

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MUĞLA İLİNDE ÇAM BASRA BÖCEĞİ (*Marchalina hellenica*
Genn. (Hemiptera: Margarodidae))'NİN FARKLI IRKLARININ
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE
ORTAYA KONULMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMA KILIÇ

HAZİRAN 2013
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MUĞLA İLİNDE ÇAM BASRA BÖCEĞİ (*Marchalina hellenica* Genn.
(Hemiptera: Margarodidae))'NİN FARKLI IRKLARININ MORFOLOJİK
VE MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE ORTAYA KONULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMA KILIÇ

HAZİRAN 2013
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SEMA KILIÇ tarafından hazırlanan MUĞLA İLİNDE ÇAM BASRA BÖCEĞİ (*Marchalina hellenica* Genn. (Hemiptera: Margarodidae))' NİN FARKLI IRKLARININ MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE ORTAYA KONULMASI başlıklı tezinin, 12/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

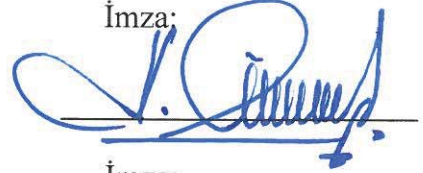
TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK
Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL
Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Eyyüp Mennan YILDIRIM
Biyoloji Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:



İmza:



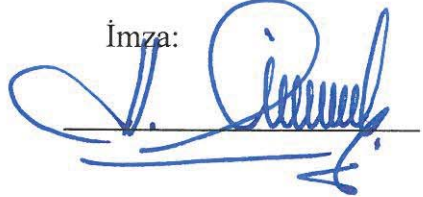
İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK
Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 12/06/2013

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Sema KILIÇ

24/05/2013

ÖZET

MUĞLA İLİNDE ÇAM BASRA BÖCEĞİ (*Marchalina hellenica* Genn. (Hemiptera: Margarodidae))'NİN FARKLI IRKLARININ MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE ORTAYA KONULMASI

Sema KILIÇ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Haziran 2013, 50 sayfa

Dünya çiçek balı piyasasında diğer ülkelerle çeşitli nedenlerle rekabet edemeyen Türkiye, çam balı ihracatı konusunda rakipsiz durumdadır (Günaydın 2009). Dünyadaki çam balı üretiminin %90'ı Türkiye'de gerçekleşmektedir. Türkiye ve Yunanistan'da çam balının ana kaynağı *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae)'nın (Çam Pamuklu koşnili, Basra, çam basrası) salgıladığı ballı maddedir. Yunanistan'da elde edilen çam balının % 60'ı *M. hellenica*'nın ballı maddesinden, % 35'nektar ve % 5'de yine diğer böceklerin ballı maddesinden elde edilmektedir.

M. hellenica'nın popülasyonundaki azalmalar yıllık çam balı veriminde ve üretiminde önemli düşüslere neden olmaktadır. Bu nedenle; Muğla ili ilçelerinden farklı yükseklik ve ekolojik koşullara sahip lokasyonlardaki basralı ormanlardan toplanan çam basra böceği erginlerinin morfolojik olarak farklılıklarının ortaya konularak ırklarının teşhisleri yapılması çalışmanın önemli bir amacıdır.

Muğla ilindeki farklı ilçelerden farklı ekolojik, coğrafik ve topografik koşullara sahip fıstık ve kızılçam ormanlarından toplanan çam basra böceği erginleri üzerinde yapılan morfolojik analizlerle farklılıkları tespit edilen çam basra böceği erginlerine karşın, son derece hızlı sonuç veren moleküler bir teknik olan RAPD (Rasgele Üretilen Polimorfik DNA) PCR tekniği kullanılarak, toplanan bireylerin DNA ekstraksiyonları yapılmış ve RAPD band desenleri çıkarılarak moleküler bazda farklılıkları ortaya konulmuştur.

Çalışma sonucunda Sakarkaya-Fethiye ilçelerinden toplanan *M. hellenica*'nın genetik olarak birbirine en yakın olduğu ve Marmaris (İnbükü)-Bodrum (Mazı) ilçelerinden toplanan *M. hellenica*'nın ise genetik olarak birbirine en uzak olduğu yapılan RAPD-PCR verilerinin dendrogramda değerlendirilmesi sonucu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Marchalina hellenica*, RAPD, PCR, Çam balı, Dendrogram

ABSTRACT

PINE BASRA BETTLE’S (*Marchalina hellenica* Genn. (Hemiptera: Margarodidae)) DIFFERENT STRAIN EXHIBIT WITH MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR REAGENT IN MUGLA

Sema KILIÇ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

June 2013, 50 pages

World’s flower honey staple for various reasons can not compete with another countries, but Turkey is unrivaled to export (Günaydın, 2009). 90% of the world’s honey production takes place in Turkey. Turkey and Greece, pine honey substance secreted by the main source of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) (Pine Cotton Koşnil, Basra, Pine’s Basra). In Greece, 60% pine honey from the *M. hellenica*’s substance of honey, 35% nectar and 5% stil other insects are substances from honey.

Pine honey yield and production is the raw material of pine honey from pine Basra betle. Important point of this study, there for, counties in the province of Mugla locations with different heights and ecological conditions pine Basra beetle’s adults diagnostic exhibit the morphological differences in pine forest.

Different districts in the province of Mugla’s (different ecological, geographical and topographical conditions) peanuts and pine forests harvest pine Basra beetle’s adults exhibit the morphological differences, which is a technique that works extremely fast molecular RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA) PCR technique was carried out pattern of RAPD band.

This study, we determined Sakarkaya-Fethiye countries pick to harvest *M. hellenica* genetically of nearest and Marmaris (İnbükü)-Bodrum (Mazı) countries pick to harvest *M. hellenica* genetically of furthest in RAPD-PCR diagrams.

Keywords: *Marchalina hellenica*, RAPD, PCR, Pine honey, Diagrams

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen, öngörüsüne, yerinde tespitlerine, tecrübelerine ve değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan SUNGUR CİVELEK' e teşekkür ederim.

Moleküler çalışmalarında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyokimya Laboratuvarının tüm imkânlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen, gerekli tespitleriyle değerli bilgileriyle yönlendirmeleri yapan, tecrübeleriyle destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL ve laboratuvar ekibine teşekkür ederim.

Örneklerin toplanması amacıyla yapılan arazi çalışmalarında doktora öğrencisi Oktay DURSUN, lisans öğrencileri olan Neziha BEŞİKTEPE ve Zeynep ARIÖZ' e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Entomoloji Laboratuvarı' ında yüksek lisans yapmakta olan Okay DEMİRAL, Hatice KAVAK, Özgür KABAN, Orhan DİNÇAY ve Mert KOSOVAERİ' ne teşekkür ederim.

Çalışmalarında büyük yardımları olan, ilgi ve desteklerini esirgemeyen ailem Mustafa KILIÇ, Şerife KILIÇ ve arkadaşlarım Zuhul ZORLU, Ali YUMAK, Cumhur ÖZYANIK, Ayfer SARITAŞ' a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, BAP-12/101 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Kaynak Özetleri	2
1.3. Çam Balının Tanımı ve Türkiye' deki Önemi	6
1.4. Çam Basra Böceği (<i>Marchalina hellenica</i> (Homoptera: Margorodidae))	9
1.4.1. Çam Basra Böceği (<i>Marchalina hellenica</i>)' nin Sistematigi.....	12
1.4.2. Çam Basra Böceği (<i>Marchalina hellenica</i> (Homoptera: Margorodidae))' nin Hayat Devreleri	13
1.5. Çam Basra Böceği (<i>Marchalina hellenica</i> (Homoptera: Margorodidae))' nin Zararlısı	15
1.6. Çam Basra Böceği (<i>Marchalina hellenica</i> (Homoptera: Margorodidae))' nin Tercih Ettiği Ağaç ve Dalların Özelliği	16
1.6.1. Çam Basra Böceği (<i>Marchalina hellenica</i> (Homoptera: Margorodidae))' nin Çam Ağaçları Üzerine Etkisi	18
1.7. Çam Balının Oluşumu ve Salgılama Zamanı.....	19
1.8. Moleküler Teknikler.....	20
1.8.1. RAPD- PCR Tekniği.....	20
1.8.1.1. RAPD tekniğinin değişkenleri	22
1.8.1.2. RAPD yönteminin avantaj ve sınırlılıkları.....	23
1.8.1.3. RAPD tekniğinin uygulama alanları.....	24
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	26
2.1. Arazi Çalışmaları	26
2.2. Laboratuar Çalışmaları.....	27
2.2.1. Moleküler Çalışmalar	27
2.2.1.1. DNA izolasyonu.....	28
2.2.1.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve PCR analizi	28
2.2.1.3. Agaroz jelelektroforezi	30
2.2.1.4. Agaroz jelin boyanması.....	30

2.2.1.5. Jellerin görüntülenmesi.....	30
2.3. Veri Analizleri.....	31
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	32
3.1. DNA izolasyonu.....	32
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve RAPD Analizleri	33
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	45
EKLER.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>M. hellenica</i> familyasının sistematikteki yeri	13
Çizelge 2.1. <i>M. hellenica</i> 'ya ait örneklerin toplandığı Muğla ili alt bölgeleri.....	26
Çizelge 2.2. İzolasyonu yapılacak örneklerle ait bilgiler	27
Çizelge 2.3. RAPD analizlerinde kullanılacak olan primerleri ve sekansları	29
Çizelge 2.4. Bir Örnek İçin Kullanılan PCR Kokteyl Bileşen ve Miktarları	29
Çizelge 2.5. PCR İçin Uygulanan Reaksiyon Basamakları	30
Çizelge 3.1. Araştırmalarda kullanılan <i>M. hellenica</i> örneklerinin DNA miktar ve saflık değerleri.....	32
Çizelge 3.2. Dendrogramda elde edilen genetik uzaklıklara ait oluşan kümeler	38
Çizelge 3.3. Genetik uzaklık değerleri.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çam Balı	6
Şekil 1.2. Çam balının üretimini sağlayan Çam Basra böceği (<i>M. hellenica</i>)	6
Şekil 1.3. <i>Marchalina hellenica</i> tarafından çıkarılan salgının arılar tarafından toplanması	7
Şekil 1.4. Türkiye’de kızılçam ormanlarının yayılış alanları.....	7
Şekil 1.5. Çam Balının görünümü.....	8
Şekil 1.6. Ağaç kabukları altında bulunan <i>M. hellenica</i>	9
Şekil 1.7. <i>Marchalina hellenica</i> ’nın uzun ağız yapısı	10
Şekil 1.8. <i>Marchalina hellenica</i> ’nın ürettiği ballı madde	10
Şekil 1.9. <i>M. hellenica</i> ’nın yumurtaları	11
Şekil 1.10. Dişi <i>M. hellenica</i> ’nın görünümü	11
Şekil 1.11. Erkek <i>M. hellenica</i> ’nın ventral görünümü	12
Şekil 1.12. Erkek <i>M.hellenica</i> ’nın dorsal görünümü	12
Şekil 1.13. Salgıladığı pamukçuklarla birlikte <i>M. hellenica</i>	14
Şekil 1.14. Çam ağacında gözlemlenen yoğun Basra dönemi	14
Şekil 1.15. <i>M. hellenica</i> ’nın zararlısı <i>Leucopis sp.</i> (Diptera: Chamaemyiidae)	16
Şekil 1.16. Çam ağacının gövdesine tırmanan <i>M. hellenica</i> yoğunluğu.....	16
Şekil 1.17. a) <i>Pinus brutia</i> , b) <i>P. pinea</i> , c) <i>P. silvestris</i> d) <i>P. halapensis</i>	17
Şekil 1.18. Çam ağacının dallarında bulunan <i>M. hellenica</i> ’nın görünümü.....	18
Şekil 1.19. Basralı orman alanlarından <i>M. hellenica</i> ile bulaşık olan çam ağaçları ..	19
Şekil 1.20. Peteklere depolanan bal	19
Şekil 1.21. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi	21
Şekil 1.22. Örnek bir RAPD bant profili	22
Şekil 2.1. <i>M. hellenica</i> ’ya ait örneklerin toplandığı Muğla ili alt bölgeleri ve lokasyonları	26
Şekil 3.1. <i>M. hellenica</i> genotiplerine ait DNA’ların % 0,8’lik agarose jel üzerindeki görünümleri	32
Şekil 3.2. OPC06 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	33
Şekil 3.3. OPB18 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	34

Şekil 3.4. OPB01 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	34
Şekil 3.5. OPD20 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	35
Şekil 3.6. OPC20 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	36
Şekil 3.7. OPE17 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	36
Şekil 3.8. OPB03 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	37
Şekil 3.9. 8 farklı lokasyona ait <i>M. hellenica</i> örnekleri ile yapılan analiz sonucunda elde edilen genetik uzaklıklara ait dendogram.....	38

KISALTMALAR DİZİNİ

RAPD	Rasgele Üretilen Polimorfik DNA
PCR	Polimorfik Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
AP-PCR	Tek Primer Amplifikasyon Metodu
DAF	DNA Amplifikasyonu Parmak İzi Metodu
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
AFLP	Çoğaltılmış Parça Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarı
ISSR	Basit Dizi Tekrarları Arası
SSCP	Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi
DDGE	Denatüre Gradient Jel Elektroforezi
CAPs	Kesilmiş Amplifiye Polimorfik Dizi
SCARs	Amplifiye Edilmiş Karakterize Dizi Bölgesi

1. GİRİŞ

1.1.Amaç ve Kapsam

Çam balı Türkiye'nin rakipsiz bir ihraç ürünüdür. Çam balı üretiminde arıların en önemli kaynağı çam basra böceği, *Marchalina hellenica*'nın salgısıdır. Türkiye çam balı üretiminin yüzde % 75-80'ini Muğla yöresi karşılamakta olup bu konuda dünyanın sayılı bölgelerinden biri olması da Muğla ilini bu anlamda özel kılmaktadır. Muğla Arı Yetiştiricileri Birliği'nden alınan bilgiler doğrultusunda son 6 yıldan günümüze *Marchalina hellenica*'nın popülasyonundaki azalmalar sonucu yıllık çam balı veriminde ve üretiminde 13.000 ton gibi önemli düşüş saptanmıştır (Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği, 2008). Bu nedenle; Muğla ili ilçelerinden farklı yükseklik ve ekolojik koşullara sahip lokasyonlardaki basralı ormanlardan toplanacak çam basra böceği erginlerinin morfolojik olarak farklılıklarının ortaya konularak ırklarının teşhislerinin yapılması ve ülkemizin bu konudaki biyolojik çeşitlilik ve zenginliğine katkıda bulunulması çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Ülkemizde ilk kez farklı lokasyonlardan toplanan ve morfolojik olarak farklılıkları tespit edilen çam basra böceği *Marchalina hellenica* erginleri üzerinde son derece hızlı sonuç veren RAPD (Rasgele Üretilen Polimorfik DNA) PCR tekniği kullanılarak DNA ekstraksiyonlarının yapılması ve toplanan bireylerin RAPD band desenlerinin çıkarılarak moleküler bazda farklılıklarının ortaya konularak biyolojik ırklarının saptanmasıyla yörenin ve ülkemizin genetik zenginliğine katkıda bulunulması çalışmanın diğer bir amacını oluşturmaktadır.

