

**Atıf İçin:** Ulaşlı B, Can F, 2022. Zygaenidae (Lepidoptera) familyasında DNA izolasyonu ve PCR optimizasyonu üzerine araştırmalar. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1045-1054.

**To Cite:** Ulaşlı B, Can F, 2022. Investigations on DNA isolation and PCR optimization in Zygaenidae (Lepidoptera) family. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1045-1054.

## **Zygaenidae (Lepidoptera) familyasında DNA izolasyonu ve PCR optimizasyonu üzerine araştırmalar**

Başak ULAŞLI<sup>1\*</sup> Feza CAN<sup>1</sup>

**ÖZET:** Son yıllarda pek çok böcek grubuyla birlikte Lepidoptera takımında da türlerin teşhis edilmesinde moleküler çalışmalar artarak önem kazanmış ve karşılaştırmalı morfolojik sınıflandırmanın tamamlayıcısı olmuştur. Tüm dünyaya yayılmış ve kendi içinde beş alt familyaya bölünmüş Zygaenidae familyasının ülkemizde 54 türü bulunmaktadır. Bu çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki 31 lokasyondan toplanan 13 Zygaenidae türü kullanılarak DNA izolasyonu ve PCR analizlerinde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. DNA izolasyonu aşamasında "Qiagen DNeasy DNA izolasyon kiti" (QDNA) ve "Macherey Nagel Nucleospin DNA Insect kiti" (MN) kullanılmıştır. Zygaenidae familyası ile ilgili yapılacak çalışmalarda MN kitinin, QDNA kitinden daha etkili ve başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada nanodrop ölçüm sonuçlarının yol gösterici olmadığı görülmüştür. Gelecekte yapılacak çalışmalarda ise daha farklı DNA ölçüm tekniklerinin denenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. PCR analizlerinde ise iki farklı karışım, DreamTaq PCR karışımı ile primer ve laboratuvar koşullarına göre modifiye edilmiş PCR karışımı, denenmiştir. Ticari karışımın çok daha hızlı ve etkin sonuç verdiği ancak olanaklar doğrultusunda ihtiyaç duyulması halinde ise laboratuvarında oluşturulan karışımla da başarılı sonuçlar elde edilebileceği görülmüştür. Çalışmada kullanılan LCO1490/HCO2198 primer çiftinin Zygaenidae türlerinin tanımlanması için uygun olduğu saptanmış ve analizlerde tür tanımlanmasında %92.7 oranında başarı elde edilmiştir

**Anahtar Kelimeler:** Lepidoptera, zygaenidae, DNA izolasyonu, PCR, optimizasyon, COI

### **Investigations on DNA isolation and PCR optimization in Zygaenidae (Lepidoptera) family**

**ABSTRACT:** In recent years, molecular studies have gained increasing importance in the identification of species in Lepidoptera as well as in many insect groups and have become complementary to the comparative morphological classification. There are 54 species of the Zygaenidae family, which is spread all over the world and divided into five subfamilies, in our country In this study, optimization studies were carried out in DNA isolation and PCR analyzes using 13 Zygaenidae species collected from 31 locations in the Eastern Mediterranean Region. for DNA isolation, Qiagen DNeasy DNA isolation kit (QDNA) and Macherey Nagel Nucleospin DNA insect kit were used. It has been determined that the MN kit gives more effective and successful results than those of QDNA isolation kit in the studies on the Zygaenidae family. In addition, it was observed that the nanodrop measurement results were not instructive in the study. It is thought that it would be beneficial to try different DNA measurement techniques in future studies In PCR analysis, two different mixtures, DreamTaq PCR mixture and a modified PCR mixture according to primer and laboratory conditions, were tested. It has been seen that the commercial mixture gives much faster and more effective results, but if needed in line with the feasibilities, successful results will be obtained with the mixture created in the laboratory. In the study, the LCO1490/HCO2198 primer pair was used and it was found to be suitable for the identification of Zygaenidae species, and a success rate of 92.7% was obtained in the analysis.

**Keywords:** Lepidoptera, zygaenidae, DNA isolation, PCR, optimization, COI

<sup>1</sup> Başak ULAŞLI ([Orcid ID: 0000-0002-0989-2020](https://orcid.org/0000-0002-0989-2020)), Feza CAN ([Orcid ID 0000-0002-0737-6145](https://orcid.org/0000-0002-0737-6145)) Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Hatay, Türkiye

\***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Başak ULAŞLI, e-mail: basaktok@yandex.com

\* Bu çalışma Başak ULAŞLI'nın Doktora tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Zygaenidae familyası Lepidoptera takımının Zygaenoidea üst familyasına bağlı 12 familyasından birisidir. Toplamda 170 cins, 1.200 tür içeren familyanın ülkemizde 54 türü bulunmaktadır. Birçok dünya ülkesi böcek faunalarını 19. yüzyılın başlarında belirlemiş olmalarına rağmen, 21. yüzyılın başlarına geldiğimiz halde Türkiye böcek faunası ve buna bağlı olarak Zygaenidae faunası henüz tam anlamıyla ortaya çıkarılamamıştır (Tarmann, 2005; Efetov ve ark., 2019; Ulaşlı, 2020).

