

Böceklerde Farklı Muhafaza Koşulları ve Zamanın Mitokondrial DNA Kalitesi Üzerine Etkisi: Bir *Diptera* (*Tephritidae*) Örneği Çalışması

Adile AKPINAR¹, Fidan JUNAİD², Vedat GÖRMEZ³, Murat KÜTÜK⁴, Canan CAN⁵

^{1,2,4,5}Gaziantep University, Science and Art Faculty, Department of Biology, Gaziantep, Turkey, ³Gaziantep University, Islahiye Vocational School, Plant and Animal Breeding Department, Gaziantep, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-5815-1096>, ²<https://orcid.org/0000-0001-8839-7695>, ³<https://orcid.org/0000-0001-8136-8226>

⁴<https://orcid.org/0000-0003-1567-1002>, ⁵<https://orcid.org/0000-0002-0473-1914>

✉: aozdemir@gantep.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada geleneksel öldürme yöntemleri ile elde edilmiş ve farklı koşullarda muhafaza edilen Tephritidae familyasına ait *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) örneklerinden DNA izole edilerek muhafaza koşulları ve muhafaza sürelerine bağlı olarak DNA kalitesi ve PZR başarıları araştırılmıştır. Bu anlamda standart barkod geni olan mitokondriyal sitokrom oksidaz I (COI) gen bölgesi kullanılmıştır. 15 yıllık örneklerden kuru ortamda (müze materyali) muhafaza edilenlerin yaşı ile PZR başarısı arasında tam bir ilişki gözlemlenmemiştir. Ancak alkolde (%95'lik etil alkol) saklanan örneklerde ise DNA kalitesi ve PZR başarısı yüksek bulunmuştur.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 24.05.2019

Kabul Tarihi : 23.08.2019

Anahtar Kelimeler

mtDNA

Saklama koşulları

COI

Euaresta bullans

Tephritidae

The Effects of Different Storage Conditions and Storage Time on The Quality of The Mitochondrial DNA on Insects: Sample Study is A Fruit Fly (*Diptera: Tephritidae*)

ABSTRACT

In this study, DNA was isolated from the samples of *Euaresta bullans* (Wiedemann, 1830) belonging to the Tephritidae family which was obtained by traditional killing methods and kept under different conditions. In this sense, the standard barcode gene mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) was used. The lack of relationship observed between the age of samples that were kept in dry conditions (museum material) for 15 years and PCR success. However, the DNA quality and PCR success of the samples stored in alcohol (95% ethyl alcohol) were found to be high.

Research Article

Article History

Received : 24.05.2019

Accepted : 23.08.2019

Keywords

mtDNA

Storage conditions

COI

Euaresta bullans

Tephritidae

To Cite : Akpınar A, Junaid F, Görmez V, Kütük M, Can C 2019. Böceklerde farklı muhafaza koşulları ve zamanın mitokondrial DNA kalitesi üzerine etkisi: Bir Diptera (*Tephritidae*) örneği çalışması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 22(Ek Sayı 2): 361-364. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.569813.

GİRİŞ

Meyve sinekleri (*Diptera: Tephritidae*), dünyada geniş bir yayılış gösterip, zirai açıdan oldukça önemli türler içermektedir. Dünyada 481 cinse ait 4352 tür, paleoartik bölgede ise 137 cinse ait 882 türün varlığı bilinmektedir (Korneyev, 1999; Norrbom, 1999). Ülkemizde meyve sineklerine ait bugüne kadar 165 türü bulunmasına karşın bunlardan daha çok tarımı yapılan meyvelerde zararlı olanları bilinmektedir (Yaran ve ark., 2018a; Çalışkan Keçe ve ark., 2019).

