

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-DR-004

TÜRKİYE'DEKİ ALABALIKLARIN (*Salmo trutta* L.)
MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

Nazan ÖZEN

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Nazan ÖZEN tarafından hazırlanan “Türkiye’deki Alabalıkların (*Salmo trutta* L.) Moleküler Filogenisi ” başlıklı tez,tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	:Prof. Dr. İslam GÜNDÜZ	Ondokuz Mayıs Üniv.	
Üye	: Prof. Dr.Fevzi BARDAKCI	Adnan Menderes Üniv.	
Üye	: Prof. Dr.Celal ÜLGER	Adnan Menderes Üniv.	
Üye	: Yrd. Doç. Tülin ARSLAN	Muğla Sıtkı Koçman Üniv.	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ	Ordu Üniv	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../200...

Nazan ÖZEN

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ ALABALIKLARIN (*Salmo trutta* L.) MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

Nazan ÖZEN

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

2013, 72 sayfa

Salmo trutta L. Avrasya ve Kuzey Afrika'da bulunan doğal bir salmonid türüdür. Türün doğal yayılış alanı Norveç'in kuzeyinden Kuzey Afrika'daki Atlas dağlarına kadar uzanmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'deki *Salmo trutta* L. popülasyonlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla mitokondrial D-loop (displacement loop) ile nükleer DNA ITS1 bölgeleri kullanılmıştır. Mitokondri DNA verilerinin analizinde daha önceki çalışmalarda kullanılan diziler GenBank'tan alınarak çalışmaya eklenmiştir. Sonuçta altı ana soy hattı tanımlanmış ve bunlardan dört soy hattının (Adriyatik, *marmoratus*, Tigris, Danubian) Türkiye'de bulunduğu belirlenmiştir. *marmoratus* soy hattının varlığı ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur. Mitokondri DNA verileri ve nükleer DNA verileri birlikte kullanılarak daha doğru filogenetik çıkarsamalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler özellikle Danubian soy hattı ile Adriyatik ve Tigris soy hattı arasında ikincil temasların olduğunu desteklemiştir. Bu çalışma Türkiye'deki alabalık popülasyonlarının yüksek derecede çeşitlilik gösterdiğini ve eşsiz bir genetik profile sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: *Salmo trutta* L., mitokondrial DNA, nükleer DNA, filogeni, Türkiye

ABSTRACT

MOLECULAR PHYLOGENY OF BROWN TROUTS (*Salmo trutta* L.) IN TURKEY

Nazan ÖZEN

Ph. D. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

2013, 72 pages

Salmo trutta L. is a native salmonid species with a range from Eurasia and North Africa. Its natural range extends from northern Norway to the Atlas Mountains of North Africa. In this study, mitochondrial displacement loop (D-loop) and nuclear DNA ITS1 were used for determining the phylogenetic relationships of *Salmo trutta* L. in Turkey. Mitochondrial DNA data was analysed by combining the sequences of the same mitochondrial DNA region deposited in GenBank belonging to brown trout lineages from other geographic regions. As a result, six main evolutionary lineages were defined, and it was determined that four of them (Adriatic, *marmoratus*, Tigris, Danubian) are existed in Turkey. The existence of *marmoratus* lineage was reported in this study for the first time. Phylogenetic inferences has been made by evaluating both mitochondrial and nuclear DNA sequence data. The results of this study indicated the secondary contacts, especially among Danubian, Adriatic and Tigris lineages. In addition, the lineages of Turkish brown trout populations are highly divergent and mainly have a unique genetic structure.

Key words: *Salmo trutta* L., mitochondrial DNA, nuclear DNA, phylogeny, Turkey

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu süreçte bana yol gösteren, tezin bu şeklini almasında emekleri geçen tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. İslam GÜNDÜZ'e, Prof. Dr. Celal ÜLGER'e, filogenetik analizleri gerçekleştirmem esnasında desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Ferhat KİREMİT'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım örneklerin temininde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Davut TURAN ve Yrd. Doç. Dr Tülin ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım hep yanımda olan, tez çalışmam süresince moral ve motivasyon desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Yüksek Lisans Öğrencisi Erinç ŞEN'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince almış olduğum TÜBİTAK 2211 Doktora Bursu için TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan, gösterdikleri desteği asla unutmayacağım çok sevgili eşime ve aileme de sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Alabalık Soy Hatları.....	2
1.1.1. Akdeniz-Adriyatik Bölgesindeki Alabalık Çeşitliliği	5
1.1.2. Atlantik Bölgesindeki Alabalık Çeşitliliği	6
1.1.3. Karadeniz, Hazar Denizi ve Aral Denizi Havzalarındaki Alabalık Çeşitliliği.....	6
1.2. Moleküler Belirteçler	7
1.2.1. Allozim Elektroforezi.....	8
1.2.2. Mikrosatellitler ve Diğer Tekrarlı DNA Dizileri	8
1.2.3. mtDNA ve nDNA	9
1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	12
1.4. Türkiye'deki Alabalıkların Moleküler Varyasyonu	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Alabalık Örneklerinin Toplanması.....	19
3.2. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	23
3.3. Total DNA İzolasyonu	23

3.4. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi	24
3.5. DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
3.6. Mitokondri D-loop bölgesi ve Nükleer ITS1 Bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması.....	25
3.6.1. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	27
3.7. Dizi Reaksiyonu ve Dizilerin Elde Edilmesi.....	28
3.8. Dizilerin Okunması	28
3.9. Veri Analizleri.....	29
3.9.1. Dizilerin Hizalanması.....	29
3.9.2. Analizlerde Kullanılacak Veri Setlerinin Hazırlanması	30
3.9.3. Filogenetik Analizler: Uzaklık (Distance) Analizi.....	31
3.9.4. Filogenetik Analizler: Maksimum Parsimoni (Tutumluluk) Analizi	31
3.9.5. Filogenetik Analizler: Maksimum Olasılık (Likelihood) Analizi	32
3.9.6. Filogenetik Analizler: Bayesian Analizi.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. mtDNA D-loop Bölgesi.....	33
4.1.1. Dizi Kompozisyonu.....	33
4.1.2. Filogenetik Analizler	35
4.2. nDNA ITS1 bölgesi.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER DİZİNİ

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AT	Atlantik
DA	Danubian
AD	Adriyatik
ME	Mediterranean
MA	<i>marmoratus</i>
mtDNA	Mitokondrial DNA
nDNA	Nükleer DNA
D-loop	Displacement loop
ITS1	Internal transcribed spacer 1
VNTR	Variable Numbers of Tandem Repeats
TBE	Tris Borik Asit EDTA
PCI	Fenol-Kloroform-İzoamil alkol
CI	Kloroform-İzoamil alkol
Dxy	Ham DNA Çeşitliliği
Da	Net DNA Çeşitliliği
ML	Maksimum Likelihood
MP	Maksimum Parsimoni
K2P	Kimura 2 Parameter
JC	Jukes and Cantor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. AT soy hattının coğrafik dağılımı.....	3
Şekil 1.2. DA soy hattının coğrafik dağılımı.....	3
Şekil 1.3. ME soy hattının coğrafik dağılımı.....	4
Şekil 1.4. MA soy hattının coğrafik dağılımı.....	4
Şekil 1.5. AD soy hattının coğrafik dağılımı.....	5
Şekil 1.6. mtDNA.....	10
Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı lokaliteler.....	20
Şekil 3.2. Hedef PZR ürünleri.....	28
Şekil 3.3. BioEdit 7.0.9 programı tarafından bir DNA dizisinin görüntüsü.....	29
Şekil 4.1. Alabalık soyhatlarının ülkemizdeki dağılımı.....	38
Şekil 4.2. K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (D-loop)....	39
Şekil 4.3. Parsimoni analizi sonucunda elde edilen ağaçları özetleyen % 50 Majority Rule Consensus ağacı.....	40
Şekil 4.4. HKY+G baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş olan Maksimum olasılık (ML) ağacı.	41
Şekil 4.5. 242 örneğe ait D-loop bölgesi parsimoni network ilişkisi.....	42
Şekil 4.6. K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (ITS1).	46
Şekil 4.7. Parsimoni analizi sonucu elde edilen 5 ağacı özetleyen Majority Rule Consensus ağacı.....	47
Şekil 4.8. ITS1 bölgesine ait Maksimum olasılık (ML) ağacı.....	48
Şekil 4.9. 68 örneğe ait ITS1 bölgesi parsimoni network ilişkisi.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Alabalık populasyonlarına ait lokalite ve drenajlar.....	21
Çizelge 3.2. Kullanılan primerler.....	26
Çizelge 3.3. D-loop gen bölgesi PZR programı.....	27
Çizelge 3.4. ITS1 gen bölgesi PZR programı.....	27
Çizelge 3.5. Analizde kullanılmak üzere Genbank'tan alınan D-loop dizileri.....	30
Çizelge 4.1. Lokalitelere göre D-loop haplotiplerinin dağılımı.....	34
Çizelge 4.2. D-loop gen bölgesi kullanılarak hesaplanan ham nükleotid çeşitliliği (Dxy), net nükleotid çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği.....	35
Çizelge 4.3. Lokalitelere göre ITS1 dizilerinin dağılımı.....	43
Çizelge 4.4. Parsimonik 5 ağacı karşılaştıran Kishino-Hasegava test sonuçları...	45

1. GİRİŞ

Ülkemizde doğal olarak bulunan ve yüksek ekonomik değere sahip bir tür olan alabalık (*Salmo trutta* L.) Salmonidae familyasına aittir. Tür, Avrupa, Asya kıtasının batı bölgeleri ve Kuzey Afrika'daki Atlas dağlarına kadar uzanan geniş bir alanda dağılım göstermektedir. Ancak alabalıklar dünya genelinde doğal yayılış alanları dışında Yeni Zelanda, Arjantin, Kanada ve ABD gibi farklı coğrafyalarda da bulunmaktadır (Geldiay ve Balık, 1988; Eliot, 1990).

Beslenme özellikleri yaşa, coğrafik alana ve çevreye bağımlı olmakla birlikte genellikle küçük olanları omurgasızlarla, büyük olanları farklı balık türleriyle beslenen karnivor balıklardır. Üreme, 2-4 yaşlarında eşeyssel olgunluğa erişen bireylerde Kasım'da başlamakta ve Şubat'a kadar devam etmektedir. Yumurtaların açılma süresi suyun sıcaklığına bağlı olarak 20-40 gün sürmektedir. Yumurtalarını akarsulara bırakabildikleri gibi göllere de bırakabilmektedirler (Kuru, 2004).

Alabalıklar yaşamları süresince farklı morfolojik tiplere girmeden önce korunaklı bir alanda birkaç yıl büyüme dönemi geçirirler. Buldukları suda ya kalıcı forma ya da göç eden (anadrom) balık formuna dönüşürler. Anadrom balıklar ya benzer nehir sistemleri ve göl içine ya da deniz sistemine göç edebilirler (Eliot, 1994).

Alabalıklar çok sayıda farklı coğrafik formdan oluşmuş olup önemli ölçüde çeşitlilik ve yaşam tarihi varyasyonu göstermektedirler. Morfolojik özelliklerinin yüksek derecede esnekliği türün evrimsel tarihinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. 18. yy ortalarında modern sınıflandırma sisteminin başlangıcından bu yana çeşitli formlar için 57 tür ismi önerilmiştir (Bernatchez vd., 1992).

Salmo trutta ülkemizde dört alttür ile temsil edilmektedir (Berg, 1948; Balık ve Geldiay, 1996). *Salmo trutta abanticus* (Tortonese, 1954) Abant gölünde, *Salmo trutta caspius* Hazar Denizi bölgesinde, *Salmo trutta labrax* Karadeniz Bölgesinde ve *Salmo trutta macrostigma* Akdeniz Bölgesinde dağılım göstermektedir. Ancak son dönemlerde yapılan genetik çalışmalara göre (Bernatchez, 2001; Bardakçı vd., 2006) ülkemizde farklı alttür olarak kabul edilen ve morfolojik olarak farklı olan çok sayıda alabalık popülasyonu arasında moleküler düzeyde farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Elde edilen genetik bulgulara rağmen bu taksonomik durum hala geniş ölçüde kullanılmaktadır (Solomon, 2000; Tabak vd., 2001; Kurtoğlu, 2002). *Salmo platycephalus* (Anadolu alabalığı), sadece Türkiye'nin orta

güneyinde özellikle Seyhan ırmağı sisteminde bulunan bir alabalık türüdür. Bilimsel olarak ilk kez 1968 yılında R. J. Behnke adlı bilim insanı tarafından tarif edilmiştir. En büyükleri 50 cm boyuna ulaşabilmektedir.

Çevresel koşulların kontrollü olduğu durumlarda bazı morfolojik ve meristik karakterlerin kalıtılabilirliği birçok çalışmada gösterilmiştir (Chevassus vd., 1979; Krieg, 1985; Skala ve Jorstad, 1987). Bununla beraber birçok salmonidi karakterize eden fenotipik esnekliğin yüksek seviyede olması evrimsel akrabalıkların çözümünde morfolojik karakterlerin kullanımını sınırlandırmaktadır (Behnke, 1972).

Canlılar arasındaki varyasyonu ortaya çıkaran moleküler tekniklerin son 30 yılda gelişmesiyle birlikte, alabalıklarda genetik çeşitliliğin belirlenmesi için bu teknikler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler filogenetik ortak ata ilişkisini temel alarak nükleik asitler ve onların kodladığı ürünler olan proteinleri kullanarak canlıların evrimsel tarihini açıklamaya çalışmaktadır.

1.1. Alabalık Soy Hatları

Geniş bir coğrafik alanda, fenotipik olarak farklı alabalık popülasyonlarının mitokondrial DNA (mtDNA), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve DNA dizi analizi verilerinin sonucunda bugüne kadar Atlantik (AT), Mediterreanean (ME), Danubian (DA), *marmoratus* (MA), Adriyatik (AD) ve Tigris (TI) olmak üzere altı ana evrimsel soyhattının varlığı ortaya konulmuştur (Bernatchez, 2001; Susnik vd., 2005; Bardakci vd., 2006).

AT soy hattı; İber yarımadasının kuzeyinde Norveç ve İzlanda'da bulunan Atlantik nehir sistemlerinde, Fas'ın Atlas dağlarıyla birlikte Baltık ve Beyaz Deniz drenajlarına kadar yayılmış olan soy hattıdır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. AT soy hattının coğrafik dağılımı (Bernatchez, 2001).

DA soy hattı, Karadeniz, Hazar Denizi ve Aral Deniz Havzalarını kapsamaktadır (Şekil 1.2) (Bernatchez vd., 1992; Osinov ve Bernartchez, 1996).



Şekil 1. 2. DA soy hattının coğrafik dağılımı (Bernatchez, 2001).

ME soy hattı Akdeniz'in Batı bölgesindeki drenaj kolları ile yakından ilişkilidir ve bu bölgeden köken aldığı düşünülmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1. 3. ME soy hattının coğrafik dağılımı (Bernatchez, 2001).

MA soy hattına ait olan alabalıklar diğer Akdeniz alabalık populasyonlarından kolaylıkla ayrılan güçlü ekolojik ve morfolojik varyasyon göstermektedir (Behnke, 1968). Ayrıca MA soy hattı AT, DA ve ME soy hatlarına ait populasyonlarından önemli ölçüde genetik farklılığa sahiptir (Bernatchez vd., 1992; Giuffra vd., 1994). Bu soy hattı Po nehri Havzasını kapsamakla birlikte Kostarika ve Slovenya'daki drenajlarda bulunmaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4. MA soy hattının coğrafik dağılımı (Bernatchez, 2001).

AD soy hattı ile ilgili yapılan mtDNA ve nükleer DNA (nDNA) çalışmaları bu soy hattının Balkan ve Anadolu sığınaklardan kaynaklandığını göstermektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5. AD soy hattının coğrafik dağılımı (Bernatchez, 2001).

Filogenetik hipotezlerin yaklaşık zamanını tahmin etmek amacıyla, demografik ve filogenetik parametreler birlikte değerlendirilerek moleküler saat uygulamaları kullanılmaktadır. Alabalık soy hatlarının ayrılma zamanını saptamada moleküler saat uygulamasına başvurulması sonucu, soy hatları arasındaki geniş çaplı ayrılmanın 0,5 ile 2 milyon yıl arasında olabileceği düşünülmektedir (Bernatchez vd., 1992). Bu sonuç alabalıklara ait ana filogenetik soy hatlarının dağılımının, Pleistosen buzullaşma olayı süresince meydana gelen iklimsel ve çevresel değişikliklerden yakından etkilendiğini göstermektedir.

1.1.1. Akdeniz- Adriyatik Bölgesindeki Alabalık Çeşitliliği

Bu alan *Salmo trutta* kompleksinin Avrupa'da yüksek fenotipik farklılık gösterdiği bir bölgedir. Araştırmacıların bu alanda tanımladığı değişik alabalık formlarının çoğu Balkan'lar ve Türkiye'de bulunmaktadır (*S. t. macrostigma*, *S. t. peristericus*, *S. t. marmoratus* vb.)

Akdeniz-Adriyatik bölgesindeki alabalık popülasyonlarının genetik farklılığı, büyük ölçüde nDNA ve mtDNA varyasyonunu temel alan çalışmalar sonucu şekillendirilmiştir. Akdeniz sığınak alanı olarak tanımlanan bölgede beş alabalık

soy hattından üçü (ME, MA ve AD) bulunmaktadır. Bu sığınak alanı güneybatı (Ibero-Mediterranean), merkezi (Adriomediterrenean ve İtalya) ve doğu (Balkanlar ve Anadolu) kısımlarından oluşmaktadır. ME soy hattı Akdeniz'in batı bölgesindeki drenaj kollarıyla yakından ilişkilidir ve bu bölgeden köken aldığı düşünülmektedir. mtDNA ve allozim varyasyonu temel alınarak yapılan çalışmada MA soy hattının 1-3 milyon yıl önce diğerlerinden ayrıldığı ve Kuzey Adriyatik bölgesinden köken aldığı belirtilmektedir (Giuffra vd., 1996).

Akdeniz *S. trutta* populasyonunun genetik yapısı geniş bir coğrafik alanda yapılan protein elektroforezi ve mtDNA çalışmalarıyla belirlenmiştir ve bu bölgede iki farklı mtDNA haplotipi gözlenmiştir (Bernatchez vd., 1992; Bernatchez ve Osinov, 1995). Bu iki mtDNA grubuna ait populasyonlar arasında küçük coğrafik alanlarda ekolojik ve fenotipik farklılıklarla ilişkili, bir ya da daha fazla lokusta belirgin farklılıklara rastlanmıştır (Krieg ve Guymoard, 1985; Apostolidis vd., 1996; Giuffra vd., 1996).

1.1.2. Atlantik Bölgesindeki Alabalık Çeşitliliği

nDNA ve mtDNA belirteçleri kullanılarak yapılan çalışmalar Atlantik İber populasyonlarını Kuzey Atlantik alabalık populasyonlarından ayırmaktadır (Moran vd., 1995; Bouza vd., 1999, Weiss vd., 2000). Son buzul döneminde Kuzey Atlantik bölgesinin buzullarla kaplı olması sebebiyle bu bölgedeki birçok populasyon buzul döneminden sonra oluşmuştur.

Atlantik havzasında alabalıklar son buzul olayları süresince marjinal buz tabakalarındaki sığınaklarda hayatta kalabilmişlerdir (Ferguson ve Fleming, 1983; Osinov ve Bernatchez, 1996). Pleistosenin ilk döngüsü süresince hem karalarda hem denizlerde önemli buzul gelişmeleri ve şiddetli iklime rağmen (Webb ve Bartlein, 1992; Anderson ve Borns, 1994) Atlantik soy hattının kökeninin atasal merkezi çoğunlukla güney, muhtemelen İber Boğazı'nın kıyı kolları veya Kuzey Afrika olduğu düşünülmektedir.

1.1.3. Karadeniz, Hazar ve Aral Denizi Havzalarındaki Alabalık Çeşitliliği

Alabalıkların genetik olarak çalışılmış doğal yayılış alanlarına bakıldığında önemli bir kısmının Avrupa'nın doğusunda bulunduğu gözlenmektedir (Bernatchez vd., 1992). Bu bölge Karadeniz, Hazar Denizi ve Aral Denizi havzalarını

kapsamaktadır. mtDNA verilerine göre beş ana soy hattından iki tanesi (DA ve AT) bu bölge içerisinde bulunmaktadır (Osinov ve Bernatchez, 1996).