Ülkemizde gece kelebeği türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalara bakıldığında ülkemizin lepidopter türlerinin belirlenmesi için, sadece morfolojik karakterlerin kullanıldığı görülmektedir. Oysa birçok gece kelebeği türü morfolojik olarak birbirine çok benzerlik gösterebilmekle birlikte, bazen benzer kanat desenlerine sahip türler, farklı türler olarak karşımıza çıkabilmektedir. Ayrıca mevsimsel ve eşeyssel dimorfizm, aynı türe ait popülasyonlarda görülen renk ve desen varyasyonları da morfolojik olarak teşhislerini zorlaştırmaktadır (Hausmann, 2001; Doğanlar, 2003; Mironov, 2003; Sihvonen ve Nupponen, 2005; Can, 2009; Garrevoet ve ark., 2013; Spalding ve ark., 2013, Hofmann ve Tremewan, 2017). Günümüzde moleküler teknikler, neredeyse tüm canlıların teşhisinde ve filogenetik özelliklerinin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Ancak ülkemizde Lepidoptera takımında bu çalışmaların yok denecek kadar az sayıda olduğu bilinmektedir. Zygaenidae familyasının evrimi, moleküler özellikleri, morfolojik özellikleri veya her ikisinin kombinasyonu kullanılarak yapılan çalışmalar son on yılda gerçekleştirilmiş ve üzerine bazı araştırmalar eklenmiştir. Ancak tür içi ve türler arası düzeylerdeki genetik çalışmalar genellikle ekonomik öneme sahip türlerle sınırlı kalmıştır (Efetov ve ark., 2019). Yurtdışında yapılan çalışmalarda 80 familyanın özellikle Procrinae alt familyasına giren bazı cinslerinin (*Fuscartona*, *Chrysartona*, *Illiberis*, *Hedina*, *Goe*, *Adscita*, *Jordanita*) birbirlerine yüksek oranda benzediği belirtilmiştir (Efetov ve ark., 2019). Bu cinslerin teşhisleri sadece genital yapılar, birinci larva dönemindeki ketotaksi, karyotip ya da sadece DNA analizleri ile yapılabilmektedir. Bazı türler sadece tip örneğinden ya da elde edilmiş tek eşeyden teşhis edilmektedir. Dolayısıyla teşhis aşamasında diğer eşeyin de moleküler teknikler kullanılarak doğrulanmasına ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Efetov ve ark., 2014). Dünyadaki moleküler çalışmalar incelendiğinde familyanın Chalcosiinae alt familyasında eşeyssel dimorfizm, polimorfizm ve kompleks mimetrik kanat desenlenmesinin görülmesinden dolayı tür teşhisinde yanlışlıkların olduğu belirtilmiştir (Yen, 2003; 2004). Ülkemizde ise Zygaenidae familyasının moleküler sistematigi ilk kez Ulaşlı ve Can (2021) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki türlerin incelenmesiyle ele alınmış, türlerin hem morfolojik hem de moleküler tanımlamaları yapılmış ve soyağaçları oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda moleküler ve morfolojik tanımlama verilerinin birbirleriyle birebir uyduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmalar sırasında yöntemin gerçekleştirilmesi ve sağlıklı sonuçların elde edilmesinde DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşamalarında bazı sorunlarla karşılaşmıştır.

Moleküler biyoloji çalışmaları yüksek kalitede DNA gerektirmekte ve DNA izolasyonu moleküler çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Böylesi çalışmalar için kullanılacak olan DNA'nın kısa sürede ve saf olarak eldesi son derece önemlidir. Bu amaçla DNA elde edilmesi için birçok izolasyon yöntemi geliştirilmiştir (Doyle ve Doyle, 1991; Chen ve ark., 2008; Ammazalorso ve ark., 2015; Palma ve ark., 2016) ve iyi bir DNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir (Şimşek ve ark., 2008). Sonraki adım olan PCR aşaması ise, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için, DNA'nın miktarı ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül, 2000; Güz ve Kılınçer, 2012).

Bu nedenle çalışmada Zygaenidae türlerinin belirlenmesinde morfolojik tanılamayı doğrulayan ve destekleyen moleküler tanılama yöntemlerinin kullanılmasında ilk ve en temel adım olan DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında bazı optimizasyonlar yapılması amaçlanmıştır. Böylelikle gelecekte özellikle bu grupta yapılacak moleküler tekniklere dayalı analizler için öncü bir çalışma olması hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

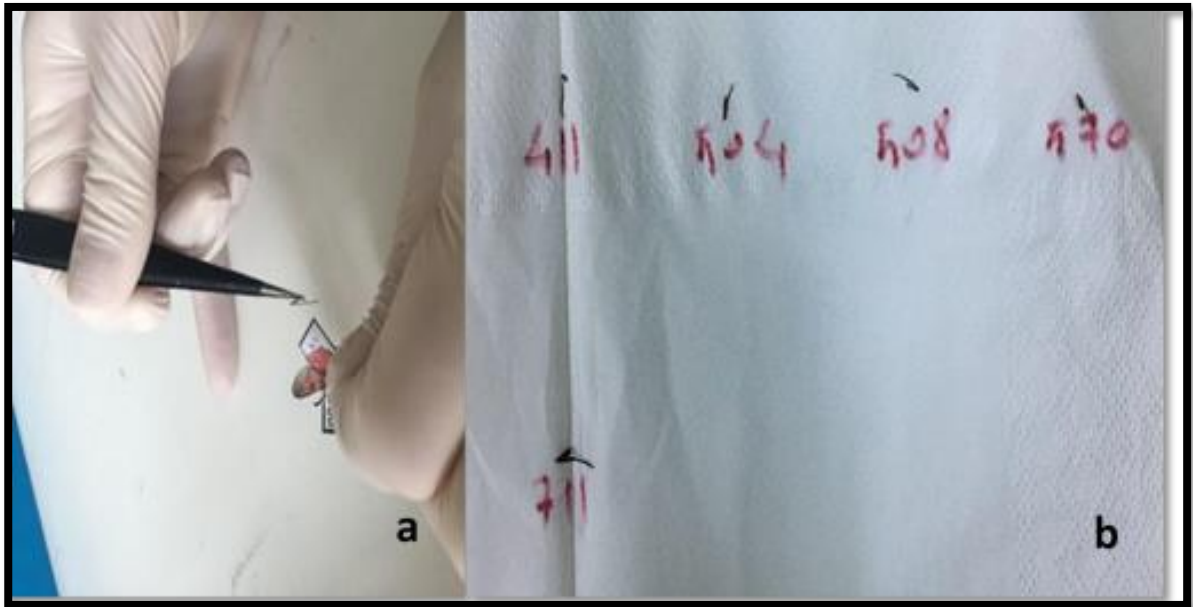
Bu çalışmanın ana materyalini Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki (Adana, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş ve Osmaniye) 31 farklı lokasyondan toplanan Zygaenidae familyasına bağlı türler oluşturmaktadır. Analize dahil edilen örneklerin seçiminde iklim koşulları, denize yakınlık, yükseklik farklılıkları, konukçu bitki çeşitliliği gibi farklı habitat özellikleri dikkate alınmıştır.

