



**KARAMIK GÖLÜ'NDEKİ TURNA BALIKLARI
(*Esox lucius* L.)'NİN DNA DİZİLEME YÖNTEMİYLE
MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif İŞİSAĞ

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Haziran 2021

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARAMIK GÖLÜ'NDEKİ TURNA BALIKLARI (*Esox lucius*
L.)'NİN DNA DİZİLEME YÖNTEMİYLE MOLEKÜLER
TANIMLANMASI**

Elif İŞİSAĞ

Danışman

Prof.Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Haziran 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARAMIK GÖLÜ'NDEKİ TURNA BALIKLARI (*Esox lucius* L.)'NİN DNA DİZİLEME YÖNTEMİYLE MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Elif İŞİSAĞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Çalışmanın amacı, Karamık Gölü'nde (Afyonkarahisar) turna (*Esox lucius* L.) türlerinin mitokondriyal sitokrom oksidaz (COI) gen lokus sekanslarının belirlenmesi ve DNA sekanslama yöntemi ile turna balıklarının moleküler tanımlamasının yapılmasıdır. Bu amaç için evrensel FishF1 ve FishR1 primerleri kullanılmıştır. mtCOI geninin 653 bp kısmi belirgin nükleotidleri, her örnekten doğrudan dizilenmiştir. 3 *Esox lucius* örneğine ait mtCOI gen dizilerinin tam özdeş olduğu tanımlanmış ve dizilerde hiçbir nükleotid varyasyonu tespit edilmemiştir. COI gen dizilerindeki nükleotid yüzdesi %23.1 (A) ve %32.1 (T) dir. PAUP ile elde edilen COI dizi veri kümesi mesafe matrisine göre, bu çalışmada tanımlanan *Esox lucius* izolatları (MW315200-MW315202) ile genbankta kayıtlı *Esox lucius* izolatları (KT716353, KT124233, MG951592, KC500713) arasında minimum varyasyon görülmüştür (%0.1). UPGMA analizinde, *Esox lucius* izolatları COI gen dizi verilerine göre aynı küme altında gruplanmıştır. Sonuç olarak, Karamık Gölündeki turna balıklarının COI gen dizileri ilk defa bu çalışmada tanımlanmış ve bu türe ait genetik özelliklerin küresel ölçekte belirlenmesi çalışmalarına katkı yapılmıştır. COI gen dizi sonuçları, anatomik ve morfolojik özelliklerine göre tanımlanan *Esox lucius*'un taksonomik konumunu doğrulamıştır.

2019, ix + 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: mtCOI, DNA, *Esox lucius*, Karamık gölü.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR IDENTIFICATION OF NORTHERN PIKE (*Esox lucius* L.) IN KARAMIK LAKE BY DNA SEQUENCING METHOD

Elif İŞİSAĞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

The aim of the study is to determine the mitochondrial cytochrome oxidase (COI) gene locus sequences of pike (*Esox lucius* L.) species in Karamık Lake (Afyonkarahisar) and to make molecular identification of pike fish by DNA sequencing method. For this purpose, the universal FishF1 and FishR1 primers were used. The 653 bp partial specific nucleotides of the mtCOI gene were sequenced directly from each sample. The mtCOI gene sequences of 3 *Esox lucius* samples were identified as identical and no nucleotide variation was detected in the sequences. The percentage of nucleotides in the COI gene sequences is 23.1% (A) and 32.1% (T). According to the distance matrix of the COI sequence dataset obtained by PAUP, a minimum variation (0.1%) was observed between *Esox lucius* isolates (MW315200-MW315202) defined in this study and *Esox lucius* isolates registered in the genbank (KT716353, KT124233, MG951592, KC500713). In UPGMA analysis, *Esox lucius* isolates were grouped under the same cluster according to the COI gene sequence data. As a result, the COI gene sequences of pike fish in Karamık Lake were defined for the first time in this study and contribution was made to the studies of determining the genetic characteristics of this species on a global scale. The COI gene sequence results confirmed the taxonomic position of the *Esox lucius* identified according to its anatomical and morphological characteristics.

2019, ix + 61 pages

Keywords: mtCOI, DNA, *Esox lucius*, Karamık lake.

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. M. Oğuz ÖZTÜRK'e teşekkür ederim. Tez savunma sınavında jüri üyesi olarak görev alan, tezin hacim ve içerik olarak genişletilmesi ile maddi hata düzeltmelerine katkıda bulunan Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şuhut Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu'ndan Doç. Dr. Yasin EREN ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Dr. Öğretim Üyesi Arzu ÖZKARA hocama çok teşekkür ederim. Tez çalışmasına ait örneklerin dizilemesi ve analizine katkıda bulunan Ankara BM Labosis çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Elif İŞİSAĞ

Afyonkarahisar 2021

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	2
2.1 Turna Balığı (<i>Esox lucius</i> L.)'nın Sistematik Konumu	2
2.2 Turna Balığı (<i>Esox lucius</i> L.)'nın Ulusal ve Uluslararası Yerel İsimleri	3
2.3 Turna Balığı (<i>Esox lucius</i> L.)'nın Biyolojik Özellikleri	4
2.4 Turna Balığı (<i>Esox lucius</i> L.)'nın Ekolojik Özellikleri.....	6
2.5 Turna Balığı (<i>Esox lucius</i> L.)'nın Kromozom Özellikleri	7
2.6 Turna Balığının Mitokondriyel DNA Gen Dizileri Üzerine Çalışmalar	8
2.7 DNA Dizileme Yöntemleri	14
2.7.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu.....	14
2.7.1.1 Kalıp DNA zincirinin açılması (Denaturation).....	15
2.7.1.2 Primer Bağlanması (Annealing)	15
2.7.1.3 Primer Uzaması (Extension)	17
2.7.1.4 Döngü Sayısı	17
2.7.1.5 PCR İşlemindeki Diğer Reaksiyon Unsurları	18
2.7.1.6 Genetik Belirteçler.....	21
2.7.2 Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) metodu	22
2.7.3 Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) metodu	23
2.7.4 Basit dizilim tekrarları (SSR) veya ardışık basit tekrarlar (STR) metodu	23
2.7.5 Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) metodu	24
2.7.6 DNA dizi analizi metodu	24
2.7.7 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) metodu	25

2.7.7.1 PCR tabanlı RFLP metodu	25
2.7.7.2 Southern emdirim (blotting) temelli RFLP metodu	26
2.8 Hayvansal Mitokondri Genomu (mtDNA)	27
2.9 Taksonomi İçin DNA Barkodlama Çalışmaları	29
3. MATERYAL ve METOT	33
3.1 Akarçay Havzası	33
3.2 Karamık Gölü	33
3.3 Araştırma Örneklerinin Temini	33
3.4 Araştırma Örneklerinin Disseksiyonu	38
3.5 Mitokondriyel DNA İzolasyonu	39
3.6 Mitokondriyel DNA Miktarının Spektrofotometrik Ortamda Hesaplanması	39
3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	40
3.8 Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Agaroz Jel Elektroforezi	41
3.9 COI Gen Bölgesinin Agaroz Jelden Geri Kazanılması ve Saflaştırılması	42
3.10 mtCOI Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi	43
3.11 Örnekler Arası Nükleotid Değişimlerine Ait Farklılıklar ve Filogram	43
4. BULGULAR	45
4.1. DNA İzolasyon Bilgileri	45
4.2 Dizileme Verileri	46
4.3 Filogram	48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bp	Baz çifti
dH ₂ O	Distile su
HCl	Hidroklorik asit
K	Potasyum
M	Molar
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
Nm	Nanometre
NaCl	Sodyum korür

Kısaltmalar

A	Adenin
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Di-nükleotid trifosfat
G	Guanin
mtCOI	Mitokondrial Sitokrom Oksidaz
PZR	Polimer zincir reaksiyonu
RAPD	Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RPM	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNPs	Tek nükleotid polimorfizmleri
T	Timin
TAE	Tris Asetikasit EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Ultra Viyole
V	Hacim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 Karamık Gölü haritası, Hasbek ve Arı (2018)'dan uyarlanmıştır.....	34
Şekil 4.1 <i>Esox lucius</i> örneklerine ait mtCOI gen dizilerinden çıkarılan UPGMA ağacı.	48



RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim2.1 Karamık Gölü’nden yakalanan <i>Esox lucius</i> örnekleri (orijinal).....	5
Resim 2.2 Sakarya Nehri’ndeki <i>E.lucius</i> ’un azalan büyüklükte 50 akrosentrik kromozom karyogramı.....	8
Resim 2.3 Güney Hazar Denizi havzası Anzali Lagünü’ndeki Turna balığının Karyotipi.....	9
Resim 2.4 <i>Esox lucius</i> ’un mitogenomik sekansı.....	32
Resim 3.1 Karamık Gölü genel görünüm (orijinal).....	35
Resim 3.2 Karamık Gölünden yerel balıkçılar yardımıyla turna balığı yakalama işlemi	35
Resim 3.3 Araştırma örneği olarak rastgele seçilen 3 adet <i>Esox lucius</i>	36
Resim 3.4 Etil alkol ortamında muhafaza edilen 3 adet <i>Esox lucius</i> örneği.....	36
Resim 3.5 <i>Esox lucius</i> örneklerinde boy ölçümü.....	37
Resim 3.6 DNA izolasyonu için 3 <i>Esox lucius</i> ’tan alınan karaciğer doku örnekleri.....	37
Resim 3.7 DNA izolasyon işlemi.....	38
Resim 4.1 <i>Esox lucius</i> örneklerinin mtCOI genine ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ve Marker DNA (kar: karaciğer, kas: kas dokuya ait PZR ürünleri).....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 <i>Esox lucius</i> 'tan mtCOI genini çoğaltma ve dizileme için kullanılan primerler.....	40
Çizelge 3.2 GenBank'tan alınan ve filogenetik analizde kullanılan taksonomik birimler	44
Çizelge 4.1 İncelenen <i>Esox lucius</i> örneklerine ait bilgiler.....	46
Çizelge 4.2 <i>Esox lucius</i> örneklerine ait mtCOI dizi verilerinin, NCBI üzerindeki en yakın izolata göre eşleşme ve benzerlik oranları.....	46
Çizelge 4.3 Karamık Gölü <i>Esox lucius</i> örneklerinin mtCOI dizi verileri.....	47
Çizelge 4.4 <i>Esox lucius</i> örneklerinin mtCOI dizisi A+T oranları.....	47
Çizelge 4.5 <i>Esox lucius</i> örneklerine ait mtCOI nükleotit dizi farklılıklarının (%) ikili karşılaştırılması.....	48

1. GİRİŞ

Populasyonların kimliklerine dair yeterli taksonomik anahtarlar ve alan kılavuzları mevcut olsa bile, araştırmacılar populasyonun genç bireyleriyle, henüz tanımlanmamış coğrafi varyantlarıyla veya eşeysel dimorfizimli bireylerle karşılaşabileceklerinden, alandaki organizmaları güvenle tanımlamak zordur. Bu süreçte örnekleri uygun ortamlarda muhafaza etmek, incelemek ve ölçmek genellikle pratik değildir. Ya da etik nedenlerden dolayı veya bazı organizmalar tehlikeli oldukları için olası değildir (Cerutti-Pereyra vd. 2012).

DNA barkodlama bilim insanları tarafından, tanımlanması gereken organizmalar üzerindeki çalışmalarının verimliliğini ve doğruluğunu desteklemek için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin savunucuları çoğunlukla, anahtar şablon örneklerine bağlı bir dizi DNA kitaplığının varlığına dayalı olarak, türlerin küresel anlamda tanımlanması için tek bir genin kullanılmasını savunmaktadırlar. Sonuçta bu DNA dizileri, organizmaları doğru tanımlamak için, gerçek bir DNA barkodu ödevi görmektedir (Wagh 2007, Ward vd. 2009).

Mitokondrial sitokrom c oksidaz I (COI) gen dizisinin tür içindeki varyasyonu, türler arasındakine göre daha düşük olduğu için 'küresel' bir barkod standardı olarak önerilmiştir. Araştırmalar, yaklaşık 650bp uzunluğundaki COI geni sekansının, DNA barkodlama için diğer genlere göre daha uygun olduğu dorulanması sonucu, ökaryot türlerin taksonomik konumlarının belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Hebert ve Gregory 2005, Kwong vd. 2012, Miller 2007).

Karamık Gölü (Afyonkarahisar)'ndekiturna balığının biyolojik özellikleri üzerine çalışmalar olmakla birlikte (Aksun 1987a,b, Aksun ve Kuru 1987, Balık vd. 2006), genetik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmanın amacı, Karamık Gölü'nde (Afyonkarahisar) turna balığı (*Esox lucius* L.) türünün mitokondriyal sitokrom oksidaz (COI) gen lokus sekanslarının belirlenmesi ve DNA sekanslama yöntemi ile turna balıklarının moleküler tanımlamasının yapılmasıdır. Çalışma sonucunda elde edilecek verilerle, bu türe ait genetik özelliklerin küresel ölçekte belirlenmesi çalışmalarına katkı sağlanacaktır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Turna Balığı (*Esox lucius* L.)'nın Sistematiği Konumu

Araştırma materyali olan turna balığının sistematiği konumu ile bilimsel sinonim isimleri aşağıda sıralanmıştır (İnt. Kay. 1).

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Grup II: Craniata

Altşube: Gnathostomata

Üst sınıf: Pisces

Sınıf: Osteichthyes

Alt sınıf: Actinopterygii

Üst takım: Teleostei

Takım: Esociformes

Alt takım: Esocidae

Familiya: Esocidae

Cins: *Esox*

Tür: *Esox lucius* Linnaeus, 1758 (Resim 2.1)

Sinonim isimler:

Esox boreus Agassiz, 1850

Esox estor Lesueur, 1818

Esox lucioides Agassiz ve Girard, 1850

Esox luciusatrox Anikin, 1902

Esox luciusbergi Kaganowsky, 1933

Esox lucius lucius wiliunensis Kirillov, 1962

Esox lucius variegatus Fitzinger, 1832

Esox nobilior Thompson, 1850

Esox reichertii baicalensis Dybowski, 1874

Luccius vorax Rafinesque, 1810

Lucius lucius (Linnaeus, 1758)

Trematina foveolata Trautschold, 1884

2.2 Turna Balığı (*Esox lucius* L.)'nın Ulusal ve Uluslararası Yerel İsimleri

Bilimsel ismi *Esox lucius* Linnaeus, 1758 olan turna balığı, Türkiye'nin farklı bölgelerinde Turna, Uzunca, Oklama, Dişli, Yılan Balığı, Ördek Gaga, Yeşilbaş ve Çivi Balığı gibi yöresel isimlerle bilinmektedir (Geldiay ve Balık 1988). Turna balığı kuzey yarıkürede de yaygın bir balık türüdür. Holoarktik coğrafik alanda yer alan ülkelerdeki uluslararası yerel isimleri aşağıda verilmiştir (Kuru 2011, İnt. Kay. 1).

Austria: hecht; pike

Azerbaijan: shchuka

Belarus: shchuka

Bulgaria: shuka

Canada: cinosa, cinoseo, grand brochet, great northern pickerel, great northern pike, hiulik, ihok, jack, jackfish, kikiyuk, northern pike, pickerel, pike, siulik, siulik, siun, sjulik, tchinouchao, tchukvak

Czech Republic: stika obecná

Denmark: gedde

Estonia: haug, hauki, pike

Finland: hauki

France: bec de canard, beked, brochet, brochet du nord, bouché, bouchet, bouchetta, hecht, lanceron, poignard, sifflet

Germany: bunthecht, Europäischer Hecht, Flußhecht, grashecht, Hecht, Hechten, heekt, Heichit, hengste, höcht, liede, scheckhecht, schnock, schnöck, schnuck, snook

Greece: toúrna, zoúrna

Hungary: csuka

Iceland: gedda

Iran: ordak Mahi, ordakmahi, shook Chehkhah

Ireland: lius

Italy: luccio

Japan: kawakamasu

Kyrgyzstan: kadimki chorton, shchuka obyknovennaya

Latvia: lidaka, shchuka

Lithuania: lydeka

Mongolia: pike
Netherlands: snoek
Norway: gjedde
Poland: szczupak
Portugal: lúcio
Romania: marlita, stiuca
Russian Federation: northern pike, obyknovennaya schuka, pike, shchuka
Serbia: stuka
Slovakia: stuka obycajná
Slovenia: scuka
Spain: lucio
Sweden: gädda
Turkey: turna baligi
UK: northern pike, penhwyad, pike
Ukraine: shtschuka
USA: American pike, common pike, Great Lakes pike, great northern pickerel, jack, jackfish, northern pike, pickerel, qalru, she, sheoak, siilik, snake, wolf
USA/Alaska: qalru, she, sheoak, siilik
Uzbekistan: northern pike
Yugoslavia (Serbia and Montenegro): stuka

2.3 Turna Balığı (*Esox lucius* L.)'nın Biyolojik Özellikleri

Turna balığında ortalama boy uzunluğu 40 cm olmakla birlikte, 137-150 cm ye kadar ulaşabilmektedir. Ortalama ağırlığı 3-5 kg olup bu güne kadar kaydedilen en fazla ağırlık 28.4 kg dır. Ortalama ömürleri 10 yıl, en uzun yaş sınırı ise 30 yıldır. Turna balığı, dorsal yüzeyinde zeytin yeşili ve açık yeşilden kahverengiye değişen renkte uzun bir gövdeye sahiptir. Yanları beyazımsı lekeler taşır. Karın bölgesi açık sarı ya da kirli beyaz renktedir. Sırt yüzgeci anal yüzgecin biraz önündedir. Vücudun arka tarafında yer alan bu iki yüzgeç, balığın daha hızlı hareket etmesine ve ani atak yapmasına olanak sağlar. Yuvarlak ve kürek şeklinde olan pelvik yüzgeçler operkülün hemen altındadır. Pektoral yüzgeçler, vücudun ventralindedir. Turna balığında 17-25 dorsal ışın, 10-22 anal ışın, 19 kaudal ışın ve 57-65 omur vardır. *E.lucius*'un ördek gagası şeklindeki

kafası, toplam vücut uzunluğun %25-30'unu oluşturur. Başın ön tarafı uzun olup, dorso-ventral yönde yassılaştırmıştır. Alt çene ileri doğru uzamıştır. Alt çene kenarlarında kuvvetli, sivri ve eklemlili dişler bulunur. Alt çenenin her iki tarafında beşer duyuşal gözenek vardır. Üst çene kısa ve dişsizdir. Gövde ve başın çoğı küçük sikloid pullarla kaplıdır. Gözler dorso-lateralde, sarı renkli ve oldukça hareketlidir (Morrow 1980).



Resim 2.1 Karamık Gölü'nden yakalanan Turna balığı örnekleri (orijinal)

Olgunluk dönemine 4-5 yaşında ulaşır. Yumurta bırakma Mart-Nisan aylarında gerçekleşir. Üreme döneminde yumurtlamak için kıyıya veya bataklık alanlarına doğru hareket eder. Genellikle gün içinde yumurtlama olur. Genellikle 17 cm'den daha sığ sularda bitki örtüsünün içinden ve üzerinden yüzerek, düzensiz aralıklarla eş zamanlı olarak yumurta salar. Yumurtalar, 2-5 günlük bir süre boyunca su altındaki bitki örtüsünde gelişir. Bir seferde sadece 5 ila 60 yumurta salınır, bu hareket birkaç saate kadar birkaç dakikada bir tekrarlanır, tüm yumurtaların boşalması birkaç gün alabilir. Yaklaşık 5kg ağırlığındaki anaç balık yaklaşık 90.000 yumurta bırakabilir. Yumurtalar 2-3 mm çapında ve kavuniçi rengindedir Anaç balık, 6-14 haftaya kadar yumurtlama alanında kalır (Geldiay ve Balık 1988).

2.4 Turna Balığı (*Esox lucius* L.)'nın Ekolojik Özellikleri

Doğal ortamlardaki balık popülasyonlarının ekolojik özelliklerini tanımlama çalışmaları, faunanın tanımlanması, biyo-çeşitliliğin korunması ve sürdürülmesi bakımından önemlidir. Farklı sucul habitatlardaki balık türlerinin bilinmesi, ilgili sucul ortamların karakteristik özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra, balık türlerinin ekolojik özellikleri hakkında değerlendirme yapılmasına fırsat oluşturmaktadır. Ekonomik değere sahip balık türlerinin biyo-ekolojik özelliklerinin farklı sucul alanlarda çalışılması söz konusu taksonun yerel ekosistemdeki etkilerinin ve muhtemel koruma durumlarının belirlenmesi bakımından faydalı olmaktadır. Sucul komüniteleri meydana getiren türler arasındaki rekabet ile habitatın biyo-ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi, komünitedeki popülasyonlar üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Vatandoust vd. 2014).

