

## **Derleme (Review)**

# **Böcek sistematğinde moleküler markörlerin kullanımı**

Usage of molecular markers in insect systematics

**Nurper GÜZ<sup>1\*</sup>**

**Neşet KILINÇER<sup>1</sup>**

## **Summary**

Insect systematics is based on morphological characters. However, molecular marker systems have been developed in recent years especially in order to discriminate closely related species and in order to identify the species which couldn't be distinguished by systematic methods currently employed. Molecular markers can be divided into DNA markers and protein markers. DNA markers have been widely used due to the disadvantages of allozymes and isozymes which can be referred as protein markers. In this review preservation of samples for DNA analysis are summarized and widely used molecular techniques are described. The current techniques are compared to each other as well as the advantages and disadvantages of these techniques are discussed. Furthermore target genes used in DNA sequence analysis and their potentials in systematic research have been overviewed.

**Key words:** Insect systematics, molecular markers, molecular techniques, protein markers

## **Özet**

Böcek sistematği çalışmalarında yaygın olarak morfolojik karakterler kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle klasik sistematik uygulamalarında tanıları yapılamayan ya da birbirinden ayrılamayan türlerin tanılarında kullanılmak üzere moleküler markör sistemleri geliştirilmiştir. Moleküler markörleri, protein markörleri ve DNA markörleri olarak ikiye ayırmak mümkündür. Allozimlerin ve izozimlerin kullanıldığı protein markörleri bir takım dezavantajlarından dolayı yerini DNA markörlerine bırakmıştır. Bu derlemede entomoloji alanında DNA temelli çalışmalarda kullanılacak örneklerin muhafaza edilmesinden başlayarak DNA markörlerinin analizinde yaygın olarak kullanılan moleküler teknikler açıklanmış, mevcut teknikler birbirleriyle kıyaslanarak avantajları ve dezavantajları tartışılmıştır. Son olarak günümüzde DNA dizi analizinde kullanılan hedef genler hakkında bilgi verilerek bu genlerin sistematik çalışmalarda kullanım olanakları açıklanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Böcek sistematği, moleküler markörler, moleküler teknikler, protein markörleri

---

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 06110, Dışkapı Ankara Türkiye

\* Sorumlu yazar (Corresponding author) e mail: nurperguz@agri.ankara.edu.tr

Alınış (Received): 19.12.2011

Kabul ediliş (Accepted): 06.06.2012

## Giriş

Böcekler dünyada önemli bir yaşam formunu temsil ederler. Çöllerden Antartika'ya kadar, hemen hemen tüm ekosistemlerde geniş bir dağılım gösterirler. Böceklerin bu şekilde geniş dağılım göstermesi, onların iyi bir ekolojik adaptasyona sahip olduklarını gösterir. Böceklerin bu biyolojik başarıları, inanılmaz vücut yapıları, büyüklükleri, çiftleşme stratejileri, beslenme ve davranışlarındaki adaptasyon yeteneklerinden kaynaklanır.

Böcekler ipek, bal ve bal mumu (wax) gibi faydalı ürünler üretip, bitkilerde tozlaşmayı sağlar ve zararlı böceklere karşı doğal düşman olarak görev yaparlar. Ancak böcekler aynı zamanda bitkilere zarar verir, ölümcül hastalıkların yayılmasında vektör olarak görev yaparlar. Böceklerin bu kadar yaygın olma nedenleri, hangi genlerin ve hangi genetik mekanizmaların böceklerin yaşam formlarını düzenledikleri ve en önemlisi insanları doğrudan ve dolaylı olarak nasıl etkiledikleri bugüne kadar üzerinde çalışılan konular olmuştur. Böceklerin çevreyle olan karmaşık ilişkilerinin de etkisiyle böcek popülasyonları davranış ve morfolojileri bakımından birbirlerinden çok farklılık göstermektedir. Bu nedenle böceklerin evrimi ve dağılımlarını anlamak için böcek sistematği çalışmaları oldukça önemlidir.

Böceklerin sınıflandırılması günümüzde çeşitli sistematik karakterler kullanılarak yapılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı morfolojik karakterlerdir. Bazı böceklerde vücut kısımlarının ayrı ayrı ölçülmesi ve birbirine oranlanmasına dayalı sınıflandırmadan da yararlanılmaktadır. Böcek sistematği uygulamalarında bir dönem böceklerin belli bir organının ya da bölgesinin detaylı yapısının incelenmesine dayanan elektron mikroskop teknikleri de kullanılmıştır. Ancak çok pahalı olmasından dolayı pek rağbet görmemiştir. Son yıllarda böceklerin sınıflandırılmasında moleküler tekniklerin kullanımı, böcek sistematğine yeni bir boyut kazandırmıştır.

Böcek sistematğinde kullanılan moleküler markörleri DNA markörleri ve protein markörleri olarak ikiye ayırabiliriz. Proteinler için allozim elektroforezi kullanılırken, DNA çalışmaları için RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), AFLP (Amplified Length Polymorphism, Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), SSR (Simple Sequence Repeat, Basit Dizi Tekrarları), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Polimeraz Zincir Reaksiyonu Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) ve DNA Dizi Analizi gibi teknikler kullanılmaktadır (Hoy, 2003).

## Protein markörleri

Moleküler markörlerden ilki protein markörleridir. DNA teknolojisi kullanımından önce elektroforetik enzim analizleri tür içi ve türler arası genetik varyasyon araştırmalarında yaygın bir yöntem olarak kullanılmıştır (Richardson et al., 1986; Dawah, 1989; Kimani-Njogu et al., 1998; Atanassova et al., 1998). Elde edilen allel frekanslarının analizi türler arası ya da bir türün farklı popülasyonları arasındaki genetik uzaklığın hesaplanmasına imkan vermiştir (Cameron et al., 1984; Pinto et al., 1992; 2003; Pintureau, 1993). Protein markörleri olarak allozimler ve izozimler kullanılır. Allozim ve izozimlerin sistematik ve popülasyon genetiğinde kullanımları 1960'ların ortasında başlamıştır (Hubby & Lewontin, 1966; Lewontin & Hubby, 1966). Allozimler aynı genin farklı allellerinin ürünüdür. İzozimler ise farklı genler tarafından üretilen ve farklı lokusları temsil eden enzimlerdir.

Allozim elektroforez tekniği kısaca şöyle özetlenebilir.

1. Örneklerin saklanması: Enzimlerin hassas olması ve çalışmaların uzun süreli olması nedeniyle mümkün olduğunca taze örneklerle çalışılmalı ya da çalışması planlanan örnekler -70°C'de saklanmalıdır.
2. Örneklerin homojenizasyonu: Örnekler ekstraksiyon sıvısı içerisinde homojenize edilir.

3. Jelin hazırlanması: Belli oranlarda hazırlanacak olan nişasta incelenecek olan enzimlere spesifik jel tamponu içinde çözülerek hazırlanır. Jel matrisi olarak poliakrilamid ya da selüloz asetat da kullanılabilir.
4. Elektroforez: Elektroforez tankının bölmelerine kullanılacak enzimlere spesifik olan elektrot tamponu doldurulur. İncelenecek enzime spesifik olacak şekilde elektroforez işlemi gerçekleştirilir.
5. Histokimyasal boyama: Her bir enzim için farklı reaksiyon karışımları hazırlanarak boyama yapılır.
6. Jel fiksasyonu: Jel enzim bantlarının görüntülenmesinden sonra, fiksasyon solüsyonu ile yıkanır.
7. Sonuçların değerlendirilmesi: Elde edilen bantlar görüntülenir ve gözlenen bant kalıpları çizilir. Enzimlerin anoda en yakın olanından başlanarak, yavaş ve hızlı hareket edenlere farklı harfler verilir ve sonuçlar değerlendirilir.

Negatif elektrik yüküne sahip olan proteinler elektriksel bir alandan geçirildiklerinde negatiften başlayarak pozitif elektriksel alana doğru ilerlerler, yani bir başka deyişle katottan anoda doğru göç ederler. Allozim ve izozimler jelde yürütüldüklerinde birbirlerinden farklı görünürler; çünkü büyüklükleri ve elektrik yükleri birbirlerinden farklıdır. Allozimlerin poliakrilamid jelde yürütülmesi sonucunda ortaya çıkan görüntü belli bir genin farklı allellerini ayırt etmede kullanılır. Aynı şekilde izozimlerin jelde yürütülmesiyle elde edilen bantların kıyaslanmasıyla farklı popülasyonlar arasındaki genetik varyasyonu saptamak mümkündür.

Loxdale & Brookes (1990) *Sitobion fragariae* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) popülasyonlarının allozim frekanslarını inceleyerek yaprakbiti popülasyonlarının yapısını ve popülasyonlar arasındaki gen akışını belirlemişlerdir. Pek çok araştırmacı *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) türlerinin sistematüğünde allozim varyasyonundan yararlanmışlardır (Hung & Huo, 1985; Pinto et al., 1992; 1993; 2003; Pintureau, 1993; Burks & Pinto, 2002). Ayrıca bal arılarındaki enzim polimorfizmleri incelenerek farklı bölgelerden toplanan arı ırkları arasındaki genetik varyasyon saptanmıştır (Nunamaker & Wilson, 1980; Gartside, 1980; Sheppard & Berlocher, 1984; Nunamaker et al., 1984; Badino et al., 1985; 1988; Sheppard 1988; Kandemir & Kence, 1995; Kandemir et al., 2000).

Allozim elektroforezinin bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Bunları şu şekilde özetlemek mümkündür (Gomez, 1988).