### DNA izolasyonunun yapılması ve DNA miktarının belirlenmesi

Bu çalışmada DNA izolasyonu yapmak için kelebeklerin kanatları gerilip kuruduktan sonra, yani örnekler taze iken her örneğin bir bacağı steril pens yardımıyla koparılıp ayrı ayrı tüplere konularak kodlanmış ve %96'lık etil alkolde -20°C'de muhafaza edilmiştir. Alkolden çıkarılan örnekler DNA izolasyonu öncesinde bir süre steril kurutma kağıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır (Şekil 1).

Moleküler tanılama çalışmalarında temel hedef kaliteli DNA eldesi olduğu için öncelikle optimizasyon yapmak amaçlanmıştır ve en yaygın kullanılan ticari kitlerle optimizasyon aşamasına başlanmıştır. Çalışma kapsamında yapılan DNA izolasyonlarında "Qiagen DNeasy DNA izolasyon kiti" (QDNA) ve "Macherey Nagel Nucleospin DNA insect kiti" (MN) kullanılmıştır. Tüm örnekler en az iki tekerrürlü olarak çalışılmıştır.

DNA izolasyonu için aynı türün farklı illerdeki farklı popülasyonlarına ait kelebek örnekleri, farklı yükselti, iklim koşulları, bitki örtüsüne sahip olmaları dikkate alınarak buldukları bölgeleri temsilen seçilmiştir. DNA izolasyonundan sonra örneklerin DNA konsantrasyonunu ve kalitesini ölçmek amacıyla nanodrop spektrofotometre (Thermo 2000c) cihazı kullanılmıştır.



Şekil 1. a) DNA izolasyonunda kullanılan bacağın steril pens yardımıyla koparılması, b) izolasyon öncesi kurumaya bırakılması.

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) koşullarının belirlenmesi ve optimizasyonu

Çalışmada DreamTaq Thermo Scientific PCR Master Mix (hazır ticari kit) karışımı ve laboratuvar koşullarına göre modifiye edilmiş bir karışım olmak üzere iki farklı karışım denenmiştir. PCR reaksiyonu ticari kit için toplam hacim 25 µl; 12,5 µl PCR master mix (DreamTaq PCR Master Mix), her bir primer için 1 µl, 5 µl DNA ve 5,5 µl ddH<sub>2</sub>O olacak şekilde hazırlanmıştır. Modifiye edilen alternatif PCR karışımı ise 2 µl DNA, 2,5 µl tampon çözelti, 2 µl 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,2 µl Taq polimeraz enzimi, her bir primerden 1 µl ve 16,8 µl ddH<sub>2</sub>O toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu her iki karışım için de Sensoquest Labcycler cihazı kullanılarak 1 döngü 95°C'de 7 dk ön denatürasyondan sonra, 95°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 1 dk sentez aşaması 40 döngü yapılmış ve 72°C'de 10 dk uzama aşaması ile son aşama olacak şekilde aynı döngüler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında mitokondriyal "Cytochrome Oxidase subunit 1 (COI)" gen bölgesine ait HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') ve LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') universal primer çifti kullanılmıştır (Folmer ve ark., 1994). PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünleri görüntülemek için %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve Redsafe (İntron) ile boyanmıştır. Elde edilen bantlar jel görüntüleme cihazı (Ebox vx2, 20mx) kullanılarak görüntülenmiştir.