Turna balığı (*Esox lucius*), ekonomik ve sportif balıkçılık değeri yüksek olan ve bu nedenle birçok sulak alanda popülasyon büyüklüğü azalan bir türdür. Turna balığı sucul ekosistemlerdeki istilacı olarak bilinen balık türleri ile mücadele amaçlı olarak da kullanılan predatör özellikte bir canlıdır. Ayrıca turna balığının başta sıcaklık olmak üzere ekolojik toleransının yüksek olması nedeniyle, farklı özellikteki sulak ortamlara kolaylıkla uyum sağlayabilmektedir (Craig 2008).

Turna balığının, ortamdaki av türlerinin yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığı ve balık topluluklarında büyük ölçekli değişikliklere neden olma potansiyeline sahip olduğu, hatta bazı türlerin neslinin tükenmesiyle sonuçlandığı gösterilmiştir. Turna balığı, berrak bitki örtülü göllerde, sakin havuzlarda, derelerin durgun yerlerinde ve küçük nehirlerde bulunur. Genellikle tek başına yaşar ve bölgesel yaşam alanı oluşturur. Yetişkinler çoğunlukla balıklarla beslenirler, ancak bazen kurbağalar ve kerevitlerle de beslenirler. Gençleri omurgasızlar ve kara omurgalılarıyla beslenir, büyük bireyler çoğunlukla karnivordur. Turna dışkısı, alarm feromonları içerdikleri için diğer balıklar tarafından tanınır. Bu nedenle dışkısını yiyecek arama alanından uzakta, belirli yerlere bırakır. Genellikle uzun göçler yapmaz, ancak nadiren önemli mesafeler kat edebilir. Bu tür üzerine çok sayıda kültürlenme çalışması olmasına rağmen, suni yemleri kabul etmediği için evcilleştirilememiştir (Morrow 1980).

Turna balığı kuzey yarımkürede geniş coğrafik alanlarda doğal yayılış gösteren bir türdür. Tatlı ve acı sularda potamodrom karakterde yaşayan 10°C-28°C su sıcaklığındaki ortamlarda yaşayan tür olarak tanınır. Genellikle 1-5 m derinlikteki sular ile sucul makrofitlerin bulunduğu alanlar, ideal yaşam ortamıdır (Kuru 2011).

Turna balığı Türkiye iç sularında genellikle, Sakarya ve Seyhan nehirleri ile Büyük Çekmece, Küçük Çekmece, Sapanca, Manyas, İznik, Uluabat, Akşehir, Eber, Işıklı (Çivril) ve Karamık göllerinde yaşamaktadır (Geldiay ve Balık 1988).

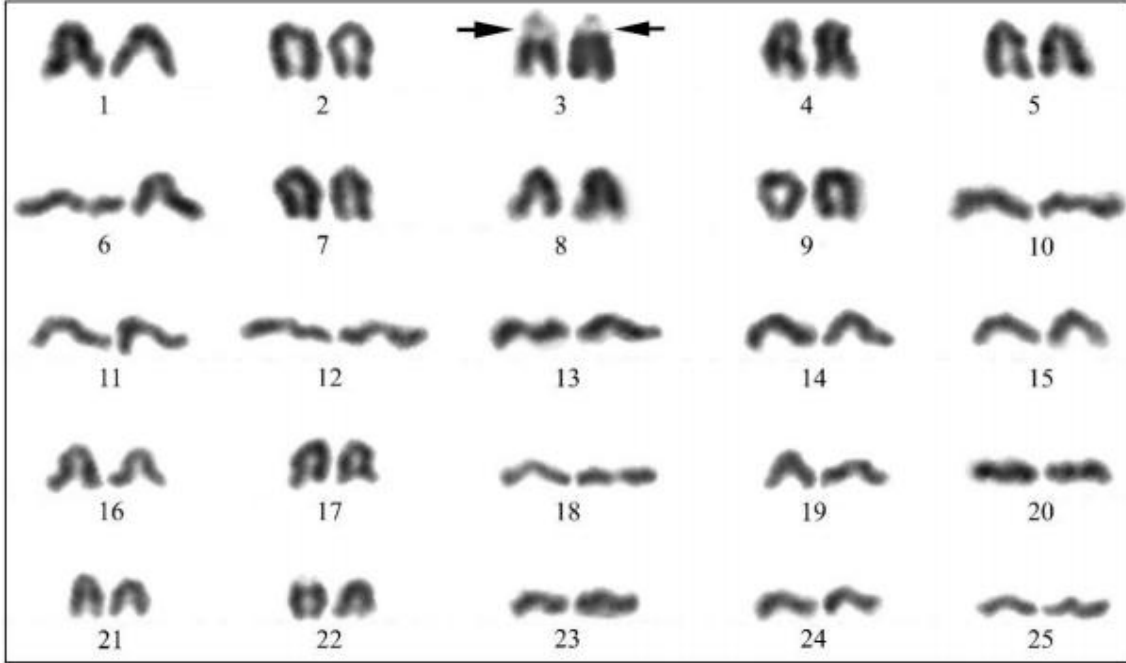
2.5 Turna Balığı (*Esox lucius* L.)'nın Kromozom Özellikleri

Zou vd. (2006), Sincan eyaletindeki Ertix nehrinden toplanan 5 adet *Esox lucius* örneğinin mitotik kromozomlarını ve karyotipini PHA ve kolşisin enjekte ederek çalışmıştır. 25 çift, N=50 kromozomun tamamı telosentrik özellikte bulunmuştur. Kromozom uzunlukların kademeli olarak uygun sırada azaldığını belirlemiştir.

Turna balığının kromozom sayısı $2n=50$ dir. Bu türün kromozom özellikleri üzerine çalışma yapan Arslan ve Alpaslan (2020), Sakarya Nehri'ndeki *E.lucius*'un sitogenetik özelliklerini Giemsa boyama yöntemiyle C-/Ag-NOR bantlama teknikleri kullanarak incelemiştir. Çalışma sonucunda incelenen turna balıklarının diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak tanımlanmış olup, karyotipin azalan büyüklükte 50 akrosentrik kromozomdan oluştuğu kaydedilmiştir. Karyotipte, üçüncü otozomal çiftte ikincil boğum gözlenmiştir. Erkek ve dişi bireylerde morfolojik olarak ayırt edilebilir cinsiyet kromozomları tespit edilmediği vurgulanmıştır. Bazı kromozomların sentromerik C pozitif iken, bazıları negatif bulunmuştur. Aktif NOR'ların üçüncü otozomal çiftin perisentromerik bölgesinde yer aldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar (2020), bulgularının diğer çalışmaların sonuçları ile benzer olduğunu ve bu durumda türün sitogenetik özelliklerinin oldukça stabil olduğu işaret edilmiştir (Resim 2.2).

Güney Hazar Denizi havzasındaki Anzali Lagününden yakalanan turna balığının karyotipi geleneksel giemsa kromozom boyama yöntemi ile araştırılmıştır (Khoshkholgh vd. 2015). Metafaz evresindeki kromozomlar %7 Giemsa solüsyonu ortamında 15 dakika boyanmış ve daha sonra fotoğraflanmıştır. İncelenen tüm örneklerde 50 kromozom ($2n = 50$) bulunmuştur. Kromozomlar centromer özelliklerine

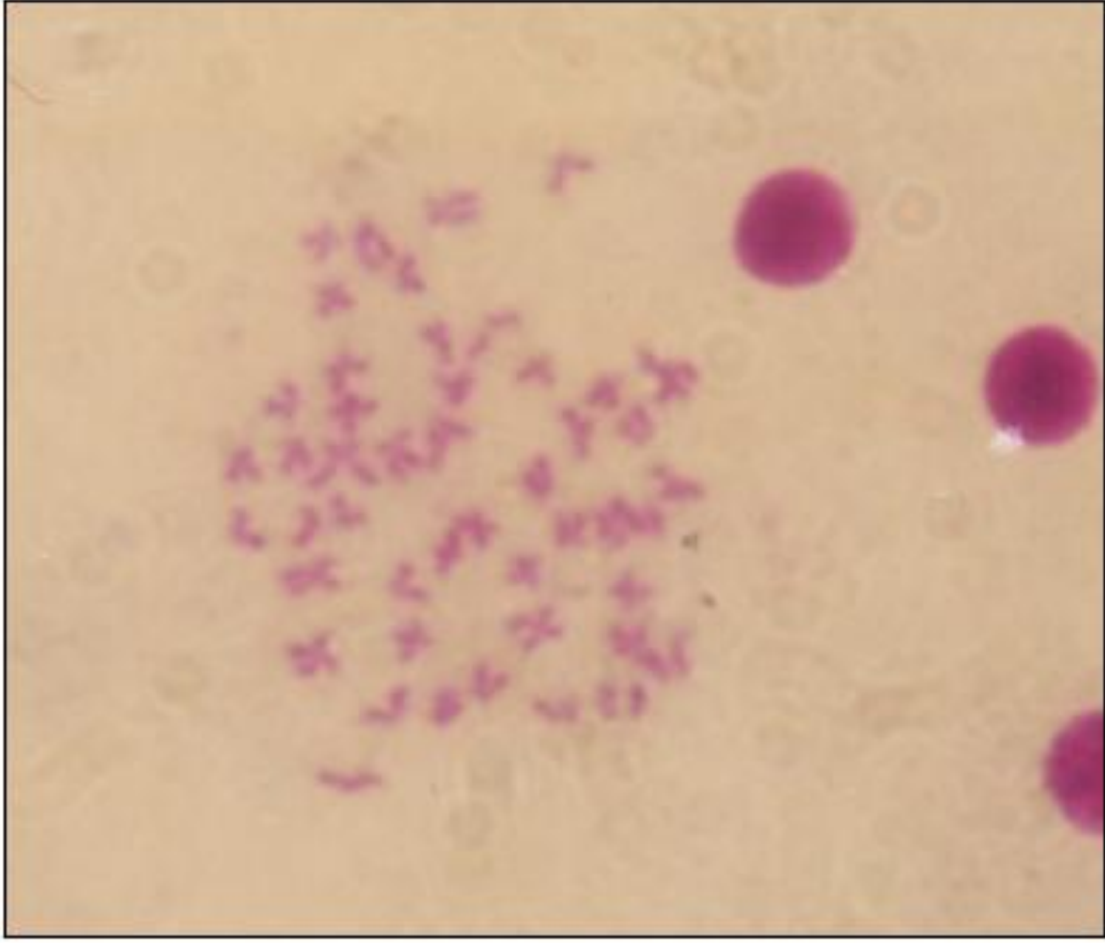
göre 12 metasentrik, 24 submetasentrik ve 14 subtelosentrik özellikte belirlenmiştir. Bu türdeki en büyük kromozom bir çift metasentrik kromozom tanımlanmıştır. Araştırmacılar (2015) söz konusu çalışma alanındaki balıkların kromozomlarının centromerik özellik yönünden, diğer araştırmacıların çalışmalarda bulunanlardan farklı olduğunu, bunu da farklı popülasyonların farklı özellikleriyle açıklamışlardır (Resim 2.3).



Resim 2.2 Sakarya Nehri'ndeki *E. lucius*'un azalan büyüklükte 50 akrosentrik kromozom karyogramı. Ok: Üçüncü otozomal çiftte ikincil boğum (Arslan ve Alpaslan 2020).

2.6 Turna Balığının Mitokondriyel DNA Gen Dizileri Üzerine Çalışmalar

Nicod vd. (2004), Avrupa'nın büyük drenaj sistemlerinden gelen *Esox lucius* popülasyonları arasında düşük seviyelerde mitokondriyel DNA varyasyonu gözlemiştir. Güney İsviçre dahil olmak üzere İtalyan yarımadasındaki popülasyonların diğer örneklerden genetik olarak farklı olduğu belirlenmiştir.



Resim 2.3 Güney Hazar Denizi havzası Anzali Lagünündeki Turna balığının karyotipi (Khoshkholgh vd. 2015).

Jacobsen vd. (2005), *Esox lucius*'un düşük genetik değişkenlik gösteren bir tatlı su balığı olduğunu, bunun nedeninin popülasyonların kendi aralarındaki az etkileşimlerden mi, yoksa tarihsel darboğazlı göç yollarından mikaynaklandığının bilinmediğini ifade etmiştir. Çalışmada, Avrupa ve Kuzey Amerika'dan on popülasyonda altı mikro uydu lokusu analiz edilmiştir. Sonuçta, genetik çeşitlilik düşük kaydedilmiş ve popülasyonlar içindeki ortalama alel sayısı lokus başına 2.3 ile 4.0 arasında değiştiği belirlenmiştir. Buna karşın genetik farklılaşmanın popülasyonlar arasında yüksek olduğu tespit edilmiştir (genel $qST = 0.51$, genel $rST = 0.50$). Bu kapsamda, yapılan çalışma ile popülasyonlar arasındaki genetik uzaklıkların çok boyutlu ölçeklendirme analizi ve moleküler varyansın uzamsal analizi, Kuzey Avrupa'dan örneklenen popülasyonlar içinde tek bir filocoğrafik ırk olduğunu öne sürerken, Kuzey Amerika ve Güney Avrupa popülasyonlarının oldukça farklı olduğu kaydedilmiştir.

Sepulveda vd. (2018), çevresel DNA (eDNA)'nın, suda yaşayan istilacı türlerin tespit olasılıklarını iyileştirdiğini, ancak eDNA analizleri için laboratuvar tabanlı analitik platformların, hızlı sonuç fırsatlarını yavaşlattığını belirtmektedir. Bu analitik darboğazı ele alan ve hızlı yanıt verme kapasitesini artıran etkili yaklaşımlara acilen ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmada, Alaska'nın Kenai Yarımadası'ndaki sekiz gölde istilacı turna balığı (*Esox lucius*)'nı tespit etmek için, yaygın olarak kullanılan laboratuvar tabanlı eDNA yaklaşımlarına göre taşınabilir, alan tabanlı bir eDNA cihazların hassasiyeti test edilmiş ve bu cihazların istilacı tür programları için oldukça faydalı olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, taşınabilir eDNA ayraçlarının çok çeşitli su koşullarında uygulanmasını iyileştirmek için iki alanda ek araştırmalar yapılmasını vurgulanmıştır. İlk olarak, taşınabilir eDNA platformlarının, inhibisyona neden olan organik bileşiklere karşı sağlam olması vurgulanmıştır. Bunun için numuneleri seyreltmek ve ortamdaki inhibitörleri uzaklaştırmak için DNA ekstraksiyon kiti geliştirilmesi tavsiye edilmiştir. İkinci olarak, taşınabilir eDNA ayraçlarının büyük hacimlerdeki suyu analiz edebilme yeteneğinde olmaları tavsiye edilmiştir. Böylece daha büyük su hacimlerinin filtrelenmesi mümkün olabilecek ve nadir DNA örneklerinin tespit olasılığının artacağına atıf yapılmıştır (Turner vd. 2014).

Lucentini vd. (2011), Avrupa'da iki turna balığı türü var olduğu hipotezini desteklemek için, Güney Avrupada turna balığı örneklerinin taksonomik konumu ele alınmış, morfoloji, DNA taksonomisi ve popülasyon genetiği parametrelerinden bir dizi test ve karşılaştırma gerçekleştirmiştir. COI, Cytb, AFLP ve belirli parçacıklar tarafından desteklenen bir kuzey genotipi ile yuvarlak lekeli ten rengi desenine sahip bir fenotip ve yanıl çizgide çok sayıda ölçek arasında güçlü bir ilişki ortaya çıkmış, güney genotipinden diğer cilt rengi deseniyle açıkça ayrılmıştır. DNA taksonomisi, bağımsız olarak gelişen iki türün varlığını desteklemiştir. Kuzey Avrupa örnekleri daha fazla olduğundan, bu tür farklılıklar sadece coğrafi mesafelerden kaynaklanmamıştır. Kanada ve Çin örneklerine Güney Avrupa örneklerine benzemektedir. Bu nedenle, iki Avrupa turna grubu arasındaki farkların fenotipik, genotipik ve coğrafi seviyelerde önemli olduğu göz önüne alındığında, kuzey turna balığı (*Esox lucius*) ve güney turna balığı (*Esox flaviae*) olmak üzere iki turna balığı türünün tanımlanması önerilmiştir.

Bir moleküler yöntem olarak DNA barkodlama tekniğinin, taksonları tanımlama amacı ile kullanılması yöntemi ele alınmış ve DNA barkodlamanın diğer yöntemlerden farkı açıklanmıştır. Mitokondrial sitokromoksidaz (mtCOI) geninin seçilme gerekçeleri tanımlanmıştır. DNA barkodlama tekniklerine ait bilgilerin yanı sıra, uygulamada karşılaşılan zorluklara yer verilmiştir. Ayrıca, DNA barkodlama çalışmaları ile filogeni ve populasyon genetiği çalışmalarının etkileşimi ele alınmıştır (Keskin ve Atar 2013a).

Yine farklı bir araştırmada, Türkiye ihtiyofaunasında bulunan ve ticari açıdan önemli olan 89 tatlı su ve deniz balığı türü DNA barkodlama yöntemi ile tanımlanmıştır. Bunun için mitokondriyal sitokrom oksidaz (mtCOI) geni kullanılmıştır. 89 balık türünün hepsi farklı bir DNA barkoduyla tanımlanmıştır. Bu türlere ait mtCOI barkod kümeleri BOLD ve GenBank veritabanlarına gönderilen ilk tür kayıtlarını temsil ettiği bildirilmiştir. Veri setinin ortalama nükleotid frekansları T=% 29.7, C =% 28.2, A =% 23.6 ve G =% 18.6 olarak hesaplanmıştır. Bireyler arasındaki ortalama ikili genetik uzaklık, akraba, doğuştan, aile içi ve sırayla sırasıyla %0.32, %9.62, %17,90 ve %22.40 olarak tahmin edilmiştir. Veri setinde analiz edilen türlerin çoğu için bir barkod boşluğu bulunmuştur. Filogenik veriler, DNA barkodlarına göre çizilmiş ve tür düzeyindeki taksonomik sınıflandırmalarına uygun olarak kümelendiği bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, balıkçılığın korunması ve yönetiminde DNA barkodlamanın etkili bir moleküler araç olduğu belirlenmiştir (Keskin ve Atar 2013b).

Diğer bir çalışmada, yerli olmayan tatlı su türlerinin, yerli türler üzerindeki olumsuz etkilerinin giderek daha fazla anlaşıldığı bununla birlikte, istilacı tatlı su balıklarının genetik tanımlamasına kısmen daha az ilgi gösterildiği Türkiye'de bu alanda hemen hemen hiçbir çalışma yapılmadığı belirtilmiştir. Çalışma kapsamında, mitokondriyal sitokrom oksidaz (mtCOI) dizilerini kullanarak istilacı tatlı su balık türlerinin (*Carassius auratus*, *Carassius gibelio*, *Gambusia holbrooki*, *Lepomis gibbosus* ve *Pseudorasbora parva*) genetik çeşitliliği tanımlanmıştır. Kimura iki parametrelili genetik uzaklıklar türler arası mesafe için 0.209 ve tür içi varyasyon için 0.009 olarak hesaplanmıştır. Aynı türün popülasyonları arasındaki mtCOI barkod farklılığı % 0.5 gibi düşük değerde bulunmuştur. Sonuçta, tür düzeyinde tanımlamalar ve popülasyonlar arasında tür içi farklılıkları ortaya çıkarmak için DNA barkodlama yaklaşımının doğruluğu belirtilmiştir (Keskin vd. 2013).

Esox cisalpinus (Teleostea: Esocidae) (sinonim: *Esox flaviae*), kökeni Kuzey ve Orta İtalya ile sınırlı olan bir İtalyan tatlı su otokton balığıdır. Bununla birlikte, bu tür tarihsel olarak Güney İtalya'nın çeşitli bölgelerinde özellikle portif olta balığı olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, türün yakın zamanda bir gölde tanındığı Sardunya adasındaki (Batı Akdeniz, İtalya) *E. cisalpinus*'un ilk kaydı sunulmuştur. Tür tanımlama ve popülasyon dinamik analizi, mitokondriyal belirteçler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *E. cisalpinus*'un diğer yarımada popülasyonlarına kıyasla genetik değişkenlik seviyesi şaşırtıcı derecede yüksek olduğu belirlenmiş ve daha önce hiç tanımlanmamış birkaç haplotip bulunmuştur (Casu vd. 2016).