Ayrıca çam basra böceğinin gerek morfolojik ve gerekse moleküler olarak DNA bandlarının çıkarılmasıyla farklı biyolojik ırklarının saptanması ve bu ırklardan hangisinin Muğla ilinde yaygın ve baskın olduğunun ilçe ve lokasyonlar bazında ortaya konulmuştur.

1.2.Kaynak Özetleri

Favia ve arkadaşları, 1994 yılında yaptıkları çalışmada *Anopheles gambiae* (Dip.: Culicidae)'nin farklı kromozom grubuna sahip olanların arasındaki farklılığı RAPD-PCR ile ortaya koymuşlardır.

Lushai ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada *Stobion avenae* (Col.: Curculionidae) türünün partenogenetik aşamalarındaki polimorfizmlerini RAPD-PCR tekniği ile ortaya koymuşlardır.

Lou ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada buğday testere arısı *Cephus cinctus* (Hym.: Cephidae)'un Amerika Birleşik Devletlerinin farklı bölgelerinden toplanmış bireyleri arasındaki farklılığını RAPD-PCR tekniğinde 60 tane rasgtele 10-oligomer kullanarak ortaya koymuşlardır. Bu amaçla RAPD-PCR tekniğinin tür içi farklılıkların saptanmasında etkili bir yöntem olduğunu ve bu yöntemin başarısının kullanılan primerlere (10-oligomer) bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Tureinaviene ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada, birbirine çok yakın olan 3 türün (*Aphis schneideri*, *A. grossulariae* ve *A. triglochinis*) RAPD-PCR tekniği ile genetik analizlerini yapmışlardır. Bu çalışmada 3 türün yanı sıra türlerin klonlarını da analiz etmişlerdir. Çalışmada 13 primer kullanılmış fakat bu primerlerden sadece 4 tanesi polimorfik sonuçlar vermiştir. Bu 4 primerle hem türler arası farklılık hem de türlerin klonları arasındaki farklılığı RAPD-PCR tekniği ile ortaya koymuşlardır.

Peng ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada pamuk afidi *Aphis gossypi* (Hem.: Aphididae)'nin RAPD-PCR yöntemi ile polimorfizmini incelemişlerdir. Sonuç olarak mevsimsel farklılıkların olduğunu ve polimorfik türlerin 3 gruba ayrıldığını ortaya koymuşlardır. Bu 3 grup bahar, sonbahar ve yaz türlerinin polimorfik olduğunu bulmuşlardır.

Morgan ve arkadaşları 2000 yılında *Liriomyza trifolii* ve *L.huidobrensis* türlerinin farklı lokasyonlardaki hem her tür içi popülasyonlarının arasındaki genetik farklılıkları hemde türler arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada RAPD-PCR tekniğinin kullanılabilirliğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada türler arası farklılığı ortaya koymak amacıyla OPA05, 7, 10 ve OPC03 primerlerini, *L.trifolii*'nin popülasyonları arasındaki farkı ortaya koymak için

OPA02, 11, OPB01, 7, 15 ve OPC18 primerlerini ve son olarak ta *L. huidobrensis* 'in popülasyonları arasındaki farklılığı ortaya koymak için de OPA09, OPB14, OPC02, 5, 12 ve 16 primerlerini kullanmışlardır *L. huidobrensis* için kullanılan primerlerden sadece bir tanesi (OPC05) farklılık göstermiş geri kalanı ise sırasıyla %81, 86, 96 oranlarında benzerlik göstermiştir. *L. trifolii* için kullanılan OPA05 primerinin popülasyonlar arası farklılığı ortaya koyduğu ve gelecekteki çalışmalar için kullanılabileceği belirtilmiştir. Buna karşın, OPB07 primerinin ise popülasyonlar arası farklılığı göstermediği, bu nedenle Bu yüzden gelecekteki çalışmalar için kullanılamayacağı belirtilmiştir.

Scheffer ve Wiegmann (2000) yaptıkları çalışmada konukçularının kültüre alınmasıyla elde ettikleri *Phytomyza* cinsine ait 23 adet tür (6 tanesinin yeni tür olduğunu düşündükleri), *Cerodontha* cinsine ait 1 tür ve *Liriomyza* cinsine ait 1 adet türün mitokondriyal COI geni baz dizi analizini yaparak soy ağacını oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda düşündükleri gibi 6 adet türün moleküler delillerle yeni tür olduklarını ve topladıkları örneklerin birbirlerinden farklı türler olduklarını ortaya koymuşlardır.

Scheffer (2000), farklı lokalitelerden topladığı 4 türe ait 35 adet bireyi molkeüler açıdan karşılaştırmış, kültüre alınmış bitkilerden ve atrapla toplayarak elde ettiği bireyleri QIAamp Blood Kit'in Blood and Body Fluid Protocol ile DNA ekstraksiyonunu yapmış ve elde ettiği DNA'lerden COI ve COII genlerini elde etmek için PCR da C1- J- 2797 (5'-CCTCGACGTTATTCAGATTACC-3') ve TK-N-3785 (5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3') (Simon ve ark., 1994) primerleri ile çoğaltmıştır. Bu yolla 937 bp'lik bir baz dizisi elde etmiş ve bu elde ettiği genin sekans analizini yapmıştır. Sonuç olarak elde ettiği sekans analizi ile bir filogenetik ağaç oluşturmuş ve 4 türü birbirinden net bir şekilde ayırt etmiştir. Ayrıca bu çalışmada *L. huidobrensis* türünün farklı bölgelerden toplanmış 31 adet bireyini de karşılaştırmış ve moleküler olarak evrimsel 2 gruba ayırdığını görmüştür.

Julian ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada *Pogonomyrmex rugosus* Emery, 1895 (Hymenoptera: Formicidae) ve *Pogonomyrmex barbatus* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae) türlerine ait karıncalarda işçi ve kraliçe bireyler arasındaki polimorfizmi 45 rastgele primer kullanarak ortaya koymuşlar ve ayrıca bu türlere ait farklılıkların farklı koloniler içerisinde bile farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Margaritopoulos ve arkadaşları (2003) Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analizi kuzey, orta ve güney Yunanistan'da toplanan altı popülasyonu temsil eden 120 adet *Marchalina hellenica* bireylerine uygulanmıştır. Çalışmada popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için 4 adet rastgele decamer primer kullanılmıştır (OPA03, OPA13, BAM, OPA20). Çalışma sonucunda ana tip ve kaynak bölgenin hem iç hem de popülasyonlar arası polimorfizim saptanmıştır. RAPD frekansları tarafından çıkarılan genetik mesafelere dayalı filogenetik analiz güney, kuzey ve orta Yunanistan'da çam ağaçlarından toplanan örneklerde daha az, köknar ağaçlarından toplanan örneklerde önemli bir genetik farklılaşmayı ortaya çıkartmıştır. Ayrıca popülasyonlar arasında önemli alt bölüm ve kısıtlı bir gen akışı gözlemlenmiştir.

El-Gohary ve Abou Zeid (2004a) yaptıkları çalışmada farklı bölgelerden topladıkları bal arılarının genetik farklılıklarını incelemişlerdir. Çalışmada bal arılarını Mısır (*Apis mellifera lamarckii* ve *A. mellifera carnica*), Sudan (*A. mellifera sudanensis* ve *Apis florea*) ve Yemen (*A. mellifera yemenitica*)'den toplamışlar ve RAPD-PCR tekniği ile 5 primer kullanarak aralarındaki genetik yakınlık ortaya konulduğunda *A. mellifera lamarckii*'nin *A. mellifera sudanensis* ve *A. mellifera carnica*'ya *A. florea* ve *A. m. yemenitica*'dan daha yakın olduğunu bulmuşlardır.

El-Gohary ve arkadaşları (2004b) Mısır'da farklı bölgelerden topladıkları farklı türlere ait 24 termit bireyinde polimorfizmi incelemek ve türlerin moleküler olarak teşhisinin yapılabilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada RAPD-PCR tekniğini kullanarak, dört cinse ait dokuz farklı türün bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Bouga ve arkadaşları (2011) Türkiye'nin 4 bölgesinden toplanan *M. hellenica* örneklerinin 12s rDNA ve COI mtDNA segmentlerinin sekans analizleri yaparak baz dizilimlerini elde etmişlerdir. Yunan örneklerinin GenBank'da bulunan 12S rDNA geninin baz dizilimlerinde dahil edilmiştir. 12s rDNA gen segmentine dayalı 13 haplotiplerin ortaya çıkmalarına rağmen, COI mtDNA geninin segment analizinde hiçbir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. En uzak popülasyonun Mudanya- Bursa ilinde olduğu bulunmuştur.

Ülgentürk ve arkadaşları (2011) *M. hellenica*'nın biyo-ekolojisini belirlemek amacıyla, 2009-2011 yıllarında Muğla, Aydın ve Antalya ormanlarında *M. hellenica* ile bulaşık 7 adet örnekleme alanında incelemeler yapmıştır. Çalışma sonunda *M. hellenica*'nın genellikle üçüncü nimf döneminde kışı geçirdiği ancak az sayıda ikinci

nimf dönemi bireyin de kışladığı ve yılda bir döl verdiği tespit edilmiştir. Nisan ayında ergin olan bireylerin yumurtlamak üzere daha kalın dallar ve gövdedeki çatlaklara yerleştiği, ovipozisyon süresinin 9.2-16.4 gün arasında değiştiği ve dişilerin 98,5-284,6 adet yumurta bıraktığı belirlenmiştir. Çalışma sırasında az sayıda *M. hellenica* erkeği gözlenirken, çok zengin bir doğal düşman kompleksi olduğu ve *Neoleucopis kartliana* (Tanasijtshuk) (Diptera: Chamaeyiidae)'ın en yaygın ve etkili predatorü olduğu saptanmıştır.

1.3. Çam Balının Tanımı ve Türkiye’de ki Önemi

Çam balı, Türkiye’ye özgü, çiçek ballarının çoğundan daha koyu renkte ve farklı şekilde oluşan ve arıların *Marchalina hellenica* salgısını kullanarak ürettikleri, kristalizasyona daha dayanıklı bir bal olup dünyada sadece Türkiye ve Yunanistan’da üretilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Çam Balı (saglik.milliyet.com.tr)

Çam balının üretimi için, çam pamuklu böceği veya halk arasında Basra böceği denilen böceğe gereksinim duyulmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Çam balının üretimini sağlayan Çam Basra böceği (*Marchalina hellenica*) ((Hatjina F. ve ark.)

Çam pamuklu böcekleri, çamın özsuğunu emerek tatlı bir madde salgırlarlar. Zoolojide bu böcek afidler sınıflandırması içinde *Marchalina hellenica* olarak adlandırılmaktadır (Anonim, 2006a). Ülkemizde, çam pamuklu koşnili (*M. hellenica*)

binlerce yıldır Marmaris-Bodrum kızılçam orman alanlarında yaşamakta ve bal arıları basra tabir edilen söz konusu koşnilin salgısını çam balı olarak üretmektedirler (Anonim, 2001) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. *Marchalina hellenica* tarafından çıkarılan salgının arılar tarafından toplanması
(www.bees.gr/blog)

Çam pamuklu böcek (basra böceği) Türkiye’de, Muğla, Aydın, İzmir, Balıkesir, Çanakkale, Antalya illerinin Ege sahil şeridi boyunca, iç bölgelerin ılıman kısımlarına biraz girecek şekilde (Menderes ovasının tamamı ve Denizli’de de bulunur) yaşamaktadır (Anonim, 2006a) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Türkiye’de kızılçam ormanlarının yayılış alanları

Çam balı dünyada %90 oranında ülkemizde ve %10 oranında Yunanistan’da üretilmektedir. Özellikle Avrupa Birliği ülkelerinin damak tadına hitap eden bu salgı balı rakipsiz ihraç ürünümüz olup; 10.000 ton civarında yıllık üretimin tamamına yakını ihraç edilerek, 9-12 milyon dolar gelir sağlamaktadır (Anonim, 2001). Türkiye çam balı üretiminin %75-80’i Muğla’daki kızılçam ormanlarından karşılanmaktadır.

Çam balı üretim dönemlerinde ülkemizin diğer illerindeki arıcılar da çam balı üretmek amacıyla (ortalama 600 aile) Muğla'ya gelmekte, üretim dönemlerinde 1.500.000 arı kolonisi çam balı üretimine katılmaktadır (Anonim, 2006b). Çam balı üretim sezonunun Ağustos ayının ikinci yarısı ile Ekim ayı ortasına kadar oluşu, yayla balı üretimi sonunda arıcılarımızın genellikle çiçek bulunmadığı dönemde bal üretimi ile gelir sahibi olmalarına imkan yaratmaktadır (Anonim, 2001).

Çam balının en önemli özelliği kıvamı bozulmadan veya donmadan yıllarca saklanabilmesidir. Bu nedenle pazarlaması da kolaydır. Rengi çiçek ballarından daha koyudur (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Çam Balının görünümü (saglik.milliyet.com.tr)

Besin değeri biraz daha düşük olmakla birlikte, özellikle boğaz (Anonim, 2006a) ve sindirim sistemi rahatsızlıklarına iyi gelmektedir (Anonim, 2006c). Balın bileşimini karbonhidratlar, proteinler, asitler, enzimler, su, nişasta ve dekstrin benzeri ürünler, aroma bileşenleri, mineraller, polen taneleri ve vitaminler oluşturmaktadır (Tolon, 1999).

Yüksek enerjili ve karbonhidratlı bir madde olan bal, tadı, aroması ve diğer üstün özellikleri nedeniyle insanlar tarafından daha çok bir besin ve enerji kaynağı olarak tüketilmekte olup, aynı zamanda tedavi edici olarak da kullanılabilmektedir. Balın antibakteriyel özelliği; asidik yapıda oluşuna, büyük oranda kuru madde (şeker) ve ayrıca enzimlerle glukozun parçalanması sonucunda oluşan antiseptik bir madde olan hidrojen peroksit içermesine bağlıdır. Çabuk sindirilmesi, bünyesindeki serbest asitler dolayısıyla yağ hazmını kolaylaştırması, anne ve inek sütündeki demir ve

diğer eksiklikleri gidermesi, iştah açması gibi özellikleri ve ayrıca sakinleştirici etkisi balın önemini daha da arttırmaktadır (Anonim, 2006b). Çam balı kristalizasyona dayanıklılığı ve önleyici özelliği ile tıpta ve gıda sektöründe çeşitli ürünlerde (örneğin dondurmalarda) bir doğal katkı maddesi olarak geniş bir kullanım alanına ve önemli ihracat potansiyeline sahip bir üründür (Anonim, 2006a). Bal, bir besin ve enerji kaynağı olması yanında çeşitli hamur işlerinde ve pastalarda da kullanılmaktadır. Kattığı hoş tat ve aromasının yanı sıra, özellikle fruktozun su tutma yeteneğinden dolayı, bu yiyeceklerin uzun süre bayatlamadan taze kalmasını sağlamaktadır (Anonim, 2006b).

