

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

ÜÇ YERLİ İPEKBÖCEĞİ İRKİNİN
(ALACA, BURSA BEYAZI VE HATAY SARISI)
BAZİ MOLEKÜLER GENETİK VE MORFOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Demet EROĞLU AKKIR

OCAK 2010

Biyoloji Anabilim Dalında DEMET EROĞLU AKKIR tarafından hazırlanan ÜÇ YERLİ İPEKBÖCEĞİ İRKİNİN (ALACA, BURSA BEYAZI VE HATAY SARISI) BAZI MOLEKÜLER GENETİK VE MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

26/01/2010

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Şükran ÇAKIR

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ertuğrul ELMA _____

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Şükran ÇAKIR _____

Üye : Prof. Dr. Meral AYDENİZÖZ _____

Üye : Prof. Dr. Kader YILDIZ _____

Üye : Doç. Dr. İrfan KANDEMİR _____

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ÜÇ YERLİ İPEKBÖCEĞİ İRKİNİN
(ALACA, BURSA BEYAZI VE HATAY SARISI)
BAZI MOLEKÜLER GENETİK VE MORFOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AKKIR EROĞLU, Demet

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Şükran ÇAKIR

Ocak 2010, 105 sayfa

Bu çalışmada Türkiye'nin üç yerli ipekböceği ırkında (Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı) genetik varyasyonu belirlemede PCR-temelli RAPD yöntemi, kokonlarında bulunan serisin proteinlerinin analizinde SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Üç yerli ırk rasgele seçilen 40 primer ile analiz edildi ve bunlardan 7 tanesi ile toplam 68 RAPD bandı gözlemlendi. Bu bantlardan 61'i ise polimorfik lokus olarak belirlendi. Polimorfik lokusların yüzdesi, en yüksek Hatay Sarısı'nda (55.88) en düşük ise Bursa Beyazı ve Alaca'da (44.12) belirlendi. Nei'nin genetik mesafesi Bursa Beyazı ile Alaca arasında 0.0637, Bursa Beyazı ile Hatay Sarısı arasında 0.1012 belirlendi. SDS-PAGE'de üç ırka ait serisin proteini 200 kDa'luk tek bant oluşturdu. Ayrıca üç yerli ırka ait kokon, ipek bezi ve yumurta morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu

(SEM) ile incelendi. İpek kalitesi yüksek olan Bursa Beyazı'nın morfolojisinin diğerk ırklardan farklı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı'nın bazı moleküler ve morfolojik özellikleri karakterize edildi. Bu veriler ileride Türkiye'nin ipekböceği ırklarının iyileştirme programlarında kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bombyx mori*, ipekböceği, RAPD-PCR, genetik polimorfizm, SDS-PAGE, SEM, ipek bezi, kokon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME MOLECULAR GENETIC AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF THREE LOCAL SILKWORM BREEDS (ALACA, BURSA BEYAZI AND HATAY SARISI)

AKKIR EROĞLU, Demet

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor : Prof. Dr. Şükran ÇAKIR

January 2010, 105 pages

In this study PCR-based RAPD method was used to determine the genetic variation in three Turkish local silkworm breeds (Alaca, Bursa Beyazı and Hatay Sarısı) and SDS-PAGE method was used to analyse the sericin proteins of their cocoons. Three local breeds were analysed by randomly chosen 40 primers and 68 total RAPD bands observed with 7 of them. 61 of these bands were evaluated as polymorphic loci. Percentage of polymorphic loci were determined higher in Hatay Sarısı (55.88), lower in Bursa Beyazı and Alaca (44.12). Nei's genetic distance was determined 0.0637 between Bursa Beyazı and Alaca, 0.1012 between Bursa Beyazı and Hatay Sarısı. In SDS-PAGE sericin proteins of three breeds yielded a single band of 200 kDa. In addition cocoon, silk gland and egg morphologies of three local silkworm breeds were analysed by the Scanning Electron Microscopy (SEM). The morphology

of Bursa Beyazı which have a high silk quality was determined as different from other breeds.

In conclusion some molecular and morphological properties of Alaca, Bursa Beyazı and Hatay Sarısı were characterized in this study. These data can be used in improvement programmes of Turkish silkworm breeds in future.

Key Words: *Bombyx mori*, silkworm, RAPD-PCR, genetic polymorphism, SDS-PAGE, SEM, silk gland, cocoon.

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımı esirgemeyen Tez DanıŐmanım Sayın Prof. Dr. Őukran ÇAKIR'a teşekkür ederim. Ayrıca ipekböceği ırklarına ait örneklerin sağlanmasında büyük katkıları bulunan Bursa İl Tarım Müdürlüğü'nde görevli Sayın Saadettin IŞIK'a teşekkür ederim. Tez çalıŐmam esnasında bana yardımcı olan arkadaşım F. Azize BUDAK YILDIRAN'a teşekkür ederim.

Tez çalıŐmam esnasında da yardımlarını esirgemeyen babam Yılmaz EROĞLU'ya, annem Aysel EROĞLU'ya, eŐim Salih AKKIR'a ve kardeŐim Őahin Yüksel EROĞLU'ya Őukranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1. 1. İpekböceğinin Tarihçesi.....	3
1. 2. İpekböceğinin Sistematığı.....	4
1. 3. Türkiye’deki Yerli İpekböceği Irkları.....	4
1. 4. Dünyada İpekböceği Genetik Stokları.....	7
1. 5. İpekböceğinin Hayat Döngüsü.....	7
1. 5. 1. Yumurta (Kuluçka) Dönemi.....	8
1. 5. 2. Larva Dönemi.....	9
1. 5. 3. Pupa (Krizalit) Dönemi.....	9
1. 5. 4. Ergin (Kelebek) Dönem.....	10
1. 6. İpekböceğinin Genetik Yapısı.....	10
1.7.İpek Bezlerinin Yapısı.....	10
1. 8. İpekböceğinin Kokon İpeğinde Bulunan Proteinler.....	11

1. 8. 1. Fibroinler.....	12
1. 8. 2. Serisinler.....	13
1. 8. 3. Seroimler.....	13
1. 8. 4. Proteinaz İnhibitörleri.....	14
1. 9. Serisin ve Fibroin Proteinlerinin Endüstride Kullanım Alanları.....	15
1. 9. 1. Bio-parçalanmış polimerler.....	15
1. 9. 2. Membran Materyalleri.....	16
1. 9. 3. Fonksiyonel Biyomateryaller.....	16
1. 9. 4. Medikal Biyomateryaller.....	16
1. 9. 5. Fonksiyonel Fiberler, Maddeler.....	17
1. 10. İpekböceği Yetiştiriciliği.....	18
1. 10. 1. Anadolu'da İpekböcekçiliği ve Bursa'nın Önemi.....	18
1. 10. 2. Sektördeki Kuruluşlar.....	19
1. 10. 3. Türkiye'de İpekböceği Tohumu Üretimi	20
1. 10. 4. Türkiye'de Yaş Koza Üretimi.....	21
1. 10. 5. Türkiye'de Ham İpek Üretimi ve Endüstrisi.....	24
1. 10. 6. Yaş Koza ve Ham İpek Üretiminde Dünya Piyasası.....	25
1. 10. 7. Yaşanan Sorunlar ve Çözüm Önerileri.....	26
1. 11. Dünyada İpek Kalitesini Artırma Amacıyla Kullanılan İyileştirme Programları.....	27
1. 12. DNA Analizine Dayalı Moleküler Teknikler.....	28
1.12.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Teknikler.....	29
1.12.1.1. RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) Tekniği.....	31

1.12.1.1.1.RAPD Metodunun Avantaj ve Dezavantajları.....	31
1. 13. Protein Analizine Dayalı Moleküler Teknikler.....	31
1. 13. 1. Elektroforez.....	32
1.13.1.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	32
1. 13. 1. 1. 1. SDS PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi).....	33
1. 14. Kaynak Özetleri.....	34
1. 15. Çalışmanın Amacı.....	36
2. MATERYAL VE YÖNTEM	37
2. 1. Örneklemeler.....	37
2. 2. RAPD-PCR Çalışmaları	38
2. 2. 1. DNA İzolasyonu.....	38
2. 2. 2. Genomik DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Hesaplanması.....	39
2. 2. 3. PCR Uygulamalarında Kullanılan Primerlerin Tayini.....	40
2. 2. 4. Çalışılan Üç Yerli İpekböceği İrkinda Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniğinin Optimizasyonu.....	42
2. 2. 4. 1. Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayısı.....	42
2. 2. 4. 2. Elektroforez Tekniği.....	43
2. 2. 4. 2 1. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	43
2. 2. 4. 2. 2. Agaroz Jelin Dökülmesi.....	44
2.2.4.2.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi.....	44
2. 2. 4. 2. 4. Örneklerin Yürütülmesi.....	44

2. 2. 4. 3. RAPD Bantlarının Gözlenmesi ve Verilerin Kaydedilmesi.....	45
2. 2. 4. 4. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	45
2. 2. 4. 4. 1. Genetik Varyasyonun Ölçülmesi.....	45
2. 3. Üç Yerli Irka Ait Serisin Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Analizi.....	46
2. 3. 1. Serisin Proteininin Elde Edilmesi.....	46
2. 3. 2. Jellerin Hazırlanması.....	47
2. 3. 3. Protein Örneklerinin Hazırlanması	49
2. 3. 4. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....	49
2. 3. 5. Jelin Boyanması ve Boyadan Arındırılması.....	49
2. 4. Üç Yerli Irkta Yapılan Morfolojik Çalışmalar.....	50
2. 4. 1. Kokonların Işık Mikroskopunda İncelenmesi.....	50
2. 4. 2. İpek Bezlerinin Çıkarılması.....	50
2. 4. 3. Örneklerin SEM İçin Hazırlanması.....	50
2. 4. 4. Serisini Uzaklaştırılmış Fiberlerin SEM İçin Hazırlanması.....	51
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
3. 1. RAPD-PCR Çalışmaları.....	52
3. 1. 1. Taranan RAPD Primerleri ve Elde Edilen DNA Bantları.....	52
3. 1. 2. Üç Yerli Irkta Genetik Varyasyonun Analizi.....	59
3. 1. 2. 1. Polimorfik Lokusların Yüzdesi.....	59
3. 1. 2. 2. Heterozigotluk.....	59
3. 1. 2. 3. Gözlenen ve Etkili Allel Sayısı.....	61
3. 1. 2. 4. Shannon'un Bilgi Endeksi.....	61
3. 1. 2. 5. Irk İçi ve Irklar Arasında Genetik Farklılık.....	61
3. 1. 2. 6. Genetik Kimlik ve Genetik Mesafe.....	62
3. 2. Üç Yerli Irka Ait Serisin Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Analizi.....	64

3. 3. Üç Yerli Irkta Yapılan Morfolojik Çalışmalar.....	65
3. 3. 1. Kokonların Işık Mikroskopunda İncelenmesi.....	65
3. 3. 2. Örneklerin SEM’de İncelenmesi	68
3. 3. 2. 1. Kokonların Morfolojisi.....	68
3. 3. 2. 2. Serisini Uzaklaştırılmış Fiberlerin Morfolojisi.....	74
3. 3. 2. 3. Yumurtaların Morfolojisi	77
3. 3. 2. 4. İpek Bezlerinin Morfolojisi.....	80
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	82
KAYNAKLAR.....	91
EK	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. Üç yerli ırka ait tırtıl ve kelebekler.....	6
1. 2. İpekböceğinin ipek bez yapısı.....	11
1. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonun Şematize Şekli.....	30
3. 1. OPL-18 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri	54
3. 2. OPN-05 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri.....	55
3. 3. OPU-19 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri.....	56
3. 4. OPY-11 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri.....	57
3. 5. OPY-13 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri.....	58
3. 6. Üç yerli ipekböceği ırkı arasında UPGMA kullanılarak oluşturulan genetik mesafeyi gösteren dendogram.....	63
3. 7. SDS-PAGE’de üç yerli ırka ait serisin proteinlerinin bant profili.....	64
3. 8. <i>Bombyx mori</i> ırklarının ışık mikroskopundaki kokon morfolojileri (X20).....	66
3. 9. <i>Bombyx mori</i> ırklarının ışık mikroskopundaki kokon morfolojileri (X100).....	67
3.10. <i>Bombyx mori</i> ırklarında gözlenen fiber dizilimi (X200).....	69
3. 11. <i>Bombyx mori</i> ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X500).....	70
3. 12. <i>Bombyx mori</i> ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X1000).....	71
3. 13. <i>Bombyx mori</i> ırklarının fiber kalınlık ölçümleri (X200).....	72

3. 14. Distile su ile kaynatılarak serisin proteini uzaklaştırılmış <i>Bombyx mori</i> ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X1000).....	75
3. 15. Sodyum tamponu ile kaynatılarak serisin proteini uzaklaştırılmış <i>Bombyx mori</i> ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X5000).....	76
3. 16. <i>Bombyx mori</i> ırklarının yumurta yüzey morfolojileri (X60).....	78
3.17. <i>Bombyx mori</i> ırklarının yumurta yüzey morfolojileri (X1000).....	79
3. 18. a. <i>Bombyx mori</i> ırkına ait tırtılın baş kısmı (labium bezleri) b. ipek bezinin morfolojisi (X35) c. ipek bezinde salgı tüplerinin morfolojisi.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. Türkiye’de yetiştirilmekte olan üç yerli ipekböceği ırkının bazı ayırt edici özellikleri.....	5
1. 2. Türkiye ipekböceği tohum üretimi, ihracatı ve ithalatı (kutu).....	20
1. 3. Bursa’da ipekböcekçiliği.....	22
1. 4. Türkiye’de kuru koza ihracatı ve ithalatı.....	23
1. 5. Türkiye’de ham ipek üretimi ve ipek halı ihracatı.....	24
1. 6. 2005 yılı dünya yaş koza ve ham ipek üretimi(ton).....	25
2. 1. Çalışmada kullanılan ırklar ve toplam birey sayıları.....	37
2. 2. Primerlerin baz dizileri ve G-C sayısının toplam baz sayısına oranı.....	41
3. 1. Sonuç alınan 7 RAPD Primeri ve bunların her üç yerli ipekböceği ırkında oluşturduğu ortak ve polimorfik bantların yaklaşık uzunlukları.....	52
3. 2. Çalışılan üç yerli ipekböceği ırkında elde edilen 34 lokus için genetik varyasyon istatistiğinin özeti.....	60
3. 3. Her üç yerli ırkta elde edilen 34 lokus için genetik varyasyon istatistiğinin özeti.....	60
3. 4. Çalışılan üç yerli ırkta gen çeşitliliğinin analizi.....	62
3. 5. Genetik kimlik (çaprazın üstünde verilen) ve genetik mesafenin (çaprazın altında verilen) ölçümü.....	63
3. 6. Grup ortalamalarını karşılaştırmak için uygulanan Anova testi sonucu.....	73
3. 7. Üç yerli ırka ait yumurta ölçümlerinin SPSS analiz sonucu.....	80

KISALTMALAR DİZİNİ

bp	baz çifti
cDNA	tamamlayıcı DNA
cm	santimetre
Da	dalton
kDa	kilodalton
kb	kilobaz
ml	mililitre
M	molar
mM	milimolar
μ l	mikrolitre
μ M	mikrometre
ng	nanogram
nm	nanometre
rpm	dönüş sayısı/dakika

1. GİRİŞ

Ülkelerin sahip olduğu biyoçeşitlilik aynı zamanda ekonomik bir potansiyel olarak da düşünülmelidir. Günümüzde mevcut gen kaynaklarının tanınması ve bunlardan sürdürülebilir faydalanma önemlidir. Çünkü ileride yaşadığı coğrafyaya uyumlu bu ırkların ıslahı ile ekonomik verimliliği artırılmış ırkların elde edilmesinde morfolojik ve moleküler verilere ihtiyaç vardır. Örneğin son yıllarda dünyada ipekböceğinin karakterizasyonu ile ilgili farklı metotların kullanıldığı birçok çalışma vardır. Tüm bu çalışmalardan elde edilen veriler ipekböceği iyileştirme programlarında kullanılmaktadır.

İpekböceği (*Bombyx mori*) 5000 yıldan beri ipek üretimi için yetiştirilmektedir (1). Ekonomik ipek değerine sahip olan bu böceğin ılıman ve tropik ülkelerde yetişen çok sayıda ırkı mevcuttur. Bunlardan tropik varyeteler genelde düşük kalitede ipek üretirken ılıman varyeteler daha yüksek kalitede ipek üretir (2).

Günümüzde ipekböceği genetikçileri ipekböceğinin kromatin yapısı, ipek üretimi ile ilgili genler ve bunların kodladığı protein salgıları üzerinde çalışmaktadır (1-9). Lepidoptera takımında ipek (10), labium salgı bezlerinin gelişmesi ile meydana gelmiş ipek bezleri tarafından salgılanır (11). İpekböceğinin ipek bezleri tarafından üretilen katı fiber yapıda olan ipekte fibroinler, serisinler, seroinler ve proteinaz inhibitörleri olmak üzere dört grup protein tanımlanmıştır (4, 10). Biyolojik özelliklerinden dolayı serisin ve fibroin, endüstride sıkça kullanılmaktadır (5).

Geçen otuz yıl içinde, ipekböceği yetiştirme programlarında genetik prensipler uygulanarak ipek kalitesinin artışı sağlanmıştır (6). Bu çalışmalar son yıllarda moleküler ağırlıklıdır. Moleküler belirleyicilerin kullanılarak bireylere özgü DNA bant profillerinin elde edildiği bu teknikler DNA parmakizi yöntemi (2) olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, ipek kalitesi yüksek ve hastalıklara dirençli ırkların yetiştirilmesi için gerekli ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır. Çünkü bilindiği üzere bu tip ıslah programları moleküler ve morfolojik çalışmaların birbirini desteklemesi ile mümkündür. Elde edilen bilgi birikimi ırkların tanımlanmasını ve bunlarla ilgili iyileştirme programlarının geliştirilmesini kolaylaştırır ve hızlandırır.

Ülkemizde Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı olmak üzere yetiştirilen sadece üç yerli ırkımız mevcuttur. Günümüzde bu ırkların saf olarak yetiştiriciliği ve yerli gen kaynaklarının muhafazası Bursa İl Tarım Müdürlüğü tarafından zor koşullar altında yürütülmektedir. Ayrıca Bursa çevresi başta olmak üzere küçük aile işletmeleri tarafından ekonomik amaçlı yetiştiricilik yapılmaktadır. Ham ipek üretimi dünyadaki diğer ülkelere göre düşüktür ve ipekböceği yetiştiriciliğinin iyileştirilmesi konusunda deneysel verilere ihtiyaç vardır. Şu ana kadar ülkemizde ipekböceği (*Bombyx mori*) üzerine bazı morfolojik, moleküler ve biyolojik çalışmalar yapılmıştır (12-15) ancak bu çalışmalar yerli ırklarla ilgili değildir. Bu yüzden yerli ipekböceği ırkları henüz tam olarak karakterize edilemeden yok olmayla karşı karşıyadır. Bu çalışmada üç yerli ipekböceği ırkının moleküler genetik ve morfolojik karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ileride kullanılacak iyileştirme programları için önemli olacaktır.

1. 1. İpekböceğinin Tarihçesi

Rivayete göre, M.Ö. 3000 yıllarında, Çin imparatoru Huang-Ti'nin sarayının bahçesinde bir tırtılın dut yaprağı yediği görülerek imparatora söylendi. Bunun üzerine imparator, böceğin yaşamını incelemesini eşi Ling-Chi'den istedi. Bir süre sonra imparatoriçe, kozadan ipliğin çekilebileceğini ve bu iplikten de kumaş dokunabileceğini saptadı. Böylelikle 3250 yıl Çinlilerin denetiminde kalan ipek endüstrisi, bu ülkenin önemli bir kazanç kaynağı olmuştur. Bu böceğin bugünkü adı *Bombyx mori*'dir. Aynı zamanda evcil ipekböceği kelebeği olarak da bilinir. MS 419 yılında, Çinli bir prensesin Khotanlı bir hükümdarla evlenmesiyle ipekböceği Çin'den çıkar. Prensese, saçlarının arasına gizlediği ipekböceği yumurtalarını eşinin ülkesine getirir (16).

Anadolu ipekböceği ile Bizanslılar döneminde, Bizans imparatorunun Çin'e gönderdiği papazların dut tohumlarını ve ipekböceği yumurtalarını getirmesiyle tanışır. Yine bu dönemde ipek Batı'ya da gönderilir. Böylelikle doğudan batıya kadar uzanan bu yol, İpek Yolu adını alır. Türklerin ipekle tanışması ise 6. yy'da Göktürkler'in İpek Yolu'nu ele geçirmesiyle olmuştur. Böylelikle bu dönemde ipek ticareti Türklerin denetimi altına girmiştir. Ayrıca bu dönemde İpek Yolu'nun Bursa'dan geçmesi, Bursa ve civarının koza yetiştiriciliğine çok elverişli olması, ülkemizde Bursa'yı ipeğin başlıca merkezi haline getirmiştir (17). Bunun sonucunda 1845 yılında Bursa'nın Kayabaşı köyünde buharla işleyen ilk ipek fabrikası kurulmuştur (16).

1. 2. İpekböceğinin Sistematığı

Şube.....:Arthropoda

Sınıf.....:Insecta veya Hexapoda

Takım.....:Lepidoptera

Alt Takım.....:Macro lepidoptera-Heterocera

Üst familya.....:Bombycoidea

Familya.....:Bombycidae

Cins.....:*Bombyx*

Tür.....:*Bombyx mori*

1. 3. Türkiye'deki Yerli İpekböceği Irkları

Günümüzde üç yerli ipekböceği ırkı ülkemizde yetiştirilmektedir. Bu ırkların sahip olduğu bazı genel özellikler Çizelge 1. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 1. 1. Türkiye’de yetiştirilmekte olan üç yerli ipekböceği ırkının bazı ayırt edici özellikleri (18)

Özellikler	Bursa Beyazı	Alaca	Hatay Sarısı
Görünüm:	Kozası büyük, boğumlu, yeşile çalan beyaz renklidir.	Kozası büyük, boğumlu, yeşile kaçan beyaz renklidir.	Kozası küçük, sarı, boğumludur.
Koza-kabuk oranı(%):	15.03	14.49	12.82
Tek koza ağırlığı (g):	2.20	2.03	1.95
Filament uzunluğu (m):	2.57	2.48	2.21
Filament kalınlığı (denier):	2.57	2.48	2.21
Larva süresi (gün):	27.50	28.50	35.50
Yumurta verimi:	441.0	583.5	440.5

Üç yerli ırka ait tırtıl ve kelebek resimleri Şekil 1.1.’ de verilmiştir. Alaca ırkına ait tırtılın vücut deseni ile diğerlerinden farklı olduğu görülmektedir.



Alaca tırtılı



Alaca kelebeği



Bursa Beyazı tırtılı



Bursa Beyazı kelebeği



Hatay Sarısı tırtılı



Hatay Sarısı kelebeği

Şekil 1. 1. Üç yerli ırka ait tırtıl ve kelebekler

1. 4. Dünyada İpekböceği Genetik Stokları

İpekböceği genetik stokları, dünyada bulunan coğrafik ırklar, soylar ve mutantlardan oluşmaktadır. Bunlar birçok morfolojik, gelişimsel, davranışsal ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Asya ve Avrupa'da 3000'den fazla ipekböceği genotipinin olduğu tespit edilmiştir. Farklı nitel ve nicel karakterler içeren 4 takım coğrafik ırk tanımlanmıştır. Bunlar; Çin, Japon, Avrupa ve Tropikal ırklardır. Bu ırkların karakteristik özellikleri şöyle sıralanabilir (19):

a) Tropikal ülkelerde yaşayan varyeteler: Bu varyeteler, ipek kalitesi yönünden fakirdirler (2). Kısa larval yaşam, kısa fiber ve düşük kokon ağırlığına sahiptirler (20).

b) Ilıman ülkelerde yaşayan varyeteler: Bu varyeteler, ipek kalitesi yönünden en iyi olanlardır. Ancak bunlar yüksek ipek kalitesine tropik koşullar altında yüksek sıcaklık, nem hastalıklar gibi olumsuzluklardan dolayı erişemezler (2). Uzun larval yaşam, uzun fiber ve yüksek kokon ağırlığına sahiptirler (20).

1. 5. İpekböceğinin Hayat Döngüsü

Bütün tipik lepidoptera böceklerinde olduğu gibi ipekböceği de yumurta (kuluçka), larva, pupa (krizalit) ve ergin (kelebek) dönem olmak üzere dört farklı hayat dönemi geçirmektedir (21).

1. 5. 1. Yumurta (Kuluçka) Dönemi (9-14 gün)

Yumurtalardan aynı anda çıkış elde edilebilmesi için yetiştirilecek ortamdaki çevre Őartlarının ayarlanması önemlidir. Kuluçka dönemi boyunca ısı (25°C-26°C) ve nem (% 80-90) sabit tutulmalıdır. Kuluçka döneminin sonlarına doğru yumurtalar koyu renkli kutulara alınırlar ve renk maddelerinin oluşumundan itibaren de 16 saatlik ışık uygulamasına başlanır (21).

İpekböceği ırklarını yıl başına verdikleri nesil sayısına göre ayırmak gerekirse;

a) Yıl Başına Tek Nesil Veren Irklar (Univoltin ırklar): Ilıman ölkelerde yaşayan bu ırklar sadece ilkbaharda bir nesil oluştururlar ve oluşturdukları yumurtalar diğer bahara kadar bekler (21).

b) Yıl Başına İki Nesil Veren Irklar (Bivoltin ırklar): Ilıman ölkelerde yaşayan bu ırkların yumurtaları ikinci nesil için beklemeye girmezler ve 11-12 günlük kuluçka devresi geçirerek yumurtadan çıkarlar. İkinci neslin oluşturduğu yumurtalar ise kışı bekleme dönemine girerek geçirirler ve ilkbaharda tekrar canlanırlar (21).

c) Yıl Başına Çok Nesil Veren Irklar (Multivoltin ırklar): Tropikal bölgelerde (Hindistan, Tayland vb.) yaşayan bu ırklar en kısa hayat dönemine sahiptirler. Yetiştirildiği bölgelerin sıcak olması nedeniyle yılda 7-8 nesil verebilirler (21).

