

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BÖRÜLCE TOHUM BÖCEĞİ’NİN, *Callosobruchus maculatus* (F.),
(COLEOPTERA:BRUCHİDAE) FARKLI POPULASYONLARINDA
BİYOLOJİK PARAMETRELERİN İNCELENMESİ VE POPULASYONLAR
ARASINDAKİ DNA POLİMORFİZMİNİN AFLP TEKNİĞİ İLE TARANMASI**

Esra ALAGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖRÜLCE TOHUM BÖCEĞİ’NİN, *Callosobruchus maculatus* (F.),
(COLEOPTERA:BRUCHİDAE) FARKLI POPULASYONLARINDA
BİYOLOJİK PARAMETRELERİN İNCELENMESİ VE POPULASYONLAR
ARASINDAKİ DNA POLİMORFİZMİNİN AFLP TEKNİĞİ İLE TARANMASI**

Esra ALAGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez 21/11/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (...) not takdir edilerek
Oybirliği/ Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.**

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN (Danışman)

Doç. Dr. Bülent UZUN

Yrd. Doç. Dr. Fatih DAĞLI

ÖZET

BÖRÜLCE TOHUM BÖCEĞİ'NİN, *Callosobruchus maculatus* (F.), (COLEOPTERA:BRUCHIDAE) FARKLI POPULASYONLARINDA BİYOLOJİK PARAMETRELERİN İNCELENMESİ VE POPULASYONLAR ARASINDAKİ DNA POLİMORFİZMİNİN AFLP TEKNİĞİ İLE TARANMASI

Esra ALAGÖZ

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

Aralık 2010, 70 Sayfa

Bu çalışmada Aydın, Antalya ve Isparta'dan toplanan börülce tohum böceğinin (BTB), *Callosobruchus maculatus* (F.), 7 çeşit/tür nohut, 1 çeşit fasulye ve 1 çeşit börülce olmak üzere 9 tohum genotipinde tercihli ve zorunlu testleme yöntemi ile biyolojik parametreleri gözlemlenilmiştir. Çalışmada populasyonlar arasındaki polimorfizmi belirlemek amacıyla AFLP yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonuçları, Antalya populasyonun diğer iki populasyona göre daha fazla yumurta bıraktığını göstermiştir. Populasyonların en çok yumurta bıraktığı tohum materyalleri börülce, fasulye ve CA2969 nohut çeşidi olmuştur. Bu tohumlardan börülce üzerinde ergin çıkış oranı Aydın, Isparta ve Antalya populasyonlarında sırası ile %84, 80 ve 73 olarak gerçekleşmiştir. Fasulye tohumları üzerinde ergin çıkışı yok denecek kadar az bulunurken, CA2969 nohut çeşidinde oran %45-63 arasında değişmiştir. Tercihli testleme yönteminde en çok yumurta bırakılan genotipler börülce ve fasulye tohumlarıdır. Börülce üzerinden toplanan Aydın ve Isparta populasyonları, börülce ve fasulye tohumlarını eşit oranlarda (%40-45) tercih ederken, Antalya populasyonunda börülce tohumları fasulyeye göre daha fazla (%54 ve 27) tercih edilmiştir. Antalya populasyonu nohut üzerinde yetiştiriliyor olmasına rağmen (36 generasyon), nohut genotiplerini tercihi %13 seviyelerini geçememiştir. Aydın ve Isparta populasyonlarında nohut genotiplerini tercih oranları %10-16 düzeylerinde kalmıştır. Her üç populasyon içinde Yar nohut çeşidinde %80-90 arasında ergin çıkışı görülürken, populasyonların bu

genotipi tercih oranları %1-2 düzeyinde kalmıştır. Populasyonların tohumlarda meydana getirdikleri yüzde-kayıp oranlarının her üç populasyon için de börölce tohumlarında birinci sırada olduğu gözlenmiştir.

Moleküler çalışmaların sonucunda, Isparta populasyonunda % 83.6, Aydın populasyonunda %72.5 ve Antalya populasyonunda %56,5 oranında polimorfizm seviyesi belirlenmiştir. Populasyonlar arası farklılaşmayı gösteren Gst değerinin çalışma sonucunda 0,50 düzeyinde bulunması, populasyonların farklılaştığını göstermektedir. Populasyonlar arası genetik uzaklıklar ve oluşturulan dendogram incelendiğinde, börölce üzerinden toplanan populasyonların (Aydın Isparta) nohut üzerinden toplanan Antalya populasyonundan genetik olarak daha uzak bulunduğu ve farklı yerde gruplaştığı belirlemiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Callosobruchus maculatus* (F.), biyolojik parametreler, AFLP, Polimorfizm

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN (Danışman)

Doç. Dr. Bülent UZUN

Yrd. Doç. Dr. Fatih DAĞLI

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOLOGICAL PARAMETERS AND DNA POLYMORPHISM THROUGH AFLP, AMONG DIFFERENT COWPEA BEETLE, *Callosobruchus maculatus* (F.), (COLEOPTERA:BRUCHIDAE) POPULATIONS

Esra ALAGÖZ

M. Sc. Thesis In Plant Protection

Adviser: Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

December 2010, 70 Pages

Several biological parameters of cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.), populations collected from Aydın, Antalya and Isparta provinces are measured under choice and no-choice conditions. A total of nine different legume seeds including seven varieties/species of chickpea, a bean and a cowpea variety were employed for the study. Furthermore, AFLP technique was used for determination of polymorphism among the populations. The results showed that overall eggs laid was higher in Antalya population than the other two. In general, populations laid more eggs on cowpea, bean and CA2969 chickpea variety. Adult emergence ratios on cowpea seeds were found to be 84%, 80% and 73% for Aydın, Isparta and Antalya populations, respectively. With the exception of an individual, there were no adult emergence recorded for all populations on bean seeds. Chickpea variety CA2969 had adult emergence ratios changing between 45-63%. In choice tests, cowpea and bean were most preferred seeds for egg laying. While Aydın and Isparta populations originally collected from cowpea preferred bean and cowpea seeds equally (40-45%), Antalya population preferred cowpea over bean seeds for egg laying (54% and 27%). Although Antalya population have been reared on chickpea seeds around 36 generations, the most preferred chickpea variety ratio was under %13. Similar egg laying ratios on chickpea varieties (10-16%) were obtained for Aydın and Isparta populations. Although all three populations had adult emergence ratios of 80-90% on chickpea variety Yar, their egg laying preferences were 1-2% for the same variety. Furthermore, populations caused the highest weight loss on cowpea seeds.

The results of the molecular study showed 83.6%, 72.5% and 56.5% polymorphism levels for Isparta, Aydın and Antalya populations, respectively. The G_{st} value was found to be 0.50, an indication of population differentiation. The genetic distance values and phylogenetic tree indicated that the populations collected from cowpea (Aydın and Isparta) were clustered together and genetically more distant to chickpea collected Antalya population.

KEY WORDS: *Callosobruchus maculatus* (F.), biological parameter, AFLP, Polymorphism

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN (Adviser)

Assoc. Prof. Dr. Bülent UZUN

Asst. Prof. Dr. Fatih DAĞLI

ÖNSÖZ

Baklagiller insan beslenmesi için önemli bir yere sahiptir. Baklagillerde kayıplara neden olan birçok zararlı bulunmaktadır bunlardan en önemlileri tohum böcekleridir. Tohum böcekleri familyasında bulunan Börülce tohum böceği (BTB), *Callosobruchus maculatus*, ise dünya üzerinde depolanmış börülcelerin ve diğer baklagillerin en önemli zararlısıdır. Ancak ülkemizde BTB'i üzerinde çok fazla çalışma yapılmamıştır bu çalışma ile ülkemizdeki populasyonların birbiri arasında gen alışverişi ortaya konulması ve bu populasyonların farklı baklagiller üzerinde gelişme potansiyeli belirlenmeye çalışılmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve bu çalışmanın her aşamasında değerli bilgilerini, tecrübelerini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e, tezimde kullanılan tohum materyallerinin temin edilmesi ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Cengiz TOKER'e, katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Fatih DAĞLI ve Doç. Dr. Bülent UZUN'a, özellikle yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. İnci ŞAHİN'e ve Arş. Gör. Ayşe AŞCI'ya, Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda bulunan hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sevgi ve desteklerini hayatım boyunca hissettiğim, çok sevdiğim annem Hacer ALAGÖZ, babam Zeki ALAGÖZ'e ve her zaman yanımda olan ablalarım Elif AYDINALP, Emel ALAGÖZ ve kardeşim M. Emre ALAGÖZ'e, destek ve sevgisini her zaman hissettiğim, her zaman olduğu gibi bu süreçte de beni yalnız bırakmayan nişanlım Cemal Alpgiray BÖLÜCEK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTARCT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGE DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. <i>Callosobruchus maculatus</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. Sistematığı ve yayılışı.....	3
2.1.2. Yaşayışı ve biyolojisi.....	4
2.1.3. Morfolojisi.....	6
2.1.4. Zararı.....	7
2.1.5. Mücadelesi.....	8
2.2. Populasyon Genetiği ve Biyoloji Ekolojisi.....	8
2.3. Moleküler Markırlar.....	13
2.3.1. Fenotipik ve protein markırları.....	13
2.3.2. DNA markırları	14
2.3.2.1. RFLP.....	14
2.3.2.2. RAPD.....	15
2.3.2.3. SSR.....	15
2.3.2.4. SNP.....	16
2.3.2.5. AFLP	16
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Böcek materyali.....	20
3.1.2. Bitki materyali.....	20
3.1.3. Böcek yetiştirmede kullanılan materyaller.....	21

3.2. Metot	22
3.2.1. Biyolojik parametreleri belirlemede kullanılan yöntemler.....	22
3.2.1.1. Zorunlu testleme yöntemi.....	22
3.2.1.2. Tercihli testleme yöntemi.....	23
3.2.2. Populasyonlar arasındaki polimorfizmi belirlemede kullanılan yöntemler.....	24
3.2.2.1. DNA izolasyonu.....	24
3.2.2.2. AFLP.....	25
3.2.2.2.1. DNA konsantasyonların belirlenmesi.....	25
3.2.2.2.2. Kesim ve adaptörlerin bağlanması.....	26
3.2.2.2.3. Preselektif aşaması.....	27
3.2.2.2.4. Selektif aşaması.....	27
3.2.2.3. Poliakrilamit jel hazırlanması.....	29
3.2.2.4. Poliakrilamit jele örneklerin yüklenmesi ve LICOR. cihazında koşturulması.....	29
3.2.2.5. AFLP analizlerinin tekrarlanabilirliği	29
3.2.3. Data analizi.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Bulgular.....	31
4.1.1. Biyolojik parametrelere ait bulgular.....	31
4.1.1.1. Zorunlu testleme yöntemi.....	31
4.1.1.2. Tercihli testleme yöntemi.....	38
4.1.2. Moleküler çalışmalara ait bulgular.....	40
4.1.2.1. AFLP tekrarlanabilirliği.....	40
4.1.2.2. Populasyonlarda AFLP tekniği ile ortaya konan genetik yapıya ait bulgular.....	41
4.2. Tartışma.....	46
5. SONUÇ.....	56
6. KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	Gram
%	Yüzde
mm	Milimetre
cm	Santimetre
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
bp	Baz çifti

Kısaltmalar

UV	Mor Ötesi
PCR	Polimorfik Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarlaması
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BTB	Börölce Tohum Böceği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	BTB'nin dişisi tarafından nohut yüzeyine bırakılan yumurtalar.....	4
Şekil 2.2.	Bruchid larvasının tohum içerisinde micro-cat ile tarama görüntüsü..	5
Şekil 2.3.	BTB'nin erkek ve dişi ergin bireyleri.....	6
Şekil 2.4.	BTB'nin nohut çeşidinde oluşturduğu zarar.....	7
Şekil 2.5.	AFLP tekniğinde izlenen aşamalar.....	17
Şekil 2.6.	DNA'nın kesilmesi ve adaptörlerin bağlanması.....	18
Şekil 3.1.	Denemede kullanılan tohumlar.....	21
Şekil 3.2.	Zorunlu testlemeye ait deneme görüntüsü.....	23
Şekil 3.3.	Tercihli testlemeye ait deneme görüntüsü.....	24
Şekil 4.1.	Populasyonların tohum genotiplerinde gözlenen ergin çıkış yüzdeleri.....	34
Şekil 4.2.	Populasyonların tohum genotiplerinde çıkış yapan bireylerdeki dişi/erkek oranı.....	36
Şekil 4.3.	Selektif ürünlerin poliakrilamit jeldeki görüntüsü.....	40
Şekil 4.4.	Li-Cor DNA sequencer readır cihazında koşturulmuş selektif ürünlere ait poliakrilamit jel görüntüsü.....	42
Şekil 4.5.	Üç farklı BTB populasyonunun 6 AFLP primer kombinasyonu ile oluşturduğu dendogram.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Denemede kullanılan tohum materyalleri ve özellikleri.....	21
Çizelge 3.2.	Selektif amplifikasyona ait PCR döngüleri.....	28
Çizelge 3.3.	Kullanılan selektif primer kombinasyonları.....	28
Çizelge 4.1.	Populasyonların tohum genotiplerine bıraktıkları yumurta sayıları....	31
Çizelge 4.2.	BTB populasyonlarının farklı tohum materyalleri üzerine ergin çıkışı	33
Çizelge 4.3.	Populasyonların tohum genotiplerinde meydana getirdiği yüzde kayıp oranı.....	37
Çizelge 4.4.	Farklı BTB’i populasyonlarının tohum genotiplerinde %50 ile %100 ergin çıkış süreleri (gün).....	38
Çizelge 4.5.	BTB’i populasyonlarının tercihli testleme yönteminde farklı tohum genotiplerine bıraktıkları yumurta sayıları ve tercih yüzdeleri.....	39
Çizelge 4.6.	BTB populasyonları için 6 AFLP primer kombinasyonu ile hesaplanan genetik çeşitlilik değerleri.....	43
Çizelge 4.7.	AFLP tekniği ile üç farklı BTB populasyonunu için hesaplanan gen çeşitliliği, genetik farklılaşma ve gen akışı parametreleri.....	44
Çizelge 4.8.	Üç farklı BTB’i populasyonunun 6 AFLP primer kombinasyonu ile oluşturduğu genetik uzaklı-benzerlik matriksi.....	44

1. GİRİŞ

Baklagiller (*Fabaceae*) dünyanın en geniş üç bitki familyasından birisidir (Ceyhan 2007). Çiçekli bitkiler içerisinde bulunan en büyük ikinci familyadır. Ekonomik önem açısından bakıldığında zaman zaman ise dikotiledonlar arasında en önemli familya olduğu görülmektedir. Bu familyanın içerisinde yaklaşık 18,000 tür ve 700 cins bulunduğu bildirilmektedir (Özdemir 2006). Baklagiller genellikle tek veya çok yıllık, ot, çalı ve ağaç formundaki bitkileri içerirler. Yetişkin bir insanın beslenmesinde bitkisel proteinlerin %22'si, karbonhidratların %7'si, hayvan beslenmesindeki proteinlerin ise %38'i ve karbonhidratların %5'i yemeklik dane baklagiller tarafından sağlanmaktadır. 2009 yılında Türkiye'de 8,009,592 dekarlık tarımsal arazide baklagil ekimi yapılmış olup 1,101,348 ton ürün elde edilmiştir. Üretilen toplam baklagillerin %51'ini nohut, %27,4'sini mercimek, %16,4'ini fasulye ve %5,2'sini ise diğerleri oluşturmaktadır (TUİK 2009).

Ülkemiz bakliyat yetiştirmeye çok elverişli bir ülke olmasına rağmen her geçen yıl ekilen bakliyat alanlarının azaldığı görülmektedir. Bu duruma ülkenin genel sosyo-ekonomik politikalarının yanı sıra baklagillerde abiyotik ve biyotik faktörlerden dolayı meydana gelen kayıplar da sebep olmaktadır. Biyotik faktörlerin en önemlilerinden birisi tohum böcekleridir. Tohum böcekleri arasında en yaygın ve en zararlı türlerden birisi ise bürölce tohum böceği (BTB), *Callosobruchus maculatus*, 'dir.

BTB mücadelesinde günümüzde kullanılan belirli birkaç strateji bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları; bakteri, protozoa, nematod, virus ve fungus kullanılarak (Chapman 1974, Kaya ve Gaugler 1993, Lenger 1995, Becker ve Ascher 1998, Scholte vd 2004) biyolojik mücadele, (Jackai ve Adalla 1997), kimyasal mücadele (Tederson vd 2006) ve hasat sonrası iyonize radyasyon yöntemleridir (Delincée vd 1998).

Genetik çalışmalardan elde edilen veriler başarılı bir mücadele stratejisinin temelini oluşturmaktadır (Sluss ve Graham 1979). Bir böceğin genetik yapısının, genetik varyasyonunun ve populasyonlar arasındaki gen taşınmasının daha iyi

anlaşılması, mevcut olan mücadele programının geliştirilmesi, değiştirilmesi ve dayanıklılıkla mücadele yapılmasının temelini oluşturmaktadır (Krumm vd 2008).

Böcekler üzerine genetik alanında yapılan ilk çalışmalar 1910 yılında Thomas Hunt Morgan ve arkadaşları tarafından başlatılmıştır. Bu çalışmalarda Morgan ve arkadaşları, sirke sineği, *Drosophila melanogaster* Meigen,'nin farklı morfolojik karakterlerini araştırmışlardır. Sirke sineği genetik açıdan çalışılan ilk böceklerden birisi olmasının yanı sıra daha sonraki yıllarda genetik çalışmalarda model organizma olduğu için önemi büyüktür. Günümüze kadar böcekler üzerinde genetik çalışmalar hızla artmıştır.

20. yüzyılın sonlarına doğru moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile böcek genlerinin yapısı, organizasyonu ve işleyişi hakkında gelişme sağlanmıştır. Moleküler yöntemler sayesinde böceklerde; genom yapısının araştırılması, populasyon biyolojisi, ırk belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, kolonizasyon ve orijin tayini, böcek-bitki interaksyonu, insektisit dayanıklılığı, DNA temelinde polimorfizm, ekoloji, taksonomi vb. gibi birçok alanda büyük kolaylıklar sağlanmıştır. Bu gelişmeler ışığında populasyon genetiği, davranış genetiği ve filogenetik gibi konularda böcekler daha iyi anlaşılmıştır. Böylece insan sağlığı ve tarımsal alanlardaki problemlere çözümler üretilmesine yardımcı olmuştur.

Ülkemizde BTB ile ilgili; Keyder vd (1973) yayılışı ve biyolojisi, Karman vd (1970) ile Özer ve Yücel (1989) zararı, Mengi (1988) ile Tamer (1996) gelişimi, Özar vd (1993) mücadelesi, Mergen vd (1996) sistematigi, Tuncer ve Kansu (1990) gama radyasyonunun kısırlaştırıcı ve öldürücü dozlarının tespiti, Çıkman ve Yücel (2002) biyolojisi, İşçi (2001 ve 2002) Mersin ilinde tanımlanması üzerine araştırmalar yapmıştır. Fakat zararlının genetiği üzerine ülkemizde yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle, bu çalışma Türkiye'de bulunan 3 ayrı populasyonunun hem genetiksel olarak farklılıklarının ortaya konulmasını, hem de zararlının farklı baklagiller üzerinde gelişimine ait gösterdiği biyolojik parametrelerin araştırılmasını kapsamaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. *C.maculatus* Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Sistematığı ve yayılışı

BTB’i Coleoptera takımı, Chrysomeloidea üst familyası ve Bruchidae familyası içerisinde yer almaktadır. Bruchidae familyası yenilebilir baklagillerde meydana getirdiği zarar nedeni ile yüzyıllardır tanınmaktadır (Shade vd 1999, Tuda vd 2006). Bu zarar doğrudan kaynağın tüketilmesinin yanında ticari malların kalitesinin düşmesi veya depolanmış tohumlarda çimlenme oranının azalması ile de ikincil zarara neden olmaktadır (Southgate 1979, Salunkhe vd 1985).

Tohum böcekleri Yeni Zelanda ve Antartika hariç bütün dünyaya yayılmış durumdadır. Fakat ılıman kuşak yerine tropikal bölgelerde daha yoğun olarak bulunmaktadır. Bruchidlerin en az 30 türü dünyadaki en önemli zararlıları kapsamaktadır ve bunlardan en azından 9’u kosmopolit zararlıdır (Kingsolver 2004). Bu zararlı türlerin çoğu *Callosobruchus* cinsinde yer almaktadır. *Callosobruchus* türleri baklagillerin kosmopolitan zararlılarından olup *Vigna*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Lablab*, *Vicia*, *Pisum*, *Cicer*, *Lens*, *Cajanus* ve *Arachis* gibi bitki cinslerini içeren 35 baklagil türünde zarar meydana getirmektedir (Credland 1987, Desroches vd 1995, Yadav 1997, Ajayi ve Lale 2000, Somta vd 2006). *Callosobruchus* Pic cinsi içerisinde en az 20 tür bulunmaktadır. Bu türlerin 3/4’ü Asya orijinelidir (Tuda vd 2003) Bunlardan en önemlisi *Callosobruchus maculatus*, *Callosobruchus chinensis*, *Callosobruchus analis* türleridir.

BTB’i ilk defa 1775 yılında Fabricus tarafından taksonomi dünyasına giriş yapmıştır. *Callosobruchus* cinsi içerisinde dünya üzerinde en yaygın olarak BTB bulunmaktadır. BTB aynı zamanda dünya üzerinde depolanmış börülcelerin ve diğer baklagillerin en önemli zararlısıdır (Taylor 1981). BTB özellikle subtropikal ve tropikal ülkelerde bulunmaktadır (Singh 1997). Orijininin Batı Afrika olduğu düşünülmektedir (Decelle 1981). Aklan (1996)’a göre Türkiye’de ilk defa 1952’de bulunmuştur. Şu an itibari ile ülkemizin bütün bölgelerinde yerleşik ve yaygın olarak bulunmaktadır.