1.4. Çam Basra Böceği (*Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae))

Marchalina hellenica çam ağaçlarında daha çok *Pinus halepensis* ve *P. brutia* üzerinde yaşamakta olup, az da olsa Göknar ve Ladin ağaçlarında da bulunmaktadır (Bodenheimer, 1953; Nikolopoulos 1959, 1964; Kailidis, 1965; Selmi, 1983; Gürkan ve Boşgelmez, 1989; Pollini, 1998).

Marchalina hellenica çam balı üretiminde ana etken olan bir böcektir. Bu böcek Mart ayı ortalarından sonra çam ağaçlarında görülmeye başlamaktadır. Ağaç kabuklarının altında ve küçük oyuklarda salgıladığı pamuk gibi bir örtü ile kendini saklamaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Ağaç kabukları altında bulunan *Marchalina hellenica* (bengittim.blogspot.com)

Genel olarak bu böcekler ergin durumda iken açık sarı renktedir ağız parçaları yoktur. Ergin olmayan böceklerde ise, ağız parçaları çok uzun, vücudun 3 katı civarında ve beslenmediği zamanlarda vücudun iç kısmında kıvrılmış olarak bulunmaktadır (Gounari, 2006) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. *Marchalina hellenica*'nın uzun ağız yapısı (Hatjina F. ve ark.)

Marchalina hellenica çam ağaçlarını emerek beslenmekte, pembemsi ve kırmızımsı tatlı salgı damlacıkları çıkarmakta ve bu damlacıklar bal arıları tarafından çam balına dönüştürülmektedir (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. *Marchalina hellenica*'nın ürettiği ballı madde (www.bees.gr/blog)

İlk çam ana salgı akımı Ağustos ayı ortasından sonra başlamakta, ikincisi ise Eylül ayında başlayarak Kasım ayı sonlarına kadar devam etmektedir. Erken ilkbaharda ise üçüncü ana salgı akımı başlamakla birlikte, bu tarihlerin coğrafik bölge ve iklim koşullarına göre değişiklik gösterebildiği bilinmektedir (Kailidis, 1965; Xidias, 1975;

Santas, 1979, 1983; Selmi, 1983; Avtzis, 1985; Gürkan ve Boşgelmez, 1989; Gounari, 2006). Salgı akımının ve böceğin yoğun olduğu bölgelerde arılar çok sayıda koloniyi fazla rekabet endişesi olmadan kullanarak üretim yapabilmektedirler.

Marchalina hellenica'nın yumurtaları açık sarı renkte 0.72 mm boyunda, 0.37 mm enindedir. Pamukçuk içinde yumurtalar birbirine yapışık değildir. Dişiler yumurtalarını ağaç dalının güneşi az gören kısmına bırakmaktadırlar. Yere düşmüş dişiler ise de yumurtalarını, ağacın dibinde bulunan taş parçacıklarının altlarına pamukçuk salgılayarak içine bırakmaktadırlar (Gürkan ve Boşgelmez, 1989) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. *Marchalin hellenica*'nın yumurtaları (Bacandritsos N. vd.)

Dişi *Marchalina hellenica*, limon sarısı rengine ve sırtı yuvarlaktır. Antenleri işçi arılarda olduğu gibi 11 halkalıdır. Gözleri iyi gelişmiştir. Karın halkalarında 4 çift stigma bulunmakta olup ağzı yarık şeklindedir ve kısa bir hortumu bulunmaktadır. Erginlerin ortalama boyu 7.57 mm, eni ise ortalama 3.60 mm'dir. Kanatları yoktur ve 3 çift bacağı bulunmaktadır. Bir saatte 36-120 cm hareket etmektedirler (Yeşil ve diğ., 2005) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Dişi *Marchalina hellenica*'nın görünümü (www.bees.gr/blog)

Erkek *Marchalina hellenica* ise siyahımsı koyu kahverengindedir. Anteni 9 segmentlidir. Ağız parçaları körelmiştir (Şekil 1.11). Birleşik göze sahip olup antenlerinin altında dışa bombeli şeklinde bulunmaktadır. Göğüs ve karın halkalarında dorsal skleritler bulunur. Kanat yoktur. Uzunluğu ortalama 1.73 mm, eni ise 0.80 mm'dir (Hatjina ve Bouga, 2009) (Şekil 1.12).



Şekil 1.11. Erkek *Marchalina hellenica*'nın ventral görünümü (Hatjina F. ve ark.)



Şekil 1.12. Erkek *M.hellenica*'nın dorsal görünümü (Hatjina F. ve ark.)

1.4.1. Çam Basra Böceği (*Marchalina hellenica*)'nin Sistematığı

Margarodidae familyası Hemiptera takımına ait bir türdür (Anonim, 2000) (Çizelge 1.1).

Çizelge1.1. *Marchalina hellenica* familyasının sistematikteki yeri

Alem:	Animalia
Şube:	Arthropoda
Sınıf:	Insecta
Takım:	Hemiptera
Familya:	Margarodidae
Cins:	<i>Marchalina</i>
Tür:	<i>M. hellenica</i>

1.4.2. Çam Basra Böceği (*Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae)) 'nin Hayat Devreleri

Marchalina hellenica arılar gibi yumurta ile hayata başlarlamaktadır. Yumurtalardan 6 hafta sonra çıkan larva 3 defa gömlek değiştirerek ergin hale gelmektedir. Ergin ömrünün bir yıl olduğu bilinmektedir (Hatjina ve Bouga, 1990; Yeşil ve ark., 2005).

Erginler, yüksekliğe göre Mart ayı sonundan Mayıs ayının üçüncü haftasına kadar; yumurtaları Nisan ayının başından Temmuz ayı başına kadar;

- 1. Evre nimfler Mayıs ayının üçüncü haftasından Ağustos ayının ikinci haftasına kadar değişen süreçte 33-40 gün.
- 2. Evre nimfler Haziran ayının ikinci haftasından Aralık ayının ilk günlerine kadar değişen süreçte 120 gün.
- 3. Evre nimfler ise Ekim ayının ikinci haftasından Mayıs ayının üçüncü haftasına kadar değişen süreçte 160 gün sürdüğü görülebilmektedir. Dişiler senede bir defa yumurtlamaktadır. Yumurtalar genelde Mayıs ayı başlarında bırakılmaya başlamakla beraber bu süre yüksekliğe bağlı olarak Nisan ayının başlarından Mayıs ayının ortalarına kadar sürmektedir. Bu süreçte ergin dişiler beslenmeye bırakılarak 2-4 gün pamukçuk salgılamaya başlar (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Salgıladığı pamukçuklarla birlikte *Marchalina hellenica* (www.forestryimages.org)

Daha sonra 3-12 gün süresince pamukçuklar ise 200-300 adet yumurta bırakarak hayata veda ederler. *Marchalina hellenica*'nın 1.evresi 33-40 gün sürmektedir. Yapılan araştırmalarda yüksekliğe göre bu zaman genelde Haziran ayının ortalarından Temmuz ayının sonuna kadar değişmektedir. Çam koşnilin arıcılar tarafından bal alındıkları dönem 2. evredir. Bu dönemde en yoğun balsıra oluşturlar (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Çam ağacında gözlemlenen yoğun Basra dönemi (ixnilatis33.blogspot.com)

2. dönem larvaların boyu ortalama 3.77 mm ve eni 2.09 mm'dir. 1. devre atma esnasında larvalar 5 cm kadar yer değiştirirler. Daha sonra yeni girdikleri kabuk altında beslenmeye başlarlar (Gürkan ve Boşgelmez, 1989). Burada kendilerini koruyacak pamuksu yapı oluşturlar. 2. deri değiştirmeye kadar larvalar yer

değiştirmezler. Larvaların 2. Evresi yüksekliğe bağlı olarak genelde Ekim ayının ikinci haftasından Aralık ayının son haftasına kadar 120 gün kadar sürmektedir. 2. deri değiştirme esnasında larva tekrar hareketlenir ve bu süre 3-5 gün devam ederek 3. Evreye girerler. 3. evre 160-170 gün sürmektedir. Genelde Mart ayının son günlerinden Mayıs ayının üçüncü haftasına kadar değişmektedir. 3. evre nimfleri erginleşmeden önce 3-11 gün süren pamukçuk içinde beslenmeden uyuşuk bir dönem geçirirler. *Marchalina hellenica*'nın toplam nimf (larva) dönemi 318-322 gün sürmektedir. *Marchalina hellenica*'nın bireyleri 14-16 gün görülmektedir. *Marchalina hellenica*'nın yumurtalarının % 42-94 oranında açıldığı; %12-84'ünün ergin birey olarak yaşadığı tespit edilmiştir (Hatjina ve Bouga, 1990; Yeşil ve diğ., 2005).

1.5. Çam Basra Böceği (*Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae))'nin Zararlısı

Çam Basra böceğinin en önemli zararlısı *Leucopis sp.* (Diptera: Chamaemyiidae) dir (Şekil 1.15). Parazitinin önemli bir predatör olduğu ve *Marchalina hellenica*'nın yumurta ve 1.evre nimfler ile beslenerek çok büyük zarar verdiği gözlenmiştir. Zararlının *Marchalina hellenica*'nın 2. ve 3. evrelerine zarar vermediği tespit edilmiştir. Bu zararlının en yoğun olduğu zaman yöre yüksekliklerine göre değişmekle beraber 15 Hazirandır. Laboratuvar şartlarında yapılan gözlemlerde bir *Leucopis sp.* larvasının 2 günde 41-98 adet *Marchalina hellenica*'nın yumurtasını ve 27-49 adet 1.evre nimfi tahrip ettiği tespit edilmiştir (Gürkan ve Boşgelmez, 1989).



Şekil 1.15. *Marchalina hellenica*'nın zararlısı *Leucopis* sp. (Diptera: Chamaemyiidae)
(www.nbaii.res.in)

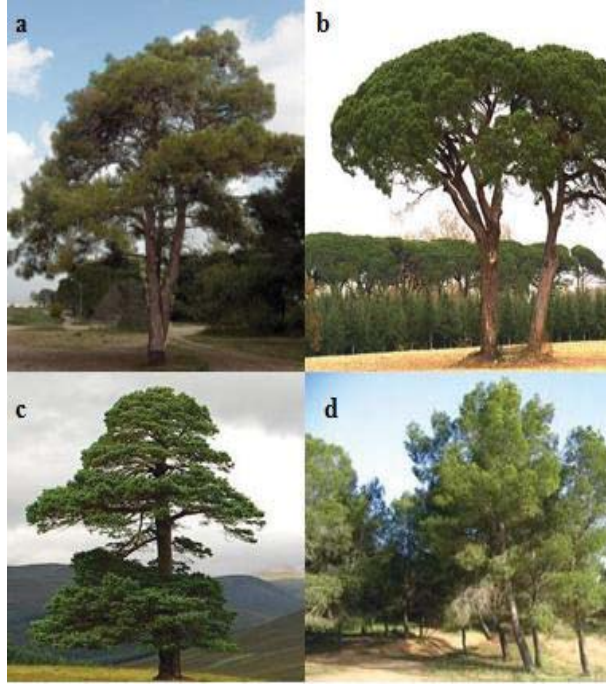
1.6. Çam Basra Böceği (*Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae))'nin Tercih Ettiği Ağaç ve Dalların Özelliği

Çam balının ham maddesini üreten çam basra böceği (*M. hellenica*) farklı ekolojik, coğrafik ve topografik koşullara sahip fıstık çamı ve kızıl çam ormanlarında konukçu olan ilk toprakta üreyip, çam ağaçlarının gövdesine tırmanan, daha sonrasında ise dallara dağılan bir böcektir (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. Çam ağacının gövdesine tırmanan *Marchalina hellenica* yoğunluğu
(ixnilatis33.blogspot.com)

Marchalina hellenica Türkiye’de daha çok kızılçam (*Pinus brutia*) ve fıstık çamı (*Pinus pinea*) üzerinde yoğun olarak görülmekle birlikte *P. silvestris*, *P. halepensis* üzerinde de bulunduğu belirtilmektedir (Bodenheimer, 1953 ve Çanakçıoğlu, 1977) (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. a) *Pinus brutia*, b) *P. pinea*, c) *P. silvestris* d) *P. halepensis*

Dünyada ise *Abies cephalonica*, *A. nordmanniana*, *Picea engelmanni*, *P. orientalis*, *Pinus halepensis*, *P. laricio tauricus*, *P. pinea*, *P. sosnowskyi*, *P. sylvestris* türlerinde bulunduğu kaydedilmiştir (Bacandritsos, 2002, 2004; Hadzibejli, 1969; Marotta ve Priore, 1992).

Marchalina hellenica ağacın güneye bakan dalların alt kısımlarında yoğun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca dal kalınlığı 51-55 cm çapında olan dallarda yoğun yaşadığı tespit edilmiştir (Şekil 1.18).



