

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE SULARINDAKİ İŞKİNE (*Sciaena umbra* LİNNÆUS, 1758) VE
KÖTEK (*Umbrina cirrosa* LİNNÆUS, 1758) BALIKLARININ
POPULASYONLARININ GENETİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Şirin FİRİDİN

**HAZİRAN 2011
TRABZON**

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE SULARINDAKİ İŞKİNE (*Sciaena umbra* LINNAEUS, 1758) VE KÖTEK
(*Umbrina cirrosa* LINNAEUS, 1758) BALIKLARININ
POPULASYONLARININ GENETİK ANALİZİ**

Biyolog Şirin FİRİDİN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"YÜKSEK LİSANS (BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.05.2011
Tezin Savunma Tarihi : 02.06.2011**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İlhan ALTINOK

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Balıkçılık Teknolojisi Anabilim Dalında

Şirin FİRİDİN tarafından hazırlanan

**TÜRKİYE SULARINDAKİ İŞKİNE (*Sciaena umbra* LINNAEUS, 1758) VE
KÖTEK (*Umbrina cirrosa* LINNAEUS, 1758) BALIKLARININ
POPULASYONLARININ GENETİK ANALİZİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 16/05/2011 gün ve 1461 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/06/2011 tarihinde yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. İlhan ALTINOK



Üye : Yrd.Doç.Dr. Celal Kurtuluş BURUK



Üye : Yrd.Doç.Dr. Erol ÇAPKIN



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı kapsamında yürütülmüştür. Bu çalışma Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünce yürütülen “İşkine (*Sciaena Umbra*) ve Kötek (*Umbrina Cirrosa*) Balıklarının Biyoekolojik Özelliklerinin Belirlenmesi” kapsamında yürütülen çalışmaların bir kısmını içermektedir. Bu çalışma Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü imkânları ile yürütülmüştür.

Sciaenidae’lerin populasyon genetiği ile ilgili Türkiye denizlerinde yapılmış herhangi araştırma mevcut değildir. Ülkemiz sularında yaşayan işkine ve kötek balıklarının genetik analizi yapılarak populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin ortaya konulması gerekmektedir. Çalışmada populasyon içi ve populasyonlar arası genetik varyasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmam için yardım ve desteğini esirgemeyerek tez danışmanlığımı üstlenen değerli hocam Sayın Doç. Dr. İlhan ALTINOK’a ve tezimin planlanmasında ve yürütülmesinde değerli deneyim ve katkılarıyla bana destek olan çalışma arkadaşım Ziraat Yüksek Mühendisi Oğuzhan EROĞLU’na, Yüksek lisans yapmam konusunda beni teşvik eden ve bilimsel düşünce ufkumu yönlendiren müdürümüz Dr. Atilla ÖZDEMİR’e, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Mühendis Eyüp ÇAKMAK’a ve çalışmada emeği geçen tüm proje ve Enstitü personeline teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman destekleri ile hep yanımda olan çok sevdiğim annem Ayhan FİRİDİN ve babam Şevket FİRİDİN’e sonsuz teşekkür ederim.

Şirin FİRİDİN
Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Türkiye Sularındaki İşkine (*Sciaena umbra* Linnaeus,1758) ve Kötek (*Umbrina cirrosa* Linnaeus,1758) Balıklarının Populasyonlarının Genetik Analizi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.16/05/2011

Şirin FİRİDİN

Trabzon 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Sciaenidae Familyasının Genel Özellikleri.....	2
1.2.1. Dağılımı	3
1.3. Sciaenidlerin Morfolojik Özellikleri.....	3
1.3.1. Renk	3
1.3.2. Vücut Yapısı	4
1.4. Mitokondrial DNA.....	5
1.5. Genetik Varyasyon ve Belirlenmesi	8
1.6. Genetik Varyasyonun Tahmininde Kullanılan Teknikler.....	9
1.6.1. Protein Elektroforezi.....	9
1.6.2. DNA Belirteç Sistemleri.....	9
1.6.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	10
1.6.2.2. Resitriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizimi (RFLP).....	11
1.7. 16S rRNA Geni.....	12
1.8. Filogenetik	13
1.8.1. Filogenetik Ağaç Oluşturma Metodları	15
1.8.1.1. Mesafe Temelli Metotlar	16
1.8.1.1.1. Kümelenme Temelli Yöntem	16
1.8.1.1.1.1. Uzaklık Metodu	16
1.8.1.1.1.2. Komşu Bağlantı Metodu (Neighbour Joining).....	17
1.8.1.1.2. En İyi Durum Temelli Yöntem.....	17
1.8.1.2. Karakter Temelli Yöntem	18

1.8.1.2.1.	Maksimum Parsimoni Metodu	18
1.8.1.2.2.	Maksimum Olasılık Metodu (Maximum Likelihood)	19
1.8.1.2.3.	Bayesian Çıkarımı	19
1.9.	Önceki Çalışmalar	21
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1.	Materyal	24
2.2.	Metod	25
2.2.1.	Toplam DNA'nın Elde Edilmesi	25
2.2.2.	DNA Amplifikasyonu.....	25
2.3.	Sekans Analizi	27
2.4.	Kesici Enzim Analizi	27
2.5.	Verilerin Değerlendirilmesi	28
2.5.1.	Sekans Analizi	28
2.5.2.	Haplotip ve Nükleotit Çeşitliliği.....	29
2.5.3.	Filogenetik Analiz, Evrimsel Model Seçimi ve Topoloji Oluşturma	29
2.5.4.	Genetik Farklılığın Belirlenmesi	29
2.5.5.	Gen Akışının Hesaplanması	30
2.5.6.	Kesim Şekillerinin Analizi	30
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	DNA Eldesi ve Gen Bölgelerinin Çoğaltılması.....	31
3.2.	Sekans Analizi	31
3.2.1.	Çoklu Sekans Hizalama ve Sekans Profiline Çıkarılması.....	31
3.3.	Haplotip Verilerinin Analizi	32
3.3.1.	Haplotip Dağılımı	32
3.3.2.	Haplotip Çeşitliliği (Hd)	41
3.4.	Nükleotit Verilerinin Analizi.....	42
3.4.1.	Nükleotit Dağılımı	42
3.4.2.	Nükleotit Çeşitliliği (Pi)	43
3.4.3.	Populasyon İçi ve Populasyonlar Arası Genetik Farklılıklar	44
3.4.4.	Filogenetik Analizler	49
3.4.4.1.	Filogenetik Yapılanma.....	50
3.4.5.	Kesici Enzim Analizi	57
4.	TARTIŞMA	59
4.1.	Haplotip Verileri	59

4.2.	Nükleotit Verileri.....	60
4.3.	Transisyon/Transversiyon Oranı.....	61
4.4.	Nükleotit Verileri.....	62
4.5.	Genetik Mesafe.....	63
4.6.	Filogenetik Analiz	64
4.7.	Populasyon Genetiği Analizleri.....	65
5.	SONUÇLAR.....	67
6.	ÖNERİLER.....	69
7.	KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

TÜRKİYE SULARINDAKİ İŞKİNE (*SCIAENA UMBRA LINNAEUS, 1758*) VE KÖTEK (*UMBRINA CIRROSA LINNAEUS, 1758*) BALIKLARININ POPULASYONLARININ GENETİK ANALİZİ
Şirin FİRİDİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlhan ALTINOK
2011, 78 Sayfa

2008-2010 tarihleri arasında Trabzon, Giresun, Artvin, Rize, Adana, Antalya, Muğla ve İzmir bölgelerinden toplam 254 adet kötek (*Umbrina cirrosa*) ve işkine (*Sciaena umbra*) balık türleri örneklenmiştir. Cyt-b, 16S rRNA gen bölgelerinin sekans ve Cyt-b, 16S rRNA ve ND1 gen bölgeleri için RFLP analiz sonuçları irdelenerek filogenetik ve populasyon analizleri yapılmıştır. Sekans analizi sonuçlarına göre Cyt-b geninde işkinede 25, kötekte 20 haplotip belirlenirken, 16S rRNA geni için işkinede 4 ve kötekte 8 haplotip bulunmuştur. Ayrıca Cyt-b ve 16S rRNA gen bölgeleri için haplotip çeşitliliği işkinede sırası ile %83,8 ve %52,6 ve kötek de ise %80,5 ve %73,6 olarak bulunmuştur. Yapılan moleküler varyans analizi sonucuna göre Fst değeri 0,07364 ($P < 0.001$) olarak bulunmuş olup, Trabzon Rize popülasyonu hariç diğer popülasyonlar birbirinden ayrılmıştır. Kötek Cyt-b moleküler varyans analizi sonucunda Fst değeri 0,1881 ve ($P < 0.001$) dir. Rize-Artvin popülasyonları yalnız kendi aralarında ayrılmaz iken Antalya tüm popülasyonlarla aynı özelliği göstermiştir. İşkine ve Kötek için hesaplanan Nükleotid çeşitliliği (P_i) ve nükleotid farklılığı (k) Cyt-b geni için sırası ile % 2,97 ve 2,87 ve 16S rRNA geni için ise sırası ile 1,54 ile 0,61 olarak belirlenmiştir. Filogenetik analizlerde genus düzeyinde ayrışma sağlanamamıştır. Yapılan RFLP analiz sonucunda ise populasyon düzeyinde polimorfik bir yapılanma bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Umbrina cirrosa*, *Sciaena umbra*, Cyt-b, haplotip, RFLP, nükleotit çeşitliliği.

Master Thesis

SUMMARY

GENETIC ANALYSES OF BROWN MEAGRE (*SCIAENA UMBRA LINNAEUS, 1758*)
AND SHI DRUM (*UMBRINA CIRROSA LINNAEUS, 1758*) DISTRIBUTED ALONG
TURKISH COASTAL WATERS
Şirin FİRİDİN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheries Technology Engineering Graduate Program

Supervisor: Assoc. Prof. İlhan ALTINOK
2011, 78 Pages

To analyze filogenetic and population structure of shi drum and brown meagre, 254 fish were sampled from eight locations of Turkish coastal. The sequence analysis of Cyt-b, 16S rRNA and RFLP analysis of Cyt-b, 16S rRNA and ND1 gene sites were examined to filogenetic and population structure of these fish. Based on sequence analyses, 25 and 20 haplotypes were specified for brown meagre and for Shi Drum in Cyt-b gene and 4 haplotypes for brown meagre and 8 haplotypes for shi drum in 16S rRNA. Nucleotide diversity in 16S rRNA and Cyt-b genes were found 83.8% and 52.6% for brown meagre and 80.5% and 73.6% for shi drum, respectively. Molecular variances analysis showed that F_{ST} value was found 0.07364, Cyt-b molecular variances analysis for shi drum indicated that F_{ST} value was 0.1881 ($P < 0.001$). The calculated nucleotide diversity (P_i) and divergence (k) for brown meagre and shi drum were between 2.97% and 2.87% for Cyt-b gene and between 1.54% and 0.61% for 16S rRNA gene, respectively. Based on phylogenetic analysis no differentiation was achieved at the level of genus. According to RFLP analysis results, no polymorphic structure was found in population level.

Key Words: *Umbrina cirrosa*, *Sciaena umbra*, Cyt-b, haplotype, RFLP, nucleotide diversities

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Sciaenidlerin dünyadaki dağılımı	3
Şekil 2.	A) İşkine ve B)kötek balığının genel görünümü.	4
Şekil 3.	Mitokondrial genom	5
Şekil 4.	Prokaryot ve ökaryot ribozom yapısı.....	12
Şekil 5.	Örnekleme alanı.....	24
Şekil 6.	12S-16S, 16S, ND1 ve Cyt-b gen bölgelerinin amplifikasyondan sonra agaroz jelde görüntülenmesi	31
Şekil 7.	İşkine Cyt-b haplotiplerinden oluşturulan dendogram	36
Şekil 8.	İşkine Cytb haplotip verilerinden oluşturulan UPMG ağacı	39
Şekil 9.	İşkine 16S rRNA haplotip dendogramı	40
Şekil 10.	Kötek 16S rRNA haplotiplerinden oluşturulmuş haplotip dendogramı	41
Şekil 11.	Kötek Cyt-b geni popülasyonları pairwise mesafelerden oluşturulan dendogramı	46
Şekil 12.	Kötek Cyt-b sekans verilerinde elde edilen Fst değerleri ile coğrafik mesafe arasındaki ilişki.....	46
Şekil 13.	İşkine Cyt-b geni popülasyonları pairwise mesafelerden oluşturulan dendogramı	48
Şekil 14.	İşkine Cyt-b sekans verilerinde elde edilen Fst değerleri ile coğrafik mesafe arasındaki ilişki.....	49
Şekil 15.	<i>Sciaenidae</i> familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan MP dendogramı	51
Şekil 16.	<i>Sciaenidae</i> familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan UPGMA dendogramı	52
Şekil 17.	<i>Sciaenidae</i> familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan NJ dendogramı	52
Şekil 18.	<i>Sciaenidae</i> familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan ML dendogramı	53
Şekil 19.	16S rRNA sekans verilerinden oluşturulmuş ME dendogramı	54
Şekil 20.	16S rRNA sekans verilerinden oluşturulmuş UPGMA dendogramı.....	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Türlerin örnekleme yeri ve sayıları.....	24
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları	26
Tablo 3.	ND1, 16S rRNA ve sitokrom-b gen bölgelerinin çoğaltılması için PCR Karışımının bileşenleri ve miktarları	26
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan primerlar için PCR programları	27
Tablo 5.	Kötek Cyt-b haplotip Sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotid yerleri ve gözlenen haplotip sayısı	32
Tablo 6.	Kötek mtDNA Cyt-b haplotiplerinin populasyonlara göre dağılımı	33
Tablo 7.	İşkine Cyt-b haplotip sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotid yerleri ve gözlenen haplotip sayısı	34
Tablo 8.	Kötek Cyt-b sekans verilerinden hesaplanan haplotipler arası genetik mesafe (K2P)	35
Tablo 9.	İşkine Cyt-b haplotipleri ve Populasyonlara göre dağılımı	37
Tablo 10.	İşkine Cyt-b sekans verilerinden hesaplanan haplotipler arası genetik mesafe	38
Tablo 11.	İşkine 16S rRNA haplotip sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotit yerleri ve gözlenen haplotiplerin populasyonlardaki sayısı.....	40
Tablo 12.	Kötek 16S rRNA haplotip sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotit yerleri ve gözlenen haplotiplerin popülasyonlardaki sayısı.....	40
Tablo 13.	Kötek 16S rRNA sekans verilerinden hesaplanan haplotipler arası genetik mesafe (K2P)	41
Tablo 14.	Kötek ve işkine Cyt-b ve 16s rRNA genlerinin % haplotip çeşitliliği, varyansı ve standart sapması	42
Tablo 15.	Farklı genlere göre % nükleotit frekansları ve transisyon/transversiyon (T_S/T_V) oranı	43
Tablo 16.	İşkine ve kötek balığında Cyt-b ve 16S rRNA genlerinin nükleotid çeşitliliği, nükleotid farklılığı, sinonim ve sinonim olmayan farklılık sayıları ve pozisyonları	43
Tablo 17.	AMOVA analizi sonuçları (Kimura 2-P)	45
Tablo 18.	Kötek balığının populasyon içi ve populasyonlar arası F_{ST} değerleri ve üste italik P değerleri (Kimura 2-P).....	45
Tablo 19.	Kötek Cyt-b populasyonlar arası pairwise farklılık (PIXY-üsde), çapraz populasyon içi pairwesi ortalama farklılık ve düzeltilmiş ortalama pairwise farklılık (Kimura 2-P)	45

Tablo 20.	Kötek Cyt-b populasyonlar arası düzeltilmiş ortalama pairwise farklılığın p değeri	45
Tablo 21.	Kötek Cyt-b verileri populasyonlar arası (göç) gen akış oranı.....	46
Tablo 22.	AMOVA analizi sonuçları (Kimura 2-P)	47
Tablo 23.	İşkine Cyt-b populasyon içi (çapraz-kalın) ve populasyonlar arası (altta) Fst değerleri ve P değerleri (üste-italik) (Kimura 2-P).....	47
Tablo 24.	İşkine Cyt-b populasyonlar arası çiftli farklılık (PİXY-üste), populasyon içi pairwise ortalama farklılık (çapraz) ve düzeltilmiş ortalama pairwise farklılık (altta) (Kimura 2-P)	47
Tablo 25.	İşkine Cyt-b populasyonlar arası düzeltilmiş ortalama pairwise farklılığın p değeri	48
Tablo 26.	İşkine Cyt-b verileri popülasyonlar arası (göç) gen akış oranı.....	48
Tablo 27.	Veriler için hesaplanan model ve testlere ait parametreler.....	49
Tablo 28.	Cyt-b sekans verileri ve Genbank örneklerinden hesaplanan türler arası genetik mesafe	53
Tablo 29.	16S rRNA sekans verilerinden hesaplanan türler arası genetik mesafe (K2P).....	56
Tablo 30.	İşkine popülasyonlarında 16S rRNA gen bölgesi için gözlenen kesim şekilleri ve yaklaşık kesim büyüklükleri	57
Tablo 31.	İşkine popülasyonlarında Cyt-b gen bölgesi için gözlenen kesim şekilleri ve yaklaşık kesim büyüklükleri	58
Tablo 32.	İşkine populasyonlarında ND gen bölgesi için gözlenen kesim şekilleri ve yaklaşık kesim büyüklükleri	58
Tablo 33.	Farklı canlılar için Cyt-b nükleotit frekansları	61

SEMBOLLER DİZİNİ

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
bp	: Baz çifti (Base pair)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
F_{ST}	: Genetik farklılık değeri
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribonükleik asit
ND	: NADH Dehidrogenaz
Ne	: Etkili populasyon büyüklüğü
NJ	: Komşu Katılım Algoritması
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyon
RAPD	: Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA
RE	: Restriksiyon Enzimi
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNAse	: Ribonuclease
rRNA	: Ribosomal ribonucleic acid
DNAse	: Deoxyribonuclease
DnaSP	: DNA Sequence Polymorphism
MP	: Maksimum Parsinomi
cDNA	: Complementary DNA
Cyt-b	: sitokrom b
ATP	: Adenozin trifosfat
OTÜ	: Operasyonel Taksonomik Ünite
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
T_m	: Primer Bağlanma Sıcaklığı
TNES	: DNA Ekstraksiyon Solüsyonu
UPGMA	: Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son 30 yılda türler ve popülasyonlar arasında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler teknikler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Genetik çeşitliliğin korunması, türlerin ve doğal popülasyonların korunmasında temel unsurdur. Herhangi bir biyolojik kaynağı etkili olarak yönetmek için, mevcut tür ve popülasyonların genetik varyasyon düzeyinin mutlaka bilinmesi önemlidir. Günümüzde bazı genetik belirteçler kullanılarak, birçok tür için belirli düzeyde bilgilere ulaşılabilir olmasına rağmen, popülasyon 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 (Utter, 1991). Genetik tekniklerin ilk uygulamaları, geniş olarak denizlerde gözlenen davranış ve göç modellerinin araştırılmasıyla ilgilidir. Moleküler genetik çalışmaları ilk olarak balık popülasyonları 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 Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'dan yararlanmaya başlamışlardır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar Mitokondrial DNA (mtDNA) odaklı olup, restriksiyon parça uzunluğu polimorfizm (RFLP) analizi kullanılmıştır (Lansman vd. 1981). Sonraki araştırmalar genetik materyale ait belirli bölgelerin dizi analizi üzerine odaklanmıştır (Bernartchez vd., 1992).

Genetik markırlar balıkçılıkta doğal stok yapılarının analizi, kültür balıkçılığı, taksonomi veya sistematik çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca yok olmakta olan türlerin genetikleri, genetik farklılık üzerine kirlenmenin ve balıkçılığın etkisi ve bir ortama sonradan sokulan türlerin genetikleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Anonymous, 2007).

1.2. Sciaenidae Familyasının Genel Özellikleri

Perciformes'ler bütün balık takımları içinde en çok çeşitliliğe sahip ve en büyük omurgalı grubudur. Yaklaşık olarak 9000 tür, 1500 cins ve 150 aileden oluşur. *Sciaenidae*'ler bu grubun dünya çapında en yaygın ve en geniş ailesidir. Yaklaşık olarak 70 cins ve 300 tür içerir. Çoğunlukla okyanusta yaşarlar sadece *Plagioscion*, *Pachypops* and *Pachyurus* cinsleri tatlı suda yaşarlar (Vinson, 2004).

Kaya levreği, işkine (*Sciaena umbra*) ve minakop, kötek balığı (*Umbrina cirrosa*) *Sciaenidae* familyasının sularımızda en çok rastlanan türleridir. Dibi kayalık, geniş mağaraların bulunduğu, mercanlı ve yosunlu 0-200 metre arasındaki derinliklerde yaşamalarına rağmen, yoğun olarak 30-40 metre derinliklerde bulunurlar. Gündüzleri kayalık derin mağarlarda bulunan bu türler, akşam saatlerinde beslenmek için dışarı çıkarlar. Sularımızda özellikle Akdeniz ve Marmara Bölgelerinde bulunur ve göç ederler. Ege ve Karadeniz'de ise daha az bulunmakla birlikte fazla göç etmezler. Yaz aylarında üreme dönemine girerler ve kalabalık gruplar halinde sığ sulara gelirler. Bu balıklar çoğunlukla ışığın az olduğu, askı yükünün fazla olduğu ve görüş mesafesinin az olduğu nehir ağzlarında bulunurlar. Bu kötü görüş mesafesini dengelemek için duyu organları yüksek duyarlı olarak gelişmiştir. Genelde ufak kabuklularla ve ufak balıklarla beslenirler. Ortalama 700-800 gr ağırlığa erişirken özellikle Marmara ve Karadeniz de 5 kg ağırlığa ulaşabilirler (Engin, 2003).

Bu familyaya ait balıkların ilk bakışta göze çarpan özelliği dorsal yüzgeçlerinin yapısıdır. Birbirinden ikiye ayrılmış gibi duran dorsal yüzgecinin ikincisinin, bincisinden daha uzun oluşu dikkat çeker. Kuyruk yüzgeci fazla uzun değildir ve iki tane sert ışın içermektedir. Yanal çizgi bütün vücut boyunca uzanmaktadır. Alt çenede bıyık veya burun deliği gibi açıklıklarda duyu organları bulunmaktadır. Bu familyanın birçok türü hava keselerinden davul sesine benzer ses üretmeleriyle tanınmaktadır (www.fishbase.org, 2010).

Bu familyaya ait yaklaşık 282 tür vardır. Bu familyanın bazı önemli genusları; *Umbrina*, *Sciaena* ve *Angynosomus*'dur. *Sciaenidae* familyası "Drums veya Croaker" davul sesi çıkaranlar veya kurbağa sesi çıkaranlar diye de bilinmektedir (www.fishbase.org, 2010).

1.2.1. Dağılımı

Eşkına balığı, 53°N ve 13°N enlemlerinde yaşayan subtropik bir türdür. Doğu Atlantik'te İngiliz kanalından Mauritanya'ya kadar, özellikle Güney Senegal'a doğru dağılım gösterir (www.fishbase.org, 2010). Aynı zamanda Akdeniz'in ve Karadeniz'in tümünde dağılım gösterirler (Şekil 1).



Şekil 1. Sciaenidlerin dünyadaki dağılımı (www.fishbase.org, 2010).

Sciaenidae familyasının denizlerimizde yaşayan türleri; *Argyrosomus regius* (Sarı Ağız, Yağlı Dramos), *Sciaena umbra* (Kaya Levreği, İşkına) ve *Umbrina cirrosa* (Minakop, Kötek Balığı)'dır.

1.3. Sciaenidlerin Morfolojik Özellikleri

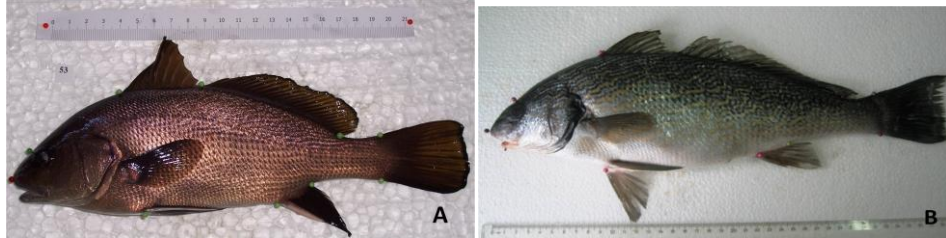
1.3.1. Renk

Eşkına balığında, üst kısmı koyu kahverengi, yanlar koyu gri, operkulum kadifemsi mor, kuyruk ve sırt yüzgeci açık kahverengi olup uç kısımlarda siyah bir bant vardır. Pektoral yüzgeci açık kahverengidir, ventral ve anal yüzgeçler siyahtır. Ventral yüzgecin ilk ışını beyaz renkte ve mahmuz yapısındadır. Minekop (*Umbrina cirrosa*) balığında, Sırtı koyu gri, yanları gümüşü beyaz, karnı ise beyazdır (www.balickilar.net).

1.3.2. Vücut Yapısı

Eşkine balığında, başın üst kısmı sırt yüzgecine doğru büyük bir açı yaparak uzanır. Baş boyu vücut boyunun yaklaşık beşte birini oluşturur. Tek bir sırt yüzgeci vardır ancak onuncu ışıktan sonra onbirinci ve onikinci ışınlarına denk gelen derin bir oyuktan dolayı iki sırt yüzgeci varmış gibi görünür. Kuyruk yüzgeci boyuna göre fazla büyük değildir. Kuyruk yüzgeci, ucu düz, tek loplu yapıdadır. Vücut yanlardan basık, boylarına göre vücutları oldukça yüksektir (Şekil 2A).

Minakopun gövde yapısı elips şeklinde olup yan taraflarından yassıdır. Sırtı kamburca, kafası gövdesine oranla küçüktür. Yan çizgide 48-50 pul bulunur. Kafasının içinde ve her iki yanında gözlerinin arkasına doğru iki küçük beyaz taş bulunur. Ağzı küçük olan minakop balığının üst çenesi alttakine oranla daha ilerde ve aşağı doğru meyillidir. Alt çenede küçük bir bıyık bulunur. Çenelerinde batıcı dişler yoktur. Burun kısa ve küt, gözler normal büyüklüktedir. Minakopun yüzgeçlerinin hepsi gelişmiş olup, birinci sırt yüzgeci üçgen biçimindedir. İkincisi ise kuyruk yüzgecine doğru uzar. Kalın derisi iri pullarla örtülüdür (Şekil 2B). Ortalama boyları 40 cm. olan minakopların 90-100 cm. boyunda ve 20-25 kg. ağırlığında olanlarına rastlanır.



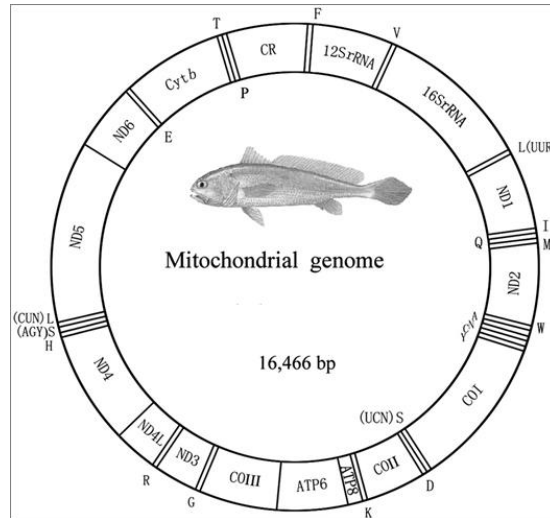
Şekil 2. A) İşkine ve B) kötek balığının genel görünümü.