#### **Allozim elektroforezinin avantajları**

1. Elde edilen veriler objektiftir ve kolaylıkla ölçülebilir.
2. Elde edilen veriler bir genetik varyasyonun sonucudur [Böylece fenotipik özelliklerden (fizyolojik değişiklikler gibi) etkilenmez].
3. Aynı anda çok sayıda bireyin analizine imkân verir.
4. Heterozigot ve homozigot bireylerin ayrılmasını sağlar.
5. Elde edilen varyantlar genom içerisine yayılmış farklı lokuslardaki bağımsız Mendel polimorfizmlerini açığa çıkarır. Bu varyasyonlar sistematik ve popülasyon ekolojisi gibi çalışmalarda moleküler markörler olarak kullanılabilirler.
6. Diğer moleküler yöntemlere göre daha az zamanda sonuç verir ve daha ucuzdur.

### **Allozim elektroforezinin dezavantajları**

1. Sadece yapısal genler incelenebilir.
2. Bazı varyasyon gösteren allozimler seleksiyon baskısı altında olabilir ki, bu durumda zayıf bir genetik markör ortaya çıkar.
3. Bu yaklaşımla genler arasındaki potansiyel pek çok farkın saptanması her zaman mümkün olmayabilir. Örneğın bazı aminoasit değışimleri elektrik yüklerini değıştirmeyebilir. Böyle bir durumda bir araştırıcı farklı elektroforetik mobiliteye sahip proteinlerin farklı olduğunu savunurken diğeri araştırıcı tam tersine aynı mobiliteye sahip proteinlerin benzer amino asit dizisine sahip olmadıklarını düşünebilir.
4. Bazı enzimlerin lokusları ya da allellerinin tanımlanması bazen zor olabilir.
5. Bazı enzimler sadece belli dokularda bulunabilir.
6. Enzimatik aktiviteyi saptamak için denatüre olmamış materyal gerekir. Bunun için her zaman canlı materyal ya da dondurulmuş materyalin kullanılması daha uygundur. Aynı zamanda bu metod çok sayıda örnek gerektirebilir.

### **DNA markörleri**

Protein markörlerinin belirtilen dezavantajlarından dolayı DNA temelli markör sistemleri geliştirilmiştir. DNA markörleriyle protein markörlerinden daha fazla polimorfizm elde edildiğı saptanmıştır (Behura, 2006). Bunun temel nedeni DNA bölgesinin intronlarında yer alan mutasyonların DNA seviyesinde protein seviyesinden daha fazla değışiklik göstermesidir. Ayrıca DNA örnekleri proteinlere göre daha stabildir. Bunun üzerine DNA markörleri türler arasındaki genetik farklılığın ölçümünde yaygın hale gelmiştir (Loxdale & Lushai, 1998; Heckel, 2003; Avise, 2004).

DNA temelli analizlerde kullanılacak böcek örneklerinin muhafaza edilmesi

Moleküler çalışmalarda kullanılacak böceklerin uygun olmayan koşullarda saklanması DNA kalitesinde ve miktarında azalmaya neden olacaktır. Bu tür örneklerle yapılacak olan PCR ve benzeri deneylerde sorun yaşanabilir. Uygun sıcaklıkta saklanmayan örnekler zamanla bozulabilir. Bu durum, istenilen miktar ve saflıktaki DNA'nın izole edilmesini engeller. PCR deneylerinde yeterince saf olmayan ve düşük miktarda DNA örneklerinin kullanımı hedef gen bölgesine primerin bağlanma verimini düşürebildiğı gibi PCR reaksiyonu için yüksek miktarda DNA kullanılmasını gerektirebilir. Bu nedenle en ideali böceklerin önce sıvı azot içerisinde öldürölüp deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmasıdır (Post et al., 1993; Reiss et al., 1995; Dillon et al., 1996). Böylece böceğın sıvı azot içerisinde hızlı ölümü, DNA'sının DNase enzimi tarafından parçalanmasını azaltır. Ancak özellikle arazi koşullarında böcekleri optimal koşullarda öldürmek ve saklamak her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle böcek DNA'sının daha az zarar göreceğı alternatif saklama koşulları önerilmiştir (Dessauer et al., 1996). Bunlardan ilki örneklerin %95 ya da %100 etanol içerisinde saklanmasıdır (Stern, 1994; Austin & Dillon, 1997). Ancak %95 etanolün altındaki koşullarda saklanması genellikle önerilmez çünkü böcek vücudundaki su etanolü seyrelteceğı için, bu durum DNA'nın parçalanmasına neden olabilir. Bazı araştırıcılar böcek örneklerini %100 etanol içerisinde öldürdükten sonra 5 derecede muhafaza etmiş ve DNA izolasyonu sonucunda iyi kalitede DNA elde etmişlerdir (Catzefflis, 1991). Etanolün dışında aseton, 2-propanol, dietil eter, etil asetat içerisinde böceklerin 6 aya kadar saklanabileceğı bulunmuştur (Fukatsu, 1999). Kuru örnekler ise özellikle hedef DNA'nın kısa bölgelerinin çoğaltılacağı ve DNA'nın bol miktarda bulunduğu deneylerde kullanılabilirler. Ancak tek kopyalı genlerin uzun DNA fragmanlarını kuru örneklerden çoğaltmak oldukça güç olabilir. Aynı şekilde metanol, kloroform ve düşük konsantrasyonda etanol içerisinde saklanan örneklerin DNA çalışmalarında kullanımı iyi sonuçlar vermemiştir (Post et al., 1993).

## DNA markörlerinin kullanıldığı moleküler teknikler

### PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

Rekombinant DNA teknolojisi 1970'lerin başında geliştirilmiş ve takip eden yıllarda genetikçilerin ve moleküler biyologların araştırmalarında bir devrim yaratarak, biyoteknoloji endüstrisinde patlamaya neden olmuştur (Jackson et al., 1972; Lobban & Kaiser, 1973; Cohen et al., 1973). Ardından polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) adı verilen teknik geliştirilmiş ve biyolojik araştırmalarda hızlı bir şekilde yerini almıştır (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis & Faloona, 1987; Mullis, 1990). PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur. PCR analizi, moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim, adli vakalar ve sistematik çalışmalar gibi pek çok disiplinde uygulama olanağı bulmuştur.

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için, yok denecek kadar az miktarda DNA bile yeterlidir. PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli maddeler; kalıp DNA, primerler, dNTP karışımı, Taq DNA polimeraz enzimi, Mg<sup>2+</sup> ve PCR tampon çözeltisidir. PCR ile belli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi sayesinde, çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezi sağlanır.

PCR reaksiyonunda gerçekleşen olaylar kısaca şu şekilde anlatılabilir. İlk adımda çoğaltılacak olan DNA denatüre edilerek, yani 95 dereceye kadar ısıtılarak, tek zincir haline getirilir. Daha sonra sıcaklık genelde 50°C ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar. PCR reaksiyonuna Taq DNA polimeraz ilave edilir ve DNA sentezi 70°C ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi nükleotidleri 5'ucundan 3'ucuna doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. Yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Belli basamaklardan oluşan PCR reaksiyonunda; kalıp DNA çift zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation), primerlerin komplementer dizilere bağlanması (annealing) ve polimeraz enzim aktivasyonu ile zincirin uzaması (extension) şeklinde meydana gelen olayların tümüne "döngü" adı verilir. PCR reaksiyonları "thermocycler" adı verilen PCR cihazlarında, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir. PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi amacıyla jel elektroforezi yöntemi kullanılır. Elektroforez cihazı farklı moleküler ağırlıktaki DNA, RNA ve proteinlerin bir elektriksel alan etkisiyle hareket etmelerini sağlar. Örnekler gözenekli bir jel üzerine yüklendikten sonra, elektrik akımını geçiren bir çözeltinin içinde bulunduğu elektroforez tankı içerisinde yürütülür. Moleküller elektrik akımının etkisiyle zıt polaritedeki elektroda doğru hareket ederler. Küçük moleküller büyük moleküllere göre jelde daha hızlı yol alır. PCR ürünlerinin görüntülenmesinde yaygın olarak agaroz jel elektroforezi kullanılır ve ortaya çıkan bantlar etidyum bromür yardımıyla ultraviyole ışık altında görüntülenir. Moleküler ağırlığı küçük olan PCR ürünlerinin ayrılmasında Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tercih edilirken, protein çalışmalarında Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılır. Elektroforez sonrası elde edilen bantlar genellikle Coomassie Brilliant Blue (CBB) veya gümüş boyama yöntemleri ile görüntülenir.

### RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Sistematik çalışmalarda kullanılan yöntemlerden birisi RFLP adı verilen restriksiyon parça uzunluk polimorfizmidir. Bazı genler üzerinde, özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerde nükleotid dizilerinde farklılık

görülebılır. Bu özel bölgelerdeki nükleotid değışiklikleri, tek bir nükleotid çiftinde değışiklik veya bir ya da birden fazla nükleotid çiftinin çıkarılması (delesyonu) veya araya sokulması (insersiyonu) şeklinde görülür. Bu durum bir restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası yaratabılır. Bu şekilde yaratılan bir restriksiyon bölgesi bir kromozomda bulunur, diğer homolog kromozomda bulunmazsa, bu iki kromozom üzerindeki restriksiyon parçaları membrana aktarılan profillerin analizi ile birbirlerinden ayırt edilebilir (Jeffreys et al., 1985 a, b).