Şekil 1.18. Çam ağacının dallarında bulunan *Marchalina hellenica*'nın görünümü
(ixnilatis33.blogspot.com)

1.6.1. Çam Basra Böceği (*Marchalina hellenica*(Hemiptera: Margarodidae)) 'nin Çam Ağaçlarına Etkisi

Marchalina hellenica bazı araştırmacılar tarafından zararlı olarak (Çanakçıoğlu ve Mol 1998) tanımlanmış, fakat böceğin çam ağaçlarını öldürmediği rapor edilmiştir (Fimiani ve Solino 1994, Yeşil ve ark., 2005). Son yıllarda Zafiri ve ark. (2007) tarafından yapılan araştırmalarda böceğin çam ağaçlarında floem dokusuna doğru ksileme ulaşmadan dikine ve paralel olarak giderek ağacın kabuklarını fazla derinleştirmedeği tespit edilmiştir. İtalya'da *Marchalina hellenica*'nın tehlikeli bir zararlı olduğu kabul edilmiştir (Fimiani ve Solino, 1994), Yeşil ve arkadaşları (2005) *Marchalina hellenica*'nın çam ağaçları üzerinde bir parazit olduğunu fakat ağacın büyümesine engel olmadığını ortaya koymuşlardır (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Basralı orman alanlarından *Marchalina hellenica* ile bulaşık olan çam ağaçları
(Samos Georgios)

1.7. Çam Balının Oluşumu ve Salgılama Zamanı

Marchalina hellenica (Genn.)’nın dişi ergin evresi, deri değişirme zamanları ve 3. nimf evresini takip eden 3-11 günlük pseudopup dönemi hariç çam ağaçlarının kabukları arasında hortumlarını ağacın iletim demetlerine sokarak sürekli beslenirler. İletim demetindeki özsuda protein miktarı az bulunduğundan ihtiyaçlarını karşılamak için fazla miktarda emgi sonrasında, %80 karbonhidrat (şeker) içeren özsuyun fazlalığını anüs yolu ile dışarıya atılmaktadır. Gül kırmızısı renğinde ve hoş kokulu olan bu dışkı arılar tarafından kovanlarına taşınarak bala dönüştürülür (Gürkan ve Boşgelmez, 1989) (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Peteklere depolanan bal (www.adabasini.com)

Alçak yerlerde *M. hellenica*'nın 1. deri değiştirmeden sonra Haziran ayının son haftasında arıların toplayabileceği balsıra salgılanmaya başlar ve yüksek yerlerde bu süre Temmuz ayının son günlerini bulur. Nispi nemin %70'in üzerinde bulunduğu günlerde daha fazla salgı yapılmaktadır. 3. dönem nimfleri daha büyük olduğu için bu dönemde daha fazla salgı yapıldığı gözlenmiştir. Bal salgılama işlemi alçak yerlerde Mart ayı sonuna kadar, yüksek yerlerde Mayıs ayı başına kadar sürmektedir (Yeşil ve diğ., 2005).

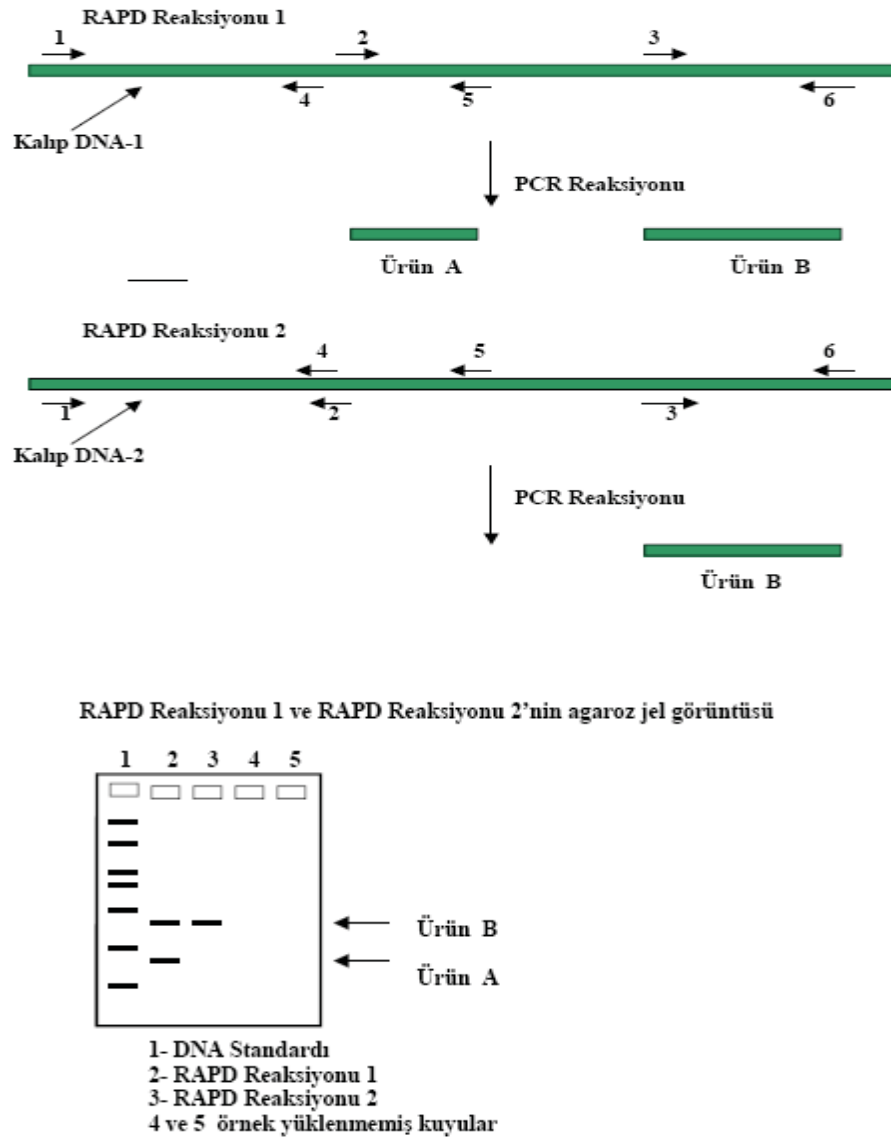
1.8. Moleküler Teknikler

M.Ö. 3. yüzyılda Aristo ile başlayan sistematik bilimi, temel olarak büyük ölçüde morfolojik karakter temeline dayanmaktadır. Bu geleneksel yaklaşımlar bazı değişimlerle günümüzde de en yaygın ve güvenilir olarak kullanılmaktadır. Ancak tür sınırlarının tanımlanmasında sadece morfolojik verilerin yeterli olmadığı değişik durumlar mevcuttur (Hillis ve Moritz, 1990; Işık, 1997). Bu durumdaki sorunları ve sistematik problemleri çözmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sitogenetik çalışmalar, kimyasal içerik çalışmaları ve farklı biyokimyasal belirteçlerin kullanıldığı izozim çalışmalarıdır (Hillis ve Moritz, 1990; Quicke, 1993; Buth, 1984). Sistematik problemlerin çözümündeki en son gelişmeler ise farklı DNA temelli belirteç sistemleriyle genotipin doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmesi üzerinde olmuştur. Bu DNA temelli farklı analizler, pek çok sorunun çözümünde umut verici görülmektedir (Crawford, 1990; Doyle ve Doyle, 1991).

1.8.1. RAPD-PCR Tekniği

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

yayınlanmıştır (Caetano-Anolles ark., 1991). Şekil 1.21’de RAPD tekniğini kısaca özetleyen şekil görülmektedir.



Şekil 1.21. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi (Anonim, 2009a'dan)

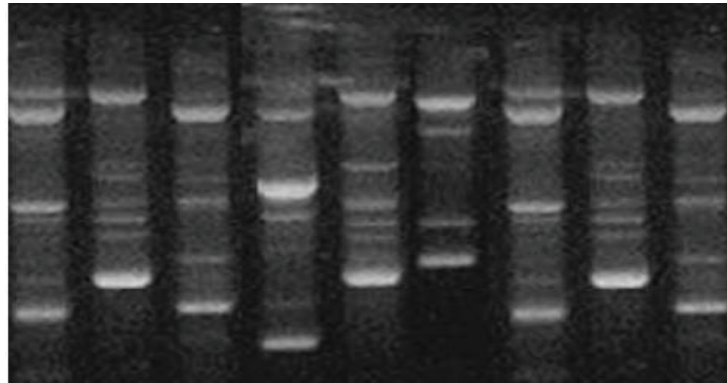
(RAPD-1, RAPD-2 Reaksiyonları bir tane primer ve iki tane farklı kalıp DNA kullanılmıştır.

- a) Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziye sahip primerin kopyalarıdır,
- b) Okların yönü DNA sentez yönünü belirlemektedir,
- c) Sayılar kalıp DNA’da primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir.

1.RAPD reaksiyonunda 2 ve 5 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün A, 3 ve 6 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

2.RAPD reaksiyonunda sadece 3 ve 6 pozisyonları arasındaki bölgedeki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır. Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2'ye eklenen primerlerin tümünden PCR sonucu bant elde edilemez. Elde edilebilen bantlar agaroz jelde görüntülenebilmektedir.

RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9- 10 bp (baz çifti) oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında (30-35°C) tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Williams vd., 1990; Welsh ve McClelland, 1990). Şekil 1.22'de RAPD bant profillerini gösteren örnek bir agaroz jel fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 1.22. Örnek bir RAPD bant profili (Anonim, 2009a'dan).

1.8.1.1. RAPD tekniğinin değişkenleri

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır (Williams ark., 1990; Welsh ve McClelland, 1990; Rafalski vd., 1994; Tingey ve Del Tufa, 1993). En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'nın miktarı ve kalitesidir (Hallden, 1998; Aljanabi vd., 1999). MgCl₂ konsantrasyonu, Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denaturasyon, primer karışımları

RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir (Khandka vd., 1997; Kohel ve Park, 1993; Rafalski vd., 1994; Mathieu-Daude vd., 1997; Atienzar vd., 2000; Doulis vd., 2000; Hallden ve Sall, in press; Hallden vd., 1996). Ayrıca PCR’da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir (Weeden vd., 1992; Hansen vd., 1998). RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir (Hallden, 1998). Moleküler sistematik çalışmalarında organizmalardan öncelikle DNA’nın izolasyonu gereklidir. DNA’nın izolasyonunun başarıyla uygulanmasını sağlayan değişik yöntemler vardır (Doyle ve Doyle, 1987; Khanuja vd., 1999). Ancak her yöntem her canlı için saf DNA eldesi açısından uygun olmamaktadır (Do N. ve Adams, 1991). Bu metodta kullanılan primerler 9- 10 bp uzunluğundadır. Kullanılan primerlerin, PCR’da kullanılan diğer primerlerde olduğu gibi herhangi bir palindromik dizi (baştan ve sondan okunuşları aynı olan baz dizilimlerini içermemesi) , %50-80 oranında G+C oranına sahip olması gerekir (Williams ark., 1990; Wels ve Mc Clelland, 1990). RAPD tekniğinde çoğaltma, kullanılan primerin uzunluğuna, primerin G+C içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotid’in yerine göre duyarlıdır (Williams ark., 1993). Bu teknikte $MgCl_2$, dNTP ve *Taq* DNA polimeraz konsatrasyonlarının çalışılan türlere özgü optimum koşullarının belirlenmesi reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından gereklidir (Williams ark.,1990; Welsh ve Mc Clelland, 1990; Rafalski ark., 1994; Mathieu-Daude ark., 1997; Khandka ark., 1997; Kohel ve Park, 1993).

1.8.1.2. RAPD yönteminin avantaj ve sınırlılıkları

Moleküler sistematikte kullanılan DNA temeline dayalı diğer bazı temel teknikler; Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış Parça Polimorfizm (AFLP) (Zabeau ve Vos, 1993; Vos ark., 1995), Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit (SSR) (Payne, 1997) Basit Dizi Tekrarları Arası (ISSR) (Zietkiewicz ark., 1994), Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) (Orita vd., 1989), Denatüre Gradient Jel Elektroföresi (DGGE) (Myers ark., 1987). Kesilmiş Amplifiye Polimorfik Dizi (CAPs) ve Amplifiye Edilmiş Karakterize Dizi Bölgesi (SCARs)’dir

(Konieczyn ve Ausubel, 1993; Paran ve Michelmora, 1993). Genel olarak bu tekniklerle karşılaştırıldığında RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (Williams ark., 1990; Welsh ve Mc Clelland, 1990; Hillis ve Moritz, 1990; Başibüyük ark., 2000). Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir ve bu oligonükleotid özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır (Hillis ve Moritz, 1990; Williams ark., 1990; Welsh ve Mc Clelland, 1990; Welsh ve Petersen, 1991). Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA'ları farklı olacağından oluşacak RAPD belirteçler farklı olacaktır (Glick ve Pasternak, 1998). Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak çok fazladır. Kullanılan primer sayısı artırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır (Mathieu-Daude ark., 1997). Farklı araştırmacılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır (Rafalski ark., 1994; Hallden ark., 1994). Bununla beraber metodun sınırlılıkları da vardır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek zordur (Mathieu-Daude ark., 1997). Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden evvel yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Tingey ve Del Tufa, 1993; Hallden, 1998).

1.8.1.3. RAPD tekniğinin uygulama alanları

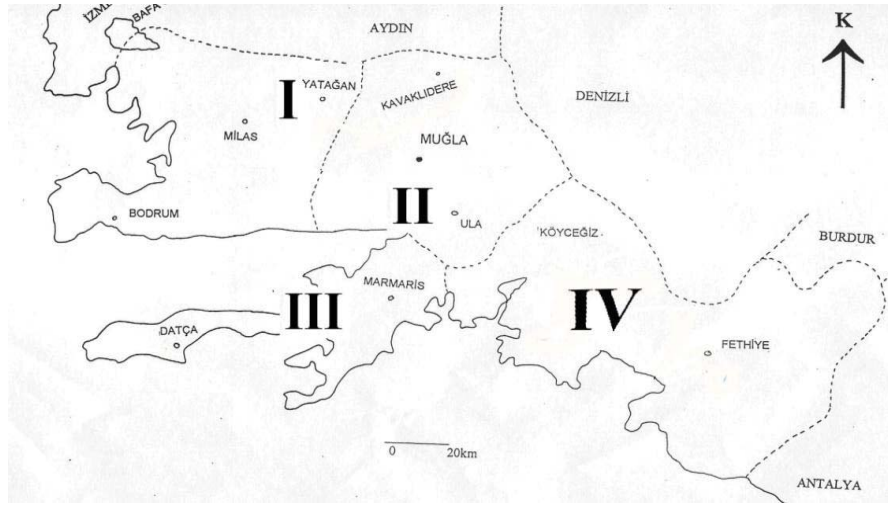
RAPD belirteç sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, popülasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür çalışmalar direkt sistematik problemleri çözmeye yönelik olabileceği gibi bu sonuçlar bazen farklı alanlarda da kullanılabilir. Örneğin

burada bahsedilen çalışmalar türlerin genetik akrabalıklarının belirlenmesi, sistematik tür problemlerinin çözümlenmesi, bitkilerde hibritlerin belirlenmesi, popülasyonlar arası ve poplasyon içi genetik eşitliliğın belirlenmesi ve buna benzer diğerk durumları kapsamaktadır. Değışik familyalara ait ve farklı özelliklere sahip birçok bitki türünün genetik akrabalığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan birçok başarılı RAPD alışması vardır (Klug ve Cummings, 2002).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Arazi çalışmaları

Tez kapsamında gerçekleştirilen arazi çalışmaları için Muğla ili 4 alt bölgeye ayrılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Marchalina hellenica*'ya ait örneklerin toplandığı Muğla ili alt bölgeleri ve lokasyonları

Bu bölgelerden *Marchalina hellenica*'ya ait örneklerin toplandığı lokasyonlar (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. *Marchalina hellenica*'ya ait örneklerin toplandığı Muğla ili alt bölgeleri

Alt Bölgeler	Lokasyonlar
I.	Milas(Sakarkaya), Bodrum(Mazı)
II.	Akbük, Sarnıç, Gökova körfezi
III.	Marmaris(Selimiye, Bayır), Datça (Aktur, Knidos)
IV.	Fethiye(Hisarönü, Faralya Köyü)

Tezin başlamasından itibaren Eylül-Ekim aylarında Muğla ilinde farklı coğrafik, topografik ve ekolojik özelliklere sahip çam basralı alanlara birer kez seyahatler gerçekleştirilmiştir.