DA soy hattı Ponto-Hazarda buzul ilerlemesi süresince hem şiddetli habitat kaybının doğrudan etkisi hem de Karadeniz, Hazar ve Aral Denizi havzalarının genişleme, daralma ve bağlantılarının karışık modelleri sebebiyle karmaşık bir yapıya sahiptir (Arkhipov vd., 1995). Yapılan moleküler çalışmalar AT ve DA soy hatlarını ayırmakla beraber bunlar arasında ikincil temas olduğuna da işaret etmektedir (Bernatchez ve Osinov, 1995; Riffel vd., 1995).

1.2. Moleküler Belirteçler

Canlılar arasındaki çeşitliliği ortaya çıkaran moleküler tekniklerin son 30 yılda gelişmesiyle birlikte, türler ve populasyonlar arasında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde bu teknikler yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Genetik çeşitliliğin korunması, türlerin ve doğal populasyonların korunmasında temel unsurdur. Herhangi bir biyolojik kaynağı etkili olarak yönetmek için, mevcut tür ve populasyonların genetik varyasyon düzeyinin mutlaka bilinmesi önemlidir. Günümüzde bazı genetik belirteçler kullanılarak, birçok tür için belirli düzeyde bilgilere ulaşılabilir olmasına rağmen, populasyon genetiği ve uzun süreli araştırmalar için genom haritalama ve kantitatif karakter lokuslarının belirlenmesi gibi ilave bilgilere de ihtiyaç duyulmaktadır.

Balıklarda filogenetik çalışmalarda, genetik tekniklerden uzun süreden beri yararlanılmaktadır. Bu tekniklerin ilk önemli uygulamaları, geniş olarak denizlerde gözlenen davranış ve göç modellerinin araştırılmasıyla ilgilidir.

Moleküler genetik çalışmalar ilk olarak birbirinden uzak balık populasyonları arasında hemoglobin polimorfizminin araştırılmasıyla başlamıştır (Sick, 1961; Ward ve Grewe, 1994). Örneklerin ayrımı sırasında karşılaşılan problemleri çözmek için özel histokimyasal boyama yöntemleri kullanılmıştır (Hunter ve Markert, 1957). Eldeki genetik belirteçlerin çeşitliliğini sayıca artırabilmek için araştırmacılar 1980'li yılların başında Deoksiribonükleik Asit (DNA)'dan yararlanmaya başlamışlardır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar mtDNA odaklı olup, RFLP analizi kullanılmıştır (Lansman vd., 1981). Sonraki araştırmalar genetik materyale ait belirli bölgelerin dizi analizi üzerine odaklanmıştır (Bernartchez vd., 1992).

Kullanılan moleküler belirteçleri açıklamadan önce moleküler belirteci tanımlarsak; bir birey, bir populasyon ya da bir türün genomunun belli bir bölgesinin diğerlerinden farklılığını ortaya koyan protein veya DNA molekülleri moleküler genetik belirteçler olarak adlandırılır.

1.2.1. Allozim Elektrofrez

Eğer bir proteini kodlayan lokusta birden fazla alel varsa, her bir alel tarafından kodlanan polipeptidler farklı amino asit içeriklerinden dolayı farklı elektriksel yüke ya da büyüklüğe sahip olacaklardır. Elektrofrez bu gibi alelik farklılıkları ortaya çıkarmaktadır.

İki genel protein veri biçiminden söz edilir. Biri izozimlerden elde edilmektedir. İzozim bir enzimin farklı genetik lokuslarca ifade edilen farklı fenotipik formlarını belirtmektedir. Aynı lokustaki farklı alellerin ürünü olan izozimler allozimler olarak adlandırılırlar. Allozim belirteçleri kodominanttır, yani bir lokustaki alellerin tümü ayırt edilebilir ve Mendel kalıtımı gösterirler. Örneklerin hızlı bir şekilde analiz edilebilirliği, kullanılan kimyasalların maliyetinin düşüklüğü, çalışılan lokus ürününün işlevinin bilinmesi yöntemin avantajlarından biridir. Hesaplanan genetik varyasyonun miktarı gerçekte olduğundan daha az bulunabilir, çünkü DNA'daki mutasyon sonucu değişen aminoasit aynı elektriksel yüke sahip olabilir veya oluşan bazı mutasyonlar genetik kodun dejenerasyonundan dolayı aminoasit değişimiyle sonuçlanmayabilir. Bu şekilde ancak genomun küçük bir kısmı incelenebilir. Bu nedenle yakın türler ya da populasyonlar arasındaki varyasyonu saptamak zordur (Taghizadeh vd., 2012).

1.2.2. Mikrosatellitler ve Diğer Tekrarlı DNA Dizileri

Çok hücrelilerde sıralı tekrar gösteren nükleotit dizilerinin varlığı 1968 yılında yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır ve bu tekrarlı diziler satellitler olarak adlandırılmıştır. Satellitler, minisatellitler ve mikrosatellitler olarak ikiye ayrılmaktadır. Minisatellitlerin oluşturduğu tekrar dizileri genellikle 9-64 baz çiftinden (bç) oluşur. Bunlar ayrıca VNTR (variable number of tandem repeats) olarak da bilinirler (Tautz, 1989).

Mikrosatellitler 20-300 bç uzunluğundaki kısa (1-6 bç) tekrarlı dizilerden oluşmaktadır (Tautz ve Renz, 1984; Tautz, 1989). Genomda bol miktarda dağılmış olarak gözlenmektedirler. Bir lokusta bulunan alel çiftinin her biri, kor zincir ünitesinin tekrar sayısının farklılığıyla birbirinden ayrılırlar ve PZR ile bu aleller çoğaltılabilmektedir. Aleller jel elektroforez metoduyla görüntülenir ve böylece bireyin genotipi tespit edilebilir. Mikrosatellit belirteçler de kodominanttır. Bazı mikrosatellit lokuslarında oldukça yüksek olan alelik varyasyon bu belirteçleri özellikle populasyon biyolojisinin çeşitli alanları için uygun kılmaktadır (Wright ve Bentzen, 1994).

1.2.3. mtDNA ve nDNA

Özellikle son 20 yılda mtDNA evrimsel çalışmalar için oldukça güçlü bir araç durumundadır. Bu çalışmalarda mtDNA analizi populasyon yapısı, gen akışı, hibridizasyon, biyocoğrafya ve filogenetik akrabalıklar için veri üretilmesini sağlamıştır (Moritz, 1994a).

Mitokondri genomu filogenetik çalışmalar için yararlı olan pek çok özelliğe sahiptir (Avice, 1994). En önemli özelliği klonal kalıtımıdır. Balık mitokondri genomu haploittir yani her bir organizma sadece bir tip mtDNA içermektedir. Bununla birlikte birkaç çalışmada heteroplazmi (bir fertte birden fazla mtDNA çeşidinin bulunuşu) olduğu rapor edilmiştir (Bentzen vd., 1991; Moritz, 1991).

İkinci olarak, mtDNA pek çok çekirdek genlerinden daha hızlı evrimleşmiştir. Bu özelliği nedeniyle, yakın akraba tür ve populasyonların filogenetik ilişkilerini çalışmak için uygundur (Presa vd., 2002).

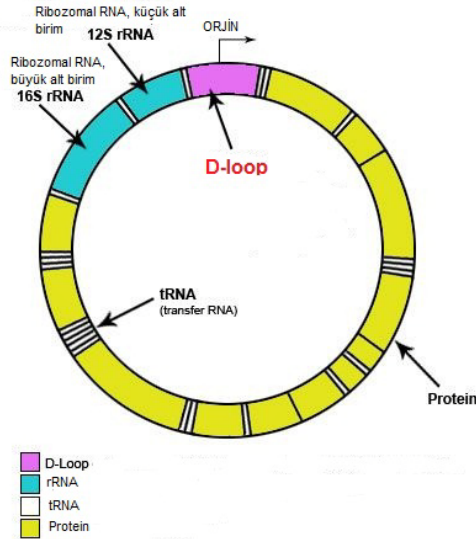
Hayvan mtDNA'sı çift sarmallı ve kovalent olarak kapalı halkasal bir moleküldür. İki ribozomal RNA (rRNA) geni, 22 transfer RNA (tRNA) geni ve adenozin trifosfat (ATP) sentezi için elektron taşınmasında rol alan enzimlerin alt ünitelerini kodlayan 13 protein geninden oluşmaktadır. mtDNA'sı tamamen dizilenen birçok omurgalı ve omurgasızda intronlar bulunmamaktadır. Ayrıca genler arası diziler genellikle küçüktür ya da yoktur. mtDNA'da bir kontrol bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge yapısal genlerden yoksundur ancak replikasyon ve transkripsiyonu başlatan dizileri içermektedir. Omurgalılarda kontrol bölgesi replikasyonda rol oynayan D-loop (displacement loop) bölgesini içermektedir. Bu bölgede sarmalın

iki zincirinden biri replikasyon sırasında yeni sentezlenen zincirle yer değiştirir (Desjardins ve Morais, 1990).

mtDNA'nın nükleer genomdan daha hızlı evrimleştiği bilinmektedir. Sonuç olarak, birçok mitokondrial protein kodlayan gen daha alt seviyedeki (aile, cins, tür veya populusyon) filogenetik akrabalıkları incelemekte kullanılmaktadır. Protein kodlayan genlerdeki üçüncü kodon pozisyonunda meydana gelen yüksek substitüsyon oranlarına bağlı olarak, bunlardaki DNA dizileri daha çok tür ya da populusyon seviyesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Navajas vd., 1996).

mtDNA'nın kontrol bölgesi oldukça değişkendir ve bireyler arasında bile varyasyon gösterebilir (şekil 1.6). Bu bölge birçok durumda ardışık tekrarlar içermektedir. Bu nedenle türler, alttürler ve populusyonlar arasındaki filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır (Zhang ve Hewitt, 1997).

mtDNA, nDNA'dan daha hızlı evrimleşmesine rağmen 12S rDNA oldukça korunmuştur ve şube ya da altşube gibi yüksek seviyelerdeki kategorilerin filogenilerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (Ballard, 1992). Diğer yandan, 16S rDNA bu bölgeye göre daha değişken olması nedeniyle aile, cins gibi orta düzeydeki kategorilerin filogenilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır.



şekil 1.6. mtDNA

nDNA ile karşılaştırıldığında yüksek varyasyona bağlı olarak mtDNA'da spesifik bölgeleri çoğaltmak için evrensel primerleri dizayn etmek daha zordur. Bu nedenle filogenetik çalışmalarda 12S rDNA, 16S rDNA, *sit-b* (sitokrom b) gibi belirli gen bölgeleri sıklıkla kullanılır (Presa vd., 2002).

Kısaca küçüklüğü, haploit ve maternal kalıtımı, konservatif gen düzenlenişi (Awise, 1991) ve nDNA ile kıyaslandığındaki hızlı evrimleşme oranı gibi önemli özellikleri mtDNA analizlerini popülasyon genetiği ve evrimsel genetik çalışmalarında, özellikle çok yakın akraba organizmalar arasındaki filogenetik çalışmalar ve balıkların filocoğrafik modellerinin belirlenmesi için, önemli derecede kullanışlı ve vazgeçilmez bir yöntem yapmaktadır (Aquadro ve Greenberg, 1983; Moritz, 1994a-b; Awise, 1994; Bernatchez ve Wilson, 1998). Ancak nDNA ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajları da vardır. Bunlar;

1-Her ne kadar hayvan mtDNA'sı 37 genden oluşuyorsa da tek bir birim olarak kalıtıldığından ve tek bir genin evrimsel tarihi tüm genomun tarihinden farklı olacağından, mtDNA verileriyle oluşturulmuş ağaçların değerlendirilmesinde daha yüksek bir hata payı olabilir (Awise, 1994)

2- mtDNA hibrit zonlarda tek bir türden köken alabilir. Bunun nedenleri asimetrik çiftleşme ya da ancak belirli hibritlerin hayatta kalmaları şeklinde ifade edilebilir (Ferris vd., 1983; Tegelstrom, 1987)

3- mtDNA'nın yüksek evrimleşme hızından dolayı uzak akraba taksonlar karşılaştırıldığında homoplasi önemli bir problem olabilir (Awise, 1994)

Bunun yanı sıra hala nükleer genlerden elde edilen bilgilerde de sınırlamalar vardır. DNA haplotiplerini izole etmedeki zorluklar, mutasyonları hızla biriktiren genomik bölgelerin seçimi ve nükleer dizilerin mitokondrial genlerle karşılaştırıldığında daha büyük olan birleşme (coalescent) zamanı gibi başlıklar bu sınırlamaların nedenleri arasında sayılabilir.

Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmalarda nükleer ve mitokondrial genlerin birlikte kullanılması ve bunların filocoğrafik uyumunun test edilmesi en doğrusudur (Awise, 2000).

1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan yöntemdir.

Bu teknikte ilk basamakta, yüksek sıcaklığın etkisiyle (92-95°C) çift sarmallı DNA'nın sarmalları birbirinden ayrılır.

İkinci basamakta ise, primerler kopyalanmak istenen zincir bölgesine iki taraftan bağlanırlar. Son olarak bir DNA polimeraz olan *Taq* (*Thermus aquaticus*) adlı enzim, sentezi gerçekleştirir (Mullis ve Faloona, 1987). Reaksiyonun verimliliğinin %100 olması için 109 kat kopyalama gerekmektedir. Kopyalama sonrası özel yöntemlerle çoğaltılan DNA (Agaroz Jel Elektroforezi, Poliakrilamid Jel Elektroforezi) boyanma işlemini takiben gözlenir. Primerlerin sınırladığı dizinin uzunluğu bilindiğinden, çoğaltılan ürünün hangi uzunlukta (bp) bant oluşturduğu DNA büyüklük standardı ile karşılaştırarak belirlenir.

Yukarıda bahsedilen moleküler belirteçlerin geliştirilme zamanlarına paralel olarak ilk zamanlar allozimlerin elektroforetik analizi, sonraki yıllarda mtDNA'nın hem PZR-RFLP hem de doğrudan dizi analizleri alabalıkların mikrocoğrafik ve makrocoğrafik genetik varyasyonunu tespit ederek evrimleri hakkında daha doğru bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır.

1.4. Türkiye'deki Alabalıkların Moleküler Varyasyonu

Türkiye coğrafyasında yapılan mtDNA RFLP analizi ve DNA dizi analizi çalışmalarında Van'ın Çatak ilçesinde bulunan alabalık örneklerinin yeni bir soy hattına ait oldukları ortaya çıkarılmıştır. TI soy hattı olarak isimlendirilen bu soy hattının mtDNA analizleri sonucu alabalıkların en eski soy hattı olduğu ve diğer soy hatlarının orjini olduğu önerilmiştir. Ayrıca bu soy hattının Dicle vadisinde fiziksel olarak izole olduğu düşünülmektedir. Bu soy hattının yeni olması nedeniyle bulunduğu havzalar ve nehir sistemleri hakkında çok fazla bilgi yoktur.

Türkiye coğrafyasında TI ile beraber altı ana soy hattından üçünün (AD, DA ve TI) bulunduğu tespit etmiştir (Bernatchez 2001, Bardakci vd., 2006). Ülkemizde Akdeniz ve Basra Körfezi (sadece Fırat Nehri) Havzasındaki alabalık popülasyonlarının AD ve Karadeniz, Marmara, Ege ve Hazar Denizi

Havzalarındakiilerin ise DA soy hattından oldukları belirlenmiştir (Bardakci vd, 2006).

Bu çalışma ile Türkiye'deki alabalık populasyonlarının filogenetik ilişkileri mtDNA D-loop bölgesi ve nDNA ITS1 (internal transcribed spacer 1) dizileri kullanılarak belirlenecektir. Elde edilen verilerin diğer coğrafik bölgelerde yayılış gösteren alabalıklardan elde edilen verilerle birlikte analizi ve Türkiye'nin jeolojik ve iklimsel tarihine ilişkin bilgiler ile ilişkilendirilmesi sonucu alabalıkların genetik farklılaşma süreçlerinin ve dağılım modellerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Salmo trutta L. doğal yayılış alanı boyunca morfolojik açıdan karmaşık bir model göstermektedir. Yaşam tarihi varyasyonu için de aynı şey geçerlidir. Bu da türün evrimsel tarihinin anlaşılmasını zorlaştırarak taksonomik açıdan karışıklığa neden olmaktadır. Bernatchez vd. (1992) Batı Avrupa boyunca morfolojik ve coğrafik olarak uzak olan populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için 24 populasyonu temsil eden 151 bireyde mtDNA kontrol bölgesini çalışmıştır. Araştırma sonucunda AD, DA, ME, MA ve AT olmak üzere beş ana filogenetik grup tanımlanmış ve populasyonlar içerisindeki filogenetik akrabalıkları belirlemek için mtDNA dizi analizinin kullanılabilirliğini göstermiştir.

Hansen vd. (1993) Danimarka'da 12 lokalitede *S. trutta* örneklerinin allozim elektroforezini incelemiştir. Çalışma sonucunda genetik varyasyonun coğrafik dağılımı Hald gölü populasyonlarının genetik olarak farklı olduğunu ve bu sebeple gölde koruma çalışmalarının dikkatli şekilde yürütülmesi gerekliliğini göstermiştir.

Rusya ve Batı Asya alabalık populasyonları morfolojik ve ekolojik varyasyona dayanarak farklı tür ve alttürler ayrılmıştır. Bunların kökenlerini değerlendirmek ve geleneksel taksonominin evrimsel farklılıkları yansıtmadığını belirlemek için Bernatchez ve Osinov (1995) mtDNA RFLP, mtDNA dizi analizi ve allozim varyasyonuna dayalı genetik akrabalıkları incelemiştir. Araştırma sonucunda Kuzey (Baltık Denizi, Beyaz Deniz) ve Güney (Karadeniz, Hazar, Aral) Denizi havzalarında iki atasal filogenetik grup tanımlanmıştır. Sonuçlar bu iki bölgede bulunan populasyonlar arasındaki geleneksel taksonomik farklılaşmayı desteklemiştir.

Apostolidis vd. (1996a) mtDNA ile çalışarak 13 populasyonun (11 Yunanistan, 1 Fransa, 1 Ermenistan) filogenetik akrabalıkları ve genetik farklılaşmalarını incelemiştir. mtDNA'nın D-loop, *sit-b*, ND-5/6 bölgelerinin RFLP analizini gerçekleştirmiştir. Sonuçta 11 haplotip gözlenmiş, populasyon içi çeşitlilik ortalama % 1,65, populasyonlar arası çeşitlilik ise ortalama % 0,063 olarak kaydedilmiştir. Analizler sonucunda Yunanistan'ın alabalıkların yüksek derecede genetik farklılaşma gösterdiği bölgelerden biri olduğu belirlenmiştir. mtDNA'nın hem geçmiş hem de şimdiki demografik olayları çalışmak için oldukça güçlü bir araç olduğu ortaya konmuştur. Yine Apostolidis vd. (1996b) Yunanistan ve diğer

Avrupa ülkelerindeki alabalık populasyonları arasındaki filogenetik akrabalıkları ve genetik yapıyı ortaya çıkarmak için yaptıkları çalışma sonucunda Akdeniz populasyonlarını biri Batı Akdeniz populasyonları ve Yunanistan'ın batı ve kuzeydoğu populasyonları, diğeri ise diğerk Balkan populasyonlarıyla ilişkili olanlar olmak üzere iki grup altında toplamışlardır.

Apostolidis vd. (1997) yılında Güney Adriyatik-İyonian ve Ege denizi havzalarındaki *S. trutta*'lar ile çalışmış ve analizler sonucunda 4 ana filogenetik grubu belirlemiştir. Bunlardan üçü Güney Balkan bölgesinde geniş ölçüde dağılmaktadır. Çalışmanın sonuçlarına göre mtDNA'nın ortaya çıkardığı genetik akrabalıklar, allozim verileri ve morfolojik verilerle uyumlu değildir.

Weiss vd. (2000) Portekiz alabalıklarıyla yaptığı çalışmada 7 populasyonu incelemiş ve mitokondrial haplotip çeşitliliğini araştırmıştır. Tanımlanan beş yeni haplotipten her birinin Kuzey Atlantik haplotipinden iki-üç mutasyon basamağı kadar uzak olduğunu belirtmişlerdir.

Dunner vd. (2000) İspanya alabalıklarında genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla RAPD (random amplified polymorphic DNA) tekniğini kullanarak nDNA ile çalışmışlar ve mtDNA kontrol bölgesinin dizi analizini yapmışlardır. Bu iki DNA kaynağından elde edilen sonuçların farklı olmasının nedenini evrimsel oranların farklı olmasına ve mtDNA'nın maternal kalıtımına bağlamışlardır.