Gandolfi vd. (2017), *Esox flaviae* türünün, egzotik *E. lucius*'un yayılmasıyla potansiyel olarak yüksek tehdit altında olan İtalyan yarımadasının yerli esosit bir türünü temsil ettiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, yerli ve egzotik türlerin dağılımını tasvir etmeyi ve potansiyel introgresif hibridizasyonu ortaya çıkarmayı amaçlayan 13 test ve 3 referans örneği içeren yeni bir mtDNA ve mikro uydu veri setini sunmuştur. Her iki türün karmaşık mozaik dağılımında, komşu yaşam alanları arasında bile genetik farklılık olduğu vurgulanmıştır (Gandolfi vd. 2017).

Yang vd. (2016), tarafından, DNA barkodlamanın, hızlı ve doğru tür tanımlaması sağlayan moleküler bir tanı yöntemi olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, Irtysh Nehri Çin'deki 33 türün 650 bp uzunluğundaki mitokondriyal sitokrom oksidaz (mtCOI) geni sekanslanmış ve analiz edilmiştir. Kimura'nın ortalama tür içi, cinsi, ailesi ve sıralaması iki parametre (K2P) mesafeleri sırasıyla 0.003, 0.060, 0.163 ve 0.240 olarak bulunmuştur. *Barbatula* ve *Cobitis* cinsi arasındaki genetik mesafe en büyüğüken, *Hypophthalmichthys* ve *Aristichthys* cinsi arasındaki genetik mesafenin en küçük olduğu kaydedilmiştir.

Roy vd. (2018), DNA barkodlama teknolojilerinin, yüksek verimde sıralama ve çevresel DNA (eDNA) izleme gibi algılama araçlarının kullanılması, potansiyel istilacı türlerin girişini önlemede giderek daha önemli hale geldiğini ifade etmiştir. eDNA'nın gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile kombinasyonu, hızlı ve spesifik bir saptamaya sahip olma fırsatı sağladığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, yüksek riskli türlerin yasal olarak ithal edilen ve yerli türlerden güvenle ayırt edilebilmesi için yeterli derinliğe sahip bir DNA dizisi

kitaplığı geliştirmiştir. Toplu su örneklerinde 13 potansiyel istilacı türün (pAIS) saptanması için toplam 12 tre özgü qPCR testi yapılmıştır. Bu türlerin tespiti de bir HTS yaklaşımı ile karşılaştırılmıştır. Düşük yoğunluklarda eDNA kullanılarak qPCR tahlillerinin yüksek hassasiyeti belirlenmiştir. Böylece oluşturulan mini barkodlar ile iyi bir algılama hassasiyeti tanımlanmıştır.

Artamonova vd. (2018) tarafından, 11 Salmonoid balık cinsinin örneklerinde mitokondriyal COI geninin kısmi dizileri analiz edilmiştir. Buna göre, Osmeroidei taksonunun, salmonoid grubuna Esocoidei'den daha yakın olduğu görülmüştür. *Salvelinus*'un ata soylarına en yakın modern salmonoid cinslerinden biri olduğu sonucuna varılmıştır. *Brachymystax*, *Hucho* ve *Salmo* cinslerinin filogenetik yakınlık olguları da doğrulanmıştır.

Hernandez vd. (2020) tarafından, evresel DNA'nın (eDNA) pratik uygulamaları, özellikle tatlı su metazoanların değerlendirilmesi ve izlenmesi için artan oranda genişleme aşamasında olduğu belirtilmiştir. eDNA örnekleme ve analizi, non-invaziv olduğundan, izleme zorluğu olan tehdit altındaki istilacı ve istismar edilen türlerin tespitini kolaylaştırmaktadır. Araştırmacılarca, Kanada'nın Qubec eyaletindeki çeşitli eDNA izleme projelerinin bir parçası olarak; 45 balık, altı amfibi, beş sürüngen, iki yumuşakça ve iki kabuklu hayvan için geliştirilmiş toplam 60 tre özgü qPCR testi (PCR protokolleri, primerler ve Taq Manprob dizileri dahil) rapor edilmiştir. Elde edilen verilerin, yalnızca Qubec merkezli izleme çalışmaları için değil, aynı zamanda Kuzey Amerika'daki türlerde de faydalı olduğu vurgulanmıştır (Hernandez vd. 2020).

Bayçelebi (2020), Seyhan, Ceyhan ve Asi Nehri drenajlarının iktiyofaunası araştırmış ve türlerin taksonomik konumlarını değerlendirmiştir. Türkiye ve Suriye'deki bu nehir drenajlarından 32 cins'e ait 67 tür ve 17 balık ailesi rapor edilmiştir. Çalışma alanında *Acanthobrama centisquama* ve *Tinca tinca* gözlenmemiş olup, ilk kez *Alburnus sellali* ve *Esox lucius* Gölbaşı Gölü (Ceyhan Nehri'ne bağlı) ve Seyhan Nehri'nde kayıt edilmiştir.

2.7 DNA Dizileme Yöntemleri

Taksonomik birimler arasındaki genetik benzerlik veya farklılıkların belirlenmesinde klasik anatomik, morfolojik ve fizyolojik özelliklerin yanı sıra genomik karakterlerden de yararlanılmaktadır. Taksonların genetik yapılarındaki farklılıkların meydana gelmesindeki ana etken mutasyondur. Mutasyon genetik materyalde meydana gelen kararlı değişiklikler olarak tanımlanır. Genetik yapının değişmesinde, homolog olmayan kromozomlar arasındaki parça değişimleri olarak bilinen translokasyon ile crossing-over olarak bilinen homolog kromozomlar arasındaki meydana gelen parça değişimleri de etkindir. Ayrıca, bir populasyonun genetik yapısının değişmesinde şans, kalıtsal sürüklenme, doğal seleksiyon ve göç gibi etkenlerin de katkısı vardır (Attardi 1985).

Taksonlar arasındaki genetik benzerlik veya farklılıkların belirlenmesi amacıyla çeşitli metotlar geliştirmiştir. Bu yöntemlerin esası, DNA parçacıklarının PCR yöntemiyle invitro ortamda çoğaltılıp genetik belirteç olarak kullanılmasıdır. Yaygın olarak kullanılan metotlar şunlardır: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Basit Dizilim Tekrarları (SSR), Ardışık Basit Tekrarlar (STR) (Vos vd. 1995).

2.7.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu

Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (Polymerase Chain Reaction), invitro ortamda kalıp DNA molekülünde belirli bir özgün bölgenin çoğaltılması işlemlerini tanımlar. PCR yöntemi ile DNA'nın invitro ortamda kopyalanması gerçekleştirilir. Bu süreçte, DNA'nın iki sarmalı arasındaki hidrojen bağları açılmakta, genetik materyalin her bir zinciri şablon-kalıp olarak kullanılarak yeni iki tamamlayıcı zincir sentezlenmektedir. İn-vitro ortamda, eppendorf içinde DNA'nın çoğaltılması için; uygun oram sıcaklığının yanı sıra, 6-30 nükleotid uzunluğunda primerlere, ortamın pH ve tuz konsantrasyonunu optimum yapan tampon çözeltiye, DNA polimerazın ihtiyaç duyduğu magnezyum'a ve yeni zincire eklenecek 4 tip nükleotide (dNTP) ihtiyaç duyulmaktadır (Saiki vd. 1985). Standart PCR işlemi için gerekli bileşenler; kalıp DNA, uygun tampon çözeltisi, DNA polimeraz, deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTP), MgCl₂ ve oligonükleotid primer

problardan meydana gelmektedir. PCR için gerekli bu ayıraçlara (reagent) ve materyallere ticari firmalardan ulaşılabilir. Araştırma konusunu oluşturacak olan kalıp DNA molekülüne araştırmacılar kendileri izole edebileceği gibi ticari olarak piyasada bulunan genomik DNA, genomik kütüphaneler, cDNA kütüphaneleri ve RNA'lardan temin edebilirler. Oligonükleotit primer problemleri, tampon solusyonları, DNA polimerazları, $MgCl_2$ ve dNTP'ler gibi diğer PCR öğeleri araştırmacılar tarafından hazırlanabildiği gibi ticari olarak da temin edilebilmektedir (Newton ve Graham 1994).

PCR işlemi genel olarak üç basamaklı bir döngünün defalarca tekrarlanmasına dayanan bir yöntemdir: 1) DNA zincirinin birbirinden ayrılması (denaturation), 2) Primerlerin tamamlayıcı DNA bölgesiyle hibrit oluşturması (annealing), 3) Yeni DNA zincir sentezlerinin yapılması (extension) (Black 1993).

2.7.1.1 Kalıp DNA zincirinin açılması (Denaturation)

Kalıp DNA'nın iki zincirini bir arada tutan hidrojen bağları, ortalama 92-95°C sıcaklıkta ve 1 ile 5 dakika süre zarfında birbirinden koparak iki zincirleri birbirlerinden ayrılmaktadır. PCR işleminin başarılı olması için öncelikle kalıp DNA zincirlerinin veya sentezlenen yeni kalıp dizilerinin denaturasyon ile birbirlerinden ayrılması gereklidir. Bu işlem için ortam sıcaklığının 95°C sürenin ise ortalama 2 dakika olması uygundur. Diğer yandan G ve C bazlarınca zengin kalıp DNA çalışmalarında sıcaklık değeri ve uygulama süresi biraz daha artırılması faydalı olmaktadır (Erich vd. 1991).

2.7.1.2 Primer Bağlanması (Annealing)

Primer bağlanması, ortalama 6-30 baz uzunluğundaki oligonükleotid primer problemlerinin, denatürasyon ile açılan kalıp DNA zincirleri üzerindeki kendilerine özgü baz dizilerine karşılık gelen bölgeye tutunmaları ve hibritlenme reaksiyonunu gerçekleştirmesi olgusudur. Primer problemlerin denaturasyonla birbirinden ayrılan DNA zincirlerine tutunması için gerekli sıcaklık değeri ve süresi ortamdaki primer yoğunluğuna, hedeflenen DNA fragmentinin uzunluğuna ve sentez için kullanılan dNTP nükleotidlerin oranına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Erich vd. 1991).

Primerlerin doğru konumda hibritlenme birleşmesinin olması için ortam sıcaklığının 40-72 °C (55 °C) arasında olması gerekmektedir. PCR reaksiyon ortamı 94 °C den 55 °C sıcaklığa soğutulduğunda primerlerin tamamlayıcı DNA ile hibritlenmesi için ortam sağlanmış olur. Primerlerin kalıp DNA zincirine bağlanması için 55 °C sıcaklıkta 1-2 dakika bekletmek yeterlidir. Bu süreçte ortam sıcaklığı ne kadar yüksek ise primer problemlerin kalıp DNA zincirlerine doğru tutunma ihtimali o oranda artmaktadır. Hatta PCR reaksiyonunun ilk iki üç döngüsündeki sıcaklığın biraz daha yüksek olması primerlerin kalıp DNA zincirine bağlanma doğruluğunu daha da artırmaktadır. Aksi yönde PCR işlemlerinde uygulanan sıcaklık değerlerinin düşük olması, kalıp DNA zincirine primer problemlerin hatalı olarak bağlanma olasılığını artırmakta dolayısıyla da yeni sentezlenen DNA zincirindeki dizilerin hatalı bağlanmayla sonuçlanmaktadır (Dieffenbach vd. 1993).

PCR işleminde ortamdaki primer problemlerin yoğunluğunun 0.1 ile 0.5 µM arasında olması reaksiyonun problemsiz çalışmasını desteklemektedir. Çözeltideki 0.5 µM ve daha yüksek primer prob yoğunluğu primer problemlerin kendi aralarında dimer yapılar meydana getirmelerine ya da kalıp DNA zincirinde yanlış bölgelere bağlanarak özgün olmayan DNA zincirlerinin meydana gelmesine neden olur. Standart PCR işlemlerinde ideal primer probun dizi uzunluğu 16-30 baz arasında yer almalıdır (Watson vd. 1992).

PCR ortamında primer problemlerin kalıp DNA zincirine tutunma sıcaklık değerinin (T_m) ile primer problemlerindeki G ve C baz miktarı arasındaki korelasyon daima göz önünde tutulmalıdır. PCR çalışmalarında kullanılan primer problemlerin nükleotid dizilerindeki G+C bazlarının toplam oranının % 50 veya daha fazla değerde bulunması yeterlidir. Primer problemlerin kalıp DNA dizilerine hata olmadan tutunabilmesi için primer problemlerin sahip olduğu toplam G ve C oranı ile ortam sıcaklığı arasındaki bağlantı için genel bir uygulama formülü önerilmiştir. Bu formül $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ şeklinde belirlenmiştir (Innis ve Gelfand 1990). Diğer yandan primer problemlerin 3' uçlarında sahip oldukları baz dizilerinin özelliği, primer probun kalıp DNA zincirinde yanlış yada doğru yere tutunması durumunu üzerinde etkili olmaktadır. Şayet primer probun alt ve üst yönündeki zincirlerin karşılıklı olarak 3' uçları birbirlerine tutunabilecek baz dizisi kompozisyonuna sahip olmaları halinde istenmeyen hatalı primer-dimer olgularına neden olabilmektedir (Kwok vd. 1994).

2.7.1.3 Primer Uzaması (Extension)

Kalıp DNA zincirlerinin kendine özgü bölümüne tutunan primerlerin öncülüğünde, sentez sıcaklığına dayanıklı özgün bir DNA polimeraz enzimi (örneğin Taq Polimeraz) yardımıyla, primerlerin 3'OH uçlarına deoksiribonükleotidlerin (dNTP) eklenerek yeni DNA zincir parçacığının kalıp sırasına uygun komplementer özellikte olacak şekilde sentezlenme evresidir. Taq Polimeraz genellikle 72°C sıcaklıkta iyi çalıştığı için ortam sıcaklığı bu değerlere ayarlanır. Taq Polimeraz enzimi, ortamdaki oligonükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek primerin öncülüğündeki yeni zincirin uzamasını sağlar ve sonuçta kalıp genetik materyalinin ilgili gen bölgesinin iki zincirli kopyası meydana gelir. Primer prob dizilerinin uzamaları için gerekli süre kalıp DNA parçacığının uzunluğuna, ortamdaki kalıp DNA miktarı ile DNA polimeraz enzim miktarının yoğunluğuna ve ortamın sıcaklık değerine bağlı olarak farklılık gösterir (Dieffenbach vd. 1993).

2.7.1.4 Döngü Sayısı

Yukarıda belirtilen bu üç ana reaksiyon PCR işleminin bir döngüsünü temsil eder. PCR reaksiyon döngüsünde, eski ve yeni DNA zincirlerinin her biri, primer bağlanma bölgesi içermeleri nedeniyle, daha sonraki DNA sentez reaksiyonları için kalıp zincir olarak görev alır. PCR reaksiyon sürecinde, her döngüde kopyalanan DNA molekül miktarı iki katına çıkarılır ve belirlenen DNA bölgesi logaritmik artışla çoğalır. Döngü genellikle 25-35 defa tekrarlanarak başlangıçtaki kalıp DNA parçacığı yeterli miktarda çoğalmış olur. Çoğaltılan ürünün uzunluğu, çoğaltılması hedeflenen DNA fragmentinin uzunluğu ile öncü kalıp olarak kullanılan iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Erlich vd. 1991). PCR işlemlerinde, döngü sayısının normalden çok olması özgün olmayan DNA zincir parçacıklarının meydana gelmesine, devir sayısının az olması da üretilen özgün DNA miktarının az olmasına neden olur. PCR yönteminin zayıf yönleri de vardır. Örneğin, hedef DNA bölgesini çoğaltımında özellikle ilk döngülerde, primerlerin istenmeyen DNA dizilerine bağlanma ihtimali ve böylece hedef bölgeden farklı bir bölgenin yanlışlıkla çoğaltılması mümkün olabilmektedir. Ayrıca, bazı poliploid canlılarda DNA lokusu çoğaltılırken, PCR ürünleri arasında parça değişimi olabilir (Watson vd. 1992).

PCR işlemlerinin en iyi verimlilikte çalışabilmesi için, genetik materyalin özelliğine göre, her reaksiyon çalışmasında kullanılan reaktiflerin miktarları, kullanım süreleri ile ortam sıcaklığı ve pH'sı gibi etkenlerin yeniden ayarlanması gereklidir. Bu kapsamda PCR çalışmalarını etkileyen etmenler aşağıda tanımlanmıştır (Erich vd. 1991).

2.7.1.5 PCR İşlemindeki Diğer Reaksiyon Unsurları

Tampon çözeltisi: PCR çalışmalarında kullanılan tampon çözeltisi oda sıcaklığında pH değeri 6.8 ile 7.8 olan 10 ile 50 mM yoğunluğunda 2-Amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol-hidroklorik asit (Tris-HCl) ortamıdır. PCR tampon çözeltisine primerlerin kalıp DNA zincirine daha kolay bağlanması için 50 mM potasyum klorür (KCl) veya 50 mM sodyum klorür (NaCl) ilave edilir. Bununla birlikte ortamda KCl veya NaCl çözeltilerinin ortamda daha yüksek değerde bulunması Taq polimeraz enzimin çalışmasını bloke etmektedir (Demeke ve Adams 1992).

DNA polimeraz: PCR işlemlerinde önceleri *Escherichia coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti ile T4 DNA polimeraz enzimi gibi yüksek sıcak değerlerine dayanıklı olmayan enzimler kullanılmıştır. Isıya dayanıklı olmayan bu enzimlerin çözeltileri, her PCR döngüsüne ortama yeniden eklenmesi gerekliliğini zorunlu kılmıştır. Fakat günümüzde ısıya dayanıklı enzimlerin PCR işlemlerinde kullanılması nedeniyle, reaksiyonun başlangıcında eklenmeleri yeterli olmaktadır.

Sıcaklığa dayanıklı DNA Polimeraz özellikli bir enzim PCR işlemleri için reaksiyonun başlangıcında ortama eklenir. Bu enzim, PCR işlemi sürecinde, kalıp DNA zincirinden birini baz alarak ve ortamdaki dNTP'leri kullanarak yeni komplementer zincirin sentezini gerçekleştirir. Yeni zincir sentez işleminde, dNTP moleküllerinin kimyasal bağ kurma yönleri dikkate alındığında, zincir sentez yönü her zaman dNTP'nin 5' α fosfatından, sentezi yapılan yeni DNA zincirinin 3' hidroksil grubuna doğru meydana gelir. Oligonükleotit primer problemler, DNA polimeraz enziminin senteze başlaması için bu 3'-OH grubunu sağlar. Böylece komplementer yeni DNA zincir sentezi daima 5' den 3' yönüne doğru ilerleme olur. Sentezde kullanılan dNTP'ler (Deoxynucleotide triphosphate), dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'den meydana gelmektedir (Yang vd. 1992).

Taq DNA polimeraz: Günümüzde en çok tercih edilen PCR ortam enzimlerinden biri Taq DNA polimeraz olup, bu enzim *Thermus aquaticus* isimli bir termal bakteriden izole edilmiştir. Enzimin özelliği 65°C gibi yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasıdır. Taq Polimeraz invitro ortam koşullarında dNTP nükleotidlerin 5' yönünden 3' yönüne aktiviteye sahip olduğu için sentezin yönü komplementer DNA zincirinde 5' uçtan 3' uca doğru gerçekleşir. Bu süreçte ortamdaki primerin serbest 3' hidroksil ucuna, ortamdaki dNTP lerin 5' fosfodiester bağlarının katalizlenmesi ve sonuçta yeni DNA zincirinin polimerizasyon uzaması gerçekleştirilir. Taq DNA polimeraz enziminin uzama değeri 70- 80°C'de ortalama 35-100 nükleotit/dakikadır.