Seyahatler boyunca basralı orman alanlarından DNA analizleri ve morfolojik farklılıkları tespit etmek amacıyla olabildiğince fazla örnekler fırça ve pens yardımı ile toplanarak içinde % 96'lık alkol bulunan eppendorf tüplere koyulmuştur. Toplanan örnekler laboratuvara getirilip moleküler analiz çalışmalarına kadar -20°C'de saklanmıştır. Örneklerin toplandığı lokasyonların kodları ve çam basra böceğinin konukçusu olan çam türü (kızılçam ya da fıstık çamı) gibi veriler not edilmiştir. Bu şekilde arazi çalışmaları 2 ay içerisinde bitirilmiş, morfolojik farklılıkların ve DNA analizlerinin yapılması için laboratuvar çalışmalarına başlanmıştır.

2.2. Laboratuvar çalışmaları

Muğla ilinde farklı coğrafik, topografik ve ekolojik özelliklere sahip çam basralı alanlardan toplanan çam basra böceğinin farklı ırklarını tespit etmek amacıyla; gerek morfolojik analizler, gerekse RAPD-PCR tekniği kullanılarak DNA analizleri yapılmıştır.

2.2.1. Moleküler Çalışmalar

RAPD-PCR çalışmasının yapılması için arazi çalışmalarında toplanan DNA izolasyonu yapılacak olan örneklerle ait bilgiler Çizelge 2.2'de verilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler üzerinde aşağıda belirtilen yöntemler ile moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.2. İzolasyonu yapılacak örneklere ait bilgiler

Moleküler No	Tür	İl	Lokasyon
1	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Marmaris(İnbükü)
2	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Bodrum(Mazı)
3	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Milas(Sakarkaya)
4	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Sarnıç
5	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Fethiye(Hisarönü)
6	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Datça
7	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Akbük
8	<i>M. hellenica</i>	Muğla	Fethiye(Faralya)

2.2.1.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda Lifton Buffer tekniği kullanılarak aşağıdaki prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

1. Örnekler, etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra ependorf tüpe aktararak mekanik yöntem kullanılarak cam çubuk ile parçalanmıştır.
2. 500 µl Lifton buffer ilave edilerek 65°C'de 35 dakika inkübe edilmiştir.
3. 250 µl 0.6 M sodyum asetat eklenip yavaşça karıştırılarak 60 dakika buz içerisinde bekletilmiştir.
4. Oda sıcaklığında 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek üst faz yeni bir ependorfa aktarılmıştır.
5. Örneğe 500 µl fenol eklenerek yavaşça karıştırılır ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
6. Daha sonra üst faz alınarak 250 µl fenol, 250 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) karışımından eklenerek oda sıcaklığında 12000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
7. Üst faz diğer bir ependorfa alınarak 1 µl RNaz (100 mg/ml) eklenerek, 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
8. 500 µl %70'lik etanol eklenerek +4 °C'de 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
9. Üst sıvı, dibe yapışan pellet düşmeyecek şekilde uzaklaştırılmıştır.
10. 500 µl %80'lik etanol eklenerek +4 °C'de 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
11. Üst sıvı boşaltılarak pellet bir gece kurumaya bırakılmıştır.
12. Alkol tamamen uzaklaştıktan sonra 50 µl ultra saf su ilave edilerek 1 saat süresinde 65°C'de inkübe edilip, dipteki DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır.

2.2.1.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve PCR analizi

RAPD analizlerinde 20 adet 10 mer'lik rastgele primer (Operon Technology Inc.) dizileri kullanılmıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. RAPD analizlerinde kullanılacak olan primerleri ve sekansları

Primer Sayısı	Nükleotid Uzunluğu	Primerin İsmi	Primerin Sekansı	Primer Sayısı	Nükleotid Uzunluğu	Primerin İsmi	Primerin Sekansı
1	10-mer	OPA-03	AGTCAGCCAC	11	10-mer	OPD-17	TTTCCCACGG
2	10-mer	OPA-08	GTGACGTAGG	12	10-mer	OPD-14	CTTCCCCAAG
3	10-mer	OPB-01	GTTTCGCTCC	13	10-mer	OPD-19	CTGGGGACTT
4	10-mer	OPB-03	CATCCCCCTG	14	10-mer	OPD-20	ACCCGGTCAC
5	10-mer	OPB-07	GGTGACGCAG	15	10-mer	OPE-17	CTACTGCCGT
6	10-mer	OPB-09	TGGGGGACTC	16	10-mer	OPE-19	ACGGCGTATG
7	10-mer	OPB-13	TTCCCCCGCT	17	10-mer	OPM-12	GGGACGTTGG
8	10-mer	OPB-18	CCACAGCAGT	18	10-mer	OPM-14	AGGGTCGTTC
9	10-mer	OPC-06	GAACGGACTC	19	10-mer	OPM-16	GTAACCAGCC
10	10-mer	OPC-20	ACTTCGCCAC	20	10-mer	OPM-17	TCAGTCCGGG

Amplifikasyon için; 0.8 mM dNTPs, 0.067 mM primer, 2.67 mM MgSO₄, 1 ünite Taq polimeraz enzimi, 10X PCR buffer (100 mM KCl, 100 mM NH₄(SO)₂, 200 mM Tris- HCl (pH 8.75), % 1 Triton X-100, 1 mg/l BSA) ve ultra saf su kullanılmıştır. Bir örnek için hazırlanan reaksiyon içeriği aşağıda belirtilmektedir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Bir örnek için kullanılan PCR kokteyl bileşen ve miktarları

10x Buffer	1.5 µl
MgSO ₄	2 µl
dNTPs	1.2 µl
Primer	1 µl
H ₂ O	4.1 µl
Enzim	0.2 µl

40 ng olacak şekilde seyreltilmiş DNA örneklerinden bir reaksiyon için 5 µl alınarak 15 µl'lik toplam reaksiyon hacmine ulaşır. PCR işlemi için amplifikasyonun gerçekleşmesinde Thermal Cycler (MJ, Research, Inc, Nevada US) cihazı kullanılmıştır. Cihaz aşağıdaki gibi programlandırılmıştır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. PCR İçin Uygulanan Reaksiyon Basamakları

1	94 °C	30 s
2	94 °C	25 s
3	35 °C	45 s
4	72 °C	1 dk
5	2, 3 ve 4. aşamalar 35 kez tekrarlanır.	
6	72 °C	5 dk
7	+4 °C	∞

2.2.1.3. Agaroz jel elektroforezi

%2'lik agaroz jel gerekli miktarda hazırlandıktan sonra elektroforez kasasına dökülerek örnek sayısına uygun taraklar kalıp olarak kullanılmıştır. Jel donduktan sonra 1xTAE tamponu bulunan kasa içerisine yerleştirilmiştir. PCR'da amplifiye olmuş DNA örnekleri jele yüklenmeden önce 2 µl brom fenolblue boyası ile boyanmıştır. PCR tüplerindeki amplifikasyon ürünü ve boyanın karışması sağlandıktan sonra örneklerden 12 µl alınarak kuyulara yükleme yapılmıştır. İlk kuyucuğa 2 µl 1 kb boyutunda moleküler ağırlık markörü (DNA ladder, Fermentas GeneRuler™) koyulmuştur. Elektroforez işlemi 100 volt'ta üç saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.4. Agaroz jelin boyanması

Elektroforez işlemi bittikten sonra jel boyama tankına alınarak, üzerine 300 µl ultra saf su içerisine 15 µl EtBr (0,5µg/µl) boyası eklenmiştir. Boyama tankı çalkalayıcı üzerine konularak 30 dakika boyunca beklenmiştir.

2.2.1.5. Jellerin görüntülenmesi

Boyama işlemi tamamlanan jeller Kodak jel görüntüleme sistemi kullanılarak, ultraviyole ışık aracıyla görüntülenerek bilgisayara aktarılmıştır.

2.3. Veri analizleri

RAPD-PCR analizleri sonucunda elde edilen polimorfik bantlar her bir örnek için bant bulunduranlar (1) ve bulundurmayanlar (0) olarak skorlanarak, elde edilen veriler Microsoft Excel dosyasında kayıt edilmiştir. Skarlama sonucu Microsoft Excel dosyası şeklinde elde edilen tablo, örneklere ait genetik uzaklıkların (GU) belirlenmesi amacıyla PHYLIP, 3.68 software programına aktarılmıştır. Microsoft Excel dosyası şeklinde oluşturulan skarlama verileri text formatına dönüştürölerek JMP software yazılımı ile yapılan cluster analizi sonucunda dendogram elde edilmiştir. Elde edilen dendograma göre bireyler arasında ırk farklılıkları olup olmadığı yorumuna gidilmiştir.

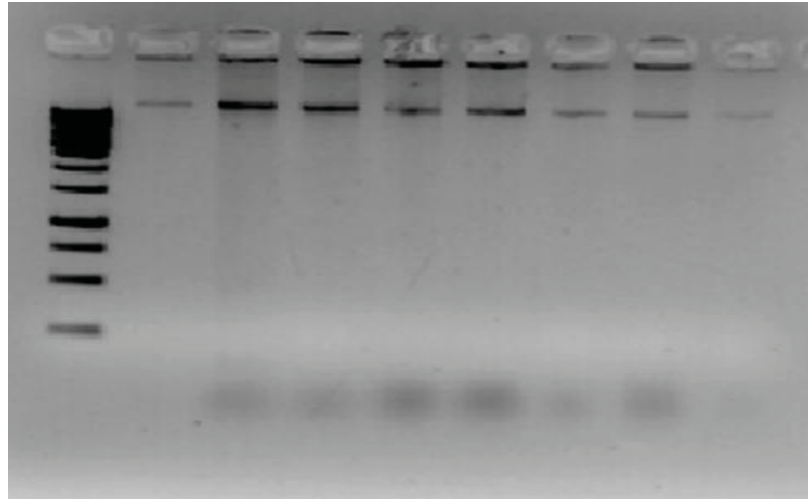
3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. DNA İzolasyonu

Bender ve ark. (1983)'nın geliştirdiği Lifton DNA izolasyonu protokolü modifiye edilerek *Marchalina hellenica* örneklerinin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'ların miktar ve saflıkları, Optizen marka spektrofotometre ile ölçülmüştür (Çizelge 3.1). Şekil 3.1'de izolasyonu yapılan DNA'ların % 0.8'lik agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 3.1 Araştırmalarda kullanılan *Marchalina hellenica* örneklerinin DNA miktar ve saflık değerleri

No	Örnek Adı	Lokasyon	OD 260 µg/µl	OD 280 µg/µl	OD 260/ 280 µg/µl
1	<i>M. hellenica</i>	Marmaris(İnbükü)	0,815	0,680	1,19
2	<i>M. hellenica</i>	Bodrum(Mazı)	0,675	0,575	1,17
3	<i>M. hellenica</i>	Milas(Sakarkaya)	0,885	0,75	1,18
4	<i>M. hellenica</i>	Sarnıç	1,2	1,015	1,18
5	<i>M. hellenica</i>	Fethiye(Hisarönü)	0,61	0,53	1,15
6	<i>M. hellenica</i>	Datça	0,8	0,695	1,15
7	<i>M. hellenica</i>	Akbük	0,555	0,48	1,15
8	<i>M. hellenica</i>	Fethiye(Faralya)	0,685	0,595	1,15



Şekil 3.1. *Marchalina hellenica* genotiplerine ait DNA'ların % 0,8'lik agarose jel üzerindeki görüntüleri

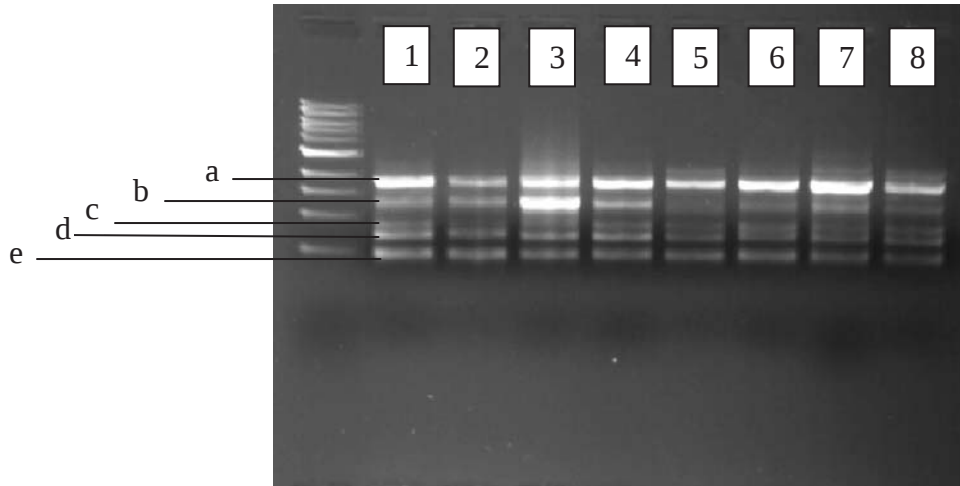
İzolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları arasında farklılıklar olduğu görülmektedir (Şekil 3.1).

Spektrofotometre verileri ve Agaroz jel görüntülerine değerlendirilerek, genotiplere ait DNA'ların RAPD-PCR uygulamaları için yeterli miktar ve saflıkta olduğuna karar verilmiştir.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve RAPD Analizleri

Çizelge 3.1'de verilmiş olan Muğla ilinden 8 farklı lokasyondan toplanan *Marchalina hellenica* türüne ait örnekler DNA izolasyonu yapılarak, 20 adet rastgele 10-mer RAPD primeri ile RAPD-PCR analizleri yapılmıştır. RAPD-PCR uygulaması yapılan örneklerden sadece 7 primer çalıştırılmıştır. RAPD-PCR sonuçlarına ait agarose jel görüntüleri Çizelge 3.1'de verilen bilgilere göre numaralandırılmıştır.