Aurette ve Berrebi (2001) Fransa'nın güneybatısındaki populasyonlarla çalışmışlar ve 10 mitokondrial haplotip tanımlamışlardır. Bu haplotiplerin dağılımlarını incelediklerinde daha önce nükleer belirteçler kullanarak ortaya attıkları hipotezlerle uyumlu olduğunu ve bu bölgede farklılaşmış 2 grubun bulunduğunu belirtmişlerdir.

Bernatchez (2001) Kuzey Afrika ve Doğu Avrupa'dan az sayıda populasyonun da içinde olduğu alabalıkların doğal coğrafik yayılış alanlarında kapsamlı bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada alabalık populasyonlarının mtDNA'sının 310 bç'lik 5' D-loop bölgesi, ND-5/6 ve tüm sit-*b* geni/D-loop bölgelerinin PZR-RFLP verilerini karşılaştırmıştır. Alabalık populasyonlarının filogenetik analizi sonucu AT, DA, ME, MA ve AD olmak üzere beş ana evrimsel soy hattının varlığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak alabalık kompleksi içindeki önemli genetik ayrılmaların,

büyük iklimsel değişiklikler sonucu erken üst-orta Pleyistosen arasında Avrupa'da meydana gelen havza izolasyonları ile olduğunu belirtmiştir.

Suarez vd. (2001) İber yarımadası ve Kuzey Afrika haplotiplerini incelemiş, buna göre İber yarımadasında Atlantik, Duero, Mediterreanean ve Andalusian olmak üzere 4 önemli haplotip grubunun olduğunu belirtmiştir. Çalışma sonucunda, İber yarımadasının Atlantik ve Akdeniz'e akan nehirlerle ilişkili olan haplotipler arasında fiziksel bir sınır rolüne sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Presa vd. (2002) filocoğrafik analizler için bu moleküler belirtecin kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla *S. trutta*'nın yayılış alanı boyunca rDNA ITS'deki varyasyonu incelemiş ve elde ettikleri sonuçları daha önce mtDNA'dan elde ettikleri sonuçlarla karşılaştırmıştır. ITS 2'nin örneklenen tüm popülasyonlarda korunmuş olduğu ve ana soy hatları boyunca informatif karakterlerin gözlenmediği ortaya çıkmıştır. Buna karşın ITS 1 diğer genetik belirteçlere göre büyük bir homojenizasyon göstermiştir. Ayrıca ITS 1 ve mtDNA arasındaki filocoğrafik modellerde uyum gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda gözlenen Akdeniz'in güneydoğu kısımlarında atasal bir ITS dizisinin varlığı (rMEDA) daha önceki mtDNA çalışmalarında bulunamamıştır.

Duftner vd. (2003) yılında yaptığı araştırma sonucunda, mtDNA D-loop bölgesinin tümünün sekansının gen frekanslarının analiz edilmesine olanak sağlayarak Avusturya alabalık popülasyonları arasında iyi bir genetik yapılanma analizi sağladığını belirtmiştir. Analiz sonucunda 92 bireyde 9 Danubian haplotipi, 31 bireyde 7 Atlantik haplotipi gözlenmiştir.

2004 yılında yapılan bir çalışmada Cortey vd. (2004) Akdeniz nehir havzalarının'daki alabalık popülasyonlarının filogenetik akrabalıklarını tanımlamak ve Akdeniz bölgesi balıklarının tarihsel biyocoğrafyasını gözden geçirmek için mtDNA D-loop'un tüm dizisini kullanmıştır. Alabalık soy hatları arasındaki filogenetik akrabalıklar Danubian'ın en atasal olduğunu göstermektedir. Nested clade ve mismatch analizlerinin sonuçlarına göre Adriyatik ve Akdeniz soy hatlarına ait haplotiplerin şu anki dağılımının sırasıyla merkez ve Batı Avrupa'dan kökenlenen popülasyon genişlemelerinin sonucunda olduğu belirtilmiştir.

Susnik vd. (2005) Dicle havzasında Çatak Çay nehrinden 6 alabalıkta mtDNA D-loop dizi analizi sonucunda diğer Tuna haplotiplerinden % 1-1,5 farklı olan, tek ve yeni bir haplotipi açığa çıkarmıştır.

Maric vd. (2006) Sırbistan'daki alabalık popülasyonlarının filocoğrafyasını araştırmak için Tuna, Ege ve Adriyatik drenajlarının üst kısımlarından kökenlenen 101 bireyde mtDNA D-loop'un 561 baz çiftlik bölgesinin dizi analizini gerçekleştirmiş ve sonuçları önceki çalışmalarla karşılaştırmıştır. Çalışmanın sonucunda Danubian haplotiplerinin Danubian drenajlarına ait olduğu, Adriyatik haplotiplerinin ise Ege ve Adriyatik drenajlarında baskın olduğu gözlenmiştir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada gözlenen 15 RFLP haplotipinin Atlantik dizileriyle ilişkili, diğer 9'unun ise daha önceden Akdeniz havzasında tanımlanan üç ana filogenetik soy hattını temsil eden (AD, ME, MA) dizilerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Splendiani vd., 2006).

Bardakci vd. (2006) Türkiye'de 27 alabalık popülasyonu arasındaki filogenetik ve filocoğrafik akrabalıkları ortaya çıkarmak için PCR- RFLP kullanmıştır. Çalışma sonucunda 27 haplotip gözlenmiş, bunlar da üç ana filogenetik klada (DA, AD, TI) ayrılmıştır. Karadeniz, Marmara, Ege ve Hazar Denizi havzasındakilerin DA, Akdeniz ve Basra Körfezi Havzasındaki popülasyonların AD, Çatak popülasyonunun TI soy hattına ait olduğu belirlenmiştir.

Adriyatik soy hattının tarihsel demografisini ortaya çıkarmak için Susnik vd. (2007) mtDNA D-loop ve 12 mikrosatellit lokusundaki varyasyonların analizini gerçekleştirmiştir. Oluşturulan networkte merkezdeki en atasal haplotipin İber yarımadasına ait olduğu gözlenmiştir.

Schöfmann ve Susnik (2007) Sicilya'daki *Salmo trutta* popülasyonlarıyla çalışmış ve Morocco'da tek bir haplotip gözlemlemiştir ve alabalıkların batıdan doğuya Atlantik okyanusu havzasından kuzeybatı Afrika sahili boyunca yerleştiklerini belirtmiştir.

Turan vd. (2008) RFLP tekniği ile Isparta ve Kahramanmaraş bölgelerinde bulunan *S. trutta* popülasyonlarının genetik yapılarını inceleyerek popülasyonlar arasındaki farklılığın derecesini tespit etmiştir. Elli bireyde 3 farklı haplotip saptanmış ve Monte Carlo İkili Karşılaştırma Analizi sonucunda popülasyonlar arasında önemli derecede genetik farklılıklar olmadığını belirlemişlerdir ($p>0,05$).

Snoj vd. (2009) Arnavutluk'taki alabalıkların genetik profilini ortaya koymak için 19 lokaliteden (Yunanistan ve Arnavutluk) 87 bireyde mtDNA D-loop dizi analizini gerçekleştirmiştir. Sonuçta gözlenen 14 haplotipten 4'ünün Adriyatik ve Mediterrean soyhatları ile yakın akraba yeni haplotipler olduğu gözlenmiştir.

Griffiths vd. (2009) Amu Darya nehriindeki alabalıklardan 5 örnekle çalışmış ve mtDNA D-loop bölgesinin dizi analizi sonucunda Danubian soyhattına ait 2 yeni haplotip tanımlamıştır.

Turan vd. (2009) Karadeniz Bölgesindeki alabalıklarla yaptıkları çalışmada hem morfolojiyi hem de moleküler teknikleri kullanmış ve sonuçta 2 yeni tür tanımlamıştır. *Salmo rizeensis* ve *Salmo coruhensis* ile yapılan moleküler analizler bunların farklı soy hatlarına ait olduklarını göstermiştir.

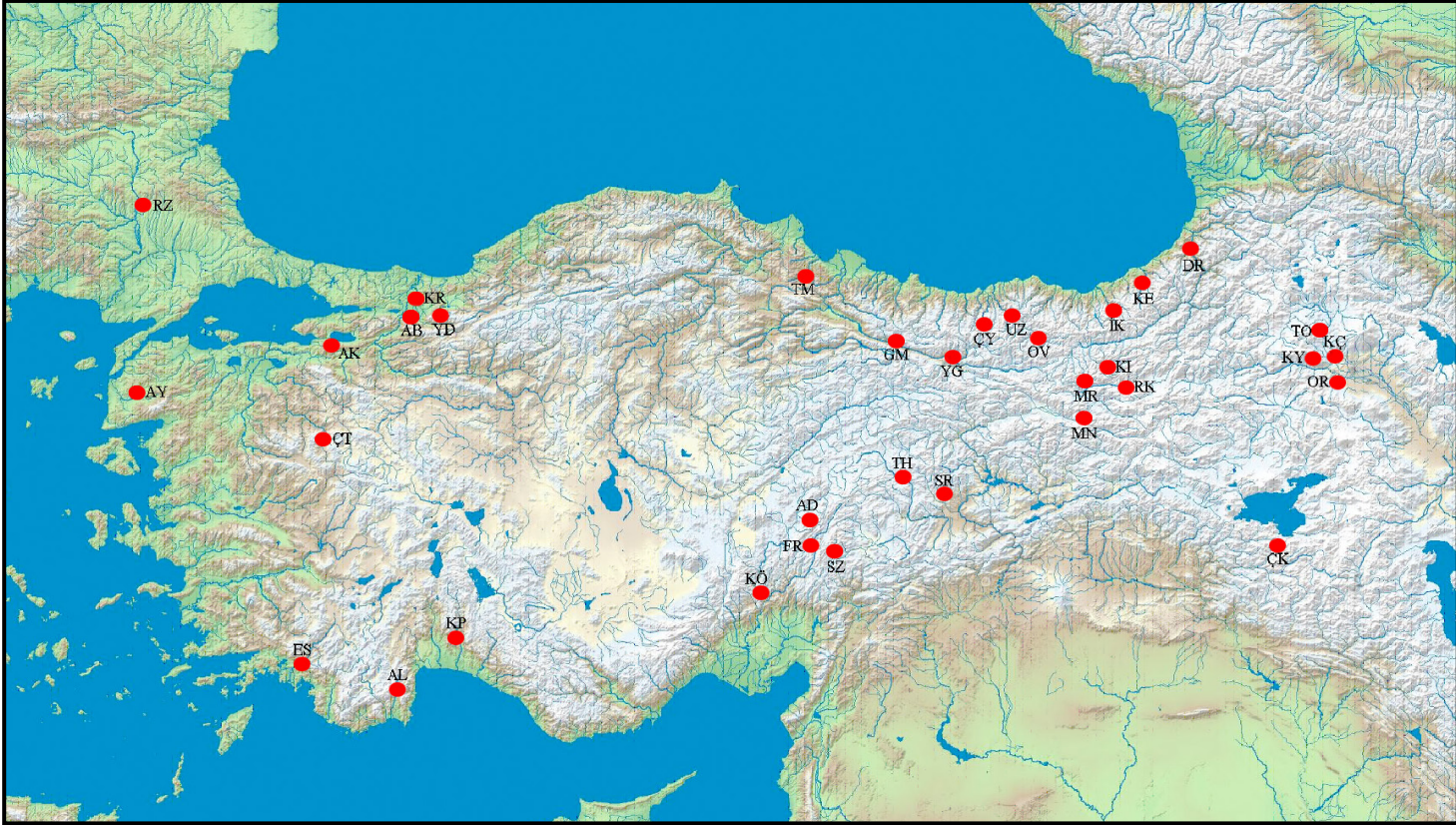
McKeown vd. (2010) dört mitokondriyal DNA segmentinin PCR-RFLP analizlerini çalışarak Britanya ve İrlanda'daki alabalıkların filogenetik yapısını analiz etmişlerdir. Sonuçta ortaya çıkan 25 haplotipin 7 farklı klada ayrıldığı gözlenmiştir.

Vera vd. (2011) Kuzey İran nehirlerindeki alabalıkların filocoğrafyasını ve bunların genetik yapılarını çalışmak için mtDNA D-loop bölgesini, ITS 1'i ve 10 mikrosatellit lokusunu kullanmıştır ve yapılan filogenetik analizler bu balıkların Danubian soyhattına ait olduklarını ortaya çıkarmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Alabalık Örneklerinin Toplanması

Türkiye’de Akdeniz, Karadeniz, Hazar Denizi; Marmara Denizi ve Basra Körfezi drenajlarında bulunan tüm ana nehir havzalarına ait toplam 34 farklı lokaliteden 242 örnek kullanılmıştır (Şekil 3.1). Araştırma materyalinin büyük bir kısmı TÜBİTAK TBAG-1971-100T104 nolu proje esnasında toplanmıştır. Bu proje sırasında örnek elde edilemeyen, ek örnek ihtiyacı olan bölgelerden yeni örnekler elde edilmiştir. Örneklerin toplandığı lokalite ve drenajlar Çizelge 3.1 ile Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Alabalık örnekleri genellikle elektroşok metodu kullanılarak yakalanmıştır. Yakalanan balık örnekleri % 95’lik (v/v) etanol içinde tespit edilerek muhafaza edilmiştir



Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı lokaliteler. KR, Karabey; AB, Abant; YD, Yedigöl; AK, Akçay; ÇT, Çatalalıc; GM, Gemin; TM, Tamdere; YG, Yağmurdere; IK, İkizdere; OV, Ovit; DR, Dörtkilise; KÇ, Karaçingil; MR, Merekum; KY, Koyunlu; AD, Akdere; TH, Tohma; SR, Sürgü; MN, Munzur; SZ, Sarız; FR, Fırız; KO, Körkün; KP, Köprü; AL, Alakır; AY, Ayıderesi;

Çizelge 3.1. Alabalık popülasyonlarına ait lokalite ve drenajlar

POPULASYON	LOKALİTE	KISALTMA	DRENAJ	BİREY SAYISI
Karabey	Bolu, Aladağ, Elmalı Dere	KR	Karadeniz	8
Abant	Bolu	AB	Karadeniz	14
Yedigöl	Bolu, Yiğilca Yolu	YD	Karadeniz	4
Akçay	Bursa, Uludağ	AK	Marmara Denizi	10
Çatalalç	Kütahya, Domaniç	ÇT	Marmara Denizi	8
Gemin	Sivas, Suşehri	GM	Kelkit, Karadeniz	8
Tamdere	Giresun, Şebinkarahisar, Aksu	TM	Karadeniz	7
Yağmurdere	Gümüşhane, Başova köyü	YG	Karadeniz	10
İkizdere	Rize, Anzer civarı	İK	Karadeniz	11
Ovit	Erzurum, İspir	OV	Çoruh, Karadeniz	10
Dörtkilise	Artvin, Yusufeli	DR	Çoruh, Karadeniz	7
Karaçingil	Ardahan, Çıldır	KÇ	Kura, Hazar Denizi	8
Merekum	Erzurum, Oltu	MR	Çoruh, Karadeniz	19
Koyunlu	Ardahan, Göle	KY	Kura, Hazar Denizi	9
Akdere	Sivas, Gürün	AD	Ceyhan, Akdeniz	11
Tohma	Sivas, Gürün	TH	Fırat, Basra Körfezi	9
Sürgü	Malatya, Doğanşehir	SR	Fırat, Basra Körfezi	11
Munzur	Tunceli, Ovacık	MN	Fırat, Basra Körfezi	8

Çizelge 3.1.Devamı

Sarız	Kayseri, Sarız	SZ	Seyhan, Akdeniz	5
Fırnız	Kahramanmaraş	FR	Ceyhan, Akdeniz	3
Körkün	Adana, Pozantı	KO	Seyhan, Akdeniz	5
Köprü	Isparta, Aksu	KP	Akdeniz	4
Alakır	Antalya, Altınkaya	AL	Akdeniz	8
Ayıderesi	Balıkesir, Edremit	AY	Ege Denizi	3
Rezve	Edirne, Istranca Dağları	RZ	Karadeniz	4
Çatak	Van, Çatak	ÇK	Dicle, Basra Körfezi	7
Ortaköy	Kars, Kağızman	OR	Aras, Hazar Denizi	3
Toro	Ardahan, Ardıçdere	TO	Kura, Hazar Denizi	2
Eşen	Muğla	ES	Ege Denizi	4
Kengel	Güneysu, Rize	KE	Karadeniz	6
Kırık	Erzurum, Kırık köyü	KI	Fırat, Basra Körfezi	7
Rizekent	Erzurum	RK	Fırat, Basra Körfezi	6
Çağlayan	Çayırbaşı	ÇY	Karadeniz	1
Uzungöl	Trabzon	UZ	Karadeniz	2

3.2. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

1X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA)

0.5 M Tris-Base

0.5 M Borik Asit

0.01 M EDTA

pH 8,13-8,23

STE Tamponu

0.1 M NaCl

0.05 M Tris-Base

0.001 M EDTA

pH 7,5 Çözelti otoklavlanır.

% 10 SDS (w/v)

10 g SDS 100 ml steril suda çözülür.

Proteinaz K

10 mg/ml çözelti kullanılmıştır.

PCI

Fenol-Kloroform-İzoamilalkol karışımı 25:24:1 oranında kullanılmıştır.

Fenol 25 ml

Kloroform 24 ml

İzoamilalkol 1 ml

Bu çözelti taze hazırlanmış, + 4 °C'de saklanmış ve ışıkla teması en az seviyede tutulmuştur. Kullanılmadan önce iyice karıştırılmıştır.

CI

Kloroform-İzoamilalkol karışımı 24:1 oranında kullanılmıştır.

Kloroform 24 ml

İzoamilalkol 1 ml

6X Yükleme tamponu

%30 Gliserol (3 ml gliserol, 97 ml su)

%0.03 boya (Bromfenol Blue)

3.3. Total DNA izolasyonu

Total DNA balık örneklerinin dorsal ya da pektoral yüzgeçlerinin kaidesindeki kas dokusundan izole edilmiştir. Öncelikle doku örneklerinden alkol uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 50 mg doku üzerine 500 µl STE tamponu ilave edilmiş ve tüpler tüm dokunun tamponla iyice karışması için vortekslenmiştir. Daha sonra bu tüplerin üzerine 25 µl proteinaz K (10 mg/ml) ve 50 µl SDS (%10) eklenmiş ve 2 saat 55

°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üzerine 500 µl PCI (Fenol-Kloroform-İzoamilalkol, 25:24:1) ilave edilmiştir. Yavaşça tüpler alt üst edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler 13.200 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Tüplerde oluşan üst faz, orta faza zarar vermeden geniş uçlu bir mikropipetle dikkatli bir şekilde alınarak boş mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 500 µl PCI eklenmiş, aynı şekilde 5 dk inkübe edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Yine üst faz dikkatli bir şekilde alınıp yeni mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 400 µl CI (Kloroform-İzoamilalkol, 24:1) eklenmiş, oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 13.200 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz alınarak boş mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 1 ml soğuk mutlak etil alkol eklenmiş ve tüpler 20 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda DNA görününceye kadar tüpler yavaşça alt üst edilmiştir. 13.200 rpm’de 1 dk santrifüj işleminden sonra çöken DNA’lardan alkol mikropipet yardımıyla mümkün olduğunca uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüpe 400 µl % 70’lik etil alkol eklenmiş, pellet kaldırılarak yıkanması sağlanmıştır. Tekrar 13200 rpm’de 10 sn santrifüj işleminden sonra alkol mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve tüpler ağzı açık bir şekilde 37 °C’de bekletilmiştir. Alkolün tamamen uzaklaştığından emin olduktan sonra pellet 100 µl steril distile suda çözülmüştür.

3.4. DNA’nın Spektrofotometrik Analizi

İzole edilen DNA’ların konsantrasyonlarını belirlemek için 260 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülmüştür. Bunun için DNA örnekleri 35 kat seyreltilmiştir. Yaklaşık DNA miktarının tespitinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$C_{DNA} = O.D._{260nm} \times S.K. \times 50$$

O.D.- Optik Dansite (260 nm’de okunan absorbans değeri).

S.K.- Sulandırma katsayısı.

50 - 260 nm’de 1 optik dansite, çift iplikli DNA konsantrasyonunda 50 µg/ml’ sine denk gelir.