1. 5. 2. Larva Dönemi (20-28 gün)

Yumurtadan çıkan larvalar iki saat içerisinde yem yeme iştahı kazandıkları için hemen besleme yataklarına alınırlar. Larvalar, iklim ve hava şartlarına bağlı olarak süresi değişen dört deri değiştirme safhası geçirdiklerinden larva safhası 5 hayat dönemine ayrılabilir (21). Bu hayat dönemlerinin her biri ise yem yeme (yaş) safhası ve deri değiştirme (uyku) safhası olarak ikiye ayrılır.

Larvalar yem yeme safhasında çok iştahlı oldukları için devamlı taze dut yaprağı ile beslenirler. Bu dönemdeki larvaların başları vücuda oranla küçüktür, derinin parlaklığı ve gerginliği ise fazladır (21). Deri değiştirme safhasında ise larvalar, yemeyi keserek durgunlaşırlar. Dinlenmek için yer ararlar ve hareketsiz bir şekilde dururlar. Deri değiştiren larvaların başları vücuda oranla büyüktür ve derileri buruşuktur (21).

1. 5. 3. Pupa (Krizalit) Dönemi (10-15 gün)

4 uyku ve 5 yaş devresi geçiren ipekböcekleri yem yemeyi keserler ve başlarını yukarı kaldırarak tutunacak bir yer arar görünümünü verirler. Bu yüzden böcekler tutunarak koza örmelerini sağlayacak askılara alınırlar. Askıya alınan ipekböcekleri koza örmeye başlarlar. Bu işlem multivoltin ırklarda 2-3 gün, uni ve bivoltin ırklarda ise 3-4 gün sürer. Koza ömrünün 4. veya 5. gününde krizalit haline dönüşen ipekböceği, 10-15 gün süren krizalit devresinde metamorfoza uğrayarak kelebek haline dönüşür. Alkali yapısındaki salya yardımıyla kozayı delerek dışarı çıkar (21).

1. 5. 4. Ergin (Kelebek) Dönem (3-10 gün)

Kelebek devresi mevsime ve ırka bağılı olarak 3-10 gün arasında değişir. Kozadan çıkan kelebekler çiftleşmeye ve yumurtlamaya hazırdırlar. Bu dönemde yem yemezler ve uçamazlar. Dişiler erkeklere göre daha büyüktür ve daha yavaş hareket ederler. Multivoltin ırklar ortalama 400, uni ve bivoltin ırklar ise 500-600 adet yumurta yumurtlayabilirler (21).

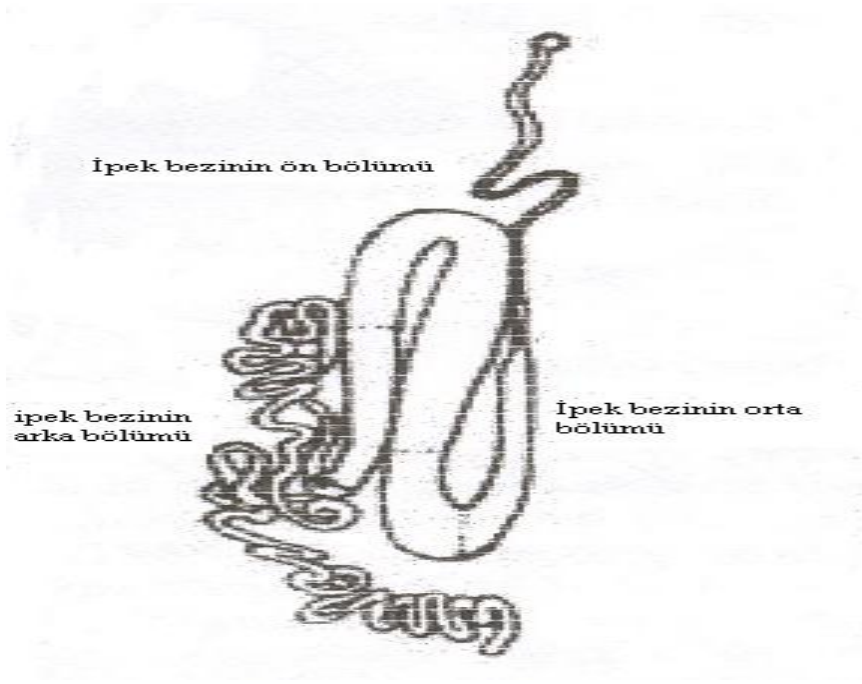
1. 6. İpekböceğinin Genetik Yapısı

Bu türün haploit kromozom sayısı 28'dir. Mevcut genetik yapısında 200'den çok lokus üzerinde 400'den fazla mutasyon belirlenmiştir (3). İpekböceklerinde dişiler heterogametik (ZW) erkekler ise homogametiktir (ZZ). Mevcut kromozomları holosentriktir. *Bombyx mori*'nin haploid genom ölçüsü memeli genomunun 1/6'sıdır (19).

1. 7. İpek Bezlerinin Yapısı

Lepidoptera takımında ipek bezleri, çoğunlukla labium salgı bezlerinin (8) gelişmesi ile meydana gelmiştir. İpek bezleri, uzun ve birçok kıvrım yapan tüplerden oluşmuş çift yapılı bezlerdir (Şekil 1. 2). Labial bezlerin salgıladıkları salgılardan biri, protein yapısında hava ile temasa geçince sertleşen ipektir. İpek önce bez tüplerinin ince arka ucundaki hücreler tarafından oluşturulur. Sonra bu salgı ilerde bulunan ince bir ipek kanalı ile genel çıkış deliğine uzanan torba şeklindeki depo içerisine salgılanır.

En son işlem olarak da oluşturulan ipek proteini, böceğin ağzından dışarıya pompalanır(11) .



Şekil 1. 2. İpekböceğinin ipek bez yapısı (10)

1. 8. İpekböceğinin Kokon İpeğinde Bulunan Proteinler

İpekböceğinin ipek bezleri tarafından üretilen katı bir fiber yapıda olan ipekte fibroinler, serisinler, seroinler ve proteinaz inhibitörleri olmak üzere dört grup protein tanımlanmıştır (4, 8).

1. 8. 1. Fibroinler

İpek bezlerinin arka bölümünden üretilirler (4, 8). β -pileli tabakalı yapıda olan fibroin proteinleri (22, 23) ipeğin temel yapısını oluştururarak (7) kokon ipek fiberinde erimeyen (8) ipek çekirdeğini meydana getirirler (7). İpeğin yapısında üç farklı fibroin proteini bulunmaktadır.

a) Ağır zincir fibroin proteini: 5263 aminoasit uzunluğunda ve 391367 Da moleküler ağırlığında büyük bir proteindir (22). İpek kütlesinin %85'ini oluşturur. Disülfid bağları ile hafif zincir fibroin proteini ve iki farklı büyüklükte olan p25 glikoproteini ile birleşir (8).

b) Hafif zincir fibroin proteini: 25 kDa'luk bir polipeptid olup disülfid bağı ile ağır zincir fibroine bağlanır (8).

c) p25 glikoproteinleri: 27 ve 30 kDa'luk iki farklı büyüklükte olan bu protein hafif zincir fibroin ve ağır zincir fibroin proteinleri ile hidrofobik bir ilişkidedir (24, 8). Fibroheksamerin olarak da bilinmektedir (25). Bu protein 6 tane fibroin dimerini elementer ipek oluşumu esnasında birleştirir (4).

1. 8 . 2. Serisinler

İpek bezlerinin orta bölümünden salgılanırlar (8). Yapısında yüksek oranda hidrofilik aminoasitlerin olmasından dolayı (Ser, Gly, Asp ve Thr) fibroin proteinini başarılı yapışkan tabakalar ile sarar (25). Böylelikle kokon kohezyonunu gerçekleştirirler. Yapılan çalışmalar farklı aminoasit içeriğinde ve büyüklükte çok sayıda serisin polipeptidinin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalardan birinde 20-220 kDa'a kadar değişebilen moleküler ağırlığa sahip 15'den fazla serisin polipeptidin orta ipek bezinin ön bölgesinden salgılandığı tespit edilmiştir (26). Fibroin gibi serisin de makromoleküler bir proteindir. Sıcak-suda eriyebilen bu proteinin üretiminde görevli beş farklı serisin geni tanımlanmıştır (7). Bunlardan *Ser-1* m-RNA'sının farklı olgunlaştırılması ile yani farklı exonların seçilmesi ile (27) ve beş farklı serisin proteini oluşur. Bunların her biri kokonda farklı fonksiyona sahiptir.

1. 8. 3. Seroinler

Bu proteinler ipek bezlerinin hem orta bölümünden hem de arka bölümünden salgılanır. Seroinler, yüksek miktarda prolin içerdiklerinden proline zengin antimikrobiyal peptidler olarak da adlandırılırlar. Bu özellik, kokona bakteri ve kurtlara karşı direnç sağlamaktadır (8).

Bombyx mori'de, iki farklı büyüklükte seroin proteini tanımlanmıştır.

a) Seroin-1 proteini: 9912.6 Da moleküler ağırlığında ve 90 aminoasit uzunluğundadır (4).

b) Seroin-2 proteini: 10312.6 Da moleküler ağırlığında ve 94 aminoasit uzunluğundadır (4).

1. 8. 4. Proteinaz İnhibitörleri

Bu proteinler ipek bezlerinin orta bölümünden salgılanır. Kokon içindeki proteinaz inhibitörlerinin kokon oluşumu ve korunmasında görevli olduğu bilinmektedir. Bunlar kokonu mikrobiyal parçalanmadan, pupayı ise potansiyel avcılarından korur (4).

Bombyx mori'de, iki farklı büyüklükte proteinaz inhibitör proteini tanımlanmıştır.

a) Kunitz tip inhibitör: 6000.75 Da moleküler ağırlığında ve 55 aminoasit uzunluğundadır (4).

b) Kazal tip inhibitör: 4767.56 Da moleküler ağırlığında ve 44 aminoasit uzunluğundadır (4).

1. 9. Serisin ve Fibroin Proteinlerinin Endüstride Kullanım Alanları

Biyolojik özelliklerinden dolayı serisin, endüstride sıkça kullanılmaktadır. (25). Bu protein oksidasyona karşı dirençli, antibakteriyel, ultraviyole dirençli, nemi kolaylıkla absorbe edip serbest bırakabilen bir yapıdadır (5). Örneğin antioksidant ve tirozinaz-inhibitör etkisi ile karyoprotektatif özelliği onu kozmetik ve besin endüstrisinde değerli yapmıştır (25).

Yüksek moleküler ağırlığa sahip serisin peptidleri (≥ 20 kDa) medikal biyomateryaller, parçalanmış biyomateryaller, polimer bileşenleri, fonksiyonel biyomembranlar, fonksiyonel fiberler ve fabrika ürünlerinde kullanılır.

Düşük moleküler ağırlığa sahip serisin peptidleri (≤ 20 kDa) ise saç ve bakım ürünlerini içeren kozmetikte ve sağlık ürünlerinde kullanılır (5).

1. 9. 1. Bio-parçalanmış Polimerler

Bio-parçalanmış polimerler, serisinin diğer sakızlarla karıştırılmasından elde edilir. Örnek olarak polimer filmleri, köpükler ve reçineler serisin içerir (5).

1 . 9. 2. Membran Materyalleri

Membran temelli ayırmalar, saf su üretimi ve endüstriyel biyo-işlemlerde geniş olarak kullanılmaktadır. Bu membran materyallerinin yapımında serisin kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar serisin içeren membranların alkol-su karışımları için su yönünden seçici olduğunu göstermiştir (5).

1. 9. 3. Fonksiyonel Biyomateryaller

Serisin proteini, fonksiyonelliği artırma amacıyla çeşitli materyallerin yüzeyini kaplamada yani korunmasında kullanılır. Örnek olarak sanat pigmentlerinin hazırlanmasında kullanılır. Ayrıca serisin kaplı materyaller mükemmel hava geçirgendir. Örneğin serisin, fibroin ve PVA'dan (polivinil alkol) yapılmış hidrojel, nemi absorbe ve desorbe edebilme özelliğine sahiptir (5).

1. 9. 4. Medikal Biyomateryaller

Serisin ve fibroin içerikli membran, hayvan hücrelerinin proliferasyonunda etkili bir substrattır. Serisin ve fibroinden yapılmış filmler üzerinde hayvan hücrelerinin büyüdüğü görülmüştür. Ayrıca serisin ve fibroinden yapılmış filmler mükemmel bir oksijen geçirgendir ve fonksiyonel özellikleri ile insan korneasına benzer.

Bu yüzden serisin ve fibroinden yapılmış karışık filmlerin, suni kornealar oluşturmada kullanılabileceği umut ediliyor. Aynı zamanda serisin kontak lens üretiminde, yüksek elastik suni kan damarları ve diğer protezlerde kullanılabilir (5).

Serisin fibroinle birlikte, sülfonasyon tedavisine maruz bırakılarak anti-koagulant özellik kazanır. Bu özellikteki proteinin ise HIV virusunun ümmün hücrelere bağlanmasını engellediği görülmüştür. Bu amaçla antikoagulant özelliği ile ipek proteininin, diş macunu ve traş kremleri gibi ürünlerde kullanılarak HIV'in yayılmasını önleyebileceği görüşü gelişmiştir (5).

1. 9. 5. Fonksiyonel Fiberler, Maddeler

Bazı sentetik fiberlerin fonksiyonel özellikleri doğal makromoleküllerle (kitin, fibroin ve serisin) kaplanarak iyileştirilebilir.

Örneğin; lastik, kauçuk eldiven, silgi ve çeşitli spor malzemelerin kulpunda hidrolize edilmiş serisin kullanılır. Ayrıca serisin kaplı giysiler deride isilik yapmaz ve emicidir (5).

1. 10. İpekböceği Yetiştiriciliği

1. 10. 1. Anadolu'da İpekböcekçiliği ve Bursa'nın Önemi

M.S. 552 yılında Bizanslılar döneminde Anadolu'ya getirilen ipekböceği tohumları önce Bursa'da değerlendirilmiştir. 16. yüzyıl başında ipekli dokumacılık büyük gelişme göstermiş ve dünya çapında bir üne kavuşmuştur. Anadolu ikliminin dut ağacı ve ipekböceği yetiştirmeye elverişli olması, ipekli dokumacılığın Avrupa'da hızla gelişmesi ile 1800'lü yılların başlarında kaliteli kozalardan çekilmiş ham ipekler rakipsiz duruma gelmiştir (28).

1845 yılında Bursa'da buharla çalışan ve 60 mancınığı bulunan ilk Harir Fabrikası kurulmuştur. 1888 yılında 'Bursa Harir Darüt Talimi' isimli ilk ipekböcekçiliği okulu kurulmuştur. 1908 yılında gerçekleşen 18 bin ton yaş koza üretimi tarihin en yüksek seviyesini oluşturmuştur. I. Dünya ve Kurtuluş Savaşları nedeniyle Avrupa pazarlarının kaybolması, işgaller, ekonomik ve sosyal düzensizlikler yaş koza üretimini düşürmüştür.

1930 yılında İpekböcekçiliği Enstitüsü kurulmuştur. Gerek Türkiye gerekse Bursa ili koza üreticileri için en önemli girişim 1940 yılında Koza Tarım Satış Kooperatifleri Birliği'nin kurulması olmuştur. Ancak piyasalarda fiyat istikrarının sağlanamayarak fiyatların giderek düşmesi, ipekböcekçiliğini olumsuz yönde etkilemiştir. Diğer taraftan, II. Dünya Savaşının sebep olduğu birtakım sıkıntılar yüzünden ipekböcekçiliği yeniden gerileme sürecine girmiştir.

1971'de Bursa'da İpekböcekçiliği Araştırma Enstitüsü kurulmuştur. 1972'de polihibrit tohum üretimine geçilmesi ile üreticinin yeniden bu ürüne yönelmesi sağlanmıştır. 1980'den itibaren üretilen kozaların tamamından ham ipek çekilerek ipek halı üretimi başlamıştır.

1989'dan sonra Çin'in ucuz koza üretimine gitmesi ve alternatif ürünlerin rağbet görmesi gibi nedenlerle 1990'lı yıllardan itibaren ülkemizde ipekböcekçiliğinde gerileme başlamıştır (28).

1. 10. 2. Sektördeki Kuruluşlar

- **Dut fidanı üreticileri:** Genellikle Bursa ve Bilecik illerinde toplanan bu aile işletmelerinin üretim kapasiteleri piyasa ve işletme özelliklerine göre değişmektedir (17).

- **İpekböceği tohumu üreten kuruluş:** Bursa Koza Tarım Satış Kooperatifleri Birliği yurt içi talebe göre tohum üretim miktarını ayarlamaktadır (17).

- **Mancınıkla ipek çeken işletmeler:** Genellikle Bursa, Bilecik, Hatay, Diyarbakır, Ödemiş, Antalya ve İzmir'de bulunan küçük aile işletmeleri şeklindedirler (17).

1. 10. 3. Türkiye’de İpekböceği Tohumu Üretimi

Tohum ırklarının ıslah edilmesi kaliteli ipek üretimi için oldukça önemlidir. Bu amaçla 1972 yılında ülkemizde de iki saf ırkın (Japon ve Çin) melezlenmesi ile elde edilen polihibrit ipekböceği tohumu üretimi başlamıştır. Böylelikle üreticiye daha kaliteli ve ucuz tohum elde etme imkanı sağlanmıştır. Türkiye, dünyada ipekböceği tohumu üreten sayılı ülkeler arasındadır ve tohum kalitesi bakımından ilk üçte yer almaktadır. Tohum talebinin tamamı kendi üretimimiz ile karşılanmakta hatta Mısır, Yunanistan, İran ve İtalya gibi ülkelere tohum ihracatı bile yapılmaktadır (28).

Çizelge 1. 2. Türkiye ipekböceği tohum üretimi, ihracatı ve ithalatı (kutu)

<i>Yıllar</i>	<i>Üretim</i>	<i>İthalat</i>	<i>İhracat</i>
1998	7.601	--	600
1999	6.626	--	570
2000	4.481	--	--
2001	3.992	--	--
2002	--	200	50
2003	--	5.000	--
2004	6.070	--	--
2005	6.583	--	--
2006	8.715	--	600
2007	6.783	--	--
2008	6.500	--	--

1. 10. 4. Türkiye’de Yaş Koza Üretimi

Türkiye’de yaş koza üretimi, çeşitli siyasi ve ekonomik sebeplerden dolayı 1990 yılından 2001 yılına kadar azalmıştır. Bu sebepler şöyle sıralanabilir:

- Dünya yaş koza üretiminde %70’lik bir paya sahip olan Çin’in 1989 yılından itibaren koza fiyatlarını dumping uygulayarak düşürmesi
- 1990’daki Körfez savaşının olumsuz etkileri
- İran-İrak savaşının bitmesiyle İran’ın piyasalara dönerek ipek halı ihracatını tıkaması
- Uzakdoğu’da başlayıp bütün dünya ülkelerini etkileyen Asya krizinin etkileri
- Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaşanan terör olayları
- Marmara bölgesinde sanayinin gelişmesi, zirai mücadele ilaçlarının aşırı ve bilinçsiz kullanılması.

1991 yılından itibaren yaş koza üretimi devlet desteğindedir. 2008 yılı itibariyle ülkemizde toplam 124,64 ton yaş koza üretilmiştir. Koza üretiminin en yoğun olduğu bölge Marmara bölgesidir. Çünkü 2008 yılında yaş koza üretiminin %28’i bu bölgede gerçekleşmiştir (28). Bursa ili %3,5’luk üretim payı ile Diyarbakır, Antalya, Bilecik, Ankara, Sakarya, Eskişehir ve Bolu illerinden sonra 8. sırada yer almıştır (Çizelge 1. 3).

Çizelge 1. 3. Bursa'da ipekböcekçiliği

<i>Yıllar</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>
<i>İpekböceği besleyen ilçe sayısı (adet)</i>	5	5	5	6	5	4
<i>İpekböceği besleyen köy sayısı (adet)</i>	26	22	24	29	24	18
<i>İpekböceği besleyen aile sayısı (adet)</i>	120	133	99	102	98	73
<i>Dağıtılan tohum miktarı (kutu)</i>	230	231	210,5	238,5	281	200
<i>Elde edilen yaş koza (ton)</i>	6,99	5,75	5,86	5,25	4,37	4,39

Kozabirlik tarafından tohum dağıtılan tüm köyler takip edilmekte ve yaş koza ürünü üreticiden doğrudan satın alınmaktadır. Kozabirlik aldığı kozaları kuruttuktan sonra ihraç etmektedir. İhracat genelde Japonya, Hong Kong, Güney Kore, Endonezya, Paraguay gibi Uzakdoğu ülkelerine ve İtalya'ya yapılmaktadır. Son yıllarda kuru koza ithalatı neredeyse hiç yapılmamaktadır (Çizelge 1. 4). Bunun nedeni, ham ipek ithal fiyatlarının neredeyse koza fiyatına düşmesi ve ham ipek üretimi için yeterli tesislerin bulunmamasıdır (28).

Çizelge 1. 4. Türkiye’de kuru koza ihracatı ve ithalatı

<i>Yıllar</i>	<i>İhraç miktarı</i>	<i>İhraç değeri</i>	<i>İthal miktarı</i>	<i>İthal değeri</i>
	<i>(ton)</i>	<i>(\$)</i>	<i>(ton)</i>	<i>(\$)</i>
1998	1,02	6.438	21,42	194.236
1999	18	90.000	--	--
2000	54	263.910	--	--
2001	--	--	0,21	2.345
2002	3,05	4.170	--	--
2003	82,80	372.600	--	--
2004	61,20	225.360	--	--
2005	39,60	233.640	--	--
2006	33,49	202.000	--	--
2007	--	--	--	--

1. 10. 5. Türkiye’de Ham İpek Üretimi ve Endüstrisi

Üretilen ham ipeğin tamamına yakın bir bölümü ipek halı üretiminde kullanılmaktadır. Ancak ham ipek üretimi, ipek halı sektörünün ihtiyacını karşılayamamaktadır. Bu yüzden son yıllarda Çin, Brezilya, Özbekistan ve Kırgızistan gibi ülkelerden ham ipek ithal edilmektedir (Çizelge 1. 5). Ülkemizde üretilen ipek halının %100’e yakını ise Almanya, Fransa başta olmak üzere Avrupa ülkelerine ve Amerika’ya ihraç edilmektedir (28).

Çizelge 1. 5. Türkiye’de ham ipek üretimi ve ipek halı ihracatı

<i>Yıllar</i>	<i>Ham ipek üretimi</i>	<i>İpek halı ihracatı</i>	<i>İpek halı ihracatı</i>
	<i>(ton)</i>	<i>(m2)</i>	<i>(1000 \$)</i>
2003	28	26.201	21.290,31
2004	24	24.517	26.079,26
2005	27	28.284	34.239,81
2006	22	18.412	31.217,90

1. 10. 6. Yaş Koza ve Ham İpek Üretiminde Dünya Piyasası

Dünyada başta Uzakdoğu ülkeleri olmak üzere 15 ülkede yaş koza üretimi yapılmaktadır. Yıllık üretimi 1000 tonun üzerinde olan ülke sayısı ise 5'i geçmemektedir. Çin, Hindistan ve Brezilya üretim miktarına göre ilk sıralarda yer almaktadır. 2005 yılı verilerine göre bu ülkelerin toplam yaş koza üretimi dünya üretiminin yaklaşık % 99'unu karşılamıştır (Çizelge 1. 6). Ham ipek tüm dünya ülkelerinde tüketilmesine karşılık sadece belli sayıda ülkede üretilmektedir. Bazı ülkeler ise ham ipek üretimi için modern filatür tesisleri olmayışı nedeniyle ürettikleri yaş kozanın önemli bir kısmını kuru olarak ihraç etmektedirler (28).

Çizelge 1. 6. 2005 yılı dünya yaş koza ve ham ipek üretimi (ton)

<i>Ülkeler</i>	<i>Yaş Koza Üretimi</i>	<i>Ham İpek</i>
	<i>(ton)</i>	<i>(ton)</i>
Çin	584.220	87.800
Hindistan	126.261	15.445
Brezilya	7.146	1.285
İran	2.543	395
Japonya	626	150
Türkiye	156,9	27
Bulgaristan	42	6
Diğerleri	89,9	8,3
Toplam	721.058,5	105.098,3

1. 10. 7. Yaşanan Sorunlar ve Çözüm Önerileri

- Değişen teknoloji ve şartları göz önüne alarak konu ile ilgili güncel bir yasanın hazırlanması önemli olacaktır.
- Masrafları en aza indirmek ve daha yüksek çıkış oranı sağlamak için ipekböcekçiliği yapılan köylerde toplu inficar evlerinin açılmasında büyük yarar vardır.
- Koza üretiminde en büyük paya sahip Marmara Bölgesi'nde gözlenen çevre kirliliği ve zirai mücadele ilaçlarının aşırı kullanımı ipekböcekçiliğine zarar vermektedir. İpekböceği yetiştiriciliğinin sanayinin az geliştiği, çevre kirliliğinin olmadığı bölgelerde yaygınlaştırılması faydalı olacaktır.
- Koza üretiminde çok üretici yerine az fakat eğitimli üretici ile dünya standartlarında ürün elde etmek için modern tarım teknolojisi ve entegre tesisler desteklenmelidir.
- Japonya ve Çin'de olduğu gibi ipek ithalatının ihtiyaç oranında resmi bir kuruluş tarafından yapılarak iç üretime zarar vermeyecek bir fiyatla ihtiyaç sahiplerine aktarılması gerekmektedir.
- Yaş koza üretiminin artırılması için en belirleyici faktör olan fiyatlar, makul ve istikrarlı bir şekilde desteklenerek Çin'in ve Türk Cumhuriyetleri'nin yıkıcı rekabetinden kurtarılmalıdır .
- Üretilen ham ipeğin %90'ı halı imalatında kullanılmakta ve üretilen halının %100'e yakını ihraç edilmektedir. Tek bir ürüne bağlı kalınmaması ve ürün çeşitliliğine önem verilmesi ipekböcekçiliğimizin geliştirilmesinde olumlu yönde etki edecektir (28).