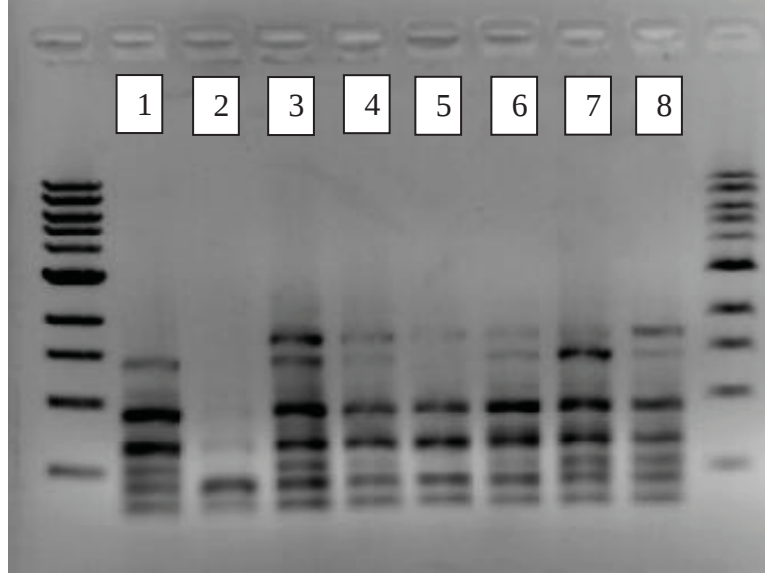
Yapılan RAPD analizi sonucunda çalıştırılmış olan 7 adet primerden 42 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Farklı primerlerin kullanımı sonucunda elde edilen bütün polimorfik bantlar her bir örnek için bant bulunduranlar (1) ve bulundurmayanlar (0) olarak skorlanarak, elde edilen veriler Microsoft Excel dosyasında kayıt edilmiştir.



Şekil 3.2. OPC06 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

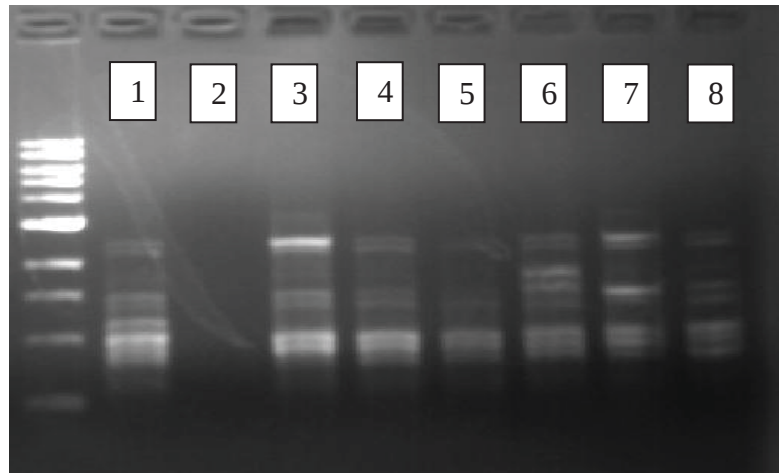
OPC06 RAPD primeri kullanılarak yapılan analiz sonucunda en iyi bant görüntüsü elde edilmiştir. Elde edilen bantlar en iyi ve en çok bant sayısına göre a, b, c, d, e

olarak isimlendirilmiş olup dendrogramda bu bantlar kullanılmıştır. Buna göre 5. lokasyonda b bantı, 2. ve 3. lokasyonda da c bandının olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3. OPB18 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

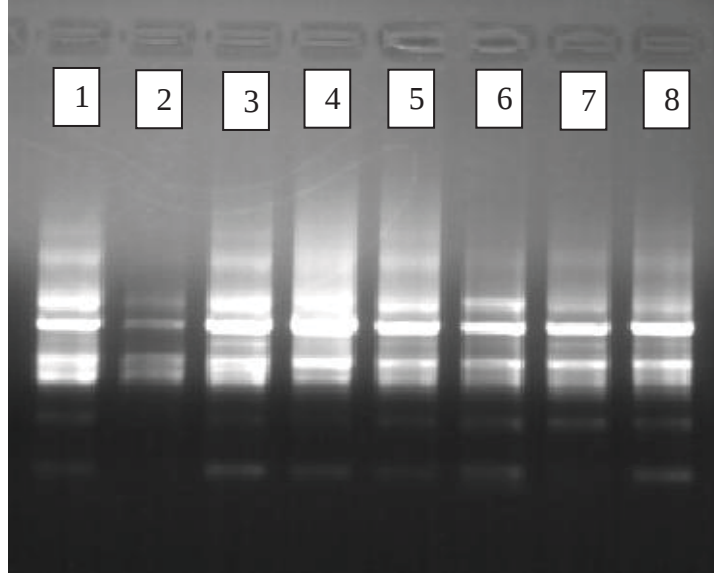
OPB18 RAPD primeri kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen bantlar a, b, c, d, e, f ve g olarak isimlendirilmiştir. Buna göre 1. ve 2. lokasyonda a bandı, 2. ve 5. lokasyonda b, e bandının olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.4. OPB01 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

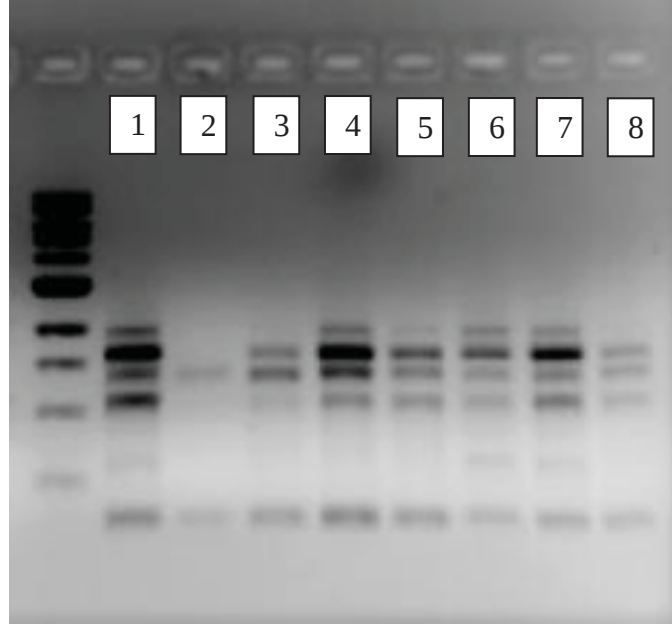
OPB01 RAPD primeri kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen bantlar a, b, c, d, e, f, g ve h olarak isimlendirilmiştir. 2. lokasyonda hiçbir bant gözlemlenmemiş olduğundan dolayı diğer lokasyonların mukayese edilebilmesi için 2. lokasyonda tüm

bantların var olduğunu varsayarak dendrogram yapılmıştır. Buna göre 1., 3., 4., 6., 7. ve 8. lokasyonlarda c bandı, 6. lokasyonda e bandı, 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. lokasyonlarda f bandının olmadığı gözlemlenmiştir.



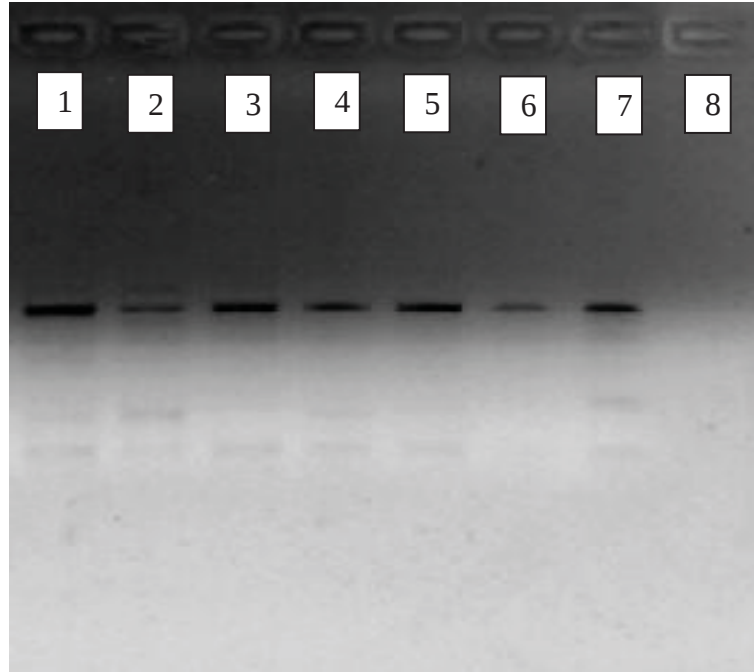
Şekil 3.5. OPD20 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

OPD20 RAPD primeri kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen bantlar a, b, c, d, e, f, g ve h olarak isimlendirilmiştir. Buna göre 2. lokasyonda a bandı, 1., 2., 4. ve 6. lokasyonlarda d bandı, 2. lokasyonda g, 2. ve 7. lokasyonda h bandının olmadığı gözlemlenmiştir.



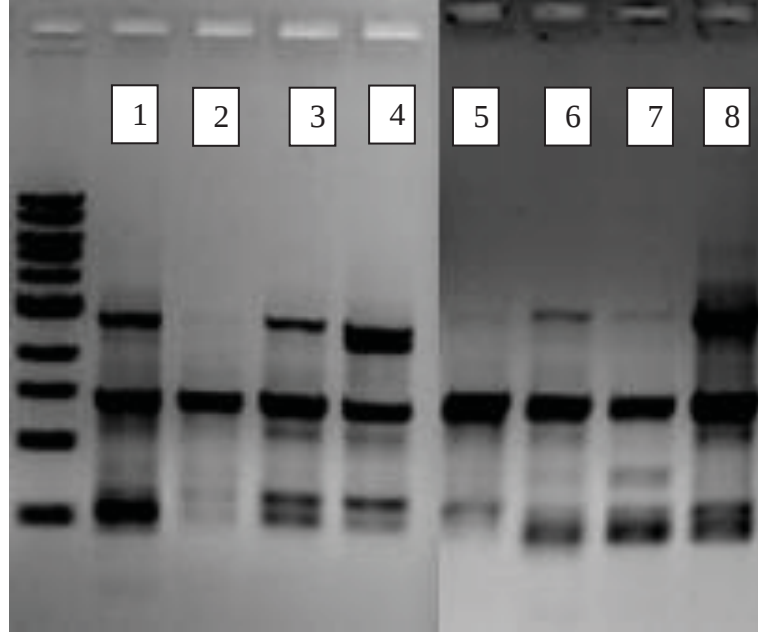
Şekil 3.6. OPC20 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

OPC20 RAPD primeri kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen bantlar a, b, c, d, e ve f olarak isimlendirilmiştir. 2. lokasyonda bantların çok net olmadığı gözlemlenmiş olduğundan dolayı diğer lokasyonların mukayese edilebilmesi için 2. lokasyonda tüm bantların var olduğunu varsayarak dendrogram yapılmıştır. Buna göre 2. lokasyonda a bandı, 3., 4., 5. ve 8. lokasyonlarda e bandının olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.7. OPE17 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

OPE17 RAPD primeri ile yapılan analiz sonucunda 1 bant haricinde diğer bantlar hakkında kesin bir yorum yapılacak görüntü elde edilemediği için sadece a bandı dendrogramda veri olarak kullanılmıştır. Buna göre de sadece 8. lokasyonda a bandı gözlemlenmemiştir.

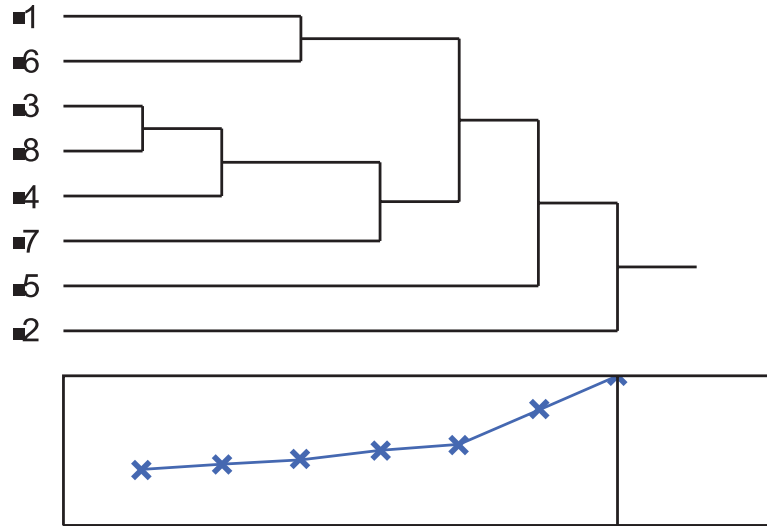


Şekil 3.8. OPB03 RAPD primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü

OPB03 RAPD primeri ile yapılan analiz sonucunda elde edilen bantlar a, b, c, d, e, f ve g olarak isimlendirilmiştir. Buna göre 5. ve 7. lokasyonda b bandı, 4. ve 5. lokasyonda da e bandının olmadığı gözlemlenmiştir.

Tez kapsamında 20 adet rastgele 10-mer RAPD primeri ile RAPD-PCR analizleri yapılmış olup bu primerlerden sadece 7 adet primer çalıştırılmıştır ve bu primerler ile dendrogram oluşturulmuştur.

Polimorfik bantların skorlanması sonucu Microsoft Excel dosyası şeklinde elde edilen skorlama tablosu örneklere ait genetik uzaklıkların (GU) belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (PHYLIP, 3.68). Microsoft Excel dosyası şeklinde oluşturulan skorlama verileri text formatına dönüştürülerek JMP yazılımı ile yapılan cluster analizi sonucunda dendrogram elde edilmiş (Şekil 3.10). Örnekler arasındaki genetik uzaklıklar ise 0.0488 ile 0.3704 uç değerleri arasında yer almıştır (Çizelge 3.3).



Şekil 3.9. 8 farklı lokasyona ait *Marchalina hellenica* örnekleri ile yapılan analiz sonucunda elde edilen genetik uzaklıklara ait dendrogram

Yapılan RAPD-PCR analiz sonucu DNA bant desenleri kullanılarak elde edilen dendrogram analizine bakıldığında 3. ve 8. lokasyon genetik olarak birbirine en yakın lokasyonlardır. 1. ve 2. lokasyonlar genetik olarak birbirine en uzak lokasyonlardır.