PCR ortamında kalıp DNA'dan yeni DNA zincir sentezinin başlayabilmesi için kalıp DNA molekülünden meydana getirilecek olan yeni tamamlayıcı diziyi ilk başlatıcı bir dizi özelliğinde primer olarak tanımlanan kısa öncü DNA fragmentlerine gereksinim vardır. PCR işlemlerinde 100 µl reaksiyon ortamı için genellikle 1-2.5 ünite Taq Polimeraz enzimi kullanılır. Enzim miktarı ön çalışmalarla optimize edilmelidir. Çünkü ortamdaki enzim miktarı düşük oranda olduğunda PCR ürünü az oluşur. Enzim miktarı yüksek olduğunda da farklı gen bölgelerine ait bantlar meydana gelebilir (Yang vd. 1992).

Thermotoga maritima Ultma™ DNA polymerase: ULTMA DNA polimeraz: ULTma™ DNA polimeraz, *Thermotoga maritima*'nın DNA polimeraz enzimidir. *Thermotoga maritima* (Tma), 90°C'nin üstündeki sıcaklıklarda yaşayan hipertermofilik bir bakteridir. Bu canlı ilk defa İtalya'da yüksek sıcaklıklı jeotermal deniz katmanlarından tanımlanmıştır. ULTMA DNA polimeraz enziminin 3' ten 5' yönüne ekzonükleaz hata okuma (proofreading) özelliği vardır (Newton ve Graham 1994).

Vent DNA polimeraz: Vent DNA polimeraz ilk defa *Thermococcus litoralis* isimli termofilik bir archaeadan izole edilmiştir. Bu archaea 98°C ve yukarı sıcaklığa sahip okyanus tabanındaki suda yaşayan bir canlıdır. Vent DNA polimeraz 3' ten 5' yönüne aktivite gösterir (Lee vd. 2002).

Proofreading DNA Polymerases (Pfu DNA polimeraz): Bu enzim tuzlu sularda yaşayan hipertermofilik bir archaea olan *Pyrococcus furiosus*'ten izole edilmiştir. Enzimin 3' ten 5' yönüne hata okuma (proofreading) özelliği vardır (Newton ve Graham 1994).

Thermus thermophilus DNA polimeraz: *Thermus thermophilus* (Tth)'dan izole edilen beş beş Tth DNA polimeraz enziminden ikisinin PCR işlemlerine uygun olduğu belirlenmiştir. Rekombinant Tth DNA polimeraz enzimi, *Thermus thermophilus*'un DNA polimeraz geninin modifiye bir versiyonunun *Escherichia coli* bakterisinde transkripsiyon işlemi sonucu elde edilen termostabil bir polimerazdır. Enzim 5' ten 3' yönüne katalizör aktivitesine sahiptir (Newton ve Graham 1994).

Magnezyum Konsantrasyonu: PCR çalışmaları için farklı DNA polimeraz enzimlerine özgü çeşitli tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Bunlardan Taq polimeraz enzimi için önerilen tamponun 10 kat konsantre yoğunluktaki içeriği şu şekilde olup, bu çözelti kullanılmadan önce 1:10 (V/ V) hacim oranında seyreltilmesi gerekir: Oda sıcaklığındaki çözeltinin bileşenleri; 100 mM Tris-HCl, pH= 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂. Bu süreçte son reaksiyon karışımında MgCl₂ konsantrasyonu farklı olabilir.

PCR ortamında magnezyum (Mg) iyon yoğunluğu dNTP monomerlerinin komplementer zincire bağlanması için gerekli olan Mg²⁺ iyonları dNTP'lerle çözünebilir bir durum meydana getirir. Mg²⁺ iyonları DNA polimeraz aktivitesini stimüle ederler. Çift zincirli kalıp DNA'nın denaturasyon durumunu desteklerler. Denatüre kalıp DNA zincirlerine primer problemlerin güvenli bir şekilde tutunarak dimer bağlarını oluşturmalarını sağlar. Bu süreçte DNA polimeraz enziminin verimli çalışabilmesi için kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazlarının üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekmektedir. Bu nedenle PCR solusyonunda 0.5 ile 2.5 hatta 5.0 mM arası bir değerde Mg iyonlarının dNTP solusyonunda bulunması gereklidir. Çoğunlukla 1.0-1.5 mM değerindeki MgCl₂ yoğunlukları en uygun değer olarak kabul edilir. Yetersiz Mg²⁺ yoğunluğu reaksiyonun ürün miktarında azalmaya ya da özgün olmayan ürünlerin meydana gelemesine sebep olabilir (Yang vd. 1992).

dNTP konsantrasyonu: PCR çalışmalarında kullanılan dNTP'ler her bir nükleotit için ayrı ayrı veya 4 nükleotidin karışımı olacak şekilde ortama ilave edilmektedir. dNTP solusyonların pH değerinin 7.5'e ayarlanması önerilmektedir. Eşit orandaki her bir deoksiniükleotid Adenin, Guanin, Sitozin, Timin baz yoğunluğunun 20 ile 200 µM (ortalama 100 µM) arasında olması halinde çoğunlukla sonuçlar istenen nitelikte olmaktadır. PCR işlemlerinde dNTP yoğunluğu normalden daha yüksek olması

durumunda yeni sentezlenen DNA dizileri beklenenden farklı hatalı dizilerin meydana gelmesine neden olur. Bu nedenle ortamdaki dNTP yoğunluğunun en alt seviyede bulunması PCR işleminin özgünlük şansını yükseltmektedir (Williams vd. 1990).

PCR Uygulamalarındaki İnhibitörler: PCR işlemi üzerinde etkili pek çok madde baskılayıcı veya uyarıcı özellik gösterir. PCR uygulamalarında incelenen çeşitli biyolojik örnekler bünyelerinde baskılayıcı materyaller bulundurabilir. Kalıp DNA elde etmek amacıyla doku veya hücrelerin lizis sürecinde kullanılan iyonik olmayan deterjanların %5 ve üzeri yoğunlukları çoğunlukla PCR işlemlerini baskılayabilir. Bununla birlikte, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik deterjanların %0.1 ve üzeri yoğunlukları PCR uygulamalarında baskılayıcı olmaktadır. PCR uygulamalarında kullanılan DNA polimeraz, deterjan kökenli ortamdaki proteinaz K etkisiyle proteaz kesimine duyarlıdır. Dolayısıyla proteinaz K ortamdan alınmalı veya 96°C sıcaklık ortamında pasifize yapılmalıdır (Lee vd. 2002).

2.7.1.6 Genetik Belirteçler

Doğadaki organizmaları veya onların tipik bir karakterini tanımlayıcı olarak belirleyen bir gen dizisi veya bir genin bant büyüklüğü genetik belirteç (marker) olarak kabul edilebilir. Genetik belirteçler bir taksonun genotip ya da fenotipik bir özelliğinin diğer taksonlardan ayırt etmeyi sağlayan karakterlerini belirler. Belirteçler morfolojik markerleri ve genetik (DNA) markerleri olmak üzere iki ana grup altında toplanır.

Protein Belirteçler: Organizmaların izoenzim ve alloenzim gibi protein ve enzimlerinin elektroforez yardımıyla jelde yürütülerek tanımlanması esasına dayanır. Bunlardan izoenzim belirteçler, taksonlar arası tanımlamaların yapılması, biyosistematik çalışmalara katkıda bulunma, taksonların filogram ve dendogramlardaki konumunu belirleme ve taksonların genetik çeşitliliği hakkındaki veri oluşturma gibi alanlarda katkıda bulunur (Sammour 1991).

Alloenzim tip belirteçler, aynı genin farklı protein şekillerini belirtmektedir. Alloenzim belirteçleri Mendel kalıtımı ve kodominant tip translasyon ürün özelliğindedirler. Alloenzim belirleme araştırmaları hızlı ve ekonomiktir. Bununla birlikte sadece

translasyon işlemi yapılabilen solubletip protein moleküllerin tanımlanması, belirteç sayısının az olması ve bu nedenle DNA genomunun diğer kısımlarının belirlenmesini temsil etmemesinden dolayı bu yöntem kısmen zayıf kalmaktadır (Lee et al. 2002).

Genetik (DNA) belirteçler: Çeşitli taksonların nükleotit dizilişlerindeki farklılıklar bu grupların genetik belirteçlerini meydana getiren öğelerdir. DNA belirteçleri, protein ve diğer morfolojik karakterlere göre daha kesin veriler üretir. Bu olgunun nedeni, protein ve diğer morfolojik karakterlerin ortamdaki etkenlerin baskısı altında eksprese olmalarıdır. Buna karşın genetik markerlerin çevresel faktörlerden etkilenmeleri söz konusu değildir. Taksonlardaki genetik polimorfizm olgusu protein ve diğer morfolojik karakterlerden daha fazladır. Ayrıca bu belirteçler organizmanın sınırlı doku veya hücre bölümünden tüm yaşamı boyunca çalışılabilir, genetik varyasyonlar incelenebilir. Taksonomik kategorilerin konumları tanımlanabilir, kendi aralarındaki filogenetik hiyerarşileri belirlenebilir (Lowe vd. 1996).

2.7.2 Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) metodu

AFLP yöntemi ile, iki farklı restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmiş çok sayıda gDNA parçacığının bulunduğu bir karışımdaki restriksiyon parçacıklarının çoğaltılması yapılır. AFLP tekniği ile çalışmada polimorfizmin oluşma ihtimali yüksektir ve canlı genomu hakkında ön bilgi olmadan uygulanabilen bir tekniktir. Sentezlenen markerlar güvenilirdir. AFLP tekniğinin zayıf yanı dominant markerler oluşturmastır. Bu süreçte, 50-100 gibi çok sayıda çoğaltılmış ürün sentezlendiği için analizlerin bilgisayar kontrolünde olması zorunludur. AFLP markerleri genellikle kromozomların sentromer ve telomer alanlarında yer almaktadır. Bu olgu kromozomların farklı alanlarının analizini zorlaştırmaktadır (Vos vd. 1995).

Restriksiyon enzimleri Virus DNA molekülünün 4-8 baz çiftlik DNA dizilerinden tanıyarak bu bölgelerden kesim yapar. Bu enzimler ile kesim sonucunda, bir zinciri diğerinden daha uzun yapışkan uçlu parçalar ya da her iki zinciri eşit uzunlukta küt uçlu parçacıklar elde edilir. RFLP tekniği Southern blotting (emdirim) ve PCR temelli olmak üzere iki farklı yöntemle uygulanır. RFLP yöntemi ile hem nuklear hem de mitokondriyel genom üzerinde yararlı bilgiler üretilebilmektedir (Griffiths vd. 1996).

2.7.3 Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) metodu

RAPD yöntemi genellikle genomdaki 9-10 bazlık kısa ve rastgele bölgelere tek bir primer kullanılarak çoğaltılması esasına dayanan PCR temelli bir yöntemdir. Bu yöntemde özgün hedef DNA bölgesi ya da hedef gen yoktur. Her bir primer rastgele DNA molekülünün farklı bölgelerine bağlanarak bu bölgelerin çoğaltılması sağlanmaktadır. RAPD yönteminin güçlü yönleri şu şekilde sıralanabilir: Çok sayıda gen lokusu üzerinde aynı anda çalışılmayı destekler, uygulanması kolaydır, sonuçları nispeten daha kısa sürede elde edilir, çok az miktarda genomik DNA'ya gereksinim duyulur, analiz başına maliyeti azdır (Williams vd. 1990).

Diğer yandan RAPD yönteminin zayıf yönleri şu şekilde sıralanabilir: genellikle heterozigot genotipler homozigot genotiplerden ayırt edilemez, tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde güçlük yaşanabilir, hedef DNA bölgesinin genomun neresinde olduğu belirlenemez, analiz yapan laboratuvarlar arasında farklı sonuçların elde edilebilir. Bununla birlikte günümüzde halen tür ve alttürler için populasyonların nDNA larının genetik varyasyonları hakkında ön bilgi elde edilmesi ve populasyon genomlarının karşılaştırılması amacıyla bu metod yaygın olarak kullanılmaktadır (Williams vd. 1990).

2.7.4 Basit dizilim tekrarları (SSR) veya ardışık basit tekrarlar (STR) metodu

Basit dizilim tekrarları, nuklear DNA için geliştirilen diğer bir yöntem olup mikrosatelit metodu olarak da bilinir. Mikrosatelit gen lokusları ökaryot canlılarda genom pek çok yerinde bulunan ve ardışık olarak tekrarlanan 2-5 bp uzunluğunda dizilerden meydana gelir. Bu diziler (GA)_n, (CT)_n, (TAT)_n veya (GACA)_n şeklinde konumlanabilir. Mikrosatelit allelleri PCR ile çoğaltılan nuklear DNA parçasındaki farklı nükleotid dizisi motiflerinin tanımlanmasıyla açığa çıkarılmaktadır. Her bir lokus allelinde tekrar eden nükleotidlerin sayıları birbirinden farklılık gösterir. Nuklear genomdaki mikrosatelitler, lokus başına 10⁻³ ile 10⁻⁴ gibi yüksek mutasyon oranında olabilir. Bu nedenle mikrosatelitler; popülasyondaki varyasyonlarının belirlenmesi, genomlarının haritalanması ve filogeni çalışmalarında yaygın olarak incelenmektedir (Attardi 1985).

2.7.5 Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) metodu

Bilindiği gibi, tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs), bir purin nükleotidlerinin (A,G) bir diğer purin ile veya bir pirimidin nükleotidinin (C,T) diğer bir pirimidin nükleotidi ile yer değişimi göstermesini ya da bir purin nükleotidinin bir pirimidin nükleotidine veya bir pirimidin nükleotidinin bir purin nükleotidine değişimi şeklinde oluşmaktadır. Bununla birlikte, bir ya da birkaç nükleotidin eklenmesi (insertion) veya eksilmesi (deletion) olguları da tek nükleotid polimorfizmine neden olmaktadır (Beuzen vd. 2000).

Günümüzde tek nükleotid polimorfizmlerinin kullanımının yaygınlaşmasının başlıca nedenleri şu şekilde sıralanabilir. İncelenen hemen her gen lokusunda diğer moleküler yöntemlere göre çok daha fazla marker elde edilir. SNPs, bir gen ürünü karşılığı bulunan bölgelerde bulunduğu için doğrudan fenotipi etkilemektedir. SNPs mikrosatelitlere oranla daha kararlı bir şekilde nesilden nesile aktarılmaktadır. Bu özellik nedeniyle seleksiyon markeri olarak SNPs karakterlerinin kullanımını tercih edilir. DNA microarray teknolojisi kullanılarak daha fazla lokusun incelendiği çalışmalarda SNPs markerleri mikrosatelitlere göre daha kullanışlıdır. Diğer yandan hedef polimorfik bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunması gerekliliği SNPs yönteminin zayıf yanı olarak belirtilmektedir (Beuzen vd. 2000).

2.7.6 DNA dizi analizi metodu

Populasyondaki bireylerin genetik varyasyonlarının belirlenmesinde DNA dizi analizi yöntemi etkin bir yöntemdir. Günümüzde DNA dizi analizi cihazlarının yardımıyla taksonların DNA dizi analizleri belirlenebilmektedir. DNA dizi analizi iki farklı yöntemle yapılmaktadır. Yöntemlerden biri Maxam ve Gilbert (1977) tarafından ortaya konan ve bazı nükleotidlere özgü kesim bölgesi geliştirilen yöntemdir. Maxam–Gilbert yönteminde dizi analizi yapılacak DNA bölgesinin terminal bölgeleri radyoaktif bir madde ile işaretlenir. Bunu takiben işaretli özgün bölgelerden kesim yapabilen çeşitli kimyasal maddeler ile DNA molekülü A, T, G, C olmak üzere 4 alt bölümde incelenir. Örneğin alt bölüm, dimetil sülfat ve piperidin ile reaksiyona tabi tutulduğunda, sadece G nükleotid ile sonlanan bölgelerden kesim yapılır, G nükleotidi ile son bulan çeşitli uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilmektedir. Daha sonra poliakrilamid jel

elektroforezi ile DNA parçacıkları ayrıştırılır ve otoradyografi ile görüntülenir. Diğer üç nükleotide özgü benzer analizler yürütölür elde edilen DNA parçacıkları poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılır ve görüntülenir (Griffiths vd. 1996).

İkinci yöntem, Sanger vd. (1977) tarafından geliştirilen ve Sanger yöntemi olarak bilinen DNA dizi analizi yöntemidir. Bu yöntem, ikili sarmal yüksek sıcaklıkta denatürasyonla tek zincirli hale getirilir, hedef DNA lokusuna uyumlu olan ve primer olarak adlandırılan komplementer kısa bir DNA parçacığı bu bölge ile hibrit oluşturur. Bunu takiben DNA polimeraz enzimi yardımıyla primere, ortamda bulunan deoksınükleotidlerin (dA, dC, dG ve dT) eklenmesiyle komplementer zincir sentezi gerçekleşir. En son deoksınükleotidlerde var olan 3' OH grubunu taşımayan dideoksınükleotidlerin (ddN) zincire eklenmesiyle reaksiyon tamamlanır. Sentez için etiketli deoksınükleotid kullanılarak yeni sentezlenen DNA zinciri floresan boya etiketli hale getirilir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile farklı uzunlukta DNA setleri elde edilir. Bu DNA setleri poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılır ve otomatik dizi tanımlayıcı cihazlar yardımıyla DNA zincirinin dizisi kolayca tanımlanır (Rokas vd. 2003).

2.7.7 Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) metodu

DNA molekülünün ikili sarmal yapısını belirli nükleotid dizilerinden kesen bakteriyel kökenli “restriction endonuclease” gibi bazı restriksiyon enzimlerinin keşfedilmesi ile DNA biyolojisi üzerinde önemli gelişmeler olmuştur. RFLP tekniğı, DNA düzeyinde polimorfizm elde etme amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bakteriler viral patojenleri olan bakteriyofajlara karşı savunma mekanizması olarak çeşitli DNA restriksiyon enzimleri üretebilmektedirler. Bu enzimler DNA molekülünü belirli özgün tanıma dizilerinden kesebilme özelliğıne sahiptir. Bu enzimler bir bakteriyofajın bakteri içine girdiğinde, bakterilerin endonükleaz enzimleri, virusların DNA’sını belirli gen dizi bölgelerinden keserek o virusun bakteride çoğalmasını önlerler (Griffiths vd. 1996).

2.7.7.1 PCR tabanlı RFLP metodu

PCR temelli RFLP metodu organizmanın özgün bir lokusunda polimorfizm olgusunu belirlemek için geliştirilmiştir. PCR-RFLP yönteminde, standart PCR işlemi ile

incelenecek lokus çoğaltılmakta ve çeşitli enzimlerle çoğaltılan PCR lokus parçacığı kesilmektedir. Meydana gelen kesim parçacık üzerindeki kesim noktasının bulunup bulunmamasına göre bireyler arasındaki çeşitlilikler belirlenmektedir. PCR-RFLP yönteminde bireyler arasında belirlenen polimorfizm olgusu, enzim tanıma bölgesinde meydana gelen bir nükleotidin eklenmesi, eksilmesi veya değişmesi şeklinde meydana gelen nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. PCR-RFLP yöntemi özellikle kodominant kalıtım modeline uygun markerler oluşturmaktadır. PCR-RFLP yönteminde klasik PCR yönteminde olduğu gibi uzun primerler kullanıldığı için çoğunlukla güvenilir çoğaltım gerçekleştirilir. Bununla birlikte PCR-RFLP yönteminin başlıca zayıf yanları şunlardır: PCR-RFLP ile çoğaltılacak lokus hakkında önceden bilgi sahibi olunması gereklidir. Araştırılacak lokuslar için gerekli kesim enzimleri ile özgün primerlerin hazırlanması zaman ve maliyet artışına neden olur (Botstein vd. 1980).

2.7.7.2 Southern emdirim (blotting) temelli RFLP metodu

Southern blotting kapsamında uygulanan RFLP yöntemi, DNA üzerindeki varyasyonların belirlenmesinde kullanılan ilk yöntemlerden biridir. Bu yöntemde belirli kesim enzimleri ile DNA molekülü işlendikten sonra oluşan DNA parçacıklarının kesim modellerindeki farklılıklarından yararlanarak DNA üzerindeki polimorfik bölgeler tespit edilir. Bu yöntem ile DNA molekülünde meydana gelen çeşitli mutasyonlar nedeniyle popülasyonun bireyleri arasında farklı uzunluklara sahip DNA parçacıkları elde edilmektedir. DNA parçacıklarının uzunluk farklılıkları Agarose jel elektroforezi ve hibridizasyon işleminden sonra belirlenebilmektedir (Beckmann ve Solter 1983).