2.1.2. Yaşayışı ve biyolojisi

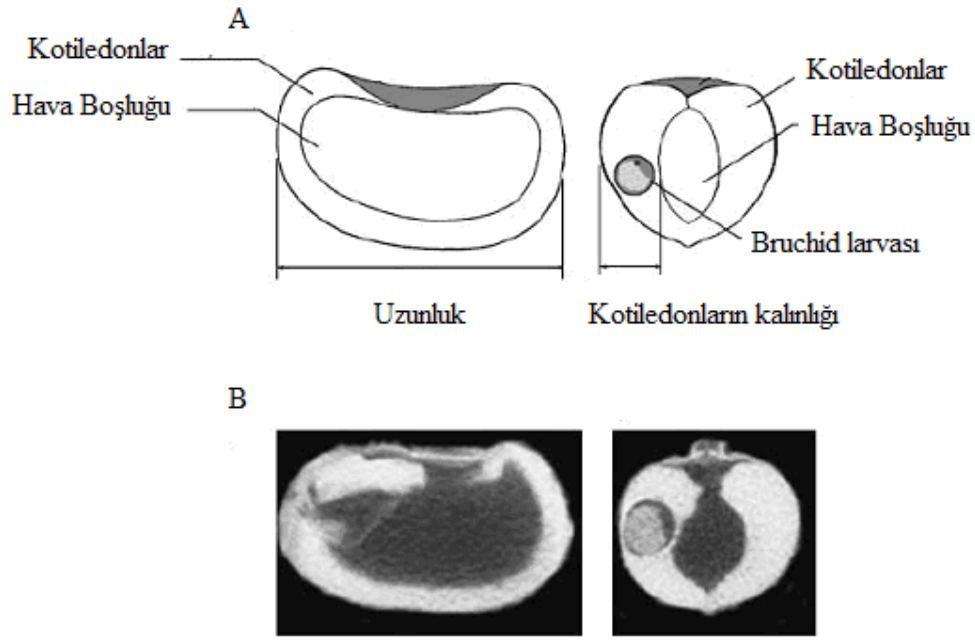
Birçok tohum böceğinde olduğu gibi BTB hayat devresinin neredeyse tamamını dişinin seçtiği tohum içerisinde geçirmektedir (Yang 2006). Ergin dişiler konukçu türüne, boyutuna, sayısına ve konukçada bulunan yumurta sayısına göre yumurta bırakma alışkanlıklarını düzenleyebilmektedir (Messina ve Renwick 1985, Mitchell 1990). Dişilerin bu davranışı yumurtanın daha iyi tutunabilmesi ve daha yüksek gelişim göstermesini garanti altına almak istemesindendir. Çünkü dişi bireyin yumurta bıraktığı konukçunun yeni neslin sayısı ve gelişim hızı üzerinde büyük tesiri bulunmaktadır (Credland 1987). Eğer larva kendisine uygun olmayan bir konukçada gelişirse, oluşan yeni erginin hayat süresinin daha kısa olduğu ve daha az yumurta bıraktığı gözlemlenmiştir (Wilson 1988).



Şekil 2.1. BTB'nin dişisi tarafından nohut yüzeyine bırakılan yumurtalar

Dişiler hayat devreleri boyunca çoklu çiftleşmeye girerler (Fox 1993). Çiftleşen dişiler yumurtalarını tarlada olgun baklalara veya depoda tohum yüzeylerine bırakmaktadır (Boeke vd 2004). Populasyonlar arasında bırakılan yumurtaların büyüklüğü açısından farklılık gözlenmektedir (Fox 1993, 1994). Daha büyük dişiler daha büyük yumurta bırakırken (Fox 1993), daha yaşlı bireylerin daha küçük yumurta bıraktığı gözlemlenmiştir (Wasserman ve Asami 1985, Fox 1993). Fakat genel olarak

bu türün yumurtaları oval ve parlak görünümlü olup 700µm uzunluğunda, 200µm genişliğinde ve 150µm yüksekliğindedir (Meer 1979) (Şekil 2.1). Yumurtalardan çıkan larvalar tohum içerisine girdikten sonra yumurtanın dış kabuğu şeffaf görüntüsünü kaybederek matlaşmakta yada larvanın dışkısının dolmasından dolayı alacalı bir renk halini almaktadır (Beck ve Blumer 2007). Dişi birey yumurta bıraktıktan sonra, larva 1-3 gün içerisinde yumurtadan çıkıp tohum içerisine girmekte ve tohumun nişasta deposu olan kotiledonlarda beslenmeye ve büyümeye başlamaktadır (Farias 2007).



Şekil 2.2. Bruchid larvasının tohum içerisinde micro-cat ile tarama görüntüsü (Tarver vd 2006)

Tohum böceği 4-5 gün içerisinde birinci larva dönemini, 9-11 günde 2.ve 3. larva dönemini tamamlamakta, 15-17. günde 4. larva döneminden pupa dönemine geçmekte, 20-22. günde de pupa dönemini tamamlayarak ergin olarak tohum içerisinden çıkmaktadır (Johnson ve Valero). Ergin çıkışı 4. dönem larvanın pupa dönemine geçmeden tohumun testa kısmının hemen altındaki yüzeyi yiyerek pencere açmakta ve metamorfozdan sonra erginin kolayca çıkmasının sağlamaktadır (Ojimelukwe ve Ogwumike 1999).

28 °C’de %50-70 oransal nemde ve karanlık bir ortamda BTB’nin hayat devresi yaklaşık olarak 28-30 günde tamamlanmaktadır (Wang ve Horng 2004). Fakat çevrenin sıcaklığı, ortamın nem miktarı (El Sawaf 1956, Mookherjee ve Chawla 1964) ve tohum çeşidine (Credland 1987) göre bu süre farklılık göstermektedir. Çıkış yapan erginler beslenme davranışı göstermemektedir. Bütün besin ve enerji kaynağını larva dönemindeki beslenmeleri ile karşılamaktadır (Huang vd 2005)

2.1.3. Morfolojisi

BTB’i morfolojik olarak uçan ve uçamayan olmak üzere iki form şeklinde görülebilmektedir. Bu iki forma ait bireyler arasında morfolojik, fizyolojik ve davranışsal karakter bakımından farklılıklar mevcuttur (Utida 1954, 1972).



Şekil 2.3. BTB’nin erkek ve dişi ergin bireyleri (Beck ve Blumer 2007)

Uçucu form erginleri 0.8 kilometre kadar uçabilmektedir bu nedenle bu mesafe aralığında ki ürünlere zarar verebilmektedir (Stoll 2000). Ergin polimorfizmi olan uçucu form: embriyo gelişiminden sonra sıcaklığın düşmesi, tohumun nem oranı ve larva yoğunluğu gibi etmenler tarafından teşvik edilmektedir (Sano 1967, Fujii 1980, 1984, Quedraogo vd 1991). Uçucu formda ergin ömrü çok daha uzundur, ancak yumurtlama kapasitesi düşüktür.

Ergin erkeklerde vücut uzunluğu ortalama 2.41mm ,dişilerde ise 3.18 mm’dir. Ayrıca dişi bireyler erkek bireylere oranla %17.1 daha ağırdırlar (Colgoni ve Vamosi

2006). Dişi bireylerde elytra zemin rengi siyah olup üzerinde kahverengi desenler bulunmaktadır. Pygidium büyük olup üzerinde uzunluğuna beyaz bir şerit bulunmaktadır. Erkek bireylerde elytra açık kahverengi rengine olup abdomen kısa ve şerit bulunmamaktadır. Her iki cinsiyette dişli anten tipi görölmektedir fakat erkek bireylerin antenleri %15.3 daha uzundur (Colgoni ve Vamosi 2006).

2.1.4. Zararı

Bruchidlerin ilk zararı tarlada baklagil baklaları üzerine yumurtalarını bırakmaları sonucu oluşmaktadır. Bu aşamada meydana gelen kayıplar çok küçüktür. Ancak tarlada bulaşık halde bulunan baklagillerin depolanması ve depolanan ürünlerden çıkış yapan erginlerin depo içerisindeki ürünlere yumurta bırakması ile meydana gelen ikinci bulaşma çok zararlıdır ve birkaç ayda depolanmış bütün ürünün kaybına neden olabilmektedir (Talekar 1988, Somta vd 2008).



Şekil 2.4. BTB'nin nohut çeşidinde oluşturduğu zarar

Börölce tohum böceği zararı altı aylık gibi kısa bir sürede %90 oranına varabilmektedir. (ICRISAT 1992, Seck vd 1996). Mücadele edilmediği takdirde ise bu hasar %100'e ulaşmaktadır ve tohumlarda %60 oranında ağırlık kaybına neden olmaktadır (Tanzubil 1991). Börölce tohum böceğinin meydana getirdiği zarar, tohumlarda oyuklar açarak fiziksel görünüşü değişmesinin yanında dışkısını tohumda bırakması ile de tohumun kimyasal yapısını değiştirmektedir (Lale 2002). Hasara uğramış tohumlar insan tüketimi için uygun olmamasının yanı sıra bu tip tohumlarda

çimlenme ve fide gücünde azalmalar meydana geldiğinden dolayı tarım sektöründe ve ticari olarak kullanılamaz hale gelmektedir (Hu vd 2008). Bruchidlerin Orta Amerika'da %35, Güney Amerika'da %7-13 ve Kenya'da %75 'e varan ekonomik kayıplar meydana getirdiği bildirilmiştir (Nahdy 1994).

2.1.5. Mücadelesi

Bruchidlerin kontrolü uygulanan kontrol metotların çoğunda larvanın çok az etkilenmesinden dolayı zordur (Dugravot vd 2002, Sanon vd 2002). Kimyasal metotlar etkili olsa da küçük işletmeler ekonomik açıdan zorlanmakta, insan ve çevre sağlığı negatif olarak etkilenmektedir (Huis 1991, Tovignan vd 2001). Bu nedenle alternatif yöntemler gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Bunlar dayanıklı çeşit kullanımı (Dabire' vd 2004), biyolojik kontrol (Amevoin 1998, Sanon vd 1998, Huis vd 1998) ve bitki repellentleridir (Golob ve Webley 1980, Lambert vd 1985, Boeke vd 2004 a,b).

2.2. Populasyon Genetiği, Biyolojisi Ve Ekolojisi

Ofuya ve Credland (1995) Kamerun, Brezilya ve Burkino Faso ülkelerinden temin ettiği üç BTB'i biyotiplerinin, 13 bürölce çeşidi üzerindeki biyolojik parametrelerini incelemiştir. Denemede 11 adet dayanıklı ile 2 adet hassas bürölce çeşidi denenmiştir. Her bir biyotipe ait larva yaşam oranı, gelişim süreci, birey ağırlığı ve dışının üretkenliğini içeren biyolojik parametreler incelenmiştir. Dayanıklı çeşitlerde gelişen her üç biyotipin hassas çeşitlere oranla larvalarında gelişim süresinin daha yavaş olduğu, çıkış yapan erginlerin daha hafif olduğu ve daha az yumurta bıraktığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada populasyonlar arasında Brezilya biyotipinin, Kamerun ve Burkino Faso biyotiplerine oranla dayanıklı çeşitlerden daha fazla etkilendiği belirtilmiştir.

Fox vd (2010) çalışmasında, 2 farklı biyotip (Asya ve Afrika) ile 4 farklı tohum (2 çeşit bürölce, 1 adet maş fasulyesi, 1 adet adzuki fasulyesi) kullanılarak, biyotiplerin tohum çeşitlerinde meydana getirdiği ağırlık kaybı , zarar görmüş tohumların çimlenme

yüzdesi ve bu tohumlardan elde edilen fidelerin büyümesi karşılaştırılmıştır. Çalışmada Afrika ve Asya biyotiplerinin konukçular üzerindeki performanslarında oldukça farklı sonuçları belirlenmiştir. Asya biyotipinin tohumlardaki; ağırlık kaybının ve kotiledon hasarının daha fazla olduğu, daha az çimlenmeye sahip oldukları ve fide büyümesinin daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Çalışmada tek larva bulunduran tohumlardan elde edilen verilerde Asya popülasyonunun Afrika biyotipine oranla %38-40 oranında daha fazla tohum ağırlık kaybı meydana getirdiği belirlenmiştir. Ayrıca tek larvanın bulunduğu Maş fasulyesinde çimlenme oranı Afrika biyotipinde %71 iken Asya biyotipinde bu oran %11 oranındadır. Börülce de ise Asya biyotipi için %76 iken, Afrika biyotipi için %92 oranında bulunmuştur. Biyotiplerin tohum üzerindeki etkileri çimlenme sonrasında da sürmüştür. Tohum çimlenmesinin yedinci gününde Asya biyotipinin kotiledonlarda daha fazla zarar meydana getirdiği görülmüştür. Çimlenmeden 15 gün sonrasında ise fide boyu ve ağırlığının daha az olduğunu tespit edilmiştir.

Kawecki ve Mery (2003) yaptıkları çalışmada, BTB'nin Kamerun, Nijerya, Uganda ve Yemen'den toplanan popülasyonları deneme öncesinde iki ayrı konukçuda, börülce ve Maş fasulyesinde, 110 generasyon boyunca çoğaltılmıştır. Çalışmada iki ayrı deneme kurulmuştur. Birinci denemede dişi bireylere eşit ağırlıktaki börülce ve maş fasulyesi karışımına bırakılarak konukçu seçim özgürlüğü verilmiştir. İkinci denemede ise bazı modifikasyonlarla 6 jenerasyon sonra aynı deneme tekrar kurulmuştur. Her iki çalışmada Nijerya'dan gelen popülasyon bıraktıkları yumurtalarının %68-86'sını börülce çeşidini tercih etmiştir, Yemen ve Uganda ise bu oran %30-42 arasında belirlenmiştir. Kamerun biyotipi ise her iki grubun ortasında yer alarak %56-60 oranında börülce çeşidini tercih etmiştir. Bu çalışmada popülasyonların farklı konukçudan gelmesi sonuçları etkilememiştir. Bulunan sonuçların neticesinde konukçu seçiminde coğrafi farklılıkların önemli derecede etkili olduğu belirlenmiştir.

Boeke vd (2004) yaptıkları çalışmada iki çeşit börülce (Kpodigegue ve Kalifornia) kullanılarak, Batı Afrika'dan toplanan üç farklı biyotip (Nijer, Güney ve Kuzey Benin) ile tercihlili ve zorunlu testleme yöntemi kurulmuştur. Çalışmanın sonucunda biyotiplerin bıraktıkları yumurta sayıları, toplam fekundite ve ergin yaşam

süreleri belirlenmiştir. Zorunlu testleme yönteminde birbirinden farklı karakteristik özellik gösteren iki çeşit börülceye erginler bırakılmış ve her gün yumurta bırakılan tohumlar, dişiler ölünceye kadar yenileri ile değiştirilerek denemeye eklenmiştir. Denemede ayrıca kullanılacak olan üç biyotip, iki çeşit b r lce çeşidinde farklı kombinasyonlarda çoğaltılarak çıkış yapan yeni jenerasyon kullanılmıştır. Zorunlu testleme sonucunda biyotipler arasında yumurta sayıları bakımından hiçbir farklılık görülmemiştir. Yaşam süreleri açısından ise (F2 jenerasyonu) Güney Benin populusunu Niger populusundan daha uzun yaşamıştır. Fakat Kuzey Benin’de farklılık gözlenmemiştir. Bütün populuslar Kpodjigugue çeşidinde gelişimleri daha uzun sürmüştür ve bu çeşitten çıkış yapan erginler ilk 24 saatte daha fazla yumurta bıraktıkları gözlenirken tüm yaşam süreleri göz önüne alındığında bıraktıkları yumurta sayılarında farklılık belirlenmemiştir. Tercihli testleme yönteminde ise Kalifornia börülcesi diğer çeşide nazaran daha fazla tercih edilmiştir. Çalışmanın sonucunda böcek biyotiplerinin birbirinden biyolojik ve davranışsal olarak çok farklı olmadıklarını fakat gelişimlerindeki bazı farklılıklardan dolayı birbiriyle kıyaslanabilir olduğu belirtilmiştir.

Lima vd (2004) yaptıkları çalışmada 5 dayanıklı ve 1 hassas olmak üzere 6 farklı b r lce çeşidinde, BTB’i populusunun biyolojik parametrelerini incelemiştir. Çalışmada dişi başına bırakılan yumurta sayısı, yumurtanın fertilitesi ve ergin çıkışlarına ait parametreler alınmıştır. Çalışmanın başında böcek populusunu herbir genotip üzerinde dört jenerasyon boyunca yetiştirilmiştir. Daha sonrasında 5. jenerasyonda ikiye ayrılarak yarısı 4. jenerasyon boyunca yetiştiği çeşitte diğer yarısı ise kontrol (hassas) çeşit üzerinde  oğlatılmıştır. 6. jenerasyonda ise 5. jenerasyon için izlenen yol tekrarlanmıştır. Çalışmada 6. jenerasyondan elde edilen 4 farklı kombinasyona ait ergin bireyler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda yumurta sayıları 66,8 ile 80,2 arasında değiştiğini fakat tohum çeşitlerinin ve farklı kombinasyonlarda çıkış yapan erginlerin yumurta sayılarında herhangi bir farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. Fakat çalışmada bırakılan yumurtanın yaşama oranına ait verilerinde genotipler arasında ve genotiplere ait kombinasyon arasında bile farklılık gözlenmiştir. Ayrıca bu sonuçlar neticesinde dayanıklı çeşitlerde çoğalmış böceğin tekrar hassas çeşitte yetiştirilmesi yumurtanın yaşama oranını arttırdığı belirtilmiştir. Bütün denemede en düşük yaşam oranı ise 6 jenerasyon boyunca dayanıklı çeşitlerde gelişmiş

olan böceklerde belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 5 dayanıklı çeşidinin 3'ünün kısmen dayanıklı olduğunu ve bir tanesinin ise hassas olduğu anlaşılmıştır. Lima vd çalışmanın sonucunda kullanılan genotiplerin *C.maculatus* biyolojilerini engellediği fakat dayanıklılığın sağlanması için başka çeşitlerin denenmesi gerektiği belirtmiştir.

Sadozai vd (2003) börülce tohum böceğinin, değişik tohumlardaki tercihi oranını belirlemiştir. Çalışmada 7 yerel tohum kullanılmıştır. Kullanılan çeşitlerden 2'si nohut, 1 adet maş fasulyesi, 1 adet börülce, 1 adet fasulye ve 1 adet bezelye ve mercimektir. Çalışmada bırakılan yumurta sayısı, ergin çıkışı, gelişim periyodu, cinsiyet oranları, yüzde hasar ve ağırlık kaybı gibi biyolojik parametrelere bakılmıştır. En çok yumurta 51,2 yumurta sayısı ile bezelyede görülürken, en düşük ise 26,6 ile mercimekte görülmüştür. Çeşitlerde görünen gelişim oranı ise yumurta sayısı ile bağımsız gerçekleşmiştir. En kısa gelişim periyodu 19,2 gün ile maş fasulyesinde ve nohutta, en uzununu ise 23 gün ile bezelyede kaydedilmiştir. Ergin çıkışı, yüzde hasar, yüzde ağırlık kaybı (sırasıyla 28,6, %79,55 ve %36,64) en yüksek maş fasulyesinde ve börülcede (27,6, %98,15 ve %26,03), en düşük ise bezelyede (5,2, %11,54 ve %5,32) görülmüştür. Seçilen tüm baklagillerde cinsiyet oranları 50:50 civarındadır. Çalışmada mercimek ve fasulye çeşidine hiç zarar verilmemiştir. Sadozai vd yapılan bu çalışmanın sonucunda maş fasulyesinde, börülcede ve nohut genotiplerinin depolanma sürecinde *C.maculatus*'a karşı tedbirlerin alınması gerektiğini fakat mercimek ve fasulye genotipleri için ekstra bir önlemin alınmasına gerek olmadığı belirtilmiştir.

Mengi (1988) çalışmasında 25°C ve 30°C sıcaklık ile %70 nemde değişik baklagil tanelerin BTB'nin toplam gelişim süresi, ergin çıkış oranı, cinsiyet oranı, yumurtlama öncesi, yumurtlama ve yumurtlama sonrası süreleri, bir dişinin bıraktığı yumurta sayısı, ergin yaşama süresi ve ergin boyuna etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca BTB'nin hangi konukçuları tercih ettikleri de araştırılmıştır. Çalışmada börülce, nohut, bezelye, bakla, soya fasulyesi, ve mercimek (kırmızı) konukçu olarak kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda her iki sıcaklıkta BTB'nin en çabuk börülce ve daha sonrasında nohutta geliştiğini saptamıştır. Mercimekte ise 25°C'de gelişme olmadığı gözlenmiştir. Çalışmada ergin çıkışlarının konukçuya göre farklılık gösterdiği, 22°C'de %44,6 ile 30°C'de %43,8 oranı ile en yüksek börülce çeşidinde bulunmuştur.

Çalışmada zararlının yumurtalama öncesi, yumurtlama ve yumurtlama sonrası süreleri ile bir dişinin bıraktığı yumurta sayısında konukçuların etkisinin önemsiz olduğu bulunmuştur. BTB'nin konukçu tercihinde ise düz yüzeyleri tercih ettiğini bildirilmiştir.

Raja vd (2009) Madurai, Nagapattinam, Coimbatore, Thiruvannamalai, Chennai ve Vellore bölgesinden elde edilen BTB populasyonlarına ait estrase profillerine ve genetik farklılıkları araştırmıştır. Estrase analizlerinde α -naphthyl acetate substrat olarak kullanılmıştır. Genetik çalışmada ise esterase genine spesifik primer kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; estrase analizlerinde Madurai, Thiruvannamalai, Chennai populasyonlarında bir izoenzim, Nagapattinam ve Vellore populasyonlarında iki izoenzim, Coimbatore populasyonunda ise 3 izoenzim bandı görüntülenmiştir. Genetik çalışmalarda ise Madurai, Thiruvannamalai, Chennai populasyonlarında 2 bant, Nagapattinam ve Vellore populasyonlarında 1 bant ve Coimbatore populasyonunda 3 bant elde edilmiştir. Populasyonlar arasındaki benzerlik indeksi 0,4 ile 1.0 arasında değişmektedir. Çalışmanın sonucunda ise Coimbatore bölgesinde elde edilen BTB populasyonunun diğer 5 populasyon ile hem esterase hemde genetiksel olarak önemli farklılıklar görülmüştür.