Balıkçılık araştırmalarında moleküler genetik tekniklerinin uygulamaları 1950’li yıllardan beri giderek artış göstermektedir. Bunun nedeni uygun tekniklerin ve genetik bilgilerin önemi üzerine olan ilginin artmasıdır. Yapılan ilk çalışmalar özellikle morinalar, salmonid’ler ve ton balıklarında kan grubu farklılıkları üzerine olmuş ve popülasyon yapısının analizinde kullanılmak üzere genetik olarak kontrol edilen varyasyonların mevcudiyeti başarılı bir şekilde ortaya konulmuştur.

1.4. Mitokondrial DNA

Mitokondri ökaryotik hücre organellerinden biridir. Hücrelerdeki sayısı hücreden hücreye farklılık gösterir, örneğin bir karaciğer hücresinde yaklaşık 1000 adet mitokondri bulunur. Mitokondrinin ökaryotlarda oksidatif fosforilasyon merkezi olduğu 1948 de Eugene Kennedy ve Albert Lehninger tarafından bulunmuştur. Organizmada oksidatif yıkım ürünlerinden alınan elektronların moleküler oksijene aktarılması sırasında açığa çıkan enerji ile ADP ve Pi'den ATP sentezlenmesi olayı oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır (Lehninger, 1993).

Oksidatif fosforilasyon mitokondri iç membranında yer alan 5 enzim kompleksi tarafından yürütülür. Kompleks I (Süksinat Dehidrogenaz Kompleksi): 39 polipeptit içerir ve bu polipeptitlerden 7 tanesi; ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 mitokondri genomu tarafından sentezlenir. Kompleks II (NADH Dehidrogenaz Kompleksi): 4 polipeptit içerir ve bu polipeptitlerin hepsi çekirdek genomu tarafından sentezlenir. Kompleks III (UQ-Cytc Oksidoredüktaz Kompleksi): 10 polipeptit içerir ve bu polipeptitlerden sadece 1 tanesi, Cyt-b, mitokondri genomu tarafından sentezlenir. Kompleks IV (Cytc Oksidaz Kompleksi): 13 polipeptit içerir ve bu polipeptitlerden 3 tanesi, COI, COII, COIII mitokondri genomu tarafından sentezlenir. Kompleks V (ATP Sentaz Kompleksi): 12 polipeptit içerir ve bu polipeptitlerden 2 tanesi, ATPase6 ve ATPase8, mitokondri genomu tarafından sentezlenir (Lehninger, 1993).



Şekil 3. Mitokondrial genom (Cui, 2009).

Mitokondrial balık genomu kapalı halkasal yapıda 15-18 kb uzunluğunda. 22 tRNA, 2 rRNA (12S ve 16S), elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan 13 protein kodlayan gen (ATPase6 ve ATPase8, COI-III, Cyt-b, ND1-6 ve 4L) ve birde kodlanmayan kontrol bölgeden oluşan toplam 37 genden oluşur. (Wallace, 1986; Guo vd., 2004) (Şekil 3). Yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan kontrol bölgesi replikasyonun başladığı bölgedir. MtDNA'da genlerin düzeni genellikle sabittir; ancak gen organizasyonu bazı hayvan taksonlarını ayırabilir (Desjardins ve Morais, 1990).

Mitokondri genomu, filogenetik çalışmalar için yararlı olan pek çok özelliklere sahiptir (Avise, 1994). En önemli özelliği klonal kalıtımıdır. Balık mitokondri genomu haploittir, yani her bir organizma sadece bir çeşit mtDNA içermektedir. Bununla birlikte, birkaç çalışmada heteroplazmi (bir fertte birden fazla mtDNA çeşidinin bulunması) olduğu rapor edilmiştir (Moritz vd., 1987; Bentzen vd., 1988; Moritz, 1991). Heteroplazmi, tirs balığı (Bermingham, vd., 1986), Atlantik ringası (Bentzen vd., 1988) ve hamsi (Magoulas ve Zouros, 1993) olmak üzere birkaç balık türünde görülmüştür. İkinci olarak, mtDNA pek çok çekirdek genlerinden daha hızlı evrimleşmiştir. Bu özelliğinden dolayı, mtDNA yakın akraba tür ve popülasyonların filogenetik ilişkilerini çalışmak için uygundur. MtDNA'nın anasal olarak kalıtımlaşıyor olması, filogenetik analizler için avantaj olarak kabul edilir.

Popülasyon ve filogenetik çalışmalarda mtDNA'nın tercih edilmesi için birçok neden bulunmaktadır. mtDNA hücrenin DNA'sından fiziksel olarak ayrılmış ve sirküler yapıda olup, balıklarda yaklaşık olarak 16-17 kb büyüklüğündedir. Genomun %1'den daha küçüktür (Davidson vd., 1989) ve saf olarak izole edilmesi nispeten kolaydır. En büyük mitokondrial genom (yaklaşık 39,9 kb) bir çift kabuklu tür olan tarak (*Tridacna gigas*)'da bulunmuştur ve tür içinde büyük miktarda varyasyon göstermektedir. Tür içi varyasyon genellikle sıralı dublikasyonlardan dolayı kontrol bölgesinde olmaktadır. Balıklarda, tür içi mtDNA'daki boy farklılıkları türler arasında olabilecek fark kadar büyüktür (Bentzen vd., 1988; Avise, 1986).

Yüksek omurgalılarda, kalıtım yalnızca maternal yolla olmaktadır (heteroplazmi bazı türlerde görülebilir) ve rekombinasyon görülmediği için fonksiyonel haploittir (Avise vd., 1990; Harrison, 1989; Moritz vd., 1987). Paternal mitokondrinin döllenme esnasında parçalandığı gözlenir. Bununla beraber, paternal sızıntı 1000 molekülde bir gibi düşük oranda olabilmektedir. Heteroplazmi üzerine, yani bireyde bir tipten fazla mtDNA bulunduğuna dair raporlar giderek artmaktadır. Heteroplazmi mersin balıkları (Broker vd., 1990), morina balıkları (Arnason ve Rand, 1992) ve midye türleri gibi bir çok temel

organizma gruplarında nadir olarak bulunmaktadır. Balıklarda rapor edilmiş heteroplazmi durumlarına bakıldığında, heteroplazmik bireylerin populasyon içindeki dağılım oranları *Amia calva* (bowfins) (Bermingham vd., 1986)'da %5; *Clupeidae* türü olan *Alosa fallax*'da %12 (Bentzen vd., 1988) ve mersin balıklarında %41 oranına kadar ulaşmıştır (Broker vd., 1990).

Hayvanlarda mtDNA baz değişiminin yüksek oranda olmasından dolayı mitokondrial genom, kodlanan nükleer DNA ile karşılaştırıldığında yüksek evölüsyon oranına sahiptir (Meyer, 1993). Bunun muhtemel sebebi ise mtDNA polimerazın azalan doğruluğu ve daha etkisiz bir DNA tamir mekanizmasıdır (Clayton vd., 1991; Brown vd., 1979). Sekans ve kesici enzim kullanılarak mtDNA üzerine yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlara göre evölüsyon oranı tek kopyalı nükleer genlere oranla 5-10 kez daha hızlıdır (Brown vd., 1979). mtDNA'nın gözlenen bu hızlı evölüsyonu nokta ve parça mutasyonunun yüksek orandaki frekansından kaynaklanmaktadır (Brown vd., 1982). Primatların tüm mitokondrial genomundaki değişim oranı 10^6 yılda yaklaşık olarak %0,5-1 oranındadır (Brown vd., 1982). Bunun yanında mersin balıklarında bu oran memelilerden 2-4 kat daha düşüktür ve diğer balık türleri içerisinde de düşük mutasyon hızına sahiptir (Kriger ve Fuerst, 2002).

Mitokondri; nükleer DNA'dan fiziksel olarak farklı olan kendi DNA'sına sahiptir. mtDNA'nın boyutu 16.000 bp ile 20.000 bp arasındadır. mtDNA 30'dan fazla gen içerir ve rekombinasyon görülmediği için tek bir locus gibi ele alınır (Carvalho and Pitcher 1995).

Pek çok türde mtDNA oldukça değişkendir ve bununla birlikte muhtemel genetik farklılıkların tespiti için iyi bir işaretleyicidir. İlaveten; haploid (n kromozom) ve maternal (anasal) olduğu için allozymeler veya mini/microsatellitler gibi yalnızca nükleer markırlar kullanılarak elde edilemeyen bilgileri içerir. Bu erkek ve dişi gen akışı arasında ki ayrımı sağlar ve mtDNA'nın etkili hacmi yalnızca nükleer genin dörtte biri kadardır (Birky vd., 1983). Bundan dolayı, mtDNA genetik engellerin bulunması için iyi bir markırdır.

Primerlerin kullanımı ve seçilmiş bölgelerin PCR uygulamasıyla mtDNA varyasyonunun incelenmesi oldukça hızlı ve kolay hale gelmiştir. Bu avantajların tümü hem popülasyon çalışmaları hem de sistematik çalışmalarda mtDNA'yı çekici hale getirmiştir. Böyle çeşitli avantajlara rağmen, mtDNA analizinde kullanılan metotların, uygulamasının zor ve pahalı olmasının yanında bir populasyonu karakterize etmek için genetik açıdan mtDNA'nın tek başına tüm bilgileri verememesi de dezavantaj olarak kabul edilebilir (Bernatchez vd., 1992; Carvalho ve Pitcher, 1995; Ferguson vd., 1995).

Mitokondrial DNA, alt veya üst türlerdeki biyocoğrafyaya bağlı olayları incelemek için mükemmel bir araç olduğunu kanıtlamıştır (Avice 1994). Mitokondriyal genomun farklı bölgeleri farklı oranlarda ortaya çıktığından bu bölgeler belirli tip çalışmalar için hedeflenmiştir. Sitokrom b ve ND genlerinin popülasyon düzeyinde farklılık gösterdiği rapor edildiğinden birçok türde çalışılmaktadır. Ayrıca D-loop memelilerde yüksek oranda farklılıklar göstermesinden dolayı popülasyon çalışmaları için tercih edilmesine rağmen, bu durum balıklar için geçerli değildir (Anonymous, 2007). Oldukça az bireye ihtiyaç duyduğu ve coğrafik bölgeler arasında çeşitli haplotiplerin kaynağını herhangi bir nükleer markırdan daha hızlı bulacağından mtDNA özellikle kullanışlıdır (Maes vd., 2003). Mitokondrial DNA varyasyonu, balık türlerinin stoklarını ayırmak ve düzenlemek amacıyla sağlıklı bir şekilde kullanılabilir (Grewe ve Hebert, 1988; Billington vd., 1992).

1.5. Genetik Varyasyon ve Belirlenmesi

Bütün organizmalarda mutasyon görülmektedir. Canlılarda, normal hücresel olaylar ya da çevre etkileşimi sonucunda genetik varyasyon (polimorfizm) sıkça görülmektedir. Seleksiyon ve genetik sürüklenmeyle birlikte bireyler, türler ve daha yüksek takson grupları arasında genetik varyasyonda azalmalar gözlenmektedir. Doğal çeşitliliği korumanın temel yaklaşımı popülasyonlardaki genetik varyasyonun korunmasıdır. Aşırı avcılık ve çevresel bozulmadan kaynaklanan stokların aşırı zarar gördüğü durumunlardan genetik varyasyonun arttırılması için stoklar hem doğal bireyler hem de kültür altındaki anaçlar kullanılarak desteklenmektedir. Bu işlemde her bir aşamanın (anaç toplama, seleksiyon ve yavru balıkların doğaya bırakılmasına gibi) dikkatlice gözden geçirilmesi popülasyonun genetik yapısına zarar vermemek için önemlidir (Allendorf vd, 1987).

Moleküler tekniklerin kullanımı, popülasyon içinde bireyler arasında, aynı türün popülasyonları arasında ve taksonomik seviyede farklı türler arasında genetik varyasyonun tahminini mümkün kılmıştır. Moleküler belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda lokal popülasyonların ve sucul türlerin üreme farklılıkları gösteren, izole halde küçük gruplara bölünmüş olduğu gözlenmiştir. Böylece bir veya birden fazla ayrı üreme davranışı gösteren izole grupların kaybolması tür içindeki genetik varyasyon seviyesinin düşmesine neden olmakta ve tamamıyla nadir bulunan genetik karakterlerin kaybolmasıyla sonuçlanabilmektedir (Çiftçi ve Okumuş, 2002).

Sonuç olarak, üretimin uzun süreli devamlılığını sağlamak için; gen havuzunu belirli bir düzen dahilinde paylaşan ve alt gruplara ayrılmış balık populasyonları arasındaki ve içindeki genetik farklılığın, gelişen moleküler genetik yöntemlerinin kullanımıyla belirlenmesi, ve genetik varyasyonun korunması gerekmektedir. Balıkçılık yönetiminin temel amacı stoktaki tüm genetik varyasyonu koruyabilecek şekilde hasat etmek ve yalnız kaybolan varyasyonun restorasyonu için balıklandırma yapmak olmalıdır (Okumuş ve Çiftçi, 2003; Çiftçi vd., 2007).

1.6. Genetik Varyasyonun Tahmininde Kullanılan Teknikler

1.6.1. Protein Elektroforezi

İlk uygulanabilir genetik belirteç sistemi 1960'lı yıllarda geliştirilen protein elektroforezi olmuştur (Buth, 1990). Yaklaşık yirmi yıldır balık genetikçileri farklı balık türlerinde populasyon düzeyinde genetik farklılıkları karakterize edebilmek için protein elektroforezlerini ana araç olarak kullanmaktadırlar. Protein elektroforezi ile yapılan çalışmaların en büyük avantajı hızlı, ucuz olması ve çok fazla laboratuvar malzemesi istememesidir. Buna karşın kullanılan örneklerin taze olması zorunluluğu, DNA çalışmalarına göre çok sayıda örneğe ihtiyaç duyulması ve bu örneklerin genellikle öldürülmesi, en önemlisi bazı populasyon ve türlerde DNA çalışmalarına göre çok düşük seviyede polimorfik olması protein elektroforez tekniğinin sınırlayıcı özellikleridir (Imsiridou ve Zaldivar, 1999). Yalnızca 64 kodonun 20 tane aminoasit kodlaması, aminoasitlerin her birinin değişimi elektrik yükünde değişiklik meydana getirmemesi ve yalnızca nükleotidlerin %30'nun değişiminin ancak elektroforetik olarak tespit edilmesi sınırlayıcı etkenlerdendir. Bu nedenle son dönemlerde çalışmaların çoğunluğu DNA belirteç sistemleri kullanılarak yapılmaktadır veya protein elektroforezi ikinci teknik olarak kullanılmaktadır.

1.6.2. DNA Belirteç Sistemleri

1960'lı yılların ortalarına kadar populasyonlar arası ve populasyon içi varyasyonun tespiti için genel olarak biyo-ekolojik özellikler, markalama, parazit dağılımı, fizyolojik ve

davranış özellikleri, morfolojik veya meristik karakterleri kullanılmaktaydı (Lewontin, 1964). İlk olarak 1970 lerde alloenzim yaygın bir şekilde kullanımından sonra moleküler genetiğin gelişimi ile bu konuda yapılan çalışmalar azalmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanımı özellikle DNA çalışmalarına ayrı bir ivme kazandırmış olup, 100 yıl veya daha öncesinden saklanmış balık pulu örnekleri ile bile çalışma imkânı sağlamıştır. Ayrıca çok az miktarda ve canlıyı öldürmeden alınan doku parçasıyla bile çalışma imkânı vermesi önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Genetik varyasyonun belirlenmesinde kullanılan DNA belirteçlerinin birçoğu dolaylı yollardan farklılığı belirlemeye yönelik çalışmaları kapsar. Bununla birlikte son yıllarda DNA sekans analizinin yaygınlaşması ve bu amaç için cihazlar geliştirilmesi daha fazla örneklerle çalışma fırsatı vermiştir.

Balıkçılıkta kullanılan başlıca DNA belirteçleri şunlardır; Mitokondrial DNA (mtDNA), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLPs), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPDs), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLPs), Mikrosatellit, Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNPs) ve İfade edilmiş Sekans İşaretleri (ESTs). Bu belirteçler kullanılarak genetik varyasyonun tahmini, akrabalı yetiştiricilik, anne-babalık testi, tür ve hat tespiti, hibrit bireylerin belirlenmesi ve genetik haritaların oluşturulması (QTL belirlenmesi ile) gerçekleştirilebilir.

1.6.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen PZR metodu nükleik asitlerin canlı organizma dışında, uygun koşullar altında çoğaltılması temeline dayanır. Her PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur.

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Temeli polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan yöntemler; DNA'nın dizi analizi ve DNA haritalamasında, genetik hastalıkların teşhisinde (fragile X sendromu, AIDS, lösemi v.b.), insan genom projesindeki araştırmalarda, allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, DNA parmak

izi analizinde, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde (analık babalık tayini), tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evrim çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde) etkin bir biçimde kullanılmaktadır (Arı, 2004).

1.6.2.2. Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

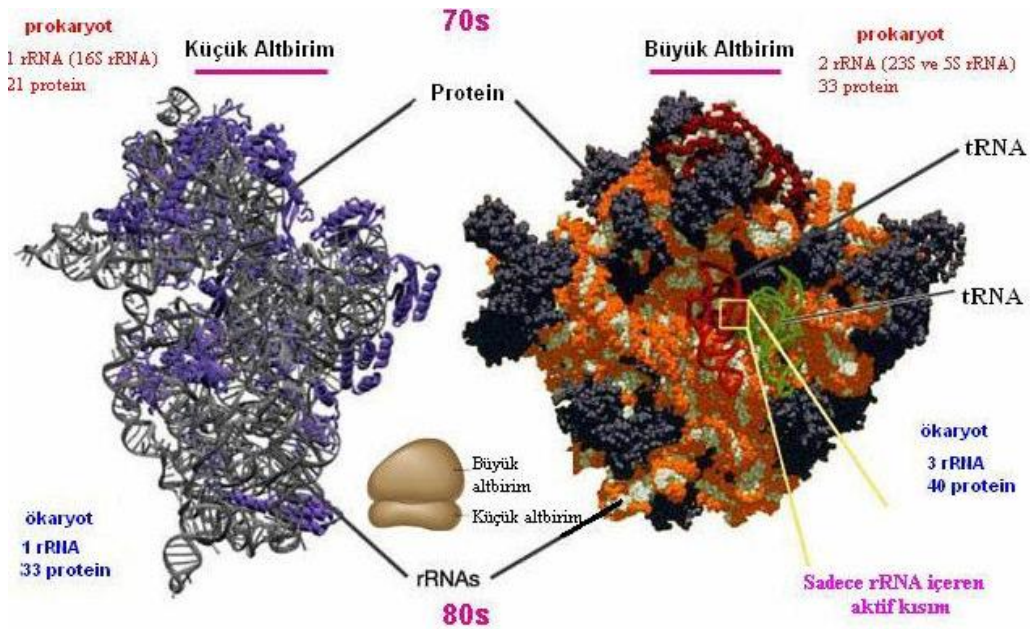
PZR'ın geliştirilmesiyle birlikte; mtDNA'nın PCR ile amplifike edilmiş parçasının RFLP analizi, populasyon genetik çalışmaları için yaygın bir metot haline gelmiştir (Hansen ve Loeschcke, 1996b). RFLP analizi; az zaman almasıyla ve tüm mtDNA'nın tamamının kesilmesi ve dizisinin elde edilmesi üzerine avantajlıdır. Dahası populasyon çalışmaları için pek çok birey ve mitokondrial genomun büyük bir kısmını göstermek için araştırmacılara imkân sağlamaktadır (Nielsen vd., 1998).

En basit DNA polimorfizmi tek baz değişikliğidir. RFLP, DNA'yı restriksiyon enzimi ile parçalara ayırarak incelenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir. DNA polimorfizmlerin çoğunu tek baz çifti değişimleri oluşturur. Bunlar restriksiyon enziminin tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan değişimlerdir. Enzimin iki tanıma bölgesi arasındaki delesyon veya insersiyon (nükleotid çıkmaları veya eklenmeleri) enzim kesimiyle oluşan fragmentlerin boyutlarındaki farklılıklar RFLP olarak isimlendirilir.

Restriksiyon endonükleazlar 4, 6, ve 8 nükleotidden oluşan genomda iki yönlü simetri oluşturan palindromik bölgelerdeki (tersten ve düzden okunuşu karşılıklı her iki iplikte de aynı olan) baz dizilerini tanıyıp, kesen endonükleazlardır. Kesim bölgesi genelde 5-10 dizilik bir bölgedir. Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalar restriksiyon parçaları olarak isimlendirilmektedir. Restriksiyon enzimleri tip I, tip II ve tip III olmak üzere gruplandırılırlar. Tip I ve tip III'ün kesimleri çok spesifik değildir. Tip II enzimler ise moleküler biyolojide kullanılan enzimlerdir. Genellikle 4-6 nükleotidli bir baz dizisini tanıyarak, DNA'nın her iki zincirini bu pozisyondan keserler. Bu enzimlerin bazıları diziyi tam ortadan keserek küt uçlu parçalar oluştururken diğerleri yapışkan adı verilen birbirini tamamlayıcı parçaların meydana gelmesine yol açarlar ve yapışkan uç DNA zincirini çapraz olarak keserler (Grinstead ve Bennett, 1988; Smith, 1999; Temizkan, 1999; Klug ve Cummings, 2003; Topal, 2004).

1.7. 16S rRNA Geni

Prokaryot ve ökaryot hücrelerde bulunan ribozomlar, yapı ve işlev bakımından birbirine büyük benzerlik gösterir. Esas farklılık, ribozomları oluşturan alt birimlere ait rRNA (ribozomal RNA) ve protein çeşitlerindedir (Temizkan, 1999). Ribozomlar, biri büyük biri küçük olmak üzere iki alt birimden oluşmuştur. Prokaryotlarda büyük alt birim 50S, küçük alt birim 30S olup, toplam ribozom 70S büyüklüğündedir. Ökaryotlarda ise büyük alt birim 60S, küçük alt birim 40S olup, toplam ribozom 80S büyüklüğündedir (Şekil 4). Birim olarak kullanılan S; Svedberg sabitesi olup, ultrasantrifigasyon sırasında çökme hızı ile ilgili birimdir (Temizkan, 1999).



Şekil 4. Prokaryot ve ökaryot ribozom yapısı (Mallery, 2007, Online).

Ribozomlar ribonükleoprotein yapısındadırlar. Bir ribozom rRNA ve çok sayıdaki çeşitli proteinden meydana gelir. Prokaryotlarda 5S, 16S ve 23S olmak üzere 3 farklı büyüklükte rRNA bulunur. 16S rRNA 1541 nükleotidden oluşmuştur ve ribozomun 30S'lik alt biriminde bulunur. 5S rRNA 120 nükleotidden, 23S rRNA 2904 nükleotidden oluşmuştur ve her iki rRNA da ribozomun 50S'lik alt biriminde bulunur.

Ökaryotlar ise 5S, 5.8S, 18S ve 28S olmak üzere 4 çeşit rRNA vardır. Bunlardan 18S rRNA ökaryot ribozomunun 40S'lik küçük alt biriminin yapısına katılırken, diğerleri ise 60S'lik büyük alt birimde yer alırlar (Temizkan, 1999). Özellikle mikroorganizmalarda

moleküler yapıların ve DNA dizilerinin, klasik fenotipik özelliklere göre evrimsel ilişkileri daha iyi ortaya çıkardığı görülmüştür. Bundan dolayı taksonların tanımlanmasında temel alınan hücresel seviyedeki çalışmalar moleküler düzeye (16S ve 18S rRNA dizi karşılaştırmaları) indirilmiştir (Temizkan, 1999).

16S rRNA gen dizisi, tüm canlılarda yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir. Genomda bu rRNA bölgesi hem bakteriye özgü çok iyi saklanmış dizileri içermekte, hem de türe göre değişken olan dizileri barındırmaktadır. Bu değişken diziler genellikle araştırmacılar tarafından heterojen fenotipe sahip veya konvensiyonel bakteriyolojik testlerle kültürü zor olan bakterilerin PCR ile tanısı için primer bölgelerinin tasarlanmasında kullanılmaktadır (Temizkan, 1999). Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. 16S rRNA'yı kodlayan gen dizisinin, özellikle bakteriler arasındaki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu evrensel molekülün taşıdığı nükleotid dizileri, filogenetik gruplar arasında gösterdiği benzerliklere göre, evrimsel yakınlığın yorumlanmasında etkin rol oynamaktadır. Günümüzde bilinmeyen bir bakterinin cins hatta tür seviyesine kadar tanımlanabilmesi 16S rRNA geni yardımıyla mümkün olabilmektedir (Temizkan, 1999).

1.8. Filogenetik

Filogenetik genel olarak filogenetik çıkarım veya filogeni yapılandırılmasının kısaltılmış eş anlamı olarak kullanılan terimdir. Filogenetik yapılandırmanın amacı eldeki bazı verilerin filogenini tahmin etmeye çalışmaktır. Toplanmış herhangi bir veri için bazı atasal ilişkiler bulunacaktır. Verinin kendisinin atasal ilişkisinin ortaya çıkarılması veya soy ağacı olarak yapılandırılması için bilgi içermektedir. Bu filogeni veya ağaç olarak isimlendirilen dallanmış yapının oluşturulmasını sağlar (Swofford vd., 1996). Bu yapılandırmada ana adımlar sırasıyla:

1. Çalışılan ana biyolojik birimin tanımlanması ki bu taksa veya Operasyonel Taksonomik Ünite (OTÜ) olarak isimlendirilir, genellikle türleri ifade eder fakat daha aşağı üniteler (alttürler, stok gibi) veya daha yukarı (genus, familya, ordo, sınıf, filum) seviyedeki organizmalar olabilir.
2. Karakterlerin ifadesiyle taksonun karakterize edilmesi ki bunlar taksonlar arasında farklı ifadeleri olan nitelikler (genetik, morfolojik, fizyolojik vb.) olabilir.

3. Taksonların benzerlik derecelerine ve/veya paylaşılan karakterlerine göre gruplandırılarak düzenlenmesi.

Düzenleme genellikle çok fazla sayıda paylaşılan karaktere göre karakterize edilen çok sayıda grubun dâhil edilmesiyle hiyerarşik olarak yapılmaktadır. Hiyerarşik düzenleme (filogeni) genellikle filogenetik ağaç oluşturularak betimlenir ve taksonomik sınıflandırmada veya evrimsel ilişkinin yorumlanmasında kullanılabilir.

Bu adımların açık olan basitliğinin yanında filogenetik çıkarımlar çok açık değildir, yani aksine çok karışık bir disiplindir. Çünkü farklı karakterler aynı grupları tanımlamayabilir. Gerçekte farklı karakterler hiyerarşik ilişkiler hakkında bilgilerle tamamıyla uyumlayabilir.

Karakterler farklı yollarla karşılaştırılabilir. Örnek olarak; kati, kesin (yeşil gibi)- nispi (ön ayaklar arka ayaklardan daha uzundur gibi)' ye karşı; ayrı, farklı (beş parmak gibi) - devamlı (8 m uzunluğunda kanat)'ya karşı; gelişimsel olarak erken - geç'e karşı; evrimsel olarak kararlı - kararsıza karşı gibi sıralanabilir. Bu karşıtlığın ilk üçü yakın zamandaki organizmalar için objektif olarak değerlendirilebilir fakat son karşıtlık evrimsel yapılar ve işlemler hakkındaki daha önceki hipotezlere bağlıdır.