Ayrıca stok DNA’nın 280 nm’de absorbansı ölçülerek protein kontaminasyonu olup olmadığı belirlenmiştir.

3.5.DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

Tüm DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezinde % 0.8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Kullanılan tankın boyutuna göre tartılan agaroz 1XTBE tamponunda çözülmüş ve yaklaşık 60 °C'ye kadar hafif hafif çalkalanarak soğutulmuştur. İçerisine 1µl EtBr (5mg/ml) eklenerek tarak yerleştirilmiş olan kalıba dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk kuyucuğa DNA büyüklük belirteci yüklendikten sonra yürütülecek örneklerden 5 µl alınarak 5 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılıp sırasıyla diğer kuyucuklara yüklenmiştir. Güç kaynağı 100 Volt'a ayarlanarak jel içindeki örnekler yaklaşık 45 dk yürütülmüştür. Daha sonra jel görüntüleme cihazına (Vilber Lourmat) yerleştirilmiş ve UV ışığı altında fotoğrafı çekilmiştir. Sonuçta konsantrasyon, degradedasyon ve kontaminasyon (RNA, protein) ile ilgili fikir edinilmiş ve spektrofotometrik analiz sonuçlarına da bakılarak gereken seyreltme ve ayarlamalar yapılmıştır.

PZR için uygun DNA miktarı 100ng/µl olacak şekilde ana stokta bu değerden daha yoğun DNA içeren örneklerde gerekli seyreltmeler yapılmış ve reaksiyonlarda kullanılacak miktar ana stoktan seyreltilerek alınmıştır.

3.6.Mitokondri D-loop bölgesi ve Nükleer ITS1 Bölgelerinin PZR ile Çoğaltılması

D-loop ve ITS1 bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu ve dizi analizinde kullanılan primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan primerler

D-loop		
Primer	Primer Dizisi	Tm (°C)
PST (Cortey vd., 2004)	5' CCC AAA GCT AAA ATT CTA AAT 3'	45.2
FST (Cortey vd., 2004)	5' GCT TTA GTT AAG CTA CGC 3'	39.8
ITS1		
kp2 (Presa vd., 2002)	5'AAAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTGCG 3'	64.8
58s (Presa vd., 2002)	5' AGCTTGCTGCGTTCTTCATCGA 3'	60.3

Her iki gen bölgesi için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve özellikle farklı MgCl₂ konsantrasyonu ve primerlerin bağlanma sıcaklığı denemeleri yapılmıştır. Her bir PZR reaksiyonu toplam 50 µl hacimde hazırlanmıştır.

mtDNA kontrol bölgesi, son hacimde 5 ng/µl kalıp DNA (100 ng/µl), 1x Taq tamponu [10x Taq Buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgCl₂ (25 mM; Fermentas, MBI), 2,5 mM dNTP karışımı (herbir dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0.5 mM; Fermentas, MBI), 0,25 U/µl Taq polimeraz (5 U/µl; Fermentas, MBI), 0.2 pmol/µl PST ve FST oligonükleotidleri (her biri 25 pmol/µl) 50 µl reaksiyon hacminde steril distile su ile tamamlanarak PZR ile çoğaltıldı.

ITS1 için, son hacimde 5 ng/µl kalıp DNA (100 ng/µl), 1x Taq tamponu [10x Taq Buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgCl₂ (25 mM; Fermentas, MBI), 0,4 mM dNTP karışımı (herbir dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0,5 mM; Fermentas, MBI), 2,5 U/µl Taq polimeraz (5 U/µl; Fermentas, MBI), 0,2 pmol/µl kp2 ve 58s oligonükleotidleri (her biri 25 pmol/µl) 25 µl reaksiyon hacminde steril distile su ile tamamlandı. Polimeraz zincir reaksiyonları Eppendorf Thermal Cycler ile gerçekleştirildi. D-loop ve ITS1 için PZR programları Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. D-loop gen bölgesi PZR programı

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	1'
Denatürasyon	94°C	30''
Primer Bağlanma (Annealing)	52 °C	1'
Zincir Uzama (Extension)	72 °C	1'
Son uzama	72 °C	3'

} 35 DÖNGÜ

Çizelge 3.4. ITS1 gen bölgesi PZR programı

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	1'
Denatürasyon	94°C	30''
Primer Bağlanma (Annealing)	52 °C	1'
Zincir Uzama (Extension)	72 °C	1'
Son uzama	72 °C	3'

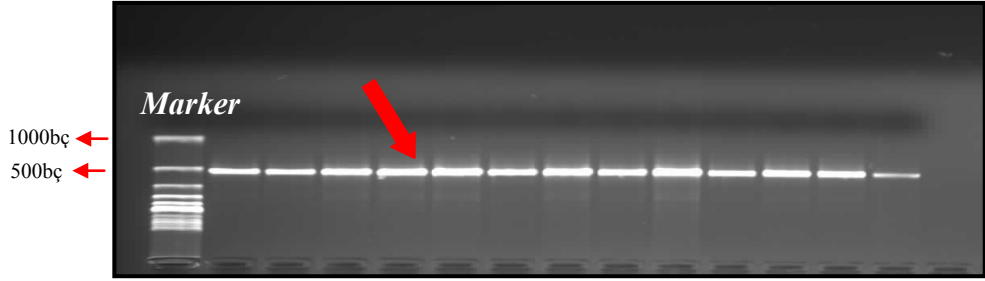
} 40 DÖNGÜ

PZR ürünlerinin kalitesi ve büyüklüğünü kontrol etmek amacıyla ürünler % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Kullanılan DNA büyüklük belirteçleri amplikon boyutuna uygun olarak seçilmiştir. Daha sonra jel UV altında görüntülenmiştir (Şekil 3.2).

3.6.1. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Agaroz jelde yürütülerek görüntülenen ürünlerden tek ve doğru büyüklükte bant verenler GenElute™ PZR Clean-Up kit (SIGMA) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu işlem yapılırken firmanın kit ile birlikte göndermiş olduğu protokol uygulanmıştır.

Saflaştırılmış PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Spesifik olmayan bantlar ve primer dimerlerinin gözlemlenmediği örnekler dizi analizine hazırlanmıştır.



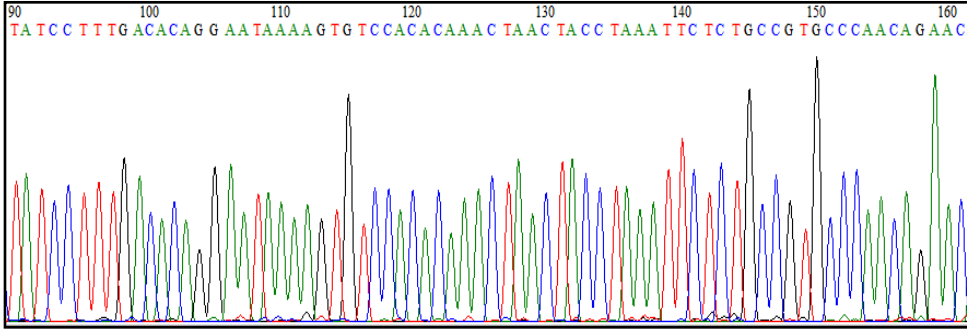
Şekil 3.2. Hedef PZR ürünleri (%2'lik jel konsantrasyonunda)

3.7. Dizi Reaksiyonu ve Dizilerin Elde Edilmesi

Saflaştırılan PZR ürünleri ve primerler dizi analizi için Güney Kore'deki MacroGen firmasına gönderilmiş, burada BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, dizi ürünleri ABI 3730XL kapillar otomatik sekans aletinde yürütülmüş ve elde edilen ham dizi verileri mail yolu ile tarafımıza gönderilmiştir.

3.8. Dizilerin Okunması

Her iki bölge için (D-loop ve ITS1) elde edilen ham diziler BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) programı kullanılarak (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) her bir birey için ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Şekil 3.3). Bu işlem sırasında her bir baz dikkatle kontrol edilmiştir.



Şekil 3.3. BioEdit 7.0.9 programı tarafından bir DNA dizisinin görüntüsü

3.9. Veri Analizleri

3.9.1. Dizilerin Hizalanması

D-loop ve ITS1 dizileri ayrı ayrı hizalanmıştır. Bireylere ait dizi dosyaları BioEdit 7.0.9.0. programına aktarılarak, D-loop için GenBank'tan alınan (Çizelge 3.5) diziler de eklendi ve hizalama işlemi BioEdit içine yerleştirilmiş olan Clustal W (Thompson vd., 1994) modülü kullanılarak gerçekleştirildi. Gözle de kontrol edilen hizalama dizileri arasında uzunluk farklılıkları olması nedeniyle örneklerin başlangıç ve sonlanma noktalarından hizalamalar yapılmıştır. Her bir örneğin dizi uzunluğu 986 baz çifti olarak hizalanmıştır.

Çizelge 3.5. Analizde kullanılmak üzere Genbank'tan alınan D-loop dizileri

HAPLOTİP	SOYHATTI	ACCESSION NO	KAYNAK
Athap1	Atlantik	AF273086	Cortey vd., 2004
Athap4	Atlantik	AF274575	Cortey vd., 2004
At10	Atlantik	AY185577	Duftner vd., 2003
At11b	Atlantik	AY185579	Duftner vd., 2003
Da1a	Danubian	AY185568	Duftner vd., 2003
Da1b	Danubian	AY185569	Duftner vd., 2003
Da2	Danubian	AY185570	Duftner vd., 2003
Da3	Danubian	AY185571	Duftner vd., 2003
Da9	Danubian	AY185572	Duftner vd., 2003
Da22	Danubian	AY185573	Duftner vd., 2003
Da23a	Danubian	AY185574	Duftner vd., 2003
Da23b	Danubian	AY185575	Duftner vd., 2003
Da24	Danubian	AY185576	Duftner vd., 2003
IRAN-1	Danubian	HM237337	Vera vd., 2011
MAcs1	Marmoratus	AY836365	Cortey vd., 2004
MEcs11	Akdeniz	AY836360	Cortey vd., 2004
MEcs8	Akdeniz	AY836357	Cortey vd., 2004
MEcs4	Akdeniz	AY836353	Cortey vd., 2004
MEcs1	Akdeniz	AY838350	Cortey vd., 2004
ADcs18	Adriyatik	AY836347	Cortey vd., 2004
ADcs6	Adriyatik	AY836335	Cortey vd., 2004
ADcs5	Adriyatik	AY836334	Cortey vd., 2004
ADcs1	Adriyatik	AY836330	Cortey vd., 2004
S. salar1	<i>Salmo salar</i> , dış grup	U12143	Cortey vd., 2004
S. salar2	<i>Salmo salar</i> , dış grup	AF133701	Arnason U., Johnson E., Rasmussen A., basılmamış

3.9.2. Analizlerde Kullanılacak Veri Setlerinin Hazırlanması

D-loop ve ITS1 gen bölgeleri için ayrı ayrı hizalanmış dosyalar FASTA ve NEXUS formatlarında kaydedilmiş, DnaSP 4.50 (Rozas vd., 2003) programı kullanılarak kaç farklı haplotip olduğu ve her haplotipin frekansı belirlenmiştir. Daha sonra sadece farklı haplotipleri içeren yeni bir veri matrisi oluşturulmuştur. mtDNA D-loop için haplotip çeşitliliği DnaSP 4.50 programı kullanılarak ve JC modeli altında yapılmıştır (Jukes&Cantor, 1969). Nükleotid çeşitliliği yine aynı program ile ve JC modeli altında analiz edilmiş ve soy hatları arasındaki ham

DNA çeşitliliği (Dxy) ve net DNA çeşitliliği (Da) (Nei ve Kumar, 2000) hesaplanmıştır.

Maksimum olasılık (Maximum Likelihood) analizi için hem D-loop hem de ITS1 bölgeleri için ayrı ayrı Modeltest 3.7 (Posada ve Crandall, 1998) programında bulunan hLRT (hierarchical likelihood ratio test) ve AIC (Akaike information criterion) baz değişim modeli testleri kullanılarak veri matrislerine en iyi uyan baz değişim modeli saptanmıştır. Bu modele ait komut satırları dosyanın içine eklenerek nexus formatında kaydedilmiştir.

TCS (Klement vd., 2000) programı kullanılarak yapılacak network analizi için diziler PHYLIP formatında kaydedilmiştir.

3.9.3. Filogenetik Analizler: Uzaklık (Distance) Analizi

Uzaklık analizi PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. D-loop ve ITS1 için ayrı ayrı yapılan Modeltest analizlerinde, hLRT ve AIC baz değişim modeli testlerinin veri setlerimize en iyi uyan baz değişim modeli olarak tespit ettiği modellerin yanı sıra daha basit modeller olan JC (Jukes ve Cantor, 1969) ve K2P (Kimura 2-parameter) (Kimura, 1980) modelleri de uzaklık analizi için denenmiştir. Belirtilen modeller kullanılarak Neighbour Joining (NJ) algoritması ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuş ve bunların topolojileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca yine tüm modeller kullanılarak bootstrap analizi yapılmış (10.000 replicate) ve NJ ağaçtaki soy hatları için elde edilen bootstrap değerleri karşılaştırılmıştır. Farklı baz değişim modelleri kullanılarak elde edilen NJ ağaçlarının topolojilerinin hemen hemen aynı olduğu gözlemlenmiştir. Bootstrap değerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek değerlerin K2P ile elde edildiği saptanmış, bu nedenle bu model kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaç verilmiştir.

3.9.4. Filogenetik Analizler: Maksimum Parsimoni (Tutumluluk) Analizi

Bu analiz PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) ile yapılmıştır. Parsimoni analizi Heuristic araştırma metodu (TBR swapping algorithm ve 1.000 rastgele replikasyon) kullanılarak yapılmıştır. Parsimoni analizi sonrası elde edilen parsimonik ağaçlar birbirleri ile Kishino-Hesegawa Test kullanılarak karşılaştırılmıştır (Kishino-Hesegawa, 1989). Ayrıca kaydedilen ağaçlar için CI (Consistency Index), RI (Retention Index) değerleri ve ağaç uzunlukları tespit

edilmiştir. Elde edilen bu parsimonik ağaçlar kullanılarak %50 Majority Rule ve Stric Consensus ağaçlar oluşturulmuştur. MP (Maksimum Parsimoni) analizi için bootstrap analizi yapılırken diziler analize 1000 rastgele tekrarlı olarak alınmış ve 10.000 replikasyon kullanılmıştır.

3.9.5. Filogenetik Analizler: Maksimum Olasılık (Likelihood) Analizi

Bu analiz PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modeltest sonucunda önerilen en uygun baz değişim modelleri veri setine girilmiş ve Heuristic araştırma metodu kullanılmıştır. Diziler analize alfabetik (as is) olarak katılmış ve TBR swapping algoritması kullanılmıştır. Maksimum likelihood analizinde bootstrap değerleri elde edilirken 1.000 replikasyon kullanılmıştır.

3.9.6. Filogenetik Analizler: Bayesian Analizi

Bayesian analizi MrBayes 3.1 (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) yazılımı ile yapılmıştır. Analiz eşit olmayan baz frekansları altında gerçekleştirilmiştir. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritması çalıştırılmış, rastgele ağaçlarla analize başlanmış ve 1000000 jenerasyon tekrarlanmıştır. Her 10 jenerasyonda bir ağaçlar örneklenmiştir. Log likelihood skorlarının belli bir dengeye ulaştığı nokta “burn in” olarak belirlenmiş ve bu noktadan önceki ağaçlar analizden çıkarılmıştır. Geriye kalan ağaçlar kullanılarak PAUP programında % 50 Majority Rule Consensus ağaç elde edilmiş ve bu ağaç üzerine “posterior probabilities” değerleri işlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. mtDNA D-loop Bölgesi

4.1.1. Dizi Kompozisyonu

34 farklı lokaliteden toplanan 242 örneğin ve GeneBank'tan alınan dizilerin birlikte analizi sonucunda 58 D-loop haplotipi saptanmıştır. Bunlardan 33 tanesi daha önce tanımlanmamış ve Türkiye'ye ait yeni haplotiplerdir. Analize sokulan tüm dizilerin hizalanması sonucunda elde edilen matrikste baz kompozisyonu A: % 25,54, C: % 27,36, G: % 18,52, T: % 28,58'dir. Toplam 621 nükleotid pozisyonunda (% 65) varyasyon gözlenmiştir. Bu pozisyonların 525 tanesi (% 84) parsimonik bilgi içermektedir.

Analizler sonucunda elde edilen haplotipler için haplotip çeşitliliği Hd: 0.9368 ve nükleotid çeşitliliği Pi: 0.07786 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda ülkemizden toplanmış örneklerle ait lokalite bilgileri ve bu lokalitelerde bulunan haplotiplerin dağılımını içeren veriler Çizelge 4.1'de verilmektedir. Ayrıca D-loop bölgesi kullanılarak hesaplanan ham nükleotid çeşitliliği (Dxy), net nükleotid çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği Çizelge 4.2'de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Lokalitelere göre D-loop haplotiplerinin dağılımı (haplotip isminin yanında yer alan parantez içindeki değerler haplotipin görülme sayısını göstermektedir)

Lokalite	Haplotip (D-Loop)	Lokalite	Haplotip (D-Loop)
Karabey	Hap 1 (7) Hap 2 (1)	Munzur	Hap 19 (8)
Abant	Hap 1 (4) Hap 3 (1) Hap 4 (8) Hap 5 (1)	Sarız	Hap 20 (5)
Yedigöl	Hap 6(4)	Fırnız	Hap 18 (1) Hap 21 (2)
Akçay	Hap 7 (10)	Körkün	Hap 7 (1) Hap 20 (1) Hap 22 (3)
Çatalalç	Hap 7 (8)	Köprü	Hap 23 (4)
Gemin	Hap 1 (7) Hap 8 (1)	Alakır	Hap 24 (8)
Tamdere	Hap 1 (1) Hap 8 (6)	Ayıderesi	Hap 1 (3)
Yağmurdere	Hap 1 (10)	Rezve	Hap 7 (4)
İkizdere	Hap 7 (2) Hap 9 (7) Hap 10 (1) Hap 11 (1)	Çatak	Hap 25 (7)
Ovit	Hap 1 (8) Hap 9 (1) Hap 12 (1)	Ortaköy	Hap 26 (2) Hap 27 (1)
Dörtkilise	Hap 13 (2) Hap 14 (5)	Toro	Hap 28 (2)
Karaçingil	Hap 17 (8)	Eşen	Hap 29 (4)
Merekum	Hap 4 (11) Hap 16 (8)	Kengel	Hap 7 (6)
Koyunlu	Hap 17 (9)	Kırık	Hap 30 (5) Hap 31 (1) Hap 32 (1)
Akdere	Hap 18 (11)	Rizekent	Hap 26 (2) Hap 33 (4)
Tohma	Hap 19 (9)	Çağlayan	Hap 34 (1)
Sürgü	Hap 19 (11)	Uzungöl	Hap 7 (1)

Çizelge 4.2. D-loop gen bölgesi kullanılarak hesaplanan ham nükleotid çeşitliliği (Dxy), net nükleotid çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği (koyu renkle gösterilmiştir). Dxy: üst diyagonal, Da: alt diyagonal.

	DA1	AD-ME-MA	TI	AT	DA2	<i>S.salar</i>
DA1	0,00428	0,01625	0,00968	0,01650	0,01297	0,95367
AD-ME-MA	0,00900	0,00953	0,01064	0,01640	0,02078	0,95275
TI	0,00743	0,00560	0,00000	0,01151	0,01507	0,95438
AT	0,01130	0,00844	0,00859	0,00437	0,02154	0,95327
DA2	0,00751	0,01255	0,01191	0,01545	0,00584	0,95634
<i>S. salar</i>	0,94857	0,94483	0,95158	0,94751	0,95032	0,00245

4.1.2. Filogenetik Analizler

Kullanılan 4 farklı filogenetik analiz ile elde edilen ağaçların birbirine çok yakın topolojilere sahip oldukları gözlenmiştir.

Kimura 2 parameter baz değişim modeli ve Neighbour Joining algoritması kullanılarak oluşturulan filogram Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Ağaç incelendiğinde 5 ana soy hattının varlığı gözlenmektedir. Bu ana soyhatları daha önce Bernatchez (2001) tarafından tanımlanan soy hatlarıyla uyumludur.