Gill vd (2006)'da yaptığı çalışmada RAPD tekniği ile BTB erkek bireylerin arasındaki genetik varyasyonu ortaya koymuştur. Çalışmada normal ve anormal erkek bireyler kullanılmıştır. Anormal bireyler, normal bireylerden pigidium ve eltra üzerinde fiziksel farklılıklar ile ayrılmıştır. Çalışmada kullanılan iki adet RAPD primeri ile elde edilen verilerde; P12 primerinde 8-11 bant, P17 primerinde 8-15 bant elde edilmiştir. Bu bantlar normal ve anormal bireylere spesifik şekilde çoğaldığı bulunmuştur. Çalışma sonucunda her iki primerinde polimorfik bant ürettiği ve polimorfizmin P12 primeri için %60-72,22 oranında, P17 primerinde ise %40-66,67 oranında değiştiği bulunmuştur.

2.3. Moleküler Markırlar

Markırlar üçe ayrılmaktadır; morfolojik markırlar, protein markırları ve DNA markırlarıdır.

2.3.1. Morfolojik ve protein markırları

Morfolojik markırlar, ilk genetik çalışmaların canlıların morfolojik özellikleri ile ilgili araştırmaların yoğunlaşmasıyla ortaya çıkmıştır. Böceklerde göz rengi, vücutta bulunan bantlar, benekler, kıllar gibi morfolojik özellikler fenotipik markırlar olarak kullanılmıştır. Morfolojik markırlar, morfolojik özelliklerin canlının bütün yaşam süreci boyunca kendisini ifade etmesinden dolayı her ne kadar avantajlı gibi gözükse de, oluşturulmasının zor ve zaman alıcı olması, sınırlı sayıda bulunmalarından dolayı haritalama yapılamaması ve çevresel koşullardan etkilenebilmesi bu markırların başlıca dezavantajıdır (Farooq ve Azam 2002).

1960'lı yıllardan itibaren proteinlerin polimorfizmlerine ait çalışmalar başlamıştır ve protein markırları daha DNA teknolojilerinin gelişmediği dönemlerde genetik çalışmalara büyük katkıları olmuştur. Protein markırları olarak alloenzimler ve izoenzimler kullanılmaktadır. Alloenzimler bir genin değişik allellerini ifade ederken isoenzimler ise aynı fonksiyona sahip değişik lokusları ifade etmektedir. Protein markırları ile yapılan analizler proteinin moleküler ağırlığına göre poliakrilamid veya nişasta jelleri gibi değişik elektroforez yöntemleri ile ayrıştırılmasını kapsamaktadır. Protein markırları böceklerde insektisit dayanıklılığı (Maa ve Terriere 1983), patojen teşhisi (Wilding vd 1993), kromozom haritalanması (Loukas vd 1979) ve böcek pradatörlerinin tanımlanması (Solomon vd 1996) gibi çalışmalarda kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesi ile protein markırları yerini DNA temelli moleküler yöntemlere bırakmıştır

2.3.2. DNA markırları

DNA temelli markırlar, DNA'nın intronlarında yada ekzonlarında meydana gelebilen mutasyonları belirleyebilmesinden dolayı protein markırlarına oranla çoğu durumda daha fazla polimorfizm bulma kapasitesine sahiptir (Richardson vd 1986).

Yaklaşık son 15 yıldır, DNA markırları böceklerde; genetic akrabalık, filogeni, populasyon dinamiği ve genom haritalarının çıkartılması (Loxdale ve Lushai 1998, Avise 2000, 2004, Severson vd 2001, Heckel 2003) gibi birçok moleküler konulardaki çalışmaların hızla artmasına katkısı olmuştur.

DNA markırlarında aranan özellikler:

- Yüksek oranda polimorfizm göstermesi
- Kodominant kalıtım göstermesi
- Kolay bulunabilir olması
- Genomda yaygın bir biçimde bulunması
- Uygulanabilirliğinin kolay ve hızlı olması
- Tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin yüksek olması
- Çevresel etmenlerden etkilenmemesi
- Laboratuvarlar arasında datanın değişim kolaylığı sağlayabilecek nitelikte (Sharma vd 2008) olmasıdır.

DNA markırları hibridizasyon (RLFP) ve PCR'a dayalı (RAPD, SSR, AFLP) olmak üzere ikiye grupta incelenebilir.

2.3.2.1. RFLP (Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)

Bu alanda kullanılan ilk moleküler teknik Botstein (1980) tarafından geliştirilen hibridizasyon temelli bir markır sistemi olan RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) tekniğidir. RFLP tekniği restriksiyon endonükleazlarla kesilen DNA'nın Southern Blot yöntemi ile işaretlenmiş proplar sayesinde DNA fragmentlerinin görüntülenmesine dayanmaktadır (Agarwal vd 2008).

RFLP markırları oldukça polimorfik, codominant kalıtmı ve tekrarlanabilir özelliktedir. RFLP tekniğinin pahalı olması, radyoaktif madde kullanılması ve yüksek kalitede fazlaca DNA'ya ihtiyaç duymasından dolayı günümüzde bu teknik çok fazla tercih edilmemektedir. Ayrıca metot da kullanılan problemler için önceden bilgiye ihtiyaç duyulması bu yöntemi daha karmaşık hale getirmektedir (Agarwal vd 2008).

DNA'nın bir veya birden fazla bölgesinin eş zamanlı olarak in situ çoğaltılmasını sağlayan teknolojinin (PCR teknolojisi) keşfinden sonra (Mullis vd 1986) moleküler yöntemlerde PCR kullanımı hızla yayılmış ve PCR'a dayalı yeni teknikler ortaya çıkartılmıştır.

2.3.2.2. RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) PCR'a dayalı ilk yöntemlerden birisidir ve temel prensibi rastgele seçilmiş 9-10 bp'lik oligonükleotid primerin düşük bağlanma sıcaklığı ile genomik DNA'ya bağlanarak PCR ile çoğaltılmasıdır. PCR sonucu çoğaltılan örnekler standart jel elektroforezinde yürütölür ve çoğaltılan bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilir.

RAPD yönteminin en büyük avantajı çalışılan organizma genleri hakkında herhangi bir ön bilgiye gerek duyulmayışıdır. Tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer kullanılabilir (Aydın 2004). Bu yöntemin dezavantajı ise RAPD markırlarının çoğunlukla dominant özellikte olması ve DNA'nın heterozigot yada homozigot bireylerden çoğaldığının bilinmemesidir. Ayrıca çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilir.

2.3.2.3. SSR (Basit Sekans Tekrarı)

DNA polimorfizmin ortaya konulmasında kullanılan bir diğer metot ise mikrosatellitlerdir. Mikrosatellitler alternatif olarak, basit sekans tekrarı (SSR), kısa tandem tekrarları (STR) veya basit sekans uzunluk polimorfizmi (SSLPs) olarak da

isimlendirilip, 1 ile 6 bp arasındaki küçük sekans diziliminin ardı ardına tekrarlanmasıdır. Tekrarlanan bu gruplar (AT)_n, (GT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir (Eriş ve Gülen 2004). Mikrosatellitlere özellikle tekrarlanan dizilerin 10 veya daha fazla olduğunda türler içi ve türler arası yüksek seviyede polimorfizm göstermektedir (Queller vd 1993)

Microsatelliteler bu bölgelere spesifik primer kullanmak süreti ile PCR’da çoğaltılmaktadır. PCR sonucunda oluşan ürünler dikey elektroforez veya sekans aletinde capillary gel electrophoresis ile yürütülerek ürünlerin büyüklük farklarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir.

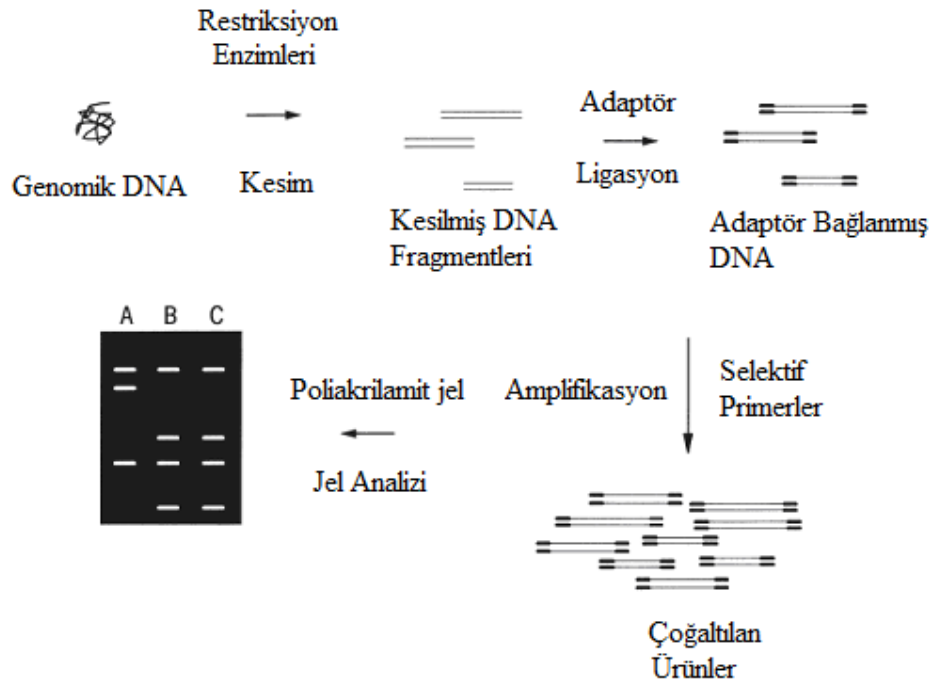
2.3.2.4. SNP (Tek nükleotit polimorfizmi)

Bir popülasyona ait bireylerin genom sekansında bulunan nokta mutasyonlarını ifade etmektedir. Genom içerisine geniş bir şekilde yayılmıştır. Bitki ve hayvanlar aleminde ise en çok bulunan markırlardır. Kodominant bir markır olmasından dolayı homozigot veya heterozigot allelleri etkili bir biçimde ayırabilmektedir.

2.3.2.5. AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfimi)

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm (AFLP) tekniği Vos vd (1995) tarafından geliştirilmiştir. AFLP genomik DNA’nın endonükleazlarla kesilmesiyle elde edilen fragmentlerin PCR’da selektif olarak çoğaltılmasını esas alır (Vos vd 1995).

AFLP tekniği RFLP tekniğinin güvenilirliği ile PCR’ın gücünün kombine edildiği bir tekniktir (Garcia vd 2004). Bu metodun kısa bir sürede çok geniş data oluşturması, ayrıca tekrarlanabilirliği yüksek olması, karmaşık DNA’larda kullanılabilmesi ve RFLP tekniğine göre çok az DNA’ya ihtiyaç duyulmasının yanında kullanılacak olan organizma hakkında genetik herhangi bir bilgiye ihtiyaç duyulmamasından dolayı bu tekniğin değişik organizmalarda genetik varyasyonun ortaya çıkartılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. AFLP’nın en büyük avantajı ise diğer PCR temelli tekniklere göre birçok polimorfik bantların belirleyebilme kapasitesidir.

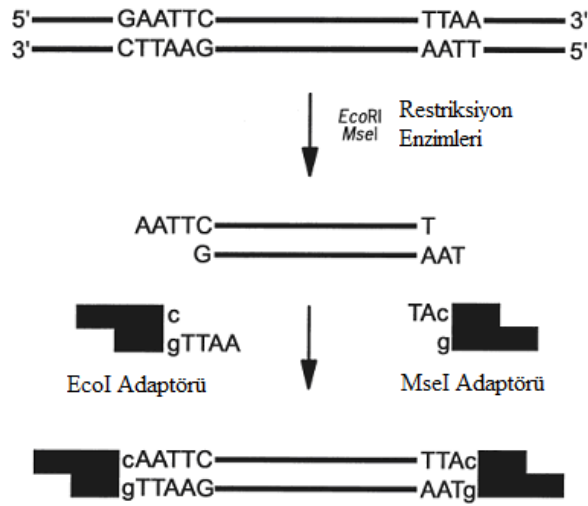


Şekil 2.5. AFLP tekniğinde izlenen aşamalar

AFLP mikroorganizmalarda, hayvanlarda ve bitkiler aleminde birçok biyolojik konuya açıklık getirmiş ayrıca popülasyon genetiği, ekoloji ve evrim çalışmalarında kullanılarak moleküler markırlar arasında önemli bir yer edinmiştir (Bonin vd 2007). AFLP tekniği esasında küçük genoma sahip bitkiler için geliştirilmiştir. Fakat daha büyük genoma sahip organizmalarda da etkin bir şekilde kullanılmıştır. AFLP tekniği böceklerle ilgili araştırmalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Clark 2007).

AFLP'nin ilk aşamasında izole edilen DNA; restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilir, kesim sonucu oluşan DNA parçalarının kesim yerleri ile eşleşen çift sarmallı 10-30 baz uzunluğundaki nükleotid adaptörler T4 ligase enzimi ile bağlanır (Bleas vd 2008). Başarılı bir AFLP için kullanılacak örneklerin DNA'ları aynı protokol ile izole edilmesi, 100-1000ng yüksek moleküler ağırlığında ve bulaşıklıklardan arı olmalıdır. Aksi takdirde AFLP sonuçlarında farklı profillerin oluşmasına neden olabilmektedir. Genellikle AFLP'de kullanılan restriksiyon enzimleri, sık ve seyrek kesim yapan olmak

üzere iki farklı tiptedir. İki farklı enzim kullanılmasının araştırmacıya en büyük yararı, oluşacak olan fragmentlerin sayısında oynama yapabilmesi ve bu sayede kompleks DNA'larda kullanılmasına olanak vermesidir (Blears vd 2008). AFLP tekniğinde *EcoRI*, *AseI*, *HindIII*, *ApaI* ve *PstI* gibi seyrek kesim yapan enzimler ile *MseI* ve *TaqI* gibi sıklıkla kesim yapan enzimler kullanılabilir. Fakat yapılan çalışmalarda genel olarak ucuz olmasından dolayı *EcoRI* ve ökaryot canlıların A ve T nükleotid bakımından zengin olmasından dolayı ise *MseI* enzimi kullanılmaktadır (Vos vd 1995).



Şekil 2.6. DNA'nın kesilmesi ve adaptörlerin bağlanması (Blears vd 1998).

Birinci aşama da oluşan DNA parçalarında bulunan adaptör ve kesim yerlerinin sekans bilgileri primerlerin bağlanacağı hedef bölgeler olarak görev yapmaktadır. Bu aşamada kullanılacak olan primerlere ek baz ekleyerek PCR'da selektif olarak çoğalma işlemi yapılır.

Küçük genoma sahip organizmalarda ($10_6 - 10_7$ baz), her bir primerin bir veya iki selektif nükleotid kullanmak polimorfizmi görüntülemek için yeterlidir. Daha kompleks DNA'larda ise ($10_8 - 10_9$) fazladan selektif nükleotide ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü oluşan amplifikasyon ürünü ile genom büyüklüğü arasında linear bir korelasyon bulunmaktadır (Vos vd 1995). Büyük genomik yapıya sahip organizmalarda genel olarak selektif aşamasından önce preselektif aşaması uygulanmaktadır. Bu aşamada

primer ucuna bir baz eklenerek PCR’da selektif olarak çoğalma işlemi yapılır. Çoğaltılan ürünler daha sonrasında selektif aşamasında kullanılır ve DNA’nın büyüklüğüne göre baz sayısı ayarlanmaktadır. Selektif amplifikasyon sonucu elde edilen bant sayısı 50 ile 100 arasında değişmektedir (Vos vd 1995).

Bu metot ilk geliştirildiğinde primerlerin radioaktif madde ile işaretlenmesinden dolayı analizler yüksek çözünürlüğe sahip poliakrilamit jellerde ayrılarak, otoradyografi, phosphoimager tarayıcı veya gümüş boyama ile gözlemlenilmesi sağlanmıştır (Papa vd 2004). Fakat bu gözlem yöntemlerinin yetersizliği AFLP tekniğinin kullanılmasını sınırlandırmıştır. Son zamanlarda ise floresan boya ile işaretli primerlerin kullanılmasıyla bir çok örneğin eş zamanda analizine olanak vermiştir (Myburg vd 2001). Selektif amplifiasyon safasında kullanılan selektif primerlerin 5’ uçları floresan boya ile işaretlenmektedir. Floresan boya kendine özgü absorpsiyon ve emisyon frekansı sayesinde laser ışınımı altında oluşan parçaların görüntülenmesini sağlamaktadır. (Bleas vd 1998).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Böcek materyali

Bu çalışma, börölce tohum böceği (BTB) olarak bilinen *Callosobruchus maculatus*'un (F.) üç farklı bölgeden alınan populasyonları üzerinde yapılmıştır. Antalya populasyonu, Antalya'nın merkez köylerinde üretilen nohut çeşitlerinden elde edilmiştir. Tez için kullanılacak veriler oluşturulmaya başlanmadan önce, böcekler yaklaşık 36 jenerasyon boyunca 2,5 litrelik üstü sık dokulu tül ile kaplı plastik kavanozlarda nohut üzerinde çoğaltılmıştır. Aydın populasyonu, Aydın ili Nazilli ilçesi, Başaran köyünün börölcelerinden elde edilmiştir. Bu populasyon elimize ulaştıktan sonra 9-10 jenerasyon boyunca börölce üzerinde çoğaltılmıştır. Isparta populasyonu 08/02/09 tarihinde Isparta şehir merkezinin organik pazarından alınan börölcelerden elde edilmiştir. Tez çalışmaları başlamadan 12 jenerasyon boyunca börölce tohumları üzerinde çoğaltılmıştır. Bütün populasyonlar Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünün, 26±1 °C sıcaklık ve 16:8 (aydınlık:karanlık) fotoperiyot koşullarındaki iklim odasında muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Bitki materyali

Bu çalışmada 7 farklı (çeşit-tür) nohut, *Cicer spp*, 1 çeşit börölce, *Vigna unguiculata* L., 1 çeşit fasülye, *Phaseolus vulgaris* L., olmak üzere 9 ayrı genotip kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan nohut çeşitleri 04.2010-09.2010 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Uygulama Alanında yetiştirilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan tohum materyalleri ve özellikleri

Genotip	Latincesi	Özellikleri	Orijini
CA2969	<i>Cicer arietinum</i> L.	Tek yıllık ,kabuli	İspanya
YAR	<i>Cicer arietinum</i> L.	Tek yıllık ,kabuli	Meksika
ICC 4969	<i>Cicer arietinum</i> L.	Tek yıllık ,desi	ICRISAT
AWC 602	<i>Cicer reticulatum</i> Ladiz	Tek yıllık	Türkiye
AWC 613	<i>Cicer reticulatum</i> Ladiz	Tek yıllık	Türkiye
AWC 304	<i>Cicer echinospernum</i> P.H.Davis	Tek yıllık	Türkiye
AWC 603	<i>Cicer echinospernum</i> * <i>reticulatum</i>	Tek yıllık	Türkiye
-	<i>Vigna unguiculata</i> Walp.	Tek yıllık	Afrika
-	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Tek yıllık	Amerika



Şekil 3.1. Denemede kullanılan tohumlar

3.1.3. Böcek yetiştirmede kullanılan materyaller

Zorunlu testleme çalışmalarında 9 cm çapında plastik petri kapları kullanılmıştır. Petri kaplarının kapaklarında havalandırma sağlamak için 2.40 cm çapındaki dairesel alan kesilmiştir ve bu alana sık dokulu tül yapıştırılmıştır. Tercihli testleme yönteminde kullanılmak üzere pleksiglas malzemesinden 20x20x20cm boyutlarında kafes hazırlanmıştır. Havalandırma sağlamak amacıyla pleksiglasın karşılıklı iki tarafından 12x12cm’lik alan kesilerek sık dokulu tüller ile kapatılmıştır.

3.2. Metot

Böcek populasyonlarına ait biyolojik parametrelerin alınabilmesi için tercihli ve zorunlu testleme yöntemi kullanılmıştır. Böcek populasyonları arasındaki polimorfizmi ortaya çıkarmak amacıyla DNA izolasyonu, agaroz jel elektroforezi, AFLP tekniği ve poliakrilamid jeller kullanılmıştır.

3.2.1. Biyolojik parametreleri belirlemede kullanılan yöntemler

3.2.1.1. Zorunlu testleme yöntemi (No-choice test)

Bu yöntem böceklerle konukçu seçme hakkı tanımadan erginlerin tek bir çeşit tohum materyaline bırakılarak biyolojik parametrelerinin saptanması için yapılan testleme yöntemidir. Bu biyolojik parametreler yumurta sayısı, ergin çıkış zamanı, dişi/erkek oranı, ergin çıkış yüzdesi ve tohumlarda meydana gelen ağırlık kaybını ve yüzde kayıp miktarını içermektedir.

Bitki materyallerinin her türlü zararlıdan arı olduğundan emin olmak için 60°C derecede bir gün süre ile inkübatörde bekletilmiştir. Her bir bitki materyalinden 20 adet tohum tartılarak 9cm çapındaki plastik petri kaplarına yerleştirilmiştir. Daha sonra Antalya, Aydın ve Isparta populasyonlarından 0-3 gün-yaşında 5'er dişi ve 5'er erkek birey kaplara bırakılmıştır. Erginler bırakıldıktan beş gün sonra petri kaplarından uzaklaştırılmıştır. Her bir bitki materyali için 3 tekerrür kullanılmıştır. Testlemenin tamamı; 26±1 °C sıcaklık, 16:8 (aydınlık:karanlık) fotoperiyot ve %60±5 nem koşullarına sahip iklim odalarında gerçekleştirilmiştir.