1. 11. Dünyada İpek Kalitesini Artırma Amacıyla Kullanılan İyileştirme Programları

Geçen otuz yıl içinde, ipekböceği yetiştirme programlarında genetik prensipler uygulanarak ipek kalitesinin artışı sağlanmıştır (3). Bu prensiplerden olan DNA parmakizi yönteminde genetik uzaklık ya da farklılıklar moleküler belirleyiciler yardımıyla belirlenerek genotiplerin pedigri analizi, morfolojisi ve coğrafyası hakkında bilgi sağlanmaktadır (2).

Moleküler belirleyicilerin gelişimi ipekböceğinde önemlidir. Çünkü bunların moleküler nesil haritalama, yetiştirme programları, ırkların parmakizi tayini ve belirleyici yardımcı seleksiyonda kullanımı ile ipekböceği varyetelerinde lepidoptera özel genleri tanımlanmıştır. Ekonomik değere sahip özelliğin (örneğin ipek kalitesi) DNA parmakizi yöntemiyle sıkı ilişkilere sahip olduğu bulunması durumunda belirleyici yardımcı seleksiyon yöntemi kullanılarak nesiller iyileştirilmektedir (2). Son zamanlarda ipekböceği ırklarını iyileştirme için kullanılan bu klasik yetiştirme stratejileri sayesinde yüksek başarı sağlanmıştır (3). Örneğin, Japonya'da ipeğin özelliklerinde yapılan iyileştirme çabaları başarı göstermiş ve ipek üretiminde yüksek kaliteye ulaşılmıştır (3).

1. 12. DNA Analizine Dayalı Moleküler Teknikler

Son yıllarda moleküler belirleyici gelişimi ve buna bağlı olarak standart ırklar için yapılan moleküler haritalar alanında ilerleme sağlanmıştır. Günümüzde belirleyici yardımcı moleküler teknikler, çeşitli genomlarda yüksek yoğunlukta haritaların geliştirilmesinde, ilgili genlerin harita temelli klonlanmasında, ekonomik karakterler için nitel özellik lokusunun tanımlanmasında (QTL), moleküler yardımcı seleksiyon (MAS) uygulamasında ve genetik farklılığı göstermede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu şekildeki bir yaklaşım ipekböceği genomunun analizi için temel oluşturmuş ve genomların karşılaştırılmasında önemli bir alet haline gelmiştir (19).

Son yıllarda ise bu belirleyiciler, özellikle ıslah çalışmaları için önemli olan, doğrudan üretim özelliklerini etkileyen ve ölçülebilir özelliklerle ilgili olan genler (Kantitatif Özellik Lokusları=QTL) üzerinde daha sık kullanılmaktadır. Bu lokuslarda fenotipler kantitatif olarak belirlenebilir. Birçok genin işlevsel olarak yer aldığı bu tip kalıtıma genellikle poligenik kalıtım denmektedir ve bu tip özelliklerin analizi için bir populasyonda çok sayıda oğul dölün çalışılması gerekmektedir (29).

DNA analizi ile ilgili teknikler (30-32) Hibridizasyon (örneğin; Enzimlerle Kesilen DNA Parçacıklarının Polimorfizmi Tekniği= RFLP) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na (PCR) (33-35) dayanmaktadır. AFLP (Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) (36-38), SSR (Basit Zincir Tekrarları) (39-47), SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) (48-51) PCR'a dayalı tekniklerdir.

1. 12. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Teknikler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, hedef olan lokusun in vitro koşullarda yapay oligonükleotidler (primer) (33-35) ile sınırlandırılarak çoğaltılması esasına dayanır. Belli bir döngü sayısı sonunda seçilmiş DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katı kopyalanmaktadır. PCR'ın bu özelliği onun genetik testler, adli vakalar ve moleküler paleontoloji gibi pek çok alanda kullanılmasını sağlamaktadır (29). PCR reaksiyonuna katılan bileşenler şunlardır:

1. Kalıp DNA: Genomik DNA, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve her hangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir (31).

2. Polimerazlar: Kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak uzun polinükleotid zincirin sentezini katalizler.

3. Primerler: Kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan 10-25 nükleotid uzunluğunda primerlere gereksinim vardır.

4. dNTP: Deoksiribo nükleozid fosfatlar primerden itibaren zincirin uzaması için gerekmektedir.

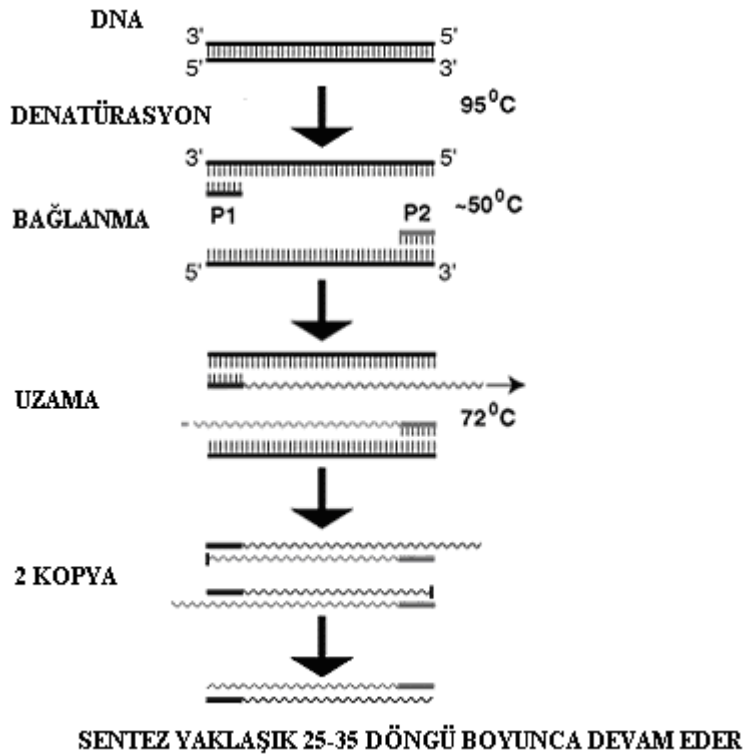
5. Tamponlar ve MgCl₂: PCR'da kullanılan tamponlar çoğunlukla satın alınan enzimlerle birlikte 10X konsantrasyonunda sağlanabilmektedir. PCR karışımında enzim aktivitesini artırmak amacıyla Mg⁺² kullanılmaktadır.

PCR Reaksiyonu 3 aşamada gerçekleşmektedir:

1. Ayrılma (Denatürasyon): Çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (92-96°C).

2. Bağlanma (Annealing): Birbirinden ayrılmış DNA zincirlerinde bulunan uygun bölgelere primerlerin bağlanması (35-65°C).

3. Uzama (Elongation): DNA polimeraz enziminin aktivitesi ile primerden itibaren sentezin gerçekleşmesi (72°C) (10).



Şekil 1. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonun Şematize Şekli

1. 12. 1. 1. RAPD (Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA) Tekniği

Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemi, nükleotid sırası rasgele seçilen kısa zincirli oligonükleotid primerler kullanılarak polimorfik DNA parçalarının PCR reaksiyonları ile çoğaltılması esasına dayanır (52, 53, 54). Primer bağlanma noktalarındaki mutasyon ve dizi değişiklerine bağlı olarak bantların varlığı ve yokluğu polimorfizm olarak adlandırılır (52, 55). Günümüzde RAPD tekniği, genomların analizinde (56), türler ve populasyonlar arasındaki varyasyonu belirlemede sıkça kullanılmaktadır (57-61).

1. 12. 1. 1. 1. RAPD Metodunun Avantaj ve Dezavantajları

RAPD çalışmalarında kullanılacak primerlerinin seçiminde DNA dizi bilgisine ihtiyaç olmaması, tekniğin basit, hızlı ve otomasyonunun kolay olması avantajları arasındadır (62). Tekrarlanabilirliğinin zor olması, PCR koşullarının tamamen sabit tutulmasının gerekliliği (63), belirlenen polimorfizmlerin dominant olmasından dolayı heterozigotların ayırt edilememesi dezavantajları arasındadır.

1. 13. Protein Analizine Dayalı Moleküler Teknikler

Araştırmacılar türlerin genetik yapılarını çalışırken önemli oranda genetik farklılıklar taşıdıklarını bulmuşlardır. Bu farklılıklar DNA dizileri seviyesinde yapılan metodlarla ve proteinlerle yapılan elektroforetik çalışmalarla belirlenmiştir.

1. 13. 1. Elektroforez

Elektroforezde durgun fazı (sabit faz); kağıt, asetat, selüloz, poliakrilamid, agaroz gibi dolgu maddeleri oluşturur. Sabit ortamın görevi moleküllerin porlardan kolaylıkla geçmesini sağlamaktır. Hareketli faz ise elektrik akımıdır. Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı bir elektriksel alan yaratılarak protein moleküllerinin bu elektriksel alanda farklı hızlarla bir elektrottan diğerine hareket ederek molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılmasıdır. Seçilen pH değerine göre aynı özellikteki biyomoleküllerin iyonizasyonu benzer olacağından yürüme yalnızca bir kutba doğru oluşur. Yürümeyi yük/kütle oranı doğrudan etkiler. Küçük moleküller önde, büyükler ise geride olacak şekilde sıralama oluşur. Daha sonra boyama yaparak protein bantları görünür hale gelmektedir (64).

1. 13. 1. 1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

En yaygın kullanım alanı olan elektroforez tipidir. Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur. Örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Akrilamid/bisakrilamid oranı yükseldikçe jellerde ısınma fazlaşır, kırılabilirlik artar, daha kolay yıkanır.

Jel yüzdesi Ayrıştırma Kapasitesi (Dalton)

% 5:	60.000 - 212.000
% 10:	18.000 - 75.000
% 15 :	15.000 - 45.000

Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yanyana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak ağımsı bir yapı meydana getirir. Polimerleşme derecesi; sıcaklık, pH, amonyum per sülfat (APS) ve N,N,N',N'- tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar (64).

1.13.1.1.1. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

En yaygın olarak kullanılan protein elektroforez tekniğidir. Örnek hazırlama tamponuna anyonik bir deterjan olan SDS eklenir. İki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından her molekülün homojen bir şekilde (-) yükle kaplanmasını sağlar (64). Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması, konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi ve saf proteinin alt yapısının incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır (65).

1. 14. Kaynak Özetleri

- **İpekböceği ile ilgili yapılmış bazı moleküler çalışmalar:** Son yıllarda farklı ipekböceği ırklarının genetik analizinde gelişmiş moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu moleküler teknikler ile ırkların karakterizasyonu yapılarak ırk içi ve ırklar arası genetik varyasyon oranları belirlenmektedir. Bunlardan RAPD-PCR tekniği ile yapılmış çalışma fazladır. Örneğin bir çalışmada *Bombyx mori* ile ilişkili hücre hatları incelenirken (66) diğer bir çalışmada *Bombyx mori*'yi infekte eden farklı mikrosporodan türlerinden en virulent olanı tespit edilmiştir (67). Bir başka çalışmada ise RAPD bulgularını desteklemek için ISSR-PCR, SSR ve RFLP gibi diğer bazı tekniklerden faydalanılmıştır (68). *Bombyx mori*'de genetik varyasyonu belirlemede farklı tekniklerin kullanıldığı çalışma fazladır. Bunlardan birinde farklı ipekböceği ırklarında FISSR-PCR tekniği kullanılarak polimorfizm oranı incelenmiştir (69). Farklı ipekböceği ırklarında genetik farklılığının tespitinde minisatellit probu (70, 71) ve mikrosatellit lokuslarının kullanıldığı çalışmalar da vardır (72). Görüldüğü üzere genom analiz çalışmalarında RAPD tekniğinden (20, 73) başka farklı teknikler de tercih edilmektedir. Bunlardan biri olan RFLP tekniği ile farklı ırkların genom analizleri yapılmıştır (74). Bazı çalışmalarda ise ipekböceğine ait genetik haritalar oluşturulmuştur (9, 75). Hatta bazı araştırmacılar ipekböceğinde büyüme verimlilik parametreleri ile ilişkili moleküler belirleyicilerin tespitini yapmışlardır (76, 77). *Bombyx mori* ırklarının ılıman ve tropikal ırk olarak ayrımı önemlidir. Irkların ayrımında RAPD tekniğinden (78) başka teknikler de kullanılmıştır (79). Ayrıca ipekböceğinin kokonunda bulunan proteinlerin moleküler analizinin yapıldığı çalışmalar da vardır. Bu çalışmaların bazılarında SDS-PAGE yöntemi kullanılarak farklı serisin polipeptidleri tespit edilmiştir (80, 81). Hatta bir

çalışmada transgenik hibrid ipekböcekleri kullanılarak *Bombyx mori*'ye ait prolyl-hydroxylase α -alt üniteleri ve insan kollajenleri üretilmiştir (82).

- **İpekböceği ile ilgili yapılmış bazı morfolojik çalışmalar:** Literatürde *Bombyx mori* ve farklı ırklarının genetik analiz çalışmaları yanında kokondan elde edilen fiberlerinin, ipek bezi ve yumurtalarının morfolojik yapısı üzerine de çalışmalar vardır. *Bombyx mori* ipeğinin AFM (Atomik Güç Mikroskobu) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile incelenip diğer bazı türlerle kıyaslandığı çalışmalar vardır (23, 83). Bazı çalışmalarda *Bombyx mori*'ye ait farklı saf ve hibrid ırklarının kokon filamentleri SEM'de incelenerek oyukların varlığı tespit edilmiş (84, 85, 86, 87), bazı çalışmalarda ise kokon filamentlerinin yapısındaki bu oyukların oluşum mekanizması açıklanmış ve verimli kokon yapısı için karakteristik olduğu bildirilmiştir (88, 89). Bir çalışmada ise kokon fiberlerindeki serisin tabakası uzaklaştırıldıktan sonra tekrar incelenmiştir (90). *Bombyx mori*'ye ait ipek fiberlerinin termal özelliklerinin SEM'den başka farklı metodlarla incelendiği çalışmalar da vardır (91).

Literatürde ipekböceğinin ipek bezi ile ilgili yapılmış çalışmalardan bazılarında yine SEM (92, 93) kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar ise Hymenoptera türlerine ait larvaların ipek bezlerini polarize ışık mikroskobunda inceleyerek ipekböceği ile karşılaştırmıştır (94).

SEM'de *Bombyx mori*'ye ait yumurta örnekleri ile yapılmış çalışmalar da vardır. Örneğin bunlardan birinde yumurta yüzeyinde parmak şeklindeki mikrovillilerin varlığı tespit edilmiş (95), diğer bir çalışmada da parmak şeklindeki bu deliklerin toz partiküllerinin ve patojenlerin girişini kontrol ettiği bildirilmiştir (96).

1. 14. Çalışmanın Amacı

- Üç yerli ipekböceği ırkının genomunu RAPD-PCR metodu ile moleküler yönden analiz etmek
- Üç yerli ırkın kokonunda bulunan serisin proteinlerini SDS-PAGE yöntemi ile analiz etmek
- Üç yerli ipekböceği ırkına ait kokon örneklerini oluşturan ipek fiberlerinin yapısını ışık ve SEM’de incelemek
- Üç yerli ipekböceği ırkına ait serisin proteini uzaklaştırılmış kokon örneklerinin yapısını SEM’de incelemek
- Üç yerli ırka ait yumurtaların yapısını SEM’de incelemek
- Üç ırka ait ipek bezlerinin yapısını SEM’de incelemek.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2. 1. Örneklemeler

Bu çalışmada Türkiye’de yetiştirilmekte olan üç yerli ipekböceği ırkına ait bireyler, Bursa İpekböcekçiliği Araştırma Enstitüsü’nden yaş koza olarak temin edildi. Üç yerli ipekböceği ırklarına ait bireylerin toplam sayıları Çizelge 2.1.’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Çalışmada kullanılan ırklar ve toplam birey sayıları

İrkin Adı	Erkek Sayısı	Dişi Sayısı	Toplam
Alaca	15	5	20
Bursa Beyazı	15	5	20
Hatay Sarısı	13	7	20

2. 2. RAPD-PCR alışmaları

2. 2. 1. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan ırklara ait DNA'lar Fermentas Genomik DNA Saflaştırma Kit'i (Genomic DNA Purification KİT®) ile izole edildi. Bu izolasyon yönteminde öncelikle bireylerden alınan doku rneklei sıvı nitrojenle bir ependorf tüp içinde toz haline gelene kadar ezildi. Her bir bireye ait doku rneklei üzerine 200 µl TE tamponu ilave edildi. Sonra da lizis tamponu (Lysis Buffer: KHCO₃, NH₄Cl, 0.5 M EDTA; pH: 8.0) eklenerek 65 C'de 10 dakika bekletildi. Bekleme sresinden sonra dokuların üzerine kloroform eklenerek yavaşça karıştırıldı ve ardından rneklei 10000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edildi. stte oluşan temiz faz steril bir ependorf tüpüne aktarıldı ve çöktürme solusyonundan (precipitation solution) eklendikten sonra tüpler iki dakika oda sıcaklığında karıştırılarak bekletildi. Tekrar 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek oluşan üst faz döküldü. Alta ken kısım ise 1.2 M NaCl ile iyice zldkten sonra mevcut hacmin yaklaşık iki misli kadar saf alkol (%99) eklenerek 10 dakika -20 C'de bekletildi. Daha sonra dondurucudan alınan tüpler 10000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edildi ve dipte kalan DNA %70'lik alkolle iyice yıkandı. Tüpler kurduktan sonra üzerlerine 100 µl steril su eklendi ve -20 C'de saklandı (10).

2. 2. 2. Genomik DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Hesaplanması

Bu çalışmada kullanılacak genomik DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm'lik dalga boyunda ölçüldü. Bu yöntem, DNA içeren distile suyun emdiği ultraviyole radyasyon miktarının ölçülmesi ile gerçekleşmektedir. 260 nm'lik dalga boyunda okunan değer, mevcut örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun ölçülmesini sağlar. Çünkü DNA'daki pürin ve pirimidin bazları 260 nm'de ultraviyole ışığı absorblarlar (10). 1 optik yoğunluk (OD); çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA ve RNA için 40 µg/ml' ye karşılık gelmektedir.

İzole edilen ve spektrofotometrede ölçülen çift iplikli DNA miktarının hesaplanması aşağıdaki formülle olmuştur:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{Sulandırma Oranı} \times \text{Katsayı (50)}$$

Bu çalışmada da öncelikle mevcut örneklerin optik yoğunlukları kuvars küvet kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü. Ardından da DNA'lar 5 ng/µl olacak şekilde RAPD-PCR uygulamaları için seyreltildi. Aynı zamanda nükleik asit saflığının tayini için 260 nm ve 280 nm'deki OD'ler ölçülerek süspansiyonda fenol veya protein atıklarının varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Nükleik asit solusyonunda OD₂₆₀ / OD₂₈₀ oranının 1.8-2.0 arasında olması önemlidir. Protein veya fenol atıklarının bulunması bu oranı azalttığından DNA miktarının kesin olarak hesaplanması zorlaşmaktadır (97).

2. 2. 3. PCR Uygulamalarında Kullanılan Primerlerin Tayini

Bu çalışmada kullanılan primerlerin seçiminde (sentetik oligonükleotidler) şu özelliklere dikkat edildi: Guanozin ve Sitozin bazlarının toplamının, toplam baz sayısına oranının % 50 ile 80 arasında olması, birbirlerinin tamamlayıcısı olmaması. Primer seçiminde Operon Technology® den rasgele 40 adet primer seçildi. Çalışmada kullanılan primerlerin DNA dizileri ve dizideki G-C oranları Çizelge 2. 2 'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Primerlerin baz dizileri ve G-C sayısının toplam baz sayısına oranı

Primer	Primer Dizini (5'---3')	G- C (%)
1	CTGGGGACTT	60
2	CTGAGACGGA	60
3	AGCGTCCTCC	70
4	TGGGCGTCAA	60
5	GGGCGGTACT	70
6	AGCCTGAGCC	70
7	ACCACCCACC	70
8	ACAACGCCTC	60
9	GGCGGTTGTC	70
10	GGGACGTTGG	70
11	ACTGAACGCC	60
12	ACAACCTGGGG	60
13	GTCAGAGTCC	60
14	TCGGCGGTTC	70
15	GAGGTCCACA	60
16	GTCAGTGCGG	70
17	GTCCGGAGTG	70
18	GTGACCGAGT	60
19	ACGCAAGAGG	60
20	AGACGATGGG	60
21	GGGTCGCGGT	80
22	GGTCGATCTG	60
23	AGTCGCCCTT	60
24	GGGCCAATGT	60
25	GTGGAGTCAG	70
26	TGAGGGTCCC	70
27	AGCCGTGGAA	60
28	GTGTCGCGAG	70
29	CTCTGGAGAC	60
30	GGGAATTCGG	60
31	TGTCATCCCC	60
32	AAGCCTCGTC	60
33	GGAATTCGAGT	60
34	GGTGACGCAG	70
35	CCTTGACGCA	70
36	TCCCCCGCT	70
37	AAGCTTGATTGCC	50
38	AAGCTTCGACTGC	50
39	AAGCTTTGGTCAG	50
40	AAGCTTCTCAACG	50

2. 2. 4. Çalışılan Üç Yerli İpekböceği Irkında Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tekniğinin Optimizasyonu

En iyi sonuçların alındığı çalışmaların dikkate alınarak optimizasyonun yapıldığı bu çalışmada (10, 20, 31, 47, 54, 63, 98-100) kullanılan bileşenlerin (MBI Fermentas®) miktarları aşağıda sıralanmıştır:

1. 10X Reaksiyon Çözeltisi: Hazır ticari stoktan 2.5 µl kullanıldı.
2. Taq polimeraz Enzimi: 5 u/µl stok çözeltisinden 0.2 u/µl enzim kullanıldı.
3. Primer: 100 ng/µl yoğunluğunda sulandırılan stoklar 0.6 µM olacak şekilde kullanıldı.
4. MgCl₂ Çözeltisi: 25 mM olan hazır stoktan 3 mM kullanıldı.
5. dNTP: 10 mM olan hazır stoktan 1.25 mM olacak şekilde kullanıldı.

PCR uygulamalarında kullanılan karışımların hacimleri toplam 25 µl olacak şekilde 0.2 ml'lik ependorf tüplerinde bir bireye ait genomik DNA örneği ile birlikte PCR ısı düzenleme cihazına (thermocycler; Thermo Hybaid®) yerleştirildi.

2. 2. 4. 1. Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayısı

Bu çalışmada DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması için 94 °C, primerlerin uygun DNA bölgelerine bağlanabilmeleri için 34 °C, primer üzerinden zincirin uzaması için ise 72 °C'lik sıcaklıklar uygulandı. Bu üç aşamanın bir döngü olarak kabul edildiği çalışmada toplam 35 döngü uygulandı ve sentez işleminin tamamlanması için 72 °C'de 10 dakika bekletildi (94 °C' de 2 dakika başlangıç ayrılma).

Bir döngü: 94 °C = 30 saniye ; 34°C = 30 saniye ; 72 °C = 45 saniye

PCR işleminin ardından örnekler elektroforez tekniği için +4 °C'de bekletildi.

Çalışma boyunca RAPD-PCR tekniğinin her bir uygulaması 3 kez tekrarlandı.

2. 2. 4. 2. Elektroforez Tekniği

Elektrolit çözeltisi olarak kullanılan TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) (20). önce 10 misli konsantre olarak (64.8 g Tris, 33 gr Borik asit, 24 ml 0.5 M EDTA) hazırlandı ardından da bu stok çözelti distile su ile seyreltilerek kullanıldı. Her bir elektroforez uygulaması için kullanılan 150 ml'lik 10X TBE'nin 18 ml'lik kısmı agaroz jelin hazırlanması için geriye kalan kısmı da elektrolit çözelti için harcandı.

2. 2. 4. 2. 1. Agaroz Jelin Hazırlanması

% 1.7 yoğunluğunda kullanılan agaroz jelin (10) hazırlanması için gerekli olan agaroz (Sigma) miktarı erlende 1X yoğunluğundaki TBE çözeltisi içerisinde şeffaflaşana kadar kaynatıldı. Sonra da içine etidyum bromid eklenerek soğutuldu. Boya maddesi olarak katılan etidyum bromid çözeltisi 0.5 µg/ml olacak şekilde kullanıldı. Etidyum bromid mutajenik bir etkiye sahip olduğundan çalışma boyunca kullanılan jeller ve diğer atık maddeler atık torbasında toplanarak Türkiye Atom Enerji Kurumu'na gönderildi.

2. 2. 4. 2. 2. Agaroz Jelin Dökülmesi

Hazırlanan jel soğuduktan sonra (50°-60° C) tarakları takılmış olan jel tepsisine döküldü. Döküldükten sonra jelin üzerinde DNA bantlarının yürümesini önleyebilecek hava kabarcıkları yok edildi. Daha sonra DNA örneklerinin yükleneceği kuyucukların oluşması için katılaştıran jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Ardından jelin üst kısmı tamamen örtülünceye kadar 1X yoğunluğundaki TBE elektrolit çözeltisiyle dolduruldu.

2. 2. 4. 2. 3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi

Çoğalan DNA örnekleri, kuyucuklara yüklenmeden önce laboratuarda ficoll, bromfenol blue ve 0.5 M'lık EDTA'dan hazırlanmış olan yükleme boyası (Loading Buffer) ile boyandı. Her bir örneğe ait PCR ürününe eşit hacimde karıştırılan bromfenol blue boyası elektroforez sırasında DNA bantlarının yaklaşık konumunu göstermek için kullanıldı.