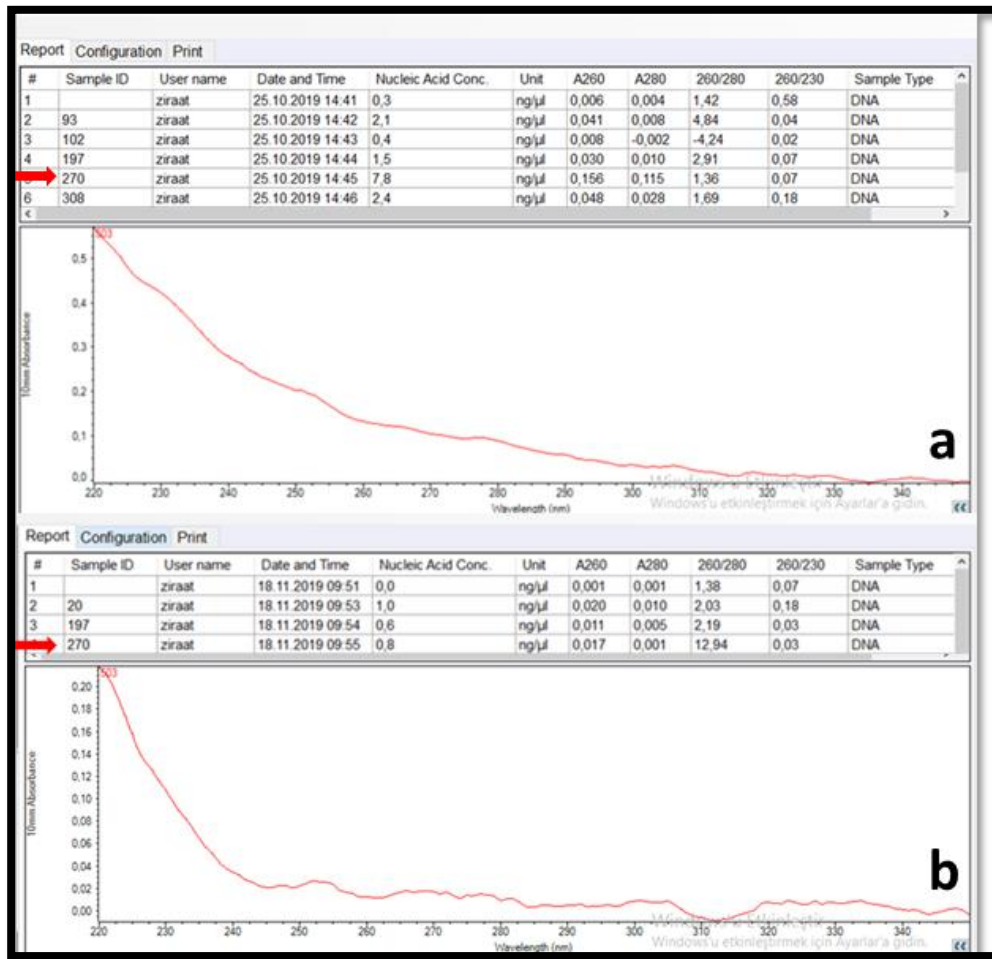
## BULGULAR VE TARTIŞMA

### DNA İzolasyon Metodlarının Karşılaştırılması

Çalışma kapsamında QDNA ve MN kitleri kullanılarak 13 farklı türe [*Theresimima ampellophaga* (Bayle-Barelle, 1808), *Adscita (Adscita) obscura* (Zeller, 1847), *Jordanita (Tremewania) notata* (Zeller, 1847), *J. (Praviela) anatolica* (Naufock, 1929), *J. (Solaniterna) subsolana* (Staudinger, 1862) (Procridae); *Zygaena (Mesembrynus) diaphana* Staudinger, 1887, *Z. (M.) graslini* Lederer, 1855, *Z. (M.) punctum* Ochsenheimer, 1808, *Z. (Agrumenia) olivieri Boisduval*, 1828, *Z. (A.) carniolica* (Scopoli, 1763), *Z. (A.) viciae* ([Denis & Schiffermüller], 1775), *Z. (A.) loti* ([Denis & Schiffermüller], 1775), *Z. (Zygaena) filipendulae* (Linnaeus, 1758) (Zygaenidae)] ait toplam 69 böcekten DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların kalitesini belirlemek amacıyla nanodrop spektrofotometre ölçümleri yapılmış olup bu örneklerin bazılarının nanodrop değerleri Şekil (2)'de verilmiştir. Ölçümler sonucunda DNA'ların nükleik asit, A260, A280, 260/280, 260/230 değerlerinde farklılıklar görülmüştür (Şekil 2). Ayrıca verilerin pik görsellerinin PCR sonuçlarını nasıl etkilediği analiz edilmeye çalışılmıştır. QDNA yöntemiyle izole edilen örneklerin DNA'larının kalitesi ve miktarı yeterli bulunmadığı için aynı örnekler ikinci bir ticari kit olan MN kiti kullanılarak yeniden izole edilmiştir.

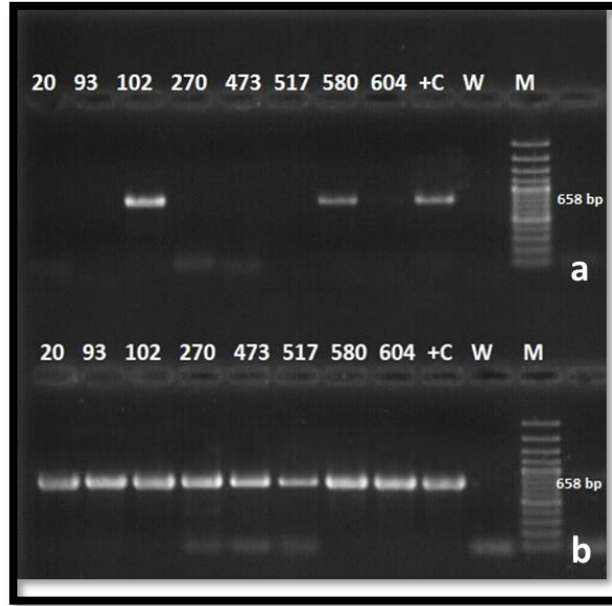
Yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümleri sonucunda her iki metodla da izole edilen DNA'larda beklenen optimum pikler görülmemiştir (Şekil 2). Üstelik zygaenid örneklerinin analiz sonuçları incelendiğinde genellikle değişken değerler elde edilmiştir. Moleküler çalışmalarda nükleik asit konsantrasyonunun ve/veya 260/280 değerlerinin eksi değerlerde olması karşılaşılan genel bir sorundur. Ancak bu değerler çalışma boyunca hiçbir zaman optimum seviyelerde olmamıştır. Buna ek olarak modifikasyon yapılmış nanodrop ölçüm sonuçlarında optimum aralığa yakın olan örneklerin çoğaltılmasında da zorluklar yaşanmıştır. Örneğin QDNA ile izole edilen 270 nolu örneğin nükleik asit konsantrasyonu 0.8 bulunurken, bu değer MN ile 1.7 bulunmuştur. Aynı örneğin QDNA ile izole edilen DNA'nın 260/280 değeri 12.94 bulunurken, MN ile 1.92 bulunmuştur (Şekil 2). İki kit ile elde edilen nanodrop değerleri arasında büyük farklılıkların olduğu görülmüştür. Kitlerdeki DNA'nın kaliteleri kıyaslandığında QDNA kitindeki DNA'nın daha kaliteli olduğu görülmektedir. Ancak asıl çelişki bu DNA'larla yapılan PCR sonucunun agaroz jel görüntüsünde ortaya çıkmaktadır. QDNA ile izole edilen