Erginler uzaklaştırıldıktan 3 gün sonra yumurta sayımları yapılmış ve günlük olarak ergin çıkışları takibe alınmıştır. Çıkışlar gerçekleştikten sonra dişi ve erkek ergin bireyler birbirinden ayrılarak sayılmış ve tartılmıştır. Aynı zamanda denemede kullanılan tohumlar da tartılarak ağırlık kaybı olup olmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 3.2. Zorunlu testlemeye ait deneme görüntüsü

3.2.1.2. Tercihli testleme yöntemi (Choice test)

Tercihli yöntemde dokuz farklı tohum materyali bir araya konularak böcekler yumurta bırakacağı tohumu seçme hakkı tanınmıştır. Bu çalışmada böceklerin hangi materyale ne kadar miktarda yumurta bırakacağı saptanmıştır.

Deneme aşamasına geçmeden önce bitki materyalleri 60°C derecede bir gün süre ile inkübatörde bekletilerek zararlılardan arı hale gelmesi sağlanmıştır. Her bir bitki tohumundan 20 adet tartılarak 3,5cm çapındaki küçük petri kaplarına konulmuştur. Bu petri kapların kapak kısmı açık bir vaziyette 20x20x20cm boyutundaki pleksiglas kafese dairesel şekilde tohum gruplarını barındıran petriler yerleştirilmiştir. Pleksiglas kafeslere 0-3 gün-yaşında 10'ar adet dişi ve erkek birey bırakılmıştır ve 3'üncü günde erginler toplanmıştır. Erginler toplandıktan üç gün sonra tohum çeşitlerindeki yumurta sayıları alınarak böcek popülasyonunun hangi tohumu daha çok tercih ettiği saptanmıştır.



Şekil 3.3. Tercihli testlemeye ait deneme görüntüsü

3.2.2. Populasyonlar arasındaki polimorfizmi belirlemede kullanılan yöntemler

3.2.2.1. DNA izolasyonu

Aydın populasyonundan toplam 12 birey, Antalya populasyonundan 11 adet birey ve Isparta populasyonundan 12 adet bireyin DNA izolasyonu CTAB metoduna göre yapılmıştır. Ayrıca dış grup olarak kullanılmak üzere *C. chinensis* türünden 2 birey analizlerde kullanılmak üzere DNA izolasyonuna ve AFLP analizlerine tabii tutulmuştur.

CTAB metoduna göre; her bir birey 1,5 ml'lik mikrotüplerin içerisine konulmuştur ve üzerine 450µl CTAB tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonrasında her tüpe 1 adet 3mm çapındaki demir bilye konularak çalkalayıcı cihazında (Retsch MM200) 20 Hz hızında 10 dakika çalkalayarak böceğin ezilmesi sağlanmıştır. Çalkalanma sonucunda parçalanan bireylerin DNA'larının sıvıya geçmesini sağlamak için 65°C'de 1 saat inkübasyona tabii tutulmuştur. Inkübasyon sonrasında örnekler oda

sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Örneklerde bulunan RNA'lerden kurtulmak için 2 µl Rnase (10mg/ml) konularak 15 dakika 37°C'de inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyondan alınan örneklerden proteinin uzaklaştırılması için 600µl kloroform-İzoamil alkol (25:1) çözeltisi konularak 5 saniye boyunca hafifçe çalkalanmıştır. Örnekler daha sonrasında 15 dakika boyunca 12000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerde tüpün alt kısmında kloroform, orta tabakada protein ve üst fazda ise DNA bulunduğu sıvı olmak üzere üç faza ayrılmıştır. Tüpün içerisinde bulunan süpernatant kısım 1,5ml'lik temiz tüplere alınmıştır. Bu faz içerisindeki DNA'nın çökmesi için 600µl -20 °C'de bulunan izopropanol konulmuştur ve ardından -20°C'deki dondurucuya konularak 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün -20°C'den alınan örneklerin DNA'larının çökmesi amacıyla 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu sürecin sonunda tüplerin dibinde pellet oluştuğu gözlenmiştir. Pellet yerinden oynatılmadan tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmış ve -20°C'de bulunan %70'lik etanolden 600µl ilave edilerek 12000 rpm'de 10 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar boşaltılmıştır ve ters çevrilerek 20- 30 dakika boyunca ağzı açık vaziyette tüp içerisinde kalan etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. Sıvıları kuruyan tüplerin içerisine 50µl TE tampon çözeltisi ilave edilmiştir. DNA'ların sıvıya geçmesi için örnekler +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında ise bozulmamaları için -20°C'de saklanmıştır. DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile %1'lik agarose jel hazırlanarak örnekler jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 65 voltta 15 dakika koşan örnekler UV transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir.

3.2.2.2. AFLP

3.2.2.2.1. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonunun belirlenmesi ve standart hale getirilmesi AFLP tekniğinin aşamalarının daha sağlıklı yapılabilmesi açısından önemlidir. DNA konsantrasyonu jel-elektroforez yöntemiyle, %1'lik jele yüklenen standart DNA/Hind III (0,5µg/µl) ile karşılaştırılarak, miktarları belirlenmeye çalışılmıştır.

Her bir bireyden elde edilen 1µl ve 2µl hacminde DNA miktarları 1µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Örneklerin yanına yine aynı miktarda standart DNA/Hind III (0,5µg/µl) yüklenerek elektroforezde 65 voltta 30 dakika koşturma işlemi yapılmıştır ve daha sonrasında UV transilluminatör ile jel görüntüsü alınmıştır. DNA konsantrasyonu belirlenen örnekler, daha sonrasında AFLP tekniğinde kullanılacak 100ng/µl konsantrasyonuna göre ayarlanmıştır.

3.2.2.2.2. Kesim ve adaptörlerin bağlanması

AFLP yöntemi Vos vd (1995)'in geliştirdiği yöntemle göre yapılmıştır. Fakat tekniğin aşamalarında bazı değişiklikler yapılmıştır. Vos vd (1995)'te AFLP tekniğinde DNA'ların kesilmesinden sonra adaptörlerin bağlanması aşamasına geçmiştir. Bu tezdeki çalışmada ise DNA'nın kesilmesi ve adaptörlerin bağlanması bir arada yapılmıştır. Bu aşamada DNA, kesim enzimleri ile kesilmekte ve kesilen bölgelere uyumlu adaptörler T4 ligaz enzimi ile bağlanmaktadır.

Bu reaksiyon için 8,8 µl'lik son hacim içerisinde 0,55µl ligaz buffer, 0,55µl Neb4 Buffer, 0,0011mg BSA(10mg/ml), 2,5 ünite *EcoR I* enzimi, 3,125 ünite *Mse I* enzimi, 2,5mM Eco adaptör, 1,25 mM *Mse* adaptör ve 50 ünite T4 ligaz enzimi, 100ng DNA ve saf su kullanılmaktadır. Hazırlanan örnekler 37°C 'de 3 saat inkübasyona tabii tutulmuştur. Inkübasyon sürecini tamamlayan örneklerin karışım içerisindeki enzimlerin işlevliğini yitirmesi amacıyla 3 saatin ardından sıcaklık 75°C'ye getirilerek 15 dakika boyunca bir ikinci inkübasyona daha tabii tutulmuştur. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 4µl ürün ve 1µl yükleme boyası karıştırılarak %1,5 agaroz jele yüklenmiştir. Kontrol olarak kesime uğramamış 3 adet, 1µl ve 2µl miktarında DNA'lar jele yüklenmiştir. Standart olarak pUC19/MspI kullanılmıştır. Agaroz jel 0.5 x TAE tampon çözeltisinde 65 voltta 45 dakika koşturulmuştur. Daha sonrasında UV altında görüntülenmiştir.

3.2.2.2.3. Preselektif amplifikasyon aşaması

Örneklerin enzim ile kesildiğini jelde görüntüledikten sonra kalan ürünler 1/20 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen ürünler ile EcoC/MseT preselektif primer kombinasyonu ile PCR makinasında çoğaltılmıştır. Bunun için kullanılan 12µl amplifikasyon reaksiyonunda 2mM MgCl₂, 1X Taq buffer, 0,5 ünite Taq polimeraz, 0,83mM dNTP, 8,4pmole primer EcoC, 8,4pmole primer MseT, 2µl seyreltilmiş kesim ürünü ve 12µl'yi tamamlayacak saf su kullanılmıştır. Sıcaklık ve termal döngü koşulları olarak, 72°C'de 2 dk ön işleminden sonra, 20 döngü boyunca örneklerin denatürasyonu için 94°C'de 20 saniye, primerlerin DNA'ya bağlanması için 56°C'de 30 saniye, polimeraz enziminin dNTP'leri bağlayıp zincirin uzaması için 72°C'de 2 dk tutulmuştur. Daha sonrasında örnekler 72°C'de 2 dakika, 60°C'de 30 dakika tutularak PCR programı bitirilmiştir.

PCR'dan alınan ürünlerden 5 µl, 1µl yükleme boyası ile karıştırılarak %1,5 'luk agaroz jele yüklenmiştir. Jele ayrıca kontrol olarak 1µl ve 2µl miktarlarında kesilmemiş DNA ve standart olarak pUC19/MspI DNA yüklenmiştir.

3.2.2.2.4 Selektif amplifikasyon aşaması

Agaroz jele yüklenen preselektif ürünlerin çalıştığı gözlemlendikten sonra ürünler 1/60 oranında saf su ile seyreltilerek selektif aşamasına geçilmiştir. Selektif amplifikasyonda preselektif aşamasında kullanılan primere uyumlu 2 tane fazladan nükleotid taşıyan EcoCNN ve MseTNN primer kombinasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AFLP analizi için Li-Cor DNA Sequencer Long Readir cihazının her iki deteksiyon kanalına uyumlu floresan işaretli EcoCNN primerleri kullanılmıştır. Bu amplifikasyon reaksiyonu için son hacim 10µl olacak şekilde 1X Taq tampon çözeltisi, 2,5mM MgCl₂, 0,5mM dNTP, 0,4 ünite Taq polimeraz enzimi, 10pmole Eco primeri ile 10pmole Mse primeri ve saf su kullanılmıştır. Ve preselektif ürünlerden 5µl ilave edilmiştir. Ürünlerin amplifikasyon için kullanılan program Çizelge 3.2'de verilmiştir. PCR döngüsü biten örnekler hazırlanan denatüre poliakrilamit jele yüklenip Li-Cor DNA sequencer Long Readir cihazında koşturulmuştur. Ele alınan bütün

örnekler 6 adet selektif kombinasyonu ile taranmıştır. Çizelge 3.3 kullanılan selektif primerler verilmiştir.

Çizelge 3.2. Selektif amplifikasyona ait PCR döngüleri

1.	94°C	2 dk	1 döngü	8.	94°C	20 sn	
2.	94°C	20 sn			60°C	30 sn	1 döngü
	66°C	30 sn	1 döngü		72°C	2 dk	
	72°C	2 dk		9.	94°C	20 sn	
3.	94°C	20 sn			59°C	30 sn	1 döngü
	65°C	30 sn	1 döngü		72°C	2 dk	
	72°C	2 dk		10.	94°C	20 sn	
4.	94°C	20 sn			58°C	30 sn	1 döngü
	64°C	30 sn	1 döngü		72°C	2 dk	
	72°C	2 dk		11.	94°C	20 sn	
5.	94°C	20 sn			57°C	30 sn	1 döngü
	63°C	30 sn	1 döngü		72°C	2 dk	
	72°C	2 dk		12.	94°C	30 sn	
6.	94°C	20 sn			56°C	30sn	25 döngü
	62°C	30 sn	1 döngü		72°C	3 dk	
	72°C	2 dk		13.	60°C	30 dk	1 döngü
7.	94°C	20 sn					
	61°C	30 sn	1 döngü				
	72°C	2 dk					

Çizelge 3.3. Kullanılan selektif primer kombinasyonları

Mse Primeri	Eco Primeri
Mse TTT	Eco CAA
Mse TTT	Eco CTT
Mse TTT	Eco CGG
Mse TAA	Eco CCC
Mse TAA	Eco CGG
Mse TAA	Eco CCG

3.2.2.3 Poliakrilamit jel hazırlanması

Çözelti hazırlanışı;

Toplam hacim 35ml olan %5,5'luk polakrilamit jel hazırlamak için 7M üre, 3,5ml 10X'lik TBE, 11mM Bis akrilamit, 4,8125 ml %40'lık akrilamit ve saf su kullanılmıştır. Cam aparatlara döküleceği sırada 23,5 µl TEMED ve 340µl (%10) Amonium per sülfat çözeltiye hava vermeyecek şekilde ilave edilmiştir.

Poliakrilamit jel çözeltisi hazırlandıktan sonra zemine eğik bir şekilde bulunan 41cm uzunluğunda ve 0,2mm kalınlığında aralayıcı ile arsında boşluk oluşturulan iki cam arasına şırınga yardımı ile dökülmüştür. Döküldükten sonra cam zemine yatay hale getirilerek camın üst kısmına 47 adet kuyucuk oluşmasını sağlayan tarak yerleştirilmiştir. Jelde herhangi bir baloncuk oluşumunda cam aparatların arasına girebilen 0,18mm çapındaki tel yardımı ile baloncuklar cam arasındaki jel içerisinden çıkartılmıştır. Ve jelin 1,5-2 saat polimerize olması sağlanmıştır.

3.2.2.4. Poliakrilamit jele örneklerin yüklenmesi ve Li-Cor cihazında koşturulması

Poliakrilamit jele yüklenecek olan örneklere 5 katı oranında yükleme boyası (%95 formamide, %2,5 EDTA ve %2,5 bromofenol blue 50mg/ml) katılmıştır. 2 dk santrifüj yapılan örnekler daha sonrasında 95°C'de 3 dk inkübasyona tabii tutularak çift sarmallı DNA'nın denatüre olması sağlanmıştır ve hemen ardından DNA'ların tekrar renatüre olmaması için buz üzerine konmuştur. Buz üzerinde bulunan örnekler Hamilton mikropipet yardımı ile her bir jel kuyucuğuna 0,5-1 µl yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 2000 voltta, 25 mA amperlik akımda, 50 watt gücünde ve sıcaklığın 45°C'e olduğu koşullarda 6 saat boyunca koşturulmuştur.

3.2.2.5. AFLP analizlerinin tekrarlanabilirliği

AFLP tekniğinin laboratuarda iyi uygulanamaması durumunda elde edilen DNA profilleri tekrarlanamayabilmekte ve genetik polimorfizm haricinde farklılıklar yanlış yorumlanabilmektedir. Bunlar teknik hatalardır ve elde edilen verileri ciddi bir biçimde

etkileyebilmektedir. Bu çalışmada uygulanan aşamaların güvenilirliğini test etmek amacı ile Aydın, Antalya ve Isparta popülasyonlarına ait börülce tohum böceğinden birer örnek alınmıştır. Alınan böcekler büstüri yardımıyla ikiye bölünerek ayrı tüplerde, tezin daha önceki bölümlerinde anlatıldığı gibi DNA izolasyonu ve AFLP aşamaları uygulanmıştır. Böylelikle bu örnekler bütün deneme boyunca birbirinin tekrarı şeklinde 6 selektif kombinasyonu kurulmuştur. Selektif PCR'ı kurulan örnekler diğer örnekler ile birlikte poliakrilamid jellere yüklenmiştir.

3.2.3. Data analizi

Biyolojik parametrelerden elde edilen verilerin temel istatistikleri Microsoft Excel programında hesaplanmıştır. Elde edilen tüm jel elektroforez görüntüleri görsel olarak incelenerek, bantların aynı jel pozisyonundaki varlığı(1) veya yokluğuna (0) göre kaydedilmiştir. Bant pozisyonlarının aynı olup olmadığına ise AFLP kombinasyonları ile aynı jelde koşturulan bant büyüklük markörü yardımı ile karar verilmiştir. Elde edilen veriler her bir birey için matriks haline getirildikten sonra, POPGENE 1.31 programının (Microsoft Temelli Ücretsiz Popülasyon Genetik Analizi) default parametleri kullanılarak gözlenen (Na) ve etkili (Ne) allel sayıları, polimorfik lokus (P) oranları , beklenen heterozigotluk (h) ve Shannon Sabiti (I) değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca popülasyonlar arası benzerlik, uzaklıklar ve soyağacı bu ücretsiz program tarafından oluşturulmuştur (Yeh ve Boyle 1997).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Biyolojik parametrelere ait bulgular

4.1.1.1. Zorunlu testleme yöntemi

Zorunlu testleme yönteminde, her bir genotipten 20'şer adet tohum bulunan grupların her birine 0-3 günlük, 5 dişi ve 5 erkek birey bırakıldıktan 5 gün sonrasında uzaklaştırılmıştır. Deneme kurulduktan sonra alınan ilk veri, populasyonların tohum üzerine bıraktıkları yumurta sayılarıdır. Erginler uzaklaştırıldıktan 3 gün sonra tohumlar da bulunan yumurtalar aydınlık bir ortamda sayılmıştır. Populasyonlara ait veriler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Populasyonların tohum genotiplerine bıraktıkları yumurta sayıları

Tohum Genotipleri	Latince İsimleri	Populasyonların Yumurta Sayıları		
		Aydın Populasyonu	Isparta Populasyonu	Antalya Populasyonu
CA 2969	<i>C.arietinum</i>	36,3 ± 23	34,3 ± 16	121,6 ± 28
YAR	<i>C.arietinum</i>	30,6 ± 11	22,3 ± 14	53,3 ± 16
AWC602	<i>C.reticulatum</i>	15,3 ± 4,5	13 ± 8	45 ± 25
AWC603	<i>C.echinospernum</i>	0,6 ± 1	2,3 ± 4	-
AWC613	<i>C.reticulatum</i>	4,3 ± 1	19,6 ± 4	23,6 ± 7
AWC304	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-
ICC4969	<i>C.arietinum</i>	31,3 ± 24	22,3 ± 10	61,6 ± 52
Fasulye	<i>P.vulgaris</i>	53,6 ± 34	57 ± 24	131,6 ± 28
Börülce	<i>V.unguiculata</i>	54,3 ± 25	107,3 ± 28	71,3 ± 27
Toplam		226,6 ± 44,7	278,1 ± 34	508 ± 16

Çizelge 4.1.'den de anlaşılacağı üzere, Antalya populasyonu 5 gün zarfında toplamda 508 adet ile en fazla yumurtayı bırakan populasyon olmuştur. 278,1 yumurta ile Isparta ikinci sırada yer alırken, en düşük yumurta bırakma potansiyeli ise 226,6 yumurta ile Aydın populasyonda görülmüştür.

Aydın populasyonu en fazla yumurtayı (54,3) börülce tohumuna bırakmıştır. 53,6 yumurta sayısı ile fasulye tohumu Aydın populasyonunda ikinci sırada yer almaktadır. Aydın populasyonunda YAR, CA2969 ve ICC4969 nohut genotiplerine 30-36 civarında yumurta bırakıldığı gözlemlenilmiştir. Aydın populasyonu AWC602 nohut genotipine nispeten yüksek oranda yumurta bırakmıştır. AWC613 ve AWC603 genotiplerine çok az sayıda yumurta bırakılmıştır, AWC304 tohumlarında ise hiç yumurta gözlenmemiştir.

Isparta populasyonu, Aydın populasyonunda olduğu gibi en fazla yumurtayı börülceye, ardından da fasulye tohumlarına bırakmıştır. Fakat fasulyedeki yumurta sayısı börülce çeşidine oranla %50 civarında düşük bulunmuştur. CA2969 kültür nohodu 3. sırada yer alırken, ICC4969 ve YAR nohut çeşitleri eşit sayıda yumurta ile 4. sırada yer almaktadır. AWC613 ve AWC602 genotiplerindeki yumurta sayısı, ICC4969 ve YAR nohutlarındaki yumurta sayısına yakın bulunmuştur. Isparta populasyonunda en az yumurta AWC603 genotipine bırakılırken, AWC304 genotipine hiç yumurta bırakılmamıştır.

Antalya populasyonu en fazla yumurtayı fasulye tohumlarına bırakırken, CA2969 kültür nohutu ikinci en yüksek sayıda yumurta bırakılan genotip olarak tespit edilmiştir. Börülce tohumlarına bırakılan yumurta sayısı (71) fasulye ve CA2969'a bırakılan yumurta sayısının neredeyse yarısı kadardır. Börülceden sonra en çok yumurta bırakılan genotipler sırasıyla ICC4969, YAR, AWC602, AWC613 genotipleri olmuştur. Antalya populasyonu AWC603 ve AWC304 genotiplerine hiç yumurta bırakmamıştır.

Deneme kurulduktan 3 hafta sonra tohumlar her gün gözlenerek ergin çıkışları kaydedilmiştir. Çizelge 4.2.'de farklı tohum çeşit/türlerinde bulunan populasyonların ergin birey çıkışları verilmiştir. Çizelge 4.2.'deki veriler ışığında, tüm tohum materyali

üzerindeki toplam çıkış göz önüne alındığında en fazla çıkış 193 ergin ile Antalya populasyonunda olmuştur. Isparta populasyonu 143,3 ergin çıkışı ile ikinci, Aydın populasyonu 112,3 ergin çıkışı ile üçüncü sırada yer almaktadır. Ancak, bu rakamlarda bırakılan yumurta sayısının farklı olmasının etkisi olduğu unutulmamalıdır. Nitekim, Antalya populasyonunun bıraktığı toplam yumurta sayısı diğer iki popülasyona göre yaklaşık 2 kat fazladır. Populasyonlarda ergin çıkışının en fazla olduğu çeşitler Aydın ve Isparta populasyonları için 45,3 ve 85 ergin ile börülce, Antalya populasyonu için 63,6 ergin ile CA2969 genotipi olmuştur.