Filogenetik çıkarımda kullanılan verinin iki geniş kategorisi bulunmaktadır. Bunlar ilki karakter verisi, takson hakkında bilgi sunar ve ikincisi uzaklık veya benzerlik verisi, buda taksonlar arasındaki ikili ilişkileri tanımlar.

Karakter verileri; her bir takson için her bir karakterin ifadelerini kodlayan rakamsal değerler olarak belirtilir. Sistematiğeçiler arasında karakter ve karakter ifadesi terimleri hakkında uyumsuzluk bulunmaktadır. Fakat bunların kullandıkları rakamsal metotlar genellikle karakteri, değişkenin eş anlamlısı olarak kullanır ve karakterin muhtemel gözlenmiş değerlerinden birini ifade ettiğini düşünürler. Karakterler ya kalitatif yada kantitatif olabilir ve kalitatif karakterler ikili (iki özelliğe sahiptir ve genellikle bu özelliklerin bulunuşu veya bulunmayışına göre ifade edilir) veya çoklu (üç veya daha fazla özelliğe sahiptir) özellikleri sınıflandırır.

Çok ifadeli karakterlerin düzensiz olduğu düşünülmektedir. Herhangi bir durum evrimsel zaman içinde yeni bir oluşuma değişim gösterebilir. Bu DNA sekans verileri için olağan bir durumdur.

Kantitatif karakter verileri değişim gösteren ayrı veya devamlı karakterlerden farklıdır. Karakterlerin farklı veya devamlı olması yada düzenli veya düzensiz olması dikkate alınmazsa, karakter temelli filogenetik çalışmalarda kabul edilen iki durum vardır.

Bunun ilki ‘analoji’ karakter bağımsızlığıdır. İkinci kabul edilen durum ise ‘homoloji’ dir. Klasik sistematikçiler iki tür arasında benzerlikler bulduklarında bu benzerliklerin olasılıkla homojimi (ortak bir atadan kalıtılan) yoksa sadece analojimi (işlev ve çoğunlukla yüzeysel yapıda benzer, ancak evrimsel orjinleri farklı) olduğunu belirlemeye çalışmaktadırlar. Bu duruma örnek olarak ardıç kuşu ve mavi kuşun kanatları karşılaştırıldığında kanıtlar bu iki kuşun kanadının ortak bir atadan geldiğini göstermiş ve böylece bunların homolog olduğu düşünülmüştür. Fakat ardıç kuşunun kanatları ile kelebek kanatları karşılaştırıldığında işlevsel olarak benzer yapılar olmasına rağmen yalnızca analogtur. Yani bunlar ortak bir atadan kalıtılmayıp, bağımsız olarak evrimleşmişler ve farklı atasal yapılardan oluşmuşlardır (Ketoon vd., 1999).

Uzaklık ve benzerliklerin ölçümleri; karakter verileri tek başına taksonu tanımlarken, uzaklık ve benzerlik verileri takson çiftleri arasındaki ilişkiyi tanımlamaktadır. İmmünoloji ve nükleik asit hibridizasyonu gibi bazı işlemler uzaklık verisini direk olarak vermektedir. Karakter verilerinin diğer türleri (allozom, nükleotit sekansı gibi) analiz için uzaklık verisine dönüştürülür. Uzaklık matrisi simetrik matristir ve buradaki elementler taksonlar arasındaki eşçiftlerin uzaklığıdır. Uzaklık verilerine bağlı olan filogenetik yöntemler genellikle eklemeli ve ultrametrik özellikler olmak üzere iki matematiksel özelliğe sahiptir (Swofford ve Olsen, 1990).

Eklemeli uzaklıklar; eklemeli uzaklık seti uzatılmaya karşılıklı olarak uyumludur ve tüm uzaklıklar köksüz ağaç tarafından bütün takson çiftleri için uyumludur.

Ultrametrik uzaklıklar; ultrametrik uzaklıklar biraz sıkıntılıdır. Eklemeli olmak zorundadır fakat özel boğumlara bağlı tüm takson uçları kökten eşit uzaklıkta olmalıdır. Ultrametrik kriter tüm ırkların eşit değişim oranıyla farklılaştığı evrimsel kuralına dayanır.

1.8.1. Filogenetik Ağaç Oluşturma Metodları

Bu metotlar üç geniş kategoride sınıflandırılmıştır (Felsenstein, 1981): uzaklık metodu, parsimoni metodu ve maksimum olasılık işlemleri ki buda özel verilerle (DNA sekans verisi gibi) çalışan birçok özelleşmiş metotları içermektedir.

Bu metotları açıklamadan önce filogenetik ağaçlar hakkında kısa bilgi vermek gerekirse; filogenetik ağaçlar, taksonomik birimleri (türler, populasyonlar, bireyler) gösteren boğumlardan (node) ve kalıtsal ve atasal anlamda taksonomik birimler arasında ilişkiyi belirten dallardan oluşmaktadır. Yalnızca bir dal bitişik boğumlardan birine

bağlanır. Ağacın dallanmış yapısı topoloji olarak isimlendirilir ve dal uzunluğu genellikle dalda meydana gelen birçok değişikliği temsil eder. Bu ölçeklendirilmiş dal olarak isimlendirilir. Ölçeklendirilmiş ağaçlar temsil ettiği zaman dilimi için sıkça kalibre edilir. Böyle ağaçlar analiz edilen genlerde kuramsal ilkeye sahiptir. Dallar ayrıca ölçeklendirilmemiş olabilir bunun anlamı dal uzunluğu zaman içinde oluşmuş değişimlerin bir orantısı değildir. Filogenetik ağaçlar ayrıca köklü veya köksüz olabilir. Köklü ağaçlarda kök olarak adlandırılan özel bir boğum (node) vardır ve yaygın olan atayı temsil eder. Köksüz ağaç evrimsel süreci veya yaygın atayı tanımlamaksızın yalnızca türler arasındaki ilişkiyi belirtir.

1.8.1.1. Mesafe Temelli Metotlar

1.8.1.1.1. Kümelenme Temelli Yöntem

Filogenetik uygulamalarda kullanılan küme analiz algoritması, yalnız taksonla başlayan hiyerarşik ağaçlar ürettiğinden hiyerarşik yığılma işlemleri olarak bilinen algoritmanın ailesidir (Rohlf, 1970). Böyle algoritmalar kavramsal olarak açıktır. Taksonlar arasında pairwise (çift yönlü) uzaklık matrislerinin verilmesiyle, bu metotların hepsi ilk olarak en benzer (en az mesafe) çiftle birlikte birleşir ve bunu gittikçe daha uzak çiftlerin oluşturduğu bağlantılar takip eder. Her bir basamakta iki takson veya bağlantı oluşturan takson grupları tek küme içinde birleşir. Sonuç genellikle “dendogram” olarak isimlendirilir çünkü bunlar ağaca benzer yapıda köklü, tekrarlanan çatal yapıdadır ve nispi benzerliklere taksonların kümelerini betimler.

Çok fazla sayıdaki muhtemel küme algoritmalarının dışında yalnızca bir kaç filogenetik çalışmada kullanılmaktadır. Bunlar Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA); ve Weighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average (WPGMA) olarak isimlendirilir.

1.8.1.1.1.1. Uzaklık Metodu

UPGMA, en çok kullanılan metotlardan birisidir ve topolojilerin yeniden oluşturulması metotlarının en basitidir. Bilgisayar simülasyonları evrimsel oranların sabit

olmadığı, yani sabit bir moleküler saat varsayımına ihtiyaç duyduğu, bunun tersi durumda ise bu metodun zayıf olduğunu önermektedir (Saitou ve Imanishi, 1989; Nei, 1991). UPGMA metodu 1973 yılında taksonomik fenogramların ya da fenotipik benzerlik ile grup OTU (Operasyonel Taksonomik Ünite)'lerinden oluşan ağaçları yeniden oluşturulması için tanımlanmıştır. Moleküler saat varsayımı tutarlı olduğu zaman filogenilerin yeniden oluşturulmasında iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Gerçekte moleküler saat fonksiyonları tamam (mükemmel) ise bu metod iyi bir şekilde uygulanabilir (Nei, 1991). Bu metodun diğer bir avantajı da, aşırı derecede hızlı olmasıdır. Uygun bir program ile birkaç dakikada yüzlerce türden bir ağaç oluşturulabilir.

1.8.1.1.2. Komşu Bağntı Metodu (Neighbour Joining)

Bu metod da, ağaç en küçük kol uzunluğu ile oluşturulur. İlk bakışta çok yoğun hesaplamalarla tanımlanmıştır, fakat metod mümkün olan bütün ağaçlar içerisinde en kısa kol uzunluğuna sahip ağacı araştırmaktadır. Açıkça OTU'lerin sayısı arttıkça ağaç sayısı da artmaktadır ve hızlı bir şekilde araştırmak imkânsız olmaktadır. Bu nedenden dolayı Saitou ve Nei (1987) ağaçlar için sezgisel algoritmayı önermişler ve buna komşu-katılımı denmiştir. Burada çatallanan tek bir ağaç üretilir. Komşu bağntı algoritması star-ağaç topolojisi ile başlar ve sıralı olarak OTU'lerin çiftlerini (komşu) seçer, bu ise ağacın toplam uzunluğunu minimize eder. Bu işlem ağaç tamamen kararlı olana kadar devam eder. Sabit olmayan uzaklıklar kullanıldığı zaman uygulama oldukça iyi görülmektedir (Rzhetsky and Nei, 1993). Bir diğer uzaklık metodu da Fitch-Margoliash metodudur. Merit fonksiyonun minimizasyonunu içerir. Burada taksonlar arası uzaklıklar arasındaki toplam farklılaşmayı ölçer. Bu işlem ağaçtaki dal uzunlukları yoluyla tahmin edilir veya hesaplanır. Kısa dallı ağaçlar için çok doğrudur.

1.8.1.1.2. En İyi Durum Temelli Yöntem

Pek çok farklı ağaç topolojisini (pek çok noktadan ve dallardan oluşan bir ağ yapısı) karşılaştırırlar ve ağaçtaki önceden tahmin edilen mesafeler ile gerçek evrimsel mesafeler arasındaki en iyi uyumu göstereni seçerler.

1.8.1.2. Karakter Temelli Yöntem

Filogeni, bir türün yada daha yüksek gruplanmış organizmaların tarihi ve evrimsel gelişimidir. Filogenlerin yapılandırılmasında çoğu çaba evrimsel ilişkilerin anlaşılmasına yöneliktir. Filogenetik çıkarımda kullanılan verinin iki geniş kategorisi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi karakter verisi, takson hakkında bilgi sunar ve ikincisi uzaklık veya benzerlik verisi, bu da taksonlar arasındaki ikili ilişkileri tanımlar.

Türler arasındaki filogenetik ilişki yada gen sekanslarından gözlenen varyasyonu en iyi anlatan evrimsel ağaç veya ağaçları bulmak için genellikle üç temel metot kullanılmaktadır. Bunlar maksimum parsimoni metodu, uzaklık metodu ve maksimum olasılık metodudur ki bu da özel verilerle (DNA sekans verisi gibi) çalışan birçok özelleşmiş metotları içermektedir (Felsenstein, 1981). Bu üç metot “ihtimal (most likely)” yada “en iyi (best)” olanı seçerek evrimsel ağacı yeniden oluşturmak için farklı algoritma, ölçüt ve yöntemlerden yararlanır. Elde edilen sonuçlar filogenetik ilişkilerin yorumlanmasında kullanılır (Saitou ve Nei, 1987).

1.8.1.2.1. Maksimum Parsimoni Metodu

Bu metod yaygın olarak kullanılan ağaç oluşturma metotlarından biridir. İlk olarak 1966 yılında Eck ve Dayhoff tarafından aminoasit sekans verileri için kullanılmıştır (Nei, 1987), fakat nükleotit sekans verileri içinde kullanılabilir (Fitch, 1977). Maksimum parsimoni metodunun prensibi parçacık (partiküller) topoloji yoluyla vurgulanan evrimsel olayların miktarının çıkarılması ve en az miktardaki evrimsel olay gerektiren ağacı seçmektir. Genelde bunun anlamı minimum değişime sahip olan ağacı araştırmak için çok miktardaki farklı topolojilerin incelenmesidir. Maksimum parsimoni analizleri çoğunlukla diğer uzaklık tabanlı analizlere göre daha çok tercih edilir. Bunun nedeni ise karakter tabanlı yaklaşımdır. Şöyle ki, bu yaklaşım daha çok veri çeşidini kullanılabilmekte ve daha çok veriyi desteklemektedir.

1.8.1.2.2. Maksimum Olasılık Metodu (Maximum Likelihood)

Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında MP“ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir. Bu metod yeniden yapılandırma metodudur. Varsayımlar üzerine hareket eder. Taksonlar arasındaki ilişki için en iyi olasılığı belirleyen basit testlerden biridir. Diğer bir ifade ile gözlenen farklılığı açıklamak için değişimin en az miktarı gereklidir. Maksimum olasılık metodunun temel amacı kollara ayrılan orderlar ya da en olası ağaç yada ağaçların topolojisidir. Bu metod bütün olası ağaç topolojileri ve parametreler arasında olasılığı en fazla oluşan ağacı bulur.

Bu yöntem, farklı tipteki nükleotit değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir sorusunu sormaktadır.

Bu yöntem için bir bilgisayar programı, her ağaç topolojisinin değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılığı toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Çok iyi temellendirilmiş istatistiğe dayandığından matematiksel olarak daha zahmetli bir yöntemdir.

Avantajları, mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olanıdır. Karakter ve oran analizlerinde kullanılabilirler. Sönmüş (hipotetik) ataların sekanslarını tahmin etmede kullanılabilir. Nükleotid, aminoasit sekansları ve diğer data tiplerine uygulanabilir. Dezavantajları, diğer pek çok metotta olduğu gibi basit ve sezgisel değildirler. Parsimonide olduğu gibi yüksek seviye homoplasilerde yanılabirler.

1.8.1.2.3. Bayesian Çıkarımı

Hemen her alanda kullanımı oldukça yaygınlaşan bu istatistik modeli filogenetiğin en popüler metodudur. Bayesian çıkarım metodu, ağaç oluşturmada maksimum benzerlik metoduna benzer bir yöntem kullanır. Ancak öncül olasılık kullanımı ile bu metottan ayrılır. Bayesian metodu, önceki olası ağaçların dağılımlarından birini alır. Bu önceki dağılımın seçimi, Bayesian çıkarım metodlarını kullananların seçimleri arasındaki farklı noktadır.

Standart bilgisayar programlarında evrimsel modelin keyfi seçiminin yada varsayım modeller kullanımı ile filogenetik ilişkilerden sonuç çıkarmak gerçek ilişkileri göstermez.

Genellikle, yanlış bir evrimsel model önerildiğinde, filogenetik modeller daha az doğru (bir çok ağaç içerisinde yanlış bir ağaç yerine geçer) olabilir yada tutarsız (verilerin artması ile bir yanlış ağaç birleşir) olabilmektedir (Swofford vd., 1996; Felsenstein, 1973; Huelsenbeck ve Hillis, 1993; Bruno ve Halpern, 1999; Posada ve Crandall, 1998; Sullivan ve Swofford 1997). Bu nedenle evrimsel modelin seçimi için hangi parametrelerin veriye daha uygun olduğunun bilinmesi gerekmektedir (Huelsenbeck, 1995). Örneğin, mtDNA ele alındığı zaman, transisyon ile transversiyon oranında sapma olabilir (Brown vd., 1982). Bu nedenle bir modelin seçiminde eşit transisyon ve transversiyon oranı varsayımı ciddi hatalara neden olacaktır. Bu sahadaki gelişmeler model oluşturulması için yol göstermiştir, modeller transisyon ve transversiyon ikame sapmalarının her ikisini (Kimura, 1980) ve eşit olmayan nükleotid frekansları bulundurabilmektedir (Hasegawa vd.,1985). Bu eğilim en son olarak “Genel Zaman Tersine Çevrilebilir (GTR) model ile sonuçlanmıştır. Bu model yalnızca eşit olmayan nükleotid frekansına izin vermez aynı zamanda nükleotid yerleri arasında mümkün olan 6 yer değişiminin her birin farklı oranlarda meydana gelmesine izin verir (A-C, A-G, A-T, C-G,C-T ve G-T) (Rodriguez vd., 1990).

Daha sonraki gelişmelerle birkaç modeli kullanarak çapraz ikame için varyasyon vermek mümkün olmuştur (Churchill vd., 1992; Yang, 1993, 1994). Değişik yerler arasındaki farklı oranları izin vermek için en çok uygulanan metotlardan biri “ayrı gamma metodu” dur. Bu metot bir gamma dağılımına göre dağılmış nispi ikame oranları varsayılır. Burada gamma dağılımı 1 ve $1/\alpha$ ’nın varyansının bir ortalamasıdır. Burada α , dağılımın şeklini tanımlar. α değerinin büyük olması yerler içinde ikame varyansının daha az olması olarak ifade edilir (yani bütün yerlerdeki ikame oranları daima eşittir). Oysa düşük (0,01) L-şeklinde dağılım sonucudur (çoğu ikame oranları düşüktür, fakat bazıları yüksektir) (Lewis, 2001).

Bu farklı parametrelerin hepsi parametreye zengin modellerde iyi gelişmiştir. Fakat bu modellerin kullanımı zaman gereksinimi ve hesaplamada daha çok parametrelere ihtiyaç duyması nedeni ile her hesaplamada daha çok hata içerir (Huelsenbeck ve Crandall, 1997). Bunun yerine kullanılacak modeli belirlemede tavsiye edilebilecek yol ise veriye uygun modeli seçmektir. Bu yöntem büyük benzerlikle parametreye zengin modellerin yaptığı gibidir, fakat daha az parametre kullanarak uygulanır. En uygun modelden önemli derecede farklı olmayan en basit modeli seçerek, hata ve zaman tüketimi azaltılır (Swofford vd., 1996). Bu konu üzerine farklı istatistiksel metotlar vardır. Bu metotlardan

bir tanesi Akaike bilgi kriteri kullanılarak (AIC) uygulanabilir (Akaike, 1974). Yine benzer şekilde BIC (Bayesian) kriterine göre de uygun model seçimi yapılabilir.

Filogenetikçilerin ağaçların güvenilirliğinin hesaplanması için en yaygın kullandığı istatistiksel test “seç-bağla (bootstrap)”dır (Efron, 1982). Felsenstein (1985) tarafından geliştirilmiş olan seç-bağla tekniği, filogenetik çalışmalar için kullanılır ve yeniden örnekleme ile yerine koyma yöntemidir. Her bir tekrar için bir topoloji oluşturulur. Bütün tekrarlardan sonra ağaçlar karşılaştırılır ve gruplandırma için üretilen ağaçların oranı, ağacın iç kol ilişkisi için kullanılır ve buda seç-bağla veri setlerinin tutarlılığının bir ölçüsünü verir. Çok farklı türlerle yapılan çalışmalarda kullanılır (Silva ve Russo, 2000). Hedges (1992), 2000 tekrar uygulanması durumunda %95 seç-bağla değerinin hassasiyetinde sonsuz sayıda tekrar ile karşılaştırıldığında %1’lik bir hata olacağını hesaplamıştır.

1.9. Önceki Çalışmalar

Genetik varyasyon ve bunların seviyeleri birey ve popülasyonların yönetimi, anlaşılması ve yorumlanmasında önemli olmakta ve alloenzim elektroforezi ve kromozomal teknolojisinin gelişmesi ile genetik varyasyon incelenmesinde bir artış olmuştur (Okumuş ve Çiftçi, 2003). Önceki yıllarda kültür balıkçılığında ve doğal balık stoklarında kromozomal teknoloji kullanılırken son yıllarda yerini DNA markırlarına bırakmıştır. Moleküler markırlar stok ve bireyler arasındaki farklılık ve benzerliklerin belirlenebilmesi için yeni istatistiksel gelişmelerle birleştirilmiştir. Mitokondriyal DNA veya çekirdek DNA’sı, mikrosatellitler, minisatellitler, kopyalanmış sekanslar, anonim cDNA, AFLP, RAPD ve RFLP gibi çeşitli moleküler markırlar ve alloenzim elektroforezi balıkçılık ve su ürünleri alanında yapılan birçok moleküler çalışmada kullanılmaktadır (Okumuş ve Çiftçi, 2003).

Moleküler çalışmaların çoğunda kullanılan evrimsel alandaki filogenetik bilgiler mtDNA’dan elde edilmektedir. Ökaryotlarda mtDNA tarafından kodlanan 13 proteinin aminoasit gen sekansının karşılaştırılması sonucu ATP sentaz 8 (ATP8) bölgesinin en çok değişken ve sitokrom oksidaz 1 (COI) bölgesinin ise en çok koruyucu bölge olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tüm protein kodon genlerinin performansı için yapılan araştırmalar sonucu mitokondriyal protein genler filogenetiksel olarak ilişkilerinde 3 filogenetik performans açısından iyi (ND4, ND5, ND2, cyt-b, ve COI), orta (COII, COIII,

ND1, ve ND6) ve zayıf (ATPase 6, ND3, ATPase 8, ve ND4L) olarak sınıflandırılmıştır (Zardoya ve Meyer, 1996). Kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) popülasyonlarının analizlerini yapmak için mitokondriyal genomun DNA sekansı yapılmış ve omurgalılarla ortak olan genler ve gen yapıları belirlenmiştir. Cyt-b ve sitokrom oksidaz I bölgelerinin nükleotid dizi karşılaştırılması ile *Ictaluridae* familyası içinde taksonomik sınıflandırma ve birbirlerine uygun olan genusların genetik ayrımı yapılmıştır (Waldbiesser vd., 2003).

PZR-RFLP yöntemi balık türlerinin genetik olarak belirlenmesinde, aynı türe mensup farklı popülasyonlar arası genetik ilişkinin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Cocolin vd. (2000) levrek, çipura, eşkine ve sinarit balıklarının fileto örneklerine PZR-RFLP uygulayarak bu türlerin teşhisini yapmışlardır. Bu metotta, DNA ekstraksiyonu ve PZR'dan sonra cyt-b gen bölgesinden elde edilen 359 baz çiftlik amplikasyon ürününü kesici enzim analizine tabi tutmuştur. Enzim kesimlerinde aynı anda bu 5 türün ayırt edilemediği fakat *Hae*III ve *Nla*III enzimlerinden elde edilen sonuçlarının birleşiminden balık filetolarının farklı olduğu belirlenmiştir.

Santos vd. (2003) Güney Amerika'nın Atlantik kıyı sularında bulunan *Macrodon ancylodon* (*Sciaenidae*, *Perciformes*) balığının genetik farklılığını mtDNA analiz yöntemi ile ortaya çıkarmışlardır. Çalışmada cyt-b ve 16S rRNA genleri kullanılarak genetik yapısını ve nükleotid çeşitliliğini göstererek Batı Atlantik'te 2 farklı genetik yapı tespit ederek bu ayrımın taksonomik düzeyde olabileceğini belirtmişlerdir. Hindistan'daki ticari öneme sahip yedi *Sciaenid* türünde 16S rRNA ve sitokrom oksidaz c mitokondriyal genlerini kullanarak filogenetik ilişkilerini ve türlerin tanımlanması yapılarak, her iki genin dizi analizleri yardımıyla yedi türün 3 gruba ayrıldığı bulunmuştur (Lakra vd., 2009). Ayrıca, *Micropogonias furnieri*'nin Brezilya popülasyonunun genetik yapısı mtDNA'nın RFLP analizi ile incelendiğinde heterojenite testinde 23°S ve 34°S, arasındaki mtDNA haploid frekansının farklı olmadığı, fakat 23°'nin kuzey ve güneyi arasında anlamlı heterojenitenin olduğu belirlenmiştir (Puchnick-Legat vd., 2006). Diğer taraftan, Sarı ve Doğu Çin Denizlerinden *Larimichthys polyactis* (*Pisces*: *Sciaenidae*) genetik stok yapısının varlığını test etmek için mitokondriyal kontrol gen bölgesinin (766 bp) genetik çeşitliliği araştırıldığında moleküler varyans analizleri için bu bölgelerden alınan örnekler arasında önemli bir farklılık ortaya konamamıştır (Kim vd., 2010).

PZR-RFLP tekniğinin yanında balıkların genetik haritasının çıkarılmasında ve akrabalık ilişkilerinin analizinde mikrosatellit DNA markırları (Oomalley vd., 2003),

AFLP metodu (Han vd., 2009), jel enzim elektroforezi (Beckwitt, 1983) ve RAPD yöntemi de (Lakra vd., 2007) kullanılmaktadır.

Macrodon ancylodon (Sciaenidae) balığının Güney Amerika'nın Atlantik kıyı sularında morfolojik değişimler dışındaki genetik çeşitliliğinin populasyon genetiği yapısı mtDNA cyt-b sekansları kullanılarak araştırılmıştır (Santos vd., 2006). Brezilya'nın kuzeyindeki Caeté nehir halicindeki yer alan Sciaenid balıklarının 8 sınıfa ait 15 türünün mitokondriyal 16S rRNA geninin sekansları yapılarak tür teşhisi yapılmıştır (Vinson vd., 2004).

Avrupa levreklerinin cyt-b sekans çeşitliliğini ve bazı perciformes türleriyle filogenetik ilişkileri bu populasyona ait bireylerin cyt-b geninin sekansı yapılarak ortaya konmuştur. Elde edilen veriler ışığında her iki Doğu (Yunan ve Mısır) ve Kuzeybatı (Fransa sahili) *D. labrax* popülasyonları Tiren Denizi'ndekilerden genetik olarak ayrılmıştır. Atlantik sahilinden elde edilen *D. labrax* populasyonu Akdeniz'dekilerden genetik olarak farklı göstermiştir (Allegrucci vd., 1999). Bu çalışma geçmişte çalışılan aynı popülasyonların alloenzim, RAPD ve mtDNA D-loop çeşitliliği sonuçlarını doğrular niteliktedir.

Sciaenidae'lerin populasyon genetiği ile ilgili Türkiye denizlerinde yapılmış herhangi araştırma mevcut değildir. Ülkemiz sularında yaşayan işkine ve kötek balıklarının genetik analizi yapılarak populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin ortaya konulması gerekmektedir. Bu bağlamda, Trabzon, Giresun, Artvin, Rize, Adana, Antalya, Muğla ve İzmir, civarından yakalanan 254 balığın populasyon içi ve populasyonlar arası genetik varyasyonun belirlenmesini amaçlamaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Örnekleme 2008-2010 tarihleri arasında Trabzon, Giresun, Artvin, Rize, Adana, Antalya, Muğla ve İzmir, bölgelerinden yapılmış 110 adet kötek ve 144 adet işkine balık türü örneklenmiştir (Şekil 5, Tablo 1). Balıkların kuyruk yüzgecinden alınan doku parçası %98 etanol içeren kaplara konularak DNA ekstraksiyonu yapılana kadar saklanmıştır.



Şekil 5. Örnekleme alanı

Tablo 1. Türlerin örnekleme yeri ve sayıları

Balıklar	Akdeniz		Doğu Karadeniz				Ege		Toplam
	Adana	Antalya	Giresun	Trabzon	Rize	Artvin	Muğla	İzmir	
Kötek	29	8	-	7	-	25	41	-	110
İşkine	-	-	38	58	-	-	-	48	144

2.2. Metod

İşkine ve kötek balığının genetik analizinde 2 yöntem kullanılmıştır. Bunlardan ilkinde Cyt-b ve 16S rRNA gen bölgelerinin sekans analizleri yapılırken. İkinci yöntemde ise balıkların 16S rRNA, Cyt-b ve ND1 gen bölgeleri için RFLP analizi yapılmıştır.