2. 2. 4. 2. 4. Örneklerin Yürütülmesi

Çalışmada örnekler en iyi sonucun alındığı 5 Volt/cm'de 2.5 saatlik sürede yürütüldü.

2. 2. 4. 3. RAPD Bantlarının Gözlenmesi ve Verilerin Kaydedilmesi

Etidyum bromidle boyanan DNA bantları, ultraviyole (UV) görüntüleme sehpası üzerinde (312 nm dalga boyunda yansıma gösterdiklerinden) gözlemlendi. Bu bantların uzunluklarını tespit etmek için 100 bp DNA Plus (MBI Fermentas ® SMO321) DNA ölçeği kullanıldı. Bazı primerlere ait jel görüntüleri Polaroid ® (DS-34) fotoğraf makinesi ile fotoğraflanırken bazı primerlere ait görüntüler de Jel Görüntüleme Cihazı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

2. 2. 4. 4. Verilerin İstatistiksel Analizi

Bu çalışmanın verileri, POPGENE (VERSION 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Yeh F.C., Yang R. and Boyle T., 1999) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi.

2. 2. 4. 4. 1. Genetik Varyasyonun Ölçülmesi

Yüksek yapılı organizmaların oluşturduğu populasyonlarda tüm lokuslardaki gen varyasyonunu ölçme zor olduğundan küçük oranlarda örneklenen genler ile tüm genetik çeşitlilik gösterilir (101). Bu çalışmada incelenen her üç yerli ırk için polimorfik lokusların yüzdesi, gen çeşitliliği (heterozigotluk), allellerin sayısı, shannon'un bilgi endeksi, ırk içi ve ırklar arası genetik farklılık, genetik kimlik ve genetik mesafe değerleri hesaplandı (polimorfik lokusların yüzdesi 0.99 alındı).

2. 3. Üç Yerli Irka Ait Serisin Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Analizi

2. 3. 1. Serisin Proteininin Elde Edilmesi

Kokonlardan serisin proteininin elde edilmesinde 2 farklı metod kullanıldı. I. metotta: 0.01 g Na₂CO₃ (90) ve 0.1 g toz hale getirilmiş beyaz sabun 100 ml distile suda manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen karışım haline gelene kadar karıştırıldı. Ardından üç irka ait kokon örnekleri (450 mg) küçük parçalara kesilerek bu karışıma ilave edildi. Bu karışımda 1 saat kaynatıldı. Bu süreçte serisin fibroinden ayrılır. Oluşan üst faz başka bir tüpe alındı (102). II. metotta: Her bir irka ait kokonlar küçük parçalara ayrılarak farklı santrifüj tüplerine alındı. Kaynatılmış distile suda 4 kez yıkandı. Ardından her birinin üzerine 3 ml distile su ilave edildi ve 1 gece bekletildi. Ertesi gün tüpler beher içine alınıp otoklavda 1 saat 120°C'de bekletildi. Örnekler süzülerek yeni tüplere alındı (102). Her iki metodla elde edilen protein örnekleri -20°C'deki dondurucuda saklandı. İki farklı metodla serisin protein örnekleri başarılı bir şekilde elde edildi.

2. 3. 2. Jellerin Hazırlanması

Alt ve üst jel hazırlanmasında (103) aşağıda verilen stoklar kullanıldı.

Stok Çözeltiler ve Tamponlar

1. Akrilamid/Bis akrilamid (%30 T, %2,67 C) stoğu

30 g akrilamid ve 0,8 g N'N'-bis-methylene-akrilamid (103) tartıldı. 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de karanlıkta saklandı.

2. %10 (w/v) SDS

10 g SDS, 90 ml distile suda çözülüp, 100 ml'ye tamamlandı.

3. 1,5M Tris-HCl, pH=8,8

18.17 g Tris 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. pH=8,8'e asit ya da baz ile ayarlanıp, 4°C'de saklandı.

4. 0,5M Tris-HCl, pH=6,8

6 g Tris 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. pH=6,8'e asit ya da baz ile ayarlanıp, 4°C'de saklandı.

5. %10 APS

0,1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözüldü.

Öncelikle ayırma jeli döküldü. Üzeri su ile örtülerek 30 dakika polimerize olması için beklendi.

%12'lik ayırma jeli (30 ml)

1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)	→ 12 ml
Distile su	→ 10.035 ml
%10 SDS	→ 0.3 ml
%30 Akrilamid 0.8 bisakrilamid	→ 12 ml
TEMED	→ 0.015 ml
%10 APS	→ 0.15 ml

Ayırma jeli oluştuktan hemen sonra üstteki su tabakası dökölüp hazırlanan düzenleme jeli döküldü. Kuyucukları oluşturmak için jelin üzerine tarak takıldı. Elektroforez tarağı ile çözelti arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir. Kuyucukların oluşması için yine en az 30 dakika beklendi (104).

%4'lük düzenlevici jel (15 ml):

0.5 M Tris-HCl (pH:8.8)	→ 1.90 ml
Distile su	→ 10.835 ml
%10 SDS	→ 0.15 ml
%30 Akrilamid 0.8 bisakrilamid	→ 1.95 ml
TEMED	→ 0.015 ml
%10 APS	→ 0.15 ml

2. 3. 3. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Protein örnekleri önce 3 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Alınan üst faz daha önceden hazırlanan yükleme tamponu ile 1:2 oranında karıştırılarak kaynayan su buharında 4 dakika ısıtıldı (104). Örnek Tamponu: 1M tris: 2.4 ml; %20 SDS : 3 ml; Gliserol: 3 ml; B-merkaptolanol: 1.6 ml; Bromfenolblue: 0.006 g (+4°C'de saklandı)

2. 3. 4. Örneklerin Yüklmesi ve Yürütülmesi

Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine yerleştirildi. Tank içerisine 10X'lik stok yürütme tamponundan (Tris:9 g, Glisin:43.2 g, SDS:3 g, distile su ile 300 ml'ye tamamlandı) seyreltilerek hazırlanan 1X'lik tampondan ilave edildi. Hazırlanan örnekler 150 Voltta 4 saat yürütüldü. Ayrıca protein bantlarının belirlenebilmesi için SMO 661 Unstained Protein Ladder yüklendi.

2. 3. 5. Jelin Boyanması ve Boyadan Arındırılması

Elektroforez sonrasında jel Coomassie Blue Brilliant-R (CBB) ile boyandı (14). Bunun için 0.25% (250 mg) CBB 45:45:10 % metanol:su:asetik asitle karıştırıldı ve jel bu boyada bir gece boyunca bekletildi. Ardından jel 45:45:10 % metanol: su: asetik asit solusyonu ile sık sık yıkanarak boyası uzaklaştırıldı. Belirginleşen protein

bantlarının fotoğrafları Sony UP-D897 Markalı Dijital Jel Görüntüleme Cihazı ile çekildi.

2. 4. Üç Yerli Irkta Yapılan Morfolojik Çalışmalar

2. 4. 1. Kokonların Işık Mikroskopunda İncelenmesi

Üç yerli ırka ait kokon örneklerinin morfolojik yapısı Zeiss Scope A1 marka ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

2. 4. 2. İpek Bezlerinin Çıkarılması

Beşinci yaş dönemindeki ipekböceği larvalarının baş kısımlarında bulunan ipek bezleri (83) stereo mikroskop altında bistüri yardımıyla çıkarılıp incelenmek üzere uygun tampon içerisine alındı.

2. 4. 3. Örneklerin SEM İçin Hazırlanması

Çıkarılan ipek bezleri, kokon örnekleri 0.2M'lık sodyum fosfat tamponu içerisinde 10 dakika yıkandı. Örnekler tamponda hazırlanmış %3'lük gluteraldehitte (94, 105, 106) +4 °C'de bir saatlik ilk tespite alındı. Daha sonra örnekler pH'ı 7.2 olan sodyum fosfat tamponu içerisinde 10'ar dakika arayla üç değiştirme yapılarak yıkandıktan sonra aynı tamponda hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksitte 1.5 saat süreyle +4 °C'de ikinci tespite alındı. Örnekler, içerisindeki osmiyum tetroksitin iyice uzaklaştırılmasını sağlamak için bir gece sodyum fosfat tamponu ile yıkandı. Dehidrasyon işleminde, örnekler 10'ar dakika arayla %50, %60, %70, %80, %90, %95 ve %99'luk etil alkol serilerinden geçirildi. Dehidrasyon aşamasından sonra

örnekler petri kaplarına konularak 30 °C deki etüvde bir gece kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi sonunda örnekler stablar üzerine alınarak “POLARON 500” kaplama cihazıyla 2 dakika süre ile altınla kaplandı. Ardından “JEOL JSM-5600” marka SEM’de incelenerek fotoğrafları çekildi (107, 108, 109). Ayrıca her bir ırktan seçilen 5 bireyde fiber kalınlığı ile yumurta en ve boy uzunluğu ölçümleri yapıldı. Kokon fiberlerinin ortalama kalınlığını belirlemek için her bir ırktan 75 adet olmak üzere 225 adet; yumurta örneklerinin ortalama boy ve en uzunluğunu belirlemek için ise her ırktan 10 adet olmak üzere toplam 30 adet ölçüm yapıldı. Elde edilen veriler ANOVA (varyans analizi) testi ile değerlendirildi.

2. 4. 4. Serisini Uzaklaştırılmış Fiberlerin SEM İçin Hazırlanması

Adı geçen üç yerli ipekböceği ırkına ait kokon örnekleri suda 30 dk. süreyle kaynatılarak fiberleri saran yapışkan protein tabaka (serisin) uzaklaştırıldı. Isı muamelesi sonucu elde edilen fiber örnekleri petri kaplarında 24 saat süreyle oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra stablar üzerine alınarak SEM’de incelendi. Ancak fotoğraflarda serisinin tamamen uzaklaşmadığı görüldü. Bu nedenle fiber eldesi bir başka metotla tekrar denendi. 0.01 g Na₂CO₃ (90) ve 0.1 g toz hale getirilmiş beyaz sabun 100 ml distile suda manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen karışım haline gelene kadar karıştırıldı (12). Ardından üç ırka ait kokon örnekleri küçük parçalara kesilerek (450 mg) bu karışıma ilave edildi. Örnekler bu karışımda 1 saat kadar kaynatıldı. Dehidrasyon işleminde, örnekler 10’ar dakika arayla %50, %60, %70, %80, %90, %95 ve %99’luk etil alkol serilerinden geçirildi. Dehidrasyon aşamasından sonra örnekler petri kaplarına konularak bir gece kurumaya bırakıldı.

Stablar kaplama cihazıyla 2 dakika süre ile altınla kaplandı. Daha sonra SEM’de incelenerek fotoğrafları çekildi (90, 107).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3. 1. RAPD-PCR Çalışmaları

3. 1. 1. Taranan RAPD Primerleri ve Elde Edilen DNA Bantları

Üç yerli ipekböceği ırkı rasgele seçilen 40 Operon primeri ile tarandı. Bunlardan 7 tanesi ile elde edilen 68 RAPD band verileri POPGENE paket programı ile değerlendirilerek her üç yerli ırkta toplam 61 polimorfik lokus belirlendi.

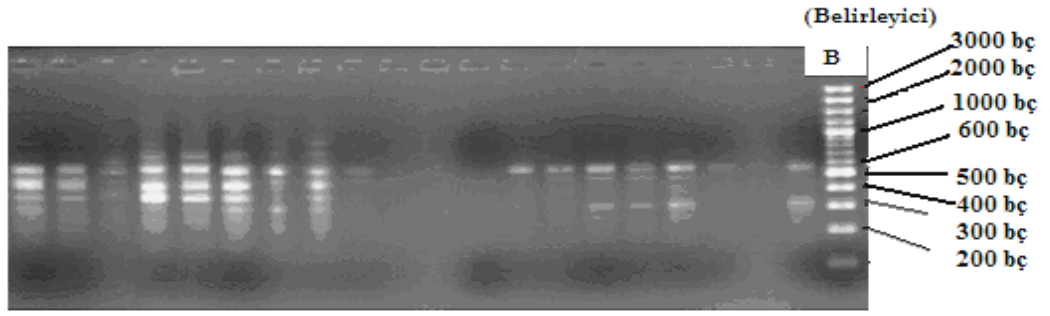
Çizelge 3. 1. Sonuç alınan 7 RAPD Primeri ve bunların her üç yerli ipekböceği ırkında oluşturduğu ortak ve polimorfik bantların yaklaşık uzunlukları

Primerin Adı	Gözlenen Bantların Yaklaşık Büyüklükleri (bp)
OPL12	200-1500
OPL18	225-900
OPN05	350-1100
OPU19	200-1500
OPY11	200-800
OPY13	250-425

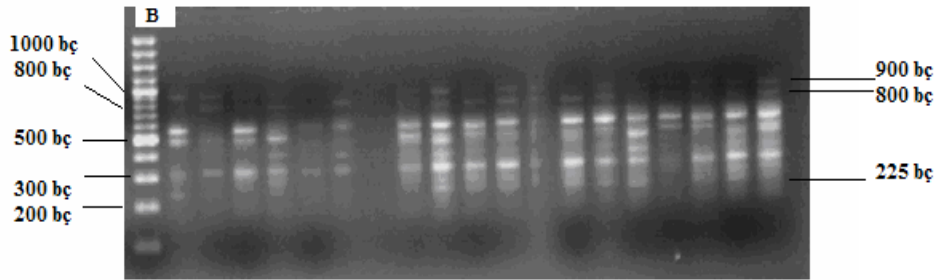
OPY15	275-1000
--------------	-----------------

Çalışmada kullanılan OPL-18 primeri ile sadece Bursa Beyazı ırkının bazı bireylerinde 225 bç, 800 bç ve 900 bç'lik bantlar gözlenirken bu bantlar diğer iki ırkta gözlenmedi. Hatay Sarısı ırkının bazı bireylerinde ise aynı primerle 850 bç'lik bant tespit edildi (Şekil 3. 1).

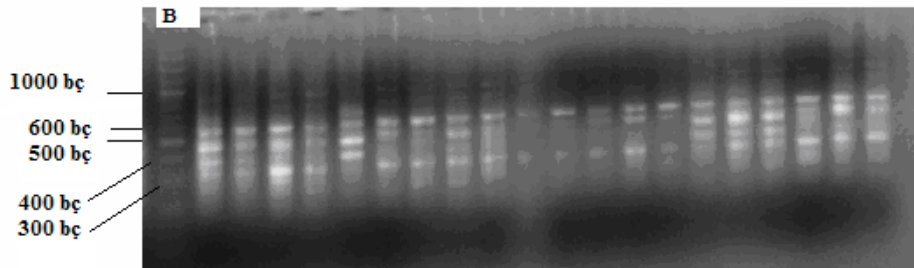
OPN-05 primeri ile ilginç olarak Alaca ve Bursa Beyazı ırklarının çoğu bireyinde 900 bç'lik bant gözlenirken Hatay Sarısı ırkında bu bant gözlenmedi (Şekil 3. 2). OPU-19 primeri ile Hatay Sarısı'na ait bireylerin bazılarında 650 bç'lik bant gözlenirken diğer iki ırka ait bireylerde bu bant gözlenmedi (Şekil 3. 3). OPY-11 primeri ile Hatay Sarısı için diğer iki ırktan farklı bir bant profili gözlemlendi (Şekil 3. 4). Diğer üç primerle her üç ırk arasında polimorfik bantlar tespit edilmedi. Bunlardan OPY-13 primeri ile her üç ırkta elde edilen bantlar şekil 3.5'de verildi.



a. Alaca

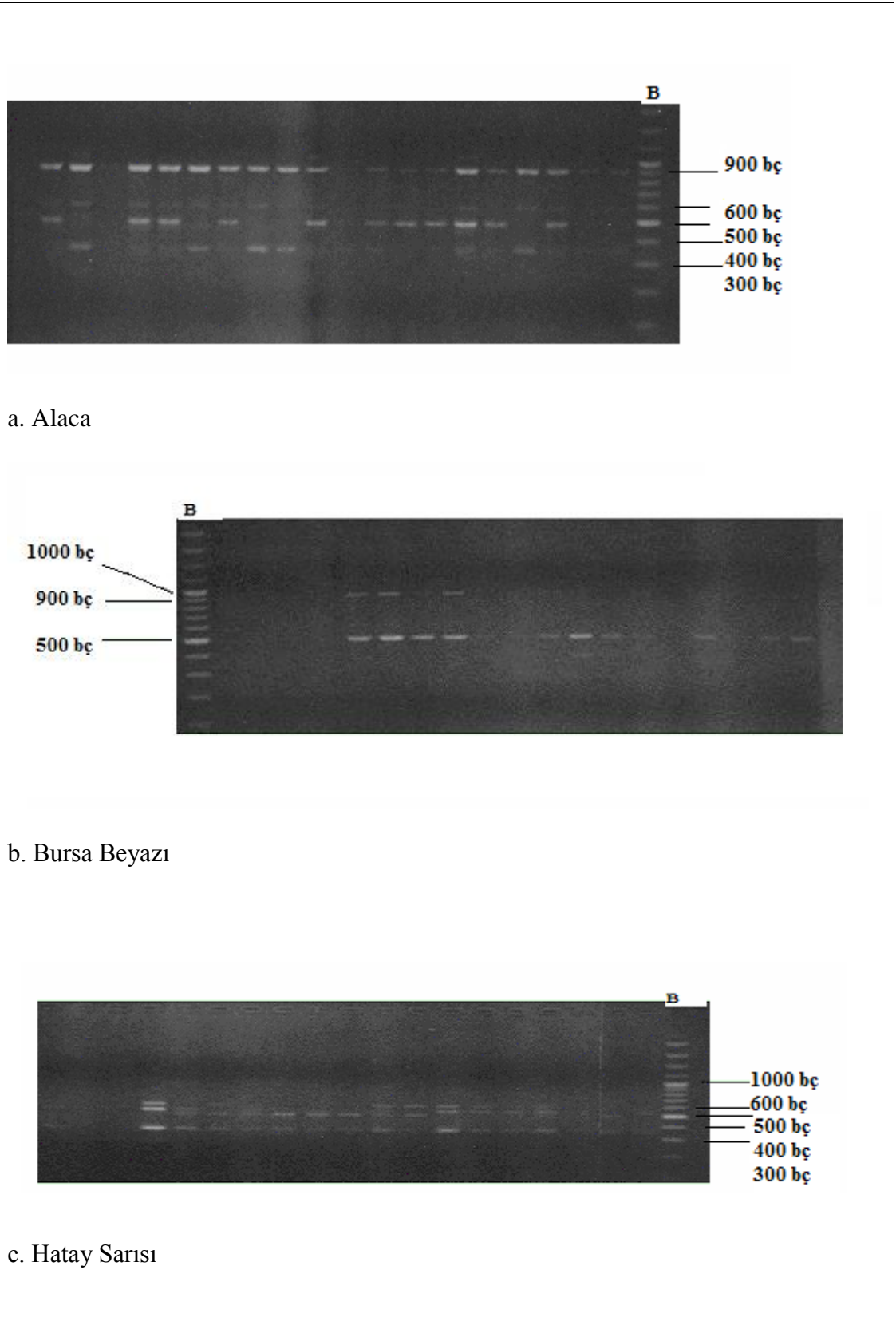


b. Bursa Beyazı

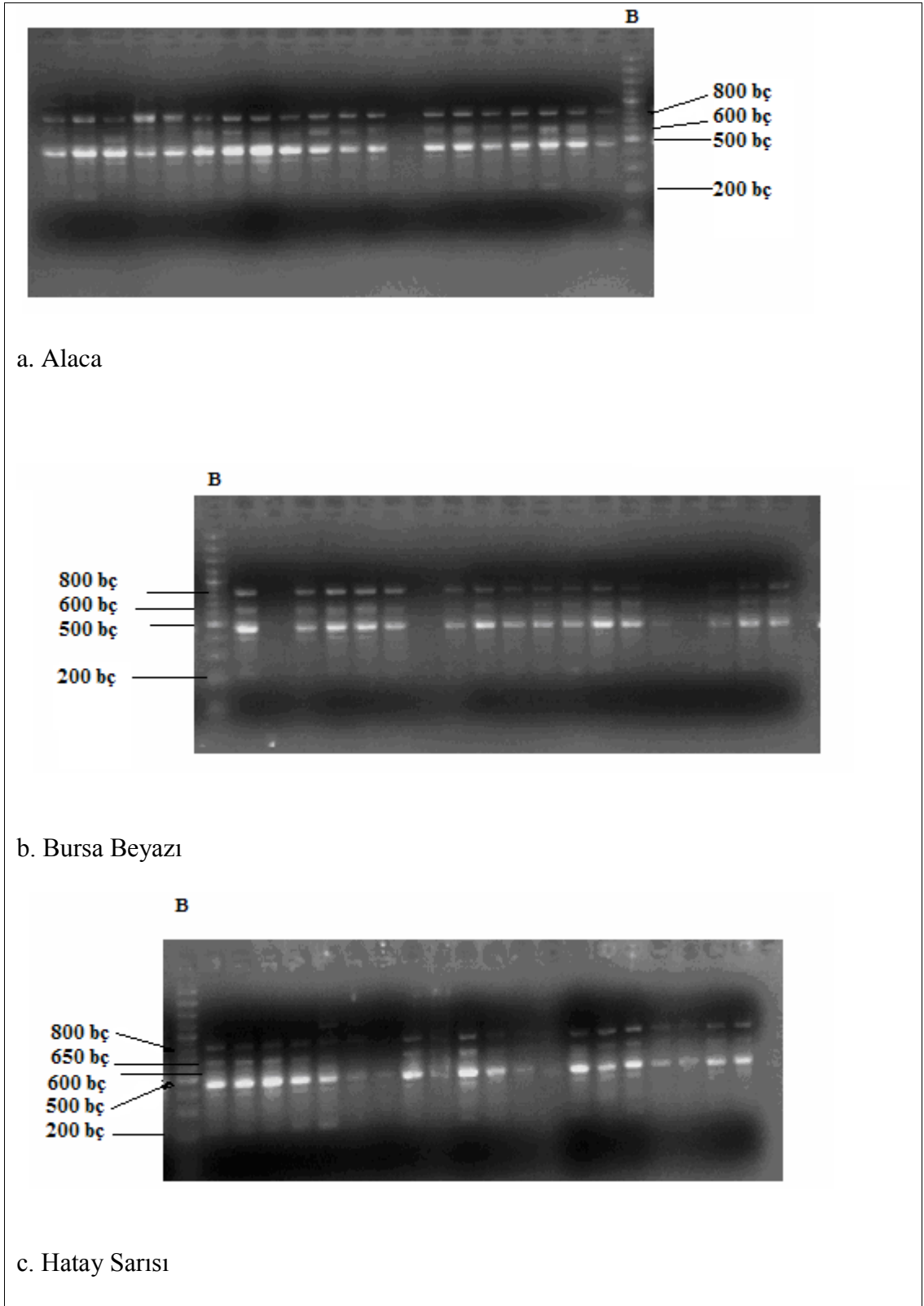


c. Hatay Sarısı

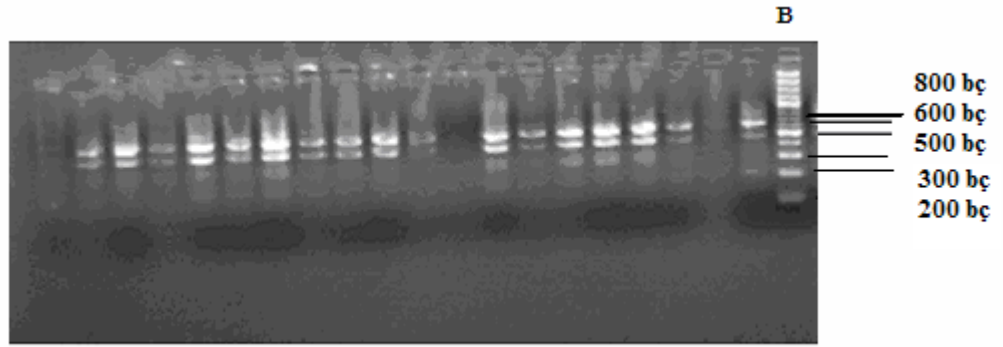
Şekil 3. 1. OPL-18 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri



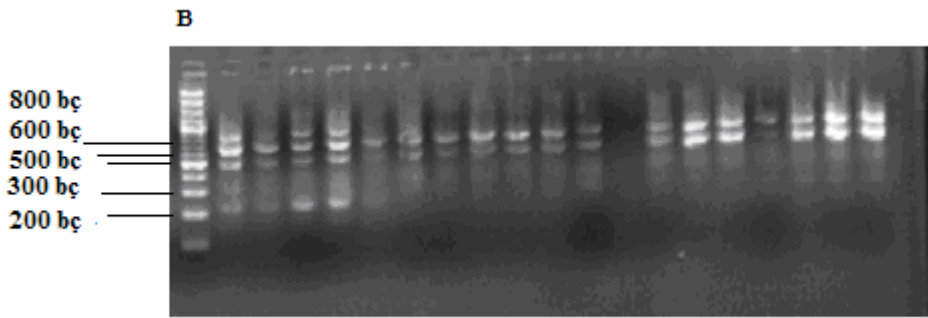
Şekil 3. 2. OPN-05 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri