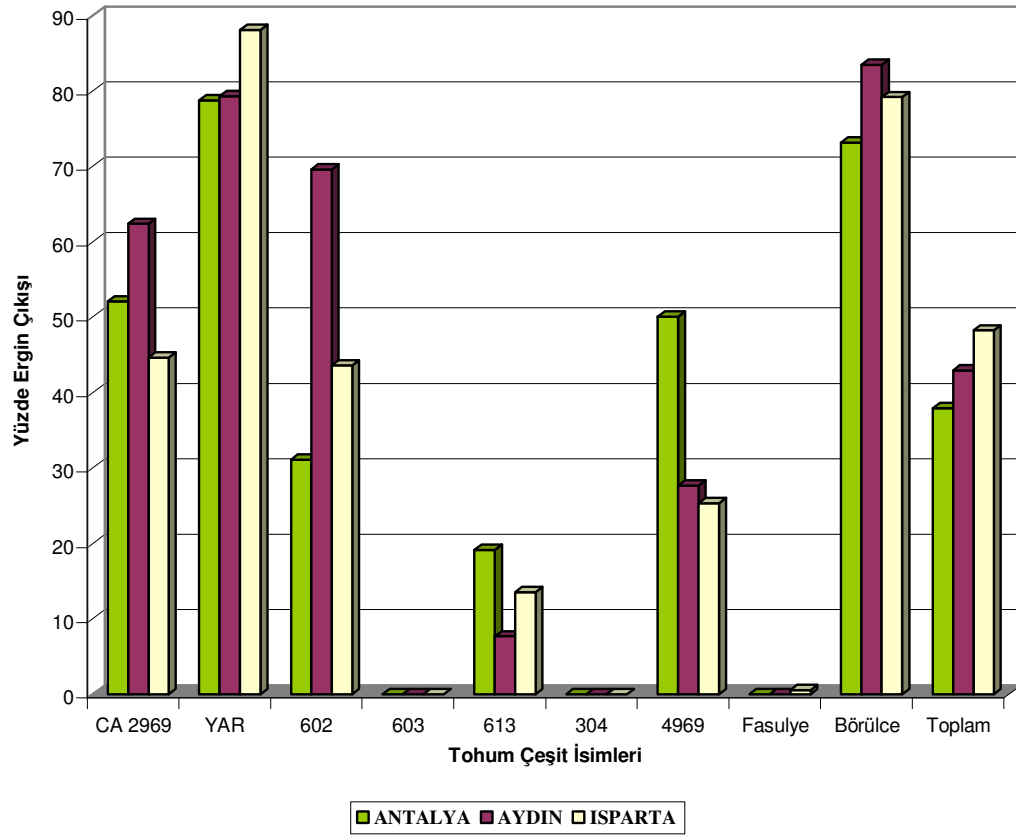
Çizelge 4.2. BTB populasyonların farklı tohum materyalleri üzerinde ergin çıkışları

Tohum Genotipleri	Latince İsimleri	Populasyonlara Ait Ergin Çıkışları		
		Aydın Populasyonu	Isparta Populasyonu	Antalya Populasyonu
CA2969	<i>C.arietinum</i>	22,7 ± 18	15,3 ± 9	63,6 ± 17
YAR	<i>C.arietinum</i>	24,3 ± 10	19,7 ± 15	42 ± 13
AWC602	<i>C.reticulatum</i>	10,6 ± 3,7	5,7 ± 7	14 ± 10
AWC603	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-
AWC613	<i>C.reticulatum</i>	0,33 ± 0,5	2,7 ± 0,5	4,3 ± 0,5
AWC304	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-
ICC4969	<i>C.arietinum</i>	8,67 ± 6	5,7 ± 7	15,6 ± 12
Fasulye	<i>P.vulgaris</i>	-	0,3 ± 0,5	-
Börülce	<i>V.unguiculata</i>	45,3 ± 9	85 ± 15	52,6 ± 22
Toplam		112,3 ± 25	143,3 ± 39	193 ± 24

Populasyonlar arasında en fazla ergin çıkışı 85 birey ile Isparta populasyonunda börülce tohumları üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bunu 63,6 ergin çıkışı ile Antalya populasyonunun bulunduğu CA2969 nohut çeşidi takip etmiştir. Her üç populasyon için AWC613 genotipinde az sayıda ergin çıkışı, AWC603 ve AWC304 genotiplerinde ise hiç ergin çıkışı görülmemiştir. Ergin çıkışı görülmediği bir başka tohum materyali ise Aydın ve Antalya populasyonlarının bulunduğu fasulyedir. Buna karşı Isparta populasyonunda fasulye de çok düşük sayıda da olsa ergin çıkışı görülmüştür. En fazla çıkışın yapıldığı çeşitler sıralandığında Aydın ve Isparta

populasyonları benzerlik gösterirken, Antalya populasyonu daha farklı bir sıralanış sergilemektedir.

Şekil 4.1’de populasyonların yumurta sayılarına göre yüzde çıkış sayıları grafik olarak verilmiştir. Üç populasyon içerisinde yüzde olarak en fazla çıkış %88 oranı ile Isparta populasyonun bulunduğu Yar nohut çeşidinde olmuştur. Yar çeşidindeki diğer populasyonların yüzde çıkışları da oldukça yüksektir. Bu oran Aydın için %79, Antalya populasyonunda ise %78 oranındadır. En düşük çıkış ise %7,6 ile Aydın populasyonunun AWC613 nohut genotipinde görülmektedir.



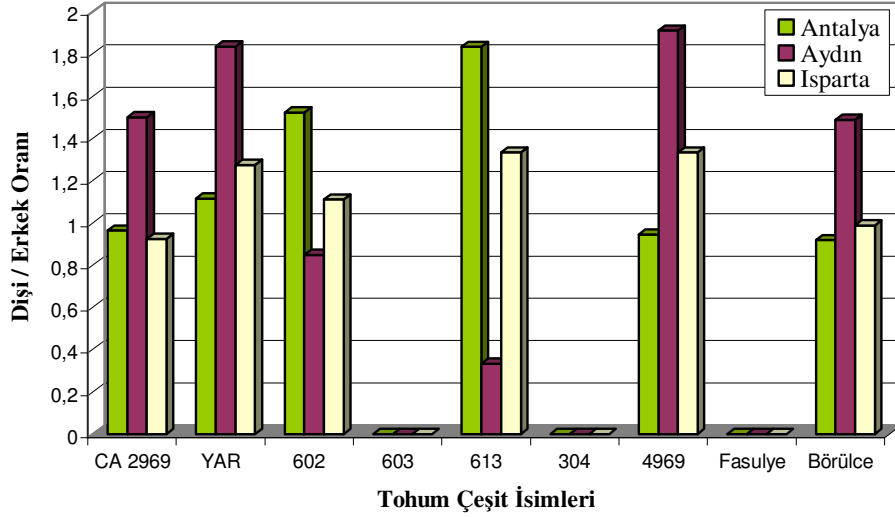
Şekil 4.1. Populasyonların tohum genotiplerinde gözlenen ergin çıkış yüzdeleri

Çıkış yüzdeleri çeşitler bazında sıralandığında bütün populasyonlar farklı profiller oluşturmuştur. Antalya populasyonunda %78 ile Yar çeşidi birinci

olurken, %73 ile börölce ikinci, %52 ile CA2969 üçüncü, %50 ile ICC4969 dördüncü, %31 ile AWC602 beşinci, %19 oranı ile AWC613 çeşidi altıncı sıradadır. AWC603, AWC304 ve fasulyede ise çıkış gözlemlenilmemiştir. Aydın popülasyonunda %83 ile börölce çeşidi birinci olurken, %79 ile Yar ikinci, %69 ile AWC602 üçüncü, %62 ile CA2969 dördüncü, %27 ile ICC4969 beşinci, %7,6 ile AWC613 altıncı olmuştur. Isparta popülasyonunda ise Yar %88 oranı ile birinci, börölce %79 ile ikinci, %44 ile CA2969 üçüncü, %43 ile AWC602 dördüncü, %25 ile ICC4969 beşinci, %13 oranı ile AWC613 çeşidi ile altıncı sırada yer almıştır.

Popülasyonlar arasında toplam çıkışta çok fark gözlenmemiştir. %51,4 ile Isparta birinci, %49,5 ile Aydın ikinci, %37,9 oranı ile Antalya popülasyonu üçüncü sırada yer almıştır. Her üç popülasyon için çıkış yüzdesinin yüksek olduğu tohum materyalleri börölce ve Yar nohut çeşidi iken, en az olduğu genotip ise AWC613 olarak tespit edilmiştir.

Popülasyonlara ait çıkış yapan erginlerin dişi/erkek oranları ise şekil 4.2.'de verilmiştir. Grafikteki verilerden Isparta popülasyonuna baktığımızda CA2969, Yar, AWC602, börölce'den çıkış yapan erginlerin dişi/erkek oranı benzer sonuç verirken AWC613 ve ICC4969 çeşitlerinde dişilerin biraz daha fazla çıktığını gösteren oranlar elde edilmiştir. Bunun sebebi çeşitlerdeki ergin çıkışının düşük miktarda olması ve çıkan erginlerin çoğunun dişi olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.2. Populasyonların tohum genotiplerinde çıkış yapan bireylerdeki dişi/erkek oranı

Aydın populasyonunda en fazla dişi-erkek oranı 1,9 ile ICC4969 nohut çeşidinde görülürken en düşük oran 0,8 seviyedeki AWC602 çeşidinde görülmektedir. Bu populasyonda AWC613 çeşidinde görülen oranın düşük olması çıkış yapan birey sayısının azlığından dolayı kaynaklanmaktadır. Antalya populasyonunda 1,8 oranı ile AWC613 çeşidi en fazla orana sahipken, 1,5 ile AWC602 çeşidi ikinci olmuştur. Yar çeşidi 1,1 oranı ile üçüncü olurken CA2969, ICC4969 ve börülcedeki dişi erkek oranı 0,9 ile aynı sonucu vermiştir.

Denemenin son aşamasına alınan veri ise tohumlarda meydana gelen ağırlık kaybıdır. Populasyonlara ait yüzde tohum kaybı çizelge 4.3’de verilmiştir. Tablo 4.3’den de anlaşıldığı üzere, her üç populasyonda en fazla ağırlık kaybını börülce üzerinde meydana getirmiştir. Börülceyi takiben Antalya ve Isparta populasyonu için CA2969 ikinci en önemli tohum kaybına uğrayan genotip olarak bulunmuştur. Aydın populasyonu için ise ICC4969 en fazla kayba uğrayan ikinci genotip olarak görülmüştür.

Çizelge 4.3. Populasyonların tohum genotiplerinde meydana getirdiği yüzde kayıp oranı

Tohum	Latince	Antalya Pop.	Aydın Pop.	Isparta Pop.
Genotipleri	İsimleri	% Kayıp oranı	% Kayıp oranı	% Kayıp oranı
CA2969	<i>C.arietinum</i>	22,6±8,2	13,5±9,6	11,5±9,5
YAR	<i>C.arietinum</i>	12,8±1,8	9,2±2,4	6,1±2,8
AWC602	<i>C.reticulatum</i>	8,6±6,3	8,8±2,7	4,7±6
AWC603	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-
AWC613	<i>C.reticulatum</i>	4,4±1,9	1,3±2,2	2,6±0,9
AWC304	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-
ICC4969	<i>C.arietinum</i>	15,5±12,5	19,16±14,6	8,2±9,6
Fasulye	<i>P.vulgaris</i>	-	-	0,9±1,6
Börülce	<i>V.unguiculata</i>	32,75±7,4	29,9±21,1	37,6±10,8

Isparta populasyonunun farklı baklagil tohumluklarında oluşturduğu zarar kayıp yüzdeleri ile Antalya populasyonunun oluşturduğu oranlara paralellik göstermiş ve aynı sıralamaya sahip olmuştur. Aydın populasyonu ise benzerlik göstermiş, ancak börülceyi takiben ikinci en önemli kayıp oranı CA2969 yerine ICC4969 nohut genotipinde olmuştur.

Ergin bireylerin çıkışlarının verileri günlük olarak alınmıştır. Alınan bu veriler ışığında populasyonlara ait %50 ergin bireyin çıkışları ve toplam erginin çıkış zamanı gün olarak çizelge 4.4’de ifade edilmiştir. Süreler hesaplanırken denemenin ilk kurulduğu gün esas alınmıştır.

Çizelge 4.4’de görüldüğü üzere, populasyonlar arasında en erken %50 ergin çıkışları Antalya populasyonundan elde edilmiştir (AWC602 çeşidi Aydın populasyonu ile aynı zamanda çıkış yapmıştır). Antalya populasyonunda CA2969, Yar ve börülcede çıkışlar 63 günde, ICC4969 64 günde, AWC602 66 günde, AWC613 ise 67 günde çıkış göstermiştir. Aydın populasyonunda %50 ergin çıkışının en erken çıkış süresi 66 gün ile AWC602 çeşidinde görülürken en uzun çıkış süresi 70 gün ile CA2969 çeşidinde görülmüştür. %50 erginin çıkışının en uzun sürede gerçekleştiği Isparta populasyonu ICC4969 çeşidi üzerinde 78 günde gelişmiştir. Toplam ergin çıkış süresi Antalya

populasyonunda diğer populasyonlara nazaran daha kısa sürede gerçekleşmiştir ve çoğu genotipte 69 gün içerisinde tamamlanmıştır. En uzun çıkış, 83 gün ile Aydın populasyonunda YAR çeşidi üzerinde ve Isparta populasyonunda börülce üzerinde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı BTB'i populasyonlarının tohum genotiplerinde %50 ve %100 ergin çıkış süreleri (gün)

Tohum Genotipleri	Latince İsimleri	Antalya Populasyonu		Aydın Populasyonu		Isparta Populasyonu	
		50%		50%		50%	
		Erginin	Toplam	Erginin	Toplam	Erginin	Toplam
		Çıkış Süresi	Süre	Çıkış Süresi	Süre	Çıkış Süresi	Süre
CA2969	<i>C.arietinum</i>	63±0,5	69	70±1,7	73	72±3	80
YAR	<i>C.arietinum</i>	63±0	69	68±0,5	83	68±0,5	72
AWC602	<i>C.reticulatum</i>	66±0,5	69	66±0,5	81	77±44	79
AWC603	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-	-	-	-
AWC613	<i>C.reticulatum</i>	67±2	69	-*	-	-*	-
AWC304	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-	-	-	-
ICC4969	<i>C.arietinum</i>	64±4	69	69±2,3	80	78±1,7	82
Fasulye	<i>P.vulgaris</i>	-	-	-	-	-*	-
Börülce	<i>V.unguiculata</i>	63±1	70	67±0,5	80	71±1,15	83

*Çıkış yapan ergin sayısı az olduğu için erginlerin tamamının çıkışı tek güne denk gelmektedir.

4.1.1.2. Tercihli testleme yöntemi

Tercihli testleme yönteminde 10'ar adet dişi ve erkek birey 3 gün süre ile deneme kaplarına bıraktıktan sonra toplanmıştır ve daha sonrasında tohum yüzeyine bırakılan yumurtalar sayılmıştır. Çizelge 4.5'de üç populasyona ait yumurta sayıları ve tercih ettikleri tohumlar yüzde olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.5. BTB’i populasyonlarının tercihli testleme yönteminde farklı tohum genotiplerine bıraktıkları yumurta sayıları ve tercih yüzdeleri

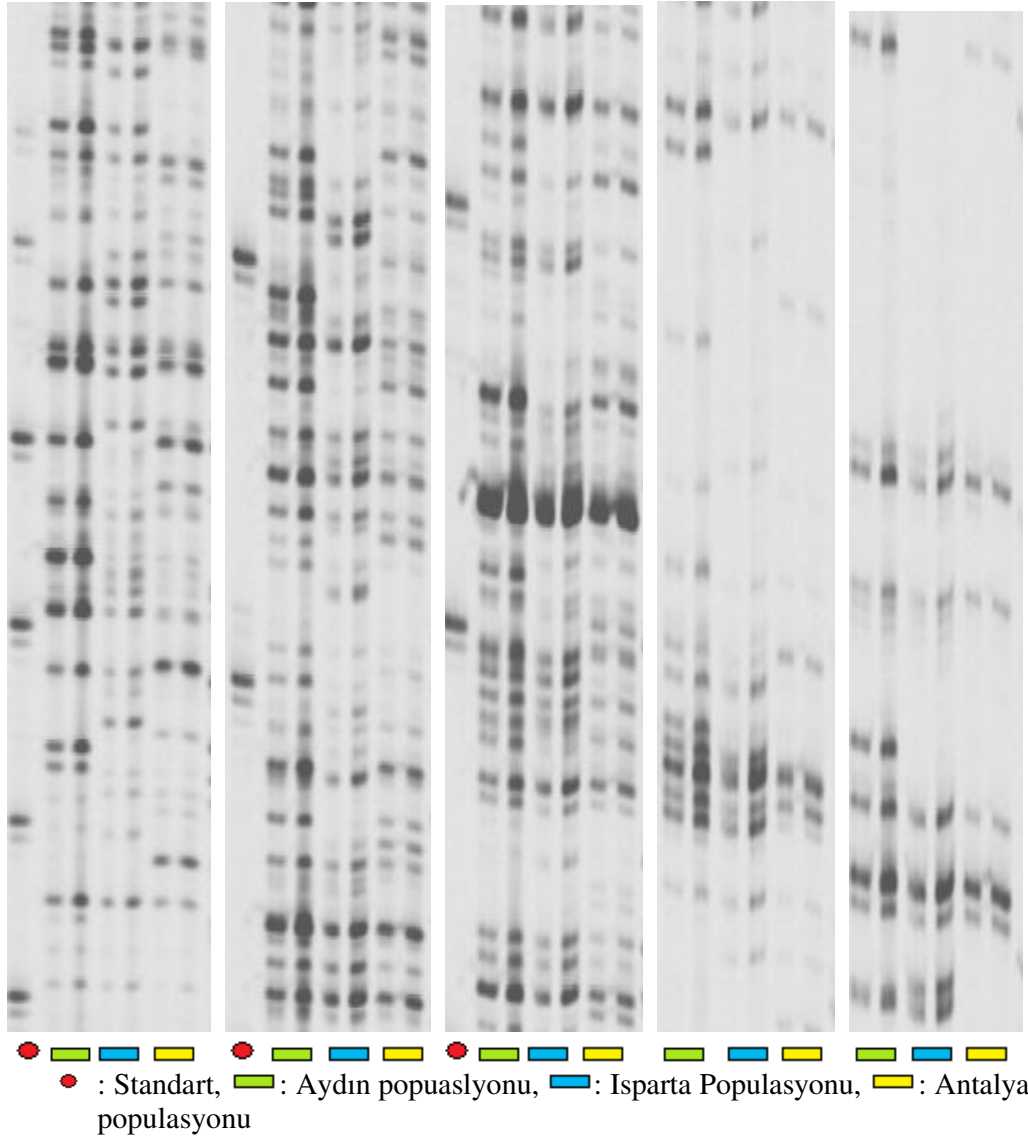
Tohum Genotipleri	Latince İsimleri	Antalya		Aydın		Isparta	
		Populasyonu		Populasyonu		Populasyonu	
		Yumurta Sayısı	Yüzde Tercih	Yumurta Sayısı	Yüzde Tercih	Yumurta Sayısı	Yüzde Tercih
CA2969	<i>C.arietinum</i>	67	12,8	36	11,8	75	16,7
YAR	<i>C.arietinum</i>	7	1,3	1	0,3	12	2,7
AWC602	<i>C.reticulatum</i>	3	0,6	-	-	2	0,4
AWC603	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-	-	-	-
AWC613	<i>C.reticulatum</i>	1	0,2	-	-	-	-
AWC304	<i>C.echinospernum</i>	-	-	-	-	-	-
ICC4969	<i>C.arietinum</i>	16	3,1	2	0,6	1	0,2
Fasulye	<i>P.vulgaris</i>	144	27,6	126	41,5	178	39,7
Börülce	<i>V.unguiculata</i>	283	54,3	139	45,7	180	40,2
Toplam		521	100	304	100	448	100

Her üç populasyonun yumurta koymak için en çok tercih ettiği çeşit börülce olarak bulunmuştur (%40-54). Börülceden sonra ise her üç populasyonun tercih ettiği ikinci çeşit ise fasulye olmuştur. Aydın ve Isparta populasyonları fasulyenin tercih edilme yüzdesi börülce çeşidine yakındır, fakat Antalya populasyonunda bu yüzde yaklaşık olarak yarıya inmiştir. CA2969 nohut çeşidi % 10- 17 arasında değişen oranlar ile bütün populasyonların üçüncü olarak tercih ettiği tohum olmuştur. Çok az tercih edilen diğer çeşitler ise YAR, AWC602, ICC4969, AWC602 çeşitleri olmuştur. AWC304 ve AWC603 nolu çeşitler bütün populasyonlar tarafından hiç tercih edilmediği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde AWC613 çeşidine Antalya populasyonu tarafından bırakılan tek yumurta dışında hiç bir yumurta bırakılmamıştır.

4.1.2. Moleküler çalışmalara ait bulgular

4.1.2.1. AFLP tekrarlanabilirliği

DNA izolasyon aşamasından, jel yükleme aşamasına kadar tüm protokol basamaklarında aynı bireye ait dokulardan tekrarlanarak oluşturulan AFLP bant profilleri şekil 4.6'da gösterilmiştir. Poliakrilamit jele yüklenmiş selektif ürünlerin görüntüsü incelendiğinde incelenen 4 farklı primer kombinasyonunda da tekrarlanan AFLP profillerinin %99 dan fazlasının aynı olduğu gözlemlenmiştir.