Bu yöntemde DNA ekstraksiyonundan sonra DNA uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek, jel elektroforezi kullanılarak kesilen DNA bantları birbirinden ayrılır. Daha sonra jeldeki DNA bir membrana aktararak, radyoaktif ya da radyoaktif olmayan bir prob ile işaretlenir. Bağlanmayan proplar yıkanarak elde edilen bantlar röntgen filminde ya da özel cihazlarda görüntülenir. Bu yöntem daha iyi bir rezolüsyon, yani çözünürlük ve daha fazla değışkenlik elde etmek için kullanılır. Ancak benzer işlemler prob kullanılmadan da yapılabilir. RFLP analizi fazla miktarda ve saflık derecesi yüksek olan DNA gerektirdiğı için küçük böcek örneklerinden her bir bireye özgü DNA'nın izole edilmesinde sorunlar yaşanabilmektedir. Bunun yanı sıra fazla sayıda böcek örneğinin RFLP yöntemiyle analiz edilmesinin zaman alıcı ve pahalı olabileceğine dikkat çekilmiştir (Hoy, 2003). Bu nedenle geleneksel RFLP analizinin modifiye edilmesiyle ortaya çıkan PCR-RFLP yönteminde belirtilen olumsuzlukların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir (Karl & Avise, 1993). Böylece küçük örneklerden ve tek bir bireyden elde edilmiş az miktardaki DNA'nın PCR yoluyla çoğaltılmasına olanak veren bu yöntemde işaretlenmiş proba ihtiyaç duyulmaz. PCR-RFLP analizi PCR yoluyla belli bölgesi çoğaltılmış DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesinin ardından agaroz jelde veya poliakrilamid jelde yürütülerek polimorfik bölgelerinin saptanmasına dayanmaktadır. PCR-RFLP analizi için literatürde primer bilgisinin mevcut olmadığı durumlarda gen bankasından hedef genin dizisine ulaşılabilir. Bu amaçla kullanılabilir veri tabanları mevcuttur (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.ebi.ac.uk/emb/>; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). Dizileri belirlenmiş genlere ait primerler tasarlanarak PCR aşamasında kullanılabilir ve uygun restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilebilir. Restriksiyon enzimlerinin belirlenmesi için 'Webcutter 2.0' ya da 'NEBcutter V2.0' gibi in silico analiz programlarından yararlanılabilir (Maarek et al., 1997, Vincze et al., 2003).

Böcek sistematüğü çalışmalarında PCR-RFLP yöntemi klasik RFLP yönteminden daha yaygın olarak kullanılmıştır (West et al., 1997; Naegele et al., 2006; Alam et al., 2007; Behere et al., 2008; Rung et al., 2009; Chen & Dorn, 2009; Hirsch et al., 2010; Chua et al., 2010; Omondi et al., 2011). Özellikle insektisit direncinden kaynaklı mutasyonların belirlenmesinde büyük kolaylık sağlayan PCR-RFLP tekniğinde (Cassanelli et al., 2005; Hsu et al., 2006; Carletto et al., 2010; Yewhalaw et al., 2011) konukçu bitkiden kaynaklı genetik varyasyonun incelenmesi (Saldamando & Velez-Arango, 2010), Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biyotiplerinin belirlenmesi (Bosco et al., 2006) ve böcek simbiyontlarının belirlenmesinde faydalanılmıştır (Aksoy et al., 1997; Mitsuhashi et al., 2002; Kikuchi & Fukatsu, 2003; Graham et al., 2008).

### **RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) PCR**

DNA'yı oluşturan bazı bölgeler genom içerisinde aynı nükleotid dizilerinin tekrarlanmasından meydana gelir. Bu dizilerin tekrarlanma sıklıklarındaki farklılıklar yeni varyasyonları ortaya çıkarır. Tür içerisinde ve türler arasındaki genetik varyasyonu DNA düzeyinde belirlemek için RAPD-PCR tekniğı geliştirilmiştir (Williams et al., 1990; Welsch & McClelland, 1990). Bu teknikte 6-10 nükleotid uzunluğundaki rastgele (random) primerlerin genom üzerindeki bazı bölgelere rastgele uyum sağlanması beklenir. Çoğaltılan DNA fragmanları agaroz jel ya da ayırım gücü daha yüksek olan poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla, molekül büyüklüklerine göre jelde farklı büyüklükte RAPD bantları verecek şekilde birbirinden ayrılır. Bantların var ya da yok olma durumuna bağlı olarak polimorfizmden söz edilir.

Diğer PCR uygulamalarının aksine bu teknikte her bir PCR reaksiyonunda bir çift primer yerine tek primer kullanılır (Williams et al., 1990).

RAPD tekniğinin avantajları:

1. Çabuk sonuç verir.
2. Ucuzdur.
3. Az iş gücü gerektirir.
4. Polimorfizm oranı yüksektir.
5. En önemlisi az ve düşük kalitede DNA örneklerinde bile sonuç verir.

RAPD tekniğinin dezavantajları:

1. Güvenirliliği sınırlıdır (Black, 1993). PCR koşulları değiştiğinde farklı sonuçlar verebilir; hatta örneklerin saklanma koşulları bile sonuçları etkileyebilir (Muralidharan & Wakeland, 1993; Schierwater & Ender, 1993). RAPD-PCR sonuçlarının tekrarlanabilirliği laboratuvaradan laboratuvara değişebilmektedir (Black, 1993; Kazmer et al., 1995; Taylor & Szalanski, 1999; Hoy et al., 2000).
2. Bu yöntem genomlardaki rastgele bölgeleri çoğalttığı için, iki tür arasındaki benzer büyüklükteki fragmanlar homolog olmayabilir (Haymer, 1994).
3. Özellikle popülasyon çalışmalarında güvenirliliği az olduğu için tercih edilmez.
4. Nadir de olsa örneklerde bakteriyel kontaminasyon sonucu farklı bantlar çıkabilir (Black, 1993).

Ancak RAPD'in güvenilir bir biçimde uygulanması için örneklerin toplanması, DNA izolasyonları ve PCR koşullarının standart olması gerekir. RAPD PCR deneylerinden elde edilen sonuçların DNA dizi analizi yöntemi, SSCP yöntemi (Single Strand Conformation Polymorphism, Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi) (Vaughn & Antolin, 1998; Sunnucks et al., 2000) ya da hibridizasyon deneyleriyle (Cognato et al., 1995) bant homolojileri kontrol edilebilir. RAPD-PCR sonucu elde edilen farklı bantlar kesilerek klonlanabilir ve DNA dizi analizi yapılabilir. Elde edilen dizilerin kullanılmasıyla SCAR (Sequence Characterized Amplified Region, Amplifiye Edilmiş Karakterize Dizi Bölgesi) primerleri tasarlanarak tekrar PCR yapılır. Bunun sonucunda allel spesifik PCR ürünleri elde edilebilir (Paran & Michelmore, 1993; Behura et al., 1999; Sylvain et al., 2000).

RAPD-PCR tekniği kullanılarak böcek popülasyonları arasındaki genetik varyasyonun belirlendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Black et al., 1992; Williams et al., 1992; Haymer & McInnis, 1994; Lou et al., 1998; Pornkulwat et al., 1998; De Sousa et al., 1999; Bas et al., 2000; Gadelhak & Enan, 2005). RAPD markörlerinden yararlanılarak bazı böcek türlerinde linkaj (bağlantı) haritaları oluşturulmuştur (Hunt & Page, 1995; Yasukochi, 1998; Beeman & Brown, 1998; Nishimori et al., 2000; Yezerski et al., 2003). Yaprakbitlerinde konukçu bitkiden kaynaklanan genotipik varyasyon RAPD tekniği ile belirlenmiştir (Vanlerberghe-Masutti & Chavigny, 1998; Lushai et al., 2002). Böceklerde insektisit direncine neden olan genlerin tanımlanması ve haritalanması sırasında RAPD-PCR tekniğinden yararlanılmıştır. Edwards & Hoy (1995) pestisitlere dirençli ve hassas yaprakbiti parazitoit popülasyonlarının salımdan sonraki durumlarını RAPD markörleri ile izlerken, Schlipalius et al., (2002) fosfin gazına yüksek oranda direnç geliştirmiş *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Coleoptera: Bostrichidae) popülasyonunun dirençten sorumlu iki lokusunu tanımlamışlardır. Ayrıca halk sağlığında paraziter hastalıklara vektörlük yapan böceklerin hastalık yayma yetenekleri RAPD markörleri ile belirlenmiştir (Pinto et al., 1998; Bosio et al., 2000).

Böceklerde tritrofik ilişkilerin anlaşılmasında spesifik RAPD lokuslarından elde edilmiş SCAR markörlerinden yararlanılmıştır (Agusti et al., 1999; 2000). Bunlara ek olarak böcek davranış çalışmalarında RAPD PCR tekniği kullanılmıştır (Apostol et al., 1994; Hunt et al., 1998; Bustamante et al., 2002).

### **AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)**

RFLP ve RAPD tekniğinin bir takım dezavantajları üzerine AFLP tekniği geliştirilmiştir. Bahsedilen bu tekniklerin tümüne aynı zamanda 'DNA fingerprinting' adı verilen 'DNA parmak izi analizleri' denilmektedir. Klasik hibridizasyona dayalı parmak izi tekniği, yani RFLP, genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden sonra elde edilen DNA fragmanlarının Southern hibridizasyonu ile polimorfizmlerin belirlenmesidir. PCR'a dayalı parmak izi tekniği yani RAPD'de ise polimorfik olan DNA fragmanlarının rastgele primerler ile çoğaltılarak belirlenmesidir. AFLP ise bu iki stratejinin birleşiminden ortaya çıkmış bir tekniktir. Yine örnekler arasındaki polimorfizmleri belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda spesifik bir DNA'nın kimlik tespiti için ya da örnekler arasındaki akrabalığı belirlemede kullanılabilir. AFLP'nin bir diğer kullanım alanı ise moleküler markörlerin tanımlanması ve genetik lokusların haritalanmasıdır.