DNA PCR analizinde çoğalmamış, MN ile çalışılan DNA ise istenen düzeyde çoğalıp beklenen seviyede bant vermiştir (Şekil 3). Çalışma boyunca bu durum sıklıkla karşılaşılan bir sorun olmuştur. Böylece nanodrop verileri ve agaroz jel sonuçları karşılaştırıldığında Zygaenidae familyasının moleküler tanısını yapmak amacıyla DNA'nın kalitesinin ölçülmesi için kullanılan nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçlarının yeterince aydınlatıcı ve yol gösterici olmadığı kanısına varılmıştır. Günümüzde DNA'nın miktarının ölçülmesi ile ilgili pek çok metod kullanılmaktadır. Bunlar bazen DNA izolasyonundan önce (Samie ve ark., 2019) bazen de sonrasında yapılan ölçümler olmaktadır (Kyle ve ark., 2003). Böylesi çelişkilerin yaşanması durumunda olanaklar ölçüsünde farklı DNA ölçüm metodlarının da kullanılması daha yol gösterici olacaktır.



Şekil 2. a) Qiagen DNA izolasyon kiti, b) Macherey Nagel Nucleospin DNA insect kiti sonuçları

Çalışmada kullanılacak en uygun izolasyon yöntemini belirlemek amacıyla tesadüfi seçilen 8 örnek, her iki DNA izolasyon yöntemiyle de izole edilmiş ve bu DNA'lar mtCOI gen bölgesinden HCO2198/LCO1490 primer çifti kullanılarak PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. QDNA kitiyle izole edilen sekiz örnekten sadece iki tanesi pozitif bulunurken, MN ile izole edilen aynı sekiz örneğin tamamından beklenen düzeyde bant elde edilmiştir (Şekil 3). Bant elde edilen tüm örnekler dizi analizine gönderilmiş ve gönderilen sekiz örnekten de anlamlı diziler elde edilmiştir. Dolayısıyla çalışmada DNA izolasyonuna MN kiti ile devam edilmeye karar verilmiştir.

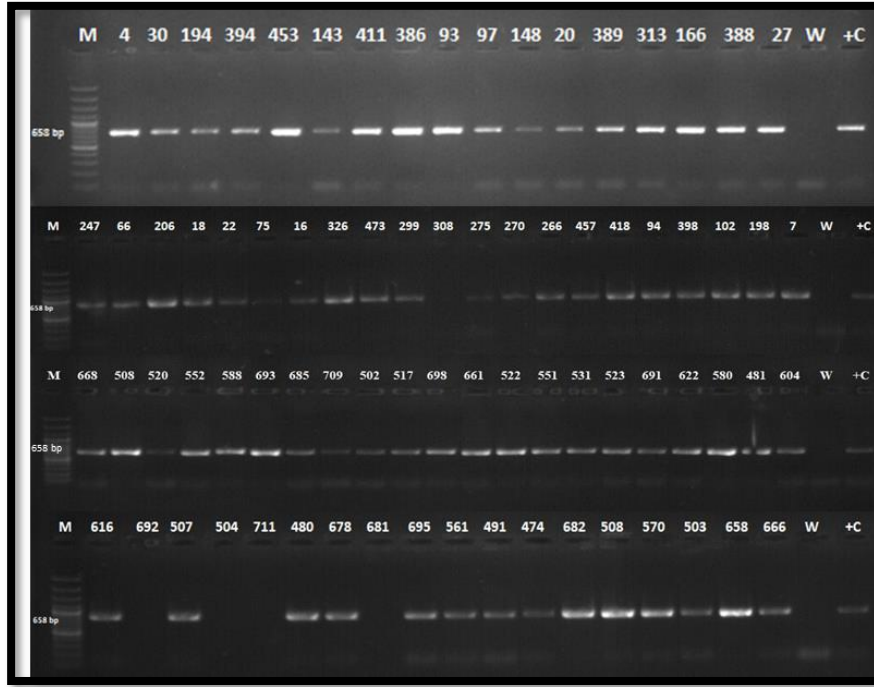


**Şekil 3.** İki farklı DNA izolasyon kiti ile elde edilen DNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri **a)** Qiagen DNeasy Tissue ve Blood kit, **b)** Macherey Nagel NucleoSpin Insect kit. M: Marker Fermentas SMO321; *Z. loti*: 20, 93; *Z. graslini*: 102; *J. anatolica*: 270, 473, 517, 580, 604 türleri; W: su kontrol; +C: pozitif kontrol; M: SM321 (*Z. loti*)'i temsil etmektedir.

DNA'nın optimizasyonu amacıyla yapılan pek çok çalışmada da hem ticari kitler hem de laboratuvarında modifiye edilen kitler karşılaştırılmıştır. Çoğunlukla da ticari kitler hem zamanın değerlendirilmesi hem de etkili olması açısından tercih edilmiştir (Asghar ve ark., 2005; Palma ve ark., 2016; Marin ve ark., 2021). Ancak tercih edilecek izolasyon yönteminde hem çalışılan materyal hem de işin mali boyutu oldukça önemlidir (Asghar ve ark., 2005). Lepidoptera takımında, türlerin teşhis edilmesinde kullanılan genital yapıların zarar görmemesi amacıyla dünya DNA barkod projesi de dahil olmak üzere çoğunlukla tek bir bacadan izolasyon yapılması tercih edilmektedir (Hebert ve ark., 2003; Niehuis ve ark., 2006). Ayrıca lepidopterlerdeki ekonomik zararlı türlerde eğer biyotip belirlemek gibi detaylar çalışılmıyorsa ve tür teşhisinde herhangi bir kaygı yaşanmıyorsa, baş, thoraks ya da abdomende izolasyon materyali olarak kullanılabilir (Marin ve ark., 2021). Kranzfelder ve ark., (2006) tarafından yapılan çalışmada da üç farklı DNA izolasyon kitinin etkinliği çalışılmış ve aralarında en etkin olanının MN izolasyon kiti olarak belirlenmiştir.