2.2.1. Toplam DNA'nın Elde Edilmesi

DNA eldesi için yaklaşık olarak 2 mm büyüklüğünde ki 15–20 mg doku örneği, küçük parçalara bölündü ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarmadan önce kâğıt mendil üzerinde 1–2 dakika bekletilerek etanolun uçması sağlandı. Daha sonra Eppendorf tüpe 500 µl homojenizasyon solüsyonu [438 µl TEN (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 250 mM NaCl), 50 µl SDS (%10), 10 µl Proteinase K (20mg/ml) ve 2 µl RNase (100 mg/ml)] ilave edildi. Daha sonra tüpler sarsaklı inkübatörde 55°C de 5-16 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra fenol-klorform-izoamil yöntemi uygulanarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Santrifüj tüplerindeki pelletler kuruduktan sonra üzerine 300 µl TE (10 mM Tris ve 0,1 mM EDTA, pH 7,6-8,0) tamponu ilave edilerek yaklaşık 1 saat 37°C de bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlandı. DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığının tahmini UV/visible spektrofotometre (BIO-RAD, The SmartSpec Plus) kullanılarak, 260 ve 280 nm dalga boyunda optik densitesi okunduktan sonra örneklerin konsantrasyonu 100 ng/µl DNase free TE tamponu ile ayarlandı.

2.2.2. DNA Amplifikasyonu

Balık örneklerinden elde edilen mitokondriyal DNA'nın ND1, Cyt-b ve 16S rRNA bölgeleri, bu bölgeler için başka araştırmacılar tarafından geliştirilen primer setleri (Tablo 2) kullanılarak Thermal Cycler (Bio-Rad DNA-ENGINE, PTC 200) yardımıyla çoğaltıldı. PZR karışımı, forward ve reverse primerler, 2X PZR Master Mix, (PROMEGA) ve ddH₂O karışımından oluşan kokteyl solüsyon hazırlandı ve 0,5 ml'lik PZR tüplerine dağıtıldı (Tablo 3). Daha sonra her bir tüpe 200 ng DNA eklenerek örneklerin iyi karışması için kısa süreli santrifüj edildikten sonra örnekler thermocycler'a konularak amplifikasyon yapıldı (Tablo4).

PZR çoğaltması için kullanılacak primerlere ait erime sıcaklık (TM) değerleri, primerlerin diziliminden belirlen değerlerin $\pm 5^{\circ}\text{C}$ olacak ($44-60^{\circ}\text{C}$) şekilde dereceli (gradientli) PZR ile denenerek tespit edildi. Cyt-b ve 16S rRNA ve ND1 primerleri için uygun tutunma sıcaklıklarının sırasıyla 50°C , 60°C ve 60°C olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları

Gen Böl.	Adı	Primerler	Boy (bp)	Yazarlar
ND1	2660F	ACG TGA TCT GAG TTC AGA CC	1500	Cui vd. (2009) modifiye edildi
	4060R	GGG GTA TGG GCC CAA DAG CTT		Nielsen vd. (1998) modifiye bu çalışma
16S	2660R	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	1100	Cui vd. (2009)
	1460f	CTY GTA CCT TTT GCA TCA TGA		Inoue (2001) modifiye
	300uf	CGG THA AAC TCG TGC CAG CC		Inoue (2001) modifiye edildi
Cyt-b	L14725L	CGAACTAATGACTTGAAAAACCACCGTTG	800	Santos vd. (2003)
	HMVZ16	AAATAGGAARTATCAYTCTGTTTTRAT		Santos vd. (2003)

Tablo 3. ND1, 16S rRNA ve sitokrom-b gen bölgelerinin çoğaltılması için PCR Karışımının bileşenleri ve miktarları

PCR Bileşenleri	Miktar		
	ND1	16S	Cyt -b
2X PZR premiks	25 μl	25 μl	25 μl
Forward Primers (10 μM)	2 μl	2 μl	2 μl
Reverse Primers (10 μM)	2 μl	2 μl	2 μl
DNA (100 ng/ μl)	2 μl	2 μl	2 μl
Nuclease-Free su	19 μl	19 μl	19 μl
Toplam	50 μl	50 μl	50 μl

PZR yükseltgemesinin sonucu 4 μl ürün 1xTBE buffer sistemi ve %1'lik agaroz jelde koşturulmuş, ethidium bromitle boyanarak UV illüminatörle görüntülenmiş ve kontrol edilmiştir. Moleküler ağırlığa göre boy dağılımı $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$ markır (Promega) kullanılarak belirlendi. Kontrol sonrası başarılı bulunan PZR ürünleri kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan primerlar için PCR programları

PCR Kondisyonu	Segment		
	ND1 /16S		
	Sıcaklık (°C)	Süre	Tekrar Miktarı (Döngü)
Birinci denaturasyon	95	1 dak	1
Denaturasyon	95	1 dak	33
Annealing	60	1 dak	
Extension	70	2 dak	
Final extension	70	5 dak	1
Cyt-b			
Birinci denaturasyon	95	1 dak	1
Denaturasyon	95	1 dak	33
Annealing	50	0,45 dak	
Extension	70	1,5 dak	
Final extension	70	5 dak	1

2.3. Sekans Analizi

Sekans analizi öncesinde her bir örnek için toplam 100 µl'lik PZR ürünü elde edildi ve bu ürünün 5 µl'si kalite ve miktarını belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi üzerinde koşuruldu, zayıf ya da jelde hiç görünmeyen örnekler yeniden çoğaltıldı ve son olarak saflaştırma işlemi yapıldı. Jel üzerinde tek bant oluşturan ürünlerin saflaştırılması direkt PZR ürününün saflaştırması Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System, (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırma sonrasında 50 µl'ye sulandırılan saf DNA yine benzer şekilde agaroz jel üzerinde 1 µl koşutularak saflaştırma işleminin etkinliği ve elde edilen saf DNA'nın yoğunluğuna bakıldı. Elde edilen son ürün ile birlikte primerler Makrogen'e (Macrogen Inc.) gönderilerek Cyt-b ve 16S rRNA gen bölgeleri için ileri ve geri primerler kullanılarak çift yönlü dizilim okuması yapıldı.

2.4. Kesici Enzim Analizi

PZR ile yükseltgenmiş her bir mtDNA bölgesi önceki çalışmalarda kullanılmış ve polimorfik olarak gözlenmiş kesici enzimlerin (Fermentas) kullanımıyla kesildi. ND1 PZR ürünü 8 enzimle (*Hpa* II, *Hinf* I, *Hae* III, *Ava* II, *Bcn* I, *EcoR* I, *Rsa* I ve *Alu* I), 16S rRNA ve Cyt-b PZR ürünü 10 enzimle (*Hpa* II, *Hinf* I, *Hae* III, *Ava* II, *Alu* I, *Bcn* I, *EcoR* I, *Hin* III, *Rsa* I ve *Ssp* I) kesildi. Her bir enzim karışımı 25 µl olarak hazırlanmış ve tedarikçi

firmanın tavsiyesine göre yapılmıştır. Karışım 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra %2'lik agarozda yaklaşık olarak 10V/cm'de 2 - 3 saat koşturuldu. Jel görüntüleri jel dokümantasyon sistemi (Biostep, Darkhood DH-30/32) ve termal yazıcı (Mitsubishi, P91D) kullanılarak kayıt edildi. Amplifikasyona tabi tutulmuş ürünlerin her bir kesici enzim için oluşturduğu kesim parçacıklarının tümü büyük harflerle tek morf olarak isimlendirildi. ND1, 16S rRNA ve Cyt-b gen bölgeleri için kullanılan kesici enzimlerin her örnek için oluşturduğu morflar sırasıyla yan yana getirilerek birleşik genotipler (Haplotipler) oluşturuldu.

2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

2.5.1. Sekans Analizi

Bireysel sekansların hizalanması için MEGA 5.0 (Kumar vd., 2004) ve Bioedit (Hall, 1999) programlarının Clustel W seçeneği kullanılarak yapıldı. Diğer tür ve bölgelere ait örneklerin sekansları biyolojik bilgilerin toplandığı merkezden (NCBI: The National Center for Biotechnology Information) alınarak çalışmaya dahil edildi. Bu bağlamda *Umbrina canariensis* (EF392638, EF392637), *Argyrosomus regius* (EF455987, DQ197924), *Pseudotolithus senegallus* (DQ197987) ve *Umbrina cirrosa* (AF143198) sekansları kullanıldı. Dış grup seçerken ise türün çalışılan taksa ile ilişkili olmasına ve bu taksa sınıflanmaya başlamadan daha önceki zamanda ortak bir ataya sahip olmasına dikkat edildi.

Çoklu karşılaştırmada ilk olarak benzer olan sekanslar uzaklaştırıldı. Düzgün olan bütün sonuçlar yeniden kontrol edildikten sonra hizalanmış olan sekanslar filogenetik ağaçlar oluşturmak için kullanıldı.

Proteini kodlayan Cyt-b geninde stop kodonlarının olmadığından emin olmak için bu gen bölgesi aminoasit kodlara çevrildi. Hizalama işleminde kullanılan MEGA 5.0 (Kumar vd., 2004) ve Bioedit (Hall, 1999) programları ile nükleotid frekansları hesaplandı.

Sekans profilinin oluşturulmasında çoklu homolog sekansları hizalandı ve çoklu sekans hizalamasından elde edilen bilgilerin özetinin çıkarılması yapıldı. Çıkarılan profilin analizinde iki ana adım izlendi. Bunlardan ilkinde profil oluşturuldu ve ikincisinde ise sekansların ait olduğu veri tabanı veya tek sekans ile profilin karşılaştırılması yapıldı.

2.5.2. Haplotip ve Nükleotit Çeşitliliği

İlk olarak DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) programı kullanılarak türler arası ve tür içi haplotipler oluşturuldu. Bu şekilde elde edilen haplotiplerden haplotip çeşitliliği (Hd) değeri hesaplandı. Nükleotit çeşitliliği (Pi) ve nükleotit farklılığı (k) bu programla değerlendirildi.

2.5.3. Filogenetik Analiz, Evrimsel Model Seçimi ve Topoloji Oluşturma

Bir grubun evrimsel tarihi olarak adlandırılan filogeni tahmininde ilk adım filogenetik olarak bilgi verici karakterlerin seçimi ve ölçülmesi yapıldı. Bu çalışmada mtDNA Cyt-b gen bölgesi filogenetik çıkarsamada kullanılacak moleküler karakterlerin kaynağı oldu. Filogeni tahminindeki ikinci adım ise evrimsel tarihin grafik özetini veren filogenetik ağaçların oluşturuldu ve bu bağlamda eldeki verilerin analizinde parsimoni, maksimum olasılık ya da uzaklık metotlarından hangisinin en uygun olduğuna karar verildi.

MEGA 5.0 programı yardımı ile çalıştırılarak farklı olasılık modelleri arasından Akaike Information Criterion AIC (Akaike, 1974) ve BIC değerlerine göre model belirlendi. Hesaplanan parametrik değerler sabitlenerek bulgusal (heuristik) ML araması yürütüldü. Hesaplanan gamma düzeltme katsayısı ile bir NJ topolojisi oluşturuldu. Bunun için türler arasındaki filogenetik ilişkiler programı kullanılarak Kimura 2P mesafesine göre filogenetik ağaç oluşturma algoritmaları olan UPGMA ve NJ kullanıldı. Aynı zamanda MP metodu kullanılarak ağaçlar oluşturuldu ve karşılaştırıldı. Ağaç güvenilirliği için seç-bağla değeri 1000 olarak belirlendi ve ikinci defa oluşturulan ortak ağaçta nodların sahip olduğu değer %50 ve üzeri olarak belirlendi.

2.5.4. Genetik Farklılığın Belirlenmesi

Populasyonların genetik yapısı ilk olarak Cockerham (1973) tarafından tanımlanan ve daha sonra Weir ve Cockerham (1984) tarafından geliştirilen varyans analizi ile araştırıldı. Bunun için moleküler haplotipler arasındaki mutasyon miktarını dikkate alarak, diğer gen frekansı varyans analizi tekniklerinden ayrılan, fakat temelde benzerlik gösteren

bilgisayar programı ARLEQUIN (AMOVA, Excoffier vd., 1992)'de kullanılan moleküler varyans analizi yaklaşımı kullanıldı. Balıklarda türler ve populasyon grupları tanımlandıktan sonra genetik yapı test edildi. Varyansın hiyerarşik analizi gruplar veya populasyon arasındaki ve içindeki farklılıklardan dolayı toplam varyansı kovaryans bileşenlerine bölmüş ve bu varyans bileşenlerinin kullanımıyla fiksasyon indisleri hesaplanmıştır.

Permutasyon metodunun kullanımıyla varyans bileşenlerinin önemliliği test edilmiştir. Verilen “p” değeri tesadüfî olarak çok ekstrem varyans bileşenlerinin sahip olduğu olasılığı tahmin için değerlendirildi. Programda ayrıca çift yönlü F_{ST} değerleri hesaplandı. Cockerham (1973) tarafından açıklandığı gibi ölçüm F_{ST} 'den türetildi ve varyans bileşenlerinde olduğu gibi aynı yolla önemliliğin testinde kullanıldı. Bu çalışmada önemliliğin tahmini için 1000 permutasyon uygulandı.

2.5.5. Gen Akışının Hesaplanması

Genlerin oransal dağılımındaki değişimde etkili olan ve populasyonlar arası ve içindeki genlerin hareketi olarak tanımlanan gen akışı ARLEQUIN (Schneider vd., 2000) paket programı kullanılarak hesaplandı. Farklı şekillerde hesaplanabilen (etkili populasyon miktarı veya nadir ve özel allellerin kullanımı gibi) gen akışı bu çalışmada Wright (1951) tarafından geliştirilen ve doğal populasyonlar arasındaki genetik farklılığın seviyesinin göstergesi olan F_{ST} değerlerinden hesaplandı. Daha sonra bu eşitlik mtDNA verileri için modifiye edildi (Takahata ve Palumbi, 1985; Slatkin, 1995).

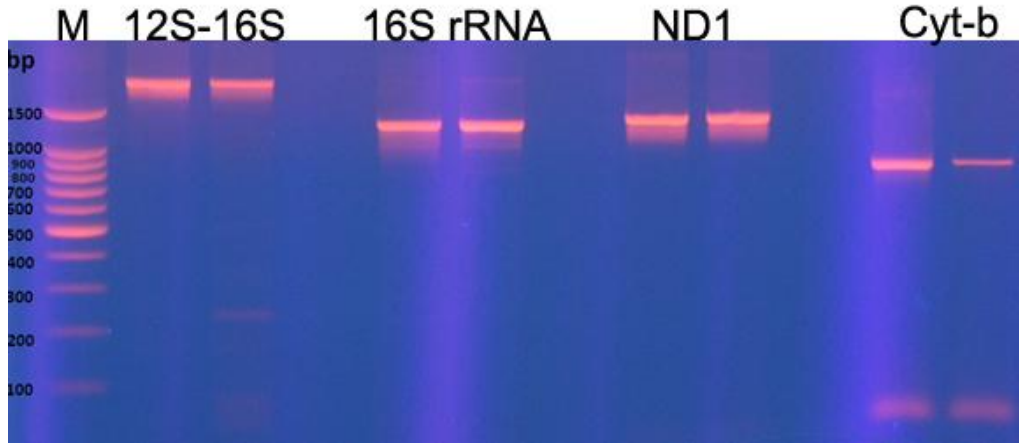
2.5.6. Kesim Şekillerinin Analizi

İşkine balığında PZR yoluyla yükseltgenen mtDNA gen bölgelerinin (Cyt-b, 16S rRNA ve ND1) kesilmesiyle, kesilmiş parça modelleri üretildi. Parça modellerinin önceki çalışmalarla uyumluluğundan emin olmak için sıralanmış yapılar “morflar” olarak adlandırıldı. Tüm enzimler için kesici enzim verileri toplandığında her bir birey için birleşik morflar veya birleşik haplotip numaraları belirlendi. Kesim modelleri yani morflar agaroz jel üzerinde ayrıştırıldı.

3. BULGULAR

3.1. DNA Eldesi ve Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Çeşitli gen bölgelerine ait elde edilen PZR ürünleri, parça boyları bilinen bir belirteçle (100bp'lık DNA boy belirteci) birlikte agaroz jel üzerinde yürütülerek parçacıkların ayrışması sağlanmıştır. Çoğaltılan gen bölgelerinin beklenen büyüklükleri Cyt-b için 800 bp, 16S rRNA sekansı için 1100 bp, RFLP için 12S-16S genleri 2300 bp ve ND1 için 1500 bp olarak belirlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. 12S-16S, 16S, ND1 ve Cyt-b gen bölgelerinin amplifikasyondan sonra agaroz jelde görüntülenmesi

3.2. Sekans Analizi

3.2.1. Çoklu Sekans Hizalama ve Sekans Profiline Çıkarılması

Cyt-b gen sekansı ışkine için 76, kötek için 104 olmak üzere toplam 180 örnekte ve 16S rRNA gen sekansı ise ışkine için 23 örnekte, kötek için 31 örnekte olmak üzere toplam 54 örnekte ileri (forward) ve geri (revers) primerleri kullanılarak çift yönlü belirlenmiştir. İlk olarak dizilim okumalarına ait grafiklerin gözle kontrolü yapılarak kendi içerisinde değerlendirilmesi yapılmıştır. Her bir yöndeki bireysel sekansların hizalanması ve çoklu hizalama işlemleri Bioedit (Hall, 1999) programlarının Clustel W seçeneği kullanılarak

Tablo 5'in devamı

mtDNA Tipi	Baz Çifti Yeri																	
	48	287	497	590	595	597	603	630	668	678	681	693	729	737	765	738	791	Sayı
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	1
H10	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	C	1
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	16
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	1
H13	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	.	.	1
H14	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	T	.	.	.	.	1
H15	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	T	.	.	C	5
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	1
H17	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	.	.	1
H18	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	T	C	.	.	1
H19	.	C	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	1
H20	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	.	C	1

Tablo 6. Kötek mtDNA Cyt-b haplotiplerinin populasyonlara göre dağılımı

Haplotipler	Haplotip Adı	Akdeniz			Karadeniz			Kültür	Toplam
		Adana	Antalya	Muğla	Trabzon	Rize	Artvin		
H1	H1	10	2	14	-	1	2	-	29
H2	H2	11	2	1	-	4	7	7	32
H3	Akd1	3	1	-	-	-	-	-	4
H4	Adn1	1	-	-	-	-	-	-	1
H5	Adn2	1	-	-	-	-	-	-	1
H6	H6	-	-	-	-	-	-	1	1
H7	H7	-	1	1	-	1	-	1	4
H8	Ant1	-	1	-	-	-	-	-	1
H9	Ant2	-	1	-	-	-	-	-	1
H10	H10	-	-	5	-	5	6	-	16
H11	Mgl1	-	-	1	-	-	-	-	1
H12	Mgl2	-	-	1	-	-	-	-	1
H13	Trb1	-	-	-	1	-	-	-	1
H14	Trb2	-	-	-	5	-	-	-	5
H15	Rz1	-	-	-	-	1	-	-	1
H16	Rz2	-	-	-	-	1	-	-	1
H17	Art1	-	-	-	-	-	1	-	1
H18	Art2	-	-	-	-	-	1	-	1
H19	Art3	-	-	-	-	-	1	-	1
H20	Art4	-	-	-	-	-	1	-	1
	Toplam	26	8	23	6	13	19	9	104

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Rz: Rize; Grs: Giresun; Mgl: Muğla; Ant: Antalya; Adn: Adana; Akd: Akdeniz

Tablo 7. İşkine Cyt-b haplotip sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotit yerleri ve gözlenen haplotip sayısı

[illegible]

Tablo 8. Kötek Cyt-b sekans verilerinden hesaplanan haplotipler arası genetik mesafe (K2P).

	Hap1	Hap2	Akd1	Adn1	Adn2	Hap6	Hap7	Ant1	Ant2	Hap10	Mgl1	Mgl2	Trb1	Trb2	Rz1	Rz2	Art1	Art2	Art3
Hap1																			
Hap2	0,176																		
Hap3(Akd1)	0,059	0,235																	
Hap4(Adn1)	0,235	0,059	0,294																
Hap5(Adn2)	0,294	0,118	0,353	0,176															
Hap6	0,118	0,294	0,059	0,353	0,412														
Hap7	0,059	0,235	0,118	0,294	0,353	0,059													
Hap8(Ant1)	0,059	0,235	0,118	0,294	0,353	0,176	0,118												
Hap9(Ant2)	0,059	0,235	0,059	0,294	0,353	0,118	0,118	0,118											
Hap10	0,235	0,059	0,294	0,118	0,176	0,235	0,176	0,294	0,294										
Hap11(Mgl1)	0,118	0,294	0,176	0,353	0,412	0,235	0,176	0,176	0,176	0,353									
Hap12(Mgl2)	0,059	0,235	0,118	0,294	0,353	0,176	0,118	0,118	0,118	0,294	0,059								
Hap13(Trb1)	0,118	0,176	0,176	0,235	0,294	0,235	0,176	0,176	0,176	0,235	0,235	0,176							
Hap14(Trb2)	0,235	0,059	0,294	0,118	0,176	0,353	0,294	0,294	0,294	0,118	0,353	0,294	0,118						
Hap15(Rz1)	0,294	0,118	0,353	0,176	0,235	0,294	0,235	0,353	0,353	0,059	0,412	0,353	0,294	0,176					
Hap16(Rz2)	0,059	0,235	0,118	0,294	0,353	0,118	0,059	0,118	0,118	0,235	0,176	0,118	0,176	0,294	0,294				
Hap17(Art1)	0,235	0,059	0,176	0,118	0,176	0,235	0,294	0,294	0,235	0,118	0,353	0,294	0,235	0,118	0,176	0,294			
Hap18(Art2)	0,353	0,294	0,294	0,353	0,412	0,235	0,294	0,412	0,353	0,235	0,471	0,412	0,353	0,353	0,294	0,353	0,235		
Hap19(Art3)	0,294	0,118	0,353	0,176	0,235	0,412	0,353	0,353	0,353	0,176	0,412	0,353	0,294	0,176	0,235	0,353	0,176	0,412	
Hap20(Art4)	0,294	0,118	0,235	0,176	0,235	0,176	0,235	0,353	0,294	0,059	0,412	0,353	0,294	0,176	0,118	0,294	0,059	0,176	0,235

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Rz: Rize; Grs: Giresun; Mgl: Muğla; Ant: Antalya; Adn: Adana

Şekil 7. İşkine Cyt-b haplotiplerinden oluşturulan dendrogram

Tablo 9. İşkine Cyt-b haplotipleri ve Populasyonlara göre dağılımı

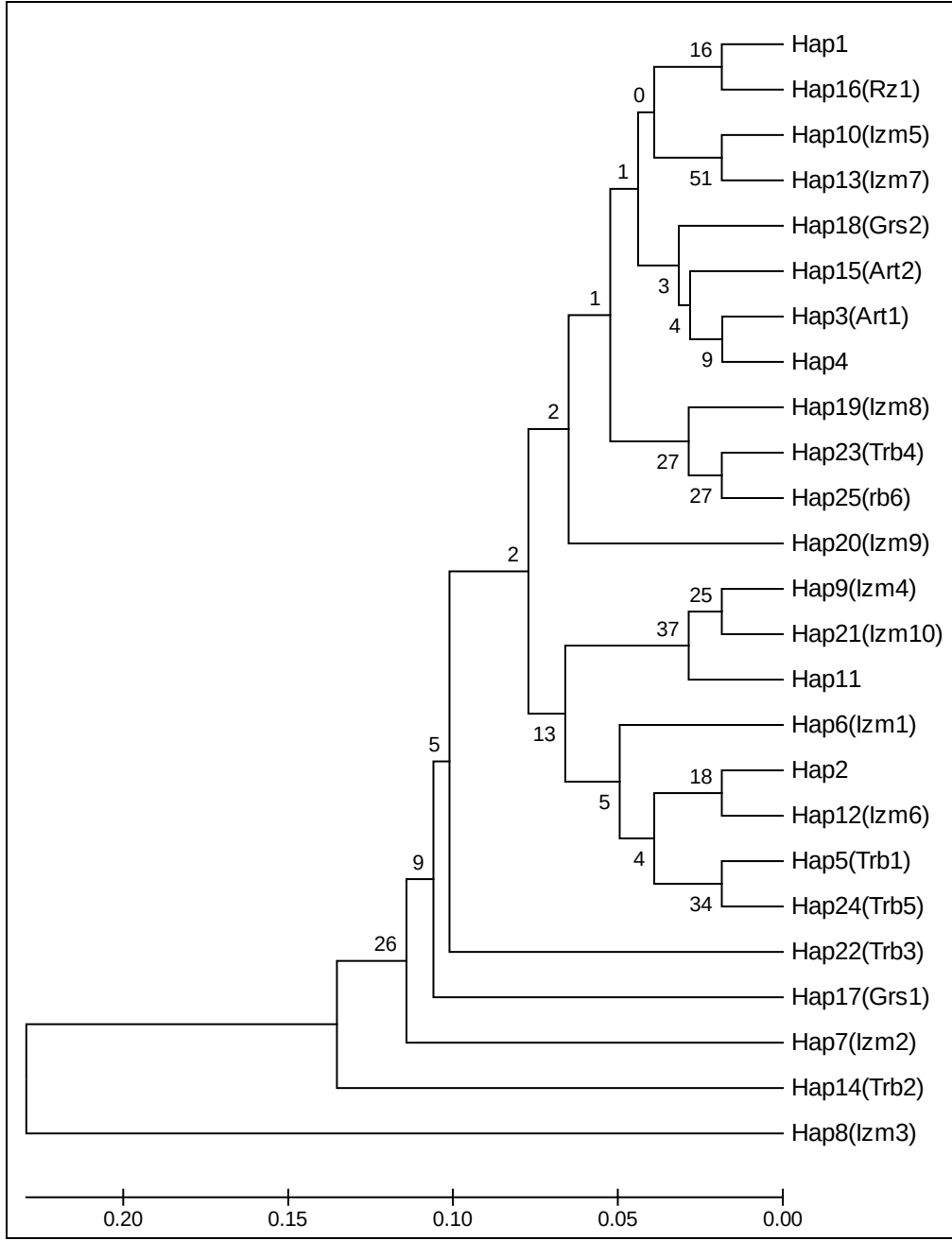
mtDNA Tipleri	Haplotip Adı	Karadeniz				Ege	Toplam (76)
		Giresun (4)	Trabzon (22)	Rize (8)	Artvin (16)	İzmir (26)	
H1	H1	-	5	3	3	3	14
H2	H2	-	-	-	1	1	2
H3	Art1	-	-	-	3	-	3
H4	H4	2	7	3	7	8	27
H5	Trb1	-	1	-	-	1	2
H6	Izm1	-	-	-	-	1	1
H7	Izm2	-	-	-	-	1	1
H8	Izm3	-	-	-	-	1	1
H9	Izm4	-	-	-	-	2	2
H10	Izm5	-	-	-	-	1	1
H11	H11	-	1	1	1	1	4
H12	Izm6	-	-	-	-	2	2
H13	Izm7	-	-	-	-	1	1
H14	Trb2	-	1	-	-	-	1
H15	Art2	-	-	-	1	-	1
H16	Rz1	-	-	1	-	-	1
H17	Grs1	1	-	-	-	-	1
H18	Grs2	1	-	-	-	-	1
H19	Izm8	-	-	-	-	1	1
H20	Izm9	-	-	-	-	1	1
H21	Izm10	-	-	-	-	1	1
H22	Trb3	-	1	-	-	-	1
H23	Trb4	-	4	-	-	-	4
H24	Trb5	-	1	-	-	-	1
H25	Trb6	-	1	-	-	-	1