AFLP tekniği DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonrası elde edilen DNA parçalarının ön seçici ve seçici PCR aşamaları ile çoğaltılmasına dayanır (Vos et al., 1995). Bu teknikte önce DNA iki restriksiyon enzimi ile kesilir. Daha sonra kesilen DNA fragmanlarına adaptör olarak isimlendirilen oligonükleotidler bağlanır. Elde edilen DNA fragmanları farklı primerlerle PCR yoluyla çoğaltılır. Burada iki aşamalı PCR yapılır. İlk aşamada her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı pre-amplifikasyon yapılır. Asıl amplifikasyonda, pre-amplifikasyondan elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün primerler sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur. Çoğaltılan fragmanlar gümüş boyama ile jelde ya da floresan boyalar yardımıyla otomatik sekans cihazında izlenir.

AFLP tekniğinin avantajları ve dezavantajları:

1. Polimorfizm oranı çok yüksektir.
2. RAPD tekniği kadar hızlı olmasa da, RFLP'den çok daha hızlıdır.
3. Masraf, işgücü gereksinimi ve güvenilirliği açısından RAPD ve RFLP arasında yer almaktadır.
4. Çok sayıda lokusu aynı anda ve etkili bir şekilde taraması bakımından parmak izi analizine uygundur.

AFLP tekniği ilk defa 'DNA parmak izinde yeni bir teknik' başlığı altında Vos et al., (1995) tarafından tanımlanmıştır. Ardından Reineke et al., (1998) böceklerde AFLP uygulamalarında DNA izolasyon tekniklerini değerlendirmiştir. AFLP analizi kullanılarak farklı böcek türleri arasındaki genetik varyasyon incelenebildiği gibi (Kakouli-Duarte et al., 2001; Alamalakala et al., 2009; Beckert et al., 2010) aynı türün farklı coğrafik popülasyonlarına ait bireylerin genetik yapısını ortaya koymak mümkündür (Reineke et al., 1999; Suazo & Hall, 1999; Katiyar et al., 2000; Kazachkova et al., 2004; Clark et al., 2007; Seyahoei et al., 2011; Lall et al., 2010). AFLP tekniğinde genomik DNA yerine cDNA'nın (komplementer DNA) kullanılmasıyla gen ekspresyonu tayini yapılabilir. cDNA genomik DNA'dan farklı olarak sadece ekzon bölgelerini içerdiği için ekspresyon çalışmalarına olanak verir. Örneğin farklı piringç varyetelerinde beslenen Nilaparvata lugens'in (Stal) (Hemiptera: Delphacidae), arılarda kireç hastalığına



yol açan fungus ile enfekte olmuş *Apis mellifera*'nın L. (Hymenoptera: Apidae); *Venturia canescens* (Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) tarafından parazitlenen *Ephestia kuehniella*'nın Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) genlerindeki ekspresyon değişikliği cDNA AFLP tekniği ile belirlenmiştir (Yang et al., 2006; Aronstein et al., 2010; Reineke & Löbman, 2005).

AFLP markörleri genlerin haritalanması ve genom linkaj haritalarının oluşturulması için uygun markörlerdir (Behura, 2006). AFLP temelli linkaj haritaları *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) (Tan et al., 2001); *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Howthorne, 2001); *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Zhong et al., 2004); *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (Dopman et al., 2004), *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae) (Behura et al., 2004) ve *Heliconius erato* (Linnaeus) (Lepidoptera: Nymphalidae) (Tobler et al., 2005) türlerinde oluşturulmuştur. Roderick (1996) böcek popülasyonlarının genetik yapısının şekillenmesinde coğrafik koşullar, göçler, seleksiyon, genetik sürüklenme ve gen akışı gibi faktörlerin rol oynadığını bildirmiştir. Gen akışından kaynaklanan popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin belirlenmesinde AFLP markörlerinden yararlanılmıştır (Carisio et al., 2004; Timmermans et al., 2005; Timm et al., 2006; Krumm et al., 2008; Ahern et al. 2009; Seyahooei et al., 2011). AFLP tekniği aynı zamanda beyaz sinek popülasyonlarında genetik varyasyon ve biyotiplerinin belirlenmesinde (Cervera et al., 2000; Göçmen & Devran, 2002), yaprakbitlerinde fenotip özelliklerinin belirlenmesinde (Braendle et al., 2005), kelebeklerde erkek bireylerin dağılımının belirlenmesinde (Salvato et al., 2002) ve parazitoidlerde cinsiyet tayininin genetik temellerinin araştırılmasında (Reineke & Löbmann, 2005) kullanılmıştır. Özellikle sosyal böceklerde gözlenen bazı davranışların açıklanmasında yine AFLP markörlerinden yararlanılmıştır (Mendelson & Shaw, 2002; Garcia-Gonzalez et al., 2003; Arechavaleta-Velasco et al., 2003; Rueppell et al., 2004a, 2004b, 2009). Ayrıca insektisit direncinin genetik yapısını karakterize etmek için AFLP markörlerinin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Hawthorne, 2001; Kazachkova 2007; Grubor & Heckel, 2007; Kazachkova et al., 2007; Wee et al., 2008; Baxter et al., 2010; Zhou et al., 2010; Paris & Despres, 2012).

### SSR (Basit dizi tekrarı)

Basit tekrar dizileri kullanılarak türler arasındaki farklılık ortaya konulabilir. SSR veya mikrosatelitler ökaryotik genom boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar örneğin (AT)<sub>n</sub> (GT)<sub>n</sub> (ATT)<sub>n</sub> şeklinde gösterilmekte ve 'n' ardışık tekrar sayısını belirtmektedir (van Oppen et al., 2000).

Mikrosatelitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta bantlar ile sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın türler arasında bile, tekrar sayılarının farklı olmasına neden olan mutasyonlar sebebiyle polimorfizm açısından iyi sonuçlar sağlar (Li et al., 2004).

Bu yöntem DNA'nın farklı uçlarındaki iki mikrosatelit tekrar bölgesi arasında bulunan DNA segmentinin çoğaltılmasına dayanmaktadır. Farklı büyüklükteki SSR bölgelerinin çoğaltılması için 2, 3, 4 veya 5'li mikrosatelit tekrarlarından oluşan 16-25 baz büyüklüğündeki primerler kullanılır. Enzim kesimi ve ligasyon gibi işlemlere gerek yoktur. Çoğaltılan PCR ürünleri jelde ya da otomatik sekans cihazında değerlendirilir (Nagaraju et al., 2002).

SSR tekniğinin avantajları kodominant olması ve tekrarlanabilir olması; dezavantajları ise genom bilgisine ve dizi analizine ihtiyaç göstermesi olarak belirtilmiştir (Morgante & Olivieri, 1993; Lowe et al., 2004). Ayrıca bazı mikrosatelitlerin gen regülasyonunda görev almasından dolayı bu lokusların filogenetik analizlerde kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (Schlotterer, 2000; Li et al., 2002).

SSR'in en önemli dezavantajı yeni markör geliştirmenin oldukça zor olmasıdır (Meglecz & Solignac, 1988). Genellikle yapılan çalışmalar önceki çalışmalarda bulunan SSR spesifik primerleriyle sınırlı kalmıştır. Çünkü yeni markör geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problarla hibridizasyonunun yapılması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel primerlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da oldukça fazla iş gücü gerektiren bir işlemdir. Ancak son yıllarda yeni nesil sekanslama teknolojilerinden yararlanarak yaprakbitlerinde SSR markörleri geliştirilmiştir (Jun et al., 2011). Bunun yanı sıra SSR yaklaşımının modifikasyonu sonucunda ters konumlanmış ve çoğaltılabilir uzaklıktaki iki mikrosatellit bölgesi arasındaki DNA parçasının PCR yoluyla çoğaltılmasına dayalı bir teknik olan 'ISSR (inter simple sequence repeat: basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)' tekniği geliştirilmiştir (Zietkiewicz et al., 1994). ISSR metodunda mikrosatellit markörlerinin aksine kullanılacak primerler için ön dizilim bilgisine gerek yoktur (Bornet & Branchard, 2001).

Böcek popülasyonlarının genetik yapısının belirlenmesi amacıyla bazı çalışmalarda SSR ya da ISSR tekniklerinden yararlanılmıştır (Harr et al., 1998; Lanzaro et al., 1998; Schlotterer et al., 1998; Bonizzoni et al., 2000; Reddy et al., 1999 a, b; Li et al., 2007; Velu et al., 2008). İpek böceği, bal arısı ve *Drosophila* genomları kullanılarak mikrosatellit temelli haritalar oluşturulmuştur (Staten et al., 2004; Solignac et al., 2004; Miao et al., 2005). Böceklerde insektisit direncinin fenotipinin belirlenmesi, sperm rekabeti, böcek simbiyont ilişkisi, zararlı konukçu ilişkisinin genetik temellerinin açıklanması için SSR markörlerinden faydalanılmıştır (Ranson et al., 2000; Simmons & Achmann, 2000; Simon et al., 2003; Miller et al., 2005). Böcek davranışlarının araştırılmasında SSR markörlerinden yararlanılmıştır (Crozier et al., 1997; Arechavaleta-Velasco et al., 2003; Knight et al., 2005; Solignac et al., 2005; Jensen et al., 2005; Trontti et al., 2005).

Archak et al. (2007) tarafından böcek mikrosatellit veri tabanı (InSatDb: Insect Microsatellite Database) oluşturulmuştur. Bu veri tabanında genomu bilinen bazı böceklere ait mikrosatellitlerin büyüklükleri, genomik lokasyonları ve dizi kompozisyonları gibi bir takım bilgiler yer almaktadır.