Danubian soy hattının ağaçta 2 alt soy hattına ayrılmış olduğu gözlenmektedir. İlk klad DA1 içerisinde yer alan haplotipler genellikle Karadeniz drenajı popülasyonlarına ait olup, bunun yanı sıra az da olsa Ege, Marmara, Akdeniz ve Basra Körfezi popülasyonlarını kapsamaktadır. DA2 soy hattı sadece Hazar Denizi popülasyonlarını içeren ayrı bir kladdır ve ülkemizden Ortaköy, Koyunlu ve Toro popülasyonlarına ait 4 haplotip (Hap17, Hap26, Hap27, Hap28) içermektedir.

TI soy hattını oluşturan tek haplotip Dicle Nehri Çatak popülasyonuna aittir. TI soy hattının ülkemizde var olan yeni bir soy hattı olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Susnik vd., 2005, Bardakci vd., 2006). Bu çalışmada da aynı sonuç % 85’lik bootstrap değeriyle desteklenmektedir.

AD-ME-MA soyhattında alt kladlar olarak Adriyatik, Mediterreanean ve *marmoratus* bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda Türkiye'deki alabalık popülasyonlarından Akdeniz ve Basra Körfezi (sadece Fırat Nehri) Havzasındakilerin AD soy hattına ait oldukları belirlenmiş, ME ve MA soy hattının ülkemizde bulunmadığı rapor edilmiştir. Çalışmamız sonucunda AD ve ME soy hatları için aynı bulgulara ulaşılmıştır. Ancak 29 numaralı haplotipin GeneBank'tan alınan *marmoratus* soy hattını temsil eden haplotiple (MAcs1) % 87'lik bootstrap değeriyle desteklenen bir klad oluşturduğu gözlenmektedir. Çalışmamızın sonuçlarına göre bu haplotip Eşen popülasyonunda fikse olmuş bir haplotiptir ve bu popülasyon ülkemizde daha önceden rapor edilmemiş *marmoratus* soyhattının varlığını göstermektedir. Daha önce ülkemizde bulunmadığı belirlenen AT soy hattına ait bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.4). Soyhatlarının ülkemizdeki dağılımı Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

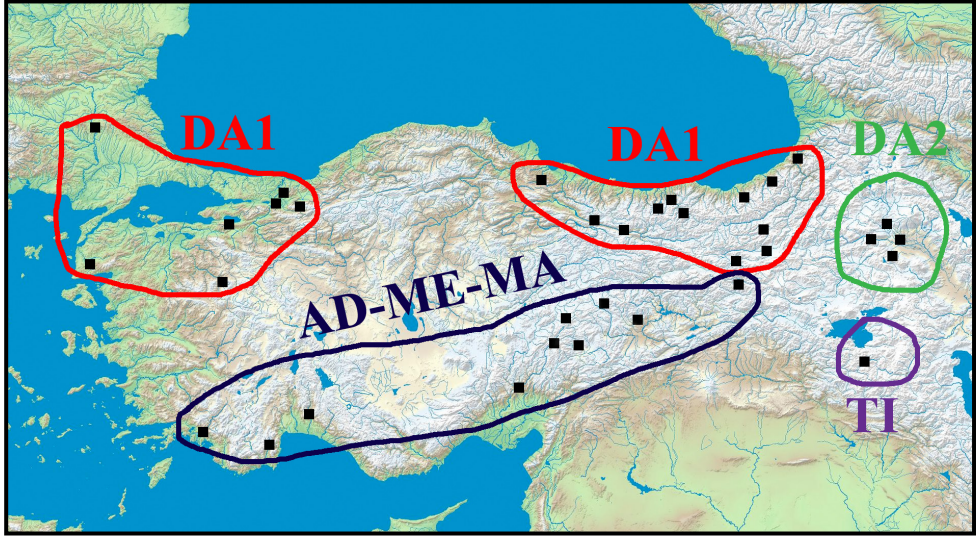
Alabalıkların ana soyhatları arasındaki genetik uzaklıklar değerlendirildiğinde birbirine en uzak olanlar AT ve DA2 (% 1,54) ve en yakın olanlar ise TI ve AD-ME-MA (% 0,56)'dır.

Parsimoni analizinde 'Heuristic Search' algoritması kullanılarak D-loop bölgesinin 525 parsimoni informatif karakteri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda eşit uzunluğa sahip 51 ağaç elde edilmiştir. Bu ağaçların uzunlukları 595, Consistency Index (CI): 0.934, Retention Index (RI): 0.942'dir. Elde edilen ağaçlar arasında farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla Kishino-Hasegawa testi uygulanmış ve anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Burada, topolojiler aynı olduğu için sadece % 50 Majority Rule ağacı verilmiş ve düğüm noktalarına 10.000 replikasyonla elde edilen bootstrap değerleri yazılmıştır (Şekil 4.3). Bu ağaçta yine aynı soy hatları belirgin bir şekilde ayrılmakta olup TI kladının DA1 ve DA2 ile % 61'lik bir bootstrap değeriyle grup oluşturduğu gözlenmektedir.

Çalışmamızda yer alan 34 popülasyondan 14 tanesi birden fazla haplotip içermektedir ve bunların çoğu da Karadeniz drenajına ait popülasyonlardır. Popülasyonlar arasında en fazla haplotip içerenler İkizdere ve Abant popülasyonlarıdır. Hap 1 ve Hap 7 incelenen 7 farklı popülasyonda bulunan en yaygın haplotiplerdir. Tohma, Sürgü ve Munzur popülasyonları (Basra Körfezi) fikse olmuş Hap 19'u paylaşmaktadır. Körkün popülasyonunda DA1 ve AD-ME-MA soyhatlarına ait haplotiplerin birlikte bulunması ilginç bir sonuçtur. İki farklı

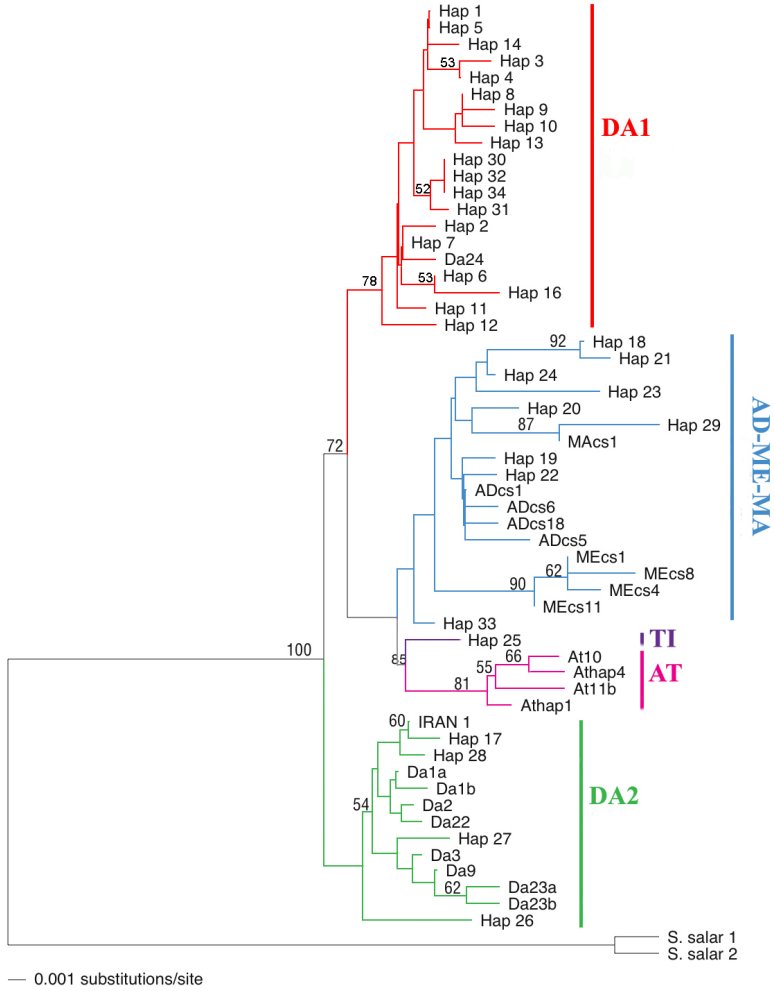
soy hattına ait haplotiplerin aynı alanda yer alması bölgede muhtemel bir hibritleşmenin olabileceğini göstermektedir.

TCS programı kullanılarak mtDNA D-loop bölgesi (945 bp) için 272 dizi analiz edilmiştir. Elde edilen networkte haplotipler arası ilişkiler gözlenmektedir (Şekil 4.5.). Yapılan analiz sonucunda atasal haplotip AD-ME-MA kladı içinde yer alan ADc1 olarak belirlenmiştir. Haplotipler arası ilişkiler incelendiğinde soyhatlarına ait haplotiplerin filogenetik analizler sonucunda gözlendiği şekilde gruplar halinde toplandığı belirlenmiş ve bu gruplar daha önce filogenetik ağaçlarda olduğu gibi renklendirilmiştir. Eşen popülasyonuna ait Hap 29 *marmoratus* soyhattını temsil eden ve Genebank'tan alınıp analizlere dahil edilen MAc1 haplotipinden iki mutasyon geçirerek ayrılmaktadır. Danubian soy hattı incelendiğinde haplotiplerin iki grup altında toplandığı gözlenebilmektedir. İlk grupta Hap 33 merkezde olup Hap12'den en az üç mutasyon geçirerek farklılaşmış haplotipleri içeren ikinci grupta sadece Hazar Denizi popülasyonlarını temsil eden haplotipler yer almaktadır. Ülkemizden Ortaköy, Koyunlu ve Toro popülasyonlarına ait 4 haplotipin (Hap17, Hap26, Hap27, Hap28) bu grupta bulunduğu gözlenmektedir.

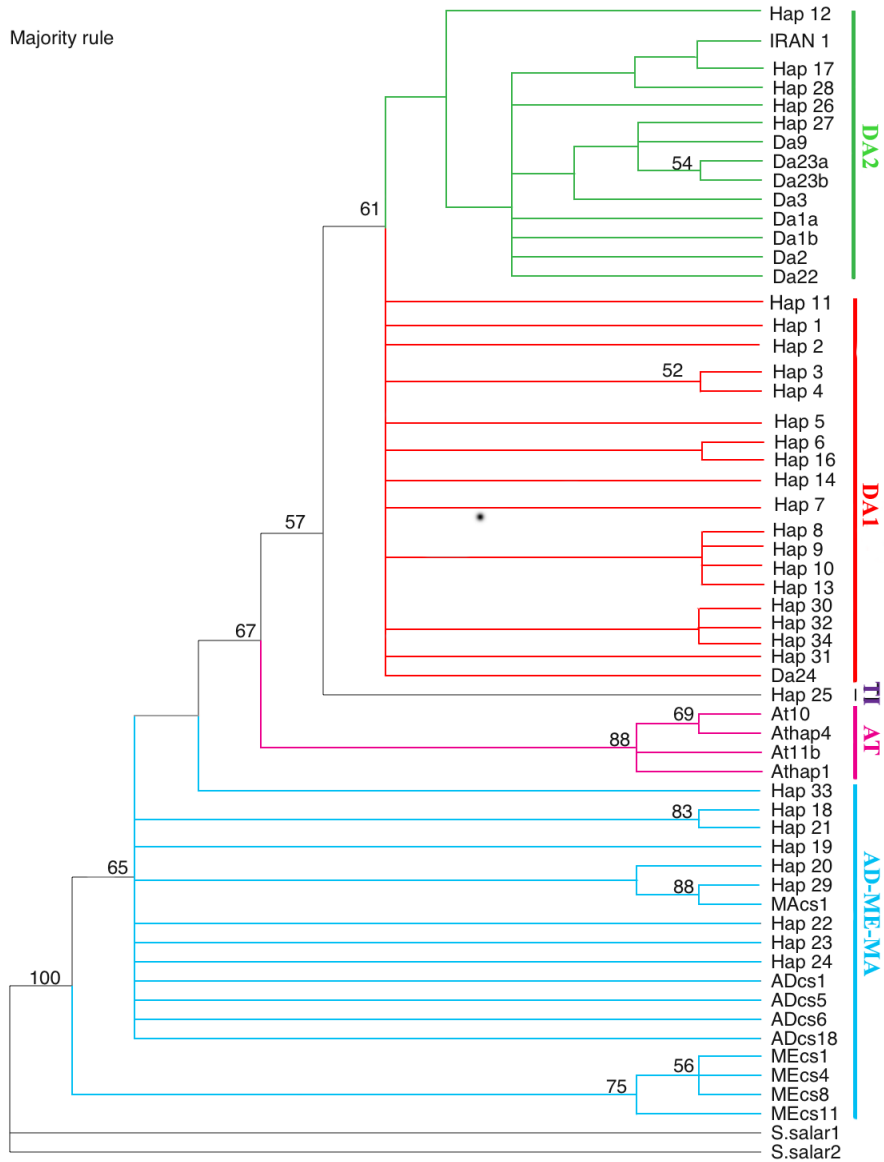


Şekil 4.1. Albalık soyhatlarının ülkemizdeki dağılımı

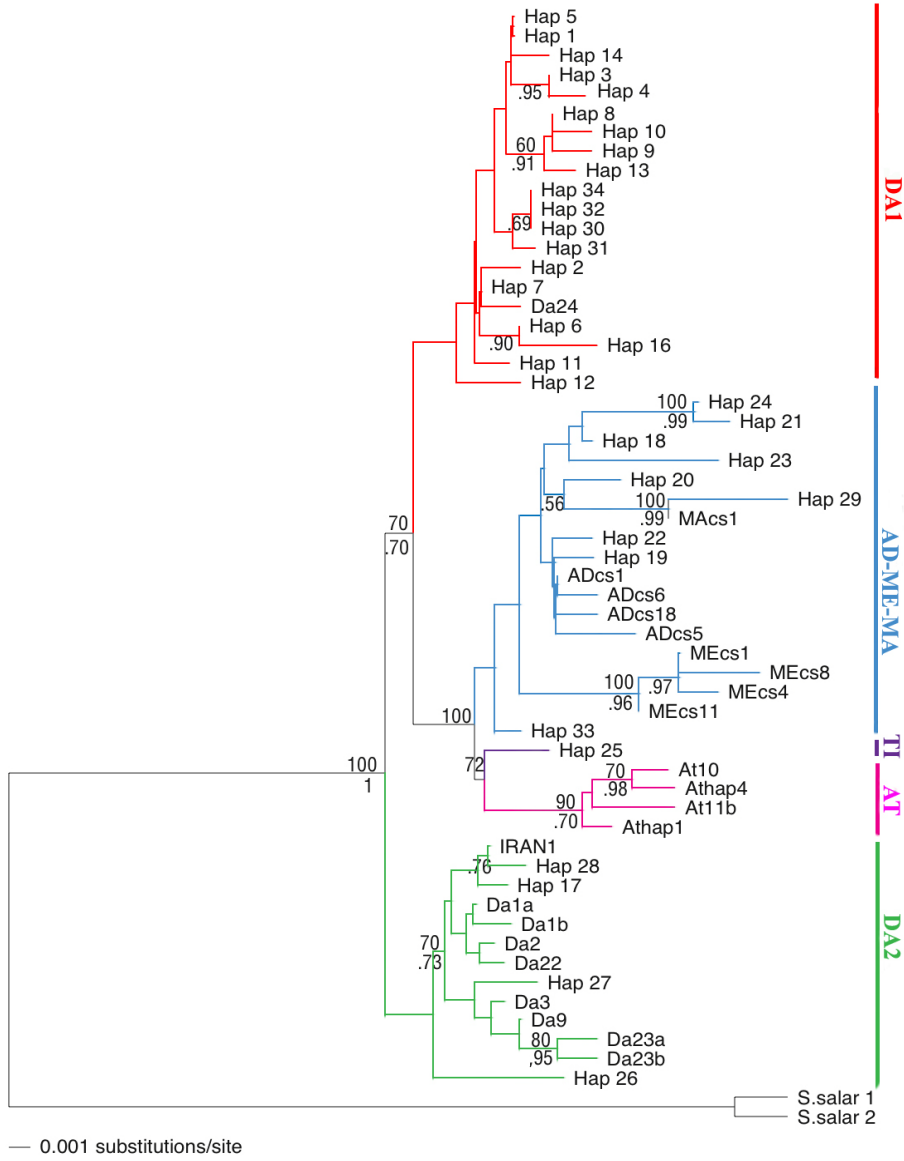
NJ



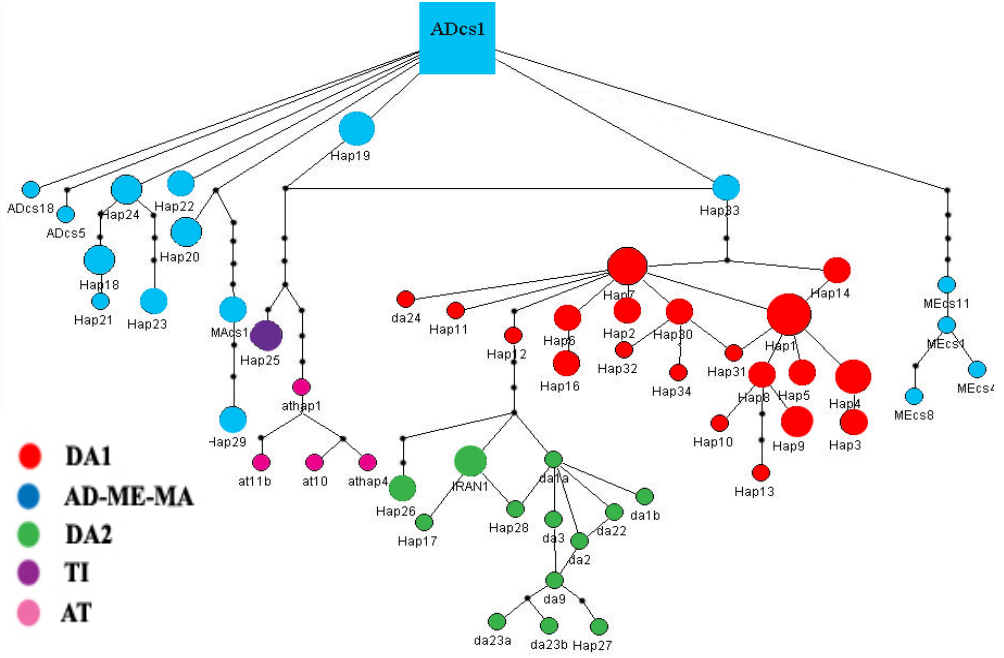
Şekil 4.2. K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (D-loop). Dalların güvenilirlikleri 1000 bootstrap yapılarak test edilmiş ve bu değerlerden % 50'nin üzerinde olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Parsimoni analizi sonucunda elde edilen ağaçları özetleyen % 50 Majority Rule Consensus ağacı. Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap değerleridir.



Şekil 4.4. HKY+G baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş olan Maksimum olasılık (ML) ağacı. Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap değerleri, alt kısmındaki değerler ise posterior probability değerleridir.



Şekil 4.5. 242 örneğe ait D-loop bölgesi parsimoni network ilişkisi. Sembol büyüklükleri yaklaşık haplotip frekansını göstermektedir. Sembollerin yanlarındaki rakamlar D-loop bölgesine ait haplotip numaralarıdır.