RFLP tekniğinin uygulaması şu şekilde yapılmaktadır. Reaksiyon kapsamında öncelikle saflaştırılan DNA molekülü özgün kesim enzimleri ile hedef bölgeden kesilir. Bunun sonucu farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. DNA kesim parçacıkları genellikle agaroz jel elektroforezi ile büyüklük esasına göre ayrılır. Daha sonra polimorfizmin tespit edilmesi ve hedeflenen kesim parçacıklarının belirlenmesi için hibridizasyon yönteminin uygulanması gerekmektedir. Hibridizasyon için agaroz jel üzerinde bulunan hedef gen parçacıkları daha kararlı olan nitroselüloz veya naylondan yapılmış ortama aktarılır. Bu yöntem ilk olarak Southern (1975) tarafından ortaya çıkarıldığı için Southern blotting (emdirim) olarak bilinir. Bu yöntemde agaroz jel bir

solusyon içinde denatüre edilir ve tek eksenli DNA kesim parçacıkları seti elde edilir. Bunu takiben agaroz jelin üzerine naylon veya nitroselüloz bir membran ve onun üzerine de ağırlık konur. Bu süreçte tampon solusyonun desteğiyle agaroz jeldeki bütün DNA kesim parçacıkları dolayısıyla DNA bantları tek eksenli olarak naylon veya nitroselüloz membrana aktarılır. DNA kesim parçacıklarını bulunduran naylon veya nitroselüloz membran bir sonda (probe) ile reaksiyona alınır. Sondanın özelliği, hedef DNA kesim parçacığı ile tamamlayıcı (komplementer) özellikte kısa, tek zincirli bir DNA parçacığı olmasıdır. Sonda parçacıkları, nuklear ya da komplementer DNA (cDNA) kütüphanelerinden hazırlanır. Bu DNA kütüphaneleri, farklı türlerin DNA moleküllerinin kesilmiş parçacıklarını içeren plazmid gibi vektörel yapılardır. Bu parçacıklar, bakteriler gibi çeşitli vektör organizmalara aktarılır ve ilgili DNA parçacıkları istenen miktarda çoğaltılır (Beckmann ve Soller 1983).

DNA sondalarının elde edilmesinde kullanılan başlıca kaynaklar şunlardır: Bir canlıya ait genomik kütüphane, DNA kesim enzimleri ile kesilir ve her bir DNA parçacık bakteri veya viral bir vektöre aktarılır. Daha sonra bu ortak kütüphane içinden RFLP analizi için uygun sonda parçaları ayıklanır. Organizmaların komplementer DNA (cDNA) kütüphaneleri kapsamında, hücre içindeki mRNA izole edilir ve ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenebilir. Elde edilen cDNA molekülü çeşitli bakteri ve viruslerde çoğaltılır ve RFLP analizi için uygun sonda olarak kullanılır. Mitokondriyel ve kloroplast gibi sitoplazmik DNA genomlarından uygun sonda parçaları seçilebilmektedir. Bu parçalar, naylon veya nitroselüloz ortamlarına aktarılan membrandaki tek zincirli kesim parçacıkları, daha önceden hazırlanan sonda parçaları ile komplementer olmaları halinde hibridizasyon gerçekleşmekte ve radyoaktif işaretli çift zincirli DNA parçacıkları üretilmektedir. İşaretli bu DNA parçacıkları görüntüleme sisteminde tanımlanmaktadır (Beckmann ve Soller 1983).

2.8 Hayvansal Mitokondri Genomu (mtDNA)

Ökaryotik heterotrof canlıların genetik içeriği, nükleus içinde bulunan çekirdek DNA (nDNA) ve mitokondri (mtDNA) organelinde bulunan DNA moleküllerinden meydana gelmektedir. Sitoplazmik kalıtım materyali olarak da bilinen mtDNA maternal kalıtım özelliğine sahip olması nedeniyle, yumurta hücresinin sitoplazması vasıtasıyla nesilden

nesile aktarılır. Mitokondri bulunduğu hücre ile birlikte bölünerek kendi kendine çoğalabilme özelliğine sahiptir. Mitokondri çift hücre zarına sahip, kendine özgü DNA molekülü (mtDNA) ve ribozomlara sahip olan, kendi enzimlerini sentezleyebilen ve adenozin trifosfat (ATP) organik bağ enerjisi üretebilen bir organeldir. Ökaryot hayvansal hücrelerde mtDNA, halka şeklinde iki zincirli sarmal yapılı bir DNA molekülü olup oksijenli solunumla ilgili genleri içerir. Moleküler hayvan sistematigi kapsamında; populasyon genetiği, filogenetik, barkodlama, tür içi ve türler arasındaki genetik özelliklerin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda mtDNA'nın kararlı olması ve maternal özellik taşıması nedeniyle tercih edilir (Rokas vd. 2003).

mtDNA molekülünün yapısı halka şeklinde, ikili zincirli bir DNA molekülünden meydana geldiği için, nükleer genetik materyalindekine benzer şekilde crossing-over meydana gelmez. Bu nedenle mtDNA kalıtımında nesilden nesile geçerken yeni kombinasyon rekombinasyon oluşmaz. Bu nedenle lokuslar daima sabit konumda kalmaktadır. Bununla birlikte nadiren ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan genetik varyasyonlar; nükleotid kaybolması (delesyon), nükleotid eklenmesi (insertion), nükleotid dönüşümü (substitution) ve nükleotid değişimleridir (Moritz vd. 1986).

Mitokondri DNA kalıtım materyalinin ortalama 37 genden meydana geldiği ve bu lokuslarının mitotip veya haplotip özelliğinde oldukları bilinmektedir. Mitotip kavramı sadece mitokondri genomuna ait kalıtım materyalini ifade etmede kullanılmaktadır. Mitotip “mitochondrial genotype” kelimelerinin kısaltmasından türetilmiştir. Haplotip kelimesi mitokondri ve Y kromozomu üzerinde bulunan karakterleri tanımlar. Haplotip kelimesi “haploid genotype” kelimelerinin kısaltılmasından üretilmiştir. Haplotip aynı kromozom üzerinde birbirine çok yakın ve bağlı bulunan ve birlikte nesilden nesile aktarılan gen takımları olarak da ifade edilir. Mitokondriyal DNA gen lokuslarının tanımlanması ile canlıların çeşitli özellikleri belirlenmektedir. Böylece, populasyonlar daha özgün tanımlanmakta, ortaya çıkış yerleri, coğrafik dağılımları, gen akış durumları, hibridleşme seviyeleri ile filogenileri belirlenmektedir (Moritz vd. 1986). Hayvansal hücrelerde 37 gen içeren mitokondri kalıtımındaki genler ve bu genlerin dizileri iyi korunmuştur. Bu 37 genin karakter dağılımı; 2 adet ribozomal RNA geni, 22 adet transfer RNA geni ve ATP sentezi ile elektron taşınmasındaki 13 adet protein geni olarak tanımlanmıştır (Resim 2.4) (Moritz vd. 1986).

Nüklear kalıtım materyali (nDNA) ile hayvansal hücrelerin mitokondriyal DNA molekülü arasında önemli farklar vardır. Örneğin mitokondriyal DNA çoğunlukla maternal kalıtım özelliğindedir. Mitokondriyal DNA zincirinin halka şeklinde olduğu bilinmekle birlikte su yılanlarında doğrusal olduğu ifade edilmektedir. Nüklear kalıtım materyali histon proteinlerine sahip olmasına karşın mitokondri DNA molekülünde histon proteinleri yoktur. Mitokondri genomundaki bölgelerin tamamının enzim, protein, rRNA ve tRNA gibi bir ürün karşılığı vardır. Dolayısıyla mitokondri DNA molekülünde görevleri tam olarak bilinmeyen ve intron olarak tanımlanan, boş (junk) DNA ve satellite olarak bilinen DNA bölgeleri yoktur (Hall 1998).

Nüklear kalıtım materyali milyon kb hacminde oldukça büyük bir molekül olmasına karşın, mtDNA ortalama 16.3-17 kb hacmi ile daha küçük bir moleküldür. Mitokondriyal DNA yer alan bazı gen bölgeleri ekspresyon esnasında çekirdek DNA genomunda belirtilen evrensel kodlamalardan farklı anlamlar ifade edebilmektedir. Örneğin UGA kodonu nüklear DNA bünyesinde stop, mitokondriyal DNA'da ise triptofan (Trp) amino asidi kodlama anlamına sahiptir. AUA kodonu nüklear DNA bünyesinde, izolösin (Ile) amino asidi, mitokondriyal DNA kapsamında ise metiyonin (Met) amino asidi anlamına sahiptir. AGA ve AGG kodonları, nüklear DNA'da arjinin (Arg) amino asidi, mitokondriyal DNA'da ise stop anlamına sahiptir. Ayrıca mtDNA molekülünde replikasyon ve transkripsiyonun başladığı ve herhangi bir ürün karşılığı olmayan ve D-loop bölgesi olarak bilinen bir kontrol bölgesi vardır (Hall 1998).

2.9 Taksonomi İçin DNA Barkodlama Çalışmaları

DNA barkodlama araştırmaları organizmaların kısa, standartlaştırılmış gen bölgeleri esasında özel bölgeler olarak kullanarak hızlı ve doğru olarak taksonları tanımlamayı amaçlamaktadır. Böylece, taksonomik sisteme daha kolay ulaşmanın yanısıra ekologlar vedoğa koruyucuları, zararlı türlerin kontrolü ve takibi ile gıda güvenliğini daha kolay takip edebileceklerdir. Daha genel kapsamda, DNA barkodlama ile profesyonel bilim insanlarından okul çocuklarına kadar her meraklı kişinin herhangi bir türün adlarına ve biyolojik özelliklerine kolay ve doğru erişime sahip olabilecektir. DNA barkodlaması, doğadaki canlıları bilinen türlere atamaya ek olarak, taksonomistlerin örnekleri hızlı bir şekilde sınıflandırmasına izin vererek ve yeni türleri tanımlamak suretiyle farklı

taksonları öne çıkararak yeni türlerin keşif hızını artıracaktır. DNA barkodlamayla ilave olarak taksonomi üzerine çalışan bilim insanlarına, yaşamın çeşitliliğinin küresel bir envanterini genişletme fırsatı sunacaktır (Wheeler 2004).

Geçtiğimiz 250 yılda yaklaşık iki milyon taksonomik hipotezin oluşturulması, biyolojik çeşitliliğin temel bir anlayışını sağlayan etkileyici bir başarıdır, ancak birçok ayrıntı açıklanmayı beklemektedir. DNA barkodlama, tür keşfini hızlandırarak, mevcut taksonomik hipotezleri test ederek ve tür tanımlamalarını daha kolay erişilebilir hale getirerek yaşam envanterine yardımcı olacak şekilde konumlandırılmıştır. Bu katkılar, temel taksonomik disiplinlere rağmen yapılmayacaktır. DNA barkodlama yöntemi, dar ve tümüyle moleküler bir tanımlama sistemi anlayışıyla morfolojik çalışmaları göz ardı etmez. Aksine, moleküler ve morfolojik taksonomistler arasında güçlü bağlantılar kurmayı amaçlar. Aynı zamanda, taksonların adlandırıldığı ve sınıflandırıldığı Linnaean ilkelerini korumayı hedefler. DNA barkodlama çalışmalarında, morfolojik olarak türetilmiş tür adlarını kullanır ve tanımlama için barkod kullanıldığında bu isimler daha güçlü bir konuma gelir (Will ve Rubinoff 2004).

Bazı araştırmacılar DNA barkodlama yaklaşımının temelde kusurlu ve eksik olduğunu iddia etse de, mevcut veriler bunun aksini desteklemektedir. DNA barkodlamanın başarısı şimdiye kadar şaşırtıcı derecede doğrulayıcı olmuştur. Dahası bir dizi çalışma sonucunda, farklı coğrafi ortamlardan ve farklı evrimsel özelliklere sahip çok sayıda taksonomik grup üzerinden DNA barkodlamasının etkinliğini araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, 13.000'den fazla hayvan türü için barkod kayıtları mevcuttur ve bu her geçen gün hızla çoğalmaktadır. Taksonlar arası gruplarda ve tür tanımlamada başarı% 95'i aşmakta ve morfolojik olarak tanımlanması zor yakın akraba türlerde ayırt edilmeyi desteklemektedir (Smith 2005).

Hayvanlar alemindeki barkodlama çalışmalarının genel performansına COI tabanlı sistemden ele alındığında % 99,99'u aşan taksonomik doğruluk sağladığı belirlenmiştir. Yaklaşık 10 milyon hayvan türü olduğu varsayılırsa, hayvanlar aleminin barkod arşivi, henüz yeni yeni oluşmaya başlamaktadır. Sonuçta elde edilen bir barkod bilgisiyle, 10 milyon türden herhangi birinin tür kimliğine veya yakın akraba türlerin küçük bir alt kümesine atama yapabilecektir (Baskin vd. 2003).

Hayvanlar alemindeki DNA barkod kütüphanesinin önümüzdeki 5 yıl içinde en az 500.000 veri tanımlanarak yaklaşık 50.000 türü kapsayan veri bankası oluşturulması üzerine çalışmalar devam etmektedir. Böylece DNA barkodlarının, kapsamlı barkod kayıtlarına sahip bu taksonomik gruplar için etkili bir tanımlama aracı olarak işlev görmesine izin verecektir. Örneğin, balıklar, sürüngenler, kuşlar, memeliler ve böcekler için barkod esaslı tanımlamaya yaklaşıldıkça, bu türlerin tanımlanmasına açık erişim mümkün olacaktır. Bu tür barkod verileri diğer hayvanlardan alınan barkod bilgileriyle birleştirildikçe, evrensel bir tanımlama sistemi ortaya çıkacaktır (Kress vd. 2005).

Hayvanlar alemi için barkodlamanın genel olarak kullanımı yaygınlaşmakla beraber, canlılar alemindeki diğer ana taksonlar için barkod yöntemlerinin oluşturulması ve sırananmasına gereksinim bulunmaktadır. Barkodlama analizinin temel yöntemleri hayvanlar alemindeki diğer canlı grupları için de geçerli olmakla beraber, barkodlamada kullanılacak gen bölgelerinin seçimi gereklidir. Bilinen türleri ayırmadaki başarısının yanı sıra, DNA barkodlama yöntemi, taksonomik problemlere çözmede güçlü bir yardımcı olacaktır. Ayrıca, tanımlanamayan türleri açığa çıkarma, gıda maddelerinin kaynağını bulma, farklı yaşam evrelerindeki organizmaları tanımlama ve bireylerin cinsiyetlerini belirlemegibi birçok taksonomik araştırmada da yardımcı olacaktır (Beskansky vd. 2003)

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Akarçay Havzası

Akşehir, Eber ve Karamık alt havzalarından meydana gelen Afyon Akarçay kapalı Havzası, KB-GD yönünde 125-130 km uzunlukta ve K-G yönünde 18-20 km genişliktedir. Bu havzanın doğu yönünde 1000-1100 m yüksekliğinde platolar, batı yönünde ise volkanik sedimentlerin yanısıra plato ve dağlar yer almaktadır. Karamık alt havzası, Sultan Dağı'nın kuzey uzantısı ile Kükürt Dağı arasına konumlanmıştır (Kazancı vd. 1999).

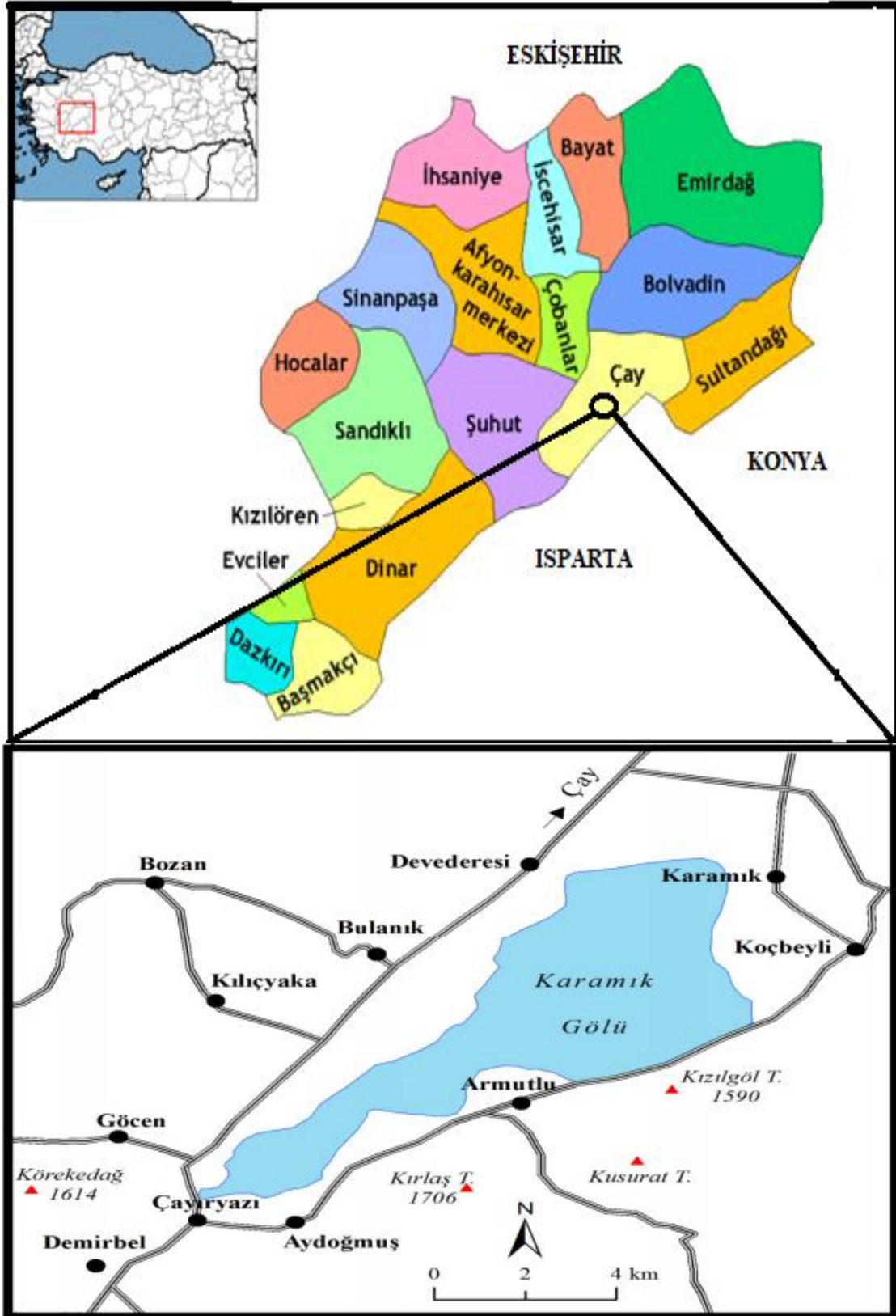
3.2 Karamık Gölü

Akarçay Havzasında yer alan Karamık Gölü, Afyonkarahisar ili Çay İlçesi 32° 28'K, 30° 53'D koordinatları arasında yer almaktadır (Şekil 3.1, Resim 3.1). Gölün ortalama derinliği 1.5-2 m (Kazancı vd. 1999), denizden yüksekliği 1002 m dir. Göl 4800 ha sazlık ve bataklık, 400 ha göl aynası olmak üzere 5200 ha alana sahiptir (Hasbek ve Arı 2018).

Karamık Gölünü besleyen başlıca kaynak Geneli çaydır. Ayrıca göl havzasına düşen yağış suları ile yüzeysel su kaynakları da gölü beslemektedir. Gölde su boşalımı ise buharlaşma, Taşevi Kaynakları bölgesinden karstik sistemle havza dışına akış ve pompaj yolu ile olmaktadır (Kazancı vd. 1999).

3.3 Araştırma Örneklerinin Temini

Araştırma örnekleri olan turna balıkları Karamık Gölünden yerel balıkçıların yardımıyla fanyalı ağ kullanılarak 13 Eylül 2020 tarihinde yakalanmıştır. Balıklar gölden çıkarıldıktan sonra %70 etil alkol ortamında fiske edilerek araştırma laboratuvarına getirilmiştir. Fiksatif sıvısı içinde 24 saat bekletilen örnekler %70 etil alkol ortamında muhafaza edilmiştir (Resim 3.2-3.4). Çalışmada etil alkol fiksatif ve örnekleri koruma sıvısı olarak kullanılmıştır. Etil alkol sıvısı canlının metabolik aktivitesini en kısa sürede durduran madde olması, protein ve genetik materyal yapısını fenol, formaldehit ve asetik asit gibi diğer fiksatiflere göre daha az tahrip etmesi nedeniyle tercih edilmiştir.