### **DNA dizi analizi**

DNA markörlerinin dizi analizi yapılarak sistematik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu amaçla önce sistematik olarak problemliler türler belirlenir. Daha sonra bu türlerin ayırımında kullanılacak hedef gen belirlenir. Bu genlere spesifik primerler dizayn edilir. Örneklerin DNA ekstraksiyonu ve spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu yapılır. Çoğaltılan gen bölgesinin DNA dizi analizi yapılır. Elde edilen diziler birbirleriyle kıyaslanarak filogenetik ağaç oluşturulur. Filogenetik ağaç oluştururken Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), Maximum parsimony (Sober, 1983), UPGMA (Sokal & Michener, 1958; Murtagh, 1984) ve Maximum likelihood (Harris & Stocker, 1998) metodlarından uygun olanı seçilerek Paup Version 4 (Swofford, 2003) ya da Mega 4 (Tamura et al., 2007) bilgisayar programlarından yararlanılabilir.

DNA analizinde kullanılan bölgeler

1. Mitokondrial DNA
2. Ribozomal DNA
3. Satelit DNA
4. İtronlar
5. Nükleer protein kodlayan genler

### **Mitokondrial DNA**

Tür bazında filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde mitokondrial DNA verileri son zamanlarda en yaygın kullanılan verilerdir. Mitokondrial DNA ökaryotlarda daireseldir. DNA sarmalının her iki yanında genler kompakt olarak dağılmıştır. Ökaryotlarda mitokondrial DNA'daki mutasyon oranları değişkendir. Mitokondride bazı bölgeler hızla değişirken, bazı bölgeler son derece korunmuştur. İşte bu farklı bölgeler farklı sistematik seviyelerin analizine imkân verir (Simon et al., 1994). Böceklerde mitokondrial DNA çalışmalarında en fazla DNA dizisi çıkarılmış genler sitokrom oksidaz I ve II, 12 S ve 16 S genleridir (Caterino et al., 2000; Hebert et al., 2003; Shokralla et al., 2011). Behura et al. (2006)'a göre mitokondrial DNA markörlerinin popüler olmasının nedenleri şunlardır;

1. Her bir hücrede binlerce mitokondri bulunur. Dolayısıyla mitokondrial DNA çok fazladır ve elde edilmesi çok kolaydır.
2. Mitokondrial DNA'nın amplifikasyonu uygun olmayan koşullarda saklanmış örneklerde bile kolaydır.
3. Mitokondrial DNA diğerlerine göre daha küçüktür. Hızlı evrimsel gelişme gösterir.
4. Mitokondrial DNA genleri anne tarafından aktarılan genlerdir.

### **Ribozomal RNA**

Sistematik çalışmalarda kullanılan bir diğer bölge ribozomal RNA'dır. Ribozomlar hücrenin temel komponentleridir. Bunlar messenger RNA'ları proteinlere çevirmekle görevlidir. Ribozomlar, ribozomal RNA ve proteinlerden oluşur. Bütün ribozomlar büyük ve küçük olmak üzere iki alt birimden meydana gelir. Ökaryotlarda büyük alt birimi 28S, 5,8S ve 5S oluştururken küçük alt birimi 18S ribozomal RNA oluşturmaktadır. Ribozomal RNA'lar korunmuş ve değişken bölgelere sahip olduklarından türler arasındaki ilişkileri açıklamak için kullanılırlar (Hillis & Dixon, 1991).

Ribozomal RNA üzerinde tekrar dizileri yer alır ve aralayıcı DNA (spacer DNA) dizileri ile birbirinden ayrılır. Bunlara aynı zamanda tekrarlanan transkripsiyon birimleri de denir. Bunlar NTS (non transcribed spacer region), ITS (internal noncoding transcribed spacer region) ve ETS (external transcribed spacer) gibi bölgelerdir. Bu bölgelerde yüksek oranda polimorfizm bulunduğu için sistematik çalışmalarda çok sık tercih edilirler (Hoy, 2003). Ribozomal RNA ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde farklı böcek takımlarında en fazla 28 S, ITS 1 ve ITS 2 bölgelerinin kullanıldığı saptanmıştır (Caterino et al., 2000).

### **Satelit DNA**

Tekrarlı dizilerden oluşan satelit DNA bölgelerinin türlerin genetik analizinde kullanıldığı bildirilmiştir (Queller et al., 1993). Ancak Satelit DNA yapısının sibling türlerde farklılık göstermesinden dolayı moleküler analizlerde markör olarak kullanılması uygun bulunmamıştır (Bachmann et al., 1993).

### **İntronlar**

DNA'da mRNA ve protein kodlanmasına katılmayan dizilere "intron" adı verilir. Tek kopyalı nükleer genlerdeki intronların sistematik çalışmalarda kullanılması önerilmiştir. Ancak türler arasındaki varyasyon intronların sistematik çalışmalarda kullanımını sınırlamıştır (Villablanca et al., 1998).

### **Nükleer Protein Kodlayan Genler**

Böcek moleküler sistematğinde protein kodlayan lokusların bazıları incelenmiş ve bunlardan yaygın olarak EF-1  $\alpha$  geninin kullanıldığı bildirilmiştir (Belshaw & Quicke, 1997; Cho et al., 1995; Mitchell et al., 1997; Reed & Sperling, 1999).

Nükleer protein kodlayan genlerin dezavantajları şu şekilde sıralanmıştır (Fang et al., 1997; Danforth & Ji, 1998):

1. Bu genler düşük kopya sayısına sahiptirler. Bundan dolayı PCR yoluyla çoğaltılmaları güçtür.
2. Bu genlerin pek çoğu büyük intronlar içerir. Bu nedenle birden fazla ekzon bölgesini çoğaltmak RT-PCR analizini gerektirir.
3. Pseudogenler problem yaratabilir.

Sonuç olarak son yıllarda moleküler markörler kullanılarak böcekler arasındaki genetik ilişkiler, filogenetik, popülasyon dinamikleri, böceklerin gen ya da genom haritalanması konularında yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Böcek sistematğinde ve biyolojik zenginliklerin envanterinin yapılmasında moleküler teknikler önemli rol oynamaktadır ve gelecekte de oynayacaktır. Günümüzde entomolojide kullanılan moleküler markörlerin geliştirilmesi için daha kesin ve etkin sonuçlar vermesi, daha az maliyette genotipleme metodlarının geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir. Ülkemizde böcek sistematği alanında moleküler markörlerin kullanımına sıkça başvurulmaya başlanmış olup ileride kullanımlarının yaygınlaşacağı düşünülmektedir.

### Yararlanılan Kaynaklar

- Agusti, N., M. C. Vicente & R. Gabarra, 1999. Development of SCAR markers of *Helicoverpa armigera*: a new PCR-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1467–1474.
- Agusti, N., M. C. Vicente & R. Gabarra, 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*, 9: 263–268.
- Ahern, R. G., D. J. Hawthorne, M. J. Raupp, 2009. Phylogeography of a specialist insect, *Adelges cooleyi*: historical and contemporary processes shape the distribution of population genetic variation. *Molecular Ecology*, 18: 343–356.
- Aksoy, S., X. Chen & V. Hypsa, 1997. Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera: Glossinidae). *Insect Molecular Biology*, 6: 183–90.
- Alam, M. T., M. K. Das, V. Dev, M. A. Ansari, Y. D. Sharma, 2007. Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cellia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP *Parasitology Research*, 100: 943–948.
- Arechavaleta-Velasco, M. E., G. J. Hunt & C. Emore, 2003. Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bees. *Behavioral Genetics*, 33: 357–364.
- Alamalakala, L., S. R. Skoda & J. E. Foster, 2009. Amplified fragment length polymorphism used for inter- and intraspecific differentiation of screwworms (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 99: 139–149.
- Apostol, B. L., W. C. Black, P. Reiter, B. Miller, 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51: 87–97.
- Archak, S., E. Meduri, P. Sravana Kumar & J. Nagaraju, 2007. InSatDb: A microsatellite database of fully sequenced insect genomes. *Nucleic Acids Research*, 35: 36–39.
- Aronstein, K. A., K. D. Murray, E. Saldivar, 2010. Transcriptional responses in honey bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC Genomics*, 11: 391.
- Atanassova, P., C. P. Brookes, H. D. Loxdale & L. Powell, 1998. Electrophoretic study of five aphid parasitoid species of the genus *Aphidius* (Hymenoptera: Braconidae), including evidence for reproductively isolated sympatric populations and cryptic species. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 3–13.
- Austin, A. D. & N. Dillon, 1997. Extraction and PCR of DNA from parasitoid wasps that have been chemically dried. *Australian Journal of Entomology* 36: 241–244.