Birçok böcek grubunun sınıflandırılması çoğunlukla geleneksel yöntemler ile morfolojik karakterlere dayanarak yapılmaktadır. Bu nedenle böcekler, taksonomistler tarafından morfolojik karakterlerin koruyacak şekilde muhafaza edilmektedir. Ancak zamanla morfolojik karakterlerde meydana gelebilecek zararlar, taksonların tanımlanmasında

bazı problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle dünyada son yıllarda moleküler çalışmalarla bu problemlerin çözüme kavuşturulmasına çalışılmaktadır. 2000'li yıllarda Hebert ve ark. (2003) hayvanlarda DNA barkod geni üzerine yaptıkları araştırmalarda mitokondriyal DNA'nın 655-658 bp lik COI bölgesinin 'standart barkod geni' olarak kullanılabilirliğini belirtmiştir. Günümüzde çoğu hayvan grubunun tanımlamalarında bu bölge kullanılmaktadır. Böylece morfolojileri zarar görmüş olan örneklerin DNA'ları üzerinden tanımlama yapmak mümkün olabilmektedir.

Bu çalışmada, 2003-2018 yılları arasında Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan Tephritidae (*Diptera*) familyasından *Euaresta bullans*'a ait müze koşullarında kuru örnek olarak saklanan bireyler ile %96'lık etanol ortamında muhafaza edilen

bireylerinden kaliteli DNA izole edilmesi ve mitokondriyal sitokrom oksidaz I (COI) gen bölgesi kullanılarak farklı saklama koşullarındaki PZR başarı oranlarının değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOD

Örneklerin toplanması ve saklanma koşulları

Çalışmada kullanılan *Euaresta bullans* türüne ait ergin örnekler konukçu bitkiler üzerinden atrap sallanarak toplanmış ve etil asetatlı öldürme şişelerine alınarak Gaziantep Üniversitesi Zooloji müzesine getirilmiştir. Preparasyonu yapılan örnekler daha sonra naftalinli saklama dolaplarında muhafaza edilmiştir. Örnekler için lokalite bilgileri ve saklanma koşulları yıllara ve muhafaza şekillerine göre Çizelge 1'de verilmiştir. Örneklerin tamamı Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Entomoloji Laboratuvarında oda sıcaklığında muhafaza edilmektedir.

Çizelge 1. *Euaresta bullans* türünün toplandığı lokaliteler ve saklanma koşulları

Tarih	İl ve İlçe	n (Örnek sayısı)	Saklama Koşulları
2003	Samsun	5	Kuru örnek
2005	Kayseri	10	Kuru örnek
2009	Kahramanmaraş	2	Kuru örnek
2010	Kahramanmaraş	15	Kuru örnek
2017	Amasya	13	Kuru örnek
2017	Samsun	15	Kuru örnek
2017	Sinop	13	Kuru örnek
2017	Yozgat	11	Kuru örnek
2018	Yozgat	5	Kuru örnek
2018	Çorum	15	%96 Alkol

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, *Euaresta bullans* türüne ait toplam 104 ergin birey üzerinde gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu, örneklerin kanat kısımları hariç tüm vücut kullanılarak DNA izolasyon kiti ile (Qiagen, DNeasy Blood&Tissue Kit) yapılmıştır. Elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometrik analiz ile kalite ve konsantrasyonları ölçülmüştür (Örneklerden 1,5 ul alınarak Nano Drop spektrofotometre ile ölçülmüştür).

PZR Çalışmaları

İzole edilen DNA'lar kullanılarak COI (655bp) gen bölgesi çoğaltılarak jel görüntüleri elde edilmiştir. Bu aşamada kullanılan primerler; LCO1490 Forward (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') (Folmer ve ark., 1994) ve HCO2198 Reverse (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Barrett and Hebert, 2005) şeklindedir. Çalışmada gerçekleştirilen PZR döngü sayıları ve koşulları Çizelge 2 ve Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 2. PZR döngüleri

İşlem adı	İşlem sıcaklığı	Süre
Denatürasyon	96 °C	1dk
Bağlanma	94 °C / 55 °C / 72 °C	1 dk/1 dk/1.5 dk
Sonlanma	72 °	7 dk
Döngü sayısı	35 / 30	

Çizelge 3. DNA'ların çoğaltılması için hazırlanan reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Miktar
ddH ₂ O	11.88 µl
10X Taq Buffer (KCl)	2.5 µl
dNTP mix	0.5 µl
2,5mM MgCl ₂	2 µl
10 µmol İleri Primer	1 µl
10 µmol Geri Primer	1 µl
Taq Polimeraz	0.12 µl
Genomik DNA	6 µl
Toplam Hacim	25 µl

Ayrıca PZR sonucunda elde edilen ürünlerin gözlemlenebilmesi için, örneklere %1,2 lik agaroz jelde 1X TBE tamponu içerisinde elektroforez işlemi uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 6 µl PZR ürünü, 3 µl yükleme tamponu olmak üzere 9 µl ürün konularak 80 voltta 45 dk yürütülmüş ve UV ışık altında DNA fragmentleri gözlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli illerinden 2003 ve 2018 yılları arasında toplanan ve farklı ortamlarda muhafaza edilen *Euaresta bullans* örneklerinin DNA kaliteleri ve PZR başarıları değerlendirilmiştir (Çizelge 4).