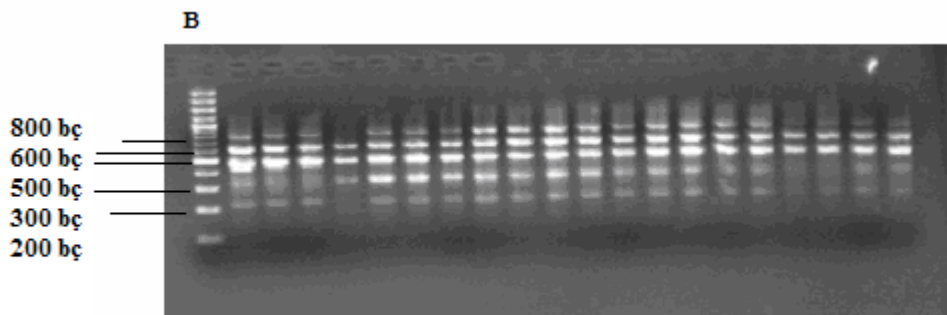
Şekil 3. 3. OPU-19 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri



a. Alaca

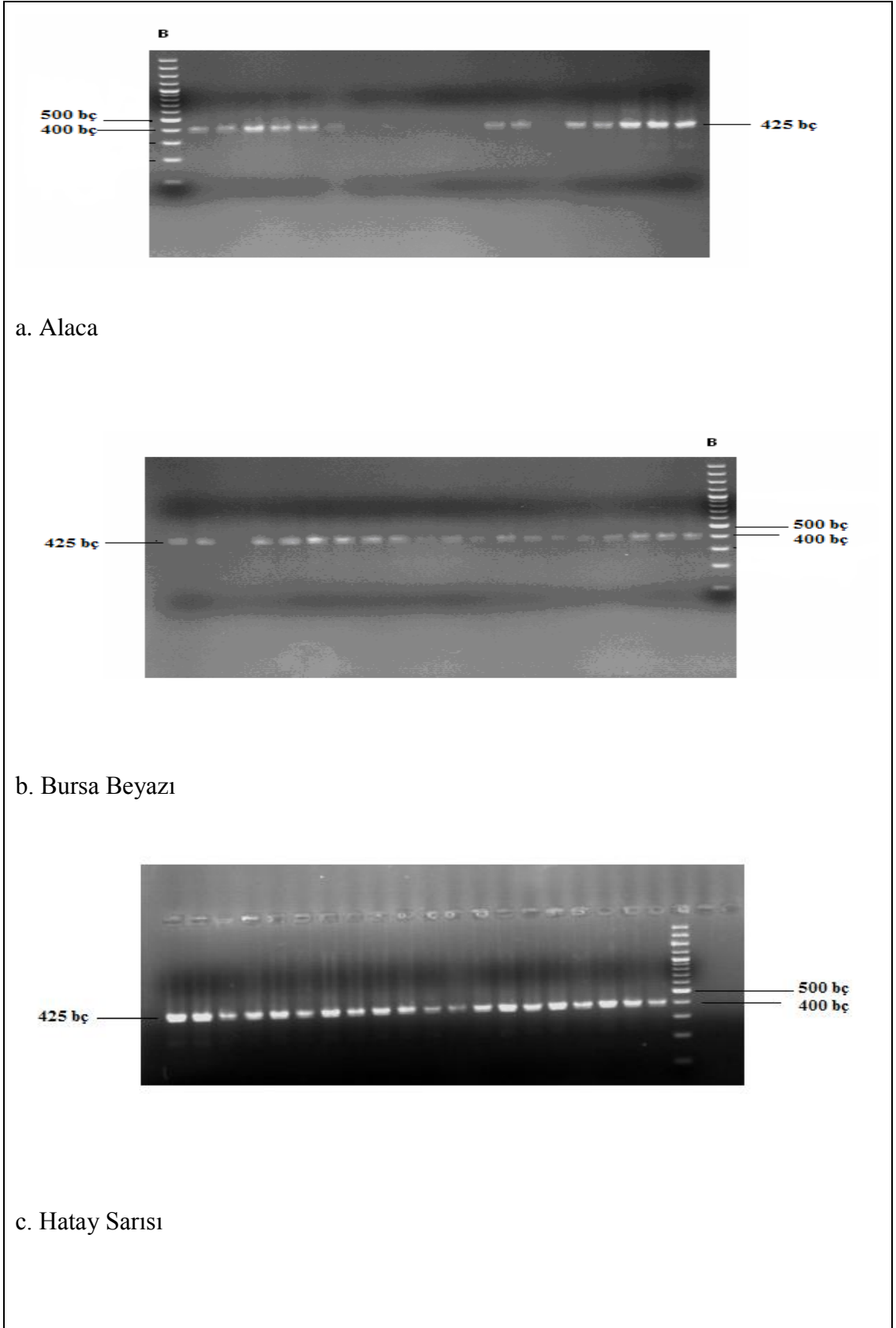


b. Bursa Beyazı



c. Hatay Sarısı

Şekil 3. 4. OPY-11 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri



Şekil 3. 5. OPY-13 primeri ile elde edilen RAPD bant profilleri

3. 1. 2. Üç Yerli Irkta Genetik Varyasyonun Analizi

Bu çalışmada öncelikle 40 rasgele primerle taranan toplam 60 bireyden elde edilen 68 RAPD bandı ile bantların varlığı “1” (dominant) yokluğu ise “0” (resesif) kabul edilerek bir veri tablosu oluşturuldu (EK). Sonra veriler paket programı ile değerlendirilerek aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

3. 1. 2. 1. Polimorfik Lokusların Yüzdesi

İrk içi polimorfik lokusların yüzdesi karşılaştırıldığında en yüksek değer Hatay Sarısı’nda (55.88) en düşük değer ise Bursa Beyazı ve Alaca’da (44.12) belirlendi.

3. 1. 2. 2. Heterozigotluk

En yüksek heterozigotluk değeri Hatay Sarısı’nda (0.1396) en düşük değer ise Bursa Beyazı’nda (0.1176) gözlemlendi (Çizelge 3. 2). Bu sonuçlara göre bir lokusta gözlenen heterozigotların ortalamasının en yüksek Hatay Sarısı’nda iken en düşük Bursa Beyazı ırkında olduğu söylenebilir. Çizelge 3. 3’de ise her üç ırk için heterozigotluk değeri verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Çalışılan üç yerli ipekböceği ırkında elde edilen 68 lokus için genetik varyasyon istatistiğinin özeti (na: Gözlenen allel sayısı, ne: Etkili allel sayısı, h: Nei'nin (1973) gen çeşitliliği, I: Shannon'un bilgi indeksi, p.lokus: polimorfik lokus)

İrk	Örnek Sayısı	na	ne	h	I	p.lokus	%p.lokus
Alaca	20	1.4412 0.5002 ±	1.2168. 0.3199±	0.1324 0.1788±	0.2038 0.2639±	30	44.12
Bursa Beyazı	20	1.4412 0.5002 ±	1.1904. 0.3017±	0.1176 0.1712±	0.1835 0.2496±	30	44.12
Hatay Sarısı	20	1.5588 0.5002 ±	1.2251. 0.3174±	0.1396 0.1753±	0.2203 0.2521±	38	55.88

Çizelge 3. 3. Her üç yerli ırkta elde edilen 68 lokus için genetik varyasyon istatistiğinin özeti

	Örnek sayısı	na	ne	h	I
Ortalama	60	1.8971	1.2727	0.1764	0.2884
Standart Sapma		0.3061	0.3060	0.1626	0.2245

3. 1. 2. 3. Gözlenen ve Etkili Allel Sayısı

Bütün alleller aynı sıklıkta olduğunda gözlenen allel sayısı etkili allel sayısına eşittir. Ancak zararlı genlerin bulunması durumunda etkili allel sayısı (ne) her zaman gözlenen allel sayısından (na) daha küçüktür. Bu çalışmada etkili allel sayısı (ne) değerleri gözlenen allel sayısı (na) değerlerinden küçük bulundu. Gözlenen allel sayısı 1.4412-1.5588 arasında değişirken, etkili allel sayısı 1.1904-1.2251 arasında değişti.

3. 1. 2. 4. Shannon'un Bilgi Endeksi

Shannon'un bilgi endeksinin en düşük değeri Bursa Beyazı'nda (0.1835), en yüksek değeri ise Hatay Sarısı'nda (0.2203) gözlemlendi. Gen farklılığını ölçen bu değerler heterozigotluk değerleri ile paralellik göstermektedir.

3. 1. 2. 5. Irk İçi ve Irklar Arasında Genetik Farklılık (=Gen Çeşitliliği)

Tüm ırklar arasında genetik farklılık (H_T) 0.1752, ırk içi genetik farklılık (H_s) 0.1299 bulundu. Gen farklılaşmasının göreceli büyüklüğü ise (G_{ST}) 0.2586 olarak gözlemlendi (Çizelge 3. 4). Bu değerler ırklar arasındaki genetik varyasyonun ırk içindeki genetik varyasyondan daha fazla olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3. 4. Çalışılan üç yerli ırkta gen çeşitliliğinin analizi

	Örnek Sayısı	H_T	H_s	G_{ST}
Ortalama	60	0.1752	0.1299	0.2586
Standart Sapma		0.0261	0.0126	
Polimorfik Lokus				61
Polimorfik Lokusların Yüzdesi				89.71

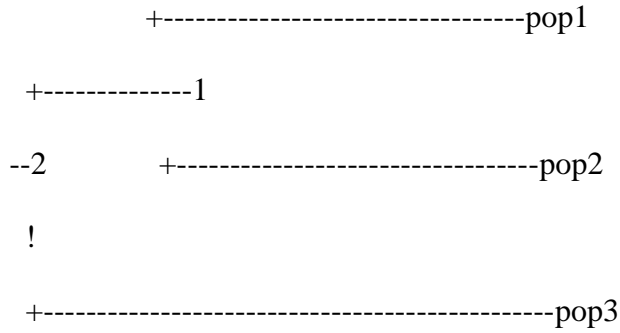
3. 1. 2. 6. Genetik Kimlik ve Genetik Mesafe

Nei'nin (NEI, 1987) gen farklılığı analizinde belirleyici ölçüler olarak ifade edilen genetik kimlik ve genetik mesafe değerleri hesaplandı. Bursa Beyazı ile Hatay Sarısı arasındaki genetik kimlik 0.9037, genetik mesafe 0.1012; Bursa Beyazı ve Alaca arasında genetik kimlik 0.9382 , genetik mesafe 0.0637 ; Hatay Sarısı ile Alaca arası genetik kimlik 0.9238, genetik mesafe 0.0793 bulundu (Çizelge 3.5). Buna göre, en uzak genetik mesafe Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı ırkı arasında gözlenirken en kısa genetik mesafe Alaca ve Bursa Beyazı arasında gözlemlendi. Genetik kimlikler genetik mesafe kalıplarını takip eder fikriyle genetik olarak en yakın ırkların Alaca ve Bursa Beyazı olduğu söylenebilir.

Çizelge 3. 5. Genetik kimlik (çaprazın üstünde verilen) ve genetik mesafenin (çaprazın altında verilen) ölçümü

Irklar	1 (Alaca)	2 (Bursa Beyazı)	3 (Hatay Sarısı)
1	****	0.9382	0.9238
2	0.0637	****	0.9037
3	0.0793	0.1012	****

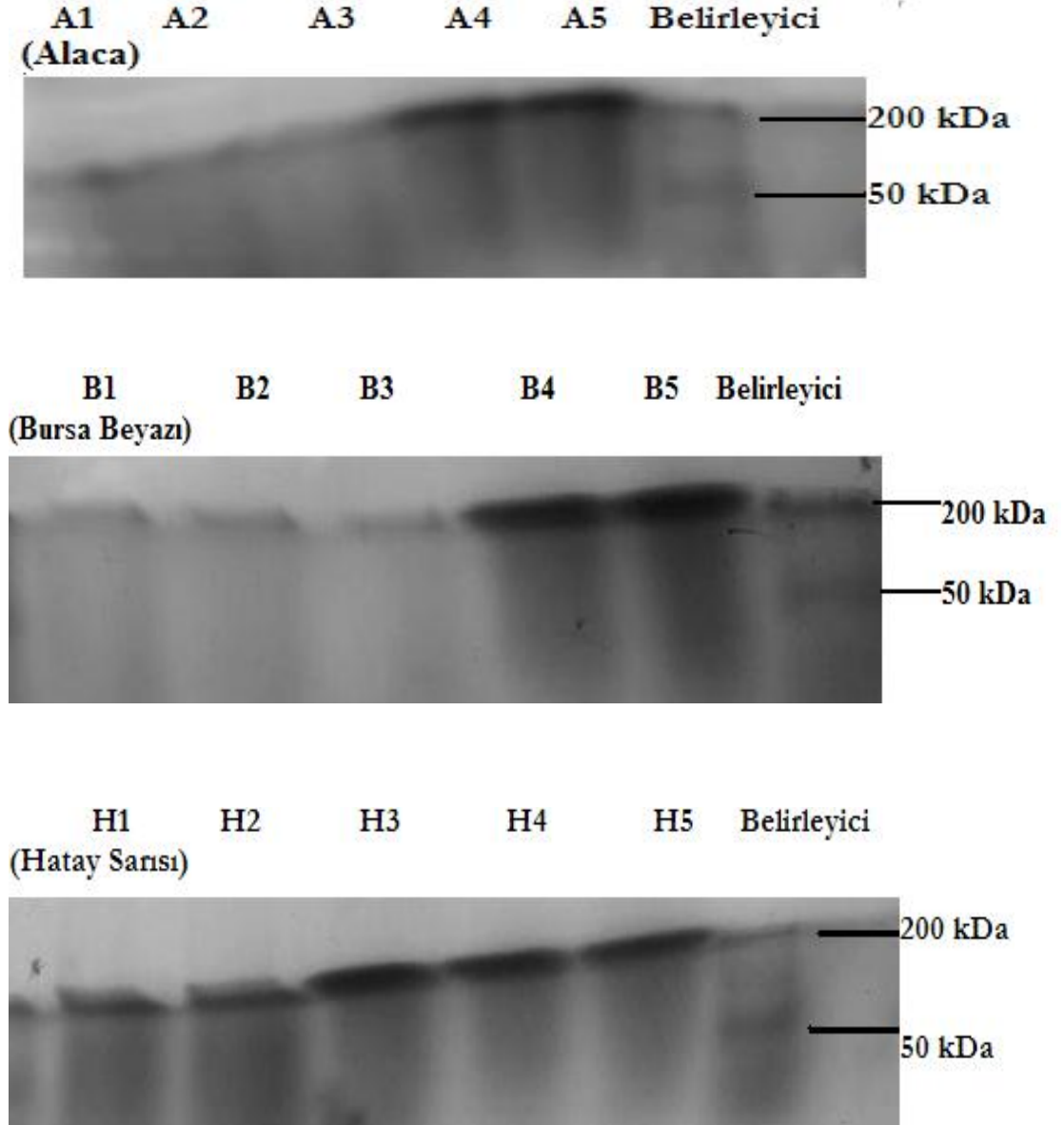
UPGMA kullanarak Nei'nin genetik mesafesine göre elde edilen dendogram PHYLIP VERSION 3.5 NEIGHBOUR Yöntemine göre oluşturuldu. (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6. Üç yerli ipekböceği ırkı arasında UPGMA kullanılarak oluşturulan genetik mesafeyi gösteren dendogram (Metod =UPGMA - PHYLIP Version 3.5. NEIGHBOR Yöntemi)

3. 2. Üç Yerli Irka Ait Serisin Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Analizi

Her üç ırkın kokonlarından elde edilen serisin proteinleri SDS-PAGE ile 200 kDa'luk tek bant oluşturdu (Şekil 3.7.).

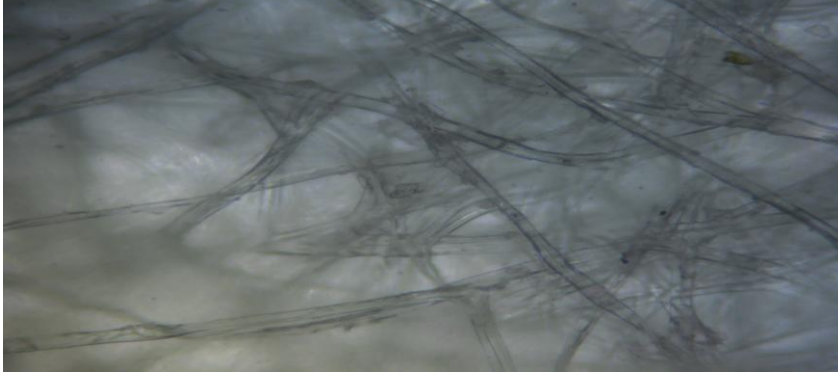


Şekil 3. 7. SDS-PAGE'de üç yerli ırka ait serisin proteinlerinin bant profili

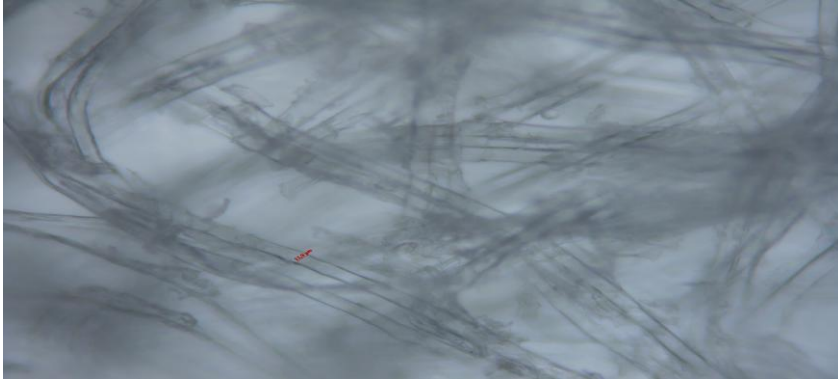
3. 3. Üç Yerli Irkta Yapılan Morfolojik Çalışmalar

3. 3. 1. Kokonların Işık Mikroskopunda İncelenmesi

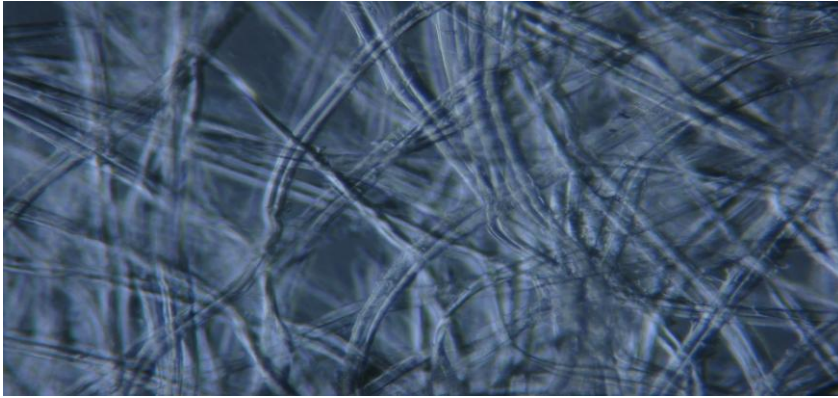
Işık mikroskobu çalışmalarında üç ırka ait kokon morfolojilerinde farklılıklar olduğu tespit edildi. Bursa Beyazında kokonu oluşturan fiberler çok sık dizilirken, Alaca ve Hatay Sarısı ırklarında daha gevşek dizilmiştir (şekil 3. 8 ve şekil 3. 9).



Alaca

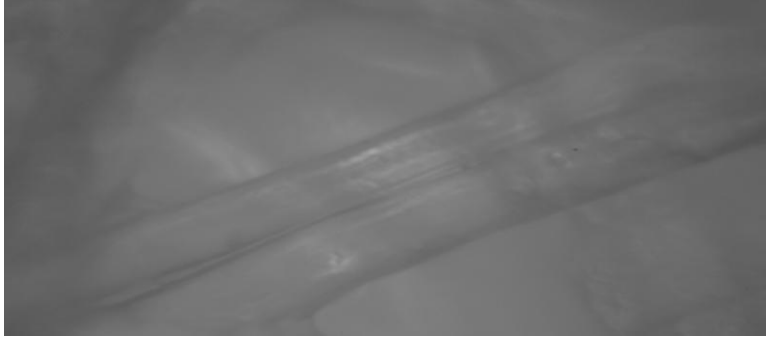


Bursa Beyazı

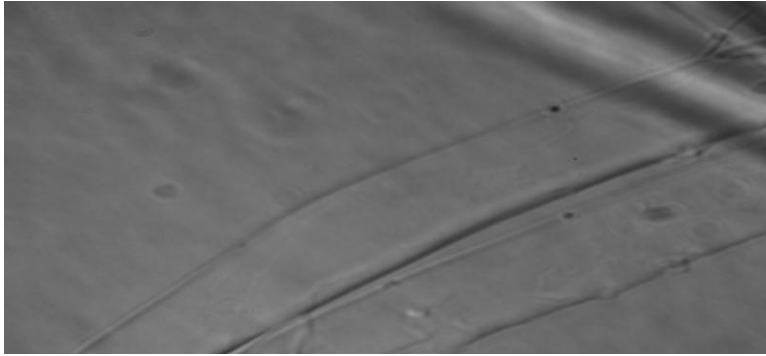


Hatay Sarısı

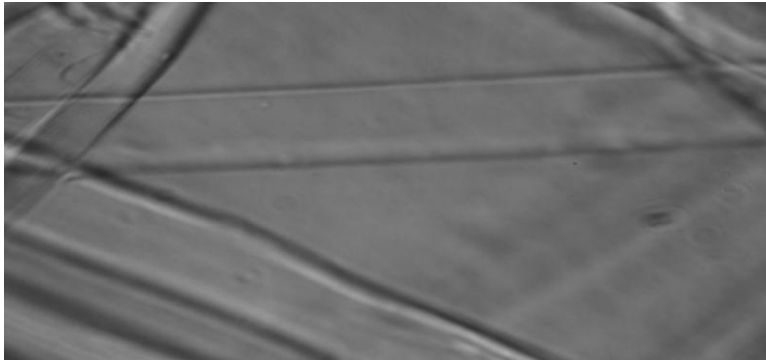
Şekil 3. 8. *Bombyx mori* ırklarının ışık mikroskopundaki kokon morfolojileri (X20)



Alaca



Bursa Beyazı



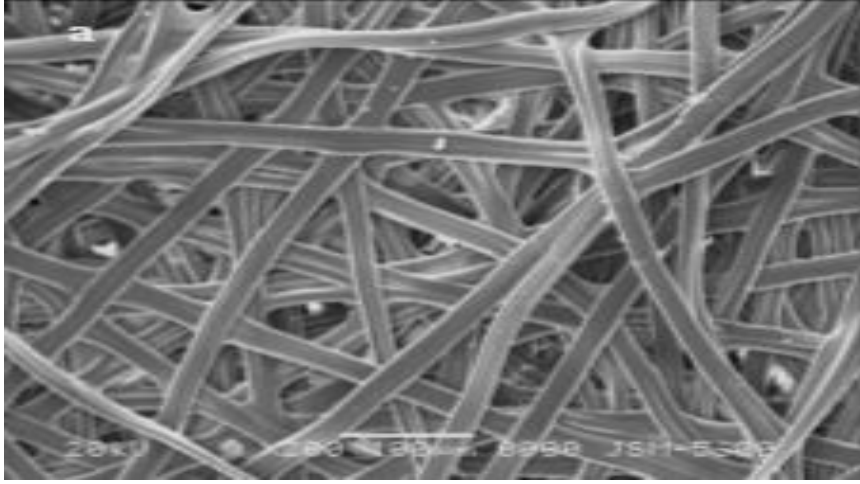
Hatay Sarısı

Şekil 3. 9. *Bombyx mori* ırklarının ışık mikroskopundaki kokon morfolojileri (X100)

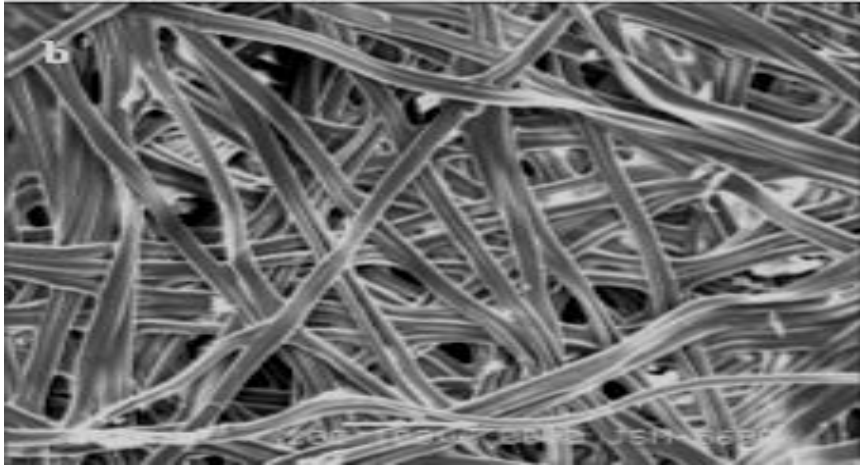
3. 3. 2. Örneklerin SEM'de İncelenmesi

3. 3. 2. 1. Kokonların Morfolojisi

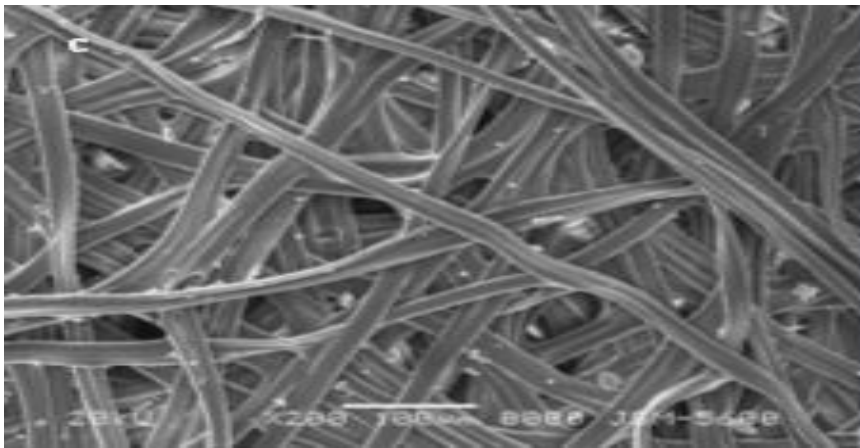
Taramalı elektron mikroskopta yapılan incelemeler sonucunda üç ırka ait bireylerin kokon fiber yapılarında belirgin farklılıklar tespit edildi. Bu farklılık önce kokonu oluşturan fiberlerin morfolojisinde göze çarpmaktadır. Bursa Beyazında kokonu oluşturan fiberler dah sık dizilirken, Alaca ve Hatay Sarısı ırklarında daha gevşek ve aralarında yer yer boşluklar bırakacak şekilde dizilmişlerdir (Şekil 3. 10). İkinci farklılık fiberlerin yüzey yapılarında görüldü. Hatay Sarısı ve Alaca ırklarına ait bireylerin fiber yüzeylerinde nispeten daha pürüzsüz ve çok az oyuk gözlenirken, Bursa Beyazına ait fiberlerin yüzeylerinde çok sayıda girintili-çıkıntılı oyuk gözlendi (Şekil 3. 11 ve şekil 3. 12). SEM incelemeleri sonucunda kokon ve fiber morfolojilerinin Hatay Sarısı ve Alaca'da nispeten birbirlerine benzediği, Bursa Beyazında ise oldukça farklılık gösterdiği gözlendi.