- Avise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution, pp. 684. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Bachmann, L., J. M. Schibel, M. Raab & D. Sperlich, 1993. Satellite DNA as a taxonomic marker. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 3-11.
- Badino, G., G. Celebrano, A. Manino & S. Longo, 1985. Enzyme polymorphism in the Sicilian honeybee, *Experientia*, 41: 752–754.
- Badino, G., G. Celebrano, A. Manino & M. D. Ifantidis, 1988. Allozyme variability in Greek honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 19: 377–386.
- Bas, B., Z. Dalkilic, T. L. Peever, H. N. Nigg, S. E. Simpson, F. G. Gmitter & R. C. Adair, 2000. Genetic relationship among Florida *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) populations. *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 459-467.
- Baxter, S. W., M. Chen, A. Dawson, J. Z. Zhao, H. Vogel, A. Shelton, D. G. Heckel & C. D. Jiggins, 2010. Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha 6$  Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genetics*, 6 (1): e1000802.
- Beeman, R. W. & Brown, S. J., 1999. RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum*. *Genetics*, 153: 333–338.
- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A. & Batterham, P., 2008. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98: 599–603.
- Behura, S. K. I., Sahu, S. C., Rajamani, S., Devi, A., Mago, R. & Nair St Mohan, M., 1999. Differentiation of Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason), biotypes by sequence characterized amplified regions (SCARS). *Insect Molecular Biology*, 8: 391-397.
- Behura, S. K., Valicente, F. H., Rider, S. D., Shun-Chen, M., Jackson, S. & Stuart, J. J., 2004. A physically anchored genetic map and linkage to avirulence reveals recombination suppression over the proximal region of Hessian fly chromosome A2. *Genetics*, 167: 343–355.
- Behura, K. S., 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15: 3087-3113.
- Belshaw, R., Quicke, D. L. J. 1997. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 281–93.
- Black, W., DuTeau, N. M., Puterka, G. J., Nechols J. R. & Pettorini, J. M., 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 82: 151-159.
- Black, W. C., 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology*, 2: 1–6.
- Bonizzoni, M., Malacrida, A. R., Guglielmino, C. R., Gomulski, L. M., Gasperi, G. & Zheng, L., 2000. Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9: 251–261.
- Bornet, B. & Branchard, M., 2001. Nonanchored Inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 209–215.
- Bosco, D., Loria, A., Sartori, C., Cenis, J. L., 2006. PCR-RFLP identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean basin. *Phytoparasitica*, 34: 243–251.
- Bosio, C. F., Fulton, R. E., Salasek, M. L., Beaty B. J. & Black, W. C., 2000. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, 156: 687– 698.
- Braendle, C., Caillaud, M. C., Stern, D. L., 2005. Genetic mapping of *aphicarus*: A sex-linked locus controlling a wing polymorphism in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Heredity*, 94: 435-442.
- Burks, R. A. & Pinto, J. D. 2002. Reproductive and electrophoretic comparisons of *Trichogramma californicum* Nagaraja and *Nagarkatti* with the *T. minutum* complex. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 104: 33–40.
- Cameron, P. J., Powell, W. & Loxdale, H. D., 1984. Reservoirs for *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae), a polyphagous parasitoid of cereal aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 74: 647-656.
- Cassanelli, S., Cerchiari, B., Giannini, S., Bizzaro, D., Mazzoni, E. & Manicardi, G. C., 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and KDR insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 61: 91-96.

- Catzefflis, F. M., 1991. Animal tissue collections for molecular genetics and systematics. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 168.
- Carisio, L., P. Cervella, C. Palestini, M. Del Pero & A. Rolando., 2004. Biogeographical patterns of genetic differentiation in dung beetles of the genus *Trypocopris* (Coleoptera, Geotrupidae) inferred from mtDNA and AFLP analyses. *Journal of Biogeography*, 31: 1149-1162.
- Carletto, J., Martin, T., Vanlerberghe-Masutti, F. & Brévault, T., 2010. Insecticide resistance traits differ among and within host races in *Aphis gossypii*. *Pest Management Science*, 66: 301–307.
- Caterino, M. S., Cho, S. and Sperling, F. A. H., 2000. The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of babel. *Annual Review of Entomology*, 45: 1–54.
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Simon, B., Martinez-Zapater, J. M., Beitia, F. & Cenis, J. L., 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 391–396.
- Chen, M. H. & Dorn S., 2009. Reliable and efficient discrimination of four internal fruit-feeding *Cydia* and *Grapholita* species (Lepidoptera: Tortricidae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Economic Entomology*, 102: 2209-2216.
- Cho, S., Mitchell, A., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., Friedlander, T. P., Zhao, S., 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor-1 $\alpha$  recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 650–56.
- Chua, T. H., Chong, Y. V. & Lim, S. H., 2010. Species determination of Malaysian *Bactrocera* pests using PCR-RFLP analyses (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*, 66: 379–384.
- Clark, P., J. Molina Ochoa, S. Martinelli, S. R. Skoda, Isenhour, D. J., Lee, D. J. Krumn, J. T. & Foster, J. E., 2007. Population variation of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in the Western Hemisphere. *Journal of Insect Science*, 7: 1-10.
- Cognato, A. I., Rogers, S. O., Teale, S. A., 1995. Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scolytidae) using random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America*, 88 (4): 397– 405.
- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., Helling, R., 1973. "Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70 (11): 3240-3244.
- Crozier, R. H., Oldroyd, B. P., Tay, W. T. Kaufmann, B. E., Johnson, R. N., Carew, M. E., Jennings, K. M., 1997. Molecular advances in understanding social insect population structure. *Electrophoresis*, 18: 1672–1675.
- Danforth, B. N. & Ji, S., 1998. Elongation factor- 1  $\alpha$  occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of EF-1 $\alpha$  sequences in insects *Molecular Biology and Evolution*, 15: 225–35.
- Dawah, H. A., 1989. Separation of *Chlorocytus* species (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoids of stem-boring Hymenoptera (Eurytomidae and Cephidae) using enzyme electrophoresis. *Entomologist*, 108: 216–222.
- De Sousa, G. B., Penzetta de Dutari, G. & Gardenal, C. N., 1999. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers. *Journal of Medical Entomology*, 36: 400-404.
- Dessauer, H. C., Cole, C. J., Hafner, M. S., 1996. Collection and storage of tissues. In: (eds Hillis DM, Moritz C, Mable BK) *Molecular Systematics*, 2nd edn, pp. 29–47. Sinauer Associates, Sunderland.
- Dillon, N., Austin, A. D., Bartowsky, E., 1996. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, 5: 21–24.
- Dopman, E. B., Bogdanowicz, S. M. & Harrison, R. G., 2004. Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*, 167: 301-309.
- Edwards, O. R. & Hoy, M. A., 1995. Random amplified polymorphic DNA markers to monitor laboratory-selected, pesticide-resistant *Trioxys pallidus* (Hymenoptera: Aphididae) after release into three California walnut orchards. *Environmental Entomology*, 24: 487–496.
- Fang, Q. Q., Cho, S., Regier, J. C., Mitter, C., Matthews, M., Poole, R. W., Friedlander, T. P. & Zhao, S., 1997. A new nuclear gene for insect phylogenetics: dopa decarboxylase is informative of relationships within Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Systematic Biology*, 46: 269–83.
- Fukatsu, T., 1999. Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1935–1945.

- Gadelhak G. G. & Enan M. R., 2005. Genetic diversity among populations of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Curculionidae), determined by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *International Journal of Agriculture and Biology*, 7 (3): 395-399.
- Garcia-Gonzalez, F., Nunez, Y., Ponz, F., Roldán, E. R. S., & Gomendio, M., 2003. Sperm competition mechanisms, confidence of paternity, and the evolution of paternal care in the golden egg bug (*Phyllomorpha laciniata*). *Evolution*, 57: 1078-1088.
- Gartside, D. F. 1980. Similar allozyme polymorphism in honeybees (*Apis mellifera*) from different continents, *Experientia*, 36: 649-650.
- Göçmen, H. & Devran, Z., 2002. Determination of genetic variation in populations of *Bemisia tabaci* in Antalya. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26: 11-216.
- Gomez, A., 1988. Allozyme electrophoresis: its application to rotifers. *Hydrobiologia*, 388: 385-393.
- Graham, R. I., Zahner, V. & Lucarotti, C. J., 2008. An intracellular symbiont and other microbiota associated with field-collected populations of sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 758-768.
- Grubor, V. D. & Heckel, D. G., 2007. Evaluation of the role of CYP6B cytochrome P450s in pyrethroid resistant Australian *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 16: 15-23.
- Harr, B., Weiss, S., David, J. R., Brem, G., Schlotterer, C., 1998. A microsatellite-based multilocus phylogeny of the *Drosophila melanogaster* species complex. *Current Biology*, 8: 1183-86.
- Harris, J. W. & Stocker, H., 1998. "Maximum Likelihood Method." in *Handbook of Mathematics and Computational Science*. New York: Springer-Verlag, p. 824, 1998.
- Haymer, D. S., 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they tell us anything we don't already know? *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 717-722.
- Haymer, D. S. & McInnis, D. O., 1994. Resolution of populations of the mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, 37: 244-48.
- Hawthorne, D. J., 2001. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. *Genetics*, 158: 695-700.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270 (1512): 313-321.
- Heckel, D. G., 2003 Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology*, 48: 235-260.
- Hillis, D. M. & Dixon, M. T., 1991. Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.*, 66:411-454.
- Hirsch, J., P. Sprick, and A. Reineke., 2010. Molecular identification of larval stages of *Otiorhynchus* (Coleoptera: Curculionidae) species based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Economic Entomology*, 103 (3): 898-907.
- Hsu, J. C., Haymer, D. S., Wu, W. J. Feng, H. T., 2006. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 396-402.
- Hung, A. C. & Huo, S. 1985. Malic enzyme, phosphoglucomutase and phosphoglucose isomerase enzymes in *Trichogramma* [Hym: Trichogrammatidae]. *Entomophaga*, 30: 143-149.
- Hunt, G. J., Page, R. E., 1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*, 139 (3): 1371-1382.
- Hunt, G. J., Guzman Novoa, E., Fondrk M. K. & Page, R. E., 1998. Quantitative trait loci for honey bee stinging behavior and body size. *Genetics*, 148: 1203-1213.
- Hoy, M. A., Jeyaprakash, A., Morakote, R., Lo, P. K. & Nguyen, R., 2000. Genomic analyses of two populations of *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) suggest that a cryptic species may exist. *Biological Control*, 17: 1-10.
- Hoy, M. A. 2003 *Insect Molecular Genetics*, edition two, Academic Press/Elsevier, San Diego. 560 pp.
- Hubby, J. L. & Lewontin, R. C., 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577-594.