Şekil 3.1 Karamık Gölü haritası, Hasbek ve Arı (2018)'dan uyarlanmıştır



Resim 3.1 Karamık Gölü genel görünüm (orijinal).



Resim 3.2 Karamık Gölünden yerel balıkçılar yardımıyla turna balığı yakalama işlemi (orijinal).



Resim 3.3 Araştırma örneği olarak rastgele seçilen 3 adet *Esox lucius* (orijinal).



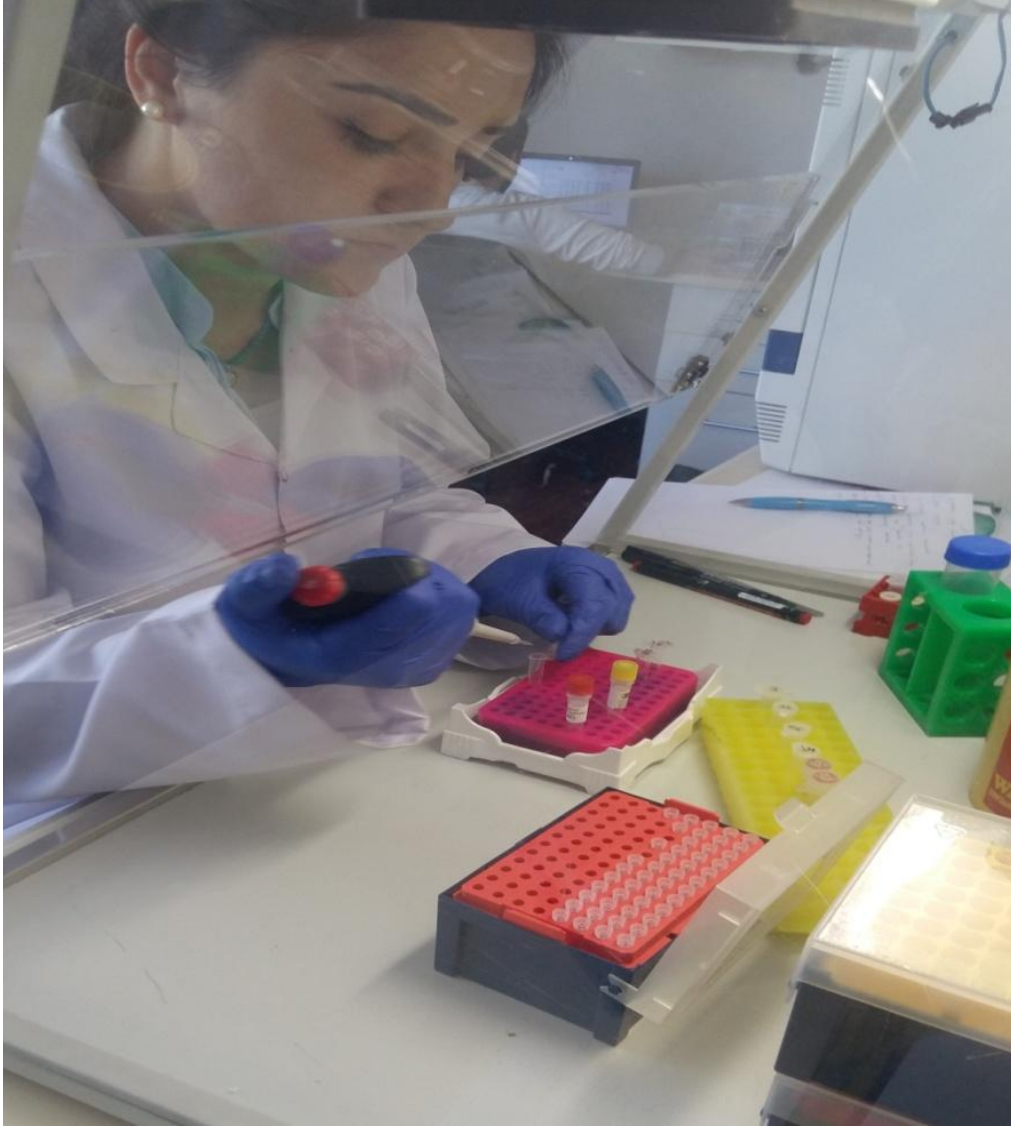
Resim 3.4 Etil alkol ortamında muhafaza edilen 3 adet *Esox lucius* örneği (orijinal).



Resim 3.5 *Esox lucius* örneklerinde boy ölçümü (orijinal).



Resim 3.6 DNA izolasyonu için 3 *Esox lucius*'tan alınan karaciğer doku örnekleri (orijinal).



Resim 3.7 DNA izolasyon işlemi (orijinal).

3.4 Araştırma Örneklerinin Disseksiyonu

Laboratuvarda boy ölçümü yapılan 28, 33 ve 36 cm boyundaki 3 turna balığı, kloak açıklığından itibaren anteriördeki farinks seviyesine kadar uzunlamasına disseksiyon yapılarak karın boşluğu açılmıştır. Daha sonra her bir balığın kas ve karaciğer dokusundan yaklaşık 1 gr doku örneği dissekte edilmiştir. Doku örnekleri içinde etil alkol bulunan petri kaplarında fiksasyon amacıyla 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemi takiben her örneğe ait doku örnekleri içinde etil alkol bulunan ayrı bir eppendorf tüpüne aktararak, DNA izolasyon işlemi için hazır tutulmuştur (Resim 3.5-3.6).

3.5 Mitokondriyel DNA İzolasyonu

Mitokondriyel DNA izolasyonu, EurX GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA izolasyon kiti (Polonya) kiti kullanılarak, Mulligan ve Chapman (1989)'un metodu kısmen değiştirilerek yapılmıştır (Resim 3.7). Buna göre, %70 etil alkol ortamında muhafaza edilen örneklerin kas dokusundan bisturi ile alınan 0.5 gr ağırlığındaki numuneler 1.5 mL'lik eppendorf tüpler içine alınmıştır. Tüplere 500 µL TEN tampon ortamı (1 M NaCl, 0.5 M EDTA, 1 M Tris (pH 8.0) ilave edilmiş ve mekanik olarak ezilmiştir. Daha sonra 25 µL SDS (%20), 15 µL Proteinaz K (20 mg/mL) ve 15 µL RNaz (20 mg/mL) ilave edilerek tüpler 60°C'de 12 saat bekletilmiştir. Bunu takiben eppendorf tüpleri 8000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tüplerin üstünde kalan süpernatant (üst tabaka) 1.5 mL'lik tüplere alınmış, geri kalan pelet (alt tabaka) atılmıştır. Eppendorf tüplerine 150 µL fenol ve 150 µL kloroform izoamil alkol (24:1) eklenip 20 dakika vortekste çalkalanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Eppendorf tüpler 8000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve tüpteki süpernatant üst sıvı faz alınmıştır. Eppendorf tüplere 300 µL kloroform izoamil alkol ilave edilerek reaksiyon tekrar edilmiştir. Numuneler yeni eppendorflara alındıktan sonra 800 µL -20°C'de tutulan % 95'lik etanol ile 50 µL 3M sodyum asetat ilave edilmiştir. Örnekler -20°C'de 12 saat bekletilmiştir. Derin dondurucudan alınan numuneler 15 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet mtDNA, %70'lik etanol ortamında iki defa yıkanmış, çeker ocakta tüplerin ağzı açık olacak şekilde 1 saat süresince bekletilmiş ve tüplerdeki etanol uçurularak pelet kurutulmuştur. mtDNA peleti 10/1 oranında 100 µL TE içinde çözündürülmüştür.

3.6 Mitokondriyel DNA Miktarının Spektrofotometrik Ortamda Hesaplanması

mtDNA miktarını spektrofotometrede ölçme işlemi DNA içeren ortam sıvısının absorbladığı uv radyasyon miktarının belirlenmesi ile gerçekleşmektedir. DNA'nın pürin ve pirimidin bazları 260 nm'de ultraviyole ışığı absorbladığı için, spektrofotometrede 260 nm'lik dalga boyunda okunan değer, örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır. Spektrofotometredeki 1 optik yoğunluk (OD); çift iplikli DNA için 50 µg/ml'ye denk gelmektedir (Henegariu vd. 1997).

Mitokondriyel DNA'nın miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop Spektrofotometreden yararlanılmıştır. Mevcut mtDNA numuneleri kuvars küvet kullanılarak spektrofotometrede okunan değer üzerinden şu optik yoğunluk hesaplama formülü kullanılarak DNA miktarı saptanmıştır: DNA miktarı = OD260 X sulandırma katsayısı X 50 µl/m. Daha sonra mtDNA yoğunluğu 50 ng/µl olacak şekilde PCR reaksiyonu için seyreltilmiştir.

Bu aşamada mtDNA saflığının belirlenmesi için 260 nm ve 280 nm'deki OD'ler ölçülerek süspansiyonda fenol veya protein atıklarının olup olmadığı belirlenmiştir. Solusyonda protein veya fenol atıklarının bulunması mtDNA OD260/OD280 oranının 1.8-2.0 arasında olması gereken değerini azalttığı için ortamdaki protein ve fenol kalıntıları DNA miktarının doğru hesaplanmasını zorlaştırmaktadır. Spektrofotometrede 260/280 dalga boylarında 1.8-2.0 saflık derecesinde ölçülen 50 ng/µL miktarındaki mtDNA, PCR işlemi yapıncaya kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Hedeflenen özellikte mtDNA izolasyonu elde edildikten sonra, mtDNA lokuslarının çoğaltılması amacıyla PCR yapılmıştır. Mitokondriyal DNA'nın COI lokusunu çoğaltmada kullanılan ileri (FishF1) ve geri (FishR1) primer çifti ile referans bilgileri Çizelge 3.1'de sunulmuştur (Yang vd. 2016).

Polimeraz zincir reaksiyonu için 30 µl hacimde ortam hazırlanmıştır: 1 µl genomik DNA, her primerden 10 mM, 15 mM MgCl₂, her bir dNTP den 20 mM ve 5 U TaqPolimeraz (Solis Biodyne, Estonya). PZR işlemi FishF1 ve FishR1 primerleri ile gerçekleştirilmiştir (Yang vd. 2016).

Çizelge 3.1 *Esox lucius*'tan mtCOI genini çoğaltma ve dizileme için kullanılan primerler.

Hedef gen	Primerler	Dizileme (5'-3' yönü)	Kaynak
COI	FishR1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Yang vd. 2016
(mtDNA)	FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3	Yang vd. 2016

PZR döngüsü şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 95°C'de 5 dakika, takiben 35 döngü, 95°C'de 45 saniye, 57°C'de 45 saniye ve 72°C'de 1 dakika ve son final uzatması olarak 72°C'de 5 dakika. Daha sonra sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PZR tamamlanmıştır. PZR işleminde Ward vd. (2005)'nin metodolojisinden yararlanılmıştır.

3.8 Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez-Jel ortamlı reaksiyonlarda kullanılmak üzere 50 X TBE yoğunluğunda stok tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Stok jel tampon çözeltisi bileşenleri 50 X TAE 242.0 gr Tris, 57.1 mL Glasiyal asetik asit, 100.0 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0 de, 1000.0 mL'ye tamamlanmıştır. Yürütme tampon çözeltisi ise, 50 X TAE'den 1:50 oranında seyreltme yapılarak 1 X TBE yoğunluğunda hazırlanmıştır. 100 mL hacimli numune yükleme tampon çözeltisi bileşenleri; 10 X DNA 60 mL Gliserol, 250 mg Bromofenol mavisi (%5), 33 mL (0.5 M, pH 8,0) Tris-EDTA, 33 mL steril dH₂O (Maniatis vd. 1982).

100 mL hacminde, %2'lik agaroz Jel hazırlanması için 2 g agaroz, 100 mL 0.5 X TBE ve 4 µL EtBr eklenmiştir. Karışımın iyice çözünmesi için hafifçe çalkalanıp mikrodalgalar fırına konulmuş ve erlen içeriği eriyene kadar aralıklarla mikrodalgadan çıkarılıp çalkalanmıştır. Eriyen agaroz çözeltisi oda sıcaklığında 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra EtBr eklenerek çalkalanmış ve çözeltiye dağılması sağlanmıştır. Agaroz, içinde 10 kuyucuklu tarak olan yatay elektroforez kasetine yavaşça dökülmüş ve polimerize olması için 30 dakika beklenmiştir. Polimerize olan jelden tarak çıkarılmış, agaroz-jel içinde 1XTBE jel tampon çözeltisi bulunan yatay elektroforez tankına alınmış ve jelin üstünü kapatacak kadar TBE ile doldurulmuştur. Örnek yüklemesi için küçük bir parafilm alınarak üzerine her bir örnek sayısı kadar yükleme tamponu (yaklaşık 1'er µl) parafilm üzerine koyulmuş ve her biri 5 µl örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklenmiştir. PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek için de, ilk kuyucuğa bir DNA standart markır (GeneRuler DNA ladder mix, Katalog No: SM0338 Fermentas) yüklenmiş ve sistem 80 V'ta 2 saat yürütülmüştür. Elektroforez işleminin sonlanmasından sonra görüntüleme sistemine alınan agaroz jeldeki PCR ürünlerinin bant boyları UV ışık altında (Vilber Lourmat) ölçülmüş ve fotoğraflama işlemi yapılmıştır. Mutajenik özelliği nedeniyle çalışmada kullanılan etidyum bromid ile jeller ve diğer atık maddeler tıbbi atık torbasında toplanmıştır (Maniatis vd. 1982).

Çalışılması planlanan hedef gen bölgesi 700 bp uzunluğundadır. Amplifikasyon sonucu oluşan PCR ürünü bant büyüklüğünün istenen gen bölgesine ait olduğu DNA standart ölçütünden karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

3.9 COI Gen Bölgesinin Agaroz Jelden Geri Kazanılması ve Saflaştırılması

Elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra görüntüleme sistemine alınan ve agaroz jel ortamında PCR ürünlerinden elde edilen uygun boydaki bantlar UV ışık altında (Vilber Lourmat) steril bisturi ile çevresinden kesilerek eppendorf tüplerine aktarılmıştır. PCR ürünlerini jelden geri kazanım için EurX GeneMATRIX Agarose Out DNA pürifikasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. Saflaştırma kiti; 40 ml Binding Buffer NTI, 25 ml konsantre Wash Buffer NT3, 13 ml Elution Buffer NE'den meydana gelmektedir. DNA saflaştırmada (Maniatis vd. 1982)'nin metodundan yararlanılmıştır. Eppendorf içindeki jel tamamen eriyinceye kadar 55°C sıcak su banyosunda yaklaşık 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra %10 oranda 8 M LiCl₂ eklenip mikropipetaj ile birkaç kez homojenize edilerek buz ortamında 10 dakika soğutulmuştur. Eppendorf tüp içindeki miktara eşit olacak şekilde (v/v) fenol-kloroform ilave edilmiş ve tüpler el ile alt üst edilerek karışmaları sağlanmıştır. Eppendorf tüpler 13 000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant üst faz dikkatlice yeni steril eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine süpernatantın 2.5 katı %100 absöü alkol ilave edilmiştir. Tüpler el ile alt üst edilerek DNA'nın çökelmesi sağlanmıştır. Eppendorflar -18°C'de 1 saat tutulmuştur. Tüpler 13 000 rpm de 20 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı faz alınıp atılmıştır. Tüpte kalan pellet 13 000 rpm de 5 dakika %70'lik etanol ile 2 defa yıkanmıştır. Eppendorf içindeki pellet oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek kurutulmuş ve üzerine 20-40 µl ddH₂O ilave edilerek süspanse edilmiştir. Elde edilen saf PCR ürünleri -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra 5 µl hacminde alınarak, PCR DNA marker ile birlikte %2'lik agaroz jelde 80 voltta 2 saat yürütülmüştür. Elektroforez işlem sonucunda elde edilen ürünlerin bant boyları UV-transillüminatör (Vilber Lourmat, UV) görüntüleme sisteminde ölçülmüş ve GeneGenius (Bio Imaging Systems, UK) görüntüleme sisteminde fotoğraflanmıştır.

3.10 mtCOI Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi

mtCOI gen bölgesinin kısmi nükleotid DNA dizi analizi 3 turna balığı örneği üzerinden yapılmıştır. Bu amaçla 2.5 µL 10XPCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 25 nM her bir dNTP, 25 pM FishF1 ve 25 pM FishR1 primerleri ve 0.6 U Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde PCR reaksiyon ortamı hazırlanmış ve PCR işlemi yürütülmüştür (Garnery vd. 1991). Elde edilen PCR ürünleri doğrudan FishF1 ve FishR1 primerleri ile ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Macrogen Hollanda laboratuvarı) kullanılarak dizilenmiştir. Nükleotid dizileri Mega7.0 çoklu dizi hizalama ClustalW2 yazılımı kullanılarak hizalanmış ve elle ayarlanmıştır.

3.11 Örnekler Arası Nükleotid Değişimlerine Ait Farklılıklar ve Filogram

İncelenen 3 numuneye ait mitokondriyal DNA'nın COI gen bölgesi dizileri arasındaki nükleotid farklılıkların belirlenmesi için FASTA programı (EMBL) ve BLAST algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir (İnt. Kay. 3). COI gen lokusları arasındaki genetik mesafeler, Kimura (1980) tarafından önerilen ve Mega7.0'da çift yönlü silme yöntemli bir analiz metodu olan Kimura'nın İki-Parametre Metodu (Kimura's Two-Parameter Method) kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.2).

Bu araştırmada tanımlanan 3 turna balığı örneğinin COI gen lokusuna ait DNA dizi analizi verileri (MW315200-MW315202) ile genbankta kayıtlı *Esox lucius* izolatları (KT716353, KT124233, MG951592, KC500713) arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla, MEGA 7 programının Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) bölümü kullanılmıştır (Tamura vd. 2007).

Benzer şekilde yukarıda verilen *Esox lucius* izolatlarının COI gen lokusunun DNA dizi analizi verilerine ait filogenetik ilişkilerini gösteren filogram konum analizi, MEGA 7 paket programında UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Tamura vd. 2007). UPGMA ağaçlarındaki güven, Mega7.0 programında Kimura'nın İki-Parametre Metodu ile 1000 bootstrap replikatı analiz edilerek belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

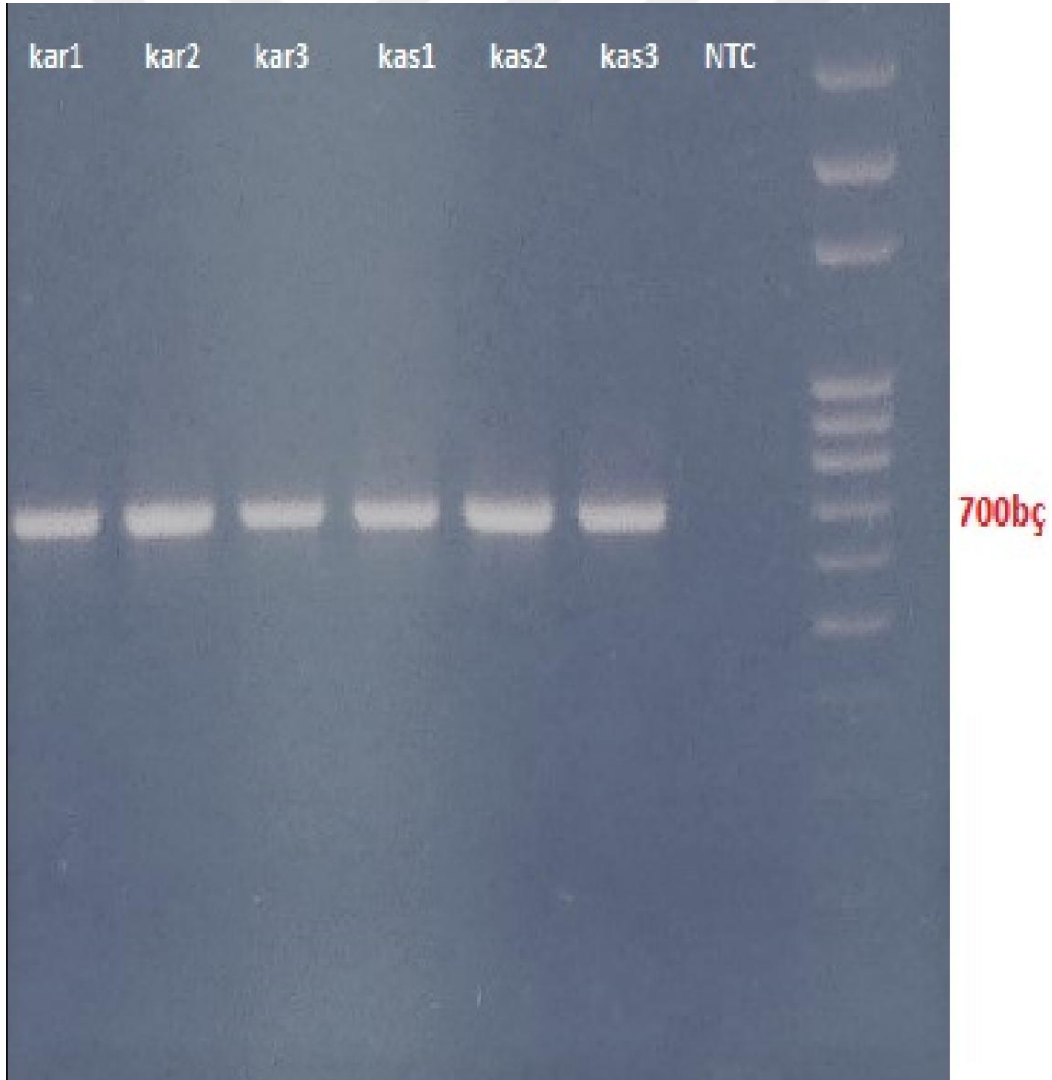
Çizelge 3.2 GenBank'tan alınan ve filogenetik analizde kullanılan taksonomik birimler.