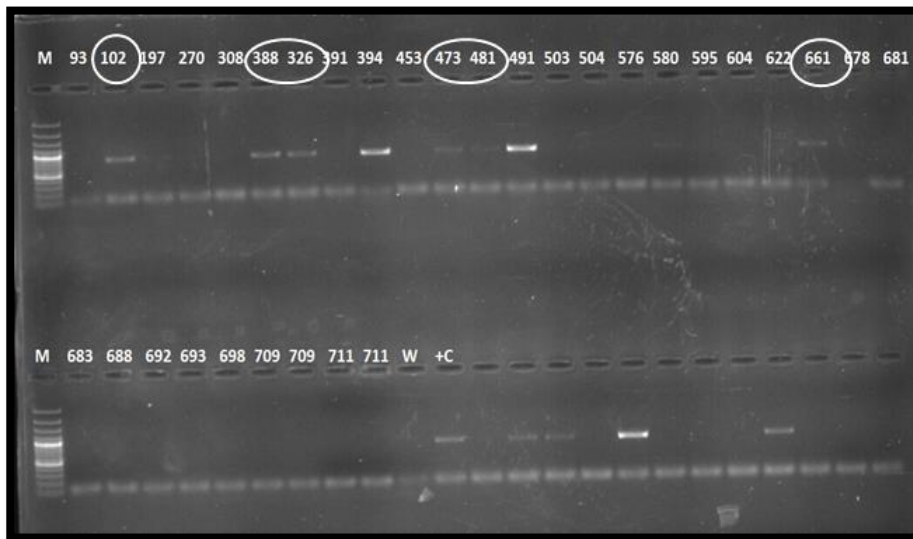
### PCR koşullarının optimizasyonu

Çalışmada DreamTaq Thermo Scientific PCR Master Mix PCR karışımı, firmanın önerdiği koşullarda karışımdan 12.5 µl, her bir primerden 1 µl, ddH<sub>2</sub>O 5.5 µl ve DNA 5 µl toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Yapılan modifikasyonlara rağmen çoğaltılamamış örnekler olması durumunda ise alternatif bir PCR karışımı denenmiştir. Bu karışımın içeriği 2 µl DNA, 2.5 µl tampon çözelti, 2 µl 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0.2 µl Taq polimeraz enzimi, her bir primerden 1µl ve 16.8 µl ddH<sub>2</sub>O toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Toplamda 69 farklı örnek üzerinde PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Zygaenidae familyasına ait böceklerin agaroz jel elektroforez görüntüleri

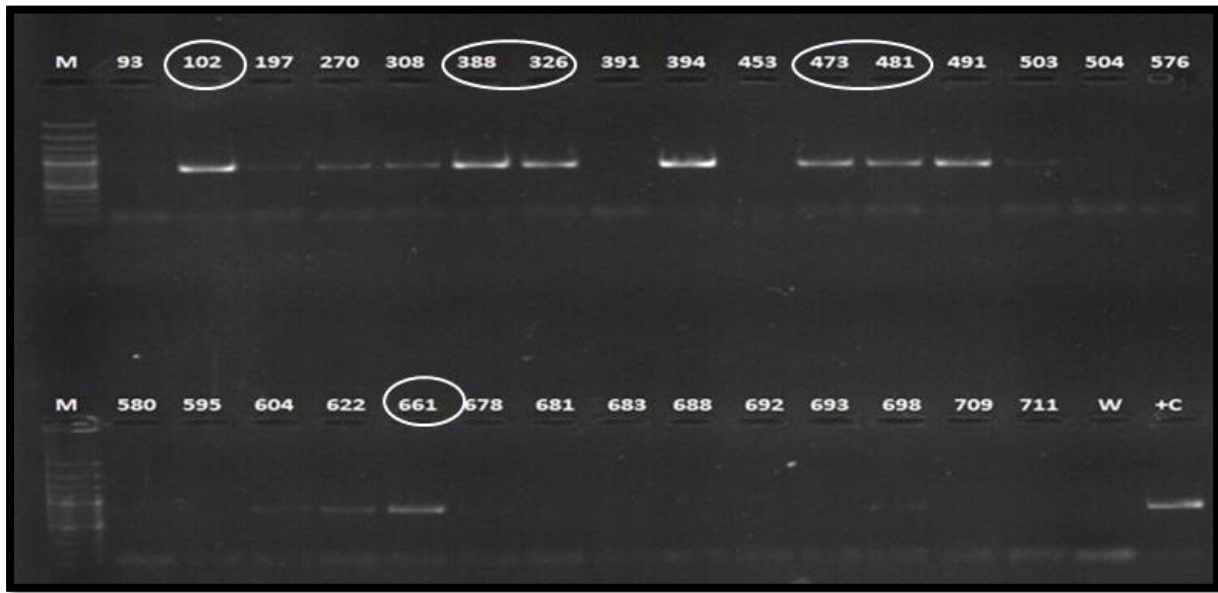
PCR analizleri sonrasında çoğaltılmayan örnekler için PCR karışımında DNA miktarında artırma ve/veya DNA sulandırması denenerek bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Şekil 5’de görüldüğü gibi DNA’nın 1/10 oranında steril su ile sulandırılması ile yapılan PCR analizlerinde daha önce herhangi bir çoğalma görülmeyen örneklerden 102, 388, 326, 473, 481 ve 661 kodlu örneklerde hafif bantlanma, 394 ve 491 kodlu örneklerde ise parlak bantlanma görülmüştür. Bu jel görüntüsü sonrasında dizi analizine gönderilen 394 ve 491 kodlu örneklerden anlamlı diziler elde edilmiştir.