Alaca

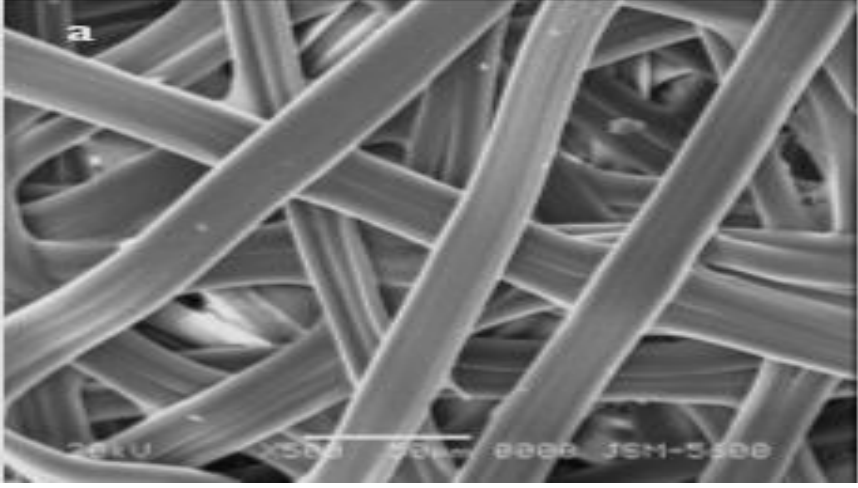


Bursa Beyazı

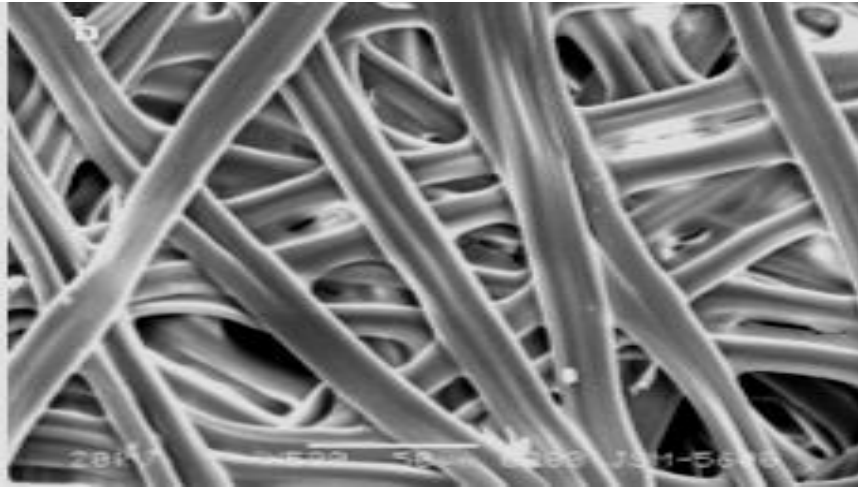


Hatay Sarısı

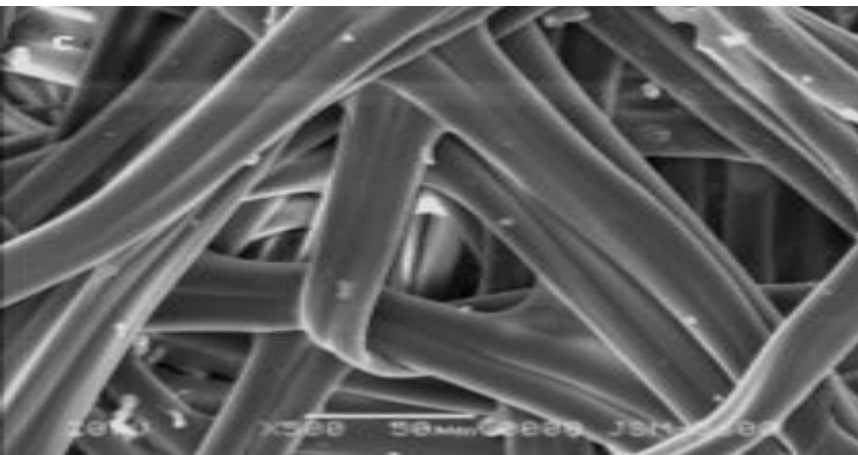
Şekil 3. 10. *Bombyx mori* ırklarında gözlenen fiber dizilimi (X200)



Alaca

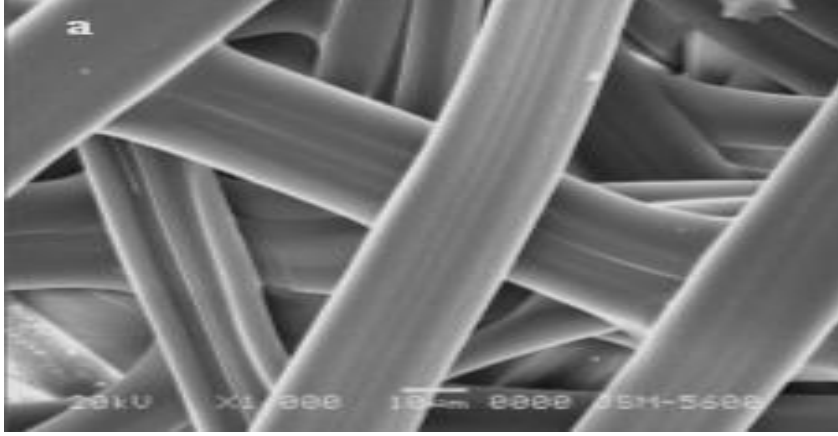


Bursa Beyazı

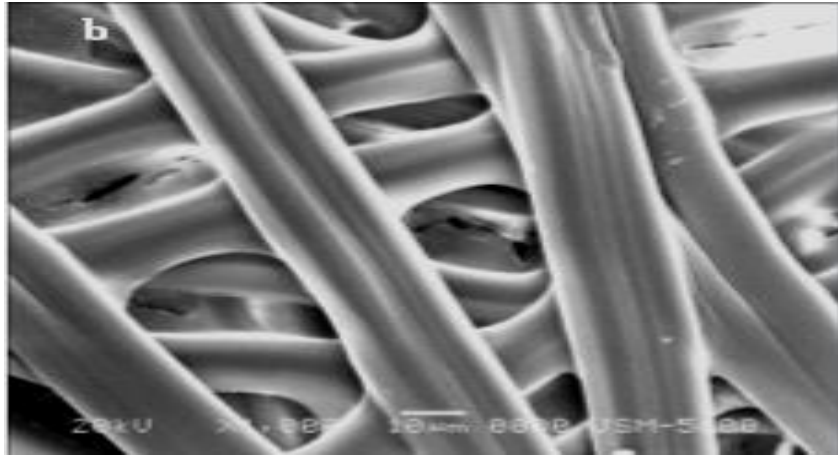


Hatay Sarısı

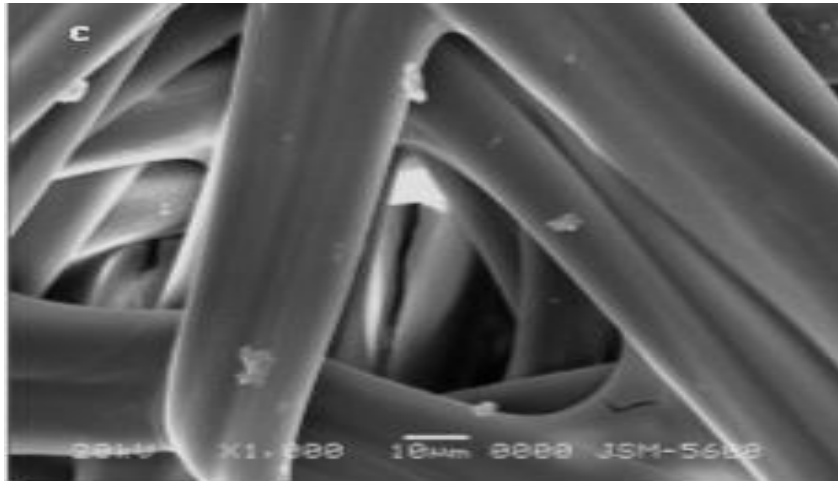
Şekil 3. 11. *Bombyx mori* ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X500)



Alaca

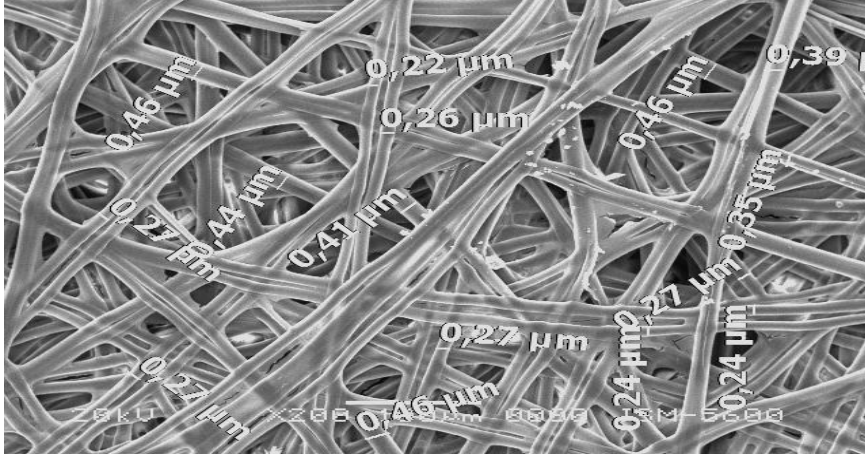


Bursa Beyazı

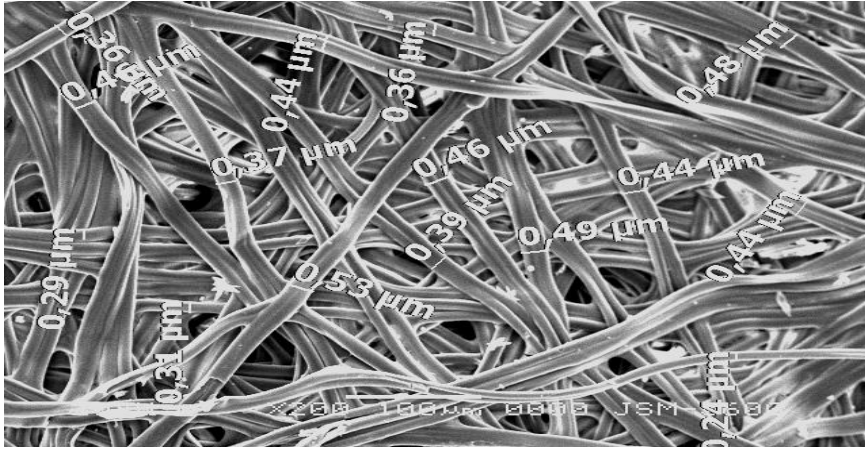


Hatay Sarısı

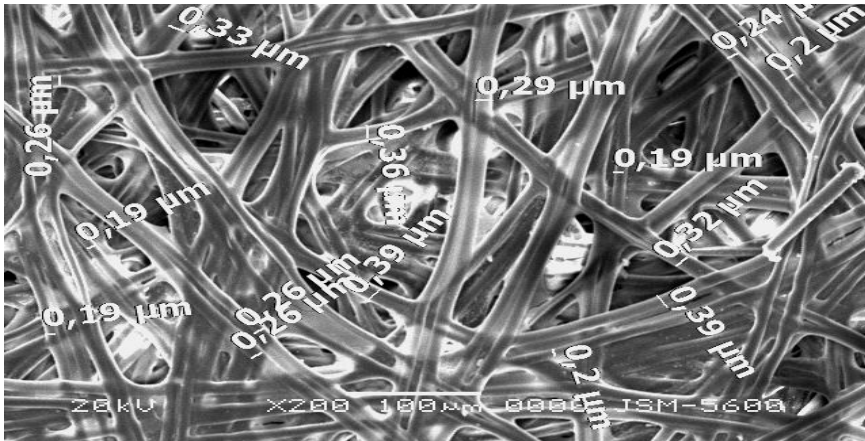
Şekil 3. 12. *Bombyx mori* ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X1000)



Alaca



Bursa Beyazı



Hatay Sarısı

Şekil 3. 13. *Bombyx mori* ırklarının fiber kalınlık ölçümleri (X200)

Üç yerli ırka ait fiber kalınlık ölçümlerinin değerlendirildiği ANOVA testinin sonucu Çizelge 3. 6.' da verilmiştir.

Çizelge 3. 6. Grup ortalamalarını karşılaştırmak için uygulanan Anova testi sonucu

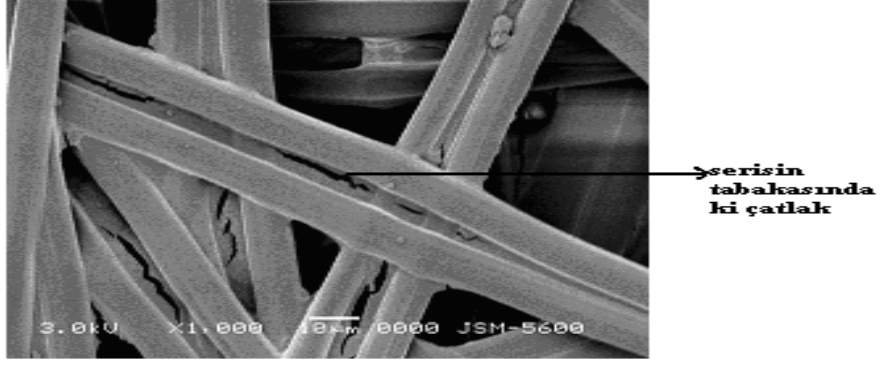
		Alaca	Bursa Beyazı	Hatay Sarısı	Fiber (μm)		F	p
					Ortalama	Standart Sapma		
Grup	Alaca		-	-	0.34	0.13	2.51	0.08
	Bursa Beyazı	-		+	0.35	0.08		
	Hatay Sarısı	-	+		0.31	0.10		

+ Ortalama kalınlık farklı ($p < 0.10$)
- Ortalama kalınlık aynı ($p > 0.10$)
F: Anova testi sonucu

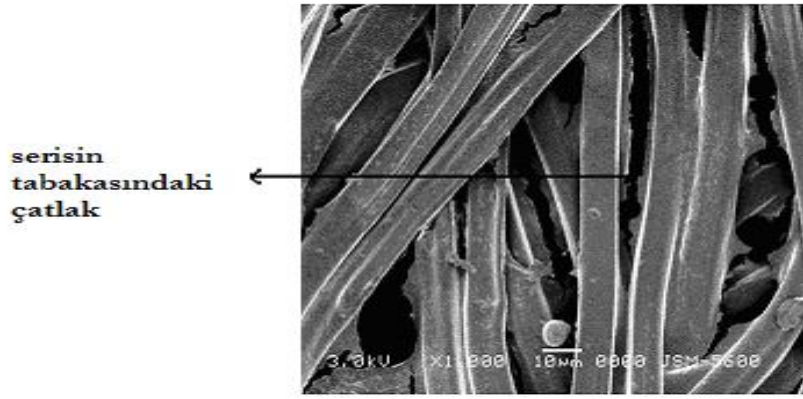
Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı ırklarından alınan toplam 225 gözlemde yapılan Anova testi sonucunda, kokonlara ait fiber kalınlıklarının ortalamasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.10$). En yüksek ortalama Bursa Beyazı'nda en düşük ortalama ise Hatay Sarısı'nda elde edildi. Analiz sonucunda ortalamalarda farklılığı ortaya çıkaran grupların 'Bursa Beyazı' ve 'Hatay Sarısı' ırkları olduğu sonucuna varılmıştır ($p < 0.10$). Buna göre 'Bursa Beyazı' ve 'Hatay Sarısı' ırklarının fiber kalınlıklarında farklılık tespit edilirken; 'Alaca' ve 'Bursa Beyazı' ırklarının karşılaştırılmasında farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Hatay Sarısı ırkına ait fiber kalınlığı diğer ırklara göre daha ince olarak tespit edilmiştir.

3. 3. 2. 2. Serisini Uzaklaştırılmış Fiberlerin Morfolojisi

Üç ırka ait kokonlar yüzeylerindeki serisin tabakasının uzaklaşması için distile suda 30 dakika kadar kaynatıldı. Ancak kozaların mikroskopik incelemelerinde fiberlerin yüzeyindeki serisin protein tabakasının sadece çatlamış olduğu tamamen uzaklaşmadığı görüldü (şekil 3.14). Bu yüzden çalışma dönemi içinde örnekler sodyum kakodilat (Na_2CO_3) tamponunda 1 saat süre ile yıkanarak tekrar incelendi. Elde edilen fotoğraflarda üç ırkın serisin proteinin tamamen uzaklaşmış olduğu ve kokon fiber yapılarında ırka özgü farklılığın ortadan kalktığı tespit edildi (şekil 3.15).



Alaca

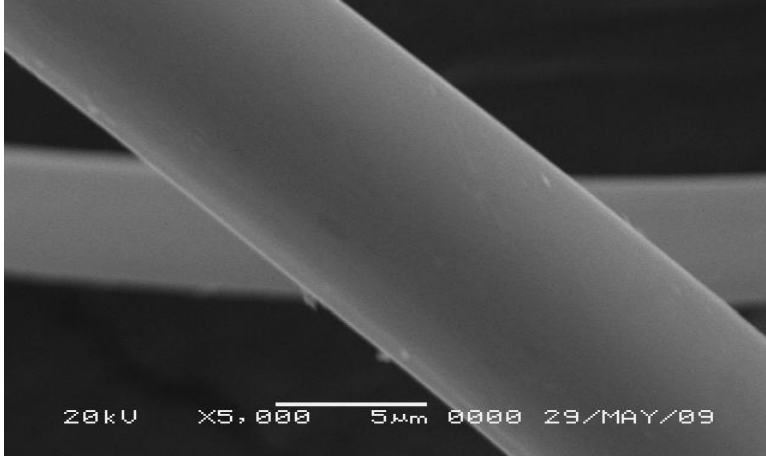


Bursa Beyazı

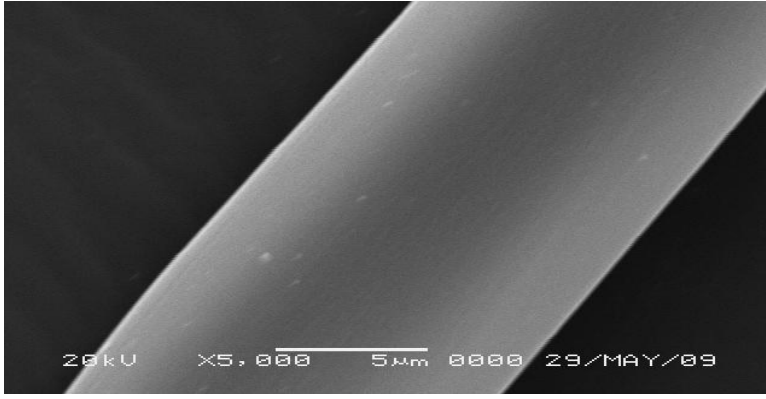


Hatay Sarısı

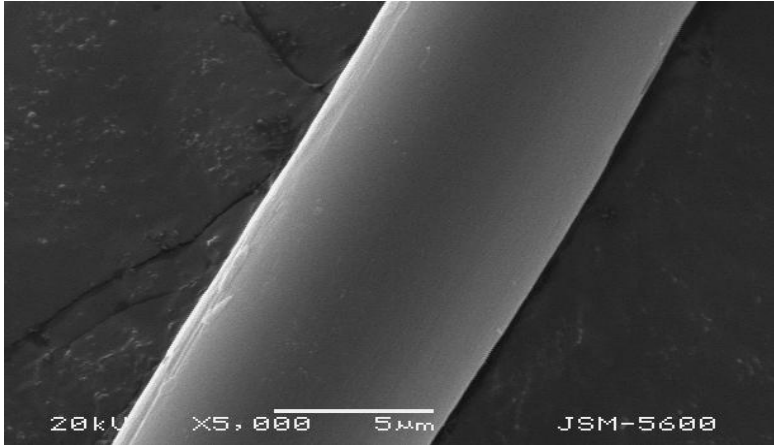
Şekil 3. 14. Distile su ile kaynatılarak serisin proteini uzaklaştırılmış *Bombyx mori* ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X1000)



Alaca



Bursa Beyazı



Hatay Sarısı

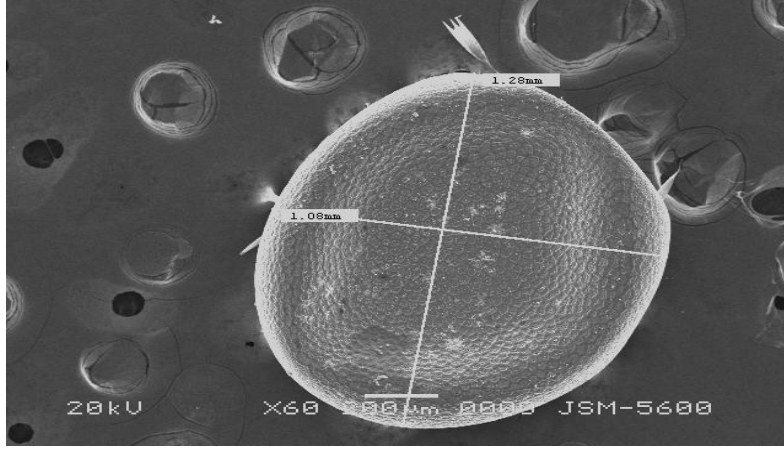
Şekil 3. 15. Sodyum tamponu ile kaynatılarak serisin proteini uzaklaştırılmış *Bombyx mori* ırklarının fiber yüzey morfolojileri (X5000)

3. 3. 2. 3. Yumurtaların Morfolojisi

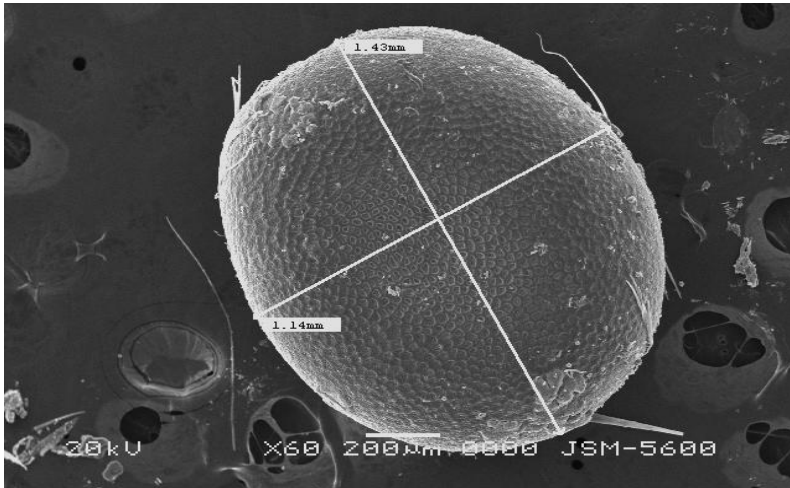
Her üç ırkın da yumurta morfolojisindeki farklılık hemen dikkat çekmektedir. Alaca ırkının yumurta yüzeyindeki motif dizilişi oldukça düzensizdir. Hatta hepsi neredeyse şekil bakımından birbirinden farklı görünmektedir. Motiflerin aralarındaki mesafeler de birbirinden farklı olmakla birlikte tek bir motif içerisindeki özel bölmeler belirgin değildir. Bursa Beyazı ırkında ise düzenli bir motif yapısı hemen göze çarpmaktadır. Çünkü motiflerin hemen hemen hepsi aynı boyutta, aralarındaki mesafe de neredeyse eşit görünmektedir. Her bir motif yapısı ise birden çok petek görünümlü yapının bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Hatay Sarısı yumurta morfolojisi bakımından daha çok Bursa Beyazı ırkına benzemektedir. Hatay Sarısı ırkında da düzenli bir motif yapısı vardır. Ayrıca Bursa Beyazı ırkında olduğu gibi motif içerisindeki özel bölmeler dikkat çekmektedir. Ancak Bursa Beyazı ırkındaki belirgin petek yapı görüntüsü Hatay Sarısı ırkında o kadar net bir şekilde gözlenmemektedir (Şekil 3. 16 ve şekil 3. 17).