4.2. n-DNA ITS1 bölgesi

Çalışmada yer alan 34 farklı lokalitenin her birinden 2 birey için ITS1 analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda 572 baz çiftinden 31 bölgede varyasyon gözlenmiş olup bunlardan 9 tanesinin parsimoni informatif olduğu belirlenmiştir. Çalışılan lokalitelerde bulunan ITS1 dizileri Çizelge 4.3'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Lokalitelere göre ITS1 dizilerinin dağılımı

LOKALİTE	BİREY SAYISI	ITS1
Karabey	2	rTR1
Abant	2	rTR1
Yedigöl	2	rTR1
Akçay	2	rTR2
Çatalalıç	2	rTR1
Gemin	2	rTR2
Tamdere	2	rTR1-rTR3
Yağmurdere	2	rTR1
İkizdere	2	rTR1-rTR4
Ovit	2	rTR1
Dörtkilise	2	rTR1-rTR2
Karaçingil	2	rTR2
Merekum	2	rTR1
Koyunlu	2	rTR2
Akdere	2	rTR5
Tohma	2	rTR1
Sürgü	2	rTR6
Sarız	2	rTR7-rTR8
Fırız	2	rTR5
Körkün	2	rTR7-rTR9
Köprü	2	rTR10
Alakır	2	rTR11
Ayıderesi	2	rTR1
Rezve	2	rTR1
Çatak	2	rTR1-rTR12
Ortaköy	2	rTR2
Toro	2	rTR2
Eşen	2	rTR7
Kengel	2	rTR1
Kırık	2	rTR1
Rizekent	2	rTR1-rTR2
Çağlayan	2	rTR13
Uzungöl	2	rTR1

Analiz sonucunda dış grup dışında 13 farklı ITS1 dizisinin olduğu gözlenmiştir. Bunlardan rTR1 daha önce yapılan bir çalışmada Türkiye’de (Turan vd., 2009) Ovit popülasyonunda gözlenen ITS1 dizisidir. Yine rTR3 ve rTR9 Susnik (2005) tarafından yapılan çalışmada tanımlanan ITS1 dizileridir. Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda rTR1’in çalışılan popülasyonlarda frekansı en sık olan ITS1 dizisi olduğu gözlenmektedir (% 50). Bunu % 20’lik bir frekansla rTR2 izlemektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi mtDNA makrocoğrafik alanda daha yüksek varyasyon göstermesi, mutasyon oranının yüksek olması, rekombinasyon göstermemesi ve haploid olmasından dolayı yakın geçmişte ayrılan popülasyonlar arasındaki varyasyonu daha iyi göstermektedir. mtDNA’dan elde edilen bulguları karşılaştırmak için çalışmamızda ITS1 bölgesi kullanıldı ve filogenetik analizleri gerçekleştirildi. 68 ITS1 dizisini ve dış grup olarak *Salmo salar*’ı içeren NJ ağacı Şekil 4.6’te görülmektedir. Ağaçta dizi isimlerinin yan tarafında yer alan renkli yuvarlaklar mtDNA analizi sonucunda elde edilen soyhhatlarını temsil etmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde nDNA’nın mtDNA gibi soy hatları arasında çok net bir ayırma göstermemekle beraber ağaçta iki ayrı filogenetik grup olduğu görülmektedir (rA ve rB). Bu iki grup arasındaki ham nükleotid çeşitliliği (Dxy) 0,01300 ve net nükleotid çeşitliliği (Da) 0,00919 olarak hesaplanmıştır. mtDNA ağacında elde ettiğimiz bulgularla karşılaştırdığımızda ITS1 filogramında rTR1’in DA, AD ve TI soyhhatlarını temsil eden birçok popülasyonda paylaşılan bir dizi olduğu gözlenmektedir. Bu dizi AD’yi temsil eden tek bir popülasyonda (Tohma’da) gözlenmektedir. Bu da diğer AD popülasyonlarından farklı olarak Akdeniz değil Basra Körfezi (Fırat) drenajına ait bir popülasyondur. rTR4 sadece İkiizdere popülasyonunda, rTR9 sadece Körkün’de, rTR12 ise sadece Çatak popülasyonunda gözlenen bir ITS dizisidir. rTR7,8,10 ve 11 Akdeniz drenajına ait olan AD soyhattına ait popülasyonlarda gözlenen dizilerdir ve bunlar % 62’lik bir bootstrap değeri ile ayrı bir grup oluşturmuşlardır. rTR7 Eşen popülasyonunda da gözlenmektedir. mtDNA filogramı incelendiğinde çalışmamızda ilk kez tanımlanan *marmoratus* soy hattını temsil eden bu popülasyonun yine AD soyhattıyla çok yakından ilişkili olduğu gözlenmektedir. rA’nın bazalinde yer alan rTR13 Tamdere popülasyonunda gözlenen ITS1 dizisidir ve burası DA soyhattının en kuzeyindeki popülasyondur.

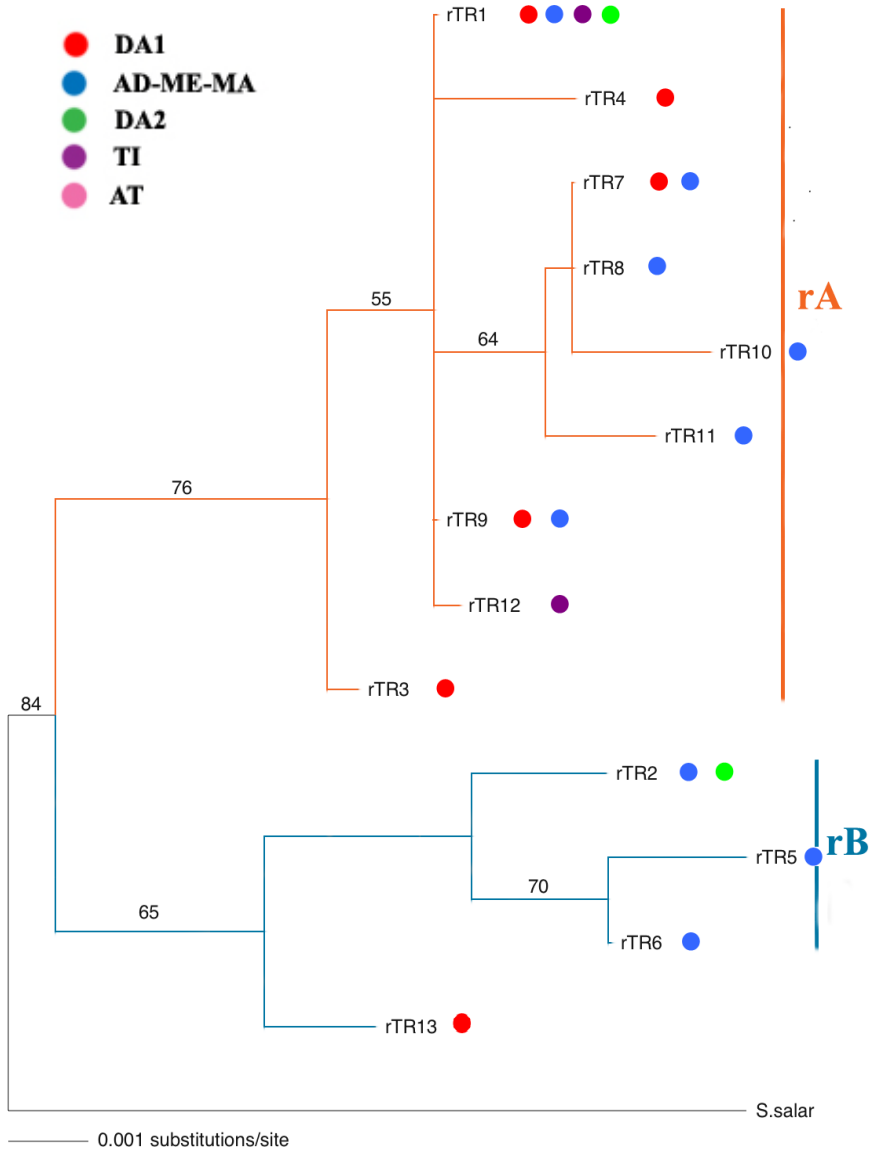
rB kladı sadece AD ve DA soyhattına ait populasyonlarda bulunan ITS1 dizilerini içeren bir kladdır. rTR2 ve rTR13 DA, rTR5 ve rTR6 AD'ye ait populasyonlarda bulunmaktadır ve ağaçta da görüleceği gibi bunlar birbirinden (% 83'lük bir bootstrap değeriyle) net bir şekilde ayırt edilebilmektedir.

Parsimoni analizinde 'Heuristic Search' algoritması kullanılarak ITS1 bölgesinin 9 parsimoni informatif karakteri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda eşit uzunluğa sahip 5 ağaç elde edilmiştir. Bu ağaçların uzunlukları 21, Consistency Index (CI): 0,810, Retention Index (RI): 0,846'dir. Elde edilen ağaçlar arasında farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla Kishino-Hasegawa testi uygulanmış ve anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.4). Bu ağaç ve ML ağacı NJ ağacıyla topoloji açısından benzerlik göstermektedir (Şekil 4.7; Şekil 4.8).

Çizelge 4.4. Parsimonik 5 ağacı karşılaştıran Kishino-Hasegawa test sonuçları

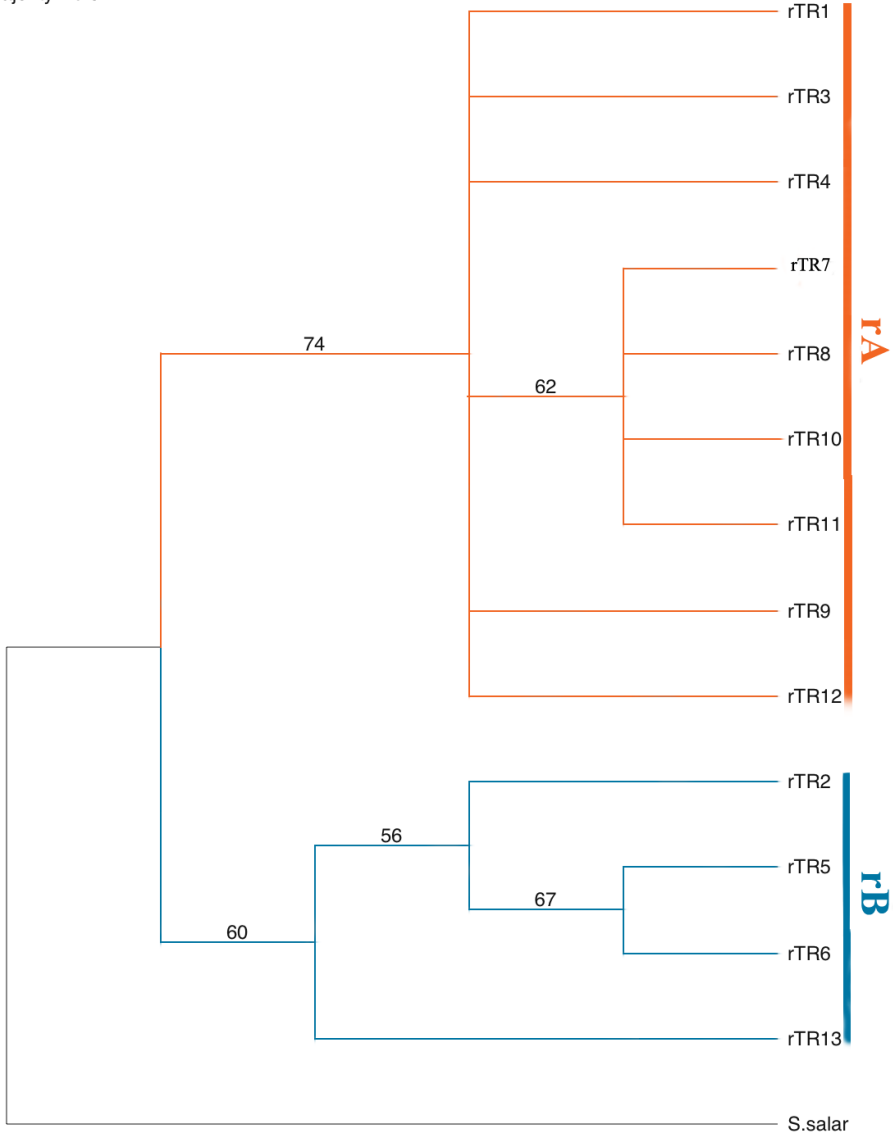
Ağaç	Uzunluk	Uzunluk farkı	sd	t	p
1	21	best			
2	21	0	1.41542	0.000	1.000
3	21	0	1.41542	0.000	1.000
4	21	0	2.00171	0.000	1.000
5	21	0	2.00171	0.000	1.000

TCS programı kullanılarak ITS1 (576 bç) için 68 dizi analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda rA içinde yer alan rTR1 atasal dizi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).

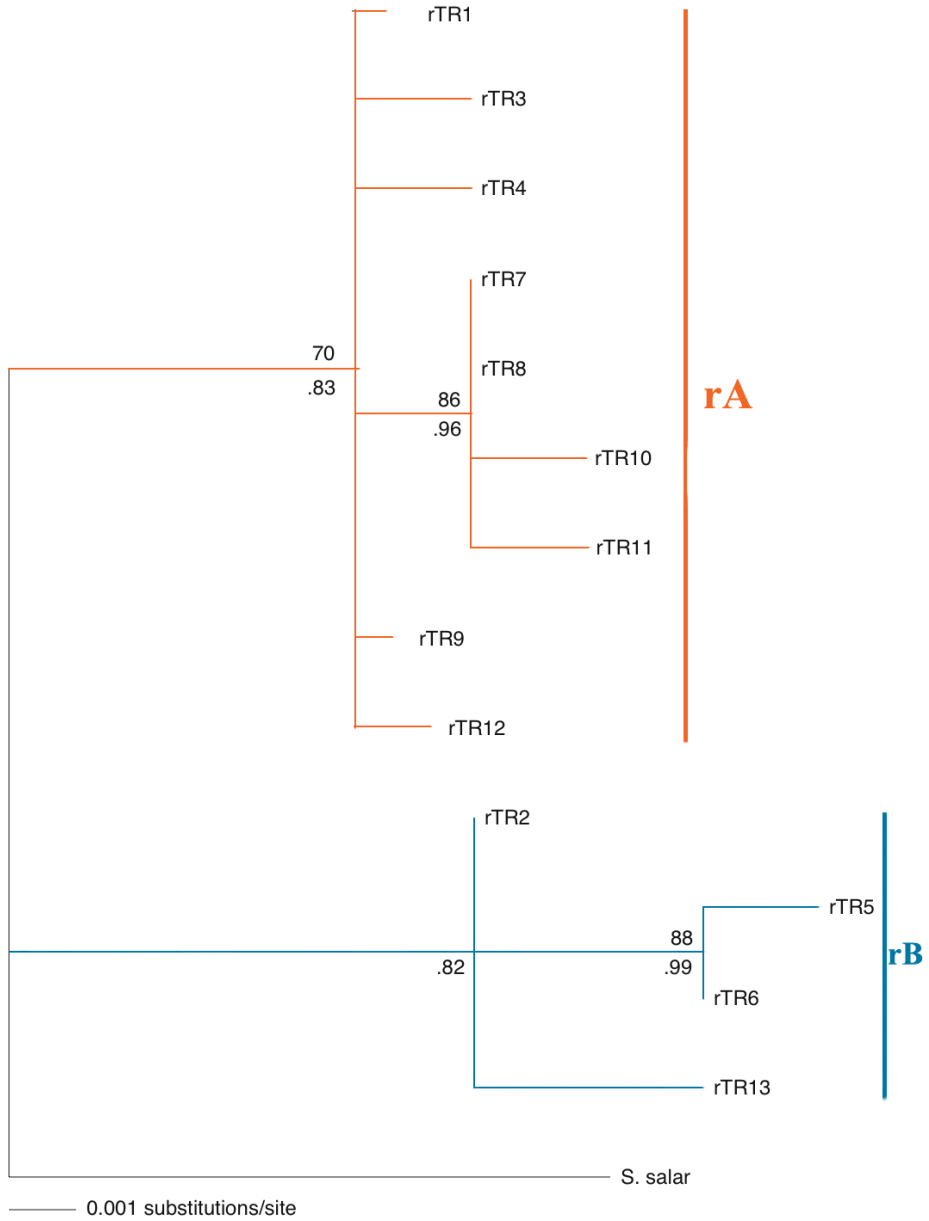


Şekil 4.6. K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (ITS1). Dalların güvenilirlikleri 1000 bootstrap yapılarak test edilmiş ve bu değerlerden % 50'nin üzerinde olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir. Dizi isimlerinin yan tarafında yer alan renkli yuvarlaklar dizinin bulunduğu mtDNA soyhatlarını göstermektedir.

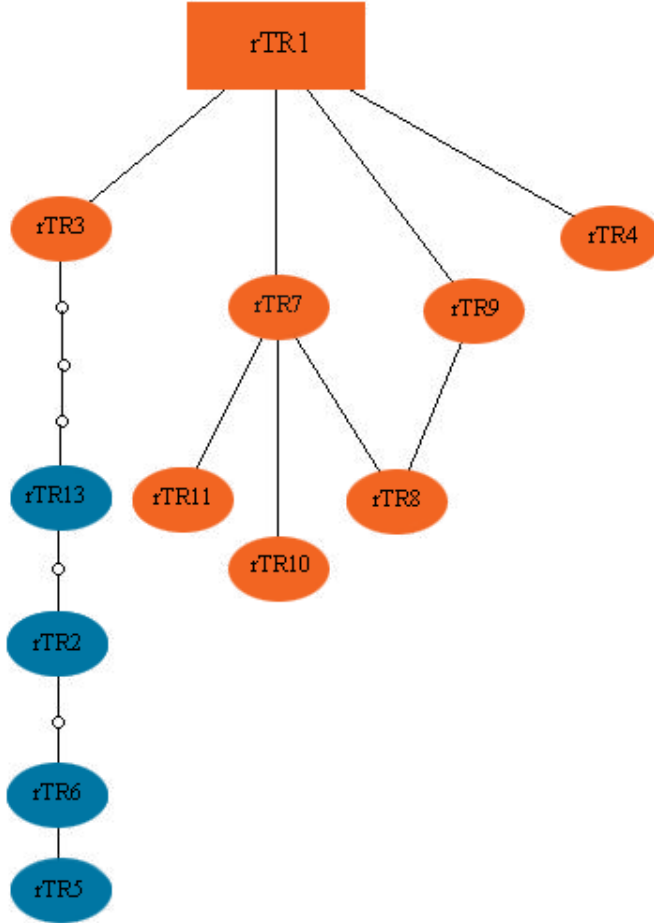
Majority Rule



Şekil 4.7. Parsimoni analizi sonucu elde edilen 5 ağacı özetleyen Majority Rule Consensus ağacı. Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap değerleridir.



Şekil 4.8. ITS1 bölgesine ait Maksimum olasılık (ML) ağacı. Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap değerleri, alt kısmındaki değerler ise posterior probability değerleridir.



Şekil 4.9. 68 örneğe ait ITS1 bölgesi parsimoni network ilişkisi. Sembollerin merkezinde yer alan rakamlar ITS1 bölgesine ait sekans numaralarıdır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Salmo trutta filogenisi ile ilgili son yirmi yılda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Bernatchez vd., 1992; Bernatchez, 2001; Cortey vd., 2004). Allozim varyasyonu çalışmaları öncelikli olmakla beraber ilerleyen zamanlarda bu verilerden elde edilen genetik çeşitlilik hesaplarının gen frekansındaki varyasyonlara dayanması nedeniyle alellerin kendileri arasındaki filogenetik akrabalıklar belirlenememiştir. Bu da DNA seviyesinde genetik varyasyonun çalışılması ihtiyacını doğurmuştur (Bernatchez vd., 1992).

Memelilerde DNA dizi varyasyonu çalışmaları sonucunda mitokondrial genomun en değişken bölgesinin kodlama yapmayan D-loop bölgesi olduğu bilinmektedir (Vigilant vd., 1989). Daha sonra yapılan çalışmalar balıklarda da bu bölgenin popülasyonlar arası ilişkileri belirlemede, filogenetik akrabalıkları çıkarsamada önemli bir moleküler belirteç olduğunu ortaya koymuştur (Avise, 1994).

Bu çalışmada Türkiye coğrafyasında 34 alabalık popülasyonuna ait 242 bireyde mtDNA D-loop bölgesinin tümünün dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 1012 baz çiftlik bölgede toplam 621 nükleotid pozisyonunda (% 65) varyasyon gözlenmiştir. Toplam 34 popülasyondan 14 tanesinin birden fazla haplotip içerdiği, birçok popülasyonun ise kendine özgü haplotipleri barındırdığı saptanmıştır. Doğal alabalık popülasyonları arasında görülen genetik farklılaşmanın nedeninin popülasyonlar arasındaki sınırlı gen akışı, lokal adaptasyon ve rastgele genetik sürüklenme olabileceği düşünülmektedir (Adkinson, 1995; Palm ve Ryman, 1999). Çoğunlukla alabalık popülasyonları arasındaki genetik farklılığın nehirlerin fiziksel olarak izole olmuş kısımları veya farklı dereler gibi önemli bariyerlerden kaynaklanan izolasyonlar olduğu düşünülmesine rağmen (Ferguson, 1989; Wenburg vd., 1998), hiçbir bariyer bulunmayan bir nehir içerisinde uzaklığa bağlı olarak popülasyonlar arasında genetik farklılığın önemli olduğu görülmüştür. Alabalık popülasyonları arasında görülen mikrocoğrafik farklılaşmanın beslenme ve üreme gibi içgüdüsel davranışlardan da kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Estoup ve Angers, 1998). Ayrıca bu balıkların yüksek dağ sularında yaşamaları izole olmalarında etkili diğer bir etmen olabilir. Bu nedenlerden dolayı alabalık popülasyonlarının genetik olarak oldukça yapılanmış bir tür olduğu düşüncesi bu çalışma ile desteklenmektedir.