Şekil 5. PCR analizindeki DNA miktarının 1/10 sulandırılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.

Jeldeki M: Marker Fermentas SMO321; *A. obscura*: 683, 693, 709; *J. subsolana*: 692; *J. anatolica*: 326, 473, 308, 270, 698, 661, 688, 622, 580, 481, 604; *Z. loti*: 93, 391, 595, 576, 503; *Z. filipendulae*: 388; *Z. graslini*: 102, 197, 678, 681, 491; *Z. carniolica*: 453; *Z. olivieri*: 394; *Z. diaphana*: 504, 511 türleri; W: su kontrol; +C: pozitif kontrol; (*Z. loti*)’yi temsil etmektedir.

Bir diğer modifikasyon çalışması olan DNA miktarının arttırılmasında ise DreamTaq PCR Master Mix karışımında önerilen DNA miktarının 1.5 katının (7.5 µl) kullanılması sonucunda DNA'nın 1/10 oranında sulandırılması ile yapılan PCR analizlerinde hafif bantlanma görülen 102, 388, 326, 473, 481, 661 kodlu örneklerin hepsinde parlak ve belirgin bantlar görülmüştür (Şekil 6). Sonuç olarak Zygaenidae örneklerinin çoğaltılamaması durumunda, bu modifikasyon çalışmalarının mevcut sorunların çözümüne alternatif olacağı belirlenmiştir. Çalışmada 308, 504, 711, 681, 692 kodlu örneklerin DNA'sı yapılan tüm optimizasyon ve modifikasyon çalışmaları sonucunda her iki primerle de istenen baz seviyesinde çoğaltılamamıştır. Başarılı sonuçlar elde edilebilmesi için farklı karışımların denenmesi gerektiği düşünülmektedir. Böylesi çalışmalarda gerek PCR döngülerinde gerekse de kimyasalların miktarlarında değişiklikler yapılarak PCR'daki başarıların arttığı görülmüştür (Innis ve Gelfand, 1999; Kranzfelder ve ark., 2006). Bu çalışma sonucunda da aynı düşünce savunulmaktadır.



**Şekil 6.** PCR analizindeki DNA miktarının 1,5 kat arttırılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.

Jeldeki M: Marker Fermentas SMO321; *A. obscura*: 683, 693, 709; *J. subsolana*: 692; *J. anatolica*: 326, 473, 308, 270, 698, 661, 688, 622, 580, 481, 604; *Z. loti*: 93, 391, 595, 576, 503; *Z. filipendulae*: 388; *Z. graslini*: 102, 197, 678, 681, 491; *Z. carniolica*: 453; *Z. olivieri*: 394; *Z. diaphana*: 504, 511 türleri; W: su kontrol; +C: pozitif kontrol; M: SM321 (*Z. loti*)'yi temsil etmektedir.

## SONUÇ

Birçok böcek takımında olduğu gibi Lepidoptera takımında da son yıllarda türlerin teşhis edilmesinde DNA sekans analizleri gibi moleküler çalışmalar artarak önem kazanmış ve karşılaştırmalı morfolojik sınıflandırmanın tamamlayıcısı olmuştur.

Dünyada Lepidoptera takımı başta olmak üzere pek çok canlı grubunun DNA barkodlanmasında, biyoçeşitliliğinin incelenmesinde, biyocoğrafik yapılarının belirlenmesinde, türlerin tanılanmasında, taksonomik ve sistematik gelişmelerinin takip edilmesinde mtCOI gen bölgesi tercih edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan mtCOI gen bölgesindeki HCO2198/LCO1490 kodlu hedef primer çifti universal primerler olarak adlandırılmakta ve Lepidoptera takımında dolayısıyla Zygaenidae familyasında da tür düzeyinde tanıya olanak sağlamaktadır.

Çalışma kapsamında Doğu Akdeniz Bölgesi illerindeki farklı lokasyonlardan toplanan 13 Zygaenidae türünden DNA izolasyonu, PCR analizleri ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. DNA izolasyonu aşamasında iki ticari kit, QDNA izolasyon kiti ve MN izolasyon kiti kullanılmış, ve



bunlardan MN kiti daha etkili ve başarılı bulunmuştur. Dolayısıyla Zygaenidae familyası ile ilgili yapılacak çalışmalarda MN kitinin kullanılması başarı şansını arttıracaktır. Bu çalışmada olduğu gibi Nanodrop değerlerinde çelişkili sonuçların elde edilmesi durumunda, mümkünse farklı DNA ölçüm metodlarının da kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

PCR analizlerinde de iki farklı karışım denenmiştir. DNA'nın çoğaltılmasına ticari bir kit olan DreamTaq Thermo Scientific PCR Master Mix PCR karışımı ile primer ve laboratuvar koşullarına göre modifiye edilmiş PCR karışımı kullanılmıştır. Sonuçlar zaman tasarrufu, araştırmacının ergonomisi ve verimlilik açısından değerlendirildiğinde ticari kitlerin, laboratuvarda hazırlanan PCR karışımına göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Yapılan optimizasyonlardan sonra, analize dahil edilen örneklerden 308 (*Jordanita anatolica*), 692 (*Jordanita subsolana*), 504 (*Zygaena diaphana*), 711 (*Z. diaphana*) ve 681 (*Z. graslini*) kodlu örnekler dışında diğer tüm örneklerin uygun gen bölgesi çoğaltılmış ve HCO2198/LCO1490 kodlu primer çifti ile tür tanılanmasında %92.7 oranında başarı elde edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü 16782 ve TÜBİTAK-1002 Hızlı Destek Programı 218O174 kodlu projeler ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