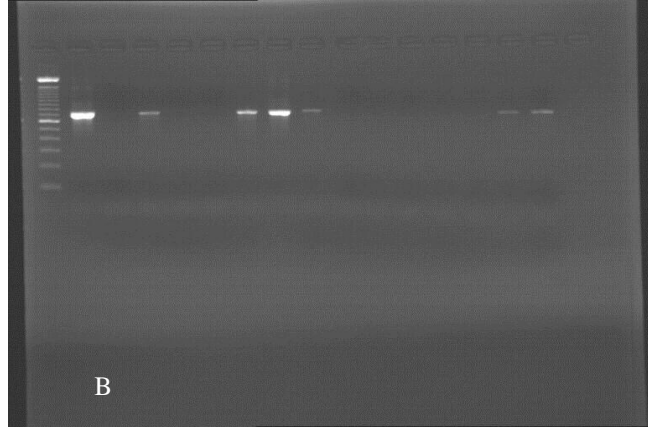
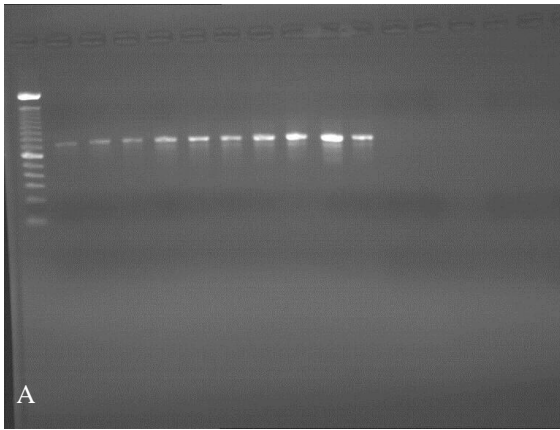
Öldürme yöntemleri ve saklama süresi, DNA verimini, çıkarılan DNA'nın fragman boyutunu ve / veya PZR başarısını etkilemektedir (Dean ve Ballard, 2001). Araştırmacılar çeşitli çalışmalarda, saklanmış böcek bacağı örneklerinden elde edilen genetik materyal kullanılarak mitokondriyal (mt) DNA dizi varyasyonunu karakterize etmiştir (Goldstein ve DeSalle, 2003; Lodge ve Freeland, 2003). Tipik olarak çalışmalarda artan numune yaşı ile birlikte PZR başarısında (başarılı PZR sayısı veya çoğaltılabilecek fragmanın uzunluğu ile tanımlanır) genel bir düşüş gözlenir. Bununla yanında, örneğin yaşıyla birlikte DNA ve / veya PZR başarı oranı verimindeki değişikliklerle ilgili hala hiçbir nicel veri yoktur (Watts ve ark., 2007). Yapılan bu çalışmada da örneklerin yaşı ile DNA kalitesi ve PZR başarısı arasında bir ilişki görülmemiştir (Çizelge 4). Böceklerin alkolde içerisinde muhafaza edilmesi sırasında, derişimi % 95'lik etanolden daha düşük ortamlarda saklanması genellikle önerilmez, çünkü böcek vücudundaki su etanolü seyrelteceği için, bu durum DNA'nın parçalanmasına neden olabilir. Bazı araştırmacılar böcek örneklerini %100 etanol içerisinde öldürdükten

sonra +5 °C'de muhafaza etmiş ve bunun sonucunda iyi kalitede DNA elde etmişlerdir (Catzeflis, 1991). Yapılan bu araştırma kapsamında da Çorum ilinden 2018 yılında toplanmış %99 etil alkolde oda sıcaklığında (6 ay) muhafaza edilmiş 15 örneğin DNA kalitesi ve PZR başarısı (%100) yüksek çıkmıştır (Şekil 1.B). Ancak uzun süre alkolde saklanacak örneklerin -

20 °C saklanması DNA kalitesi açısından daha uygundur. Kuru ortamda muhafaza edilen örneklerde DNA kalitesi ve başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri de ortam sıcaklığıdır. DNA konsantrasyon değerleri 40 °C ve üzeri sıcaklıklarda düşmektedir (Vink ve ark, 2005). Bu durumda PZR başarı oranlarını düşürmektedir.