Yapılan filogenetik analizler sonucunda, ülkemizde 6 ana soy hattından 4 tanesinin bulunduğu görülmektedir. Bunlar AD, DA, TI ve MA soy hatlarıdır. Bernatchez (2001) mtDNA PZR-RFLP ve dizi analizi verilerini kullanarak coğrafik ve fenotipik olarak farklı olan alabalık popülasyonlarının analizi sonucunda AT, ME, DA, MA ve AD olmak üzere beş ana evrimsel soy hattının varlığını ortaya koymuştur. Yine aynı çalışmasında Türkiye coğrafyasında beş ana soy hattından ikisinin bulunduğunu tespit etmiştir. Bunlardan AD daha çok Akdeniz ve Adriyatik Denizi havzasında dağılışı göstermektedir. DA soy hattı ise Karadeniz, Hazar Denizi ve Aral Denizi havzalarında yer almaktadır.

Bardakçı vd. (2006) Türkiye’de bulunan alabalık popülasyonlarında mtDNA’nın NADH 5/6 ve sitokrom b/D-loop bölgeleri PZR-RFLP analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Dicle Nehri Havzasındaki Çatak popülasyonuna ait olan balıkların tanımlanmış beş soy hattından farklı olduğu ve bu nedenle ayrı bir soy hattı olduğu ileri sürülmüş ve Tigris (TI) olarak adlandırılmıştır. Susnik vd. (2005)’de mtDNA kontrol bölgesi ile dizi analizi çalışması sonucunda Çatak popülasyonunun TI soy hattına ait olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada da aynı sonuç NJ filogramında %85’ lik bir bootstrap değeriyle desteklenmektedir.

Fırat ve Dicle nehirleri İran Körfezi’ne akan iki önemli nehirdir. Dicle Nehri Türkiye’de Elazığ’ın yanındaki iki kaynaktan doğmakta ve Fırat Nehrine katılmaktadır. Birçok rapora göre alabalıklar Dicle-Fırat havzasına getirilmiştir (Coad, 1996). Ancak bazı yazarlar Dicle havzasının yukarı kısımlarında doğal alabalıkların bulunabileceğini belirtmiştir. Tortonese (1954) Çatak nehrinden alabalık tanımlamıştır. Susnik vd. (2005)’de elde edilen bireylerde gözlenen haplotip Da26 diğer DA’lardan %1-1,5 oranında farklıdır, ancak TI kladı % 54 gibi düşük bir bootstrap değeriyle desteklenmektedir. Bu çalışmada TI (Hap 25) diğer DA’lardan % 0,7-1,5 oranında farklı olmakla beraber, güvenilirlik % 85 gibi yüksek bir değerdedir.

Daha önce yapılan mtDNA çalışmalarında İspanya’dan Türkiye’ye kadar tüm Akdeniz Havzasında bulunan mtDNA genotiplerinin ME, MA, AD soy hatlarından herhangi birine ait olduğu belirtilmiştir (Bernatchez vd., 1992; Giuffra vd., 1994; Bernatchez, 1995). Presa vd. (2002) hem mtDNA hem de nDNA ITS1 verilerini birlikte kullanarak Türkiye’den Göksu, Dimçay ve Tohma’dan elde ettikleri örneklerin AD soy hattına ait olduklarını belirtmişlerdir. Daha önce

mtDNA PZR-RFLP ve mikrosatellitler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda ülkemizde Akdeniz ve Basra Körfezi (sadece Fırat Nehri) Havzasındaki alabalık populasyonlarının AD, Karadeniz, Marmara, Ege ve Hazar Denizi Havzasındakilerin ise DA soy hattından oldukları belirlenmiştir. Ayrıca ME ve MA'nın ülkemizde bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda AD ve ME için aynı bulgular elde edilmekle beraber, 29 numaralı haplotip MA soy hattının ülkemizde de bulunduğunu göstermektedir. Eşen populasyonunda fikse olan bu haplotip ve MAcs1'in ayrı bir klad oluşturduğu NJ filogramında % 87'lik bir bootstrap değeriyle desteklenmektedir. Splendiani (2006) *marmoratus* soy hattının İtalya ve Yunanistan'da bulunmasının en güneyde yayılmış olan ataya ait bir kalıntı olabileceğini belirtmiştir.

Türlere ilişkin soy hatlarının ayrılma zamanını tahmin etmeye yönelik genetik çeşitlilik değerleri esas alınarak moleküler saat çalışmaları yapılabilmektedir. Ancak bu konuda moleküler saat verileri çok farklılık gösterebilmektedir (Smith, 1992; Wilson vd., 1996; Bernatchez, 2001). Eşen ve diğer MA haplotipi arasındaki nükleotid çeşitliliği 0,00305'tir. Milyon yıl başına % 1-2 'lik mutasyon oranını uygulandığında ayrılma zamanları Holosene denk gelmektedir (Bernatchez, 2001). Yaklaşık 21.500 yıl önce kuzey Ege'de, Yunanistan'ın bazı bölgelerinde ve Ege Denizi'nin doğu kısmında geniş kayalık alanlar bulunmaktaydı. Ege'nin her iki tarafında var olan arazi izdüşümleri Anadolu ve Yunanistan'ı birbirine bağlayan köprüler oluşturmaktaydı. Bunlar ara ara deniz kanallarıyla ayrılıyordu (Stanley ve Blanpied, 1980). 11.800 yıl önce kayalık alanlar oldukça küçülmüştü ancak birçok ada şu anki durumunu korumaktaydı. Yaklaşık 7000-8000 yıl önce deniz kademeli olarak düz arazilere girdi ve sahil konfigürasyonu bugüne yakın bir görünümdeydi (Perissoratis vd., 2001).

Bu soy hattının dağılım modeli *Chondrostoma* (Durand vd, 2003), *Aphanius fasciatus* (Triantaphyllidis vd., 2007) gibi bazı balıklarda da gözlenmektedir. Ülkemizde sadece Eşen Çayında bulunması ve fikse olmuş bir haplotip olmasından dolayı öncelikli olarak korunması gereken bir popülasyondur.

Bu çalışmada yapılan filogenetik analizler sonucunda DA1'in Karadeniz drenajı populasyonlarının yanı sıra Ege, Marmara, Akdeniz ve Basra Körfezi'ne ait populasyonları da kapsadığı, DA2'nin ise sadece Hazar populasyonlarını içeren ayrı bir klad olduğu tespit edilmiştir. DA soy hattı Ponto-Hazar'da buzul ilerlemesi süresince hem şiddetli habitat kaybının doğrudan etkisi hem de jeolojik dönemler

süresince Karadeniz, Hazar ve Aral Denizi Havzalarının genişleme, daralma ve bağlantılarının değişkenliği nedeniyle karmaşık bir dağılıma sahiptir (Arkhipov vd., 1995). Kafkas bölgesinde bulunan ilk alabalık fosillerinden ve daha sonraki çalışmalardan elde edilen bilgiler, DA soy hattına ait mevcut populasyonların Karadeniz ile bağlantılı drenajlardan köken aldığını göstermektedir.

Soy hatları arasındaki net nükleotid çeşitlilikleri Çizelge 4.2’de gösterilmektedir. En düşük değer TI ile AD-ME-MA (0,00560) ve en yüksek değer AT ve DA2 arasında (0,01545) tespit edilmiştir. Bardakcı (2006) DA/TI, DA/AD ve AD/TI arasındaki net nükleotid çeşitlilik değerlerini % 2,49, % 2,27, % 2,42 olarak belirtmiştir.

Bernatchez (2001) soy hatları arasındaki net genetik uzaklık değerlerinin % 1,21 ile % 2,19 arasında değiştiğini tespit etmiştir. mtDNA-RFLP ile yapılan önceki çalışmalarda (Apostolidis vd., 1996) daha yüksek değerler elde edilmiş, ancak daha sonra mtDNA D-loop bölgesinin dizisi ile araştırmacılar daha düşük değerlere ulaştığını gözlemlemişlerdir (Apostolidis vd., 1997; Suarez vd., 2001; Cortey vd., 2004). mtDNA-RFLP analizlerinde yüksek değerlerin gözlenmesi bu analizlerde daha büyük mtDNA bölgelerinin görüntülenebilmesi ve kontrol bölgesinin en azından bazı kodlama yapan bölgelere göre daha yavaş evrimleşmesine bağlanabilir.

TCS programı ile yapılan parsimoni network analiz sonucunda mtDNA D-loop bölgesi için atasal haplotip ADc1 olarak belirlenmiştir. Maric vd (2006) yaptıkları çalışmada aynı sonucu elde etmişlerdir ve Lago mare (Messiniyen Krizi’nin son evresi) olarak adlandırılan jeolojik olay sonucunda Akdeniz alabalık populasyonlarının izolasyonunda ve daha sonra Akdeniz nehir sistemlerine yayılmasında çok önemli role sahip olduğunu belirtmişlerdir. Akdeniz alabalıkları da (AD, ME, MA) bu sırada izole oldukları ileri sürülmüştür. AD’nin oldukça geniş dağılımı kurucu populasyon olabileceğini desteklemektedir (Apostolidis vd, 1997).

mtDNA’nın populasyon genetiği ve evrimsel genetik çalışmalarında özellikle yakın akraba organizmalar arasındaki filogenetik çıkarımlar için çok önemli ve vazgeçilmez bir moleküler belirteç olsa da çekirdek DNA’sı ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajlara sahip olduğu daha önce belirtilmişti. Filocoğrafik çalışmaların büyük çoğunluğu da (>%80) bu gerçeğe dayanarak mtDNA analizlerine

dayanmaktadır. Ancak bu tarz çalışmaların güvenilirliği mitokondrial genom sadece anasal kalıtımı yansıttığı için eleştirilmektedir (Degnan 1993; Palumbi ve Backer; 1994). Bu nedenle çalışmalarda nükleer ve mitokondrial genlerin birlikte kullanımı en doğrusudur (Awise, 2000). Ayrıca, mtDNA tek başına popülasyonlar arası hibritleri saptamada yetersiz kalmaktadır. Bu açıdan nükleer DNA popülasyonlar arası ikincil temasların saptanması ve hibritlerin belirlenmesinde daha kullanışlıdır. Ayrıca mtDNA'nın yüksek mutasyon oranı homoplazilerin olma olasılığını da artırmasının yanısıra, genetik sürüklenmeyle nükleer DNA'dan daha hızlı fiksasyona uğramasından dolayı hibritleşme durumlarında tek bir soya ait mtDNA bulunabilmektedir.

Bu sebeplerle mtDNA ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak ve güvenilirliklerini artırmak amacıyla nDNA ITS1 gen bölgesi kullanılmıştır. Analizler sonucunda 68 birey için (34 popülasyon) 572 baz çiftlik bölgede 31 değişken bölge (% 5.4) tespit edilmiştir ve bunlardan 9 tanesi filogenetik olarak bilgi içermektedir. Presa vd. (2002) yaptıkları çalışmada 86 popülasyondan elde ettikleri bireylerde 572 baz çifti için 16 değişken bölge (% 2,74) gözlemişler ve bunlardan 10 tanesinin parsimoni informatif olduğunu belirtmişlerdir.

ITS1 analizleri sonucunda elde edilen filogenetik ağaçlar incelendiğinde grupların çok daha karmaşık olduğu, mtDNA'da olduğu gibi soy hatlarının net bir şekilde ayrılmadığı gözlenmektedir. Bu rDNA ITS1'in düşük evrimleşme oranıyla açıklanabilir (Gonzales vd., 1990; Suh vd., 1993; Osinov ve Bernatchez, 1996). Yine ITS1 ağacının dallarının güvenilirlik değerlerinin mtDNA verileri ile karşılaştırıldığında çok daha düşük olduğu daha önce de benzer filocoğrafik çalışmalarda da rapor edilmiştir (Manos vd., 1999; Mayer ve Soltis, 1999).

Alabalıkların köken aldıkları sığınaklara göre farklılaşan soy hatları arasında, yeniden kolonize olma sürecinde ikincil temas olduğu düşünülmektedir (Persat ve Berrebi, 1990; Hynes vd., 1996). Özellikle Kuzey Avrupa tatlı su balık popülasyonları son buzul olaylarından yoğun bir şekilde etkilenmesinden dolayı ancak son zamanlarda yeniden kolonize olabilmüşlerdir (Hamilton vd., 1989). Alabalıklar buzullar nedeniyle uzun süre izolasyona uğramışlar, daha sonra farklı soy hatları yeniden kolonize olma sürecinde ikincil temas oluşturmuşlardır. ITS1 ile yapılan filogenetik analizler sonucunda rTR1'in DA, AD ve TI soy hatlarını temsil eden birçok popülasyonda paylaşılan allel olduğu ortaya çıkmıştır. TCS analizinde de atasal allelin rTR1 olduğu gözlemlenmiştir. Bernatchez (2001) DA

soyhattının tüm popülasyonlarından atasal olanın Karadeniz’le ilişkili drenajlardan, AD’nin de Balkanlar/Anadolu refüjünden köken aldığını belirtmiştir. rTR1 dizisinin atasal olması ve bulunduğu popülasyonların hemen hemen hepsinin Karadeniz drenajıyla ilişkili popülasyonlar olması bu sonucu desteklemektedir. rTR1 dizisinin paylaşıldığı popülasyonların DA, AD ve TI soyhatlarında yer alması ve bunların Tigris-Fırat sisteminde bulunması bu alabalıkların Anadolu’dan köken aldığını işaret etmektedir. ITS1 filogenisinden elde edilen sonuçlar ve ağaç topolojilerin genel değerlendirilmesine bakıldığında Türkiye alabalık popülasyonları da alabalıkların evrimsel süreçleri içerisinde ikincil temasları olduğuna işaret etmektedir. Bu ikincil temasların ülkemizde özellikle DA soy hattı ile AD ve TI soy hattı arasında olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir (Bardakçı vd., 2006, Aslan, 2006) ve bu çalışmada da aynı bulgulara rastlanmıştır. Bu temaslar Holosen’de buzulların şiddetli geri çekilmesi süresince Akdeniz su seviyesindeki önemli derecede artış sonucu meydana gelmiştir (Ryan vd., 1997). Sonuç olarak komşu olan Fırat ve Karadeniz havzasının bir bölümü Akdeniz suyuyla istila edilmiş ve bu olay havzalardaki popülasyonların temasına neden olmuştur.

Bardakçı vd. (2006) mtDNA PZR-RFLP sonuçlarında dayanarak bu temasların bundan yaklaşık 7.500 yıl önce buzul dönemi sonrası buzulların erimesi ile Akdeniz su seviyesinin yükselmesi sonucu meydana geldiğini ileri sürmüştür. Bernatchez (2001) AD soy hattının olduğu Fırat Nehri Havzasında DA soy hattının varlığını rapor etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da Dicle Fırat Nehri sisteminde en az üç soy hattının (DA, AD, TI) varlığını ortaya koymaktadır. Bu soy hatları arasındaki ayrılımların Anadolu’nun jeolojik tarihi ve moleküler saat verilerine dayanarak buzul dönemi öncesi Pliyosen’de olduğu düşünülmektedir (Bardakçı vd., 2006).

ITS1 analizi sonucunda elde edilen filogenetik ağaçlarda rB kladında yer alan diziler DA ve AD soyhatlarını temsil etmektedir. Sadece AD soy hattını temsil eden rTR5 ve rTR6’nın oluşturduğu klad %82 gibi (ML filogramında) yüksek bir bootstrap değeriyle desteklenmektedir. Genel olarak karşılaştırıldığında mtDNA verileri ve nDNA verileri birbirleriyle uyumludur.

Her iki gen bölgesi için de yapılan filogenetik analizlerde CI değeri 0.5’in oldukça üzerinde (mtDNA için 0,934, nDNA için 0,810) 1’e yakın bir değerde çıkmış olup

bu da kullanılan verinin güvenilirlik derecesinin yüksek olduğunu ifade etmektedir.

Daha önce Abant gölüne endemik olduğu ileri sürülen alabalıklar *Salmo trutta abanticus* alttürü olarak tanımlanmıştır. Ancak daha önce mtDNA RFLP çalışmasıyla da ortaya konduğu gibi bunlar sadece bir ekolojik formlardır ve farklı bir filogenetik takson değildir. Bu çalışmada da aynı sonuçlara ulaşılmaktadır ve mtDNA D-loop analizi sonucunda elde edilen Abant popülasyonuna ait dört haplotipin (Hap1, Hap3, Hap4, Hap5) DA soy hattına ait oldukları görülmektedir. Aynı sonuç ITS1 analiziyle de desteklenmektedir.

Behnke (1968) Seyhan nehri havzasındaki alabalık örneklerini *Salmo* (Platysalmo) *platycephalus* olarak tanımlamıştır. Çalışmamızda yer alan Sarız ve Körkün popülasyonları Seyhan Nehrihavzasında yer almaktadır. Analizler sonucunda bunlar AD soyhattı içerisinde yer almıştır. Bu sonuçlar Behnke (1968)'in tanımladığı bu altcinsin doğru olmadığını göstermektedir.

Turan vd. (2009) yaptıkları çalışmada Ovit, Çayırbaşı ve Kendirli gibi Karadeniz drenajına ait popülasyonların morfolojik açıdan ve genetik açıdan diğerlerinden farklı olduğunu ve bunların yeni iki tür olduğunu belirtmişlerdir (*Salmo rizeensis* ve *Salmo coruhensis*). Ancak bu çalışmada bu popülasyonlardan elde edilen bireyler DA soy hattı içerisinde yer almaktadırlar. Bernatchez (1992) Atlantik Havzasında gözlenen anadrom veya göl formlarının oluşturduğu popülasyonlarda herhangi bir farklılık gözlemlenmemiş ya da farklı drenajlara ait (Atlantik, Akdeniz, Adriyatik) göl formlarının farklı filogenetik gruplarda yer alabildiğini belirtmiştir. Bu da açıkça gösteriyor ki ekolojik formlar filogenetik akrabalıkları yansıtmamaktadır.

Tüm bu sonuçlar ışığında hem mtDNA D-loop bölgesinin hem de nDNA ITS1'in tümünün sekans analizleri Türkiye coğrafyasında bulunan alabalık popülasyonlarının yapısını ve aralarındaki filogenetik ilişkiyi ayrıntılı bir şekilde ortaya koymaktadır. Ayrıca çalışma sonucunda elde edilen verilerin ortaya koyduğu ikincil temas bulgusunun gösterdiği gibi türlerin evrimsel tarihini açıklayabilmek için farklı moleküler belirteçler kullanılarak farklı bölgelerin analizi daha doğru sonuçları sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Adkison, M. 1995. Population differentiation in Pacific Salmon: Local adaptation, genetic drift or the environment? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 52: 2762-2767.
- Anderson, B. G., Borns, J. 1994. The Ice Age world. Candinavian University Press, 288 p., Norway.
- Apostolidis, A. P., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. 1996. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Grek *Salmo trutta* L (brown trout) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. **Heredity**, 77: 608-618.
- Apostolidis, A., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. T. 1996a. Genetic divergence and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. **Heredity**, 76: 551-560.
- Apostolidis, A., Karakousis, Y., Triantaphyllidis, C. T. 1996b. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Grek *Salmo trutta* L. (brown trout) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. **Heredity**, 77: 608-618.
- Apostolidis A., Triantaphyllidis, C. T., Kouvatsi, A., Economidis, P. S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. **Molecular Ecology**, 6: 531-542.
- Aquadro, C. F., Greenberg, B. D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics**, 103: 287-312.
- Arkipov, S. A., Jehlers, R. G., Johnson H. E. 1995. Glacial drainages towards the Mediterranean during middle and late Pleistocene. **Boreas**, 24:196–206.
- Aslan, S. 2006. Türkiye Doğal Alabalık Populasyonlarında Mikrocoğrafik ve Makrocoğrafik Mikrosatellit DNA Varyasyonu. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 87 s., Sivas.