İncelenen tür	Gen Dizisi	Kayıt no	Kaynak
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	MW315200	Bu çalışma
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	MW315201	Bu çalışma
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	MW315202	Bu çalışma
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	KT716353	Yang vd. 2016
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	KT124233	Riina vd. 2016
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	MG951592	Artamonova vd. 2018
<i>Esox lucius</i>	mtCOI	KC500713	Keskin ve Atar 2013
<i>Tinca tinca</i> (dış grup)	mtCOI	KT716360	Yang vd. 2016

4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyon Bilgileri

Bu tez çalışmasında, Karamık Gölü (Afyon)'den yakalanan 3 adet turna balığı (*Esox lucius* L.)'nın kas ve karaciğer dokusundan moleküler tanımlaması mitokondriyal sitokrom oksidaz (mtCOI) gen ekstraksiyonu ile yapılmıştır. mtCOI geni polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve Sanger dizileme metodu uygulanmıştır. Her 3 balık örneğinin kas ve karaciğerine ait mtCOI gen dizileri birbirleriyle tam uyum göstermiştir. Agaroz-jel ortamındaki mtCOI gen bant boyutu 653 bp olarak belirlenmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1 *Esox lucius* örneklerinin mtCOI genine ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ve Marker DNA (kar: karaciğer, kas: kas dokuya ait PZR ürünleri).

4.2 Dizileme Verileri

Turna balığının mtCOI gen lokusu, her örnekten doğrudan dizilenmiştir. Kas ve karaciğer dokularına ait mtCOI lokus dizileri kendi aralarında tam uyum gösterdiği için, GenBank'ta sadece karaciğer dokusuna ait mtCOI gen dizileme verileri kayıt altına alınmıştır (Çizelge 4.1). Örneklerle ait dizilerin eşleşme oranı ve benzerlik oranı %100'dür (Çizelge 4.2). Bu kapsamda örneklerle ait mtCOI gen bölgeleri, kendi aralarında hiçbir nükleotid varyasyonu göstermemiştir. Bu sonuçlar 3 turna balığına ait mtCOI gen dizilerinin tam özdeş olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.1 İncelenen *Esox lucius* örneklerine ait bilgiler.

Coğrafik Yer	Örnekleme Tarihi	Örnek adı ve No	Gen Lokusu	GenBank Kayıt No
Karamık Gölü, Afyonkarahisar	13 Eylül 2020	<i>Esox lucius</i> , Eluc1	mtCOI	MW315200
		<i>Esox lucius</i> , Eluc2	mtCOI	MW315201
		<i>Esox lucius</i> , Eluc3	mtCOI	MW315202

Çizelge 4.2 *Esox lucius* örneklerine ait mtCOI dizi verilerinin, NCBI üzerindeki en yakın izolata göre eşleşme ve benzerlik oranları.

Örnek Adı ve No	GenBank No	Dizi hacmi (bp)	Eşleşme ve Benzerlik Oranı (%)
<i>Esox lucius</i> – Eluc 1	MW315200	653	%100 - %100
<i>Esox lucius</i> – Eluc 2	MW315201	653	%100 - %100
<i>Esox lucius</i> – Eluc 3	MW315202	653	%100 - %100

Turna balığı örneklerinin mtCOI gen dizilerindeki nükleotid kompozisyonunun A+T yönünde eğilim sergilediği (%55.1) görülmüştür. Nükleotid yüzdesi sırasıyla %23.1 (A) ve %32.1 (T) şeklinde hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Araştırma materyali olan 3 turna balığına ait mtCOI dizileri ile Gen-Bank'ta kayıtlı olan *Esox lucius* izolatlarının mtCOI referans dizilerinin ikili karşılaştırması yapılmıştır. Buna göre, mevcut çalışmadaki örneklerle daha yakın görünen izolat Acıgöl (Türkiye)'den tanımlanan *Esox lucius* olup, bunu İtalya'dan bir *Esox lucius* izolatu ve daha sonrada Çin izolatları takip etmektedir (Çizelge 4.5). Bu veriler doğrultusunda, bu çalışmada incelenen örnekler ile GenBank'taki diğer izolatlar arasındaki toplam ve ortalama karakter farklılık sayısının oldukça düşük olduğunu görülmüştür.

Çizelge 4.3 Karamık Gölü *Esox lucius* örneklerinin mtCOI dizi verileri.

Örnek No	GenBank No	Baz Dizisi
Eluc 1	MW315200	1 tgcttgagcc ggaatagtcg gcacagcctt aagcctttta atccggggccg aactaagcca 61 gccaggggct ctcttaggtg acgaccagat ttataatgtt atcggtacag cccatgcctt 121 tgttataatc tttttatag ttatacccggt tataattggg gggtttggaa actgattaat 181 tcccctaagc attggtgccc cgcacatggc ctccccccgc ataaataata taagctcttg 241 acttctcccc cctcctttt tacttctctt agcctctca ggtgttgaag ctggtgctgg 301 tactggctga acagtttctc cgcctttggc cggaactta gcacacgcag gtgcttctgt 361 agacttaact attttctctc tccacctggc cggaatttct tctattctag gagctattaa 421 ttttattacc acaattatta acataaaaacc ccccgccatc tcacaatc agacaccatt 481 attgtttga gcagtcctga ttacagctgt acttctactt ctatctctcc cagtcctagc 541 cgctggaatt accatattgc tcacagaccg aaatttaaac accacattct ttgacccgcg 601 tgggtgggga gaccctattc tataccaaca cctcttctga ttctttggcc acc
Eluc 2	MW315201	1 tgcttgagcc ggaatagtcg gcacagcctt aagcctttta atccggggccg aactaagcca 61 gccaggggct ctcttaggtg acgaccagat ttataatgtt atcggtacag cccatgcctt 121 tgttataatc tttttatag ttatacccggt tataattggg gggtttggaa actgattaat 181 tcccctaagc attggtgccc cgcacatggc ctccccccgc ataaataata taagctcttg 241 acttctcccc cctcctttt tacttctctt agcctctca ggtgttgaag ctggtgctgg 301 tactggctga acagtttctc cgcctttggc cggaactta gcacacgcag gtgcttctgt 361 agacttaact attttctctc tccacctggc cggaatttct tctattctag gagctattaa 421 ttttattacc acaattatta acataaaaacc ccccgccatc tcacaatc agacaccatt 481 attgtttga gcagtcctga ttacagctgt acttctactt ctatctctcc cagtcctagc 541 cgctggaatt accatattgc tcacagaccg aaatttaaac accacattct ttgacccgcg 601 tgggtgggga gaccctattc tataccaaca cctcttctga ttctttggcc acc
Eluc3	MW315202	1 tgcttgagcc ggaatagtcg gcacagcctt aagcctttta atccggggccg aactaagcca 61 gccaggggct ctcttaggtg acgaccagat ttataatgtt atcggtacag cccatgcctt 121 tgttataatc tttttatag ttatacccggt tataattggg gggtttggaa actgattaat 181 tcccctaagc attggtgccc cgcacatggc ctccccccgc ataaataata taagctcttg 241 acttctcccc cctcctttt tacttctctt agcctctca ggtgttgaag ctggtgctgg 301 tactggctga acagtttctc cgcctttggc cggaactta gcacacgcag gtgcttctgt 361 agacttaact attttctctc tccacctggc cggaatttct tctattctag gagctattaa 421 ttttattacc acaattatta acataaaaacc ccccgccatc tcacaatc agacaccatt 481 attgtttga gcagtcctga ttacagctgt acttctactt ctatctctcc cagtcctagc 541 cgctggaatt accatattgc tcacagaccg aaatttaaac accacattct ttgacccgcg 601 tgggtgggga gaccctattc tataccaaca cctcttctga ttctttggcc acc

Çizelge 4.4 *Esox lucius* örneklerinin mtCOI dizisi A+T oranları.

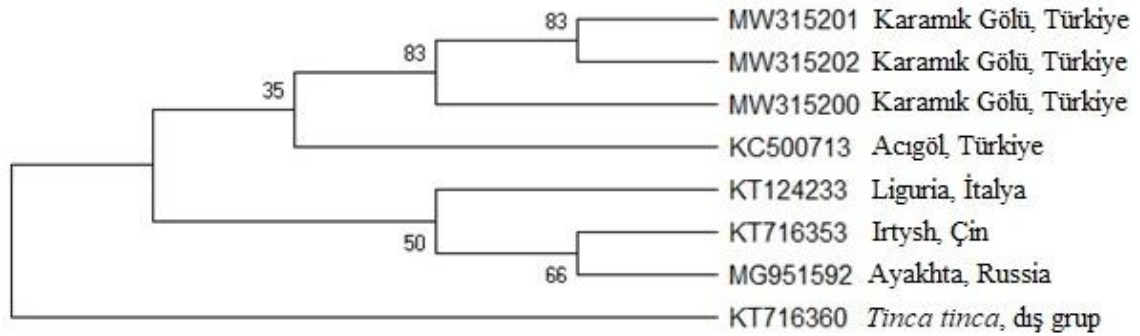
Gen Lokusu	Örnek No	GenBank No	T(U)	A	A+T
mtCOI	<i>Esox lucius</i> – Eluc 1	MW315200	32.01	23.12	55.13
	<i>Esox lucius</i> – Eluc 2	MW315201	32.01	23.12	55.13
	<i>Esox lucius</i> – Eluc 3	MW315202	32.01	23.12	55.13

Çizelge 4.5 *Esox lucius* örneklerine ait mtCOI nükleotit dizi farklılıklarının (%) ikili karşılaştırılması.

<i>Esox lucius</i>	MW315200							
<i>Esox lucius</i>	MW315201	0.00						
<i>Esox lucius</i>	MW315202	0.00	0.00					
<i>Esox lucius</i>	KT716353	0.00	0.00	0.00				
<i>Esox lucius</i>	KT124233	0.01	0.01	0.01	0.00			
<i>Esox lucius</i>	MG951592	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>Esox lucius</i>	KC500713	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	
<i>Tinca tinca</i>	KT716360	0.25	0.25	0.25	0.25	0.26	0.26	0.26

4.3 Filogram

Turna balıklarına ait mtCOI genin nükleotit dizilerine dayanan filogenetik analiz, *Esox lucius*'un morfolojik temelli taksonomik durumunu desteklemiştir. mtCOI gen dizilerine göre oluşturulan UPGMA analizi, Şekil 4.1 de görülen tüm *Esox lucius* izolatlarının aynı küme altında gruplandıklarını belirlemiştir. Ağaç dalları arasındaki fark, mevcut izolatlarımız ile diğer *Esox lucius* izolatlarının konumunu göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen 3 *Esox lucius* ile Acıgöl'den tanımlanan *Esox lucius* izolatının ağacın aynı dal sırasında yer alması, bunların yakın ilişkisini göstermiştir. Çin ve Rusya kökenli *Esox lucius* izolatları ise aynı ağaç kolu üzerinde ayrı bir dal oluşturmuştur.



Şekil 4.1 *Esox lucius* örneklerine ait mtCOI gen dizilerinden çıkarılan UPGMA ağacı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mitokondriyel DNA esaslı barkodlama kavramı ilk olarak 2003 yılında Guelph Üniversitesi taksonomisti Paul Hebert tarafından önerilmiştir (Hebert vd. 2003). Mitokondriyel DNA üzerinde bulunan gen dizileri günümüzdeki taksonomik tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Organizmaların taksonomik ve filogenetik özelliklerini belirleme için kullanılan mitokondriyel DNA, nispeten az sayıda veriyle sonuca ulaşılabilmesi ve herhangi bir nükleer belirteçten daha hızlı sonuç alınması nedeniyle oldukça yararlıdır. Ayrıca mtDNA dizi analizi, uygun nükleer gen boyutlarının elde edilmesinin zor olduğu türleri incelemek için kullanılan alternatif bir tekniktir (Senanan ve Kapuscinski, 2000).

Ward vd. (2005), mtDNA'nın COI gen dizilerine dayalı olarak yürütülen barkodlama çalışmalarının büyük çoğunluğunda kesin tür tanımlanmasının yapılabildiğini vurgulamıştır. Ward vd. (2005), balıklar için global bir COI barkod veritabanı oluşturulduktan sonra, bir DNA dizileycisine erişimi olan herkesin; herhangi bir balık yumurtası, larvası veya karkas parçasından o canlının hangi türe ait olduğunu yüksek bir kesinlikle tanımlayabileceğini belirtmiştir. Ward vd. (2005), bu yöntemin balıkçılık yöneticileri, balık ekolojistleri, balık perakendecileri ve balık tanımlama mikro dizileri geliştirmek isteyen bilim insanları için vazgeçilemez bir araç olacağını söylemiştir.

Bu çalışmada, Karamık Gölü'nden temin edilen 3 adet *Esox lucius*'un mtCOI gen dizileri tanımlanmış, kendi aralarında tam bir homolog uyum tespit edilmiş ve incelenen 3 turna balığı örneğinin *Esox lucius* taksonuna ait bireyler olduğu NCBI Gen Bankası verilerinden yararlanılarak belirlenmiştir. Böylece, daha önceden Geldiay ve Balık (1988) tarafından anatomik-morfolojik özelliklerine göre tanımlanmış olan Karamık Gölü turna balıklarının, mtCOI dizi özelliklerine göre de *Esox lucius* taksonunda yer aldıkları doğrulanmıştır.

Esox lucius türü üzerine ilk mtDNA dizileme çalışmaları Maes vd. (2003) tarafından gerçekleştirilmiştir. Maes vd. (2003), Belçika dahil altı farklı Avrupa ülkesi ile Kanada'daki 15 farklı lokasyondan temin edilen turna balığı bireylerinin mtDNA'sından sitokrom b dizisini kullanarak genetik yapısı araştırılmış ve 551 bp'lik

sitokrom b dizisinin GC içeriğini %43.9 olarak bulmuşlardır. Örneklerde 153, 267 ve 459 nolu dizi pozisyonlarında olmak üzere sadece üç bölgede son derece düşük değerlikli nükleotid çeşitlilik ($p_i = 0.0009$) tespit edilmiştir.

Billington ve Hebert (1991), tatlı su balıklarının sitokrom b genetik değişkenliğinin son derece düşük olduğunu vurgulamış ve turna balığı populasyonları içindeki nükleotid çeşitliliğinin diğer balıklardaki popülasyon içi düzeylerle aynı büyüklükte olduğunu belirtmiştir. Mevcut bu araştırmada incelenen üç turna balığı örneğinin mtDNA COI gen bölgesinde varyasyonlu nükleotid dizine rastlanmaması, Maes vd. (2003), Billington ve Hebert (1991)'in sonuçları ile uyum göstermenin yanı sıra, Ward vd. (2005)'nin "mtDNA'nın tür tanımlaması için uygun bir genetik belirteç" görüşünü de desteklemektedir.

Bu araştırmada incelenen 3 turna balığına ait mtCOI dizileri ile Gen-Bank'ta kayıtlı olan *Esox lucius* izolatlarının referans dizileri, ikili mesafe matris yöntemiyle karşılaştırılmıştır (Keskin vd. 2013b, Riina vd. 2016, Yang vd. 2016, Artamonova vd. 2018). Buna göre, örnekler arasındaki ikili mesafe farklılık değerlerinin, tür içi varyasyon tolerans sınır değeri olan %2 den daha düşük olduğu görülmüştür. Mevcut bu çalışma sonuçlarında elde edilen mtCOI gen dizilerinin tam homolojik uyum göstermesi, aynı tür içinde yer aldıklarını güçlü bir şekilde göstermiştir.

Mevcut bu araştırmada, 3 *Esox lucius* örneğine ait mtCOI dizilerinin evrimsel mesafeleri ile GenBank ortamında kayıtlı olan *Esox lucius* izolatlarının mtCOI dizileri UPGMA yöntemiyle karşılaştırılmış ve köklü filogram ağaçları üretilmiştir (Keskin vd. 2013b, Riina vd. 2016, Yang vd. 2016, Artamonova vd. 2018). Filogramda, mevcut çalışmada incelenen 3 turna balığına ait diziler ile coğrafik yayılım bakımından en yakın örnek olan Acıgöl (Türkiye) turna balığı izolatu aynı ağaç kolunu paylaşmış, bunu coğrafik uzaklıkla bağlantılı olarak İtalya izolatu ve diğer izolatlar takip etmiştir. Oluşturulan bu köklü filogram ağacında, *Esox lucius* örneklerinin coğrafik uzaklığa bağlı olarak filogenetik ağaç dallarında farklı konumlanmış olması, söz konusu alanlardaki turna balığı populasyonlarının taksonomik konumunu belirlemiştir.

Turna balığı, kuzey yarıküredeki tatlı ve acı su habitatlarında geniş coğrafik dağılış gösteren, ekonomik, ticari ve spor balıkçılığı için büyük öneme sahip bir türdür. Kuzey Amerika, Orta-Doğu ve Avrupa populasyonları arasındaki oldukça düşük seviyelerde genetik varyasyona dayalı olarak, *Esox lucius*'un yakın zamana kadar Avrupa'daki tek esosit balık türü olduğuna inanılmış ve genetik çeşitliliğin net bir coğrafi yapılanması tanımlanmamıştır. Bu alandaki boşluğun fark edilmesiyle, farklı lokalitelerdeki turna balığı populasyonlarının nükleer DNA-mikrosatellit belirteçleri belirlemiş ve bunun sonucu intraspesifik genetik varyasyonlar ile populasyon farklılaşmaları tespit edilmiştir (Hansen vd. 1999). Bir diğer çalışmada da, Avrupa kıtasındaki *Esox* genusunun güney ve batı dağılım sınırlarında genetik bakımdan araştırılmayan alanlara çalışmaların genişletilmesiyle, tür düzeyine yükselen *Esox aquitanicus*, *Esox cisalpinus*, *Esox flaviae* gibi farklı yerel formlar ortaya çıkarılmıştır (Seeb vd. 1987).

Turna balığı polasyonlarının mtCOI ve mitokondriyel sitokrom b dizilerini tanımlayan çalışmaların yanı sıra, tam mtDNA ve nükleer genom özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. Brzuzan vd. (1998), Polonya'daki turna balığı popülasyonu üzerinden total mtDNA ve D-Loop bölgesine ait varyasyonu RFLP yöntemi ile incelemiştir. Araştırmacılar (1998), restriksiyon analizi sonucunda tüm parçacıkların ortalamasını alarak, turna balığı total mtDNA molekülü için ortalama boyut tahminini 16200 ± 400 bp olarak hesaplamışlar ve düşük nükleotid çeşitlilik indeksi ($p = 0.06$) kaydetmişlerdir.