Alaca

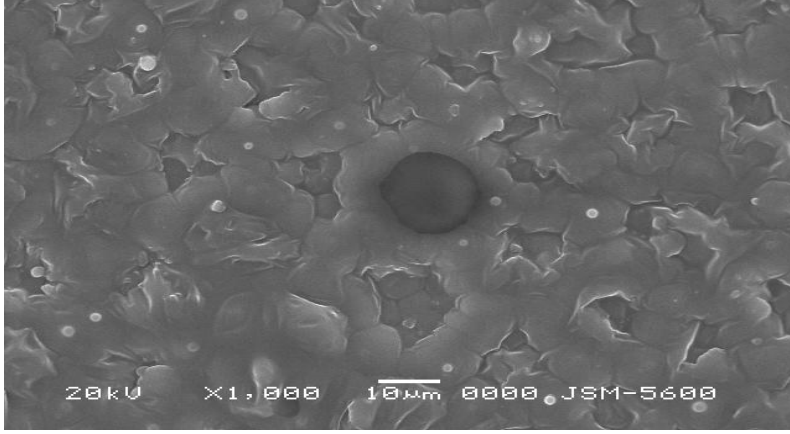


Bursa Beyazı

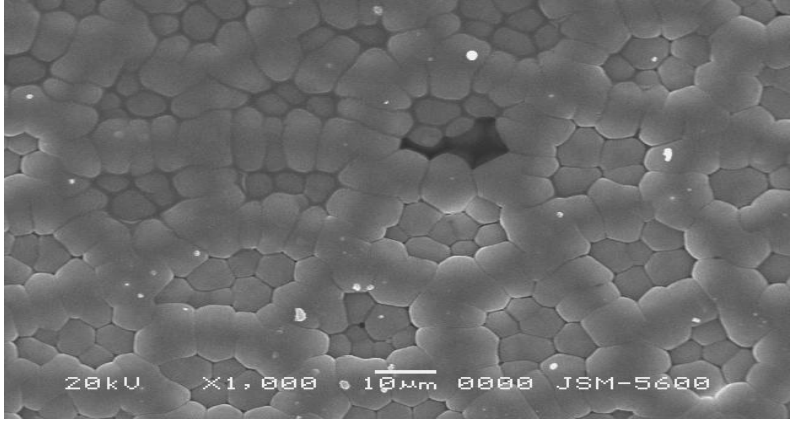


Hatay Sarısı

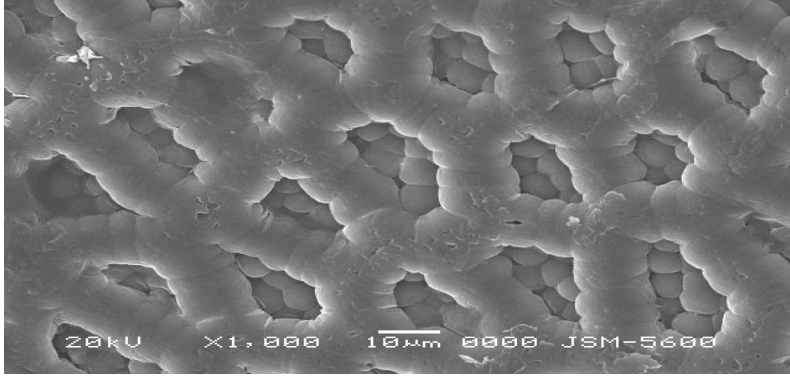
Şekil 3. 16. *Bombyx mori* ırklarının yumurta yüzey morfolojileri (X60)



Alaca



Bursa Beyazı



Hatay Sarısı

Şekil 3. 17. *Bombyx mori* ırklarının yumurta yüzey morfolojileri (X1000)

Üç yerli ırka ait yumurta örneklerinde yapılan en ve boy uzunluğu ölçümlerinin SPSS analiz sonucu Çizelge 3. 7.'de verilmiştir.

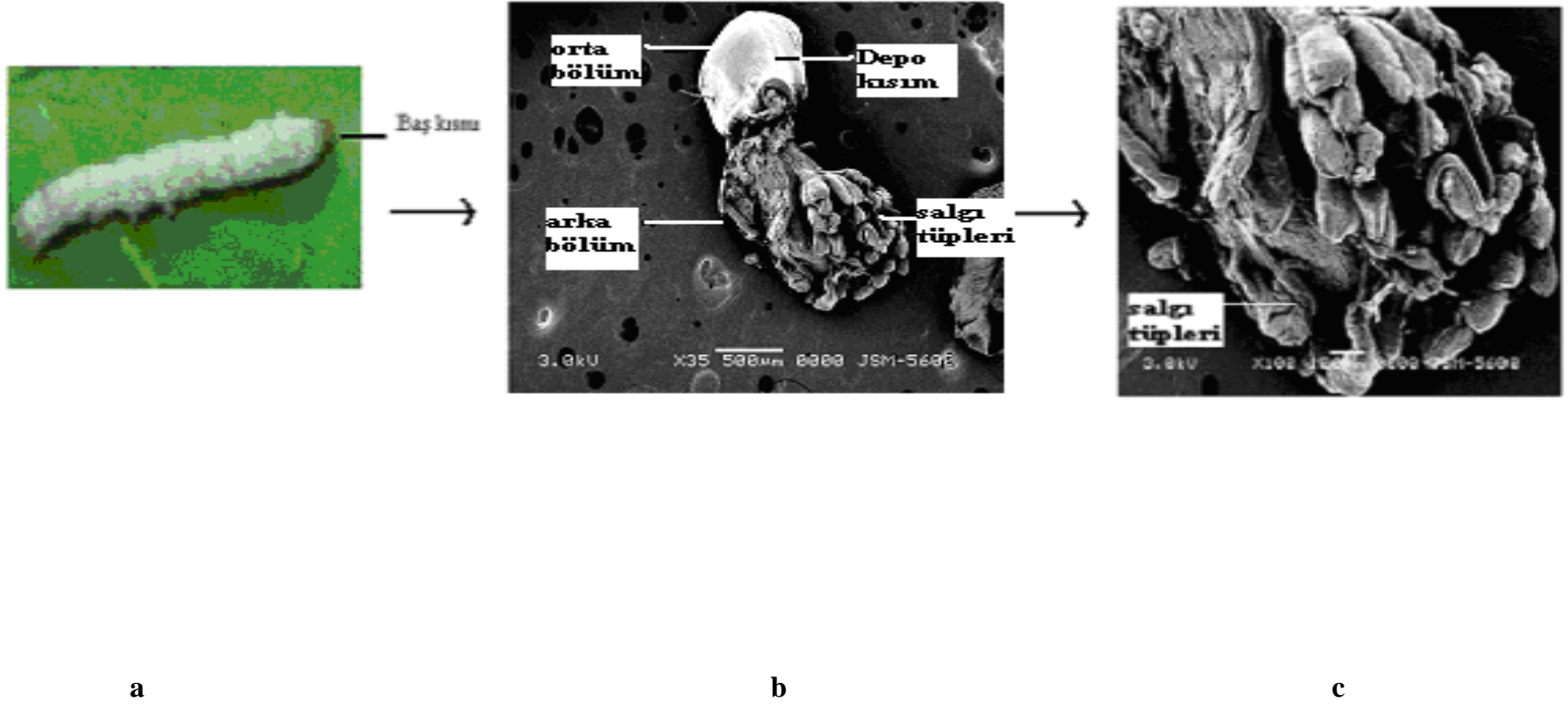
Çizelge 3. 7. Üç yerli ırka ait yumurta ölçümlerinin ANOVA testi sonucu

	IRK						F	p
	Alaca		Bursa Beyazı		Hatay Sarısı			
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma		
Boy (mm)	1.38	0.05	1.27	0.06	1.35	0.06	4.499	0.035
En (mm)	1.03	0.10	1.17	0.08	1.15	0.05	4.792	0.030

En ve boy ırklarda farklıdır ($p < 0.10$). Yumurta boy uzunluğu değeri Alaca'da daha yüksek iken Bursa Beyazı ırkında daha düşük çıkmıştır. En uzunluğu değeri ise en yüksek Bursa Beyazı'nda en düşük Alaca'da elde edilmiştir.

3. 3. 2. 4. İpek Bezlerinin Morfolojisi

Üç ırka ait ipek bez yapılarında farklılık tespit edilmemiştir. Bilindiği üzere *Bombyx mori*'nin baş kısmında bulunan ipek bezi bir glandular lümen şeklindedir. Arka bölümde fibroin proteinleri salgılanırken orta bölüme gelen bu salgı serisin tabakaları ile sarılır. İpek bezinin morfolojik yapısında uzun ve birçok kıvrım yapan lobların olduğu tespit edildi (şekil 3.18). Bu loblar çok sayıda salgılama tüpleri içermektedir. Salgılama tüplerinin kök kısmından uçlara doğru incelendiği görüldü. Burada üretilen ipek salgısı önce torba şeklindeki depo içerisine salgılanır. Fotoğraftan da görüldüğü gibi depo bölümü düz ve geniştir. Buradan ipek ince bir ipek kanalı yardımıyla dışarıya verilmektedir.



Şekil 3. 18 : a. *Bombyx mori* ırkına ait tırtılın baş kısmı (labium bezleri) **b.** ipek bezinin morfolojisi (X35)
c. ipek bezinde salgı tüplerinin morfolojisi (X100)

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

RAPD-PCR Çalışmaları: Son zamanlarda yüksek verim özelliğine sahip ırkların ıslahında genetik analiz yöntemleri klasik yetiştirme programları ile birlikte sıkça kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'nin üç yerli ipekböceği ırkı (Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı) laboratuvar imkanları ve uygulama avantajları nedeniyle RAPD-PCR tekniği ile analiz edildi. Üç yerli ipekböceği ırkı rasgele seçilen 40 Operon primeri ile tarandı. Bunlardan 7 tanesi ile elde edilen 68 RAPD bandı POPGENE paket programı ile değerlendirildi ve her üç yerli ırkta toplam 61 polimorfik lokus belirlendi. Elde edilen sonuçlar Alaca ve Bursa Beyazı (ılıman varyete) ırklarının birbirine yakın grup, Hatay Sarısı (tropik varyete) ırkının ise bu iki ırktan daha uzak bir grup olduğunu gösterdi.

Benzer şekilde yurt dışında yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle de farklı ipekböceği ırkları ılıman (ipek kalitesi yüksek) ve tropik ırklar (ipek kalitesi düşük) olmak üzere farklı gruplara ayrılabilmiştir. Örneğin Nagaraja ve Nagaraju (20), RAPD tekniğini 13 farklı ipekböceği ırkında genetik polimorfizmi belirlemede kullanmıştır. Bu araştırmacılar da 40 rasgele primer kullanmıştır. Bu primerlerden 5 tanesinin tropik ve ılıman varyeteler için ayırt edici olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Thanananta (78), 5 farklı morfolojik ırkı yılda iki-nesil veren (ılıman) ve çok-nesil veren (tropik) olmak üzere iki gruba ayırmıştır.

RAPD-PCR tekniği ipekböceğinin genetik analizinde de kullanılmıştır. Örneğin Promboon ve ark. (73), P₅₀ ve C₁₀₈ olarak adlandırılan ırkların aprazından elde edilen F₂ neslindeki 102 bireyi, 320 primerle tarayarak 243 polimorfik DNA bandı elde etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan birkaç çalışmadan da örnek verilirse; Iwanagaa ve ark. (66), *Bombyx mori*'nin atası olarak kabul edilen *Bombyx mandarina*'ya ait hücre hatlarını RAPD primerleri ile inceleyerek *Bombyx mori*'ye ait hücre hatları ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Murthy ve ark. (110), 5 multivoltin ipekböceği genotipi için 30 RAPD primerini kullanarak 73 oğaltılmış ürün elde etmişlerdir. Abe ve ark. (111), *Bombyx mori*'ye ait W kromozomunun özel DNA sekanslarının analizinde RAPD primerlerini kullanmışlardır. 12 tane W-özel RAPD belirleyici tanımlanmış ve başka organizmalara ait retrotranspozonlarla aminoasit sekans benzerliği olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler retrotranspozonların W kromozomunun temel yapısal bileşeni olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Bilindiği üzere, ancak birkaç moleküler teknikle desteklenen sonuçlar daha güvenli ve yeterli bilgi verir. Bu nedenle bazı araştırmacılar sonuçlarını desteklemek için diğer bazı tekniklerden de faydalanmışlar ve RAPD-PCR metodunun genetik varyasyonu belirlemede oldukça başarılı bir teknik olduğunu göstermişlerdir. Örnek olarak Nagaraju ve ark. (68), yukarıda belirtilen RAPD-PCR çalışmalarında (20) inceledikleri 13 farklı ipekböceği ırkının analizinde RFLP ve 3 tane PCR-temelli tekniği (RAPD, ISSR-PCR ve SSR tekniği) kullanmışlar ve önceki çalışma ile destekleyici bulgular elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu dört yaklaşım da 13 farklı ipekböceği ırkını tropik ve ılıman ırklar olmak üzere ayırt etmede faydalı olmuştur.

Moleküler tekniklerle ırka özgü bant profillerinin elde edilmesi ırkların karakterizasyonu için önemlidir. Benzer şekilde yerli ırklarımızın karakterizasyonu için ayırt edici bantların elde edilmesi de ileride yapılacak iyileştirme programları için önemli olacaktır. Bu çalışmada kullanılan RAPD primerlerinden OPN-05 primeri ile Alaca ve Bursa Beyazı ırklarında 900 bç'lik bant gözlenirken Hatay Sarısı ırkında bu bant gözlenmedi. OPL-18 primeri ise sadece Bursa Beyazı bireylerinde 225 bç, 800 bç ve 900 bç'lik bantlar oluşturdu. OPU-19 primeri ile sadece Hatay Sarısı'na ait bireylerde 650 bç'lik bant elde edildi. Daha önceki RAPD-PCR çalışmasında 23 adet primer kullanılmış (10) ve bunlardan **OPA-02** (800 bç) bantı sadece Hatay Sarısı ırkına ait bireylerde elde edilmişti. Benzer şekilde Nagaraja ve Nagaraju (20)'da **OPA-02**(800 bç) bantını sadece tropik ırklarda elde ettiklerini ve bu bantın belirleyici olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. **OPL-18** (225 bç, 800 bç, 900 bç) Bursa Beyazı ırkının (şekil 3. 1.), **OPN-05** (900 bç) Alaca ve Bursa Beyazı ırkının (şekil 3. 2.), **OPU-19** (650 bç) (şekil 3. 3.) ve **OPA-02** (800 bç) ise Hatay Sarısı ırklarının karakterizasyonunda belirleyici olarak kullanılabilir.

Bu çalışmadan elde edilen verilerin ipek kalitesi yönünden farklı olan üç yerli ırkın ılıman ve tropik varyeteler olarak ayrılmasında kullanılabilir olması yerli ipekböceği ırklarının moleküler karakterizasyonu açısından faydalı olabilecektir.

Serisin proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi: Dünyada *Bombyx mori*'nin kokonunda bulunan serisin proteini ile yapılmış çok çalışma vardır. Elektroforetik çalışmalar serisin proteinine ait sayılarca farklı uzunlukta ve farklı aminoasit içeriğinde polipeptidin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda serisin proteinlerinin SDS-PAGE ile moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir. Sprague (26) 20'den 220 kDa'a kadar moleküler ağırlığı değişebilen 15'den fazla polipeptidin olduğunu bildirmiştir.

Takasu ve ark., (27), kokondan serisin M (400 kDa), P (150 kDa), ve A (250 kDa) proteinlerini izole ederek SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarını tespit etmiştir. Takasu ve ark. (80), bir başka çalışmalarında *Bombyx mori*'nin orta ipek bezinin farklı bölgelerinden salgılanan 3 farklı serisin bileşenini SDS-PAGE yöntemi ile inceledikten sonra 400 kDa'luk serisin M ile 150 kDa'luk serisin P'nin birbirlerine aminoasit içeriği ile benzerken 250 kDa'luk serisin A'nın diğerlerine benzemediğini bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (102), *Bombyx mori*'ye ait serisin proteinin aminoasit analizini yapmışlar ve moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile tayin etmişlerdir. Serisinin 50-200 kDa arasında değişebilen farklı moleküler ağırlıklara sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Dash ve ark. (81), tropikal ipekböceği olan *Antheraea mylitta*'nın kokonundan serisin proteinini izole ederek SDS-PAGE ile incelemişlerdir. SDS-PAGE'de yaklaşık 200 kDa'luk bir bant oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca düşük moleküler ağırlığa sahip serisinlerin pupayı çevresel faktörlerden koruyabilirken yüksek moleküler ağırlığa sahip olan serisinlerin ise ipek direncini artırabildiğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde bu çalışmada da üç ırka ait kokonlardaki serisin proteinleri literatürde belirtildiği gibi elde edildi ve SDS-PAGE yöntemi ile beklenen 200 kDa'luk bantın oluştuğu gözlemlendi (şekil 3. 7.).

Kokonların morfolojisi: Taramalı elektron mikroskopta yapılan incelemeler sonucunda üç ırka ait bireylerin kokon fiber yapılarında belirgin farklılıklar tespit edildi. Alaca ve Hatay Sarısı ırklarında kokonu oluşturan fiberlerin daha gevşek dizilirken, ipek verimliliği daha yüksek olan Bursa Beyazında fiberlerin daha sıkı dizildiği gözlemlendi. Bunun yanı sıra fiberlerin yüzey yapılarında görülen farklılıklar da ilgi çekicidir. Bursa Beyazı ırkına ait fiberlerin yüzeylerinde çok sayıda girintili-çıkıntılı oyuk gözlenirken Alaca ve Hatay Sarısı ırklarına ait fiberlerin yüzeylerinde daha az oyuk gözlemlendi.

Mondal ve ark. (84), *Bombyx mori*'ye ait farklı saf ve hibrid ırklarına ait kokon filamentlerini SEM'de incelemiştir. Morfolojik çalışmalar, ırklar arasında şekil ve boyut açısından varyasyonun olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde Mondal ve ark. da iki nesil veren saf ırklarda (ılıman-ipek kalitesi yüksek) çok nesil veren saf ırklara (tropik- ipek kalitesi düşük) göre kokon fiberlerinin daha sık dizilimli olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer farklılığın ise fiberlerin yüzeylerindeki oyuk sayısı ve şekli olduğunu bildirmişlerdir. Örneğin, çok nesil veren ırklardaki oyuk sayısı iki nesil verenlere göre daha fazla görülmüştür. Bu çalışmada da Bursa Beyazı kokonlarının fiber yüzeylerindeki girinti çıkıntılarının diğer ırklara göre fazlalığı ilgi çekicidir. Sonuç olarak Mondal ve ark., oyuk sayısının ve şeklinin ipek kalitesinin tespiti için bir belirleyici olabileceği ve bu nedenle yetiştirme programlarında kullanılabilmesini açıklamıştır.

Fiberleri oluşturan oyukların varlığı diğer çalışmalarda da tespit edilmiştir. Narumi ve ark. (85), *Bombyx mori* ve *Bombyx mandarina*'nın kokon filamentlerinde oyukların varlığını tespit etmişlerdir. Narumi ve ark. (87), bir başka çalışmalarında yabani ipekböceği erkek bireylerinde dişi bireylere göre kokon filamentlerinde daha fazla sayıda ve daha büyük oyukların olduğunu tespit etmiştir. Bazı araştırmacılar da Mondal ve ark. gibi kokon filamentlerinde oyukların varlığını tespit ederek ipek verimliliği ile ilişkilendirmiştir. Örneğin Lin ve ark. (88), 5 yabani ipekböceğine ait kokon filamentlerinin SEM incelemeleri sonucunda oyukların varlığını tespit etmiş, bu oyukların verimli kokon yapısı için karakteristik olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgu farklı ipek kalitesine sahip ipekböceği ırklarının tanımlanması ve iyileştirme programlarında kullanılabilmesi için oldukça önemli olmuştur.

Benzer şekilde bu çalışmada da üç ırka ait kokon morfolojilerindeki farklılık ilgi çekicidir. SEM analizleri, fiber morfolojilerinin Hatay Sarısı ve Alaca'da birbirlerine benzerken Bursa Beyazında oldukça farklı olduğunu gösterdi. Hatay Sarısı koza rengi bakımından farklılık göstermesine rağmen mikroskobik morfolojisi ile beyaz renkli kozaya sahip Alaca'ya benzemektedir. İpek kalitesi daha yüksek olan Bursa Beyazı ırkında fiber diziliminin daha sık olması ve fiber yüzeyindeki oyukların daha fazla olması yerli ırkların morfolojik karakterizasyonu için önemlidir.

Serisini uzaklaştırılmış fiberlerin morfolojisi: Altman ve ark. (90), *Bombyx mori*'ye ait kokon fiberlerini 90°C'de 60 dakika kaynatarak SEM'de incelemiştir. Serisin tabakasının tamamen uzaklaşması ve alttaki fibroin tabakasının incelenebilmesi için bu metodun başarılı olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada da benzer şekilde serisin proteini uzaklaştırılmış fiberlerin morfolojik incelemelerinde üç ırk arasında farklılık tespit edilmedi. Çünkü örneklerin sodyum kakodilat tamponunda yıkanması ile üstteki serisin tabakası çözdürüldü. Elde edilen fotoğraflarda üç ırkın serisin proteinin tamamen uzaklaşmış olduğu ve kokon fiber yapılarında ırka özgü farklılığın ortadan kalktığı tespit edildi. Buradan serisin proteinin alttaki fibroin tabakasını sararak fibere özgü desen kazandırdığı anlaşılmaktadır.

Yumurta Morfolojisi: *Bombyx mori*'nin yumurta morfolojisi ile yapılmış çalışma sınırlı sayıdadır. Keino ve Takesue (95), erken gelişim fazındaki *Bombyx mori* yumurtalarını SEM'de incelemiş ve verimli yumurta yüzeyinin bir seri değişim geçirdiğini bildirmiştir. Yumurta yüzeyinin sayılarca parmak şeklinde mikrovillilerle dolu olduğunu açıklamıştır. Kumar ve ark. (96), Lepidoptera ailesine mensup bir ipekböceği türü olan *Antheraea assamensis* Helf.'in yumurta yüzeyini SEM ile incelemişlerdir. Bu araştırmacılar da yumurta yüzeyinde hava alış-verişini sağlayan ve aynı zamanda çevre ile yapılan gaz alışverişi

esnasında toz partiküllerinin ve patojenlerin girişini kontrol ettiği düşünülen mikropilar denilen parmak şeklinde deliklerin olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada üç ırka ait yumurta morfolojisindeki farklılık dikkat çekicidir. Alaca ırkının yumurta yüzeyindeki motif yapısı düzensiz olarak gözlenirken Bursa Beyazı ırkında motif yapısı oldukça düzenli olarak gözlemlendi. Hatay Sarısı ırkında da düzenli bir motif yapısı gözlemlendi. Ancak Bursa Beyazı'nda görülen belirgin petek yapılar Hatay Sarısı'nda o kadar net değildir. Yumurta morfolojisinde gözlenen ırklar arası farklılıklar ve yine Bursa Beyazı ırkının farklı bir morfoloji göstermesi ipekböceği ırklarının karakterizasyonu için kullanılabilir.

İpek bezlerinin morfolojisi: Üç ırka ait ipek bez yapılarında farklılık tespit edilmedi. *Bombyx mori*'nin baş kısmında bulunan ipek bezinin morfolojik yapısında uzun ve birçok kıvrım yapan lobların olduğu görüldü. Bu loblar parmak şeklinde olup kök kısmından uçlara doğru incelenerek çok sayıda salgılama tüplerini oluşturmuştur. Bu görüntülerden literatürde belirtildiği gibi salgılamanın tek yönlü olduğu anlaşılmaktadır. Burada üretilen ipek salgısı önce torba şeklindeki düz ve geniş olan depo içerisine salgılanır oradan da dışarıya çıkar. Gomes ve ark. (94), *Bombyx mori*'ye ait ipek bezi ile ilgili mikroskobik incelemelerinde salgılamanın lümenin merkezinde izotropik olduğunu açıklamışlardır. Yani merkezi salgılamanın ön bez bölgesinde bir organizasyon göstererek tek yönlü olduğunu bildirmişlerdir. Akai ve ark. (112), glandular lümende başlayan salgının makromoleküler düzeyde paketlenildiğini bildirmiştir. Arka ipek bezinden üretilen salgının fibroin proteinleri olduğunu orta ipek bezi bölümünde ise serisinlerle bu fibroin tabakasının sarıldığını açıklamıştır. Zacarin ve ark. (105), ipek oluşum mekanizmasında Hymenoptera ve Lepidoptera için iki basamağın benzer olduğunu açıklamıştır: Bunlar lümen içinde protein polimerizasyonunda tipik yapıların oluşması ve bu yapılar arasından ipek bezi boyunca

çözünmeyen ve iyi düzenlenmiş ipek filamenti oluşumudur. Sasaki ve Tashiro (92), *Bombyx mori*'nin arka ipek bezi hücreleri ile ilgili SEM ve ışık mikroskopunda ayrıntılı bir çalışma yaparak fibroini salgılayan iki çeşit hücre grubunu tespit etmiştir. Bunlar halkasal ve radyal mikrotübül sistem olarak tanımlanmıştır. Her ne kadar ipeğin fiziksel özellikleri ve yapısı ile ilgili çok çalışma yapılmış olsa da hala ipeğin yapısı ile ilgili cevaplanamamış sorular vardır.

Türkiye'de Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı olmak üzere yetiştirilen üç yerli ırk vardır. Bunların korunarak devamlılığı Bursa İpekböcekçiliği Araştırma Enstitüsü tarafından gerçekleştirilirken 2004 yılında Enstitü'nün kapatılmasıyla bu görevi şimdilik Bursa İl Tarım Müdürlüğü üstlenmiştir. Türkiye'de ham ipek üretimi için ekonomik kaygılardan dolayı yerli ipekböceği ırklarından ziyade Japon x Çin ipekböceği ırklarının hibritleri tercih edilmektedir. Bu durum dışarıya bağımlılığı sürekli kılmaktadır. Türkiye'nin coğrafik koşullarına uyumlu bu üç yerli ırkın ıslah programları ile iyileştirilmesi dışarıya bağımlılığı ortadan kaldırarak ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır. Yerli ırkların ıslah programlarına hazırlanabilmesi için öncelikle bu ırkların karakterizasyonu gereklidir. Türkiye'de ipekböceği üzerine bazı çalışmalar vardır. Ancak bu çalışmalar yerli ırklarla ilgili değildir. Bu çalışmada Türkiye'nin üç yerli ipekböceği ırkı RAPD-PCR metodu kullanılarak moleküler düzeyde analiz edildi ve taranan primerler için genetik polimorfizm belirlendi. Taranan primerlerle üç yerli ırkta ayırt edici RAPD-DNA bantları elde edildi. Irka özgü DNA band profillerinin artırılması ancak ırk gen havuzlarının farklı metodlarla da taranması ile mümkün olacaktır.