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Rz: Rize; Grs: Giresun; Mgl: Muğla; Ant: Antalya; Adn: Adana

Tablo 10. İşkine Cyt-b sekans verilerinden hesaplanan haplotipler arası genetik mesafe

	Hap1	Hap2	Art1	Hap4	Trb1	İzm1	İzm2	İzm3	İzm4	İzm5	Hap11	İzm6	İzm7	Trb2	Art2	Rz1	Grs1	Grs2	İzm8	İzm9	İzm10	Trb3	Trb4	Trb5	Rz6
Hap1																									
Hap2	0,077																								
Hap3(Art1)	0,075	0,075																							
Hap4	0,037	0,037	0,037																						
Hap5(Trb1)	0,077	0,077	0,162	0,121																					
Hap6(İzm1)	0,077	0,077	0,162	0,121	0,077																				
Hap7(İzm2)	0,212	0,117	0,207	0,162	0,212	0,212																			
Hap8(İzm3)	0,372	0,372	0,364	0,310	0,527	0,527	0,431																		
Hap9(İzm4)	0,168	0,077	0,162	0,121	0,168	0,168	0,212	0,527																	
Hap10(İzm5)	0,077	0,077	0,075	0,037	0,168	0,168	0,212	0,372	0,168																
Hap11	0,121	0,121	0,212	0,168	0,121	0,121	0,268	0,628	0,037	0,221															
Hap12(İzm6)	0,121	0,037	0,117	0,077	0,037	0,121	0,162	0,444	0,121	0,121	0,168														
Hap13(İzm7)	0,037	0,121	0,117	0,077	0,121	0,121	0,268	0,444	0,221	0,037	0,168	0,168													
Hap14(Trb2)	0,159	0,254	0,252	0,204	0,254	0,254	0,431	0,655	0,372	0,254	0,310	0,310	0,204												
Hap15(Art2)	0,077	0,077	0,075	0,037	0,168	0,168	0,212	0,372	0,168	0,077	0,221	0,121	0,121	0,254											
Hap16(Rz1)	0,037	0,121	0,117	0,077	0,121	0,121	0,268	0,444	0,221	0,121	0,168	0,168	0,077	0,204	0,121										
Hap17(Grs1)	0,159	0,159	0,159	0,116	0,259	0,259	0,310	0,423	0,259	0,159	0,318	0,207	0,207	0,304	0,159	0,207									
Hap18(Grs2)	0,077	0,077	0,075	0,037	0,168	0,168	0,212	0,372	0,168	0,077	0,221	0,121	0,121	0,254	0,077	0,121	0,159								
Hap19(İzm8)	0,077	0,077	0,075	0,037	0,168	0,168	0,212	0,372	0,168	0,077	0,221	0,121	0,121	0,254	0,077	0,121	0,159	0,077							
Hap20(İzm9)	0,117	0,117	0,116	0,075	0,212	0,212	0,159	0,431	0,212	0,117	0,268	0,162	0,162	0,305	0,117	0,117	0,204	0,117	0,117						
Hap21(İzm10)	0,121	0,037	0,117	0,077	0,121	0,121	0,162	0,444	0,037	0,121	0,077	0,077	0,168	0,310	0,121	0,168	0,207	0,121	0,121	0,162					
Hap22(Trb3)	0,116	0,207	0,117	0,159	0,207	0,207	0,372	0,578	0,318	0,207	0,259	0,259	0,159	0,304	0,207	0,159	0,305	0,207	0,207	0,254	0,259				
Hap23(Trb4)	0,037	0,121	0,117	0,077	0,121	0,121	0,268	0,444	0,221	0,121	0,168	0,168	0,077	0,204	0,121	0,077	0,207	0,121	0,037	0,162	0,168	0,159			
Hap24(Trb5)	0,121	0,121	0,212	0,168	0,037	0,121	0,268	0,628	0,221	0,221	0,168	0,077	0,168	0,310	0,221	0,168	0,318	0,221	0,121	0,268	0,168	0,259	0,077		
Hap25(rz6)	0,077	0,168	0,162	0,121	0,168	0,168	0,331	0,527	0,280	0,168	0,221	0,221	0,121	0,254	0,168	0,121	0,259	0,168	0,077	0,212	0,221	0,116	0,037	0,121	

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Rz: Rize; Grs: Giresun; Mgl: Muğla; Ant: Antalya; Adn: Adana

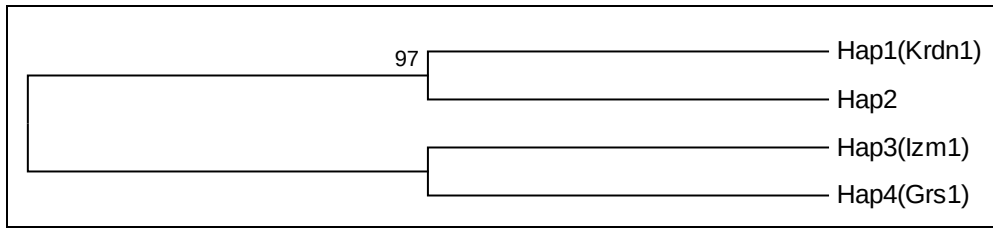


Şekil 8. İşkine Cytb haplotip verilerinden oluşturulan UPMG ağacı

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Rz: Rize; Grs: Giresun; Mgl: Muğla; Ant: Antalya; Adn: Adana

Tablo 11. İşkine 16S rRNA haplotip sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotit yerleri ve gözlenen haplotiplerin popülasyonlardaki sayısı

mtDNA Tipleri	Baz Çifti Yeri			Karadeniz			Ege	TOPLAM (N=23)
	75	80	741	Artvin (N=8)	Trabzon (N=5)	Giresun (N=8)	İzmir (N=2)	
H1	A	C	G	3	1	2		6
H2	G	.	.	5	4	5	1	15
H3	G	.	A	-	-	-	1	1
H4	G	T	-	-	-	1	-	1



Şekil 9. İşkine 16S rRNA haplotip dendogramı

Krd: Karadeniz; İzm: İzmir; Grs: Giresun

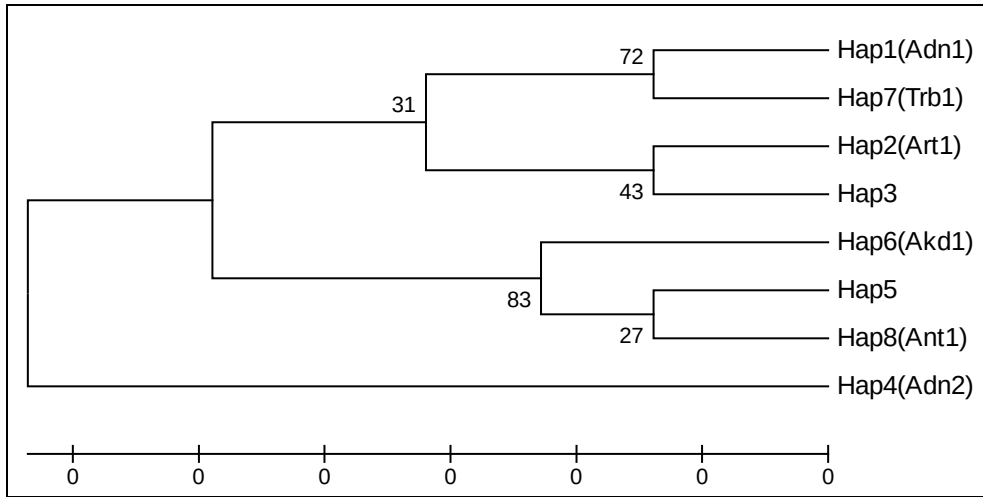
Tablo 12. Köték 16S rRNA haplotip sekansların da farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotit yerleri ve gözlenen haplotiplerin popülasyonlardaki sayısı

mtDNA Tipleri	Baz Çifti Yeri								Karadeniz			Akdeniz		Ege	TOPLAM (N=22)
	371	394	416	417	991	994	997	999	Rize (N=5)	Trabzon (N=1)	Artvin (N=3)	Adana (N=7)	Antalya (N=4)	Muğla (N=5)	
Adn1	C	A	A	A	C	T	T	G				1			1
Art1	.	C	.	G	.	.	.	.			1				1
H3	.	.	.	G	.	.	.	.			2	3	2	4	9
Adn2	.	.	.	G	.	.	G	T				1			1
H5	.	.	.	G	T	.	.	.	5			1		1	7
Akd1	.	.	.	G	T	G	.	.				1	1		1
Trb1	.	.	C	.	.	.	.	.		1					1
Ant1	G	C	.	G	T	.	.	.					1		1

Tablo 13. Kötek 16S rRNA sekans verilerinden hesaplanan haplotipler arası genetik mesafe (K2P).

	Adn1	Art1	Hap3	Adn2	Hap5	Akd1	Trb1	Ant1
Hap1 (Adn1)								
Hap2 (Art1)	0,307							
Hap3	0,144	0,139						
Hap4 (Adn2)	0,520	0,582	0,317					
Hap5	0,347	0,307	0,144	0,520				
Hap6 (Akd1)	0,562	0,520	0,307	0,837	0,139			
Hap7 (Trb1)	0,139	0,520	0,307	0,837	0,562	0,867		
Hap8 (Ant1)	0,562	0,520	0,307	0,837	0,139	0,317	0,867	

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Akd: Akdeniz; Ant: Antalya; Adn: Adana



Şekil 10. Kötek 16S rRNA haplotiplerinden oluşturulmuş haplotip dendrogramı

H1: Haplotip; Art: Artvin; Trb: Trabzon; Akd: Akdeniz; Ant: Antalya; Adn: Adana

3.3.2. Haplotip Çeşitliliği (Hd)

Çalışılan gen bölgelerine ait haplotip çeşitliliği %52,6-83,8 bulunmuştur. Haplotip çeşitliliğine ait yüzde (%) frekans değerleri Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. Kötek ve işkine Cyt-b ve 16s rRNA genlerinin % haplotip çeşitliliği, varyansı ve standart sapması

Türler	Haplotip Çeşitliliği (Hd x 100)	N	Varyans Sd	
			(V _{Hd})	(Hd±Sd)
kötek-Cyt-b	80,5	104	0,00055	0,023
İşkine-Cyt-b	83,8	76	0,00118	0,034
kötek -16S rRNA	73,6	22	0,00818	0,09
İşkine- 16S rRNA	52,6	23	0,00898	0,095

3.4. Nükleotit Verilerinin Analizi

3.4.1. Nükleotit Dağılımı

Kötek Cyt-b gen bölgesinin nükleotid verileri 104 örneğe ait 793 bazlık kısmi sekanslar kullanılarak hesaplanmıştır. Transisyon/transversiyon oranları $k_1 = 18.214$ (pürinler) ve $k_2 = 12.047$ (pirimidinler) bulunmuştur ve genel transisyon/transversiyon sapma oranı ise $R = 7.492$ dür. İşkine Cyt-b gen bölgesinin nükleotid verileri 76 örneğe ait 792 bazlık kısmi sekanslar kullanılarak hesaplanmıştır. Transisyon/transversiyon oranları $k_1 = 9.578$ (pürin) ve $k_2 = 8.428$ (pirimidinler) ve genel transisyon/transversiyon sapma oranı ise $R = 4.84$ olarak hesaplanmıştır.

İşkine 16S rRNA gen bölgesinin nükleotit verileri 23 örneğe ait 947 bazlık kısmi sekanslar kullanılarak hesaplanmıştır. Transisyon/transversiyon oran oranı $k_1 = 1000$ (pürinler) ve $k_2 = 218.848$ (pirimidinler) olarak hesaplanmıştır. Genel transisyon/transversiyon sapması ise $R = 306.886$ 'dır. Kötek 16S rRNA gen bölgesinin nükleotid verileri 22 örneğe ait 864 bp'lik kısmi sekanslar kullanılarak hesaplanmıştır. Transisyon/transversiyon oranları $k_1 = 0.935$ (pürinler) ve $k_2 = 2.928$ (pirimidinler) ve genel transisyon/transversiyon sapma oranı ise $R = 0.896$ olarak bulunmuştur. (Tablo 15).

Tablo 15. Farklı genlere göre % nükleotit frekansları ve transisyon/transversiyon (T_s/T_v) oranı

Tür	Genler	Nükleotidler				%AT
		T	C	A	G	
Kötek	Cyt-b	26,5	35,9	23,2	14,3	49,7
İşkine	Cyt-b	27,2	35,3	22,0	15,6	49,2
İşkine	16S rRNA	19,1	27,6	34,6	18,8	53,7
Kötek	16S rRNA	20,6	26,8	31,9	21,3	52,5

3.4.2. Nükleotit Çeşitliliği (Pi)

İşkine ve Kötek balığında nükleotid çeşitliliği (Pi) ve nükleotid farklılığı (k) *Cyt-b* genin için sırası ile %2,97 ve %2,87 arasında, 16S rRNA geni için ise sırası ile %1,54 ile %0,61 olarak bulunmuştur. Ayrıca sinonim ve sinonim olmayan pozisyonlar belirlenmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. İşkine ve kötek balığında *Cyt-b* ve 16S rRNA genlerinin nükleotid çeşitliliği, nükleotid farklılığı, sinonim ve sinonim olmayan farklılık sayıları ve pozisyonları

	Kötek cyt-b	İşkine cyt-b	İşkine-16S rRNA	Kötek 16S rRNA
Nükleotid Çeşitliliği (Pi)	0,00297	0,00287	0,00061	0,00154
Nükleotid Farklılığı (k)	2,35	2,27	0,577	1,329
Farklılaşan yer sayısı	17	28	3	5
Sinonim farklılık sayısı	10	17	1	3
Sinonim farklılık pozisyonları	48, 497, 590, 595, 597, 603, 678, 693, 729, 783	179, 199, 327, 355, 681, 692, 726, 732, 739, 757, 760, 763, 780, 789, 751, 754, 786	75	371, 394, 416, 997, 999
Sinonim olmayan farklılık sayısı	7	11	2	3
Sinonim olmayan farklılık pozisyonları	281, 668, 681, 737, 758, 765, 791	17, 158, 276, 411, 628, 654, 709, 729, 737, 766, 792	80, 741	417, 991, 994

İşkine *Cyt-b* içerisinde görülen sekans farklılığı 28-30 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir. Bunlardan 19 tanesi transisyon ve 11 tanesinin de transversiyon

olarak değiştiği görülmüştür. Transisyon değişimlerin 7 tanesi A→G (199, 327, 411, 628, 709, 739, 751) ve 12 tanesinin C→T (17, 158, 276, 654, 681, 692, 729, 737, 754, 760, 786, 792) arasında olduğu tespit edilmiştir. Transversiyon değişimlerin 11 adet görülmüştür; 2 tanesi A→T (751,754) ve 2 tanesi T→G (179-355), 2 tanesi C→G (726-763) ve 5 tanesi C→A (732, 757, 766, 780, 789) olarak belirlenmiştir. Ts/Tv oranı 19:11 olarak bulunmuştur.

Kötek Cyt-b içerisinde görülen sekans farklılığı 17-18 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir. Bunlardan 11 tanesi transisyon ve 7 tanesinin de transversiyon olarak değiştiği görülmüştür. Transisyon değişimlerin 7 tanesi A→G (597, 603, 668, 681, 693, 729, 765) ve 4 tanesinin C→T (48, 287, 737, 791) arasında olduğu tespit edilmiştir. Toplam 7 adet transversiyon değişimlerinin 4 tanesi A→T (497, 590, 595, 791) , 1 tanesi T→G (678) ve 2 tane C→A (765,738) olarak belirlenmiştir. Ts/Tv oranı 18:7 olarak bulunmuştur.

İşkine 16S rRNA içerisinde görülen sekans farklılığı 3 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir. Bunların hepsi transisyon olarak değiştiği görülmüştür. Transisyon değişimlerin 1 tanesi C→T (80) ve 2 tanesinin A→G (75, 741) arasında olduğu tespit edilmiştir. Ts/Tv oranı 3:0 olarak bulunmuştur.

Kötek 16S rRNA içerisinde görülen sekans farklılığı 8 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir. Bunlardan 2 tanesi transisyon ve 6 tanesinin de transversiyon olarak değiştiği görülmüştür. Transisyon değişimlerin 1 tanesi A→G (416) ve 2 tanesinin C→T (371, 991) arasında olduğu tespit edilmiştir. Toplam 6 adet Transversiyon değişimlerinin 3 tanesi T→G (994, 997, 999) ve 2 tane C→A (394, 416) ve 1 tanesi C→G (371) belirlenmiştir. Ts/Tv oranı 2:6 olarak bulunmuştur.

3.4.3. Populasyon İçi ve Populasyonlar Arası Genetik Farklılıklar

Kötek cyt-b haplotip frekanslarından yapılan moleküler varyans analizi sonucunda varyasyonun %81,12'lik çok büyük bir kısmı grup içi arasında dağıldığı görülmüş ve bu oran istatistik  olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$) (Tablo 17). Gruplar arası varyasyon ise %18,88 olarak bulunmuştur. Tüm populasyonlar arasında Fst değeri 0,18881 olarak hesaplanmıştır.

Kötek balığının populasyon içi ve populasyonlar arası pairwise farklılık değerleri ve gen akış oranı hesaplanmıştır (Tablo 18,19,20).

Tablo 17. AMOVA analizi sonuçları (Kimura 2-P).

Varyasyon Kaynağı	d.f.	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyasyonun Yüzdesi
Gruplar Arası	6	8,743	0,07851 Va	18,88
Gruplar içi	97	32,719	0,33731 Vb	81,12
Toplam	103	41,462	0,41582	
Bağılılık İndeksi	F _{ST} :	0,18881		

Tablo 18. Kötek balığının populasyon içi ve populasyonlar arası F_{ST} değerleri ve üste italik P değerleri (Kimura 2-P).

	Adana	Antalya	Muğla	Trabzon	Rize	Artvin	Kültür
Adana	0,00000	0.39640	0.00901	0.00000	0.00000	0.00000	0.06306
Antalya	-0,01546	0,00000	0.03604	0.00000	0.24324	0.21622	0.05405
Muğla	0.14048	0.10605	0,00000	0.00000	0.00910	0.00000	0.00000
Trabzon	0.42859	0.34320	0.48341	0,00000	0.00000	0.00000	0.00901
Rize	0.12575	0.04079	0.19133	0.38577	0,00000	0.92793	0.03604
Artvin	0.08920	0.03618	0.18970	0.37687	-0.04235	0,00000	0.03604
Kültür	0.15227	0.15781	0.44714	0.61810	0.17822	0.13218	0,00000

Tablo 19. Kötek Cyt-b populasyonlar arası pairwise farklılık (PİXY-üsde), çapraz populasyon içi pairwise ortalama farklılık ve düzeltilmiş ortalama pairwise farklılık (Kimura 2-P).

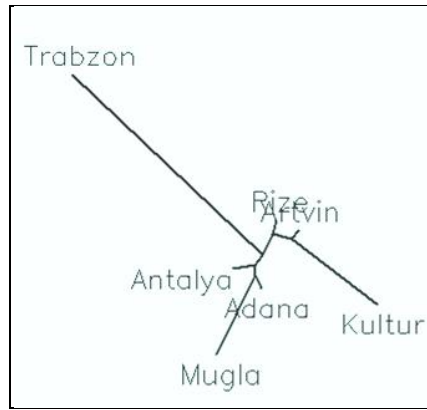
	Adana	Antalya	Muğla	Trabzon	Rize	Artvin	Kültür
Adana	0,68308	0,78365	0,74749	1,00000	0,84024	0,80364	0,67094
Antalya	-0,02217	0,92857	0,83152	1,00000	0,89423	0,88158	0,79167
Muğla	0,10556	0,06684	0,60079	1,00000	0,85284	0,85126	0,96135
Trabzon	0,49179	0,36905	0,53294	0,33333	1,00000	1,00000	1,00000
Rize	0,10126	0,03251	0,15501	0,43590	0,79487	0,75709	0,75214
Artvin	0,07029	0,02548	0,15905	0,44152	-0,03216	0,78363	0,71345
Kültür	0,12107	0,11905	0,45262	0,62500	0,14637	0,11330	0,41667

Tablo 20. Kötek Cyt-b populasyonlar arası düzeltilmiş ortalama pairwise farklılığın p değeri

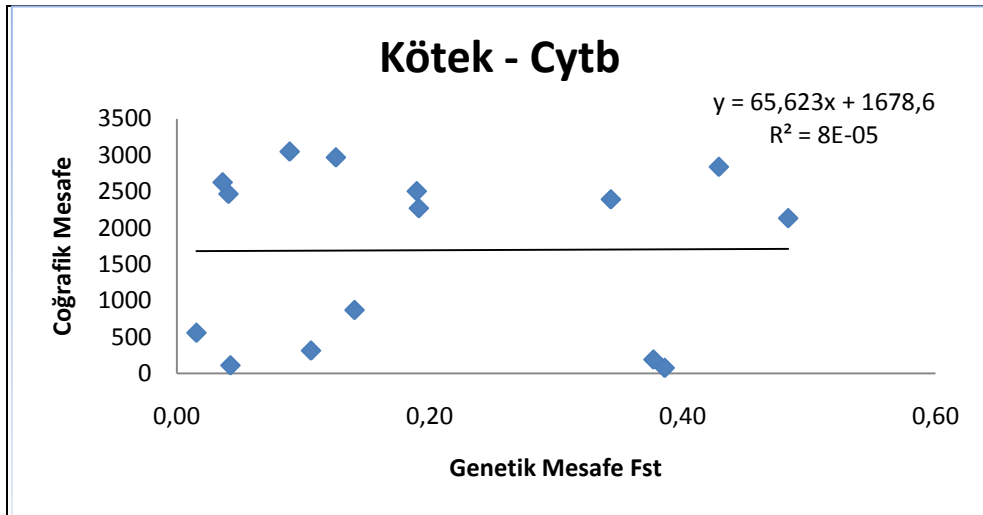
	Adana	Antalya	Muğla	Trabzon	Rize	Artvin	Kültür
Adana							
Antalya	0.06364						
Muğla	0,00909	0,02727					
Trabzon	0,00000	0,00909	0,00000				
Rize	0,00000	0,17273	0,00000	0,00000			
Artvin	0,01818	0,10000	0,00000	0,00000	0,90909		
Kültür	0,47273	0,05455	0,00000	0,00909	0,10000	0,42727	

Tablo 21. Kötek Cyt-b verileri populasyonlar arası (göç) gen akış oranı

	Adana	Antalya	Muğla	Trabzon	Rize	Artvin	Kültür
1							
2	inf						
3	3.05922	4.21456					
4	0.66661	0.95688	0.53432				
5	3.47604	11.75922	2.11329	0.79610			
6	5.10528	13.32169	2.13581	0.82673	inf		
7	2.78355	2.66834	0.61822	0.30892	2.30546	3.28262	



Şekil 11. Kötek Cyt-b geni populasyonları pairwise mesafelerden oluşturulan dendrogramı



Şekil 12. Kötek Cyt-b sekans verilerinde elde edilen Fst değerleri ile coğrafik mesafe arasındaki ilişki

İşkine Cyt-b haplotip frekanslarından yapılan moleküler varyans analizi sonucunda varyasyonun % 92,64'lik çok büyük bir kısmı grup içi arasında dağıldığı görülmüş ve bu oran çok önemli bulundu ($P < 0.001$). Gruplar arası varyasyon ise % 7,36 olarak bulundu. Tüm populasyonlar arasında F_{ST} değeri 0.07364 olarak hesaplandı (Tablo 22).

İşkine Cyt-b populasyon içi (çapraz-kalın) ve populasyonlar arası (altta) F_{ST} değerleri ve P değerleri. populasyonlar arası çiftli farklılık (PİXY-üste), populasyon içi pairwise ortalama farklılık (çapraz) ve düzeltilmiş ortalama pairwise farklılık değerleri hesaplanmıştır (Tablo 23,24,25).

Tablo 22. AMOVA analizi sonuçları (Kimura 2-P).

Varyasyon Kaynağı	d.f.	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyasyonun Yüzdesi
Gruplar Arası	4	10,752	0,10083 Va	7,36
Gruplar içi	71	90,062	1,26848 Vb	92,64
Toplam	75	100,814	1,36931	
Bağıllık İndeksi	FST :	0,07364		

Tablo 23. İşkine Cyt-b populasyon içi (çapraz-kalın) ve populasyonlar arası (altta) F_{ST} değerleri ve P değerleri (üste-italik) (Kimura 2-P).

	Rize	Artvin	Trabzon	İzmir	Giresun
Rize	0,09693	0,21622	0,59459	0,22523	0,04505
Artvin	0,05345	0,10073	0,00901	0,27027	0,17117
Trabzon	-0,01878	0,11026	0,07261	0,00000	0,00000
İzmir	0,01673	0,00702	0,10868	0,04760	0,24324
Giresun	0,21647	0,11033	0,21767	0,05011	0,09355

Tablo 24. İşkine Cyt-b populasyonlar arası çiftli farklılık (PİXY-üste), populasyon içi pairwise ortalama farklılık (çapraz) ve düzeltilmiş ortalama pairwise farklılık (altta) (Kimura 2-P).

	Rize	Artvin	Trabzon	İzmir	Giresun
Rize	1.74950	1.69844	2.12441	2.72260	2.46622
Artvin	0.08012	1.48713	2.27248	2.50693	1.97363
Trabzon	-0.01112	0.26814	2.52156	3.35255	3.08692
İzmir	0.12770	0.04321	0.37161	3.44031	3.13185
Giresun	0.48976	0.12835	0.72443	0.30999	2.20342

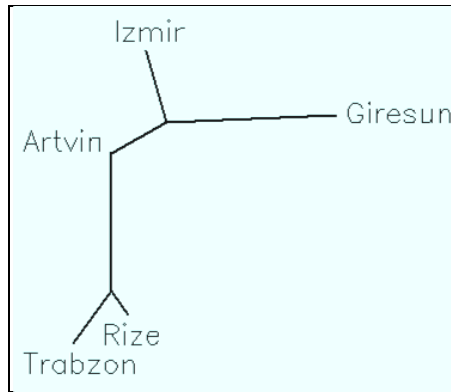
Tablo 25. İşkine Cyt-b populasyonlar arası düzeltilmiş ortalama pairwise farklılığın p değeri

	Rize	Artvin	Trabzon	İzmir	Giresun
Rize					
Artvin	0,17273				
Trabzon	0,76364	0,24545			
İzmir	0,77273	0,93636	0,00909		
Giresun	0,20000	0,37273	0,27273	0,51818	

İşkine Cyt-b sekans verileri gen akışı her bir jenerasyon için hesaplanan değerler Tablo 26’da verilmiştir.