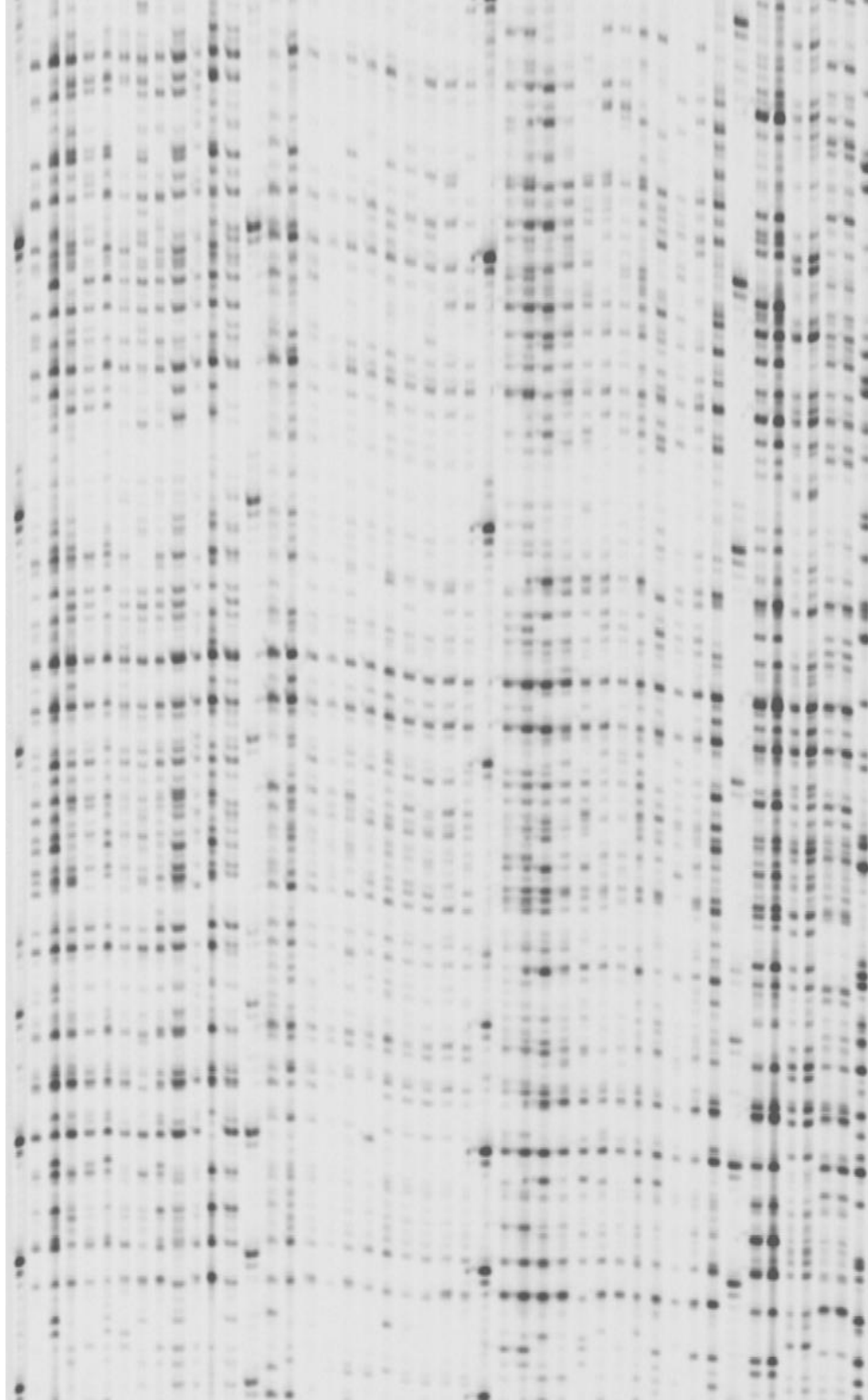
şekil 4.3. Selektif rnlerin poliakrilamit jeldeki görüntüsü

4.1.2.2. Populasyonlarda AFLP tekniği ile ortaya konan genetik yapıya ait bulgular

Genetik çalışmalarda kullanılan AFLP tekniği üç BTB'i populasyonu ve dış grup olarak kullanılan bir *C. chinensis* populasyonu arasında çok geniş bir varyasyonu ortaya koymuştur. Her bir AFLP primer kombinasyonu için çoğaltılan bant büyüklüklerinin 60 ve 410 bp arasında değişken oldukları görülmüştür. Bir rnek olarak AFLP bant profili şekil 4.7'de gösterilmiştir. Ele alınan 6 AFLP kombinasyonunun hepsi 10 ve üzerinde polimorfik lokus oluşturarak kullanılan tekniğin genetik varyasyonu ortaya koyma gücünü göstermiştir.

Bütün populasyonlar üzerinden hesaplanan toplam polimorfik bant sayısı ise 254 olarak bulunmuştur. Bu 254 polimorfik lokus içerisinden, %10 ve daha fazla seviyede polimorfik olan lokus sayısı ise 207 olarak hesaplanmıştır. Diğer bir deyişle elde edilen polimorfik bantların 47 tanesi populasyonlarda %10dan daha az seviyede polimorfizmi göstermektedir. Frekansları %10 seviyesinden düşük olan bu lokuslar elemine edilerek analizler 207 polimorfik lokus üzerinden yapılmıştır.

Şekil 4.4. Li-Cor DNA sequencer readır cihazında koşturulmuş selektif ürünlere ait poliakrilamit jel görüntüsü



Elde edilen 207 polimorfik lokusun populasyonlar içerisindeki polimorfizm seviyesine bakıldığında en yüksek seviyenin % 83.6 ile börölce üzerinden toplanan Isparta populasyonunda olduğu bulunmuştur. Yine börölce üzerinden toplanan Aydın populasyonunda %72.5 düzeyinde polimorfizm elde edilmiştir. Polimorfizm seviyesinin en düşük olduğu Antalya populasyonunda oran %56.5 seviyesinde kalmıştır (Çizelge 4.6.). Ortalama allel (Na) ve etkili allel sayıları (Ne) elde edilen polimorfik lokus oranları ile paralellik göstererek, Isparta, Aydın ve Antalya populasyon sıralaması değişmemiştir (Çizelge 4.6). Heterozigotluk (h) değerleri açısından en yüksek değer yine Isparta populasyonunda (0.33) bulunmuş, bu populasyonu Aydın ve Antalya populasyonları takip etmiştir (Çizelge 4.6). Benzer şekilde, Shannon'un bioçeşitlilik indeksi Isparta, Aydın ve Antalya populasyonları sırasını takip etmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. BTB populasyonları için 6 AFLP primer kombinasyonu ile hesaplanan genetik çeşitlilik değerleri

Populasyon	N	Na	Ne	h	I	P(%)
Aydın	12	1.72±.44	1.50±.39	0.28±.21	0.41±.28	72.5
Antalya	11	1.56±.49	1.37±.39	0.21±.21	0.31±.29	56,5
Isparta	12	1.84±.37	1.59±.37	0.33±.18	0.48±.25	83,6
Ortalama		2.00±0	1.70±.25	0.40±.10	0.58±.12	70,8

Na: Gözlenen allel sayısı

Ne; Etkin allel sayısı

h:Gen çeşitliliği

I: Shannon indeksi

P: Polimorfik lokus yüzdesi

Genetik analiz sonuçlarına göre, populasyon içi genetik çeşitliliği ölçen Hs değeri %21 olarak bulunurken, toplam genetik çeşitlilik göstergesi olan Ht değeri % 41 olarak tahmin edilmiştir. Populasyonlar arası farklılaşmayı gösteren GST değeri 0.501 olarak hesaplanırken, gen akışı değeri (Nm) 0.497 seviyesinde kalmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. AFLP tekniği ile üç farklı BTB popülasyonu için hesaplanan gen çeşitliliği, genetik farklılaşma ve gen akışı parametreleri

HT	HS	GST	Nm
0.41±0.01	0.21±0.01	0.501	0.497

Ht: Tüm popülasyonlarda beklenen heterozigotluk

Hs: Alt popülasyonlarda beklenen heterozigotluk

Gst:Popülasyonlar arası farklılaşma değeri (Hs/Ht)

Nm:Popülasyonlar arası gen akış değeri ($Nm = 0,5(1-Gst)/Gst$)

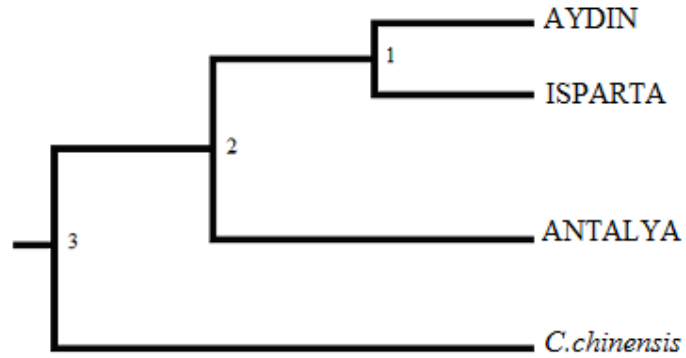
Popülasyonlar arası genetik mesafe ve benzerlik değerleri 4.8. nolu çizelgede verilmiştir. Bu değerlere bakıldığında genetik olarak birbirine en yakın popülasyonların börülce üzerinden toplanan Aydın ve Isparta popülasyonları (0,82) olduğu gözlenlenmektedir. Her iki popülasyonun nohut tohumları üzerinde yetiştirilen Antalya popülasyonuna olan genetik uzaklıkları benzer düzeyde bulunmuştur (0,73 ve 0,75). Göreceli bir değerlendirme yapılabilmesi açısından dış grup olarak analizlere alınan *C. chinensis* popülasyonuna olan benzerlik değerleri, Aydın, Isparta ve Antalya için sırası ile, 0,54, 0,62 ve 0,50 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. Üç farklı BTB popülasyonun 6 AFLP primer kombinasyonu ile oluşturduğu genetik uzaklık-benzerlik matrisi

Popülasyon	Aydın	Antalya	Isparta	<i>C. chinensis</i>
Aydın	****	0,7339	0,8247	0,5381
Antalya	0,309	****	0,7541	0,5025
Isparta	0,193	0,2823	****	0,6255
<i>C. chinensis</i>	0,62	0,6882	0,4692	****

Elde edilen genetik veriler ile oluşturulan genetik soy ağacı incelendiğinde, yine BTB populasyonlarının birlikte kümeleştiği ve Antalya populasyonun bu populasyonlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir (Şekil4.7). Dış grup olarak ele alınan *C. chinensis* ise daha farklı bir ana kol oluşturarak *C. maculatus* populasyonlarından ayrılmıştır.

Şekil 4.5. Üç farklı BTB populasyonunun 6 AFLP primer kombinasyonu ile oluşturduğu dendogram



4.2. Tartışma

BTB'nin biyolojik parametrelerinin elde edilmesi için tercihli ve zorunlu testleme yöntemi bir çok çalışmada yer almıştır. Bu çalışmaların bir kısmı yapılan bu tez ile paralellik gösterse de bazılarının izledikleri metotta değişiklikler mevcuttur.

Bulgular kısmında bulunan veriler ışığında zorunlu testleme yöntemine ait sonuçlarda Antalya ile diğer iki populasyon arasında yumurta sayıları bakımından ciddi bir farklılık bulunduğu ortaya konulmuştur. Antalya populasyonu toplam 508 adet yumurta bırakırken, Isparta populasyonu 278 adet, Aydın populasyonu ise 226,6 adet yumurta bırakmıştır. Isparta ve Aydın populasyonları arasında toplam bırakılan yumurta sayıları arasındaki fark önemsiz olarak bulunmuştur. Populasyonların çeşitlere bıraktığı yumurta sayıları incelendiğinde; AWC602, AWC603 ve ICC4969 çeşitlerine her üç populasyon arasında fark bulunmamıştır. Yar çeşidinde sadece Antalya ve Isparta populasyonları arasında, bürölcede ise sadece Aydın ve Isparta populasyonu arasında fark bulunmuştur. Populasyonların çeşitlere bıraktıkları yumurta sayılarının dağılımına bakıldığında, Isparta ve Aydın populasyonları yakın profil oluştururken Antalya populasyonu çok farklı bir profil oluşturmuştur. Görülen bu farklılığın, Antalya populasyonunun ilk konukçusunun nohut olması ve uzun süredir de bu çeşitte çoğaltılıyor olmasından, yine Aydın ve Isparta populasyonlarında ilk konukçularının bürölce olması ve devamlı olarak bürölce üzerinde çoğaltılmasıyla açıklanabilir. Bu hipotezi doğrular nitelikte olan Boeke vd (2004)'de yaptığı çalışmada biyotipler arasında fark bulunmamasının nedeni olarak biyotiplerin hepsinin bürölceden toplanmasından kaynaklanmış olabileceği vurgulanmıştır.

Yapılan çalışmada populasyonlar arasında farklılığın görülmesi Dick ve Credland (1984)'de yaptığı çalışmanın bulgularında paralellik göstermektedir. Dick ve Credland (1984)'de Yemen, Nijerya ve Brezilya'dan alınan biyotiplerin bürölce çeşidine bıraktıkları yumurta sayılarını incelemiş ve belirli sayıda bürölce böcekleri sunulduğunda biyotipler arasında yumurta sayılarında farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir. Buna karşın Boeke vd 2004'te yaptığı çalışmada Niamey, Kuzey ve Güney Beninden toplanan üç biyotipin farklı bürölce çeşidine bıraktıkları yumurta

sayıları arasında fark gözlenmemiştir. Çalışmada dişilerin yumurta bıraktığı tohumlar günlük olarak yenileri ile yer değiştirilmiştir ve biyotipler arasındaki farklılığın oluşmama sebebinin izlenen bu metot olabileceği vurgulanmıştır.

Boeke vd (2004)'nin aksine Guedes vd 2003'te yaptığı çalışmada biyotiplerin bıraktıkları yumurta sayıları arasında farklılıklar bulmuştur. Çalışmada Brezilya, Hindistan, Nijerya, Uganda ve Yemen olmak üzere toplamda 5 farklı biyotipin maş fasulyesi ve börülce üzerinde tohum başına bırakılan yumurta sayılarını belirlemiştir. Börülce çeşidinde Nijerya, Yemen ve Hindistan popülasyonlarının yumurta sayıları arasında farklılık bulunurken, maş fasulyesinde Brezilya, Nijerya ve Uganda/Yemen biyotipleri arasında farklılıklar bulunmuştur. Guedes vd (2004)'nin yaptığı çalışmada biyotipler arasında fark bulunmasının yanı sıra biyotiplerin farklı genotiplere bıraktıkları yumurta sayıları arasında da fark bulmuştur. Bu sonuçlar tez çalışmasındaki veriler ile paralellik göstermektedir.

Antalya popülasyonu en fazla yumurtayı CA2969 çeşidine bırakırken, Aydın ve Isparta popülasyonu börülceye bırakmıştır. Aydın ve Isparta popülasyonlarının börülceyi, Antalya popülasyonun ise bir nohut çeşidini tercih etmesi yine ilk konukçularının bu çeşitler olmasından kaynaklanmış olabilir. Bırakılan yumurta sayıları ile yüzde ergin çıkış oranı sadece Aydın popülasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Aydın popülasyonunda en fazla yumurta sayısı ve ergin çıkışı börülcede bulunmuştur. Isparta popülasyonunda en fazla yumurta börülcede görülürken, yüzde çıkışın en fazla olduğu çeşit Yar olarak bulunmuştur. Antalya popülasyonu en fazla yumurtayı fasulyeye bırakırken bu çeşitte ergin çıkışı hiç olmadığı gözlenmiştir.

Her üç popülasyonun ikinci olarak en fazla yumurta bıraktığı tohum fasulye olmuştur. Her üç popülasyonun fasulyeye fazla yumurta bırakması tohum yüzeyinin daha saydam ve pürüzsüz olmasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü dişiler yumurtalarını genel olarak daha pürüzsüz tohumlara yumurta bırakmayı tercih etmektedir (Nwanze ve Horber 1976). Bu durum dişilerin yumurta gelişimlerini garanti altına almak istemesinden kaynaklanabilmektedir. Nitekim, Nwanze ve Horber 1976'de yaptığı çalışmada pürüzsüz yüzeylerde yumurtanın daha iyi tutunduğunu böylece daha

yüksek gelişim gösterdiğini bulmuştur. Fakat Nwanze ve Horber (1976) çalışmasının aksine tez çalışmasında fasulyede her üç populasyon içinde çıkış olmamıştır. Denemede kullanılan AWC602 çeşidi AWC613 çeşidine göre nispeten daha fazla oranda pürüzlü bir yüzeye sahip olmasına rağmen Aydın ve Antalya populasyonlarında AWC602 çeşidine daha fazla yumurta bırakılmıştır. Bu sonuç ile paralel olan Edde ve Amatobi'nin çalışması 22 adet tohum üzerinde gerçekleştirilmiştir. Böceğin yumurta bırakmasında pürüzlü ve pürüzsüz yüzeyinin çok bir farkı olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca tohum testası kaldırıldığında ergin çıkışı, gelişim periodu ve ergin öncesi ölümler gibi biyolojik parametrelerinde farklılık göstermediği belirtilmiştir.

Denemede her üç populasyonunda yumurta bırakmadığı genotipler gözlemlenmiştir. Bu genotiplerden AWC304 her üç populasyon için yumurta bırakılmayan, AWC603 ise Aydın ve Isparta populasyonları tarafından az, Antalya populasyonu tarafından ise hiç yumurta bırakılmayan genotip olmuştur. AWC304 ve AWC603 tür bazında, denemede kullanılan diğer genotiplerden ayrılmaktadır. AWC304 ve AWC603 genotipi *Cicer echinospermum* türü içerisindedir ve bu genotiplere yumurtanın bırakılmaması yada az bırakılması tohum yüzeyinde bulunan dikensi yapılardan kaynaklanabilmektedir, nitekim bu sonuç ile paralellik oluşturan Raina (1971)'nin yaptığı çalışmada bulunan G109-1 çeşidi diğer genotiplere nazaran daha az tercih edildiğini gözlemlemiştir ve bu tohumun yapısının pürüzlü olduğu hatta dikensi olduğunu belirtilmiştir.

AWC304 ve AWC603 çeşitlerinin fiziksel özellikleri bırakılan yumurta sayısını etkilemiştir. Ancak çalışmada kullanılan büyük taneli ve beyaz Yar çeşidi ve küçük taneli ve yeşil ICC4969 çeşidinin fiziksel özelliklerinin tamamen farklı olmasına rağmen populasyonların kendi içlerinde bıraktıkları yumurta sayıları arasında fark bulunmamıştır.

Populasyonun kendi içerisinde yumurta sayısında gösterdiği farklılık yapılan bazı çalışmalar ile paralellik göstermiştir. Sadozai (2003)'te yaptığı çalışmada BTB, 2'si nohut, 1 adet maş fasulyesi, börülce, fasulye bezelye ve mercimek olmak üzere 7 çeşit baklagil üzerinde gözlemlenilmiştir. Çeşitlere bırakılan yumurta sayıları çok farklı

sonuçlar vermiştir. En çok yumurta 51,2 yumurta sayısıyla bezelye’de görülürken, en düşük ise 26,6 ile mercimekte görülmüştür. Ayrıca denemede bulunan iki çeşit nohut üzerine de bırakılan yumurta sayısı arasında farklılık belirlenmiştir.

Iboda ve Umoetok (2007)’de yaptıkları çalışmada tek bir populasyonun *Vigna inguiculata*, *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema pubences*, *Pureria phaseoloides*, *Flemingo congesta* ve *Desmodium intortium* isimli 6 baklagil üzerinde brlce tohum böceğinin bıraktığı yumurta sayıları belirlenmiştir. Populasyon her bitki türünde farklı oranlarda yumurta bırakmıştır. *V.inguiculata* türüne 123,2, *C.mucunoides* 36,7, *C.pubences* 18,2, *P.phaseoloides* 17,2 ve *F.congesta* 63,5 adet yumurta, *D.intortium* türüne ise hiç yumurta bırakmamıştır. Çalışmanın ileri safhasında türlere bırakılan yumutalardan ergin ıkışları ve bu erginlerin gelişim zamanları gözlemlenilmiştir. *C.mucunoides* ve *C. pubecens* türlerinde çıkış olmamıştır. *P.phaseoloides* türünde ise larva üçüncü dönemine kadar yaşamını devam ettirmiş fakat ergin olmamıştır. *V.unguiculata* türünde ise gelişim 25 günde tamamlanırken, %81 oranında ergin çıkışı sağlanmıştır. *F. Congesta*’da ise 32,5 günde gelişimi tamamlanmış olup, %50,7 oranında çıkış sağlamıştır. Çalışmada yumurta bırakmanın çeşitlerdeki gelişim ile uygunluğu ile ilişkisinin olmadığı vurgulanmıştır. Benzer durum bu tez çalışmasında da görülmüştür. Ayrıca *F. congesta*’nın baklagil içerisinde bulunan antibiosis veya gelişim engelleyici maddelerin varlığından dolayı yüzde çıkışın bu denli az olabileceği belirtilmiştir. Gelişim engelleyicilerin larvanın gelişimini engellemenin yanında böcek içerisindeki proteolytic enzim aktivitesinde etkileyebileceği belirtilmiştir. Iboda ve Umoetek’in sonuçlarında değinilen bu yargı bu çalışmanın sonuçları içinde geçerli olabilir. Fasulyede her üç populasyonda yüksek oranlara yumurta bırakmasına rağmen çıkış olmaması bu çeşidin içerisinde bulunan antibiosis veya gelişim engelleyiciler neden olmuş olabilir. AWC603 eşidi de benzer şekilde yumurta bırakılabilmesine rağmen böcek gelişimine izin vermemesi nedeniyle antibiosis faktörlerinin varlığından sözedilebilir.