- Avise, J. C. 1991. Matriarchial liberation. **Nature**, 22: 352-192.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, 511p., USA.
- Avise, J. C., 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard Univesity Press, 384p., Cambridge.
- Aurelle, D., Berrebi, P. 2001. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from South-western France: data from mitochondrial control region variability. **Molecular Ecology**, 10: 1551-1561.
- Balık, S., Geldiay, R. 1996. Türkiye Tatlı Su Balıkları. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 519s., İzmir.
- Ballard, J. W. O. 1992. Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods. **Science**, 258: 1345-1348.
- Bardakçı, F., Değerli, N., Özdemir, Ö., Başbüyük, H. H. 2006. Phylogeography of the Turkish Brown trout *Salmo trutta* L: mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. **Journal of Fish Biology**, 68: 1-20.
- Behnke, R. J. 1968. A new subgenus and species of trout, *Salmo* (Platysalmo) *platycephalus* from south central Turkey, with comments on the classification of the subfamily Salmonidae. **Mitteilungen Hamburgisches Zoologisches Museum und Institut**, 66: 1-15.
- Behnke, R. J. 1972. The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, 29: 639-671.
- Bentzen, P., Haris, A. S., Wright, J. M. 1991. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquacultural species of salmonids and tilapia. In: DNA Fingerprinting Approaches and Application (Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A. J., Wolf, R., Eds.), Birkhauser Verlag, pp. 243-262, Switzerland.
- Berg, L. S. 1948. Freshwater Fishes of the Soviet Union and Adjacent Countries. Vol 1. Akademy Nauk, Moscow.

- Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European Brown trout *Salmo trutta* populations. **Molecular Ecology**, 1: 161-173.
- Bernatchez, L., Osinov, A. G. 1995. Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. **Molecular Ecology**, 4: 285–297.
- Bernatchez, L., Wilson, C. C. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. **Molecular Ecology**, 7: 431-452.
- Bernatchez, L. 2001. The evolutionary history of Brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. **Evolution**, 33: 351-379.
- Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sanchez, L., Martinez, P. 1999. Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution of the anadromous form. **Molecular Ecology**, 8: 1991-2002.
- Chevassus, B., Blanc, J. M., Bergot, P. 1979. Dteninisme genetique du nombre de caeca pyloriques chez la truite fario (*Salmo trutta* L.). **Annales de Ginnaique et Selection Animale**, 11: 79-92.
- Coad, B. W. 1996. Exotic fish species in the Tigris-Euphrates basin. **Zoology in the Middle East**, 13: 71-83.
- Cortey, M., Pla, C., Garcia-Marin, J. C. 2004. Historical biogeography of Mediterranean trout. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33: 831-844.
- Degnan, S. M. 1993. The perils of single gene trees -mitochondrial vs. single copy nuclear DNA variation in white-eyes (Aves: Zosteropidae). **Molecular Ecology**, 2: 219–225.
- Desjardins, P., Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. **Journal of Molecular Biology**, 212: 599-634.

- Duftner, N., Weiss, S., Medgyesy, N., Sturmbauer, C. 2003. Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. **Journal of Fish Biology**, 62: 427-435.
- Dunner, S., Royo, L., Canon, J. 2000. Genetic structure in Atlantic brown trout (*Salmo trutta* L.) population in the Iberian peninsula: evidence from mitochondrial and nuclear DNA analysis. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 117: 105-120.
- Durand, J. D., Bianco, P. G., Laroche, J., Gilles, A. 2003. Insight into the origin of endemic Mediterranean ichthyofauna: Phylogeography of *Chondrostoma* Genus (Teleostei, Cyprinidae). **Journal of Heredity**, 94: 315-328.
- Eliot, J. M. 1990. Mechanisms responsible for population regulation in young migratory trout, *Salmo trutta*. **Journal of Animal Ecology**, 59: 803-818.
- Eliot, J. M. 1994. Quantitative Ecology and the Brown Trout. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press, 286 p, Oxford.
- Estoup, A., Angers, B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. **Advances in Molecular Ecology**, 9: 55-86.
- Ferguson, A., Fleming, C.C. 1983. Evolutionary and taxonomic significance of protein variation in the brown trout (*Salmo trutta* L.). In: Protein Polymorphism (Oxford, G.S and Rollinson, D., Eds.), London Academic Press, pp. 85-99, New York.
- Ferguson, A. 1989. Genetic differences among brown trout stocks and their importance for the conservation and management of the species. **Freshwater Biology**, 21: 35-46.
- Ferris, S. D., Sage, R. D., Huang, C. M., Nielsen, J. T., Ritte, U., Wilson, A. C. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 80: 2290-2294.

- Geldiay, R., Balık, S. 1988. Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üniversitesi Basımevi, 245 s., İzmir.
- Giuffra, E., Bernatchez, L., Guyomard, R. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy. **Molecular Ecology**, 3: 161-172.
- Giuffra, E., Guyomard, G., Forneris, S. 1996. Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). **Molecular Ecology**, 5: 207–220.
- Gonzalez, I. L., Sylvester, J., Smith, T. F., Stambolian, D. 1990. Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, 7: 203–219.
- Griffiths, A. M., Bright, D., Stevens, J. R. 2009. Complete mitochondrial control region sequences indicate a distinct variety of brown trout *Salmo trutta* in the Aral Sea. **Journal of Fish Biology**, 74: 1136-1142.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Research**, 41: 95-98.
- Hamilton, K. E., Ferguson, A., Taggart, J. B., Tomasson, T., Walker, A., Fahy, E. 1989. Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: Ldh-5 as a phylogeographical marker locus. **Journal of Fish Biology**, 35: 651-664.
- Hansen, M. M., Loeschke, V., Rasmussen, G., Simonsen, S. 1993. Genetic differentiation among Danish brown trout (*Salmo trutta*) populations. **Hereditas**, 118: 177-185.
- Hunter, R. L., Markert, C. L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125: 1294-1295.
- Hynes, R. A., Ferguson, A., McCann, M. A. 1996. Variation in mitochondrial DNA and post-glacial colonisation of north-west Europe by brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal of Fish Biology**, 48: 54-67.

- Jukes, T., Cantor, C. 1969. Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism (Munro, H. N., Eds.), Academic Press, pp. 232, New York.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120.
- Kishino, H., Hasegawa, M. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data. **Journal of Molecular Evolution**, 29: 170-179.
- Klement, M., Posada, D., Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, 9: 1657-1659.
- Krieg, F., Guyomard, R. 1985. Population genetics of French Brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. **Genetique, Selection and Evolution**, 17: 225-242.
- Kurtoğlu, İ. Z. 2002. Kahverengi Alabalıkların (*Salmo trutta labrax*, L.) Doğal Stokları Zenginleştirmek ve Kültür Potansiyellerini Belirlemek Amacıyla Yoğun Şartlarda Üretim İmkanlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
- Kuru, M. 2004. Omurgalı Hayvanlar. Palme Yayıncılık, 833s., Ankara.
- Lansman, R. A., Shade, R. O., Shapiro, J. P., Avise, J. C. 1981. The use of restriction nucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. Techniques and potential applications. **Journal of Molecular Evolution**, 17: 214-226.
- Manos, P. S., Doyle, J. J., Nixon, K. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 12: 333-349.
- Maric, S., Susnik, S., Simonovic, P., Snoi, A. 2006. Phylogeographic study of brown trout from Serbia, based on mitochondrial DNA control region analysis. **Genetics Selection Evolution**, 38: 411-430.

- Mayer, M. S., Soltis, P. 1999. Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). **Systematical Botanic**, 24: 47–61.
- McKEown, N. J., Hynes, R. A., Duguid, R. A., Ferguson, A., Prodöhl, P. A. 2010. Phylogeographic structure of brown trout *Salmo trutta* in Britain and Ireland: glacial refugia, postglacial colonization and origins of sympatric populations. **Journal of Fish Biology**, 76: 319-347.
- Moran, P., Pendàs, A. M., García-Vasquez, E., Izquierdo, J. I., Lobon-Cervia, J. 1995. Estimates of gene flow among neighbouring populations of brown trout. **Journal of Fish Biology**, 46: 93-602.
- Moritz, C. 1991. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): Evidence for recent and localized origins of widespread clones. **Genetics**, 129:211-219.
- Moritz, C. 1994a. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. **Molecular Ecology**, 3: 401-411.
- Moritz, C. 1994b. Defining evolutionarily significant units for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 9: 373-375.
- Mullis, K., Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155: 335-350.
- Navajas, M., Gutierrez, J., Lagnel, J. 1996. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. **Entomology Research**, 86: 407-417.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, 484p., New York.
- Osinov, A., Bernatchez, L. 1996. Atlantic and Danubean phylogenetic groupings of brown trout (*Salmo trutta* L.) complex: genetic divergence, evolution, and conservation. **Journal of Ichthyology**, 36: 762-786.

- Palm, S., Ryman, N. 1999. Genetic basis of phenotypic differences between transplanted stocks of brown trout. **Ecology of Freshwater Fish**, 8: 169-180.
- Palumbi, S. R., Backer, C. S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. **Molecular Biology and Evolution**, 11: 426–435.
- Perissoratis, C., Conispoliatis, N., Zimianitis, E., Galanopoulou, S., Zaharaki, P. 2001. Marine geological investigations in the greater area of Navarino Bay, S. Ionian Sea. 9th Int. Congress of Geol. Soc. Greece. Bull. Geol. Soc. Greece XXXIV/2, pp. 655-662.
- Persat, H., Berrebi, P. 1990. Relative ages of present populations of *Barbus barbus* and *Barbus meridionalis* (Cyprinidae) in southern France: preliminary considerations. **Aquatic Living Resource**, 3: 253–263.
- Posada, D., Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 14: 817-818.
- Presa, P., Pardo, B. G., Marinez, P., Bernatchez, L. 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. **Molecular Biology and Evolution**, 12: 2161-2175.
- Riffel, M., Sorch, V., Schreiber, A. 1995. Allozyme variability of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations across the Rhenanian-Danubian watershed in southwest Germany. **Heredity**, 74: 241-249.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19: 1572-1574.
- Rozas, J., Sanches-Delbarrio, J. C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, 19: 2496-2497.
- Ryan, W. B. F., Pitman, W., Kazimiera, S., Moskalenko, V., Jones, G. A., Görür, N. 1997. An abrupt drowning of the Black Sea shelf. **Marine Geology**, 138: 119-126.

- Schöffmann, J., Susnik, S. 2007. Phylogenetic origin of *Salmo trutta* L. 1758 from Sicily, based on mitochondrial and nuclear DNA analysis. **Hydrobiologia**, 575: 51-55.
- Sick, K. 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. **Nature**, 192:894-896.
- Skala, O., Jorstad, K. E. 1987. Fine-spotted brown trout (*Salmo trutta*): its phenotypic description and biochemical genetic variation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 44: 1775-1779.
- Smith, G.R. 1992. Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. **Systematic Biology**, 41: 41–57.
- Snoj, A., Maric, S., Berrebi, P., Grivelli, A., Shumka, S., Susnik, S. 2009. Genetic architecture of trout from Albania as revealed by mtDNA control region variation. **Genetics Selection Evolution**, 41: 22-27.
- Solomon, D. J. 2000. The biology and status of the Black Sea Salmon *Salmo trutta labrax*, EU Tacis Black Sea Environmental Programme. Black Sea Salmon Project. Draft report. 24 pp.
- Splendiani, A., Giovannotti, M., Cerioni, P., Caniglia, M. L., Capuyo, V. 2006. Phylogeographic inferences on the native brown trout mtDNA variation in central Italy. **Italian Journal of Zoology**, 73: 179-189.
- Stanley, J. D., Blanpied, C. 1980. Late quaternary water exchange between the eastern Mediterranean and the Black Sea. **Nature**, 285: 537-541.
- Suarez, J., Bautista, J., Almodovar, A., Machordom, A. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian peninsula. **Heredity**, 87: 198–206.
- Suh, Y., Thien, B., Zimmer, E. A. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. **American Journal of Botany**, 80: 1042–1055.
- Susnik, S., Snoj, A., Wilson, I. F., Mrdak, D., Weiss, S. 2005. Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including

the putative *S. letnica* endemic to Lake Ohrid. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 44: 63-76.

Susnik, J., Schöffmann, A., Weiss, S. 2007. Genetic verification of native brown trout from the Persian Gulf (Catak Cay River, Tigris basin). **Journal of Fish Biology**, 67: 879-884.

Swofford, D. L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analyses Using Parsimony (and other methods), version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.

Tabak, İ., Aksungur, M., Zengin, M., Yılmaz, C., Aksungur, N., Alkan, A., Zengin, B. ve Mısır, D.S. 2001. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811) Biyoekolojik Özelliklerinin Tespiti ve Kültüre Alınabilirliğinin Araştırılması Proje Sonuç Raporu. Tagem/HAYSUD/98/12/01/007, 238 s., Trabzon.

Taghizadeh, V., Genadevich, G., Jahanbakshi, A. 2012. Allozyme variability in populations of trout from the rivers of Russia and Iran. **Nucleic Acids Research**, 1: 1-48.

Tautz, D., Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, 12: 4127-4138.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17: 6463-6471.

Tegelstrom, H. 1987. Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to bank vole (*C. glareolus*). **Journal of Molecular Evolution**, 24: 218-227.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22: 49-55.

Tortonese, E. 1954. The trouts of Asiatic Turkey. **Hydrobiology**, 2: 1-26.

- Triantafyllidis A., Leonardos, I., Bista, I., Kyriazis, I.D., Kappas, I., Amat, F., Abatzopoulos, T.J. 2007. Phylogeography and genetic structure of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae). **Marine Biology**, 152: 1159-1167.
- Turan, C., Ergüden, D., Gürlek, M., Yağlıoğlu, D., Yeğen, V. 2008. Isparta ve Kahramanmaraş (*Salmo trutta* L., 1758) populasyonlarının genetik karşılaştırılması. **Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi**, 4: 1-2.
- Turan, D., Kottelat, M., Engin, S. 2009. Two new species of trouts, resident and migratory, sympatric in streams of northern Anatolia (Salmoniformes: Salmonidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 20: 289-374.
- Vera, M., Sourinejad, I., Bouza, C., Vilas, R., Kalbassi, M. R., Martinez, P. 2011. Phylogeography, genetic structure and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. **Hydrobiologia**, 664: 51-67.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T. D., Wilson, A. C. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 86: 9350-9354.
- Ward, R. D., Grewe, P. 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4:300-325.
- Webb, T., Bartlein, P. 1992. Global changes during the last 3 millions years: climatic controls and biotic responses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 23: 141-173.
- Weiss, S., Antunes, A., Schlötterer, C., Alexandrino, P. 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. **Molecular Ecology**, 9: 691-698.

- Wenburg, J. K., Bentzen, P., Foote, C. J. 1998. Microsatellite analyses of genetic population structure in endangered salmonid: the coastal cutthroat trout. **Molecular Ecology**, 7: 733-749.
- Wilson, C. C., Hebert, P., Reist, J., Dempson, J. B. 1996. Phylogeography and postglacial dispersal of arctic charr *Salvelinus alpinus* in North America. **Molecular Ecology**, 5: 187-197.
- Wright, J. M., Bentzen, P. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4: 384-388.
- Zhang, D. X., Hewitt, G.M. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, 25: 99-120.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nazan ÖZEN

Doğum Yeri ve Tarihi: AYDIN / 06.11.1981

Medeni Hali: Evli

İş Adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Fen-
Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
09010 Kepez /AYDIN

Telefon: (90) (256) 212 84 98 (İş)

Faks: (90) (256) 2135379 (İş)

E-Mail: nzncr@yahoo.com
nacar@adu.edu.tr

Eğitim

İlkokul: Yahya Kemal Beyatlı (1988- 1992)

Ortaokul: Gazipaşa Ortaokulu (1992-1995)

Lise: Aydın Süper Lisesi (1995-1999)

Üniversite: Dokuz Eylül Üniversitesi, Eğitim
Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü
(1999-2004)

Yüksek Lisans: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen
Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2004-2006)

Doktora: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen
Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2006-Devam ediyor)

Dil: İngilizce (ÜDS: 89.750)

Yüksek Lisans Tezi: Acar N. ,Aydın Yöre'sinde Yaşayan Laudakia Stello'nun (LINNAEUS 1758) (SQUAMATA: AGAMIDAE) Barsak Dokusu Histolojik Yapısının ve Glikozaminoglikanlarının Işık Mikroskop Düzeyinde İncelenmesi, Biyoloji, Fen Edebiyat Fakültesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye, 2006 .

Yayınlar

-Kete R., Acar N.: "Rüzgarı Bekleyen Şehir"Ekoloji Çevre Magazin, Nisan-Haziran Syf:16-21 , Ekoloji Dergisi, 2004.

-Kete R., Acar N: "İki Ucu Keskin Kılınç: Bitkisel Hormonlar", Ekoloji Çevre Magazin Dergisi, Ekim-Kasım Aralık Syf:22-23, 2003.

Yurt İçi Bildiriler

-Kete Rıdvan., Acar Nazan: "Lisansüstü Programlarında Biyoloji Öğretim Yönteminde Verimlilik", Eğitimde Bilime Katkı: Lisansüstü Eğitim Sempozyumu. 1-4 Ekim 2003. İzmir, 1-4 Ekim 2003.

-Başimoğlu Koca Y., Paksuz E. P., Acar N., Özkan B., Paksuz S. (2006) *Myotis capaccinii*'nin (Chiroptera, Vespertilionidae) Böbrek Yapısının Histolojik Olarak Değerlendirilmesi. XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı syf: 314. 26-30 Haziran Kuşadası/Aydın.

-Başimoğlu Koca Y., Paksuz E. P., Acar N., Paksuz S., Özkan B. (2006) *Rhinolophus mehelyi* (Chiroptera, Rhinolophidae) Karaciğer Dokusunun Işık Mikroskop Düzeyinde İncelenmesi. XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı syf: 316. 26-30 Haziran Kuşadası/Aydın.

- Başımoğlu Koca Y., Gürcü B., Paksuz E. P. Acar N., (2006) *Laudakia stellio*'nun (Agamidae, LINNAEUS 1758) Trake Dokusunun Histolojik Yapısı ve Kıkırdak Dokusunda Glikozaminoglikanların Dağılımı. XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı syf: 315-316. 26-30 Haziran Kuşadası/Aydın.

- Başımoğlu Koca Y., Gürcü B., Acar N., Paksuz E. P. (2006) *Laudakia stellio*'da (Agamidae, LINNAEUS 1758) Özofagusun Histolojik Yapısı ve Goblet Hücre İçeriğinin Histokimyasal Olarak Belirlenmesi. XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı syf: 314. 26-30 Haziran Kuşadası/Aydın.

-Ayaz A., Acar N., Paksuz E.P., Başımoğlu Koca Y. (2006) *Laudakia stellio* (Dikenli Keler) Kalbinin Histolojik Olarak İncelenmesi. 13. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi 20-23 Eylül İzmir. Poster Bildirisi.

-Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, 3-4/05/2007 İnönü Üniversitesi, MALATYA/Katılımcı

-Paksuz E.P.B. ,Paksuz S. ,Özkan B. ,Acar N. ,Myotis myotis (Borkhausen, 1797) Kalın Barsak Dokusunun Histolojik Yapısı ve Goblet Hücrelerinde Glikozaminoglikan Çeşitlerinin Belirlenmesi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster ,27/06/2008 .

-II. Ulusal Alabalık Sempozyumu, 06-08/07/2010, Ermenek KARAMAN/Katılımcı

YurtDışı Bildiriler

-Acar N. ,Bardakçı F. ,Avcı A. ,Yılmaz C. ,Bağda E. ,Üzüm N.T. ,Olgun K. ,Re-evaluation of taxonomic status of genus *Rhynchocalamus* using mitochondrial *cyt b* gene, 15th European Congress of Herpetology, 85, Kuşadası-Aydın/TURKEY, 2009. ,Sözlü ,01/10/2009 .

Projeler-Burslar

- “Aydın Yöresi’nde Yaşayan *Laudakia stellio* ’nun (LINNAEUS 1758) Barsak Histolojisi ve Glikozaminoglikanlarının Belirlenmesi”. ADÜ Bilimsel Araştırma Fonu, Proje No:FEE/ 2006-06006. Yardımcı araştırmacı.

- “Aydın Yöresi’nde Yaşayan *Laudakia stellio*’nun (LINNAEUS 1758) Barsak Histolojisi ve Glikozaminoglikanlarının Belirlenmesi”. TÜBİTAK, Proje No; TBAG-HD/109 (105T546), (2006). Yardımcı araştırmacı.

-TÜBİTAK- Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB), Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu

-TÜBİTAK- Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB), Yurtiçi Doktora Bursu

-ESF-Congen Bursu, “Integrating population genetics and conservation biology: Merging theoretical, experimental and applied approaches” bölümü, 16-21 Kasım 2009, Montpellier Üniversitesi, Fransa.

Katıldığı kurslar

-VIII. Ulusal Stereoloji Kursu, 14-17 Eylül, Başkent Üniversitesi, ANKARA