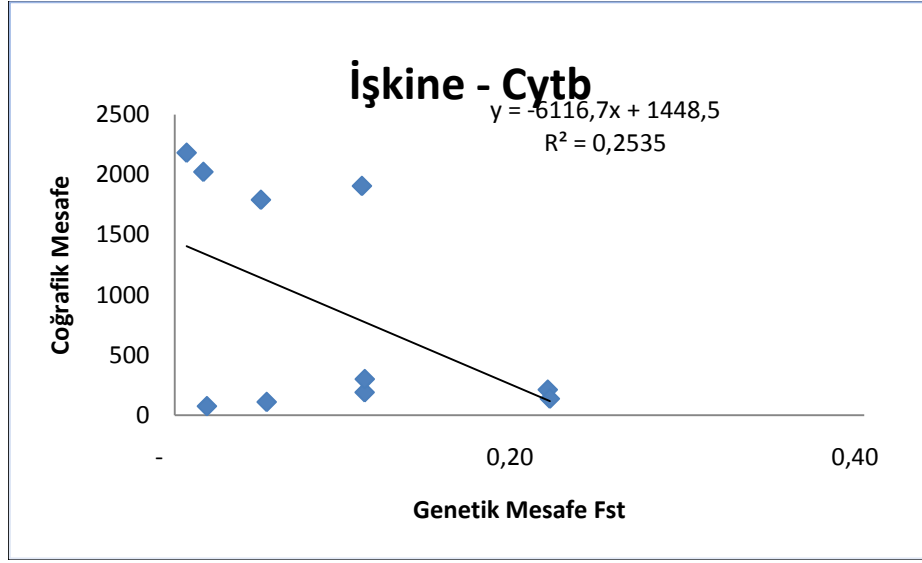
Tablo 26. İşkine Cyt-b verileri popülasyonlar arası (göç) gen akış oranı

	Rize	Artvin	Trabzon	İzmir	Giresun
Rize					
Artvin	inf				
Trabzon	inf	55,22			
İzmir	inf	617,03	144,13		
Giresun	64,00	inf	115,33	inf	



Şekil 13. İşkine Cyt-b geni popülasyonları pairwise mesafelerden oluşturulan dendogramı

Coğrafi mesafe ile genetik mesafe arasındaki ilişki belirlenerek grafikte verilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. İşkine Cyt-b sekans verilerinde elde edilen Fst değerleri ile coğrafik mesafe arasındaki ilişki

3.4.4. Filogenetik Analizler

En uygun modelin belirlenmesi için MEGA 5.0 programı kullanılarak Akaike bilgi kriterlerine (AIC) göre farklı modeller arasından Cyt-b için GTR+G ve 16S rRNA geni için ise HKY+ G modeli seçilmiştir. Belirlenen model ve teste ait parametreler Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27. Veriler için hesaplanan model ve testlere ait parametreler

Gen	Model	-ln L	Ω	P inv.	AIC
Kötek Cyt-b	GTR+G	-1269.604	0,05	n	4916.715
İşkine Cyt-b	HKY+G+I	-1356,188	0,05	0,48	3023,18
İşkine16s rRNA	TN93	-1304.046	0,05	n	2704.308
Kötek16s rRNA	HKY+G	-1721.374	0.05	n	3554.974

Hesaplanan gamma (Ω) değeri küçük bulunmuştur ve bu da değişim gözlenen yerlerin çoğunun çok yavaş değiştiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. MEGA 5.0 programı kullanılarak sekanslarda, bazların herhangi birine doğru bir eğilim olup olmadığı kontrol edilmiştir. Diğer bir değişle baz frekanslarının sabitliğinin bozulması kontrol edilmiş ve bunun olmadığı görülmüştür ($\chi^2 = 7$, sd = 81, P=1.00). Bu sonuca göre bireylerin baz

frekansları arasında her hangi bir eğilim bulunmamaktadır. Bu parametrelerin hesaplanmasından sonra filogenetik ağacın oluşturulması aşamasına geçilmiştir.

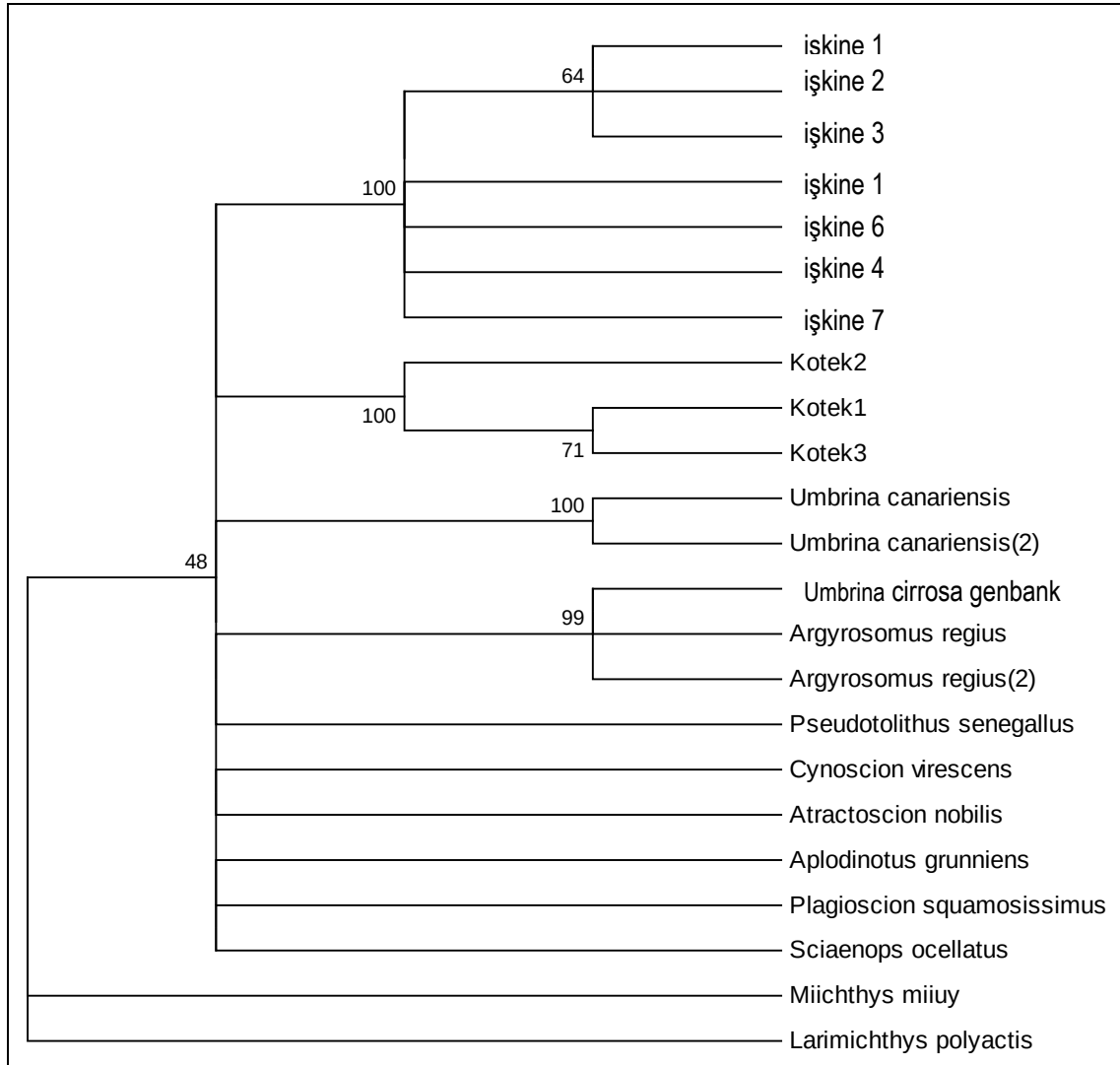
3.4.4.1. Filogenetik Yapılanma

Filogenetik topolojilerin yapılandırılmasında hesaplanan gamma değeri MEGA 5 (Kumar vd., 2007) programında kullanılarak her bir metot için ayrı ayrı uygulandı. Gerek seç - bağla gerekse iç dal testi (interior branch test) yapılarak nodların tutarlılığı belirlendi ve seç - bağla değeri %50 den daha büyük nodlar görüntülendi. Veri setinden yeniden örnekleme yöntemi ile 1000 kez ağaç oluşturuldu ve tüm ağaçlar içerisinde ortak ağaçlar elde edildi. Dendogramda ağaç içerisinde her bir kolunun üzerinde seç-bağla değerleri verildi.

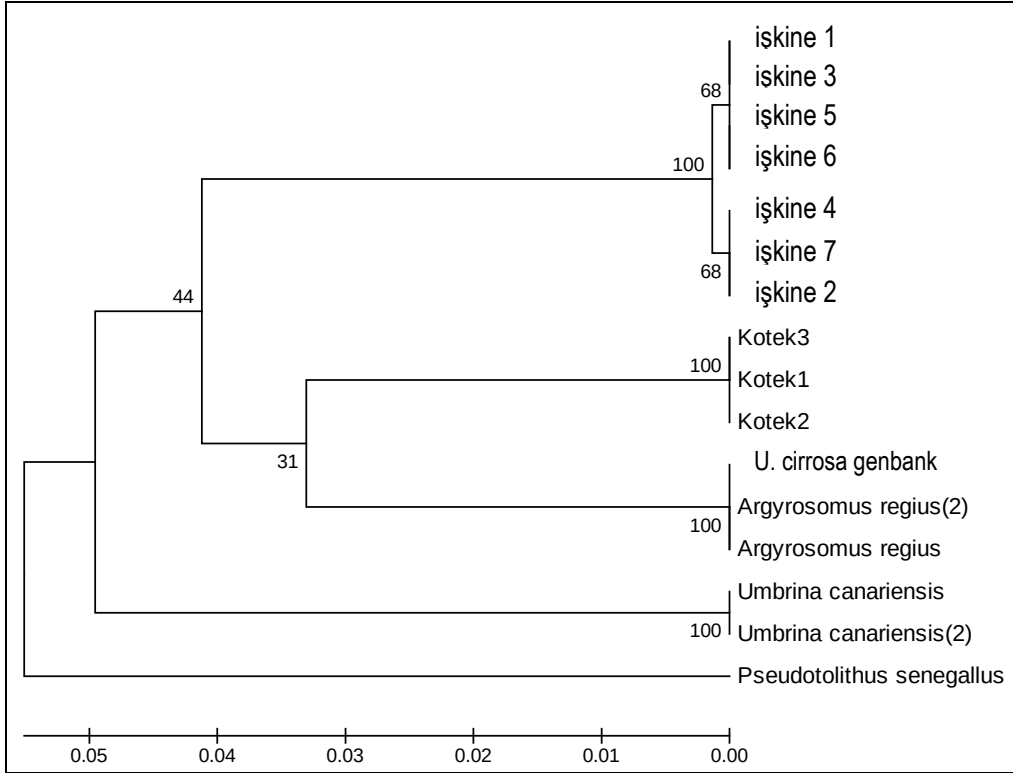
Çalışılan örneklerle ait Cyt-b sekans verileri ilk olarak Maksimum parsimoni (MP) (Şekil 15), UPGMA (Şekil 16), NJ (Şekil 17)ve Maksimum olasılık (ML) (Şekil 18) dendogramlarının yapılandırılmasında kullanıldı. Tüm dendogramlar için benzer bir ayrışma görüldü. Ayrıca oluşturulan köksüz ağaca (MP) bakıldığında türlerin farklılaşması açık bir şekilde görüldü. (Şekil 15).

16S rRNA sekans verileri ilk olarak Minimum evolution (ME) (Şekil 19), ve UPGMA (Şekil 20) dendogramlarının yapılandırılmasında kullanıldı. Tüm dendogramlar için tespit edilen ayrılmalar dendogramlarda görülmektedir.

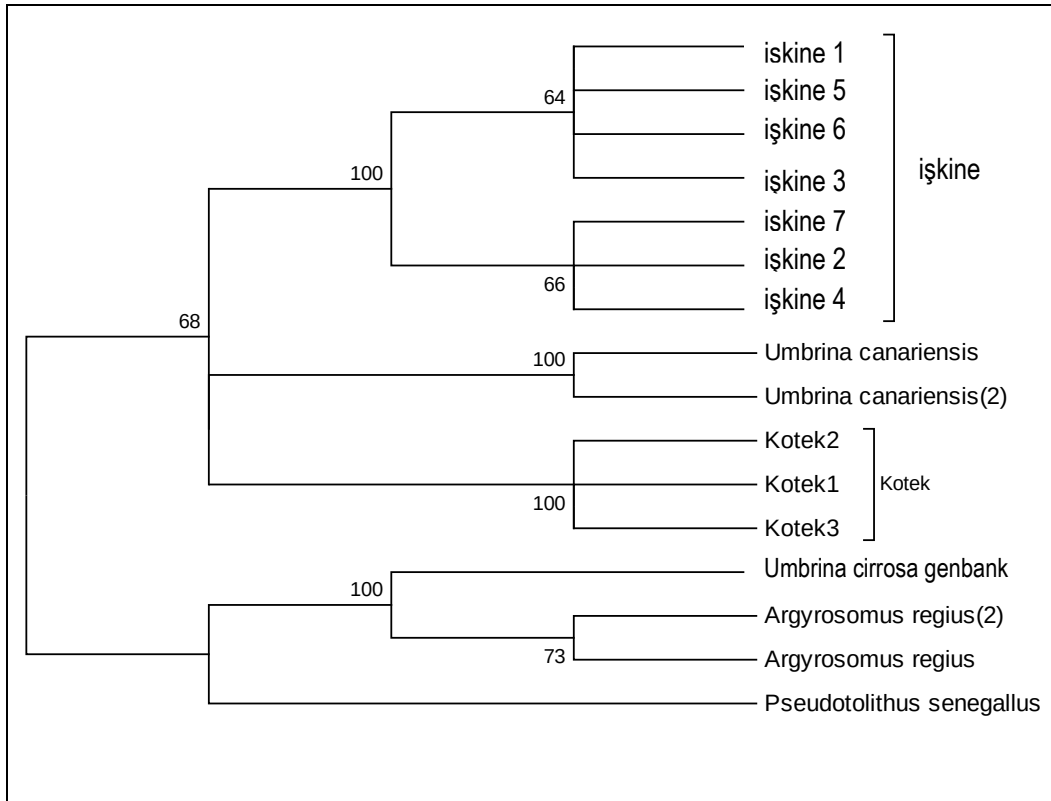
Ayrıca Cyt-b (Tablo 28) ve 16S rRNA (Tablo 29) sekans verilerinden elde edilen verilere göre işkine ve kötek balıklarının türler arası genetik mesafeleri hesaplanmıştır.



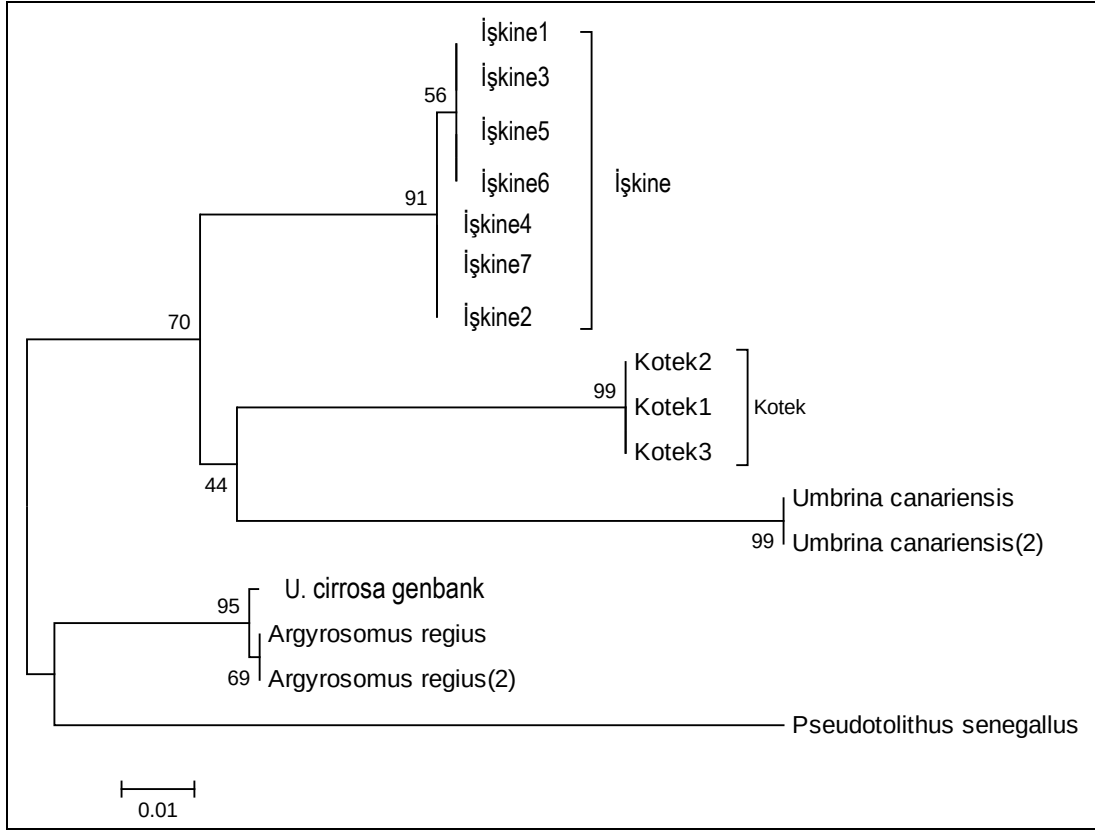
Şekil 15. *Sciaenidae* familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan MP dendogramı



Şekil 16. *Sciaenidae* familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan UPGMA dendogramı



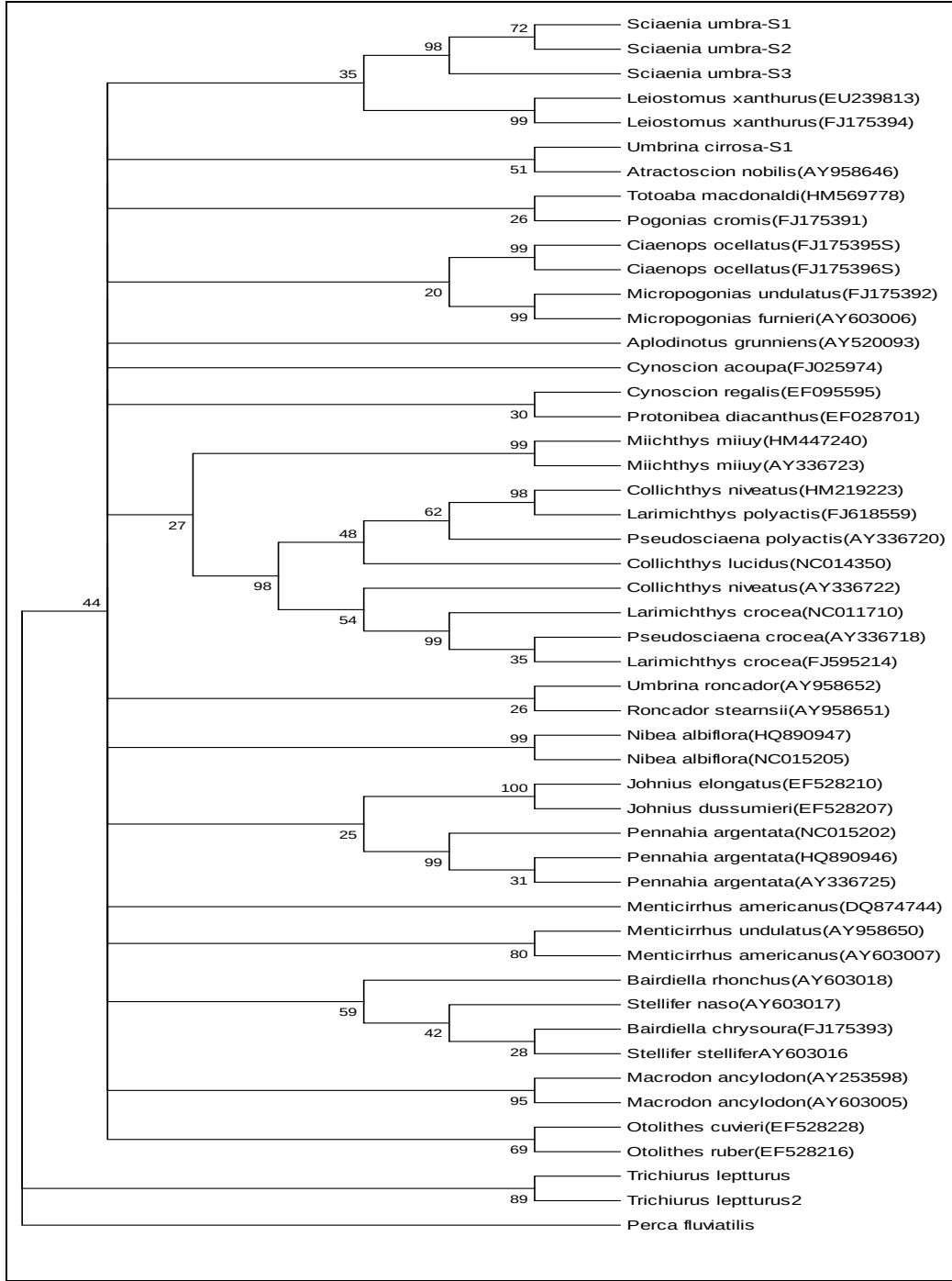
Şekil 17. *Sciaenidae* familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan NJ dendogramı



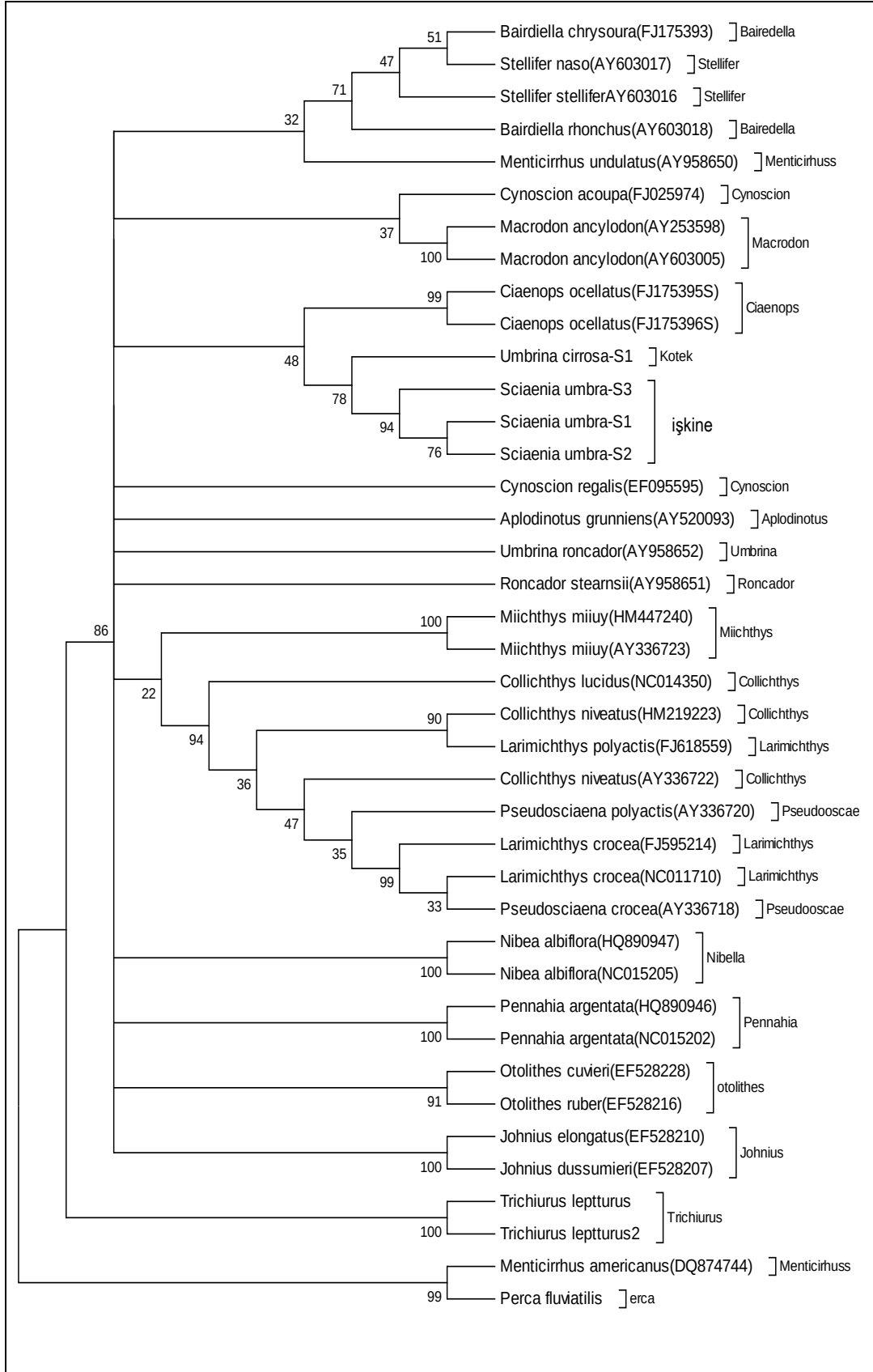
Şekil 18. *Sciaenidae* familyasına ait Cyt-b sekansları ile oluşturulan ML dendrogramı

Tablo 28. Cyt-b sekans verileri ve Genbank örneklerinden hesaplanan türler arası genetik mesafe

	<i>P. squamosus</i>	<i>U. canarienses</i>	<i>A. regius</i>	<i>U. cirrosa</i> genbank	İşkine	Kotek	<i>L. polyactis</i>
<i>P. squamosus</i>							
<i>U. canarienses</i>	0,152						
<i>A. regius</i>	0,105	0,109					
<i>U. cirrosa</i> genbank	0,105	0,109	0,003				
İşkine	0,126	0,085	0,076	0,076			
Kotek	0,128	0,096	0,077	0,077	0,079		
<i>L. polyactis</i>	0,160	0,173	0,137	0,137	0,163	0,151	



Şekil 19. 16S rRNA sekans verilerinden oluşturulmuş ME dendrogramı



Şekil 20. 16S rRNA sekans verilerinden oluşturulmuş UPGMA dendogramı

Tablo 29. 16S rRNA sekans verilerinden hesaplanan türler arası genetik mesafe (K2P).

işkine	işkine	Kotek	Aplodinotus	Cynoscion	Collichthys	Otolithes	Johnius	Ciaenops	Larimichthys	Nibella	Pennahia	Bairdella	Stellifer	Pseudooscae	Macrodon	Mentii	Trichiumus	Müichthys	Umbrina	Roncador
Kotek	0,022																			
Aplodinotus	0,057	0,063																		
Cynoscion	0,057	0,063	0,069																	
Collichthys	0,066	0,077	0,088	0,085																
Otolithes	0,147	0,15	0,175	0,168	0,166															
Johnius	0,278	0,276	0,266	0,286	0,268	0,299														
Ciaenops	0,027	0,032	0,059	0,051	0,067	0,15	0,279													
Larimichthys	0,071	0,083	0,094	0,092	0,027	0,175	0,273	0,074												
Nibella	0,101	0,101	0,113	0,12	0,103	0,172	0,266	0,096	0,116											
Pennahia	0,118	0,119	0,118	0,128	0,107	0,181	0,268	0,11	0,116	0,141										
Bairdella	0,143	0,142	0,154	0,163	0,168	0,227	0,327	0,142	0,178	0,189	0,181									
Stellifer	0,111	0,115	0,118	0,121	0,129	0,196	0,286	0,104	0,141	0,165	0,151	0,108								
Pseudooscae	0,071	0,084	0,091	0,091	0,027	0,175	0,275	0,073	0,019	0,118	0,114	0,177	0,14							
Macrodon	0,12	0,126	0,122	0,112	0,144	0,187	0,292	0,112	0,155	0,181	0,168	0,206	0,158	0,15						
Menticirhuss	0,339	0,338	0,358	0,364	0,375	0,419	0,536	0,341	0,382	0,369	0,418	0,402	0,389	0,386	0,414					
Trichiumus	0,226	0,227	0,229	0,256	0,257	0,255	0,352	0,233	0,253	0,257	0,243	0,267	0,255	0,258	0,255	0,445				
Müichthys	0,051	0,057	0,085	0,071	0,062	0,153	0,272	0,044	0,075	0,101	0,111	0,173	0,122	0,079	0,133	0,353	0,231			
Umbrina	0,078	0,082	0,095	0,103	0,1	0,169	0,277	0,084	0,106	0,145	0,128	0,171	0,13	0,104	0,149	0,369	0,256	0,091		
Roncador	0,051	0,064	0,06	0,071	0,068	0,158	0,266	0,056	0,077	0,1	0,119	0,145	0,116	0,079	0,14	0,362	0,23	0,064	0,076	

3.4.5. Kesici Enzim Analizi

İşkinegil balık popülasyonunun genetik yapısının belirlenmesi için mitokondriyal DNA'nın üç farklı bölgesi (ND1, Cyt-b ve 16S) RFLP metodu ile çalışılmıştır. Bu bölgelerin PZR ürünleri boylama markırı kullanılarak %1'lik agaroz jelde koşturulmuş ve jel görüntüleri şekil 6'da verilmiştir. Gen bölgelerinin büyüklüklerinin yaklaşık olarak sırasıyla ND1 için 1500 bp, için 800 bp ve 16S rRNA için 2300 bp olarak belirlenmiştir (Tablo 30,31,32)

ND ve Cyt-b gen bölgelerinin toplam 10 kesici enzimle kesilmesi sonucunda her birey için 100 bp ile 2300 bp arasında 1-9 arasında kesim parçacığı gözlenmiştir. Her gen bölgesi için kesici enzimlerin oluşturduğu kesim parçacıklarının büyüklük toplamalarının ortalaması ND1 için 1368 ± 100 bp, Cyt-b için 870 ± 20 bp ve 16S rRNA için 2289 ± 130 bp olarak hesaplanmıştır. Küçük parçacıkların jelde hızlı hareket ederek ve çıkmış olmasından dolayı gözlenememiş olması veya bazı kesici enzimler için benzer boydaki parçacıkların jelde beraber hareket etmesi genlerin ortalama boylarının gerçek boylarından küçük olmasına neden olmuştur.