Bu çalışmada kullanılan bütün populasyonlarda yüzde çıkış oranları arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar populasyonlar arasında gözlendiği gibi populasyon içinde bulunan farklı genotiplerde de belirlenmiştir. Wijeratne (1998)’de

yaptıkları çalışmada bu çalışma ile benzerlik göstermiş ve çalışılan iki populasyonun yüzde ergin çıkışların arasında farklılık gözlenmiştir. Çalışmada üç adet baklagil türü denenmiştir. *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, *Phaseolus angularis* kullanılan çalışmada, Brezilya ve Yemenden alınan iki BTB’i biyotipi ve Endonezya’dan alınan *C.chilensis* populasyonları kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda iki ayrı BTB poulasyonunda yumurta sayıları arasında ciddi farklılıklar bulunmuştur. Brezilya populasyonu börülceye 74,5, greengram 77,5 ve adzukiye ise 79,9 yumurta bırakırken, Yemen biyotipi 57,3, 48,4 ve 62,0 adet yumurta bırakmıştır. Çalışmada ergin çıkışlarında yine farklılıklar göstermiştir. Brezilya için börülce, greengram ve adzuki için sırasıyla 35,9, 1,0 ve 18,7 ergin çıkışı gözlenirken Yemen de bu oranlar 33,8, 6,1 ve 11,7 olarak bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada üç populasyonunda genel olarak en fazla yüzde çıkışın olduğu çeşitler Yar ve börülce tohumları olarak bulunmuştur. Bu çeşitler her üç populasyon için gelişim açısından son derece uygun olduğu, populasyonların CA2969 ve AWC602 çeşitlerindeki yüzde çıkışlar göz önüne alındığında Yar ve börülce tohumları kadar olmasa da ergin çıkışı sağlandığından bu genotiplerin de yine börülce tohum böceği için uygun çeşitler olduğu söylenebilir. Fakat fasulye ve AWC603 genotiplerinde BTB’i larvasının daha tohum içerisine girmeden öldüğü tespit edilmiştir ve bu çeşitlere ait bütün populasyonlarda herhangi bir çıkış gözlenmemiştir. Denemede gözlemlendiği üzere, AWC304 çeşidi BTB tarafından hiç tercih edilmeyen bir çeşit olmuştur ve populasyonlardan hiçbirinin bu çeşide yumurta bırakmadığı bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında fasulye, AWC603, AWC304 genotiplerinin börülce tohum böceğine tamamen dayanıklı olduğu söylenebilir. Fakat bu çalışmada çeşitlere ait dayanıklılığın sebebi araştırılmamıştır. Fakat aşağıdaki belirtilen çalışmalar ile paralellik göstermekte olup fasulye, AWC613, ICC4969 tohumlarında görülen az çıkışın tohum içindeki bileşenlerden kaynaklanmış olabileceği söylenebilir.

Edde and Amatobi (2000)’de yaptıkları çalışmasında BTB’ne karşı dayanıklılığın sebeplerini araştırmıştır. Çalışmada ikisi popüler olarak kullanılan 3 adet yerel börülce çeşiti ve 19 börülce hattı kullanarak börülce tohum böceğinin gelişim sürecini, yüzde ergin çıkışını ve ağırlık kaybını gözlemlenilmiştir. Araştırmada %79,3 ergin çıkışı ile IT

93K-734 çeşidinde en fazla çıkışın meydana geldiği belirtilmiştir.. Rakamsal olarak en az çıkış Kanannanda (%52,3), IT90K-277-2 (%54,6) VE IT93K-573-3 (%55,8) çeşitlerinde gerçekleşmiştir. Bu çeşitlerde az sayıda erginin çıkışının, larvanın tohum içerisinde girememiş olması veya tohum içeriye giriş yapan larvanın, larva yada pupa döneminde ölmesinden dolayı kaynaklanmak olduğu belirtilmiştir. Çeşitlerdeki gelişim süreci ise gün olarak IT95K-1453-47 çeşidinde de 27,7 gün ve Kannananda çeşidinde ise 40,6 gün arasında değişmektedir. Çalışmanın sonucunda 6 çeşit hassas bulunurken 5 çeşit dayanıklı bulunmuştur. Oluşan dayanıklılığının tohum tekstürü, rengi, boyutu ve sertliği gibi fiziksel karakterlerden dolayı kaynaklanmadığı ifade edilmiştir. 5 adet dayanıklı tohumda larvanın erken ölümü tohum içerisindeki biyokimyasal bileşenlerden meydana gelebileceği belirtilmiştir. Ayrıca Southgate (1979), ve Gatehouse and Boutler(1983) baklagil tohumu içerisinde bulunan lipid, amino asit, karbonhidratların ve alkaloidlerin kompozisyonundan dolayı dayanıklılığın kaynaklanmakta olduğunu ifade etmektedir.

Lale ve Kolo (1998)'de yaptıkları çalışmada sekiz farklı börülce çeşidi börülce tohum böceğinin yumurta sayılarına yüzde çıkışlarını ve yüzde ağırlık kaybını incelemiştir. Çalışmanın sonucunda 3 adet dayanıklı çeşit bulunmuştur. Dayanıklı bulunan çeşitlerden birtanesi pürüzlü ve koyu renge sahipken diğer iki çeşidin beyaz ve pürüzsüz olduğu belirtilmiştir ve dayanıklılığın tohumun fiziksel özelliklerinden ziyade tohum içerisindeki bileşenlerden olduğunu belirtilmiştir.

Çıkış yapan erginlerin dişi/erkek oranları incelendiğinde oranın 0,3 ile 1,9 arasında değiştiği gözlenmiştir. Bulgular Antalya popülasyonunda AWC613 genotipi dışında 1:1 oranına çok yakın bulunmuştur. AWC613 genotipinde görülen dişi birey fazlalığının sebebinin genelde çok az çıkış olması ve çıkan bireylerin dişi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde Isparta popülasyonunda da oranlar genel olarak 1:1 den çok farklı değildir. Bu popülasyonda yine AWC613 ve ICC4969 genotiplerinde çok az miktarda dişi oranının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, çıkış oranının düşük olduğu genotiplerde dişilerin biraz daha fazla yaşama şansına sahip olduğunu göstermektedir. Aydın popülasyonuna bakıldığında ise çıkış oranının yüksek olduğu genotiplerde(CA2969,Yar, Börülce) dahi dişi oranının daha yüksek olduğu

görülmektedir. Bu durum, Aydın popülasyonunda farklı faktörlerin dişi erkek oranında rol alabileceğine işaret etmektedir. Nitekim bazı böcek türlerinde Wolbachia enfeksiyonunun dişi oranını artırdığı bilinmektedir.

Mengi'nin 1988 yılında yaptığı çalışmada altı farklı baklagil kullanmıştır ve çıkış yapan dişi-erkek oranında börülce, nohut, bezelyede fark bulamazken, bakla, soya fasulyesi ve mercimekte belirgin bir farklılık bulmuştur. Dick ve Credland (1984) yaptığı çalışmada Yemen ve Campinasdan elde edilen erginler börülcede 1:1 oranında, IITA çeşidinde erkeklerin daha az çıktığını belirtmiştir. Ayrıca Sadoai (2003)'de yaptığı çalışmada; 2'si nohut, 1 adet maş fasulyesi, 1 adet börülce, 1 adet fasulye ve 1 adet bezelye ve mercimek olmak üzere 7 baklagil türü kullanmış ve çıkış yapan BTB dişi-erkek oranı arasında fark bulamamıştır.

Erginlerin çıkış sürelerinde, %50 erginin çıkış süreleri ve toplam ergin çıkışlarının hepsinde Antalya popülasyonun daha erken çıktığı gözlemlenmiştir. Antalya popülasyonun nohut çeşidinde daha erken çıkış yapması ilk konukçusunun nohut olmasıyla açıklansa da, börülce üzerinde de diğer iki popülasyondan daha erken bir çıkış sağlamıştır. Bu durumun sebebi, Antalya popülasyonun daha çok jenerasyon laboratuvar koşullarında çoğalmış olması ve Isparta ve Aydın popülasyonun ise daha kısa süre boyunca laboratuvar koşullarında bulunması ve dolayısıyla adaptasyonu olabilir. Antalya popülasyonu börülce hariç diğer bütün genotiplerde gelişimini en erken tamamlayan popülasyon olmuştur. Aydın popülasyonunda bu süre en kısa 73 gün ile CA2969 çeşidinde, Isparta popülasyonun da ise Yar çeşidinde bulunmuştur. Bütün çeşitlerin ergin çıkış süreleri popülasyon arasında farklılıklar göstermiştir.

Popülasyonların tohumlarda meydana geldikleri % kayıp oranları her üç popülasyon içinde börülce tohumlarında birinci sırada olduğu gözlenmiştir. Ancak, popülasyonların oluşturdukları kayıp oranlarında farklılıklar mevcuttur. Bu açıdan en fazla kaybın Isparta popülasyonunda börülce tohumlarında olduğu görülmüştür. Antalya popülasyonu diğer popülasyonlara kıyasla CA2969, Yar ve AWC613 çeşidinde yüzde olarak daha fazla kayıp meydana getirmiştir.

Tercihli testleme yönteminde her üç populasyonda yüzde olarak en fazla tercih ettikleri tohum b r lce olmuştur. Fakat populasyonların tercih edilme oranı ise farklılıklar göstermiştir. Antalya populasyonunda bu oran %54,3 , Aydın populasyonunda %45,7, Isparta populasyonunda ise %40,2 civarında belirlenmiştir. Her üç populasyon göz önüne alındığında en fazla üç tohumun tercih edildiği belirlenmiştir. Ancak, yüzde oranları populasyonlara göre farklılık göstermiştir. B r lce çeşidinden sonra tercih edilen ikinci tohum materyal, fasulye, üçüncü olarak ise CA969  eşidi gelmiştir. Populasyonların en fazla tercih ettikleri b r lce çeşidi zorunlu testleme sonuçlarında ergin çıkış y zdelерinin her üç populasyon için yüksek olduğu belirlenmiştir. Fakat üç populasyonunda ikinci olarak tercih ettiği çeşit olan fasulyede (Antalya %27,6, Aydın %41,5 ve Isparta %39,7) zorunlu testlemeler sonucunda hiç ergin çıkışının olmadığı gözlenmiştir. Zorunlu testlemelerde Isparta populasyonunda en fazla, Aydın populasyonunda ise ikinci olarak ergin çıkışının gözlendiği çeşit olan Yar'da ise her üç populasyon için çok düşük (%0,3-2,7) bir tercih söz konusu olmuştur. Bu verilerden de anlaşıla ı üzere populasyonların ergin çıkış oranları ile tercih edilen çeşitlerin arasında bir paralellik görülmemektedir.

Her iki yöntemde de bütün populasyonlar AWC304 çeşidine yumurta bırakmamıştır. AWC603  eşidi ise zorunlu testleme yönteminde Aydın ve Isparta populasyonları (0,6 ve 2,3) az sayıda yumurta bırakırken, tercihli yöntemde yumurta bırakmamayı tercih ettikleri belirlenmiştir. Antalya populasyonu ise AWC603 çeşidine her iki yöntemde de yumurta bırakmamıştır. Tercihli testleme yönteminde erginlerin yumurta bırakmaması AWC603 ve AWC304  eşitleri tohum yüzeyinde bulunan dikensi yapılardan kaynaklanmış olabilir.

Bazı  eşitler böceklerin seçimine bırakıldığında hiç ya da az yumurta bırakıldığını gözlenirken zorunlu testleme yönteminde böceklere sunulduğunda oldukça fazla yumurta bırakıldığını gözlemlenmiştir. Bu  eşitler AWC602, AWC613 ve ICC4969  eşitleridir. AWC602 çeşidine tercihli testleme yönteminde Antalya 3, Aydın 0 ve Isparta populasyonu 2 yumurta bırakırken zorunlu testleme yönteminde Antalya 15,3, Aydın 13 ve Isparta populasyonu 45 adet yumurta bırakmıştır. Yine AWC613  eşidinde tercihli testleme yönteminde Antalya 1, Aydın ve Isparta populasyonu hiç

yumurda bırakmamışken zorunlu testleme yönteminde bu çeşide sırasıyla 4,3-19,6-23,6 adet yumurda bırakılmıştır. ICC4969 çeşidinin zorunlu testleme yönteminde ise Antalya , Aydın ve Isparta sırasıyla 31, 22 ve 61 yumurda sayıları bırakırken tercihli testleme yöntemi ile 16, 2 ve 1 adet yumurda bırakmıştır. Sonuçlardan da görüldüğü üzere her iki teste ait yumurda sayılarında ciddi farklılıklar bulunmaktadır ve böceklerin belirli çeşitlere zorunlu olmadığı durumlarda yumurda bırakmamaktadır.

Kawedki and Mery (2003)'de yaptığı tercihli testlemeye ait çalışmada Nijerya, Uganda, Yemen, Kamerun olmak üzere 4 farklı ülkeden biyotip kullanılmıştır. Biyotipler laboratuvara getirildiğinde b örölce üzerinde çoğaltılmıştır fakat deneme kurulmadan önce ikiye ayrılıp popülasyonun yarısını b örölce yarısını ise maş fasulyesinde 110 jenerasyon boyunca çoğalması sağlanmıştır. Bu popülasyonlar daha sonra 2'şer gram maş fasülyesi ve b örölce çeşitlerinin karışımına bırakılarak biyotiplerin tercihli testleme ile tercihleri incelenmiştir. Nijerya popülasyonu yumurtalarının çoğunu (%68-86) oranında b örölceye bırakmıştır. Uganda ve Yemen'de (%30-42) civarında ve Kamerun'da ise %56-60 civarında olduğunu belirtmiştir. Ve bu sonuçlara göre coğrafi farklılıkların konukçu tercihinde önemli farklılıkların yaratabileceği vurgulamıştır. Biyotiplerin 110 jenerasyon boyunca farklı konukçuda yetiştirmelerinin ise, tercihler üzerinde hiçbir fark ortaya koymadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, şimdiki çalışmada da Antalya popülasyonunun uzun süredir nohut üzerinde bulunmasına rağmen Isparta popülasyonu ile aynı tercih profilini göstermesi ile paralellik göstermektedir. Ancak literatürde farklı sonuçlar da rapor edilmiştir. Nitekim, Wasserman ve Futuyma 1981'de yaptıkları çalışmada popülasyonların 11 jenerasyon boyunca farklı konukçuda yetiştirilmesinin konukçu tercihinde farklılıklar ortaya çıkarabildiğini rapor etmişlerdir.

Popülasyonlara ait genetik parametreler AFLP tekniği ile ortaya konmuştur. Bu parametreler, öncelikle bu tekniğin tekrarlanabilir ve genetik varyasyonu ortaya koyabilme açısından çok uygun olduğunu göstermiştir. 6 primer çifti ile dahi üç popülasyon arasında 250 civarında polimorfik lokusun elde edilebilmesi önemlidir. Popülasyonların biyolojik tarihçesi incelendiğinde laboratuvar ortamına en son taşınan popülasyonların (Aydın ve Isparta) en fazla polimorfik lokus taşıdığı ve diğer

heterozigotluk ve allel sayı parametreleri açısından daha zengin olduğu görülmüştür. Bu durum, her ne kadar çalışılan böcek doğasında laboratuvar benzeri ortamda yaşıyor olsada, gen alışverişinin tohumluk depolarında devam edebildiğini en azından laboratuvar ortamından daha fazla olabildiğini göstermiştir. Populasyonlar arası farklılaşmayı gösteren G_{st} değerinin 0,50 düzeyinde bulunması, populasyonların farklılaştığını göstermektedir. Populasyonlar arası genetik uzaklıklar ve oluşturulan dendogram incelendiğinde, börölce üzerinden toplanan populasyonların (Aydın Isparta) nohut üzerinden toplanan Antalya populasyonundan genetik olarak daha uzak bulunduğu ve farklı yerde gruplaştığı görülmektedir. Bu sonuç populasyonların konukçuya olan özelleşmesini de göstermektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada Aydın, Antalya ve Isparta'dan toplanan börölce tohum böceği (BTB), *Callosobruchus maculatus* (F.), 7 çeşit/tür nohut, 1 çeşit fasulye ve 1 çeşit börölce olmak üzere 9 tohum genotipinde tercihli ve zorunlu testleme yöntemi ile biyolojik parametreleri gözlemlenilmiş ve populasyonlar arasındaki genetik varyasyon AFLP yöntemi ile ortaya konmuştur.

Tez çalışmaları, BTB populasyonlarının baklagil tohumları üzerinde çok farklı biyolojik parametrelere sahip olduğunu göstermiştir. Nohut üzerinden toplanan ve 36 generasyon boyunca aynı konukçuda yaşatılan Antalya populasyonuna ait dişilerin börölce tohumlarına yumurta koyma tercihleri, börölce üzerinden toplanan diğer iki populasyondan daha yüksek bulunmuştur. Her üç populasyonunda yumurta koyma tercihi bakımından, en çok canlılık oranı gösterdiği Yar nohut çeşidini çok az tercih ettiği (%1-2) belirlenmiştir. Her üç populasyonda, yumurta koymak için fasulye tohumlarına ekseriyetle tercih etmelerine rağmen bu tohumda gelişmeleri hemen hemen yok denecek düzeydedir. Bu sonuçlar, BTB için konukçu seçimi ve biyolojik adaptasyon arasında bir paralelliğin olmadığını göstermektedir. Her üç populasyonunda AWC603, AWC613 gibi nohut genotiplerinde hemen hemen hiç bir gelişme göstermemesi ve yumurta koyma açısından tercih etmemesi bu genotiplerin nohut dayanıklılık ıslahında kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Moleküler çalışmalar sonucunda 6 adet AFLP primer kombinasyonu ile 254 den fazla polimorfik bant elde edilmiş ve bunun 207 tanesinin populasyonlar içerisinde %10 dan fazla polimorfizm oranına sahip olduğu bulunmuştur. Populasyonlar içerisindeki polimorfizm seviyesine bakıldığında en yüksek seviyelerinin laboratuvar şartlarına en son taşınan Isparta ve Aydın populasyonlarında olduğu, 36 generasyon boyunca laboratuvarında bulunan Antalya populasyonunda ise daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar BTB gibi doğal ortamı laboratuvar şartlarına çok benzeyen böcek gruplarında dahi, uzun süreli laboratuvar ortamında yetiştirilen böcek kültürlerinde genetik daralmaya yol açabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Moleküler sonuçlar, ayrıca, populasyonlar arası gen akışının sınırlı düzeyde kaldığını belirtmektedir. Moleküler

genetik uzaklıklar ve dendogram sonuçları, börölce ve nohut üzerinden beslenen BTB populasyonlarının ayrıştığını ve konukçuya göre genetik kümeleşme oluştuğunu göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- ALKAN, B. 1966. Türkiye' nin Zararlı Tohum böcekleri Coleoptera: Bruchidae Faunası Üzerinde Çalışmalar. A.Ü.Zir.Yayınları : 277, 56.
- AGARWAL, M. and SHRIVASTAVA, N. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Springer-Verlag* 27:617–631.
- AJAYI, F.A. and LALE N.E.S. 2000. Susceptibility of Unprotected Seeds and Seeds of Local Bambara Groundnut Cultivars Protected with Insecticidal Essential Oils to Infestation by *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 37(1): 47-62.
- AMEVOIN, K. 1998. Activite's Reproductrices et Re'ponses Comportementales de Q2 Dinarmus basalis et de Eupelmus vuilleti en pre'sence de leur ho^ te Callosobruchus maculatus en zone guine'enne au. Togo. The'se de Doctorat, p 152.
- APPLEBY, J.H. and CREDLAND, P.F. 2003. Variation in Responses to Susceptible and Resistant Cowpeas Among West African Populations of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of enonomic entomology* 96(2):489-502.
- AVİSE, J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- AVİSE, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, 2nd edn, pp. 684. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- AYDIN, Ö.S. 2004. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimofik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematigi. DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,6: 113-130
- BARDAKÇI, F. 2001.Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers.*Turk J Biol*,25 :185-196
- BECK, C.W. and BLUMER, L.S. 2007. A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*. 12.
- BECKER, N. and ASCHER, K.R.S. 1998. The Use of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti) Against Mosquitoes, with Special Emphasis on the Ecological Impact. *Isr. J. Entomol*, 32: 63–69.

- BLEARS, M.J., GRANDIS, S.A.D.E., LEE, H. And TREVORS, J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Society for Industrial Microbiology*, 21:99–114.
- BOEKE, S.J., BAUMGART, I.R., VAN LOON, J.J.A., VAN HUIS, A., DICKE, M. and KOSSOU, D.K. 2004a. Toxicity and Repellence of African Plants Traditionally Used for the Protection of Stored Cowpea Against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Stored Products Research* 40:423–438.
- BOEKE, S.J., BARNAUD, C., VAN LOON, J.J.A., KOSSOU, D.K., VAN HUIS, A. and DICKE, M. 2004b. Efficacy of Plant Extracts Against the Cowpea Beetle, *Callosobruchus maculatus*. *International Journal of Pest Management* 50(4):251–258.
- BOEKE, S.J., VAN LOON, J.J., VAN LOON, A., VAN HUIS, A. and DICKE, M. 2004. Host Preference of *Callosobruchus maculatus*: a Comparison of Life History Characteristics for Three Strains of Beetles on Two Varieties of Cowpea. *Blackwell Verlag, Berlin JEN* , 128(6): 390–396.
- BONIN, A., EHRICH, D. and MANEL, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, 16:3737–3758.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. and DAVIS, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–333.
- CEYHAN, E. 2007. Yemeklik Tane Baklagiller Ders Notları. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 144 ss.
- CLARK, P.L., MOLINA-OCCHOA, J., MARTINELLI, S., SKODA, S.R., ISENHOUR, D.J., LEE, D.J., KRUMM, J.T. and FOSTER, J.E. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. 10pp. *Journal of Insect Science*, 7/5:10pp.
- CHAPMAN, H.C. 1974. Biological Control of Mosquito Larvae. *Annu. Rev. Entomol*, 19: 33–59.