- Jackson, D. Symons, R.; Berg, P., 1972. "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 69 (10): 2904–2909.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. 1985a. "Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA." Nature, 314: 67-73.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. 1985b. "Individual-specific 'fingerprints' of human DNA." Nature, 316: 76-79.
- Jensen, A. B., Palmer, K. A., Boomsma, J. J. & Pedersen Bo, V., 2005. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. Molecular Ecology, 14: 93–106.
- Jun, T. H., Michel, A. P., Mian, M. A., 2011. Development of soybean aphid genomic SSR markers using next generation sequencing. Genome, 54 (5): 360-7.
- Kakouli Duarte, T., Casey, D. G. & Burnell, A. M., 2001. Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae) using amplified fragment-length polymorphism. Journal of Economic Entomology, 94: 989-997.
- Kandemir İ. & Kence A. 1995. Allozyme variation in a central Anatolian honeybee (*Apis mellifera* L.) population. Apidologie, 26: 503–510.
- Kandemir, İ., Kence, M. & Kence A. 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. Apidologie, 31: 343–356.
- Katiyar, S. K., Chandel, G., Tan, Y., Zhang, Y., Huang, B., Nugaliyadde, L., Fernando, K., Bentur, J. S., Inthavong, S., Constantino, S., Bennett, J., 2000. Biodiversity of Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae* Wood Mason) from five countries examined by AFLP analysis. Genome, 43: 322–332.
- Kazachkova, N., Fahleson, J. & Meijer, J., 2004. Establishment of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique for genotyping of pollen beetle (*Meligethes aeneus*)-a noxious insect pest on oilseed rape (*Brassica napus*). Molecular Biology Reports, 31: 37–42.
- Kazachkova, N., 2007. Genotype analysis and studies of pyrethroid resistance of the oilseed rape (*Brassica napus*) insect pest - pollen beetle (*Meligethes aeneus*). Swedish University of Agricultural Sciences, PhD thesis.
- Kazachkova, N., Meijer, J. & Ekblom, B., 2007. Genetic diversity in pollen beetles (*Meligethes aeneus*) in Sweden: role of spatial, temporal and insecticide resistance factors. Agricultural and Forest Entomology, 9: 259–269.
- Kazmer, D. J., Hopper, K. R., Coutinot, D. M. & Heckel, D. G., 1995. Suitability of random amplified polymorphic DNA for genetic markers in the aphid parasitoid, *Aphelinus asychis* Walker. Biological Control, 5: 503–512.
- Kikuchi, Y. & Fukatsu T., 2003. Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. Applied and Environmental Microbiology, 69: 6082–6090.
- Kimani-Njogu, S. K., Overholt, W. A., Woolley, J. B. & Omwega, C. O., 1998. Electrophoretic and phylogenetic analyses of selected allopatric populations of the *Cotesia flavipes* complex (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of cereal stem borers. Biochemical Systematics and Ecology, 26: 285–296.
- Knight, M. E., Martin, A. P., Bishop, S. Osborne, J. L., Hale, R. J. Sanderson, R. A. & Goulson D., 2005. An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. Molecular Ecology, 14: 1811–1820.
- Krumm, J. T., Hunt, T. E., Skoda, S. R., Hein, G. L., Lee, D. J., Clark, P. L. & 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.
- Lall, G. K., Darby, A. C., Nystedt, B., MacLeod, E. T., Bishop, R. P., Welburn, S. C., 2010. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of closely related wild and captive tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*) populations. Parasites & Vectors, 3: 47.
- Lanzaro, G. C., Toure, Y. T., Carnahan, J., Zheng, L., Dolo, G., Traore, S., Petrarca, V., Vernick, K. D. & Taylor C. E., 1998. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in West Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14260–65.
- Lewontin, R. C. & Hubby, J. L., 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity on natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, 54: 595–609.



- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A. & Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453–2465.
- Li, M. Hou, C., Miao, X., Xu, A. & Huang, Y., 2007. Analyzing genetic relationship in *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat amplification *Journal of Economic Entomology*, 100: 202–208.
- Lobban, P. Kaiser, A., 1973. "Enzymatic end-to end joining of DNA molecules". *Journal of Molecular Biology*, 78 (3): 453–471.
- Lou, K. F., Weiss, M. J., Bruckner, P. L., Morrill, W. L., Talbert, L. E. & Martin, J. M., 1998. RAPD variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). *The American Genetic Association*, 89: 329–335.
- Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P., 2004. *Ecological genetics: design, analysis, and application*. Blackwell, Malden, MA. 320 pp.
- Loxdale, H. D. & Brookes, C. P. 1990 Temporal Genetic Stability Within and Restricted Migration (Gene Flow) Between Local Populations of the Blackberry-Grain Aphid *Sitobion fragariae* in South-East England. *Journal of Animal Ecology*, 59 (2): 497-514.
- Loxdale, H. D., Lushai, G., 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577–600.
- Lushai, G. Markovitch O. & Loxdale, H. D., 2002. Host-based genotype variation in insect revisited. *Bulletin of Entomological Research*, 92: 159–164.
- Maarek, Y. S., Jacovi, M., Shtalhaim, M., Ur, S., Zernik, Z., Ben-Shaul, I. Z., 1997. WebCutter: a system for dynamic and tailorable site mapping, Selected papers from the sixth international conference on World Wide Web, p.1269-1279, California, United States.
- Meglec, E. & Solignac, M. 1998. Microsatellite loci for *Parnassius mnemosyne*. *Hereditas*, 128:179–80.
- Mendelson, T. C. & Shaw, K. L., 2002. Genetic and behavioral components of the cryptic species boundary between *Laupala cerasina* and *L. kohalensis* (Orthoptera: Gryllidae). *Genetica*, 116: 301-310.
- Miao, X. X., Xu, S. J., Li, M. H., Li, M. W., Huang, J. H., Dai, F. Y., Marino, S. W., Mills, D. R., Zeng, P., Mita, K., Jia, S. H., Zhang, Y., Liu, W. B., Xiang, H., Guo, Q. H., Xu, A. Y., Kong, X. Y., Lin, H. X., Shi, Y. Z., Lu, G., Zhang, X., Huang, W., Yasukochi, Y., Sugasaki, T., Shimada, T., Nagaraju, J., Xiang, Z. H., Wang, S. Y., Goldsmith, M. R., Lu, C., Zhao, G. P. and Huang, Y. P., 2005. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America*, 102: 16303-16308.
- Miller, N. J., Kift, N. B. & Tatchell, G. M., 2005. Host-associated populations in the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.). *Heredity*, 94: 556-564.
- Mitchell, A., Cho, S., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., Matthews, M., 1997. Phylogenetic utility of elongation factor-1 $\alpha$  in Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 381-90.
- Mitsuhashi, W., Saiki, T., Wei, W., Kawakita, H., Sato, M., 2002. Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Molecular Biology*, 11: 577–584.
- Morgante, M. & Olivieri, A., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175–182.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 51: 263-73.
- Mullis, K. & Faloona, F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- Mullis, K., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4): 56-61, 64-5.
- Muralidharan, K., & Wakeland, E. K., 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechnology*, 14: 362-364.
- Murtagh, F., 1984. "Complexities of Hierarchic Clustering Algorithms: the state of the art". *Computational Statistics Quarterly* 1: 101–113.
- Naegele, M. P., Da Costa, P. I. and Da Rosa, J. A., 2006. Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 353-357.

- Nagaraju, J., Kathirvel, M., Subbaiah, Subbaiah, E. V., Muthulakshmi, M. & Kumar, L. D. 2002. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for high throughput genotyping and genetic mapping. *Molecular Cellular Probes*, 16: 67–72.
- Nishimori, Y., Lee, J. M., Sumitani, M., Hatakeyama, M., Oishi, K., 2000. A linkage map of the turnip sawfly *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta) based on random amplified polymorphic DNAs. *Genes & Genetic Systems*, 75: 159–166.
- Nunamaker, R. A. & Wilson, W. T. 1980 Some isozymes of the honeybee. *Isozyme Bull.*, 13: 111–112.
- Nunamaker, R. A., Wilson, W. T. & Haley, B. E. 1984. Electrophoretic detection of Africanized honeybees (*Apis mellifera scutellata*) in Guatemala and Mexico based on malate dehydrogenase allozyme patterns. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 57: 622–631.
- Omondi, B. A., van den Berg, J., Masiga, D. & Schulthess, F., 2011. Phylogeographic structure of *Teretrius nigrescens* (Coleoptera: Histeridae) predator of the invasive post harvest pest *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Bulletin of Entomological Research*, 101: 521-532.
- Paran I. & Michelmore, R. W., 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy resistance genes in lettuce, *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985- 993.
- Paris M. & Despres L., 2012. Identifying insecticide resistance genes in mosquito by combining AFLP genome scans and 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology* DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05499.x.
- Pinto, J. D., Kazmer, D. J., Planter, G. R. & Sassaman, C. A., 1992. Taxonomy of the *Trichogramma minutum* complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae): allozyme variation and its relationship to reproductive and geographic data. *Annals of the Entomological Society of America*, 85: 413–422.
- Pinto, J. D., Platner, G. R. & Sassaman, C. A., 1993. Electrophoretic study of two closely related species of North American *Trichogramma*: *T. pretiosum* and *T. deion* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 86: 702–709.
- Pinto, A. D., Lana, M., Bastrenta, B., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., & Tibayrenc M., 1998. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitology Research*, 84: 348–353.
- Pinto, J. D., Platner, G. R. & Stouthamer, R., 2003. The systematics of the *Trichogramma minutum* species complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae), a group of important North American biological control agents: the evidence from reproductive compatibility and allozymes. *Biological Control*, 27: 167–180.
- Pintureau, B., 1993. Enzyme polymorphism in some African, American, and Asiatic *Trichogramma* and *Trichogrammatoidea* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 557–573.
- Pornkulwat, S., Skoda, S. R., Thomas, G. D., Foster, J. E., 1998. Random amplified polymorphic DNA used to identify genetic variation in ecotypes of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91: 719–25.
- Post, R. J., Flook, P. K., Millest, A. L., 1993. Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 85-92.
- Queller D. C., Strassmann J. E., Hughes C. R., 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 285–88.
- Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L., Hemingway, J., Collins, F. H. 2000 Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 9: 499–507.
- Reed, R. D. & Sperling, F. A. H., 1999. Interaction of process partitions in phylogenetic analysis: an example from the swallowtail butterfly genus *Papilio*. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 286–97.
- Reiss, R. A., Schwert, D. P., Ashworth, A. C., 1995. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology*, 24: 716–19.
- Reddy, K. D., Abraham, E. G. and Nagaraju, J., 1999 a. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome*, 42: 1057–1065.
- Reddy, K. D., Nagaraju, J., Abraham, E. G., 1999 b. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity*, 83: 681-687.
- Reineke, A., Karlovsky, P. & Zebitz, C. P. W., 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology*, 7: 95–99.