Çalışılan balıkların popülasyon düzeyinde polimorfik yapı gözlenememiştir.

Tablo 30. İşkine popülasyonlarında 16S rRNA gen bölgesi için gözlenen kesim şekilleri ve yaklaşık kesim büyüklükleri

Kesici Enzimler	Hpa II	Hinf I	Hae III	Ava II	Alu I	BclI	EcoRI	RsaI	HinIII	SspI
Kesim morfları	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Parça Büyüklükleri (bp)	1400 700 140 180	1100 470 470 240	850 570 230 200 190 130 100	1600 590 120	480 480 320 230 230 180 150 130	2070 230	1000 700 410 240	800 550 320 220 200	1000 390 280 230 190 180 80	2100 220
Toplam	2420	2280	2270	2310	2200	2300	2350	2090	2350	2320

Tablo 31. İşkine popülasyonlarında Cyt-b gen bölgesi için gözlenen kesim şekilleri ve yaklaşık kesim büyüklükleri

	Hpa II	Hinf I	Hae III	Ava II	Alu I	BcnI	EcRI	Hin1II	RsaI	SspI
Kesim morfları	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Parça Büyüklükleri (bp)	850	340 210 170 150	200 200 180 160 140	410 200 150 120	700 180	880	880	500 230 150	510 370	880
Toplam	850	870	880	880	880	880	880	880	880	880

Tablo 32. İşkine popülasyonlarında ND gen bölgesi için gözlenen kesim şekilleri ve yaklaşık kesim büyüklükleri

	Hpa II	Hinf I	Hae III	Ava II	Alu I	BcnI	EcRI	RsaI
Kesim morfları	A	A B	A	A	A	A	A	A
Parça Büyüklükleri (bp)	900 290 190	900 600 270 200 200 160 160 120 120	320 320 280 280 180 90	800 400 170	720 400 150 80	820 290 200	1350	1350
Toplam	1380	1380 1350	1470	1370	1350	1310	1350	1350

4. TARTIŞMA

4.1. Haplotip Verileri

Bu çalışmada *Sciaenidae* familyasına ait iki türde (ışkine ve kötek) Cyt-b ve 16S rRNA genlerinin sekans analizi sonuçlarına göre Cyt-b geninde ışkinede 25 kötekte ise 20 haplotip belirlenirken, 16S rRNA geni için ışkine da 4 ve kötek de 8 haplotip bulunmuştur. Ayrıca Cyt-b ve 16S rRNA gen bölgeleri için haplotip çeşitliği sırası ile ışkinede %83,8 - %52,6 ve kötekte ise % 80,5- % 73,6 olarak bulunmuş olup, türler arasında ortak haplotipin olmadığı görülmektedir. Benzer şekilde Lakra vd. (2009) yaptıkları çalışmada *Sciaenidae* familyasında 5 cinse ait (*Otolithes*, *Johnius*, *Johnieops*, *Protonibea* ve *Otolithoides*) toplam 35 bireyde 16S rRNA ve COI genlerinin kısmi sekans (577-590) analizi yaparak her tür için iki haplotip (türe özgü) belirlemiştir fakat yaptıkları çalışmada örnek sayısının az olması sonucunda haplotip sayısı az bulunmuştur. Örnek sayısı, çalışılan gen bölgesi ve metoda bağlı olarak haplotip çeşitliliğinin değişebileceği düşünülmektedir. Özellikle 16S rRNA geni için elde edilen haplotip değerlerinin düşük olması bu genin özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen haplotip sayıları ile ilgili değerler diğer çalışmalar tarafından desteklendiği görülmektedir. Şöyle ki haplotip çeşitliliği diğer kemikli balıklarda %80'nin üzerinde bulunmaktadır (Grant ve Bowen, 1998). Santos (2003), *Macrodon* türünde Cyt-b ve 16S rRNA geninin sekans analizini Cyt-b (810 bp, N=53) geninde 25 haplotip ve 16S rRNA geninde (520 bp ve N=68) ise 11 haplotip elde etmiştir. Daha sonra aynı türde Santos (2006) yaptığı çalışmada 12 coğrafik bölgeden 130 örnek içinde Cyt-b sekansının toplam 789 baz çiftinin analizinden 43 ayrı haplotip bulmuş ve bu haplotiplerin bazılarının Santos (2003)'ün yaptığı çalışma ile benzer haplotipleri içerdiğini rapor etmiştir. Benzer şekilde Hsu vd. (2007) *Trichiurus lepturus* türüne ait 99 örnekte genetik çeşitliliğini Cyt-b mitokondrial geninin 636 bp'lik kısmi sekansı ile 82 haplotip belirlemiştir. Popülasyon içi haplotip çeşitliliğini %87 - 100 arasında ve ortalama %96 haplotip çeşitliliği bulunmuştur. Kim (2010) mitokondrial kontrol sekans verilerinden *Larimichtys polyactis*'in bütün türleri benzersiz haplotiplere sahip olduğunu belirlemiştir. Farklı bir metotla yapılan çalışmada Legat (2006)'da *Micropogonias furnieri*'nin Brezilya popülasyonlarının genetik yapısını araştırmış D-loop

bölgesinin RFLP analizi ile *M. furnueri*'nin mtDNA 5 haplotip de %40-56 arasında düşük bir değer bulmuştur. Bunun nedeni ise çalışılan örnek sayısının az olmasına bağlanmıştır.

4.2. Nükleotit Verileri

Farklı araştırmacılar tarafından Cyt-b (%53-57) ve D-loop (%70-80) bölgelerinin yüksek A+T değerine sahip oldukları (Apostolidis vd., 1997) ve kontrol bölgesi için % 68'lik A+T oranının genel bir değer olduğu belirtilmiştir (Meyer, 1993; Jerry ve Baverstock, 1998). *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae)'nın komple mitokondrial kontrol bölgesinin genomunun incelemiş ve *Sciaenidae*'nin filogenetik durumunu araştırmışlardır. *L. crocea*'nın mt genom boyu *Labracinus cyclophthalmus*'dan daha büyük ve diğer 27 *Percoidei* türlerinden küçük olduğunu göstermişlerdir. *L. crocea*'nın A+T içeriği %53 ün üzerinde olup *Diagramma pictum*, *Lethrinus obsoletus* ve *Lutjanus rivulatus* içindeki değerler ile benzer fakat diğer *Percoidei* balıklarından düşük olduğu (Yamanoue vd., 2007) ve kontrol bölgesinin, bütün *Percidae* türlerinin ortak özelliği olarak *L. crocea*'nın (%53) tüm genomunun ortalama değerinden daha yüksek bir AT içeriğine (%61,3) sahip olduğunu bildirmiştir (Cui vd., 2009). *Trichiurus lepturus* (Perciformes: Trichiuridae)'un genetik çeşitliliğini incelenmiş ve *T.lepturus*un Cyt-b nükleotid sekansı zengin A+T (%55.3) içeriğiyle çoğu balık türlerine benzer bulunmuştur (Hsu vd., 2007). Önceki çalışmalarda Cyt-b geni C, A ve T oranlarınca zengin ve G oranı olarak ise çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Cantatore vd., 1994). Bu çalışmada benzer şekilde Cyt-b genlerinin nükleotid frekanslarında G düşük fakat kötekte 16S rRNA geninde yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada Cyt-b için A+T oranları ışkine de %49,2 ve kötekte %49,7 olarak bulunurken 16S rRNA için bu oran ışkinede %53,7 ve kötek de %52,5 olarak bulunmuştur.

Sciaenidae familyasında 5 cinse ait (*Otolithes*, *Johnius*, *Johnieops*, *Protonibea* ve *Otolithoides*) (N=35) farklı türlerde 16S rRNA ve COI genlerinin kısmi sekans sonucuna göre 16S rRNA (597 bp)'in nükleotid frekansları A %28,10, T %25,50, G %22,50 ve C %24,00 olarak bulunurken, bu değerler COI (655 bp) için ise A %23,6, T %28,6, G %18,8, ve C %28,7 olarak bulunmuştur (Lakra vd., 2009). *Sciaenidae*'lerden *M. ancylodon* da 16S rRNA geninin ortalama baz kompozisyonu A %28,7, T %23, C %24,4 ve G %23,4 olarak bulunmuştur (Santos vd., 2003). Bu çalışmada ise 16S rRNA için nükleotid frekansları Kötekte A %31,9, T %20,6, C %26.8 ve G %21.3 ve ışkinede A %34,6, T %19,1, C %27,6

ve G %18,8 bulunmuştur. Belirlenen A değerlerinin yüksek T değerlerinin ise daha düşük olduğu görülmekle birlikte A+T oranı benzerdir.

Farklı canlı grupları için Cyt-b geninin nükleotid frekansları çalışılmış olup (Johns ve Avise,1998), farklı araştırmacıların bazı balık ve perciformes türlerinden elde ettikleri değerle bu çalışmada elde edilen değerler tabloda verilmiştir (Tablo 33) (Allegrucci, 1999, Eroğlu, 2008, Santo ve ark 2003). Tabloda verilen değerlere bakıldığında bu çalışmada elde edilen değerlerle uyumlu oldukları görülmektedir.

Tablo 33. Farklı canlılar için Cyt-b nükleotid frekansları

Canlı Türü	T	C	A	G	A+T
Kuşlar	25,0	33,9	27,6	13,5	52,6
Memeliler	28,8	28,4	29,6	13,3	58,4
Sürüngenler	28,6	27,6	27,7	16,1	56,3
Amphibianlar	32,7	24,3	27,0	16,0	59,7
Balıklar	29,5	29,9	25,3	15,3	54,8
Mersin Balıkları	26,83	31,45	26,52	15,18	53,36
Kötek (Bu çalışma)	26,5	35,9	23,2	14,3	49,7
İşkine (Bu çalışma)	27,2	35,3	22,0	15,6	49,7
Scanidae (Santos 2003, 2006)	28,8-29,3	32,8-32,8	23,6- 23	14,8-14,9	52,4-52,3

4.3. Transisyon/Transversiyon Oranı

Balık türlerine ve gen bölgelerine göre transisyon-transversiyon (Ts/Tv) oran değişimini göstermektedir. Çoğu balıklarda Cyt-b bölgesi Ts/Tv 2:1-3:1 gibi düşük değerler rapor edilmişken (Bernatchez vd., 1992; Fajen ve Breden 1992; Apostolidis vd., 1997) mersin balığı gibi bazı türlerde yapılan çalışmalarda Ts/Tv oranını (7,17) nispeten yüksek oranlarda rapor edilmiştir (Almodovar vd., 2000). Perciformes ve *Moridae* içindeki transisyon oranları hesaplanarak tüm değişkenlik oranı sırasıyla %54 ve %74 civarında bulunmuştur (Allegrucci, 1999). Skanidler içinde bu oran çoğu kemikli balıklar ile karşılaştırmış ve ortalama Ts/Tv oranını 2,10 olarak belirlenmiştir (Lakra vd., 2009). *Macradon* türünde Ts/Tv oranı her kodon için ayrı ayrı hesaplandığında ilk kodon pozisyonu için 2,4, ikinci pozisyon için 1,6 ve üçüncü pozisyon için 3,0 ve ortalama Ts/Tv oranı ise 2,8 olarak bulunmuştur (Santos vd., 2003). *Larimichthys crocea*'nın farklı popülasyonları için kontrol bölgesi çalışılmış Ts/Tv oranı sırasıyla 1,9 (42/22), 2,1 (17/8), 3,6 (43/12) ve Wido 3,8 (50/13) olarak hesaplanmıştır. Bu tür için ortalama Ts/Tv oranı 3,6

olduğu rapor edilmiştir (Kim, 2010). Bu çalışmada Cyt-b Ts/Tv oranları işkine için 19/11 ve kötek için 18/7 olarak hesaplanmıştır. İşkine için 16S rRNA Ts/Tv oranı 3/0 bulunmuştur. Kötek için 16S rRNA transisyon/transvesiyon oranı 2/6 bulunmuştur. Cyt-b için elde edilen değerlere nispeten yüksek bulunur iken 16S rRNA için düşük değerler hesaplanmıştır. Bu durumun örnek sayısı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

4.4. Nükleotit Verileri

Genel olarak 16S rRNA geni COI'e göre daha korunmuş olduğu düşünülmektedir ve farklı tür ve cinsler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat 16S rRNA geninin sekans analizi Sparid ve Percoid gibi bazı deniz taksonları içinde ki ilişkileri çözmede yeterli olmadığı bildirilmiştir (Orrell, 2004). Bu görüşe ters olarak 16S rRNA geninde nükleotid farklılığı (K2P) türler arası %5,9-8,7 ve genus düzeyinde (intergenerik) %8,9-23,0 ile yüksek bulunmuş ve skanid türlerinin karşılıklı ilişkileri tanımlamak için yeterli gücü gösterdiği belirtilmiştir (Lakra vd., 2009). Bununla birlikte 16S rRNA sekansı kullanarak Kuzey Brezilya içindeki skanid türlerinde yüksek nükleotid çeşitliliği (8,3%) rapor edilmiştir (Vinson vd., 2004). Subtropikal ve tropikal *Macrodon* grubu türlerinde sekans verileri karşılaştırıldığında Cyt-b için yüksek nükleotid farklılığı %4,3 ve 16S rRNA geni için %2,6 ulaşan değerler bulunmuş ve bununda tropikal ve subtropikal *Macrodon* gruplarını açıkça ayırt ettiği gösterilmiştir (Santos vd., 2003). Fakat Santos (2006)'un yaptığı çalışmada her bir gende ve her popülasyondaki nükleotid farklılığını %1 den daha az bulunmuş ve her bir popülasyon için nükleotid çeşitliliği 0,0010 – 0,0030 arasında hesaplanarak yüksek benzerlik gösterdiklerini belirlenmiştir.

Trichurus lepturus popülasyon içi nükleotid çeşitliliği Da Hsi (%3,45) popülasyonu içinde yüksek Miao Li (%0,53) içinde düşük ve nükleotid çeşitliliği (%7,71) bulunmuştur (Hsu vd, 2007). Santos (2003) tropikal ve subtropikal grup çeşidi arasındaki genetik mesafeyi sitokrom b geni için %3,2 den %4,3'e 16S rRNA geni için %2,0 dan %2,4'e değişkenlik gösterdiğini bulmuştur. *Larimichtys polyactis* (Pisces:Sciaenidae)'ın mtDNA kontrol sekans verilerinden nükleotid bölgesi sekans çeşitliliği açısından bakıldığında, Qingdao bölgesi çok farklı (%1,82) iken Zhoushan bölgesi çok az (%1,22) farklı; Kore popülasyonları 1,39 ile 1,67 arasında değişmektedir (Kim vd., 2010).

M. ancylodon'un tropik ve subtropik soyları içinde mesafeye göre izolasyon ile kısıtlı gen akışı varsayımı ve iç içe soy (nested clade= D_n $P < 0.001$) analizi ile soy (D_c)

düzeyinde yüksek ayrılma göstermiştir. Nesting (iç içe) analizin en yüksek önemlilik düzeyi tropikal ve subtropikal soylarların karşılaştırılmasından hesaplanmıştır. Ayrıca Santos (2006) yaptığı Mantel testte; soylar içindeki populasyonların coğrafik ve genetik mesafeleri arasında ki ilişkinin önemini değerlendirmek için uygulanmış ve korelasyon pozitif (sırasıyla $r=0.575$ 0.297) fakat önemli olmadığını belirtmiştir. *M. furnierinin* farklı populasyonlar içinde hesaplanan ortalama nükleotid farklılığı %1,362 ile %0,248 arasında bulunurken bu değer diğer deniz balık türlerinden daha düşük olduğu belirtilmiştir. Mantel test sonucuna göre genetik mesafe ve coğrafik mesafenin arasındaki ilişki önemli ($r=0.883$, $P<0.003$) bulunmuştur (Legat, 2006). Bu çalışmada İşkine ve Kötek için hesaplanan nükleotid çeşitliliği (P_i) ve nükleotid farklılığı (k) Cyt-b genin için sırası ile %2,97 ve 2,87 arasında bulunmuştur. 16S rRNA geni için ise sırası 1,54 ile 0,61 olarak düşük nükleotid çeşitliliği belirlenmiştir.

4.5. Genetik Mesafe

Bazı kemikli balık gruplarında alloenzim ve mtDNA bölgelerinin (Cyt-b gibi) çalışılması ile elde edilen genetik farklılaşma her zaman taksonomik düzeyde olmayabilir. Aynı türlerin belirlenmesinde tek başına genetik mesafenin kullanımı yeterli olmayacağından bu analizler çok sayıdaki türde (bitki ve hayvan) uygulanamayabilir. Bunun yanında aynı türleri tanımlamak için genetik mesafe yeterli olmamakla birlikte cins içindeki tür düzeyi veya populasyon uygulamalarında kullanılabilir olduğu belirtilmiştir (Ferguson, 2002), *Trichiurus* 'un 4 türünün mtDNA Cyt-b sekansına dayalı genetik mesafe belirlenmiş ($d=0,210-0,282$) ve belirlenen değerin yüksek olduğunu bildirmiştir (Hsu vd., 2007). Diğer bir araştırmacı da mtDNA 16S rRNA sekans analizine dayalı *Trichiurus* cinsinin üç türü içinde genetik farklılığı 0,44 ve 0,066 arasında olduğunu belirtmiştir (Tinti ve Piccinetti, 2000). Akdeniz *Solea* türünün iki gen bölgesinin (16S rRNA ve Cyt-b) de genetik analize göre Cyt-b için $d=0,164-0,272$ ve 16S rRNA için 0,042-0,103 olarak bulunmuştur (Chakraborty vd., 2006).

Sciaenidae içerisinde 7 Hindistan türünde 16S rRNA ve COI genini çalışarak tür içi ve türler arası sekans farkı çalışılmıştır. Skanidler içinde 16S rRNA için ortalama sekans farkı 0,139 iken türler arası sekans farkı ortalama 0,137'dir ve en yüksek intergeneric sekans farkı 0,195 ile *P. diacanthus* ile *J. dussumieri* arasında iken en düşük değer 0,0710 ile *J. vogleri* ile *J. elongatus* arasındadır. En yüksek türler arası sekans farkı 0,0873 *O.*

ruber ile *O. cuvieri* arasında ve en düşük değer 0,0588 *J. dussumieri* ile *J. elongatus* arasında bulunmuştur. COI ortalama intergenerik ve türler arası sekans çeşitliliği 0,163 iken kongenerik türler arası sekans çeşitliliği 0,147'dir. En yüksek intergenerik sekans çeşitliliği (0,2137) *O. biauritus* ve *J. vogleri* arasında ve en düşük değer (0,1023) *J. vogleri* ve *J. elongatus* arasında gözlenmiştir ve en yüksek türler arası sekans çeşitliliği (0,0580) *O. ruber* ve *O. cuvieri* arasında ve en düşük değer (0,0259) *J. dussumieri* ve *J. elongatus* arasında bulunmuştur (Lakra vd., 2009).

Bu çalışmada Cyt-b sekans verilerinden elde edilen verilere göre ışkine ile kötek arasındaki genetik farklılık 0,079 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte Türkiye'de bulunan diğer tür olan *A. regius* ile ışkine arasındaki mesafe 0,076 ve bu türün kötek ile mesafesi 0,077 olarak daha yakın olduğu bulunmuştur. Yine Genbank verilerinden elde edilen *U. cirrosa* ile ışkine arasındaki mesafe 0,076 ve kötek örnekleri ile 0,077 olarak bulunmuştur. Türler arası 16S rRNA genetik mesafede ışkine -kötek arasındaki mesafe 0,022 ile en düşük bulunurken bu türe en yakın *Ciaenops* (0,27) ve en uzak *Perca* (1,3) olarak belirlenmiştir.

4.6. Filogenetik Analiz

Perciformes balıklar içerisindeki en büyük takımdır. Toplam 22 alt order içerisinde 9000 tür bulunmaktadır. Bu order içerisindeki alt orderlardan bir tanesi Percoidei'dir ve perciformes in %25'ini (73 aile) içermektedir. Scanidler ise 70 cins 300 türe sahiptir. Bu nedenle bu türlerde bazı filogenetik ilişkilerin çalışılmasında tek başına Cyt-b yeterli olmayabilmektedir.

Sciaenidae familyasında (7 hindistan türü) 16S rRNA'nın filogenetik analiz yaparak NJ ve MP dendrogramları oluşturulmuş ve filogenetik ilişki araştırılmıştır. Elde edilen bootstrap değerlerine göre (NJ=88-100% ve MP=84-99%) örneklerin 3 gruba ayrıldığı belirlenmiştir. İlk grup *Johnius* cinsinin 3 tür aynı grupta yer alır iken *Johnieops vogleri* diğer iki türden uzaklaşarak alt grup oluşturmuştur. İkinci grup da *Otolithes* cinsi içerisinde bulunan *O. cuvieri* ve *O. ruber*) 2 tür yer almıştır. 3. grup ise *P. diacanthus* ve *O. biauritus*'a türleri oluşturmuştur (Lakra vd., 2009). Perciformes içerisinde 4 aileden (*Moronidae*, *sparidae*, *Cichlidae* ve *Carangidae*) ve 3 *Scombombridae* 10 türde Cyt-b sekans verilerinden filogenetik ilişkileri çalışılmıştır. Filogenetik analizlerde (Tamura ve Nei) mesafelerine dayalı NJ ve MP topolojilerini kullanılmıştır. Her iki analiz için boot

strap değerleri *Carangidae* ailesi için $MP=78\%$ ve $NJ=97\%$, *Sparidae* her ikisi için 100% ve *Moronidae* için $MP=81\%$, $NJ=95\%$ olarak hesaplanmıştır. *Scombridae-Pomatomidae-Carangidae* kümelerinin ayrımı kuvvetle desteklendiğini (bootstrap değerleri eşit olarak $MP=72\%$; $NJ=70\%$) göstermiştir (Allegrucci, 1999).

Skanidlerden Caete nehir halisindeki 8 genus'a ait 15 türde 16S rRNA sekans analizi ile yaptığı çalışmada minimum evolasyon (ME), maximum olasılık (ML) ve maximum parsinomi (MP) filogenetik ağaçları skanid soylarının çoğunluğu için çözümlenmemiş polytomi gösterdiğini belirtmiştir (Vinson, 2004)

Bu çalışmada Cyt-b ağaç topolojilerine göre *Sciaenidae* familyası içerisinde yer alan iki tür bootstrap değeri (100%) bakımından ayrılmaktadır. İşkine için karşılaştırılacak veri olmadığından filogenetik analizlerde tüm türlerden ayrılırken kendi içerisinde 2 gruba ayrıldığı belirlenmiştir. Kötekte Genbank verilerinden alınan aynı türe ait sekans verileri olmasına rağmen bu türden tamamen ayrılma görülmüştür.

4.7. Populasyon Genetiği Analizleri

M. furnieri türünün farklı populasyonlar içinde AMOVA yapılmıştır. Aynı lokasyonlar ($P<0.002$) içindeki varyasyonunun büyüklüğü $87,24\%$ olarak hesaplanmıştır. Pairwise F_{ST} değerleri 0,023-0,446 arasında değişmekte olup, ortalaması 0,134 olarak bulunmuştur. Bu değerler Skanidler için rapor edilenlerden yüksek olduğu bildirilmiştir. (*Micropogonias undulates* için F_{ST} değeri 0.057 Lankford Jr. vd., 1999; Legat, 2006) .

Macrodon türünde tropikal soy içinde genetik varyansın $53,84\%$ 'ü ($F_{ST}=0.42$, $P<0.001$) popülasyon içindeki farklılıklara, genetik varyansın $44,54\%$ 'ü kuzey Brezilya ve Brezilya popülasyonları arasındaki ($F_{CT}=0.445$, $P=0.072$) varyasyondur. Subtropikal soy içindeki varyansın $86,38\%$ 'i ($F_{ST}=0.136$, $P<0.001$) populasyonlar içindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır ve Tropikal soy içinde populasyonlar arasındaki F_{ST} değeri -0,058 ile 0,464 aralığında, aynı şekilde subtropikal grup içindeki populasyonlar arası pairwise F_{ST} değeri -0.094 ile 0.285 aralığında bulunmuştur (Santos, 2006). Santos (2003) yaptığı çalışmada Cyt-b ve 16S rRNA genlerinin filogenetik analizler sonucunda (NJ ve MP ağaçları) tropikal ve subtropikal olmak üzere iki ayrı soy grubu belirlemiş ve bütün ağaçlar da yüksek bootstrap değeri ($>93\%$) ile ayrılmanın benzer topolojiyle ifade edildiğini rapor etmiştir. *Epinephelus marginatus* (Serranidae) da Cyt-b sekans analizine dayalı çalışmasında Fransa ve Tunus popülasyonları arasında büyük nükleotid benzerliğine

rağmen Tunus ve Fransa popülasyonlarının ayrıldığını bildirilmiştir (Giles vd., 2000). *Dicentrarchus labrax* da Cyt-b sekansının analizine göre yüksek nükleotid benzerliği sahip olmasına rağmen Tiren popülasyonundan açıkça ayrı olduğu doğu (Yunan ve Mısır) ve kuzeybatı popülasyonları ile Akdeniz *D. labrax* popülasyonları içinde belirgin bir coğrafik yapılanma belirlemiştir (Allergruci vd., 1999).