Ayrıca bu çalışma ile yerli ipekböceği ırklarının detaylı morfolojik karakterizasyonu ilk defa yapıldı. Morfolojik veriler moleküler verileri destekler niteliktedir. İpek kalitesi daha yüksek olan Bursa Beyazı ırkının diğer ırlardan farklı bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi. Üç yerli ipekböceği ırkının morfolojisinde gözlenen ayırt edici farklılıklar ipekböceklerinin karakterizasyonu için önemlidir. Bu çalışmadan elde edilen moleküler ve morfolojik veriler ileride yerli ipekböceği ırkları için uygulanacak ıslah programlarının belirlenmesinde yararlı olacaktır. Türkiye'nin potansiyel ekonomik gen kaynaklarından biri olan yerli ipekböceği ırklarının gelecekteki ıslah programlarında kullanılabilmesi için kurumsal olarak acilen koruma altına alınması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- (1) Nagaraju, J., Goldsmith, M. R., Silkworm genomics-progress and prospects. *Current Science*. 83 (4): 415-425, 2002.
- (2) Nagaraju, J. G., Singh, L., Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm, *Bombyx mori*. *Electrophoresis*. 18, 1676-1681, 1997.
- (3) Nagaraju, J., Application of genetic principles for improving silk production. *Current Science*. 83(4): 409-414, 2002.
- (4) Nirmala, X., Mita, K., Vanisree, V., Zurovec, M., Sehnal, F., Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*. 10 (5): 437-445, 2001.
- (5) Zhang, Y.Q., Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances*. 20, 91-100, 2002.
- (6) Prudhomme, J. C., Couble, P., Perspectives in silkworm (*Bombyx mori*) transgenesis. *Current Science*. 83 (4): 432-438, 2002.
- (7) Craig, C. L., Riekkel, C., Comparative architecture of silks, fibrous proteins and their encoding genes in insects and spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 133, 493-507, 2002.
- (8) Zurovec, M., Yang, C., Kodrik, D., Sehnal, F., Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. *J. Biol. Chem*. 273 (25): 15423-15428, 1998.
- (9) Tan, Y. D., Wan, C., Zhu, Y., Lu, C., Xiang, Z., Deng, HW, An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*. 157 (3): 1277-1284, 2001.
- (10) D. Eroğlu, Türkiye'nin Üç Yerli İpekböceği Irkının (Bursa Beyazı, Alaca ve Hatay Sarısı) RAPD-PCR Yöntemi ile Moleküler Genetik Analizi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2005.

- (11) Demirsoy, A., Yaşamın Temel Kuralları. Entomoloji. Ankara, 1992.
- (12) M. Aslani, İpek Fibroininin Seyreltik Sulu Çözeltilerden Uranyum Kazanımında Kullanılabilirliğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, 1993.
- (13) N. Onar, Protein Liflerinin (yün, ipek) Terbiyesinde Enzimlerin Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 2003.
- (14) G. Turgay, İpekböceği (*Bombycidae: Bombyx mori*)' nin Farklı Genomik İçerikli Yumurtalarında Bazı Protein Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir, 2001.
- (15) Yumuşak Ç., Fibrilyar Biyopolimerlerin (İpek Fibroini ve Yün Keratini) Serbest Radikalli ve Dinamik-Mekanik Yıpranma Özelliklerine Dış Faktörlerin (Nem, UV ışınları ve Sıcaklık) Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2001.
- (16) Akbaba, G., Dut yaprağından ipeğe ipekböceği. Bilim ve Teknik. 378, 98-100, 1999.
- (17) Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, İpekböceği Yetiştiriciliği, Hayvancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu.
- (18) http://www.tagem.gov.tr/hgk/milli_irk_tescil_listesi_taslagi_ipekbocegi (erişim tarihi: 10. 03. 2004)
- (19) Nagaraju, J., Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. A review, 1-12, 2003.
- (20) Nagaraja, G. M., Nagaraju, J., Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. Electrophoresis. 16, 1633-1638, 1995.
- (21) Şeref, İ., İpekböceği yetiştiriciliği bilgisi, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2000.
- (22) Zhou, C. Z., Confalonieri, F., Medina, N., Zivanovic, Y., Esnault, C., Yang, T., Jacquet, M., Janin, J., Duguet, M., Perasso, R., Li, Z. G., Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. Nucl. Acids. Res. 28 (12): 2413-2425, 2000.

- (23) Putthanarat, S., Stribeck, N., Fossey, S. A., Eby, R. K., Adams, W. W., Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer*. 41, 7735-7740, 2000.
- (24) Zurovec, M., Kodrik, D., Yang, C., Sehnal, F., Scheller, K., The P25 component of *Galleria* silk, *Mol. Gen. Genet.*, 257, 264 -270, 1998.
- (25) Tsujimoto, K., Takagi, H., Takahashi, M., Yamada, H., Nakamori, S., Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J. Biochem.* 129, 979-986, 2001.
- (26) Sprague, K., The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*. 14, 925-931,1975.
- (27) Takasu, Y., Yamada, H., Saito, H., Tsubouchi, K., Characterization of *Bombyx mori* Sericins by the Partial Amino Acid Sequences. *Journal of Biotechnology and Sericology*. 74, 103-109, 2005.
- (28) http://www.koksav.org.tr/ebulten/eyl-ek-kas2008/081127_hk_ekaraca.html (erişim tarihi: 25. 07. 2009)
- (29) Klug, W. S., Cummings, M. R., *Genetics*. Palme Yayınevi, Ankara, 2002.
- (30) Tinker, N. A., Fortin, M. G., Mather, D. E., Random amplified polymorphic DNA pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85, 976-984, 1993.
- (31) F. A. Budak, Karayaka, Sakız ve Bafra Koyun Irklarının RAPD-PCR Yöntemi ile Moleküler Genetik Analizi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2003.
- (32) Schall, B. A., Leverich, W. J., Rogstad, S. H., Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology, In: Falk D. A. Holsinger K. E. (eds). *Genetics and conservation of rare plants*. 123, New York Oxford University Press, 1991.
- (33) Mullis, K. B., Faloona, F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350, 1987.

- (34) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase. *Science*. 239 (4839): 487-491, 1988.
- (35) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354, 1985.
- (36) Marques, C. M., Araujo, J. A., Ferreira, J. G., Whetten, R.O' Malley, D. M., Liu, B. H., Sederoff, R., AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. Tereticomis*. *Theor. Appl. Genet.* 96, 727-737,1998.
- (37) Zabeau, M., Vos, P., Selective Restriction Fragment Amplification general method for DNA fingerprinting European patent application. No: 0534858, 1993.
- (38) Parsons, Y. M., Shaw, K. L., Mapping unexplored Genomes: genetic linkage map of the Hawaiian Cricket *Laupala*. *Genetics*. 162(3): 1275-1282, 2002.
- (39) Weising, K., Atkinson, R. G., Gardner, R. C., Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evulation. *PCR Methods and Application.Genome Res.* 4, 249-255, 1995.
- (40) Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L., Hypervariable " minisatellite" regions in Human DNA. *Nature*. 314, 65-73, 1985a.
- (41) Nakamura, Y., Lathrop, M., O'Connell, P., Leppert, M., Barker, D., Wright, E., Skolnick, M., Kondoleon, S., Litt, M., Lalouel, J. M., Whitei, R. A mapped set of DNA markers for human chromosome 17. *Genomics*. 2(4): 302-309, 1988.
- (42) Litt, M., Luty, J. A., A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat with in the cardiac muscle Actin gene. *Am. J. Hum. Genet*, 44(3): 397-401, 1989.
- (43) Tautz, D., Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17(16): 6463-6471, 1989.

- (44) Weber, J. L., May, P.E., Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44(3): 388-396, 1989.
- (45) Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millassean, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., Weissenbach, J., The 1993-94 Genethon human linkage map. *Nature Genetics.* 7, 246-339, 1994.
- (46) Amos, B., Schlötterer, C., Tautz, D., Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science.* 260 (5108): 670-672, 1993.
- (47) G. Güneren, Polimeraz Zincir Reaksiyonları İle Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Parmakizi Yöntemi'nin (RAPD-PCR) Türkiye Yerli Sığır Irklarında Uygulanma Olanakları. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 1999.
- (48) Primmer, C. R., Borge, T., Lindell, J., Saetre, G. P., Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avran genome. *Molecular Ecology.* 11(3): 603-612, 2002.
- (49) Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics.* 22, 231- 238, (1999).
- (50) Hacia, J. G., Fan, J. B., Ryder, O., Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Genetics.* 22, 164-167, 1999.
- (51) Lindblad, T.K., Winchester, E., Daly, M. J., Large-scale discovery and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the Mouse. *Nature Genetics.* 24, 381-386, 2000.
- (52) Clark, A. G., Lanigan, C. M. S., Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10, 1096-1111, 1993.
- (53) Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 218, 704-740, 1993.
- (54) Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18(22): 6531- 6535, 1990.

- (55) Kernodle, S. P., Cannon, R. E., Scandalios, J. G., Concentration of primer and template qualitatively affects products in Random- Amplified Polymorphic DNA PCR. *Nucleic Acids Research*. 14(3): 362-364, 1993.
- (56) Schierwater, B., Ender, A., Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*. 21(19): 4647-4648, 1993.
- (57) Ali, B. A., Genetics similarity among four breeds of sheep in Egypt detected by random amplified polymorphic DNA markers. *African Journal of Biotech*. 2, 194-197, 2003.
- (58) Caetano, A. G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M., DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. 9, 553- 557, 1991.
- (59) Gustine, D. L., Voigt, P. W., Brummer, E. C., Papadopoulos, Y. A., Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. Published in *Crop. Sci*. 42, 343-347, 2002.
- (60) Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B., Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol*. 1(1): 55-63, 1993a.
- (61) Whitkus, R., Doebley, J., Wendel, J. F., Nuclear DNA markers in plants. Amsterdam. The Netherlands: Kluwer, 1994.
- (62) Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 280, 1077-1082,1998.
- (63) Cushwa, W. T., Doods, K. G., Crawford, A. M., Medrano, J. F., Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. *Mammalian Genome*. 7(8): 580-585, 1996.
- (64) Ünal, H., Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Bio 408 Deneysel Biyokimya II, Laboratuvar Notları, 2009.
- (65) Ünlüsayın, M., Erdilal, R., Çağatay, T., Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler. *Journal of FisheriesSciences.com*. 3(4): 298-309, 2009.

- (66) Iwanagaa, M., Araia, R., Shibanoa, Y., Kawasakia, H., Imanishib, S., Establishment and characterization of the *Bombyx mandarina* cell line. *Journal of invertebrate pathology*. 101(2): 124-129, 2009.
- (67) Rao, N. S., Nath, S.B., Bhuvanewari, G., Raje, U. S., Genetic diversity and phylogenetic relationships among microsporidia infecting the silkworm, *bombyx mori*, using random amplification of polymorphic DNA: Morphological and ultrastructural characterization. *Journal of invertebrate pathology*. 96(3): 193-204, 2007.
- (68) Nagaraju, J., Reddy, K. D., Nagaraja, G. M., Sethuraman, B. N., Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*. 86, 588-597, 2001.
- (69) Nagaraju, J., Kathirvel, M., Subbaiah, E. V., Muthulakshmi, M., Kumar, L. D., FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for highthroughput genotyping and genetic mapping. *Molecular and Cellular Probes*. 16, 67-72, 2002.
- (70) Nagaraju, J., Sharma, A., Sethuraman, B. N., Rao, G. V., Singh, L., DNA fingerprinting in silkworm *Bombyx mori* using banded krait minor satellite DNA-derived probe. *Electrophoresis*. 16, 1639-1642, 1995.
- (71) Sharma, A., Niphadkar, M. P., Kathirvel, P., Nagaraju, J., Singh, L., DNA fingerprint variability within and among the silkworm *Bombyx mori* varieties and estimation of their genetic relatedness using Bkm-derived probe. *J. Hered.* 90, 315-319, 1999.
- (72) Reddy, K. D., Abraham, E. G., Nagaraju, J., Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism and strain characterization. *Genome*. 42, 1057-1065, 1999.
- (73) Promboon, A., Shimada, T., Fujiwara, F., Kobayashi, M., Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet. Res.* 66, 1-7, 1995.
- (74) Shi, J., Heckel, D. G., Goldsmith, M. R., A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphism. *Genet. Res.* 66, 109-126, 1995.

- (75) Yasukochi, Y., A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori* covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*. 150, 1513-1625, 1998.
- (76) Chatterjee, S. N., Pradeep, A. R., Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield and origin of the silkworm, *Bombyx mori* L. in India. *Genetika*. 39(12): 1612-1624, 2003.
- (77) Chatterjee, S. N., Mohandas, T. P., Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. *Genome*. 46(3): 438-447, 2003.
- (78) Thanananta, N., RAPD Technique in silkworm (*Bombyx mori*): strain differentiation and identification. *Thammasat Int. J. Sc. Tech.* 2, 47-51, 1997.
- (79) Li, M., Hou, C., Miao, X., Xu, A., Huang, Y., Analyzing Genetic Relationships in *Bombyx mori* Using Intersimple Sequence Repeat Amplification. *Journal of Economic Entomology*. 100 (1): 202-208, 2007.
- (80) Takasu, Y., Yamada, H., Tsubouchi, K., Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (12): 2715-2718, 2002.
- (81) Dash, R., Mukherjee, S., Kundu, S.C., Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Indian Institute of Technology*. 1-7, 2006.
- (82) Adachi, T., Tomita, M., Shimizu, K., Ogawa, S., Yoshizato, K., Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase α -subunits and human collagens in posterior silk glands: production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *Journal of Biotechnology*. 126, 205-219, 2006.
- (83) Poza, P., Rigueiro, J.P., Elices, M., Lorca, J.L., Fractographic analysis of silkworm and spider silk. *Engineering Fracture Mechanics*. 69, 1035-1048, 2002.
- (84) Mondal, M., Trivedy, K., Kumar, S.N., Kumar, V., Scanning electron microscopic study on the cross sections of cocoon filament and degummed fiber of different breeds /hybrids of mulberry silkworm, *bombyx mori* Linn. *Journal of entomology*. 4(5): 362-370, 2007.

- (85) Narumi, T., Kobayashi, M., Mori, T., Fine structure of cocoon filament of silkworms. In: wild silkmoths'91. Int. Soc. wild silkmoths. Tsukuba, Japan. 179-185, 1992.
- (86) Narumi, T., Kobayashi, M., Mori, T., Electron microscopic observations of voids in cocoon filaments of silk-spinning moths. J. Seric. Sci. Jpn. 62, 489-495, 1993.
- (87) Narumi, T., Shimada, T., Koyayashi, M., The fine structure of cocoon filaments in wild silkmoth, *Loepa katinka sakaei* inoue. Int. J. wild silkmoth and silk. 1, 22-25, 1994.
- (88) Lin, Y., Liou, T., Liu, C., Liu, Y., Wu, T., Chang, Y., An introduction to Taiwan wild silkworms. In: wild silkmoths'92. International society for wild silkmoths. Tsukuba, Japan. 105-114, 1993.
- (89) Hirabayashi, K., Ishikawa, H., Kakudo, M., sen-I. Gakkaishi, 25, 440-443, 1969.
- (90) Altman, G.H., Horan, R.L., Lu, H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J.C., Kaplan, D., Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials. 23, 4131-4141, 2002.
- (91) Zhang, H., Magoshi, J., Becker, M., Chen, J. Y., Matsunaga, R., Thermal properties of *Bombyx mori* silk fibers. Journal of Applied Polymer Science. 86, 1817-1820, 2002.
- (92) Sasaki, S., Tashiro, Y., Studies on the posterior silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. The Journal of Cell Biology. 71, 565-574, 1976.
- (93) Victoriano, E., Gregorio, E.A., Ultrastructure of the Lyonet's glands in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). Biocell. 28(2): 165-169, 2004.
- (94) Gomes, G., Silva-Zacarin, E.C.M, Zara, F. J., Regina, L.M. Moraes, S., Caetano, F. H., Macromolecular array patterns of silk gland secretion in social Hymenoptera larvae. Genet. Mol. Res. 3 (3): 309-322, 2004 .
- (95) Keino, H., Takesue, S., Scanning electron microscopic study on the early development of silkworm eggs (*Bombyx mori* L.). Develop., Growth and Differ. 24(3): 287-294, 1982.

- (96) Kumar, V., Kamble, C., Scanning electron microscope study on the egg chorion of silkmoth, *Antheraea assamensis* Helf. (Lepidoptera : Saturniidae). *Animal Biology*. 58(2): 235-244, 2008.
- (97) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1989.
- (98) Cushwa, W. T., Medrano, J. F., Identification of RAPD genetic markers in sheep. *Proc. 5th. World Congress Genet. Appl. Livestock Prod.* 21: 133-143, 1994.
- (99) Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H., Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step Protocol. *BioTechniques*. 23, 504-510, 1997.
- (100) Wittwer, C. T., Garling, D. J., Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques*. 10, 76-80, 1991.
- (101) Nei, M., *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- (102) Zhang, Y., Tao, M., Shen, W., Zhou, Y., Ding, Y., Ma, Y., Zhou, W., Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*. 1-9, 2003.
- (103) Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685, 1970.
- (104) www.ciwemb.edu/labs/koshland/protocols/protein/sdspage.html (erişim tarihi: 12. 05. 2009)
- (105) Zacarin, E., Moraes, R., Taboga, S.R., Silk formation mechanisms in the salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). *J.Biosci.* 28(6): 101-112, 2003.
- (106) Zara, F.J. , Caetano, F. H. , Ultramorphology and histology of the larval salivary gland of *Pachycondyla villosa* (Fabricius) (Hymenoptera: Formicidae, Ponerinae). *Neotrop. Entomol.* 32(1): 59-68, 2003.

- (107) Hayat, MA., Principles and techniques of electron microscopy. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1981.
- (108) Yıldız, K., Çavuşoğlu, K., A., Scanning Electron Microscope Examination of *Heligmosomum costellatum*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28, 569-573, 2004.
- (109) Ekinçi, R, Ekinçi, N., An alternative method for the determination of element concentrations in Schizophrenic, Lung cancer and Leukemia patients Bloods. Spectroscopy and Radiative Transfer. 86, 379-385, 2004.
- (110) Murthy, B.C., Prakash, B.M., Puttarahu, H.P., Fingerprinting of non-diapausing silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. Cytologia. 71(4): 331-335, 2006.
- (111) Abe, H., Yasukochi, Y., Oshihi, T., Shimada, T., Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. Cytogenetic and Genome Research. 110: 144-151, 2005.
- (112) Akai, H., Imai, I., Tsubouchi, K., Fine structural changes of liquid silk in the silk gland during the spinning stage of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 56, 131-137, 1987.

EK

* RAPD Data Set *

Number of populations = 3

Number of loci = 68

Locus name :

OPL12-1 OPL12-2 OPL12-3 OPL12-4 OPL12-5 OPL12-6 OPL12-7 OPL12-8 OPL12-9 OPL12-10
OPL12-11 OPL12-12 OPL12-13 OPL12-14 OPL12-15 OPL12-16 OPL12-17 OPL12-18 OPL12-19
OPL18-1 OPL18-2 OPL18-3 OPL18-4 OPL18-5 OPL18-6 OPL18-7 OPL18-8 OPL18-9 OPL18-10
OPL18-11 OPL18-12 OPL18-13 OPL18-14 OPL18-15
OPN05-1 OPN05-2 OPN05-3 OPN05-4 OPN05-5 OPN05-6 OPN05-7
OPU19-1 OPU19-2 OPU19-3 OPU19-4 OPU19-5 OPU19-6 OPU19-7 OPU19-8 OPU19-9 OPU19-10
OPU19-11 OPU19-12
OPY11-1 OPY11-2 OPY11-3 OPY11-4 OPY11-5 OPY11-6 OPY11-7
OPY13-1 OPY13-2 OPY13-3
OPY15-1 OPY15-2 OPY15-3 OPY15-4 OPY15-5

name = ALACA

fis = -0.238

0000110010100000100 000110100100000 0100110 000110000110 011 10011
0000110010110000000 000110100100000 1000110 100110000110 1100110 011 10011
0000100001000000000 000000100110000 000111000100 0010110 ... 10011
0000110010100000100 000100100110000 1100110 000110001100 0000110 011 10011
0000110010100000100 000110100110000 1100110 000110000100 1100110 011 10011
0000110001000000100 001100101100000 1000110 000111010100 0000110 011 10011
0000100000000000000 001000100100000 0100110 000110010100 1100110 011 10011
0000110001000000100 000110100100000 1000110 000110010100 0000110 011 10011
0000100001000000100 000000000100000 1000110 000110010100 0010110 011 10010
0000100001010000000 0100111 000110010100 0010110 ... 10010
0010100000100000000 1000001 000110010100 0000110 011 10010
0000100000000000000 1100010 000110010100 10010
..... 000100100100000 0100010 1100110 011 10011
0000110000100000000 000100100100000 0100010 000110010100 0000110 011 10010
0000110000100000000 001100001100000 1100111 000110010100 0100110 011 10011
0000100000000000000 000100001100000 0100010 000110010100 0100110 011 10011
0000110001100000100 001100001100000 1000110 100110010100 0100110 011 10010
0000110000000000100 000110000000000 1100110 100111000100 1100110 011 10010
0000100001011000110 1000011 100111000100 011 10011

0000100001010000110 000110000000000 1000011 000111000100 1000110 011 10010

name = BURSA BEYAZI

fis = 0.0

0100100000000000000 100100010100001 010111000100 1100111 011 10011
0010100000000000000 000100110000101 1000110 011 10011
0001100000000000000 000100010100101 000111000100 1000110 011 10011
0000100000000000000 001101010000101 000111000100 1000110 011 10011
0000100100000000000 000100000100000 0100110 000111000100 1000110 011 10011
0000100000000000000 000110100100100 0100010 000111000100 0100110 001 10011
0000110100000000000 0100010 0000110 ... 10011
0000100100000000000 000100110100101 0100010 000110000100 0000110 ... 10011
0000100010000000000 100110010100101 0100000 000110010100 0000110 ... 10011
1010100000000000000 000100010100101 0100000 000010000100 0000110 ... 00011
1010100000000000000 000100010100101 0100000 000010010100 1100110 ... 00011
0100100000000000000 000100010100101 1100000 000010010100 011 10011
0000100000000000000 100100010100101 0100000 000111010100 1100110 011 10011
0000100000000000000 100100010100101 0100000 000011010100 0100110 ... 10011
0010100000000000000 100111000100101 000011000100 0100110 111
0000100000000000000 000000010100101 0100000 0000110 111
0000100000000000000 000100010100101 010010000100 1100110 111 10011
0000100000000000000 100101000100000 0100010 000010010100 1100110 111 10011
0000100000000000000 100111000100101 0100010 000010010100 111 10011
0000100000000000000 100110100100101 010111000100 111

name = HATAY SARISI

fis = 0.0

0000100010000001000 011110100110010 000110100100 1101111 111 10011
00101000000000001000 011110100100010 1001100 000110100100 1101111 111 10011
0010100000100000000 011100100100000 1001100 000110100100 1101111 011 10110
0000101000000000000 011100100100000 000110100100 0100110 111 11111
0110100010110010001 000010100110000 1001100 010110000110 1100111 111 10111
0000100010110100011 000100100100000 1011000 000010000100 1100111 111 10011
0010100000000000000 000100000100000 1010100 000010000000 1100111 111 10011
0110100000000000000 010110101000000 1011000 000110100100 1100111 111 10011
0110100000000000000 000010100100010 1010000 1100111 111 10011
0110100000000000000 000100100100000 1010000 010110100100 1100111 111 10011

01101000000000000000 000100100100000 1010000 000010100100 1100111 111 10011
01101000000000001000 000100100100000 1011100 000010000000 1100111 011 10011
00001000100000000000 000100100100000 1010100 000010000000 1100110 011 10011
01001000000000000000 001100100100000 1010100 000110100100 1100111 111 10011
01101000000000000000 000110100100000 1010100 001110100100 1100111 111 10011
01101000000000000000 000110100100000 1010100 001110100100 1100111 111
00001000000000000000 010110100100000 1010100 000010000100 1100110 011 00011
00001000000000000000 010110100100000 1000000 000010000100 1100110 011 10011
00001000000000000000 000100100100000 1010000 000110000100 1100111 011 10011
..... 000100100101010 1010000 000110100100 1100111 011 10011

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Demet EROĞLU AKKIR

Doğum Tarihi : 04 . 07. 1980

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Anabilim Dalı Doktora tamamlandı, 2005-2010.

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 1998-2002.

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Anabilim Dalı, 2002-2005.

Yayımları (SCI) : -

Yayımları (Diğer) :

Eroğlu, D., Arıca, Ç.Ş., Molecular Genetic Analysis of Three Turkish Local Silkworm Breeds (Bursa Beyazı, Alaca and Hatay Sarısı) by RAPD-PCR Method. Journal of Applied Biological Sciences. 2 (3): 01-04, 2009

Çakır, Ş., Eroğlu, D., Insektisidlerin Ekosisteme Etkisi: Böceklerde Direnç. V. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Bolu 2004, s.391-397, 2004.

Çakır Ş., Eroğlu D., İpekböceği Yetiştiriciliği ve Önemi. Tabiat Ve İnsan Dergisi. 1(2): 59-64, 2004.

Araştırma Alanları : Üç yerli ipekböceği ırkının bazı (Alaca, Bursa Beyazı ve Hatay Sarısı) moleküler ve morfolojik özellikleri.