Dendrogramda elde edilen genetik uzaklıklara ait oluşan kümeler arasında ki mesafeler Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Dendrogramda elde edilen genetik uzaklıklara ait oluşan kümeler

Küme Sayısı	Distance(mesafe)	Leader(lider)	Joiner
7	2,516611478	3	8
6	2,748737084	3	4
5	2,943920289	1	6
4	3,370624736	3	7
3	3,640054945	1	3
2	5,170889212	1	5
1	6,715298809	1	2

Çizelge 3.3. Genetik uzaklık değerleri

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	Lokasyon	Lokasyon	Lokasyon	Lokasyon	Lokasyon	Lokasyon	Lokasyon	Lokasyon
1.Lokasyon	0.0000							
2. Lokasyon	0.2113	0.0000						
3. Lokasyon	0.1268	0.3037	0.0000					
4. Lokasyon	0.1001	0.3365	0.0741	0.0000				
5. Lokasyon	0.2719	0.3365	0.1823	0.1542	0.0000			
6. Lokasyon	0.0741	0.3037	0.1001	0.0741	0.2412	0.0000		
7. Lokasyon	0.1268	0.3037	0.1001	0.1268	0.1823	0.1001	0.0000	
8. Lokasyon	0.1268	0.3704	0.0488	0.0741	0.1823	0.1001	0.1001	0.0000

Biyolojik çeşitlilik bir bölgedeki genlerin, türlerin, ekosistemlerin ve ekolojik olayların oluşturduğu bir bütündür. Buradan da anlaşıldığı gibi biyolojik çeşitlilik birbirini takip eden 3 ögeden oluşmaktadır; bunlardan ilki genetik çeşitliliktir. Genetik çeşitlilik, bir bireyin sahip olduğu genler tarafından belirlenen genetik bilgilerin toplamıdır veya bir tür içindeki çeşitliliği ifade eder. Bu çeşitlilik, belli bir tür, popülasyon, varyete, alt-tür ya da ırk içindeki genetik farklılıkla ölçülür. İkincisi tür çeşitliliğidir. Tür çeşitliliği, belli bir bölgedeki, alandaki ya da tüm dünyadaki türlerin farklılığını, bir bölgede mevcut olan canlı türlerinin sayısını ifade eder. Üçüncü öge ise ekosistem çeşitliğidir. Belli bir alanda yaşayan ve birbirleriyle sürekli etkileşim içinde olan canlılar ve bunların cansız çevreleriyle birlikte oluşturduğu bütüne “ekosistem” denir. Orman, göl, ırmak, deniz ve kent ekosistemleri gibi belirli bir alandaki farklı ekosistemlerin sayısını ifade eder (Anonim, 2007c; 2009b).

Türkiye biyolojik çeşitlilik açısından küçük bir kıta özelliği göstermektedir. Anadolu, kendi başına ayrı bir kıta olmamakla birlikte, bir kıtanın sahip olabileceği tüm ekosistem ve habitat özelliklerine tek başına sahiptir. Bunun nedenleri arasında üç farklı biyoiklim tipinin görülmesi, bünyesinde Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan olmak üzere üç Biyocoğrafik Bölge bulundurması, sahip olduğu topoğrafik, jeolojik, jeomorfolojik ve toprak çeşitlilikleri, deniz, göl, akarsu, tatlı, tuzlu ve sodalı göller gibi değişik sulak alan tiplerinin varlığı, 0- 5000 metreler arasında değişen yükselti farklılıkları, derin kanyonlara ve çok farklı ekosistem tiplerine sahip olması, Avrupa ülkelerine göre buzul döneminden daha az etkilenmesi, kuzey Anadolu’yu güney Anadolu’ya bağlayan Anadolu Diyagonalinin varlığı ve buna bağlı olarak

oluşan ekolojik ve floristik farklılıklar ile üç kıtanın birleşme noktasında yer alması sayılabilir.

Marchalina hellenica'nın genetiği ile ilgili çalışmalarda dikkate alınması gereken önemli noktalar vardır. Bunlar; Parthenogenetik ürettiği için erkek *M. hellenica* çok nadir görülmesi ve dişi *M. hellenica*'nın ise kanatları olmadığı için uzun mesafeler boyunca dağılması yani göç edebilmesinin mümkün olmadığıdır (Sureyya & Hovasse, 1930; Erlinghagen, 2001; Kailidis, 1991). Burada ortaya çıkan soru türün coğrafi olarak uzak popülasyonları arasında genetik olarak farklı olup olmadığıdır. Bu çalışmanın sonucu incelendiğinde çalışılan 8 lokasyon arasında ayırım gösteren önemli bir işaret ortaya çıkmamıştır. Ancak genetik polimorfizm için yapılan veri analizi sonucunda lokasyonlar arasında bir ölçüde genetik varyasyon olduğu gözlemlenmiştir. Düşük göç yeteneği coğrafi olarak uzak popülasyonlar arasında genetik farklılaşmaya yol açabilir.

Margaritopoulos ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analizi kuzey, orta ve güney Yunanistan'da toplanan altı popülasyonu temsil eden 120 adet *Marchalina hellenica* bireylerine uygulanmıştır. Popülasyonlar arasında genetik çeşitliliği değerlendirmek için 4 adet rastgele decamer primer kullanıldı (OPA03, OPA13, BAM, OPA20). Çalışma sonucunda ana tip ve kaynak bölgenin hem iç hem de popülasyonlar arası polimorfizm saptandı. RAPD frekansları tarafından çıkarılan genetik mesafelere dayalı filogenetik analiz güney, kuzey ve orta Yunanistan'da çam ağaçlarından toplanan örneklerde daha az, köknar ağaçlarından toplanan örneklerde önemli bir genetik farklılaşma ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca popülasyonlar arasında önemli alt bölüm ve kısıtlı bir gen akışı gözlemlenmiştir.

Muğla ilindeki farklı ilçelerden fıstık ve kızılçam ormanlarından toplanan farklı ekolojik, coğrafi ve topografik koşullara sahip *Marchalina hellenica* böceğinin genetik farklılıklarını belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışma sonucunda Sakarkaya- Fethiye ilçelerinden toplanan *Marchalina hellenica*'nın genetik olarak birbirine en yakın olduğu ve Marmaris (İnbükü)-Bodrum (Mazı) ilçelerinden toplanan *Marchalina hellenica*'nın ise genetik olarak birbirine en uzak olduğu yapılan RAPD-PCR verilerinin dendrogramda değerlendirilmesi sonucu ortaya konulmuştur.

Tez çalışması süresince, 8 lokasyondan toplanan örneklere 20 adet 10’mer li primer kullanılarak 160 PCR uygulaması yapılmıştır. Bunların sonucunda 7 adet primer çalıştırılmış ve 8 lokasyona ait bireyin bant görüntüleri elde edilmiştir. Çalışılan böcek türlerinin vücutlarının çok küçük olması DNA izolasyonu sonrasında elde edilen verimin az olmasına neden olabilir. Çalışmayan primerlerin bir sebebin bu olduğu düşünülmektedir. DNA izolasyonu çalışmalarında 10’ar adet böcek kullanılmasına rağmen başlangıçta daha az böcek kullanılarak yapılan DNA izolasyonu sonucu sağlanamamıştır. Tez çalışmasında Eylül-Ekim ayları arasında Çizelge 2.1’de belirtilen bölgelere seyahat edilmesine rağmen bazı lokasyonlarda *Marchalina hellenica* popülasyonunun az olmasından dolayı örnekler toplanmamıştır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemiz çam balı ihracatı konusunda rakipsiz durumdadır (Günaydın, 2009). Dünyada'ki çam balı üretiminin %90'ı Türkiye'de gerçekleşmektedir. Çam balının ana kaynağı *Marchalina hellenica*'nın salgıladığı ballı maddedir (Kunkel, 1997). Türkiye çam balı üretiminin %75-80'ini Muğla yöresi karşılamaktadır. Son 6 yıldan günümüze *Marchalina hellenica*'nın popülasyonundaki azalmalar sonucu yıllık çam balı veriminde ve üretiminde 3. 000 ton gibi önemli düşüş olduğu saptanmıştır. Bu nedenle; Muğla ili ilçelerinden farklı yükseklik ve ekolojik koşullara sahip lokasyonlardaki Basralı ormanlardan toplanan Çam Basra Böceği (*M. hellenica*) genetik farklılıkları ortaya konularak ülkemizin biyolojik zenginliğine ve ülke ekonomisine katkıda bulunmak amacıyla yapılan bir ön çalışmadır.

Muğla ilindeki farklı ilçelerden fıstık ve kızılçam ormanlarından toplanan farklı ekolojik, coğrafik ve topografik koşullara sahip *M. hellenica* böceğinin genetik farklılıklarını belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışma sonucunda Sakarkaya-Fethiye ilçelerinden toplanan *Marchalina hellenica*'nın genetik olarak birbirine en yakın olduğu ve Marmaris (İnbükü)-Bodrum (Mazı) ilçelerinden toplanan *Marchalina hellenica*'nın ise genetik olarak birbirine en uzak olduğu yapılan RAPD-PCR verilerinin dendrogramda değerlendirilmesi sonucu ortaya koyulmuştur.

Genetik farklılığı saptamak amacıyla hem kolay olması hem de ekonomik olmasından dolayı RAPD-PCR tekniği kullanılmıştır. Bu kapsamda farklı coğrafik, ekolojik ve topografik alanlardan ekonomik öneme sahip olan *Marchalina hellenica* toplanarak DNA izolasyonları yapılmıştır. RAPD tekniği için genomik DNA, izolasyonu sağlanmıştır. Daha sonra bahsedilen teknikler kullanılarak elde ettiğimiz türlerin birbirlerine genetik yakınlık ve uzaklıkları materyal ve metot kısmında belirtilen çeşitli istatistik programları kullanılarak ortaya konulmuştur.

Gerçekleştirilen RAPD çalışması sonucu, farklı coğrafik alanlardan toplanan örneğin genomik DNA'ları baz alınarak genetik uzaklık tablosu ile birbirlerine yakınlık ve uzaklıkları ortaya konmuş, söz konusu primerlerin denenmesiyle de oluşturdukları PCR ürünleri karşılaştırılmaları yapılmıştır. Veriler uygun JMP bilgisayar programına girilerek örneklere ilişkin dendrogram elde edilmiştir.

Elde edilen dendrogram sonucunda 7 adet grup oluşmuştur. Oluşan gruplar farklı lokasyonlardan toplanan türün yakından ilişkisini göstermektedir. Dendrogramda 7 no'lu grupta yer alan 3 no'lu örnek (*M. hellenica*, Sakarkaya) ve 8 no'lu örnek (*M. hellenica*, Fethiye) birbiri ile genetik olarak en yakın türlerdir ve dendrogramda en kısa 2,516611478 mesafede bir araya gelmektedirler.

Dendrogram 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. grupta yer alan *Marchalina hellenica* türüne ait farklı lokasyonlardan toplanan örnekler bu grupları oluşturmaktadırlar ve bu türlerin genetik olarak uzak oldukları doğrulanmaktadır.

Dendrogramda 1 no'lu grupta yer alan 1 no'lu örnek (*M. hellenica*, İnbükü) ve 2 no'lu örnek (*M. hellenica*, Mazi) birbiri ile genetik olarak en uzak türlerdir ve dendrogramda en uzun 6,715298809 mesafede bir araya gelmektedirler.

Dendrogram sonucu elde edilen genetik uzaklık değerlerine bakıldığında (Çizelge 3.3) 3 no'lu (*M. hellenica*, Sakarkaya) ve 8 no'lu (*M. hellenica*, Fethiye) türün oluşturduğu grup genetik olarak birbirine en yakın türlerdir. Genetik uzaklık matrisinde de bu iki türe ait genetik uzaklık değeri 0.0488 olarak bulunmuştur. 2 no'lu (*M. hellenica*, Mazi) ve 8 no'lu (*M. hellenica*, Fethiye) grupların genetik uzaklık matrisinde uzaklık değeri 0.3704'dir ve buna göre analiz edilen örnekler arasında birbirine en uzak olan türlerdir.

Analizde kullanılan primerler, toplam rastgele seçilmiş olan 20 primerin taranmasıyla belirlenmiş ve bunlar arasından, en iyi bant deseni ve polimorfizmini oluşturan 7 primer dendrogram analizlerinde kullanılmıştır. Toplam bant sayısı 42 olup, kullanılan primerler 1 ile 8 arasında bant oluştururken, polimorfik bant sayısı da 1 ile 4 değişim göstermiştir. Bantların polimorfizim oranları, % 19,04 (OPE17), % 38,09 (OPC06, OPB03, OPC20), %57,14 (OPB18, OPB01), %76,19 (OPD20)'dir.

Ülkemizde ilk kez farklı lokasyonlardan toplanan ve morfolojik olarak farklılıkları tespit edilen Çam Basra böceği *Marchalina hellenica* üzerinde son derece hızlı sonuç veren RAPD (Rasgele Üretilen Polimorfik DNA) PCR tekniği kullanılması çalışmanın önemli bir unsurudur. Yapılan bu ön çalışma bundan sonra gerçekleştirilecek olan çalışmalara ışık tutması amacı ile *Marchalina hellenica*'nın Muğla ili ilçelerinde genetik uzaklık ve yakınlıklar ortaya konulmuştur.

Gerek Ülkemizde ve gereksede Muğla ilinde yapılacak olan *Marchalina hellenica*'nın popülasyon yoğunluklarına ait çalışmalar ile birlikte, çalışma

sonucunda tarafımızdan bulunan bu sonuçlar birlikte değerdendirildiğinde ekonomik olarak çok önemli bir böcek olan *Marchalina hellenica*'nın popölasyonu korunabilir veya aşılama yöntemi kullanılarak popölasyon yoğunluğunun artırılması sağlanabilir. Böylelikle hem ölke hemde yöre ekonomisine büyük katkılar sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Aljanabi, S.M., Forget, L., Dookun, A. (1999) An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polisaccaride and Polyphenol-Free Sugarcane, *Plant Mol Biol Rep*, 17: 1- 8.
- Anonim, *Çam Balı*, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ankara, 2001.
- Anonim, *Çam Balı*, http://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%87am_bal%C4%B1, 2006a.
- Anonim, *Çam Balı*, Muğla İli Arı Yetiştiricileri Birliği Çalışma Raporu, http://www.maybir.org.tr/index.php?option=com_content&task=view&id=50&Itemid, 2006b.
- Anonim, *Bal*, <http://www.tarimkredi.org.tr/modules.php?name=Content>, 2006c.
- Anonim, Yeşil Kutu <http://www.yesilkutu.net> (2007c).
- Anonim, *Çam Balı*, Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma Ve Uygulama Merkezi, <http://www.akdeniz.edu.tr/tbaum/uygulamalar.htm>, Antalya, 2009a.
- Anonim, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, <http://www.tagem.gov.tr>, (2009b).
- Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D. ve Depledge, M. (2000) Optimized RAPD Analysis Generates High-Quality Genomic DNA Profiles at High Annealing Temperature, *BioTechniques*, 28: 52- 54.
- Avtzis, N. (1985) *Marchalina hellenica* (*Monophlebus hellenius*) Genn. The most important honeydew producing insect in Greece, *Dasika Chronica*, 1: 51-63.
- Başıbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R. ve Quicke, D.L.J. (2000) Phylogenetic Systematics, Önder Matbaa, Sivas.
- Bacandritsos, N. (2002) A scientific note on the first establishment of the monophlebine coccid *Marchalina hellenica* (Coccoidea, Margarodidae) on the fir tree (*Abies cephalonica*), *Apidologie*, 33: 353- 354.
- Bacandritsos, N., Saitanis, C. ve Papanastasiou, I. (2004) Morphology and life cycle of *Marchalina hellenica* (Gennadius) (Hemiptera: Margarodidae) on pine (Parnis Mt.) and fir (Helmos Mt.) forests of Greece, *Ann Soc entomol Fr*, 40 (2) : 000-000.
- Bodenheimer, E.S. (1953) The coccoidea of Turkey III, Istabil- Univ., *Facult des Sci Rev Ser B Tom XVIII*, 2: 91-164 (152-154).
- Bodenheimer, F.S. (1949) Türkiye'nin Coccoidea' sı, *Diaspididae Monografik bir Etüd*, Ankara, Güney Matbaacılık ve Gazetecilik T.A.O.,1. Cilt: 262 s.
- Bouga, M., Evangelou, V., Lykoudis, D., Cakmak, I. ve Hatjina, F. (2011) Genetic structure of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) populations from Turkey: preliminary mtDNA sequencing data, *Biochem Genet*, 49 (11-12): 683-94.