Bu çalışmada kötek Cyt-b haplotip frekanslarından (Adana, Antalya, Muğla, Trabzon, Rize, Artvin) yapılan moleküler varyans analizi sonucunda varyasyonun %81,12'lik çok büyük bir kısmı grup içi dağıldığı görülmüş ve bu oran çok önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). Gruplar arası varyasyon ise %18,12 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonlar arasında F_{st} değeri 0,18881 olarak hesaplanmıştır. Rize-Artvin popülasyonları yalnız kendi aralarında ayrılmaz iken Antalya tüm popülasyonlarla aynı özelliği göstermiştir. Coğrafik mesafe ile genetik mesafe arasında ilişki önemli bulunmamıştır.

Bu çalışmada işkine Cyt-b haplotip frekanslarından yapılan moleküler varyans analizi sonucunda varyasyonun % 92,64'lik çok büyük bir kısmı grup içi arasında dağıldığı görülmüş ve bu oran çok önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). Gruplar arası varyasyon ise %7,36 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonlar arasında F_{ST} değeri 0,07364 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre Trabzon Rize popülasyonu diğer popülasyonlardan ayrılmıştır. Coğrafik mesafe ile genetik mesafe arasında ilişki önemli bulunmamıştır.

5. SONUÇLAR

1. PZR ürünleri, parça boyları bilinen bir belirteçle (100 bp'lik DNA boy belirteci) birlikte agaroz jel üzerinde yürütülerek gerek ethidium bromid ile boyanması gerekse parçacıkların ayrışması sağlanmıştır. Bu şekilde oluşan DNA bantları UV ışık altında görüntülenmiştir. Çoğaltılan gen bölgelerinin beklenen büyüklükleri Cyt-b için 800 bp, 16S sekansı için 1100 bp, RFLP için 12S-16S genleri 2300 bp ve ND1 için 1500 bp olarak belirlenmiştir.
2. Cyt-b gen sekansı ışkine için 76, kötek için 104 olmak üzere toplam 180 örnekte ve 16S gen sekansı ise ışkine için 23 örnekte, kötek için 31 örnekte olmak üzere toplam 54 örnekte ileri (forwad) ve geri (revers) primerleri kullanılarak çift yönlü belirlenmiştir.
3. Cyt-b için 800 bp toplam uzunlukta (primer yerleri çıkarıldı) ve 16S için ise 1000 bp'lik ortak bir sekans elde edilmiştir. Aynı zamanda biyolojik bilgilerin toplandığı merkezden (NCBI, The National Center for Biotechnology Information) bu türe ait Cyt-b ve 16S gen bölgesi sekansları, filogenetik analizlerde topoloji oluşturmada kullanılmak üzere alınmıştır.
4. Yapılan analiz sonucunda Cyt-b gen sekansında Kötek de 104 örnekte toplam 20 adet haplotip gözlenirken (Tablo 5,6) İşkine balığında ise 76 örnekte 25 haplotip gözlenmiştir (Tablo 7,9). Kötek ve İşkine Cyt-b sekans verilerinden haplotipler arası genetik mesafe hesaplanmıştır (Tablo 8,10). İşkine 16S rRNA geninde 23 örnek çalışılmış ve 4 adet haplotip belirlenmiştir (Tablo 11). Kötekte ise toplam 22 örnekten 8 adet haplotip belirlenmiştir (Tablo 12). Kötek 16S rRNA sekans verilerinden haplotipler arası genetik mesafe hesaplanmıştır (Tablo 13).
5. Çalışılan gen bölgelerine ait haplotip çeşitliliği Cyt-b ve 16S rRNA gen bölgeleri için sırası ile ışkinede %83,8 -%52,6 ve kötekte ise % 80,5- % 73,6 olarak belirlenmiştir(Tablo 14).
6. Bu çalışmada Cyt-b için A+T oranları ışkine da %49,2 ve kötekte %49,7 olarak bulunur iken 16S rRNA için bu oran ışkine de %53,7 ve kötek de için %52,5 olarak bulunmuştur ve he bir gen iç nükleotid frekansları belirlenmiştir (Tablo 15).

7. Cyt-b gen bölgesinin için Kötek de Transisyon/transversiyon oran oranları 19/11 ve işkine de 18/7 olarak hesaplanmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin için kötekte transisyon/transversiyon oran oranları 3/0 ve İşkine da 2/6 olarak hesaplanmıştır.
8. İşkine ve Kötek balığında nükleotid çeşitliliği (Pi) ve nükleotid farklılığı (k) Cyt-b genin için sırası ile % 2,97 ve 2,87 arasında, 16S geni için ise sırası ile 1,54 ile 0,61 olarak bulunmuştur. Ayrıca sinonim ve sinonim olmayan pozisyonlar belirlenmiştir (Tablo 16).
9. Kötek Cyt-b haplotip frekanslarından yapılan moleküler varyans analizi sonucunda grup içi varyasyonun % 81,12'si, gruplar arası varyasyon ise %18,88 bulunmuş. F_{ST} değeri 0,18881 ($P < 0.001$) olarak hesaplanmıştır (Tablo 17) .
10. İşkine Cyt-b verilerinden yapılan moleküler varyans analizi sonucunda grup içi varyasyon %92,64 ve gruplar arası varyasyon ise %7,36 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonlar arasında F_{ST} değeri 0,07364 ($P < 0.001$) olarak hesaplanmıştır (Tablo 22).
11. Filogenetik topolojilerin yapılandırılmasında Cyt-b ve 16S sekans verileri ilk olarak Maksimum parsimoni (MP) (Şekil 15), UPGMA (Şekil 16), NJ (Şekil 17)ve Maksimum olasılık (ML) (Şekil 18) dendogramları bakıldığında türlerin farklılaşması açık bir şekilde görülmüştür.
12. Bu çalışmada Cyt-b sekans verilerinden elde edilen verilere göre işkine ile kötek arasındaki genetik farklılık 0,079 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte Türkiye’de bulunan diğer tür olan *A. regius* ile işkine arasındaki mesafe 0,076 ve bu türün kötek ile mesafesi 0,077 olarak daha yakın olduğu bulunmuştur. Yine Genbank verilerinden elde edilen *U. cirrosa* ile işkine arasındaki mesafe 0,076 ve kötek örnekleri ile 0,077 olarak bulunmuştur (Tablo 28).
13. İşkine popülasyonun genetik yapısının belirlenmesi için mitokondriyal DNA’nın üç farklı bölgesi (ND1, Cyt-b ve 16S) RFLP metodu ile çalışıldı. Popülasyon düzeyinde polimorfik yapı gözlenememiştir. Dolayısıyla işkine ve köteklerin popülasyon genetiği çalışılırken PCR RFLP kullanılması tavsiye edilmemelidir.

6. ÖNERİLER

Dünya genelinde olduğu gibi Ülkemizde de moleküler teknikler su ürünlerinin çok değişik konularında kullanılmaya başlanmıştır. Sistemli bir şekilde elde edilen bilgilerin daha sonraki çalışmalar için bir temel oluşturabilmesi, gerek kaynak, gerekse zaman israfından kaçınmak için bu tür çalışmaların belirli bir disiplin içerisinde yapılması gerekmektedir.

Ülkemizde farklı birkaç balık türünde yapılmış filogenetik çalışmalar mevcut iken *Sciaenidae*'lerin populasyon genetiği ile ilgili Türkiye denizlerinde yapılmış herhangi araştırma mevcut değildir. Özellikle ülkesel çapta yürütülecek ve yöntem birliği oluşturacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Elde edilen bulgular türün yetiştiricilik ve balıklandırma gibi uygulamaların da genetik çeşitliliğin korunması amacı ile kullanılabilir.

Türkiye sularında bulunan *Sciaenidae* türlerinin tamamı ve özellikle Akdeniz de (Avrupa ve Afrika) dağılım gösterdiği diğer kıyılarından örneklerle filogenetik çalışmalar detaylandırılabilir.

mtDNA bazı durumlarda popülasyon düzeyinde ayrım sağlayamayabilmektedir. Bu nedenle Populasyon çalışmaları nükleer DNA belirteçleri ile yapılarak genetik yapılanma detaylı olarak ortaya konulabilir. İlk etapta daha fazla örnekle daha çok gen bölgesinin sekans analizi yapılarak tür içi ve türler arası yapılanma detaylı olarak ortaya konulabilir.

7. KAYNAKLAR

- Akaike, H., 1974. A New Look at The Statistical Model Identification, IEEE Trans Autom Contr., 19, 716–723.
- Allegrucci, G., Caccone, A. ve Sbordoni, V., 1999. Cytochrome b Sequence Divergence in The European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) And Phylogenetic Relationships Among Some Perciformes Species, J. Zool. Syst. Evo.. Research, 37, 149-156.
- Allendorf, F.W. ve Ryman, N., 1987. Genetic Management of Hatchery Stocks, In: N. Ryman ve F. Utter, (Eds.) Population Genetics and Fisheries Management. University of Washington Press, Seattle and London: 141-159.
- Alves-Costa F.A., Martins C., Matos F.D.C., Foresti F., Oliveira C. ve Wasko A.P., 2008. 5S rDNA characterization in twelve Sciaenidae fish species (Teleostei,Perciformes): Depicting gene diversity and molecular markers Genetics and Molecular Biology, 31,1 , 303-307.
- Anonymous, <http://www.yunus.sumae.gov.tr/2003/03/07.pdf> , 20.04.2007
- Arı, S., 2004. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması: Bölüm 5, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler (G. Temizkan, ve N.Ü. Arda (Eds.), Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Arastırma ve Uygulama.
- Arnason, E. ve Rand, D.M., 1992. Heteroplasmy of Short Tandem Repeats in Mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*, Genetics, 132 ,211-220.
- Atabeyoğlu, K.,2007. Bölgemizdeki Aras, Karasu ve Çoruh Havzalarından Yakalanan Yerli Alabalıkların (*Salmo Trutta Sp.*) Mtdna D-Loop F1 ile 12s1-H Bölgesi Arasındaki Genetik Farklılığın Pcr-Rflp Ve Mikrosatellit Yöntemleriyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Avise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, USA, 511 s.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E. *et al.*, 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst., 18 489-522.
- Avise, J.C., 1986. Mitochondrial DNA and Evolutionary Genetics of Higher Animals, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 312, 325-342.

- Awise, J.C., Akney, C.D. ve Nelson, W.S., 1990. Mitochondrial Gene Trees and The Evolutionary Relationship Of Mallard And Black Ducks, Evolution, 44, 1109-1119
- Bentzen, P., Legget, W.C. ve Brown, G.G., 1988. Length and Restriction Site Heteroplasmy in The Mitochondrial DNA of American Shad (*Alosa sapidissima*), Genetics, 118, 509-518.
- Bermingham, E. ve Awise, J.C., 1986. Molecular Zoogeography of Freshwater Fishes in The Southeastern United States, Genetics, 113, 939-965.
- Bernartchez, L., Guyomard, R. ve 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.
- Billington, N., Barrette, R.J. ve Hebert, P.D.N., 1992. Management Implications of Mitochondrial DNA Variation in Walleye Stocks. North American Journal of Fisheries Management, 12, 276-284.
- Birky, C.W., Jr, Maruyama, T. ve Fuerst, P., 1983. An Approach To Population And Evolutionary Genetic Theory For Genes in Mitochondria And Chloroplasts, And Some Results. Genetics, 103, 513-527.
- Broker, N.E., Brown, J.R. ve Gilbert, T.A., 1990. Length Heteroplasmy of Sturgeon Mitochondrial DNA: an Illegitimate Elongation Model, Genetics, 124, 157-163.
- Brown, W.M., George, M.Jr ve Wilson, A.C., 1979. Rapid Evolution of Mitochondrial DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1967-1971.
- Brown, W.M., Prager, E.M. ve Wang, A., 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution, J. Mol. Evol., 18, 225-239.
- Bruno W. J. ve Halpern, A. L., 1999. Topological Bias and Inconsistency of Maximum Likelihood Using Wrong Models, Mol. Biol. Evol., 16, 564-566.
- Buth, D.G., 1990. Genetic Principles and The Interpretation of Electrophoretic Data, In: Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management (D. H. Whitemore, (Ed.), CRC Press Inc, Boca Raton, 1-21.
- Carvalho, G.R. ve Pitcher, T.J., 1995. Molecular Genetics in Fisheries. First Edition. Chapman and Hall, London.
- Chakraborty, A, Aranishi, F. ve Iwatsuki, W., 2006. Genetic differences among three species of the genus *Trichiurus* (Perciformes: Trichiuridae) based on mitochondrial DNA analysis. Ichthyol Res., 53, 93-96.

- Chao, L.N., 1978. A Basis For Classifying Western Atlantic Sciaenidae (Teleostei, Perciformes). NOAA. Technical Report Circular, 415,1-64.
- Churchill, G.A., 1992. Hidden Markov Chains and The Analysis of Genome Structure, Computers and Chemistry, 16, 107–115.
- Clayton, D.A., 1991. Replication and Transcription of Vertebrate Mitochondrial DNA, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 7, 453-478.
- Cocolin, L., Dagaro, E., Manzano, M., Lanari, D. ve Comi, G., 2000. Rapid PCR-RFLP Method For The Identification of Marine Fish Fillets (Seabass, Seabream, Umbrine and Dentex). Journal of Food Science, 65, 8.
- Cui, Z., Liu, Y., Pang, L.C., You, F. ve Chu, K.H., 2009. The Complete Mitochondrial Genome of The Large Yellow Croaker, *Larimichthys Crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual Features of Its Control Region and The Phylogenetic Position of The Sciaenidae. Elsevier, Gene, 432 33–43.
- Çiftçi, Y. ve Okumuş, İ., 2002. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2,2, 145-155.
- Çiftçi, Y., Eroğlu, O., Firidin Ş. ve Ertekin, A., 2007. Türkiye Kahverengi Alabalık (*Salmo trutta* L.) Populasyonlarının Genetik Yapısının Belirlenmesi, Proje No: TAGEM HAYSÜD/2001/09/03/08, Trabzon.
- Çiftçi, Y., 2006. Türkiye Alabalık (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758 ve *Salmo platycephalus* Behnke,1968) Populasyonlarının Genetik Yapısının mtDNA-RFLP Analiz Yöntemiyle Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Davidson, W.S. Birt, T.P. ve Green, J.M., 1989. Organization of the mitochondrial genome from Atlantic salmon (*Salmo salar*), Genome, 32, 340-342.
- Desjardins, P. ve Morais, R., 1990. Sequence and Gene Organization of Chicken Mitochondrial Genome. J. Mol. Biol., 212: 599-634.
- Engin, S., 2003. Doğu Karadeniz Kıyısı Ekosistemindeki Eşkina Balığının (*Sciaenidae umbra*) Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ergüden, D., 2007. Türkiye Denizlerindeki Tirsilerin (*Alosa* spp.) Moleküler Sistematığı, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Eroğlu, O., 2008. Karadeniz'in Türkiye Kıyılarında Dağılım Gösteren Mersin Balığı Türlerinin (*Acipenser stellatus*, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Huso huso*) Mitokondrial Dna Sekans Analizi Yöntemiyle Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary Trees From Gene Frequencies and Quantitative Characters: Finding Maximum Likelihood Estimates, Evolution, 35, 1229-1242.
- Ferguson, A., Taggart, B., Prodöhl, P.A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, C. ve Hynes, R.A., 1995. The Application of Molecular Markers To The Study and Conservation of Fish Populations, With Special Reference To Salmo. Journal of Fish Biology, 47, A, 103-126.
- Fitch, W.M., 1977. On The Problem of Discovering The Most Parsimonious Tree, American Naturalist, 111, 223-257.
- Gilles, A., Miquelis, A., Quignard, J.P. ve Faure, E., 2000. Molecular Phylogeography of Western Mediterranean Dusky Grouper *Epinephelus marginatus*. C R Acad Sci Paris, Sciences de La Vie / Life Sciences, 323, 195-205.
- Grewe, P.M. ve Hebert, P.D.N., 1988. Mitochondrial DNA Diversity Among Broodstocks of The Lake Trout, *Salvelinus namaycush*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45, 2114-2122.
- Grinsted, J. ve Bennett, P.M., 1988. Analysis of Plasmid DNA with Restriction Endonucleases, In Methods in Microbiology Volume 21 Plasmid Technology 2nd Edition, Academic Press, London, 0-12-521521-5.
- Guo, X.H., Liu, S.J., Liu, Q. ve Liu, Y., 2004. New Progresses on Mitochondrial DNA in Fish. Acta Genet. Sin. 31, 983–1000 (English abstract).
- Hansen, M.M. ve Loeschcke, V., 1996. Temporal Variation in Mitochondrial DNA Haplotype Frequencies in A Brown Trout (*Salmo trutta* L.) Population That Shows Stability in Nuclear Allele Frequencies. Evolution, 50, 454–457.
- Harrison, R.G., 1989. Animal Mitochondrial DNA As A Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology, Tree, 4, 6-11.
- Hasegawa, M., Kishino, H. ve Yano, T., 1985. Dating the Human-Ape Splitting By A Molecular Clock of Mitochondrial DNA, J. Mol. Evol., 22, 160–174.
- Hedges, S.B., 1992. The Number of Replications Needed for Accurate Estimation of the Bootstrap P Values in Phylogenetic Studies, Mol. Biol. Evol., 9, 366-369.
- Hsu, K., Shih, N., Ni, I. and Sao, K., 2007. Genetic Variation in *Trichurus lepturus* (perciformes: Trichiuridae) in Waters of Taiwan: Several Species or Cohort Contribution, The Raffles Bulletin of Zoology, 14, 215-220.
- Huelsenbeck, J.P. ve Hillis, D.M., 1993. Success of Phylogenetic Methods in The For-Taxon Case, Systematic Biology, 42, 247-264.

- Huelsenbeck, J.P., 1995. Performance of Phylogenetic Methods in Simulation, Systematic Biology, 44, 17-48.
- Imisiridou, A. ve Zaldivar, J.M., 1999. Methodology and Formats for Stock Identification of Fish Species. European Commission. Joint Research Center, Institute for Systems, Informatics and Safety Tech. Note, I,99,16.
- Kim J.K., Kim Y., Kim M. ve Park J.Y., 2010. Genetic Diversity, Relationships and Demographic History of The Small Yellow Croaker, *Larimichthys Polyactis* (Pisces: Sciaenidae) From Korea and China Inferred From Mitochondrial Control Region Sequence Data Animal Cells and Systems, 14,1, 45-51.
- Klug, W.S. ve Cummings, M. R., 2003, Genetics: A Molecular Perspective, Pearson Education, 0-13-008530-8.
- Krieger, J. ve Fuerts, P.A., 2002. Evidence for a Slowed Rate of Molecular Evolution in the Order Acipenseriformes, Mol. Biol. Evol., 19, 891-897.
- Kumar, S., Tamura, K. ve Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. Briefings in Bioinformatics, 5, 150-163.
- Lakra W.S., Goswami M. ve Gopalakrishnan A., 2009. Molecular Identification and Phylogenetic Relationships of Seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) Based on 16S rRNA and Cytochrome c Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes Mol. Biol. Rep., 36, 831–839.
- Lansman, R.A., Shade, R.O., Shapiro, J.F. ve Avise, J.C., 1981. The Use of Restriction Endonucleases to Measure Mitochondrial DNA Sequence Relatedness in Natural Populations. Techniques and Potential Applications. Journal of Molecular Evolution, 17, 214-226.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. 2004. Principles of Biochemistry,. (4th Edition), W.H. Freeman & Co., New York.
- Lewis, P.O., 2001. Phylogenetic Systematic Turns Over a New Leaf, Tren.Ecol. and Evol., 16, 30-37.
- Lewontin, R., 1964. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations, Heterotic Models, Genetics, 49, 49-67.
- Maes, G.E., Van Houdt, J.K.J., De Charleroy, D. ve Volckaert, F.A.M., 2003. Indications For a Recent Holarctic Expansion of Pike Based on A Preliminary Study of mtDNA Variation. Journal of Fish Biology, 63, 254–259.
- Magoulas, A. ve Zouros, E., 1993. Restriction site Heteroplasmy in Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Indicates Incidental Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol., 10, 319-325.

- Mallery, C., Ribosome Structure [Online], University of Miami Department of Biology, http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm 27 Şubat 2010.
- Markert, C.L. ve Moller, F., 1959. Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic and Species Specific Patterns, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 45 753 763.
- Meyer, A., 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in Fish, In: Biochemistry and Molecular Biology of Fish, (P.W. Hochachka ve P. Mommsen, Eds.), Elsevier Press, 2, 1-38.
- Moritz, C., 1991. Evolutionary Dynamics of Mitochondrial DNA Duplications in Parthenogenetic Geckos, *Heteronotia binoei*. Genetics, 129, 221-230.
- Moritz, C., Dowling, T.E. ve Brown, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics, Annu. Rev. Ecol. Syst., 18, 269-292.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics, Columbi University press, New York, 505 s.
- Nei, M., 1991. Relative Efficiencies of Different Tree-making Methods for Molecular Data. In Miyamoto, M.M and Cracraft, J.(eds), Phylogenetic Analysis of DNA Sequences, Oxford University Press, New York, 90-128.
- Nelson, J.S., 1994 Fishes of the World. 3rd ed. John Wiley and Sons Inc., New York, 600 s.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M. ve Mensberg, K.L.D., 1998. Improved Primer Sequences for The Mitochondrial ND1, ND3/4 and ND5/6 Segments in Salmonid Fishes: Application to RFLP Analysis of Atlantic Salmon. Journal of Fish Biology, 53, 216-220.
- Okumuş, İ. ve Çiftçi, Y., 2003. Fish Population Genetics and Molecular Markers: II Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3,1, 51-79.
- Posada, D. ve Crandall, K.A, 1998. Modeltest: Testing The Model of DNA Substitution. Bioinformatics, 14, 817-818.
- Puchnick-Legat A. ve Levy J.A., 2006. Genetic Structure of Brazilian Populations of White Mouth Croaker *Micropogonias furnieri* (Perciformes : Sciaenidae) Brazilian Archives Of Biology And Technology, 49, 3, 429-439.
- Rodriguez, F., Oliver, J.F., Marin, A. ve Medina, J.R., 1990. The General Time Stochastic Model of Nucleotide Substitutions, J. Theoretical Biology, 142, 485-501.

- Rohlf, F.J., 1970. Adaptive Hierarchical Clustering Schemes, Systematic Zoology, 18, 58-82.
- Rzhetsky, A. ve Nei, M., 1993. Theoretical Foundation of the Minimum-Evolution Method of Phylogenetic Inference, Mol. Biol. and Evol., 10, 1073-1095.
- Saitou, N. ve Nei, M., 1987. The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, Mol. Biol. Evol., 4, 406-425.
- Saitou, N. ve Imanishi, T., 1989. Relative Efficiencies of the Fitch–Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum-likelihood, Minimum-evolution, and Neighbor joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree, Mol. Biol. and Evol., 6, 514–525.
- Santos, S., Hrbek, T.P., Farias, I., Schneider, H. ve Sampaio, I., 2006 Population Genetic Structuring of The King Weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic Coastal Waters of South America: Deep Genetic Divergence Without Morphological Change, Molecular Ecology, 15, 4361–4373.
- Santos, S., Schneider, H. ve Sampaio, I., 2003. Genetic Differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) Populations in Atlantic Coastal Waters of South America As Revealed by mtDNA Analysis Genetics and Molecular Biology, 26, 2, 151-161.
- Schneider, S., Roessli, D. ve Excoffier, L., 2000. ARLEQUN: Software for Population Genetics Data Analysis (version 2.000). <http://lgb.unige.ch/arlequin>.
- Sick, K., 1961. Haemoglobin Polymorphism in Fishes. *Nature*, London. 192, 894-896.
- Silva, E.P. ve Russo, C.A.M., 2000. Techniques and Statistical Data Analysis In Molecular Population Genetics, Hydrobiologia, 420, 119-135.
- Smith, D.R., 1999. Restriction Endonuclease Digestion of DNA, In *The Nucleic Acid Protocols Handbook* (R. Rapley, (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 63-66.
- Sullivan, J. ve Swofford, D.L., 1997. Are Guinea Pigs Rodents? The Importance of Adequate Models in Molecular Phylogenetics, J. Mamm. Evol., 4, 77–86.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J, Waddell, P.J. ve Hillis D.M., 1996. Phylogenetic Inference. In: *Molecular Systematics 2*. Eds. (eds. Hillis, D.M, Moritz, C. ve Mable, B.K), Sinauer Associates, MA., 407-514,
- Takahata, N. ve Palumbi, S.R., 1985. Extranuclear Differentiation and Gene Flow in The Finite Island Model, Genetics, 109, 441–457.

- Tamura, F. ve Nei, M. 1993. Estimation of The Number of Nucleotide Substitutions in The Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. Mol Biol Evol., 10, 512-526.
- Temizkan, G., 1999. Genetik II: Moleküler Genetik, İ.Ü. Yayınları Sayı: 4067, Fen Fak. No:245, İ.Ü., Fen Fak. Basımevi, İstanbul, 975-404-429-9.
- Topal, A., 2004. DNA'nın İzalasyonu ve Analizi: Bölüm 2, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler* (Editörler Temizkan, G. ve Arda, N.), İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Arastırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGE), yayın no: 2, Nobel Tıp Kitabevleri, 975-420-347-4.
- Utter, F.M., 1991. Biochemical Genetics and Fishery Management: An Historical Perspective. Journal of Fish Biology, 39,A, 1-20.
- Vinson, C., Gomes, G., Schneider, H. ve Sampaio, I., 2004.Sciaenidae Fish of the Caeté River Estuary, Northern Brazil: Mitochondrial DNA Suggests Explosive Radiation For The Western Atlantic Assemblage Genetics and Molecular Biology, 27, 2, 174-180.
- Waldbiesser, G.C., Bilodeau, A.L. ve Nonneman, D.J., 2003. Complete Sequence and Characterization of The Channel Catfish Mitochondrial Genome. DNA Sequence, 14, 265-277.
- Wallace, D.C., 1986. Mitochondrial Genes and Diseases. Hospital Practice, 21, 77-92.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. ve Hebert, P.D.N., 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. Phil Trans Royal Soc., 360, 1847-1857.
- Ward, R.D. ve Grewe, P., 1994. Appraisal of Molecular Genetic Techniques in Fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4, 300-325.
- Yang, Z., 1993. Maximum-likelihood Estimation of Phylogeny From DNA Sequences When Substitution Rates Differ Over Sites, Mol. Biol. and Evol., 10, 1396-1401.
- Yang, Z., 1994. Maximum-Likelihood Estimation of Phylogeny From DNA Sequences With Variable Rates Over Sites: Approximate Methods, J. Mol. Evol., 10, 1396-1401.
- Zardoya, R. ve Meyer, A., 1996. Phylogenetic Performance of Mitochondrial Protein-Coding Genes in Resolving Relationships Among Vertebrates. Molecular Biology and Evol., 13, 933.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini Trabzon'da tamamladı. 1998 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi'nden Biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Özel Karadeniz Hastanesi'nde biyolog olarak çalışmaya başladı. 1999 yılında Tarım Bakanlığına bağlı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün açtığı sınavı kazanarak 4/B sözleşmeli Biyolog kadrosuyla Su Ürünleri Sağlığı bölüm başkanlığında göreve başladı. 2007 yılından itibaren Genetik bölümünde araştırmacı olarak çalışmakta ve yürütülen bir çok projede görev almaktadır. Orta derecede İngilizce bilmektedir.