Çizelge 4. Elde edilen DNA konsantrasyonları ve PZR başarısı

Tarih	İl ve İlçe	n (Örnek sayısı)	DNA konsantrasyonu ng / µl	A260\A280	PZR başarısı %
2003	Samsun	5	57.712	1.43	100 %
2005	Kayseri	10	59.189	1.66	60 %
2009	Kahramanmaraş	2	41.08	1.29	100 %
2010	Kahramanmaraş	15	38.58	1.66	93 %
2017	Amasya, Samsun, Sinop, Yozgat	52	49.45	1.64	67 %
2018	Yozgat	5	15.28	1.63	40 %
2018	Çorum	15	47.91	1.65	100 %



Şekil 1. *Euraesta bullans*'in PZR ürünlerine ait elektroforez görüntüsü; A) Alkol içinde muhafaza edilen örnekler; B) kuru ortamda muhafaza edilen örnekler

Artan moleküler temelli çalışmalarda kaliteli DNA elde etmek temel amaçtır. Bu anlamda örneklerin doğru saklanması, sonraki aşamalar (PZR, dizi analizi) için önemlidir. Yapılan bu çalışmada böceklerin yaşı ile DNA kalitesi açısından birebir paralel bir ilişki bulunmamıştır. Böceklerin kuru ortamlarda müzelerde muhafaza edilirken oda sıcaklığının üzerinde olmaması ve UV ışığa maruz bırakılmaması DNA kalitesi açısından önemlidir. Bu çalışma, müzelerde uzun yıllarca muhafaza edilen böcek materyallerine ait DNA barkotlarının (DNA barkod kütüphaneleri) hazırlanmasında örnek teşkil edebilecek bir araştırmadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya, Gaziantep Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin, FEF.YLT.18.20 numaralı proje ile vermiş oldukları destekten dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Barret RDH, Hebert PDN 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 481-491.
- Catzeflis FM 1991. Animal tissue collections for molecular genetics and systematics. *Trends in Ecology and Evolution*, 6(5): 168.
- Çalışkan Keçe AF, Özbek Çatal B, Ulusoy MR 2019. A New Invasive Species in Turkey: *Dacus ciliatus* Loew, 1862 (Diptera: Tephritidae). *Turkish Journal of Entomology*. 43 (1): 25-30.
- Dean DM, Ballard JWO 2001. Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98:279-283.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299
- Goldstein PZ, DeSalle R (2003) Calibrating phylogenetic species formation in a threatened

- insect using DNA from historical specimens. *Mol Ecol* 12:1993–1998.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. Royal Society London B (Suppl.)*: 596-599.
- Korneyev VA 1999. Phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae. In *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton, xi 944 p (73–113).
- Lodge RJ, Freeland JR 2003. The use of Odonata museum specimens in questions of molecular evolution. *Odonatologica*, 32:375–380.
- Norrbom AL 1999. A Generic reclassification and phylogeny of the tribe Myopitini (Tephritinae). In *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton. xi 944 p (581 – 627).
- Vink JC, Steven MT, Pierre P, Cheryl HY, Marshal H 2005. The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebrate Systematics*, 19: 99 -104.
- Watts CPH, Thompson JD, Allen AK, Kemp JS 2007. How useful is DNA extracted from the legs of archived insects for microsatellite-based population genetic analyses. *Journal of Insect Conservation*, 11:195-198.
- Yaran M, Kütük M, Görmez V, Koyuncu MÖ 2018. A new species and additional record of *Terellia Robineau-Desvoidy* (Diptera: Tephritidae) from Turkey with a key for the Cerajocera group. *Turkish Journal of Zoology*. 42: 661-665.