- Buth, D.G. (1984) The Application of Electrophoretic Data In Systematic Studies, *Ann Rev Ecol Syst*, 15, 501- 22.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. ve Gresshoff, P.M. (1991) High Resolution DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers, *Biotechnol*, 9: 553- 557.
- Crawford, D.J. (1990) *Plant Molecular Systematics*, John, Willey ve Sons, New York, 388s.
- Çanakçıoğlu, H. (1977) Türkiye'de Orman Ağaçları ve Ağaççıklarında Zarar Yapan Coccoidea (Hom.) Türleri Üzerinde Araştırmalar, *Sist-Yay Kon Biyo*, İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi Yayınları, 122 s.
- Çanakçıoğlu, H. ve Mol, T. (1998) Harmful and useful insects, *Forest entomology*, Orman Fakültesi Yayınları, İstanbul, Yayın No:451.
- Doulis, A.G., Harfouche, A.L. ve Aravanopoulos, F.A. (2000) Rapid, High Quality DNA Isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and Optimization of the RAPD Marker Technique, *Plant Mol Biol Rep*, 17, 1- 14.
- Do, N. ve Adams R.P. (1991) Simple Technique For Removing Plant Polysaccharide Contaminants From DNA, *BioTechnique*, 10: 163–166.
- Doyle, J.J. ve Doyle, J.L. (1987) A Rapid DNA Isolation Procedure From Small Quantities Of Fresh Leaf Tissue, *Phytochem Bull*, 19:11- 15.
- Doyle, J.J. ve Doyle J.L. (1991) DNA And higher plant systematics: Principles And Results: Molecular technics in taxonomy, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- El-Gohary, E.A, Ahmed, S. ve Abou, Z. (2004a) Genetic Analysis For Some Honey Bees From Middle East with Rapd-Pcr Markers, *The Egypt Entomol Society Public Summar*, vol: 81, 12s.
- El-Gohary, E.A., Mohamed, S., Elsherif, S. ve Ahmed, L., Kaschef, H. (2004b) Molecular diversity of Egyptian termites determined by PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting., *The Egypt Entomol Society Public Summar*, vol: 81 pp:5.
- Erlinghagen, F. (2001) Portrait of an insect: *Marchalina hellenica* Genn. (Sternorrhyncha: Coccinea: Margarodidae), important producer of honeydew in Greece, *Apiacta*, 36: 131–137.
- Favia, G., Dimopoulos, G., Torre, D.A., Touro, Y.T., Coluzzi, M. ve Louis, C. (1994) Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*, *Population Biology*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 10315- 10319.
- Fimiani, P. ve Solino, G. (1994) An exotic insect dangerous to the native plants of the island of Ischia, *Informatore Agrario*, 50: 65-68.
- Glick, B.R. ve Pasternak, J.J. (1998) Principles and Applications of Recombinant DNA, *Mol Biotechnol*, ASM Press., Washington, D.C.
- Gounari, S. (2006) Studies on the phenology of *Marchalina hellenica* (Genn.) (Hemiptera: Coccoidea, Margarodidae) in relation to honeydew flow, *J Apicult Res*, 45: 8-12.

- Günaydın, G. (2009) Economic and Political Analysis of Beekeeping, Türkiye, <http://www.maybir.com.tr/>
- Gürkan, B. ve Bosgelmez, A. (1989) Bioecology and population dynamics of the pine scale *Marchalina hellenica* (Gennadius), PhD thesis, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 87s.
- Hadzibeyli, Z.K. (1969) On *Marchalina caucasica*, sp. n. (Homoptera, Coccoidea) from the Caucasus, Rusya, *Entomologicheskoe Obozrenye*, 48: 391-398.
- Halldén, C. ve Sall, T. (200) Primer mixtures in RAPD analysis, *Submitted to Genomics*.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.O., Hjerdin, A. ve Sall, T. (1996) Competition as a of Errors in RAPD analysis, *Theor Appl Genet*, 92: 1185-1192.
- Halldén, C. (1998) Characterization and Use of a Multiplex PCRbased System: Random Amplified Polymorphic DNA, Ph.D, Thesis, Department of Genetics Lund University, Lund.
- Halldén, C., Nilsson, N-O., Rading, I.M. ve Sall, T. (1994) Evaluation of RFLP and RAPD Markers İn A Comparison Of Brassica Napus Breeding Lines, *Theor Appl Genet*, 88: 123-128.
- Hansen, M., Halldén, C., Sall, T. (1998) Error rates and Polymorphism Frequencies For Three RAPD Protocols, *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 139-146.
- Hatjina, F. ve Bouga, M. (2009) Balını Üreten Esas Böcek Olan Çam Koşnili *Marchalina hellenica* Gennadius (Hemiptera: Margarodidae)'un Tanımlanması, Genetik Çesitliliği ve Bal Üretimi, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 9(4): 162-167.
- Hillis, D.M. ve Moritz, C. (1990) Molecular Systematics, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Amerika, 83.
- Iski, J.A. ve Tingey, S. (1990) DNA Polymorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Usefull As Genetic Markers, *Nucleic Acids Res*, 18(22): 6531- 6535.
- Işık, K. (1997) Karakter Kavramı ve Karakterlerin Genetik Temeli, Taksonomi Yaz Okulu Ders Notları, Ed. Dr. Çıplak B., Antalya, 74s.
- Julian, G.E., Fewell, J.H., Robert, J.G., Johnson, A., Larrabee, D. (2002) Genetic determination of the queen caste in an ant hybrid zone, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12): 8157–8160.
- Kailidis, D (1965) *Monophlebus hellenicus* (M. *hellenica*) Genn. The pine insect feeder of honey bees, *Dasika Chronika*, 81/82: 305-321.
- Kailidis, D.S. (1991) Forest entomology and zoology, 4th edn. Thessaloniki, Christodoulidis Press, Yunanistan.
- Keane, M. P., Arenberg D. A., Lynch J. P., Whyte R. I., Iannettoni M. D., Burdick M. D., Wilke C. A., Morris S. B., Glass M. C., DiGiovine B., Kunkel S. L. ve Strieter R.M. (1997) The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis, *J. Immunol*, 159:1437.
- Khandka, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejdat, A. ve Goldhirsh, A.G. (1997) Variability İn The Pattern Of Random Amplified Polymorphic DNA, *Electrophoresis*, 18, 2852-2856.

- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P. ve Kumar, S. (1999) Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of plants Producing Large Amount of Secondary Metabolites and Essential oils, *Plant Molecular biology Reporter*, Protocols-17.
- Klug, W. ve Cummings, M.R. (2002) Genetik Kavramlar, 6.baskı, Çeviri Ed. Öner, C., Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kohel, R.J. ve Park, Y. (1993) Effect Of Concentration Of MgCl₂ On Random Amplified DNA, *BioTechniques*, 16:652-656.
- Konieczyn, A. ve Ausubel, F.A. (1993) A Procedure For Mapping Arabidopsis Mutation Using Co-Dominant Acotype-Specific PCR-based markers, *Plant J*, 4: 403-410.
- Lou, K.F., Weiss, M.J., Bruckner, P.L. ve Morrill, W.L. (1998) Talbert, L.E., Martin, J.M., RAPD Variation Within and Among Geographic Populations of wheat Stem Sawfly (*Cephus cinctus* Norton), *T Am Genet Assoc*, 89: 329-335.
- Lushai, G., De Barro, P.J., David, O., Sherratt, T.N., ve Maclean, N. (1998) Genetic variation within a parthenogenetic lineage, *Insect Mol Biol*, 7(4), 337- 344.
- Margaritopoulos, J.T., Bacandritsos, N., Pekas, A.N., Stamatis, C., Mamuris, Z. ve Tsitsipis, J.A. (2003) Genetic variation of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) sampled from different hosts and localities in Greece, *Bull of Entomol Res*, 93, 447–453.
- Marotta, S. ve R. Priore (1992) Morphological notes on *Marchalina hellenica* (Gennadius) (Homoptera, Coccoidea, Margarodidae), *Boll. Lab. Entomol. Agrar. Filippo Silvestri*, 49: 195-202.
- Mathieu-Daudé, F., Ralph, D. ve McClelland, M. (1997) Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. Taylor, G. R., CRS Press, Boca Raton.
- Morgan, D.J.W., Reitzà, S.R., Atkinson, P.W. ve Trumble, J.T. (2000) The resolution of Californian populations of *Liriomyza huidobrensis* and *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) using PCR, *Heredity*, 85: 53-61.
- Myers, R.M., Sheffied, V.C. ve Cox, D.R. (1987) Mutation Detection By PCR, GC-Clamps and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, in PCR Technology Prenciples And Applications for DNA Amplification, Amerika, Academic Press Inc.
- Nikolopoulos, C. (1959) *Beekeeping flora of Attica*, Athens, Greece.
- Nikolopoulos, C. (1964) *On discovering the until now unknown male insect of the species Marchalina hellenica (Gennadius)*, Agricultural University of Athens, Greece, 16s.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. ve Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 86: 2766-2770
- Paran, I. ve Michelmora, R.W. (1993) Development of Reliable PCRBased Markers Linked To Downy Mildew Resistance Genes In Lettuce, *Theor Appl Genet* 85: 985-993.

- Payne, S.J. (1997) Microsatellite Analysis: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. Taylor, G. R., CRS Press, Boca Raton.
- Peng, G., Xiao-Xi Z., Xiao-Wen, Y. ve Xiao-Fen, C. (2000) Rapd-Pcr Detection Of Dna Polymorphism Of Cotton Aphid, *Entomologia Sinica*, 7: 41- 46.
- Pollini, A. (1998) Manuale di entomologia applicata, *Edagricole*, 1462s.
- Rafalski, A., Tingey, S.V. ve Williams, J.G.K. (1994) (RAPD) markers, *Plant Mol Biol Mannual*, 114: 1-8.
- Quicke, D.L.J. ve Cameron S.A. (1993) Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy, Blackie Academic ve Professional, Glasgow, 120-122s.
- Santas, L.A. (1979) *Marchalina hellenica* (Gennadius), an important insect for apiculture, Greece, *Proceedings of the XXVII International Congress of Apiculture*, 419-422s.
- Santas, L.A. (1983) Insects producing honeydew exploited by bees, Greece, *Apidologie*, 14: 93- 103.
- Selmi, E. (1983) The biology of *Marchalina hellenica* (Gennadius) (Homoptera, Margarodidae), Marmara, *Orman Fakültesi Dergisi, Seri A, Sayı* 33: 93-103.
- Scheffer, S.J. (2000) Molecular Evidence of Cryptic Species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae), *J Econ Entomol*, 93(4): 1146- 1151.
- Scheffer, S.J. ve Wiegmann, B.M. (2000) Molecular Phylogenetics of the Holly Leafminers (Diptera: Agromyzidae: *Phytomyza*): Species Limits, Speciation, and Dietary Specialization, *Mol Phylogenet Evol*, 17: 244–255.
- Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Warmington, K., Lincoln, P., Chensue S.W., ve Lukacs. (1997) Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation, *J Immunol*, 158:4398–4404.
- Sureyya, M. ve Hovasse, R. (1930) Les ennemis des pins aux Iles Princes, Istanbul.
- Tingey, S.V., Del Tufa, J.P. (1993) Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers, *Plant Physiol.*101, 349- 352.
- Tolon, B. (1999) Muğla ve Yöresi Çam Ballarının Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Turènavièienė, J., Šupiedėlis, K. ve Rakauskas, R. (1999) Dna Study Of The Currant Inhabiting Aphid Species Of The Genus *Aphis* L. By Means Of The Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR), *Acta Zool Lituanica*, 9: 1392- 1657.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee T., Homes M.,Frijeters A., Pot J., Kulper M. ve Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucl Acids Res*, 23: 4407- 4414.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hermmat, M., Hneen, B.E. ve Lodhi, M.A. (1992) Inheritance and Reliability of RAPD markers, Proceedings of the symposium: Applications of RAPD Techology to Plant Breeding, 12-17s.
- Welsh, J. ve Mc Clelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers, *Nucl Acids Res*, 18: 7213- 7218.

- Welsh, J. ve Petersen, C. (1991) Polimorphisms Generated By Arbitrarily Primed PCR In The Mouse: Application To Strain Identification And Genetic Mapping, *Nucleic Acids Res*, 19: 303-306.
- Williams, J.V., Kubelik, A.R., Livak, K., Rafalski, J.A. ve Tingey, S. (1990) DNA Polymorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Usefull As Genetic Markers, *N A Res*, 18(22): 6531- 6535.
- Williams, J.G.K., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V. (1993) Genetic Analysis Using RAPD Markers, *Methods Enzymol*, 218: 704- 740.
- Xidias, T.A. (1975) Thasos and Kassandra the biggest beekeeping areas, *Melissokomiki Ellas*, 289: 8-12.
- Yeşil, A., Gürkan, B., Saraçoğlu, O. ve Zengin, H. (2005) Effect of the pest Marchalina hellenica Gennadius (Homoptera, Margarodidae) on the growth parameters of Pinus brutia Ten, Mugla Region (Turkey), *Pol l Ecol*, 53: 451-458.
- Zabeau, M. ve Vos, P. (1993) Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method For DNA Fingerprinting European Patent Application EP 534858A1.
- Zafiri, S.G., Fasseas, C.P. ve Emmanouel, N.G. (2007) An approach to the investigation of the Marchalina hellenica (Gennadius) (Hemiptera: Margarodidae) in pine, *12th Congress of Hellenic Entomological Society*, Larnaka, Cyprus, Proceedings 106s.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. ve Labuda, D. (1994) Genome Fingerprinting By Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification, *Genomics*, 20: 176- 183.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Sema KILIÇ
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 28/ 11/ 1989
Medeni Hali : Bekâr
Telefon : 0 531 627 59 89
E-posta : semakilic_bio@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	İbrahim Turhan Lisesi	2005
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2007
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2013

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma	X		
Anlama	X		
Okuma		X	

Alınan Sertifikalar

ISO 2001- ISO 9001

Hobiler

1. Film İzlemek
2. Doğa Yürüyüşü Yapma
3. Basketbol