- CREDLAND, P.F. 1987. Effects of Host Change on the Fecundity and Development of an Unusual Strain of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 23(2): 91-98.
- COLGONI, A. and VAMOSI, S.M. 2006. Sexual Dimorphism and Allometry in Two Seed Beetles (Coleoptera: Bruchidae). *Entomological Science*, 9: 171-179
- ÇIKMAN, E. ve YÜCEL, A. 2002. Farklı gün uzunluğunun *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Col., Bruchidae); ta aktif ve inaktif formlarının oluşumuna etkisi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(12).
- DABIRE', L.C.B., SANO, A. and DRABO, I. 2004. Developpement de *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera: Bruchidae) sur des lignées de niébe' en évaluation pour leur résistance aux bruches. *Annales de l'Université de Ouagadougou, Série C* 2:105-121.
- DECELLE, J. 1981. Bruchidae related to grain legumes in the afro-tropical area. In: Labeyrie, V. (Ed.), *The ecology of bruchids attacking legumes*. Junk, The Hague, pp. 193-198
- DELINCEE, H., VILLAVICENCIO, A.-L.C.H. and MANCINI-FILHO, J. 1998. Protein Quality of Irradiated Brazilian Beans. *Radiat. Phys. Chem.* 52: 43-47.
- DESROCHES, P., EL SHAZLY, E., MANDON, N., DUC, G. and HUIGNARD, J. 1995. Development of *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in Seeds of *Vicia faba* L. Differing in Their Tannin, Vicine and Convicine Contents. *Journal of Stored Products Research*, 31(1): 83-89.
- DICK, K.M. and CREDLAND, P.F. 1984. Egg production and development of three strains of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 20(4): 221-227.
- DUGRAVOT, S., SANON, A., THIBOUT, E. and HUIGNARD, J. 2002. Susceptibility of *Callosobruchus maculatus* (Col.: Bruchidae) and Its Parasitoid *Dinarmus basalis* (Hym.: Pteromalidae) to Sulphur Containing Compounds: Consequences on the Biological Control. *Environmental Entomology*, 31(3): 550-557.

- EL- SAWAF, S.K. 1956. Some Factors Affecting the Longevity, Oviposition and Rate of Development in the Southern Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Bull. Entomol. Soc. Egypt* 40, 29–95.
- EDDE, P.A. and AMATOBÎ, C.I. 2000 Relative Resistance of Some Cowpea Varieties to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera:Bruchidae). *Journal of Sustainable Agriculture*, Vol, 17(2/3) 2000
- ERİŞ, A. ve H. GÜLEN. 2004. Moleküler Biyoloji (Temel Bilgiler). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No:98.
- ERLER, F., CEYLAN, F., ERDEMİR, T. and TOKER, C. 2009. Preliminary Results on Evaluation of Chickpea, *Cicer arietinum*, Genotypes for Resistance to the Pulse Beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science* 9:58 14pp.
- FARIAS,L.R., COSTA, F.T., SOUZA, L.A., PELEGRINI, P.B., GROSSI-DE-SAB, M.F., NETO, S.M., BLOCH, C., LAUMANN, R.A., NORONHA, E.F. and FRANCO, O.L.2007. Isolation of a novel *Carica papaya* _-amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87 255–260
- FAROOQ, S. and AZAM, F. 2002. Molecular Markers in Plant Breeding-III: Practical Applications and Difficulties Encountered. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(10): 1148-1154.
- FOSTER, J.T., ALLAN G.J., CHAN, A.P. RABINOWICZ, P.D., RAVEL, J., JACKSON, P.J. and KEİM, P. 2010. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). *BMC Plant Biol*,10:13–23.
- FOX, C.W. 1993. Multiple Mating, Lifetime Fecundity and Female Mortality of the Bruchid Beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) . *Functional Ecology*, 7, 203– 208.
- FOX, C.W. 1994. The Influence of Egg Size on Offspring Performance in the Seed Beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Oikos* 71, 321–325.
- FOX, C.W., BUSH, M.L. and MESSINA F.J. 2010. Biotypes of the Seed Beetle *Callosobruchus maculatus* Have Differing Effects on the Germination and

- Growth of Their Legume Hosts. *Agricultural and Forest Entomology*, 12/4:353-362.
- GARCÍA, A.A.F., BENCHİMOL, L.L., BAROSA, A.M.M, GERALDİ, I.O., SOUZA, C.L. and DE SOUZA A.P.2004 Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* 27: 4.
- GUEDES, R.N.C.,SMITH, R.H. and GUEDES, N.M.P.2003 Host suitability, respiration rate and the outcome of larval competition in strains of the cowpea weevil,*Callosobruchus maculatus*.*Physiological Entomology* ,28:298–305.
- GOLOB, P. and WEBLEY, D.J. 1980. The Use of Plants and Minerals as Traditional Protectants of Stored Products. Report of the Tropical Products Institute G138: 32p.
- HECKEL, D.G. 2003. Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology*, 48:235–260.
- HU, F.,ZHANG, G.N. and WANG, J.J.2009. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Micron* 40, 320–326.
- HUANG, C.C., YANG, R.L., LEE, H.J. and HORNG, S.B. 2005. Beyond Fecundity and Longevity: Trade-Offs Between Reproduction and Survival Mediated by Behavioural Responses of the Seed Beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology* 30, 381–387.
- IBODA, B.N. and UMOETOK, S.B.A.2007. Development of *Callosobruchus maculatus* Fabricius on Grain Legumes Used as Cover Crops. *Agricultural Journal* 2/1: 97-100.
- ICRISAT. 1992. Annual Report. Internation Cereal Research Institute for Semi-Arid Tropics. Patancheru, India. 76pp.
- İŞÇİ, H. Mersin İlinde Depolanmış Baklagillerde Zaralı olan Baklagil Tohum Böcekleri ve Zarar Durumları . Tez.
- JACKAI, L.E.N. and ADALLA, C.B.1997 Pest management practices in cowpea: a review. In *Advances in Cowpea Research*, pp. 240–258.

- JITSE, M. And VAN DER M. 1979. The Specification of Metameric Order in the Insect *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera) I. Incomplete Segment Patterns Can Result from Constrictioninduced Cytological Damage to the Egg *Printed in Great Britain © Company of Biologists Limited, Embryol. exp. Morph. Vol. 51: 1-26.*
- JOHNSON, J.A. and VALERO, K.A. Control of Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus*, Using Freezing Temperatures. Horticultural Crops Research Laboratory USDA-ARS.
- KARMAN, M., ERAKAY, S. ve KAYA, O. 1970. Nohut sineği ve Baklagil tohum böcekleri. T.B. Zir.Müc. ve Karan.Gn.Md.lüğü, Mesleki Neşriyat Serisi No:53.
- KAYA, H.K. and GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic Nematodes. *Annu. Rev. Entomol*, 38: 181–206.
- KAWECKI, T.J. and MERY, F. 2003. Evolutionary Conservatism of Geographic Variation in Host Preference in *Callosobruchus maculatus*. *Ecological Entomology* 28: 449–456.
- KEYDER, S., BALCIOĞLU, E. ve MENE, G. 1973 Marmara Bölgesinde Börülce Tohum Ambar Böceği (*Callosobruchus maculatus* F., Col: Bruchidae-Bruchinae)'nin Yayılışı, biyolojisi ve mücadelesi Zir.Müc.Yıllığı. Sayı; 7, 58-59.
- KINGSOLVER, J.M. 2004. Handbook of the Bruchidae of the United States and Canada. Agricultural Research Service Technical Bulletin Number 1912, 319pp.
- KRUMM, J.T., HUNT, T.E., SKODA, S.R., HEIN, G. L., LEE, D.J., CLARK, P.L. and FOSTER, J.E. 2008. Genetic Variability of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*, Suggests Gene Flow Between Populations in the Midwestern United States. *Journal of Insect Science*, 8: 72, 12 pp.
- LALE, N.E.S. and KOLO, A.A.1998. Susceptibility of eight genetically improved local cultivars of cowpea to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in Nigeria. *International Journal of Pest Management* 44, 25–27.
- LALE N.E.S. 2002. Stored Products Entomology and Acarology in Tropical Africa, 1st ed. Maiduguri, Nigeria: Mole Publications (Nig) Ltd. 204pp.

- LAMBERT, J., ARNASON, J.T. and PHILOGE, B.J.R. 1985. Bruchid Control with Traditionally Used Insecticidal Plants *Hyptis spicigera* and *Cassia nigricans*. *Insect Science and its Application* 6: 167–170.
- LEGNER, E.F. 1995. Biological Control of Diptera of Medical and Veterinary Importance. *J. Vector Ecol*, 20: 59–120.
- LIMA, M.P.L., OLIVERA, J.V., BARROS, R. and TORRES, J.B. 2004. Alternation of Cowpea Genotypes Affects the Biology of *Callosobruchus maculatus* (Fabr.)(Coleoptera: Bruchidae). *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, (61)1: 27-31
- LOUKAS, M., KRİMBAS, CB., MAVRAGANİ-TSİPİDOU, P., *et al.* 1979. Genetics of *Drosophila subobscura* populations. VIII. Allozyme loci and their chromosome maps. *Journal of Heredity*, 70:17–26.
- LOXDALE, H.D. and LUSHAİ, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577–600.
- MAA, W.C.J. and TERRİERE, L.C. 1983. Age-dependent variation in enzymatic and electrophoretic properties of house fly (*M. domestica*) carboxylesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 74C: 461–467.
- VAN DER MEER, J.M. 1979 The specification of metameric order in the insect *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera) I. Incomplete segment patterns can result from constrictioninduced cytological damage to the egg. *Embryol. exp. Morp*, 51:1-26.
- MENGİ, R. 1988. Bazı değişik baklagil tanelerinde *Callosobruchus maculatus* F.(Coleoptera:Bruchidae)’un gelişimi üzerinde araştırmalar. Ankara üniversitesi fen bilimleri enstitüsü. 35 sayfa
- MESSINA, F.J., BLOXHAM, A.J. and SEARGENT, A.J. 2007. Mating Compatibility between Geographic Populations of the Seed Beetle *Callosobruchus maculatus*. *J Insect Behav* 20: 489–501.
- MESSINA, F.J. and RENWICK, J.A.A. 1985. Ability of Ovipositing Seed Beetles to Discriminate Between Seeds with Differing Egg Loads. *Ecological Entomology*, 10, 225–230.
- MITCHELL, R. 1975. The Evolution of Oviposition Tactics in the Bean Weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.). *Ecology* 56: 696–702.

- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HIRON, G. and ERLICH, H.
1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51:263–273.
- MURAD, A.M., LAUMANN R.A., MEHTA, A., NORONHA, E.F. and FRANCO, O.L.
2007. Screening and Secretomic Analysis of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* Isolates in Response to *Cowpea weevil* (*Callosobruchus maculatus*) Exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145: 333–338.
- MOOKHERJEE, P.B. and CHAWLA, M.L. 1964. Effect of Temperature and Humidity on the Development of *Callosobruchus maculatus* Fab., a Serious Pest of Stored Pulses. *Indian J. Entomol.* 26, 345–351.
- MYBURG, A.A., REMINGTON, D.L., O'MALLEY, D.M., SEDEROFF, R.R. and WHETTEN R.W. 2001. High-Throughput AFLP Analysis Using Infrared Dye-Labeled Primers and an Automated DNA Sequencer. *BioTechniques*, 30:348–357.
- NAHDY, M.S. 1994. Bean Sieving, a Possible Control Measure for the Dried Bean Beetles, *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.*, 30: 65–69.
- NWANZE, K.F., HORBER, E. and PITTS, C.W. 1975. Evidence for ovipositional preference of *Callosobruchus maculatus* for cowpea varieties. *Environ. Entomol.*, 4:409–412.
- OFUYA, T.I. and CREDLAND, P.F. 1995. Responses of Three Populations of the Seed Beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), to Seed Resistance in Selected Varieties of Cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Journal of Stored Products Research* 31/1: 17–27.
- OJIMELUKWE, P.C. and OGWUMIKE, F.C. 1999. Effects of Infestation by Bruchid Beetles (*Callosobruchus maculatus*) On the Nutritional Quality and Sensory Properties of Cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Biochemistry*, 23: 637–647.

- ÖZAR, A.İ., GENÇ, H. 1993. Ege Bölgesi'nde tarla döneminde Börülce tohumböceği (*Callaosobruchus maculatus* F.) (Coleoptera, Bruchidae)'nin kimyasal savaşım yöntemi üzerinde araştırmalar. *Türk. Entomol. Derg.*, 17/2, 95-98.
- ÖZAR, A.İ. 1974. Phostoxin'in mercimek tohum böceği (*Bruchus lentis* Fröhl.) ve Börülce tohum böceği (*Callosobruchus maculatus* F.)'ne etkisi üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 14/1:43-54.
- ÖZDEMİR, S. 2006. Yemeklik Baklagiller. Hasad Yayıncılık, 165ss.
- ÖZER, M. ve YÜCEL, A. 1989 . Güneydoğu Anadolu Bölgesinde baklagillerde zararlı Baklagil tohum böcekleri, yayılışları, en önemli türün biyo-ekolojisi ve savaş yöntemleri. *Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 13/2:361-381.
- PAPA, R., TROGGIO, M., AJMONE-MARSAN, P. And NONNIS MARZZNO, F. 2005. An improved protocol for the production of AFLPTM markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis. *J. Anim. Breed. Genet.*, 122:62–68.
- QUELLER, D.C., STRASSMANN, J.E. and HUNGHERS, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8:285–288.
- QUEDRAOGO, A.P., MONGE, J.P. and HUIGNARD, J. 1991. Importance of Temperature and Seed Water on Induction of Imaginal Polymorphism in *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59: 59–66.
- RAİNA, A.K. 1971. Comparative resistance to three species of *Callosobruchus* in a strain of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Stored Products Research* 7(3): 213-214.
- RİCHARDSON, B.J., BAVERSTOCK, P.R. and ADAMS, M. 1986. Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies. London Academic Press.
- SADOZAI, A., NAEEM, M., Inayatullah, SHAH, M. and ASAD, A. 2003. Host Preference of Pulse Beetle *Callosobruchus maculatus* in different legumes. *Sarhad J. Agric.* (19)4: 557-561.
- SALUNKE, D.K., KADAM, S.S. and CHAVAN, J.K. 1985. Postharvest Biotechnology of Food Legumes. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- SANO, F. and SANO, I. 1980. Effect of Parental Age and Developmental Rate on the Production of the Active Form of *Callosobruchus maculatus*. *Mechanisms Aging Development*, 10: 283–293.
- SANO, F., SANO, I. 1984. Effect of Bean Water Content on the Production of the Active Form of *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Stored Product Research*, 22: 115–123.
- SANO, I. 1967. Density Effect and Environmental Temperature as the Factors Producing the Active Form of *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Stored Product Research* 2: 187–195.
- SANO, A., OUEDRAOGO, A.P., TRICAULT, Y., CREDLAND, P.F., HUIGNARD J. 1998. Biological Control of Bruchids in Cowpea Ctores by Celease of *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) adults. *Environmental Entomology* 27(2):717–725.
- SANON A., GARBA M., AUGER, J. and HUIGNARD, J. 2002. Analysis of the Insecticidal Activity of Methylisothiocyanate on the Coleoptera Bruchidae *Callosobruchus maculatus* and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Pteromalidae). *Journal of Stored Products Research*, 38: 285–295.
- SHARMA, A., A. G. NAMDEO and K.R. MAHADIK. 2008. Phcog. Rev.: Rewiev Article. Molecular Markers: New Proepects in Plant Genome Analysis. *Pharmacognosy Rewievs*, 2/3: 23-34.
- SCHOLTE, E.J., KNOLS, B.G.J., SAMSON, R.A. and TAKKEN, W. 2004. Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control. *J. Insect Sci*, 24: 4–19.
- SECK, D., LOGNAY, G., HAUBRUGE, E., MARLIER, M. and GASPER, C. 1996. Alternative Protection of Cowpea Seeds Against *C. maculatus* Using Hermetic Storage Alone or in Combination with *Boscia senegalensis* (Pers). *J Stored Products Res*, 32: 39 – 44.
- SEVERSON, D.W., BROWN, S.E. and KNUDSON, D.L. 2001 Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. *Annual Reviewof Entomology*, 46:183–219.

- SHADE, R.E., MURDOCK, L.L. and KITCH, L.W. 1999. Interactions Between *Cowpea weevil* (Coleoptera: Bruchidae) Populations and *Vigna* (Leguminosae) Species. *J Econ Entomol*, 92: 740–745.
- SINGH, S.R. 1997. Cowpea Cultivars Resistant to Insect Pests in World Germplasm Collection. *Trop. Grain Legume Bull.* 9, 3–7.
- SLUSS, T.P. and GRAHAM, H.M. 1979. Allozyme Variation in Natural Populations of *Heliothis virescens*. *Annals of the Entomological Society of America*, 72: 317–322.
- SOLOMON, M.G., FITZGERALD, J.D. and MURRAY, R.A. 1996 Electrophoretic approaches to predator–prey interactions. In: *The Ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches* (eds Symondson WOC, Liddell JE), pp. 457–468.
- SOMTA, P., TALEKAR, N.S. and SRINIVES, P. 2006. Characterization of *Callosobruchus chinensis* (L.) Resistance in *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi. *Journal of Stored Products Research*, 42(3): 313–327.
- SOMTA, C., SOMTA, P., TOMOOKA, N., OOI, P.A.C., VAUGHAN, D.A. and SRINIVES, P. 2008 Characterization of New Sources of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) Resistance to Bruchids, *Callosobruchus spp.* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 44/4:316–321.
- SOUTHGATE B.J. 1979. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 24: 449–473.
- TANZUBIL, P.B. 1991 Reducing post harvest losses in stored grains. *Agric Ext Bull* (Ghana MOA/NAES), 6pp.
- TALEKAR, N.S. 1988. Biology, Damage and Control of Bruchid Pests of Mungbean. In: Shanmugasundaram S (ed.) *Mungbean: Proceedings of the 2nd International Symposium*, Bangkok, 16–20 November 1987. Taipei: Asian Vegetable Research and Development Center, pp. 329–342.
- TARVER, M.R., SHABE, R.E., TARVER, R.D., LIANG, Y., KRISHNAMURTHI, G., PITTENDRIGH, B.R. and MURDOCK, L.L. 2005. Use of Micro-CAT Scans to Understand Cowpea Seed Resistance to *Callosobruchus maculatus*. *The Netherlands Entomological Society*, 118: 33–39.

- TAYLOR, T. 1981. Distribution, Ecology and Importance of Bruchids Attacking Grain Legumes and Pulses in Africa. *Series Entomologica*, 19: 199.
- TEDERRSON, L.G., ROBERT, L.K. and WILLIAM, D.H., 2006. Toxicity of Indoxacarb and Spinosad to the Multicolored Asian Lady Beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera:Coccinellidae), Via Three Routes of Exposure. *Pest Manag. Sci*,(n-a).
- TOVIGNAN, S., VODOUHE, S.D. and DINHAM, B. 2001. Cotton Pesticides Cause more Deaths in Benin. *Pesticides News* 52: 12–14.
- TUDA, M., CHOUB, L.Y., NIYOMDHAMC, C., BURANAPANICHPAND, S. and TATEISHIE, Y. 2003. Ecological Factors Associated with Pest Status in *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): High Host Specificity of Non-pests to *Cajaninae* (Fabaceae). *Journal of Stored Products Research* 41: 31–45.
- TUDA, M., RONN, J., BURANAPANICHPAN, S., WASANO, N., ARMQVIST, G. 2006. Evolutionary Diversification of the Bean Beetle Genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): Traits Associated with Stored-Product Pest Status. *Molec Ecol*, 15: 3541–3551.
- TUİK, 2009. http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=57
- TUNCER, C. ve KANZU, İ.A. 1990. Börülce tohum böceği (*Callosobruchus maculatus* Col., Bruchidae)'nin çeşitli biyolojik dönemlerine uygulanan gamma radyasyonunun kısırlaştırıcı ve öldürücü dozlarının tespiti üzerindeki araştırmalar. II. Ulusal Nükleer Bilimler Kong., 27-29 Eylül 1989, İstanbul, Bildiri Kitabı Cilt 2: 825-831.
- UTIDA, S. 1954. Phase Dimorphism in the Laboratory Population of *Callosobruchus quadrimaculatus*. *Oyo Dobutsugaku Zasshi* 18: 161– 168.
- UTIDA, S. 1972. Density-Dependent Polymorphism in the Adult of *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Stored Product Research* 8: 111–126.
- VAN HUIS, A. 1991. Biological Methods in Bruchid Control in the Tropics: a Review. *Insect Science and Its Application* 12: 87–102.

- VAN HUIS, A., SCHUTTE, C., SAGNIA, S. 1998. The Impact of Egg Parasitoid *Uscana Lariophaga* on *Callosobruchus maculatus* Populations and the Damage to Cowpea in a Traditional Storage System. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89(3): 289–295.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M. *et al.* 1995 AFLP — a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407–4414.
- WANG, M.H. and HORNG, S.B. 2004. Egg Dumping and Life History Strategy of *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology*, 29: 26–31.
- WASSERMAN, S.S. and ASAMI, T. 1985. The Effect of Maternal Age upon Fitness of Progeny in the Southern Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Oikos*, 45: 191–196.
- WILDING, N., MARDELL, S.K., BROOKES, C.P., *et al.* 1993. The use of polyacrylamide gel electrophoresis of enzymes to identify entomophthoralean fungi in aphid hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62:268–272.
- WILSON, K. 1988. Egg Laying Decisions by the Bean Weevil *Callosobruchus maculatus*. *Ecol. Entomol.*, 13: 107–118.
- YADAV, T.D. 1997. Safe Storage of Pulse Crops. In: Asthana AN, Ali M, editors. *Recent Advances of Pulses Research*, pp. 649-662.
- YANG, R.L., FUSHING, H. and BINHORNG, S.(2006). Effects of search experience in a resource-heterogeneous environment on the oviposition decisions of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.) *Ecological Entomology* 31, 285–293.
- YEH, F.C. ve BOYLE, T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129: 15.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara’da doğdu. İlkokul eğitimini İngiltere’de, orta ve lise eğitimini Antalya’da tamamladı. 2002 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Programı, Bitki Koruma Bölümü’nden 2006 yılında mezun oldu.

2007-2008 eğitim-öğretim yılı Güz Dönemi’nde Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dal’ında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı kurumda eğitime devam etmektedir.