- Reineke, A., Karlovsky, P. & Zebitz, C. P. W., 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of different geographic populations of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae). *Bulletin of Entomological Research*, 89: 79–88.
- Reineke, A. & Löbmann, S., 2005. Gene expression changes in *Ephestia kuehniella* caterpillars after parasitization by the endoparasitic wasp *Venturia canescens* analyzed through cDNA-AFLPs. *Journal of Insect Physiology*, 51 (8):923-932.
- Richardson, B. J., Baverstock, P. R. & Adams, M., 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. New York, Academic Press 401 pp.
- Roderick, G. K., 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325–352.
- Rueppell, O., Pankiw, T., Nielson, D. I., Fondrk, M. K., Beye M. & Page, R. E., 2004a. The genetic architecture of the behavioral ontogeny of foraging in honey bee workers. *Genetics*, 167: 1767–1779.
- Rueppell, O., Pankiw, T., Page R. E., 2004b. Pleiotropy, epistasis and new QTL: the genetic architecture of honey bee foraging behavior. *Journal of Heredity*, 95: 481-491.
- Rueppell O., 2009. Characterization of quantitative trait loci for the age of first foraging in honey bee workers. *Behaviour Genetics*, 39: 541–553.
- Rung, A., Millerand D. R. & Scheffer, S. J., 2009. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to distinguish three mealybug groups within the *Planococcus citri*-P. minor species complex (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology*, 102 (1): 8-12.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., and Erlich, H., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-54.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution*, 4 (1): 406-425.
- Shokralla, S., Zhou, X., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Landry, J. F., Jacobus, L. M., Hajibabaei, M., 2011. Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One*, 6 (7): e21252.
- Sokal, R. & Michener, C., 1958. "A statistical method for evaluating systematic relationships". *University of Kansas Science Bulletin*, 38: 1409–1438.
- Saldamando, C. I. & Velez-Arango, A. M., 2010. Host plant association and genetic differentiation of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39: 921-929.
- Salvato, P., Battisti, A., Concato, S., Masutti, L., Patarnello, T., Zane, L., 2002. Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa-wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 11: 2435-2444.
- Schierwater, B. & Ender, A., 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*, 21: 4647-4648.
- Schlupalius, D. I., Cheng, Q., Reilly, P. E., Collins, P. J., Ebert, P. R., 2002. Genetic linkage analysis of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* identifies two loci that confer high-level resistance to the fumigant phosphine. *Genetics*, 161: 773–782.
- Schlotterer, C., Ritter, R., Harr, B., Brem, G., 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*, 15 (10): 1269–74.
- Schlotterer C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371.
- Seyahooei, M. A., van Alphen, J. J. M. & Kraaijeveld K., 2011. Genetic structure of *Leptopilina boulardi* populations from different climatic zones of Iran. *BMC Ecology*, 11: 4.
- Sheppard W. S. & Berlocher S. H. 1984. Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway, *J. Apic. Res.*, 23: 64–69.
- Sheppard, W. S. 1988. Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honeybee (Hymenoptera: Apidae) populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 81: 886–889.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flok, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.

- Simon, J. C., Carre, S., Boutin, M., Prunier-Leterme, N., Sabater-Mun, B., Latorre, A. & Bournoville R., 2003. Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270: 1703–1712.
- Simmons, L. W., Achmann, R., 2000. Microsatellite analysis of sperm use patterns in the bush cricket *Requena verticalis*. *International Journal of Organic Evolution*, 54: 942–952.
- Sober, E., 1983. "Parsimony in Systematics: Philosophical Issues". *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14: 335–357.
- Solignac, M., Vautrin, D., Baudry, E., Mougél, F., Loiseau, A., Cornuet, J. M., 2004. A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics*, 167: 253–262.
- Solignac, M., Cornuet, J. M., Vautrin, D., Le Conte Y., Anderson, D., Evans, J., Cros-Arteíl S. & Navajas M., 2005. The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 272: 411–419.
- Staten, R., Schully, S. D. & Noor, M. A. F., 2004. A microsatellite linkage map of *Drosophila mojavensis*. *BMC Genetics*, 5: 12-19.
- Stern, D. L., 1994. A phylogenetic analysis of soldier evolution in the aphid family Hormaphididae. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 256: 203–209.
- Suazo, A. & Hall, H. G., 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *Biotechniques*, 26: 704-705, 708-709.
- Sunnucks, P., Wilson, A. C. C., Beheregaray, L. B., Zenger, K., French, J. & Taylor, A. C., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and ecology. *Molecular Ecology*, 9: 1699–1710.
- Swofford, D. L., 2003. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Sylvain, B., Dujardin, J. C. and Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111: 95-105.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tan Y. D., Wan C. L., Zhu Y. F., Lu C., Xiang Z., Deng H. W., 2001. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 157: 1277-1284.
- Taylor, D. B. & Szalanski, A. L., 1999. Identification of *Muscidifurax* spp. by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biological Control*, 15: 270–273.
- Timm, A. E., Geertsema, H. & Warnich, L., 2006. Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) geographic and host populations in South Africa. *Journal of Economic Entomology*, 99: 341–348.
- Timmermans, M. J. T. N., Eilers, J., Marien, J., Verhoef, S. C., Ferweda, E. B., Van Straalen, N. M., 2005. Genetic structure in *Orchesella cincta* (Collembola): strong subdivision of European populations inferred from mtDNA and AFLP markers. *Molecular Ecology*, 14: 2017-2024.
- Tobler, A., Flanagan, N., Jiggins, C. D., Heckel, D. G., McMillan, W. O., 2005. First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity*, 94: 408–417.
- Trontti, K., Aron, S., Sundstrom, L., 2005. Inbreeding and kinship in the ant *Plagiolepis pygmaea*. *Molecular Ecology*, 14: 2007–2015.
- Vanlerberghe-Masutti F. & Chavigny P., 1998. Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, as evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology*, 7: 905-914.
- van Oppen, M. J., Rico, C., Turner, G. F., Hewitt, G. M. 2000. Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 489-498.
- Vaughn, T. T., Antolin, M. F., 1998. Population genetics of an opportunistic parasitoid in an agricultural landscape. *Heredity*, 80: 152–62.

- Velu, D., Ponnuvel, K. M., Muthulakshmi, M., Sinha, R. K. & Qadri S. M., 2008. Analysis of genetic relationship in mutant silkworm strains of *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers *Genetics and Genomics*, 3: 291–297.
- Villablanca, F. X., Roderick, G. K., Palumbi, S. R., 1998. Invasion genetics of the mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology*, 7: 547–60.
- Wee, C. W., Lee, S. F., Robin, C. and Heckel & D. G., 2008. Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP. *Insect Molecular Biology*, 17: 351–360.
- West, D. F., Payette, T., Mundy, T. & Black, W. C., 1997. Regional molecular genetic key of thirteen snow pool *Aedes* species (Diptera: Culicidae) in northern Colorado. *Journal of Medical Entomology*, 34: 404-410.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Williams, J. G. K., Teau, N. M., Puterka G. J. & Nechols, J. R., 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 82: 151-159.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R. J., 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids Research*, 31: 3688-3691.
- Yang, Z. F., Zhang, F. T., Zhu, L. L. & He, G. C., 2006. Identification of differentially expressed genes in brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) responding to host plant resistance. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 53–59.
- Yasukochi, Y., 1998. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 150: 1513–1525.
- Yewhalaw, D., Wassie, F., Steurbaut, W., Spanoghe, P., Van Bortel, W., Denis, L., Tessema, D. A., Getachew, Y., Coosemans, M., Duchateau, L., Speybroeck, N., 2011. Multiple Insecticide Resistance: An impediment to Insecticide-Based Malaria Vector Control Program. *Plos One*, 6 (1): e16066.
- Yezerski, A., Stevens L. & Ametrano J., 2003. A genetic linkage map for *Tribolium confusum* based on Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD's) and Recombinant Inbred (RI) lines. *Insect Molecular Biology*, 12 (5): 517-526.
- Zhong, D., Pai, A. & Yan, G., 2004. AFLP-based genetic linkage map for the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Heredity*, 95: 53–61.
- Zhou, X.-M., Wu, Q.-J., Zhang, Y.-J., Bai, L.-Y. & Huang, X. Y., 2010. Effects of abamectin selection on the genetic differentiation within *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) based on amplified fragment length polymorphism. *Insect Science*, 17: 353–360.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