Brzuzan vd. (1998), gözledikleri düşük mtDNA çeşitliliğini yetersiz örnek sayısı ve kullanılan RFLP metodundaki enzimlerin sınırlı sayıda olmasıyla ilişkilendirmiştir. Ayrıca, mtDNA parçacıklarının agaroz jelde dağılıbilirliklerinden ve görselleştirme yöntemindeki gözden kaçan küçük mtDNA bantlarından dolayı değişken küçük fragmanların tespit edilememesini de muhtemel bir olasılık olarak görmüştür. Brzuzan vd. (1998)'nin sıraladıkları bu olasılıkların gerçek olma durumu varsa, çalışmalarında elde ettikleri turna balığı türüne ait mtDNA'nın 16.200 ± 400 bp'lik toplam uzunluğun eksik bir tahmin olabileceğini beyan etmişlerdir. Bu kapsamda Brzuzan vd. (1998), turna balıklarının mtDNA dizi yapıları hakkında daha doğru ve daha güvenilir bilgi edinebilmek için, daha fazla numune ve daha fazla gen lokusu üzerinden ek çalışmalara ihtiyaç olduğuna işaret edilmiştir.

Nicod vd. (2004), İsviçre'nin Ren (Atlantik), Rhone (Akdeniz) ve Po (Akdeniz) su havzalarından 12 lokasyon ile Danimarka, İtalya, Belçika, Avusturya, Yunanistan, Macaristan ve Fransa'daki göl veya nehirlerinden 8 lokasyondan toplam 108 turna balığı üzerinden Avrupa turna balığı popülasyonlarındaki genetik yapısını mitokondriyal DNA üzerinden D-loop DNA sekans varyasyonunu araştırmıştır. Çalışmada 458 bp uzunluğundaki hizalamada, 11 farklı haplotip bulunmuştur. Haplotipler, herhangi bir ekleme ve silme boşluğu olmaksızın 14 pozisyonda farklılık göstermiştir. Ayrıca A, T, G ve C'nin ortalama nükleotid frekansları sırasıyla %35.1, 28.5, 13.1 ve %23.3 olarak bulunmuştur. Haplotipler arasında düzeltilmemiş ikili dizi farklılığı %0.20 ila 1.75 arasında değişmiştir. Haplotiplerin coğrafik dağılımı, Avrupa havzalarındaki turna balığı popülasyonlarında son derece düşük genetik farklılaşmaya işaret etmiştir.

Nicod vd. (2004), mtDNA'nın düşük varyasyon seviyelerini; “1) Turna balıkları az sayıdaki sığınaktan buzul sonrası dönemde çıkarak yeniden yayılmış olabilirler. 2) Belirli bölgelerdeki kaynak popülasyonundan geniş alanlara yapay transplantasyonlar yapılmış olabilir. 3) Muhtemelen diğer birçok yırtıcı hayvan gibi, turna balığı da düşük etkileşimli demografik davranış özelliklerine sahip olması nedeniyle düşük nitelikli genetik çeşitlilik oluşmuş olabilir” hipotezleriyle açıklamaktadır. Nicod vd. (2004), elde ettiği veriler sonucunda, mtDNA varyasyonun tek başına, turna balıklarının hangi rotalar üzerinden Avrupa'ya yayıldığına dair kesin bir değerlendirme yapmaya yetersiz kaldığını belirtmiştir. Bu nedenle, Avrupa ve Kuzey Amerika kıtalarını kapsayan Holarctic bölgedeki turna balığı popülasyonlarının hiperdeğişken özellikteki mikrosatellit lokusları ile mtDNA gibi nükleer belirteçlerin bir kombinasyon şeklinde araştırılmasının, turna balıklarındaki yapay veya doğal popülasyon olgularının ortaya çıkarılmasında faydalı olabileceği belirtilmiştir.

Yukarıdaki veriler göz önüne alındığında, *Esox* genusundan bu güne kadar anatomik-morfoloji özelliklerine göre sadece tek bir türün (*Esox lucius*) tanımlandığı (Geldiay ve Balık 1988), Anadolu'daki turna balığı popülasyonlarının mitokondriyel ve nükleer DNA genom özelliklerinin belirlenerek, söz konu popülasyonların taksonomik konumlarının yeniden sorgulanması ve doğrulanması üzerine araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, Karamık Gölündeki turna balıklarının mtCOI gen dizileri ilk defa bu çalışmayla tanımlanmış ve elde edilen mtCOI gen dizi sonuçlarıyla, anatomik ve morfolojik özelliklerine göre tanımlanan Karamık Gölü turna balıklarının taksonomik konumu doğrulanmıştır. Çalışma sonuçlarıyla ayrıca, Anadolu'daki turna balığı popülasyonlarının mtDNA genomuna ait özelliklerinin belirlenmesi alanındaki çalışmalar için bir ön veri oluşturulmuş, *Esox lucius* türüne ait genetik özelliklerin küresel ölçekte belirlenmesi çalışmalarına da katkı yapılmıştır. Bununla birlikte Anadolu'daki *Esox lucius* türünün genetik özelliklerinin daha iyi bilinmesi için, daha fazla örnek ve gen lokusu üzerinden genomik çalışmaların yapılması gerekmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Aksun F Y, 1987a, Karamık Gölünde Yaşayan Turna Balıklarının (*Esox lucius* L., 1758) Üreme Biyolojisi, Doğa Türk Zooloji Dergisi, 11, 67–75.
- Aksun F Y, 1987b, Karamık Gölünde Yaşayan Turna Balıklarının (*Esox lucius* L., 1758) Büyüme Özellikleri ve Büyüme Oranları, Doğa Türk Zooloji Dergisi, 11, 76–86.
- Aksun F Y, Kuru M, 1987, Karamık Gölünde Yaşayan Turna Balıklarının (*Esox lucius*) Mide İçerikleri ve Beslenme Biçimi, Doğa Türk Zooloji Dergisi, 11, 87–95.
- Artamonova V S, Kolmakova O V, Kirillova E A, Makhrov A A, 2018, Phylogeny of Salmonoid Fishes (Salmonoidei) Based on mtDNA COI Gene Sequences (Barcoding), Contemporary Problems of Ecology, 11, 3, 271–285.
- Arslan A, Alpaslan Z, 2020, Banded Karyotypes of the Northern Pike, *Esox lucius* (Esocidae) in Turkey, Acta Aquatica Turcica, 16, 4, 511–515.
- Attardi G, 1985, Animal Mitochondrial DNA: An Extreme Example of Genetic Economy, International Review of Cytology, 93, 93–145.
- Balık İ, Çubuk H, Özkök R, Uysal R, 2006, Reproduction Properties of Pike (*Esox lucius* L., 1758) Population in Lake Karamık (Afyonkarahisar/Turkey), Turkish Journal of Zoology, 30, 27–34.
- Bayçelebi E, 2020, Distribution and Diversity of Fish from Seyhan, Ceyhan and Orontes River Systems, Zoosystematics and Evolution, 96, 2, 747–767.
- Beckmann J S, Soller M, 1983, Restriction Fragment Length Polymorphisms in Genetic Improvement: Methodologies, Mapping and Costs, Theoretical and Applied Genetics, 67, 35–43.
- Beskansky N J D W, Severson M T F, 2003, DNA Barcoding of Parasites and Invertebrate Disease Vectors: What You don't Know can Hurt You, Trends Parasit, 19, 545–546.
- Beuzen N D, Stear M J, Chang K C, 2000, Molecular Markers and Their use in Animal Breeding, Veterinary Journal, 160, 42–52
- Billington N, Hebert P D N, 1991, Mitochondrial DNA Diversity in Fishes and its Implications for Introductions, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48, 80–94.

- Black IV, W C, 1993, PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care, *Insect Molecular Biology*, 2, 1, 1–6.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W, 1980, Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, *The American Journal of Human Genetics*, 32, 314–331.
- Brzuzan P, Luczynski M, Kuzniar P A, 1998, Mitochondrial DNA Variation in Two Samples of Northern Pike, *Esox lucius* L, *Aquaculture Research*, 29, 521–526.
- Brown J R, Beckenbach A T, Smith M J, 1992, Mitochondrial DNA Length Variation and Heteroplasmy in Populations of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*), *Genetics*, 132, 1, 21–228.
- Casu M, Scarpa F, Cossu P, Lai T, Curini-Galletti M, Varcasia A, Sanna D, 2016, First record of *Esox cisalpinus* (Teleostea: Esocidae) in Sardinia with insight on its mitochondrial DNA genetic variability. *Italian Journal Zoology*, 83, 4, 514–523.
- Cerutti-Pereyra F, Meekan M G, Wei N-W V, O'Shea O, Bradshaw C J A, Austin C M, 2012, Identification of Rays through DNA Barcoding: An Application for Ecologists, *PLoS ONE*, 7, 6, e36479.
- Craig J F, 2008, A short review of pike ecology, *Hydrobiologia*, 601, 5–16.
- Çeliktaş S, 2009, Apolyont (Uluabat) Gölü Turna Balığı (*Esox lucius* L., 1758)'nın Bazı Biyolojik Özellikleri, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 79s, İstanbul.
- Demeke T, Adams F P, 1992, The Effects of Plant Polysaccharides and Buffer Additives on PCR, *BioTechniques*, 12, 332–335.
- Dieffenbach C W, Lowe T M J, Dveksler G S, 1993, General Concepts for PCR Primer Design, *PCR Methods and Applications*, 530–537.
- Erlich H A, Gelfand D H, Sninsky J J, 1991, Recent Advances in Polymerase Chain Reaction, *Science*, 252, 1643–1650.
- Gandolfi A, Ferrari C, Crestanello B, Girardi M, Lucentini L, Meraner A, 2017, Population Genetics of Pike, Genus *Esox* (Actinopterygii, Esocidae), in Northern Italy: Evidence Form Osaic Distribution of Native, Exotic and Introgressed Populations, *Hydrobiologia*, 794, 73–92.
- Geldiay R, Balık S, 1988, Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No 97, 644s, İzmir.

- Gold J R, Richardson L R, 1991, Genetic Studies in Marine Fishes. IV. An analysis of Population Structure in the Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Using Mitochondrial DNA, Fisheries Research, 12, 213–241.
- Griffiths A J F, Miller J H, Suzuki D T, Lewontin R C, Gelbart W M, 1996, An Introduction to Genetic Analysis. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, p. 916, New York.
- Hansen M M, Taggart J B, Meldrup D, 1999, Development of New VNTR Markers for Pike and Assessment of Variability at Di and Tetranucleotide Repeat Microsatellite loci, Journal of Fish Biology, 55, 183–188.
- Hall H G, 1998, PCR Amplification of a Locus with RFLP Alleles Specific to African honeybees, Biochemical Genetics, 36, 351–361.
- Hasbek M, Arı Y, 2018, Bizim Gölümüzü Bize Vermeyecekler: Karamık Gölü’nün Kültürel ve Politik Ekolojisi, Doğu Coğrafya Dergisi, 23, 40, 37–60.
- Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, 2003, Biological identifications through DNA barcodes, Proceedings of the Royal Society B, 270, 313–322.
- Hebert P D N, Gregory T R, 2005, The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy, Systematic Biology, 54, 5, 852–859.
- Hernandez C, Bougas B, Perreault-Payette A, Simard A, Côté G, Bernatchez L, 2020, 60 Specific eDNA qPCR Assays to Detect Invasive, Threatened, and Exploited Freshwater Vertebrates and Invertebrates in Eastern Canada, Environmental DNA, 2, 373–386.
- Huo T B, Ma B, Tang F J, Li Z, Jiang Z F, Cai L G, Adakbek K J and Liu L Z, 2009, Growth Models and Life-history Pattern of *Esox lucius* in Ertixhe River, J Fish Sci China, 16, 316–322.
- Jacobsen B H, Hansen M M, Loeschcke V, 2005, Microsatellite DNA Analysis of Northern Pike (*Esox lucius* L) Populations: Insights Into the Genetic Structure and Demographic History of a Genetically Depauperate Species, Biological Journal of the Linnean Society, 84, 91–101.
- Kazancı N, Girgin S, Dügel M, Oğuzkurt D, Mutlu B, Dere Ş, Barlas M, Özçelik M, 1999, Köyceğiz Beyşehir Eğirdir Akşehir Eber Çorak Kovada Yarışlı Bafa Salda Karataş Çavuşçu Gölleri Küçük ve Büyük Menderes Deltası Güllük Sazlığı Karamuk Bataklığı’nın Limnolojisi Çevre Kalitesi ve Biyolojik Çeşitliliği. Türkiye İç Suları Araştırmaları Dizisi, IV, Form Ofset, Ankara.

- Keskin E, Atar H H, 2013a, DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6, 2, 01–08.
- Keskin E, Atar H H, 2013b, DNA Barcoding Commercially Important Fish Species of Turkey, *Molecular Ecology Resources*, 13, 788–797.
- Keskin E, Ağdamar S, Tarkan A S, 2013, DNA Barcoding Commonnon-native Freshwater Fish Species in Turkey: Low Genetic Diversity but High Population Structuring, *Mitochondrial DNA*, 24, 3, 276–287.
- Khoshkholgh M, Alavi A R, Nazari S, 2015, Karyotypic Characterization of the Pike, *Esox lucius* from the South Caspian Sea Basin, *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 11, 1, 43–49.
- Kwok S, Chang S Y, Sninsky J J, Wang A, 1994, A Guide to the Design and Use of Mismatched and Degenerate Primers, *PCR Methods and Applications*, 539–547.
- Kwong S, Srivathsan A, Meier R, 2012, An Update on DNA Barcoding: Low Species Coverage and Numerous Unidentified Sequences, *Cladistics*, 28, 639–644.
- Kress W, J K J, Wurdack E A, Zimmer, Weigt L A, Janzen D H, 2005, Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 102, 8369–8374.
- Kuru M, 2011, *Omurgalı Hayvanlar*, Palme Yayıncılık, 841s, Ankara.
- Lee S W, Ledig T, Johnson D R, 2002, Genetic Variation at Allozyme and RAPD Markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California, *American Journal of Botany*, 89, 4, 566–577.
- Lopez J A, Bentzen P, Pietsch T W, 2000, Phylogenetic Relationships of Esocoid Fishes (Teleostei) Based on Partial Cytochrome b and 16S Mitochondrial DNA Sequences, *Copeia*, 420–431.
- Lowe A J, Hanotte O, Guarino L, 1996, Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: The Caase of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Plant Genetic Resources Newsletter*, 107, 50–54.
- Lucentini L, Puletti M E, Ricciolini C, Gigliarelli L, Fontaneto D, 2011, Molecular and Phenotypic Evidence of a New Species of Genus *Esox* (Esocidae, Esociformes, Actinopterygii): The Southern Pike, *Esox flaviae*, *PLoS One*, 6, 12, 25218.
- Maes G E, Van Houdt J K J, Charleroy D De, 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.

- Maxam A M, Gilbert W, 1977, A new method for sequencing DNA, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 2, 560–564.
- Miller S E, 2007, DNA Barcoding and the Renaissance of Taxonomy, Proc. Natl. Acad. Sci, 104, 12, 4775–4776.
- Moritz R F A, Hawkins C F, Crozier R H, Mackinley A G, 1986, A Mitochondrial DNA Polymorphism in Honeybees, Experientia, 42, 322–324.
- Morrow J E, 1980, The Freshwater Fishes of Alaska, University of B C, Animal Resources Ecology Library, 248pp.
- Nicod J C, Wang Y Z, Excoffier L, Largiadè C R, 2004, Low Levels of Mitochondrial DNA Variation Among Central and Southern European *Esox lucius* Populations, Journal of Fish Biology, 64, 1442–1449.
- Riina M V, Oneto F, Ottonello D, Capurro M, Ciuffardi L, Braidà L, Acutis P, 2016, First record of the Cisalpine Pike *Esox cisalpinus* Bianco & Delmastro, 2011 in Liguria (New Italy): Future Studies and Storage Perspectives, Bollettino dei Musei e Degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, 78, 26–32.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E, 2003, Animal Mitochondrial DNA Recombination Revisited, Trends in Ecology and Evolution, 18, 8, 411–417.
- Roy M, Belliveau V, Nicholas E, Mandrak N E, Gagne N, 2018, Development of Environmental DNA (eDNA) Methods for Detecting High-Risk Freshwater Fishes in Live Trade in Canada, Biological Invasions, 20, 299–314.
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N, 1985, Enzymatic Amplification of B-globulin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, Science, 230, 1350–1354.
- Sammour R H, 1991, Using Electrophoretic Techniques in Varietal Identification, Biosystematic Analysis, Phylogenetic Relations and Genetic Resources Management, Journal of Islamic Academy of Sciences, 4, 3, 221–226.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R, 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 12, 5463–5467.
- Seeb J E, Seeb L W, Oates D W, Utter F M, 1987, Genetic Variation and Postglacial Dispersal of Populations of Northern Pike (*Esox lucius*) in North America, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44, 555–561.

- Senanan W, Kapuscinski A R, 2000, Genetic Relationships Among Populations of Northern Pike (*Esox lucius*), Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57, 391–404.
- Sepulveda A J, Hutchins P R, Massengill R L, Dunker K J, 2018, Tradeoffs of a Portable, Field-based Environmental DNA Platform for Detecting Invasive Northern Pike (*Esox lucius*) in Alaska, Management of Biological Invasions, 9, 3, 253–258.
- Sharina S N, Kartavtsev, Y P, 2010, Phylogenetic and Taxonomic Analysis of Flat Fish Species (Teleostei, Pleuronectiformes) Inferred from the Primary Nucleotide Sequence of Cytochrome Oxidase I Gene (Co-I), Russ. J. Genet, 46, 3, 401–407.
- Smith V S, 2005, DNA barcoding: Perspectives from a “Partnerships for Enhancing Expertise in Taxonomy” (PEET) debate, Syst Biol, 54, 841–844.
- Southern E M, 1975, Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98, 503–517.
- Turner C R, Barnes M A, Xu C C, Jones S E, Jerde C L, Lodge D M, 2014, Particle Size Distribution and Optimal Capture of Aqueous Macrobial eDNA, Methods in Ecology and Evolution, 5, 676–684.
- Vatandoust S, Abdoli A, Anvarifar H, Mousavi-Sabet H, 2014, Morphometric and Meristic Characteristics and Morphological Differentiation Among Five Populations of Brown Trout *Salmo Trutta fario* (Pisces: Salmonidae) Along the Southern Caspian Sea Basin, European Journal of Zoological Research, 3, 2, 56–65.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995, AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting, Nucleic Acids Research, 23, 21, 4407–4414.
- Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, Last P R, Hebert P D N, 2005, DNA Barcoding Australia’s Fish Species, Philosophical Transactions of the Royal Society B, 360, 1847–1857
- Ward R D, Hanner R, Hebert P D, 2009, The Campaign to DNA Barcode all Fishes, Fish-Bol, Journal of Fish Biol, 74, 329–356.
- Watson J D, Gilman M, Witkowski J, Zoller M, 1992, The Polymerase Chain Reaction In: Recombinant DNA, Second Edition, New York, 79–98.

- Waugh J, 2007, DNA Barcoding in Animal Species: Progress, Potential and Pitfalls, BioEssays, 29, 188–197.
- Wheeler Q D, 2004, Taxonomic Triage and the Poverty of Phylogeny, Phil. Trans. R. Soc. London B, 359, 571–583.
- Will K W, Rubinoff D, 2004, Myth of the Molecule: DNA Barcodes for Species Cannot Replace Morphology for Identification and Classification, Cladistics, 20, 47–55.
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V, 1990, DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful Genetic Markers, Nucleic Acids Research, 18, 6531–6535.
- Yang X, Hadidi A, Garnsey S M, 1992, Enzymatic cDNA Amplification of *Citrus exocortis* and *Cachexia viroids* From Infected Citrus Hosts, Phytopathology, 82, 279.
- Yang T, Meng W, Zhang R, Gao T, Cai L, Hai S, Zhou Q, 2016, DNA Barcoding of Fishes in Irtys River China, Russian Journal of Genetics, 52, 9, 969–976.
- Zou S M, Li S F, 2006, The Study on Chromosomes of White Spot Pike (*Esox lucius*). Journal of Shanghai Fisheries University, 2, 203–211.

İnternet Kaynakları

- 1- <https://www.cabi.org/isc/datasheet/83118>, 23.03.2021
- 2-https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_004593.1, 08.04.2021