## KAYNAKLAR

- Ammazzalorso AD, Zolnik CP, Daniels TJ, Kolokotronis SO, 2015. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). PeerJ 3:e1147.
- Asghar U, Malik FM, Anwar F, Javed A, Raza A, 2015. DNA Extraction From Insects By Using Different Techniques: A Review. Advances in Entomology, 3: 132-138.
- Can F, 2009. DNA Barcoding Confirms Species Rank for a Cryptic Geometrid Species from Turkey and Bulgaria (Lepidoptera: Geometridae: Sterrhinae). Zootaxa, 2314: 63-68.
- Chen M, Zhu Y, Tao J, Luo Y, 2008. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. For. Stud. China, 10(3): 189–192.
- Cheung WY, Hubert N, Landry BS, 2018. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. Genome Res. 1993(3): 69-70.
- Doğanlar F, 2003. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Geometridae (Lepidoptera) Familyası Üzerinde Faunastik ve Sistemik Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Doyle, JJ, Doyle, JL, 1991. Isolation of Plant DNA Fresh Tissue. Focus 12:13-15.
- Efetov KA, Parshkova EV, Baevsky MY, Poddubov AI, 2014. Sec-butyl ester Of Dodecenoate: Synthesis and Attractive Properties. The Ukrainian Biochemical Journal, 5. 86 (6): 175–182.
- Efetov KA, Kirsanova AV, Lazareva ZS, Parshkova EV, Tarmann GM, Rougerie R, Hebert PDN, 2019. DNA Barcoding of Zygaenidae (Lepidoptera): Results and Perspectives. Nota Lepidopterologica, 42(2):137-150.
- Ergül, 2000. Asmalar ( *Vitis vinifera* L. cvs.) genomik DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome Coxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5): 294-299.
- Garrevoet T, Bartsch D, Lingenhöle A, 2013. On the Knowledge of *Bembecia rushana* Gorbunov, 1992 and Some Related Species (Lepidoptera: Sesiidae). Nota Lepidopterologica, 36(2):95-108.

- Hausmann A, 2001. The Geometrid Moths of Europe. Apollo Books, Volume I, 282, pp, Strenstrup-Denmark.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard J, 2003. Barcoding Animal Life: Cytochrome Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proceeding of the Royal Society Biology*, 270: 96-99.
- Hofmann A, Tremewan G, 2017. Book Review: The Natural History of Burnet Moths, Part I. 630, pp, Museum Witt Munich and Nature Research Center Vilnius.
- Innis M, Gelfand D, 1999. Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. *Protocols for Functional Genomics: PCR Applications*, *Protocols for Functional Genomics*, Academic Press, 3-22 pp.
- Kranzfelder P, Ekrem T, Stur E, 2015. Trace DNA from Insect Skins: A Comparison of Five Extraction Protocols and Direct PCR on Chironomid Pupal Exuviae. *Molecular Ecology*, 16(1): 353-363.
- Kyle M, Watts T, Schade J, Elser JJ, 2003. A microfluorometric method for quantifying RNA and DNA in terrestrial insects. *J Insect Sci.*:3:1.
- Marín DV, Castillo DK, López-Lavalle LAB, Chalarca JR, Pérezc CR, (2021). An Optimized High-Quality DNA Isolation Protocol for *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *MethodsX*, 8:101255.
- Mironov V, 2003. The Geometrid Moths of Europe, Volume 4. Apollo Books, 464 pp, Strenstrup-Denmark.
- Niehuis O, Naumann CM, Misof B, 2006. Higher Phylogeny of Zygaenid Moths (Insecta: Lepidoptera) Inferred From Nuclear and Mitochondrial Sequence Data and the Evolution of Larval Cuticular Cavities. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(3):812-829.
- Palma J, Valmorbidia I, Guesdes JVC, 2016. Comparative Analysis of Protocols for DNA Extraction From Soybean Caterpillars. *Genetics and Molecular Research*, 15(2).
- Samiea L, Champoda C, Glutzb V, Garciab M, Castellac V, Taroni F, 2019. The efficiency of DNA extraction kit and the efficiency of recovery techniques to release DNA using flow cytometry. *Science and Justice*, 59(4): 405-410.
- Sihvonen P, Nupponen K, 2005. Taxonomy of *Rhodostrophia jacularia* (Hubner, 1813)-a Sterrhinae Moth with Variable Female Wing Shape (Lepidoptera: Geometridae). *Nota Lepidopterologica*, 28(2):113-122.
- Spalding A, Fukova I, Contant-Ffrench HR, 2013. The Genetics of *Luperina nickerlii* Freyer, 1985 in Europe s (Noctuidae). *Nota Lepidopterologica*, 36(1):35-46.
- Şimşek Ö, Karaat EF, Serçe S, Aka Kaçar Y, 2005. Bazı Meyve Türlerinde Dna İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 2008, 25(1):59-69.
- Tarmann GM, 2005. Revision of the Australian Zygaenidae (Procridinae: Artonini). CSIRO Publishing, 320, pp, Collingwood, Australia.
- Ulaşlı B, 2020. Doğu Akdeniz Bölgesi Zygaenidae (Lepidoptera) Türlerinin Morfolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Ulaşlı B, Can F, 2021. Determination of Zygaenidae (Lepidoptera) Species by Morphological and Molecular Methods in The Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Turkish Journal of Entomology*. 45(2): 255-268.
- Yen SH, 2003. Phylogeny and Systematics of the Major Lineages of Chalcosiinae Sensu Lato (Zygaenidae). Crimean State Medical University Press, Simferopol, Proceedings of the 7th International Symposium on Zygaenidae, Innsbruck, September: 4-8, 2003, 293-359.
- Yen SH, 2004. Phylogenetic Reconstruction of the Chalcosiinae (Lepidoptera, Zygaenidae s.l.). Imperial College, London. PhD Thesis (Printed).