

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI AMFİBİ VE SÜRÜNGEN TÜRLEİNİN KOLEKSİYON
ÖRNEKLERİNDEN DNA AMPLİFİKASYONU

Selin ERTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 12/01/2012

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. C. Varol TOK

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

SELİN ERTÜRK tarafından **PROF. DR. C. VAROL TOK** yönetiminde hazırlanan “**BAZI AMFİBİ VE SÜRÜNGEN TÜRLERİNİN KOLEKSİYON ÖRNEKLERİNDEN DNA AMPLİFİKASYONU** ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. C. Varol TOK

Danışman

Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 12/01/2012

Prof. Dr. İsmet KAYA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 108T559 no’lu ve ÇOMÜ-BAP tarafından 2010/174 no’lu projelerle desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Selin ERTÜRK

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca değerli bilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. C. Varol TOK'a;

Bu süreçte bilimsel deneyimini paylaşan, tecrübelerinden ders çıkardığım hocam Sayın Doç. Dr. Sibel HAYRETDAG'a;

Çalışmam boyunca bana yol gösteren, fikirleriyle ufkumu genişleten hocam Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a;

Bu çalışmayı 2010/174 no'lu proje kapsamında destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na,

Çalışmamın moleküler araştırmalarında desteğini aldığım TÜBİTAK 108T559 no'lu 1001 projesine;

Denemelerim süresince bana laboratuvarlarının kapılarını açarak gerek teorik, gerek pratik olarak donanım kazanmamı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı (BTEML)'na ve çalışmamın aksamaması için laboratuvarlarını kullanmamda bir sakınca görmeyen Doç. Dr. Başaran DÜLGER'e ve Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına;

Her koşulda sonsuz sabrı ve anlayışıyla yanımda olan, bilimsel ve manevi desteğini eksik etmeyen çalışma arkadaşım Nilgün TEKİN'e;

Tez çalışmamın deneysel aşamasında yardımlarını gördüğüm öğrencilerim Serap YÜCE ve U. Kerem GÜNAY'a;

Tezimin her aşamasında, manevi desteklerini ve arkadaşlıklarını hiç esirgmeden bu süreçte beni yalnız bırakmayan Aslı SUCU'ya ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Nihan AKINCI, Arş. Gör. Özlem KIPRAK, Müge ÇETİN ve Osman Nezih KENANOĞLU'na;

Her koşulda yanımda olan, aldığım kararlarda beni destekleyen, güven ve sevgilerini her daim hissettiren çok sevgili aileme;

Hayatım boyunca, yüzünde ona çok yakışan gülümsemesiyle ebediyetten beni izleyeceğine inandığım sevgili dayım Abidin MÜLHİM'e

sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Selin ERTÜRK

SİMGELER VE KISALTMALAR

%: Yüzde değer

AP: Apürinik ve aprimidik bölge

ark: Arkadaşları

bç: Baz çifti

BSA: Bovine Serum Albumin

°C: Santigrat Derece

Cyt B: Cytochrome B

ÇOMÜ: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

DMSO: Dimetil Sulfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotit trifosfat

DTE: Dithioerythritol

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

F: Forward primer

g: G-force

GITC: Guanidium isothiocyanate

GTE: Glisin-Tris-EDTA Solüsyonu

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution

HCl: Hidroklorik asit

kb: Kilobaz

KCl: Potasyumklorür

KH₂PO₄: Potasyumdihidrojenfosfat

KOH: Potasyumhidroksit

M: Molar

mg: Miligram

MgCl₂: Magnezyumklorür

ml: Mililitre

mM: Milimolar

MTA: Maden Tetkik Arama

NaCl: Sodyumklorür

NaOH: Sodyumhidroksit

Na₂PO₄: Sodyumfosfat

nm: Nanometre

PCR: Polymerase Chain Reaction

pH: Power of Hydrogen

R: Reverse primer

RNA: Ribonükleik asit

rpm: Revolutions per minute

rRNA: Ribozomal RNA

SDS: Sodyumdodesilsülfat

STE: Sodyum-Tris-EDTA Solüsyonu

TBE: Tris-Borik asit-EDTA Solüsyonu

TE: Tris-EDTA Solüsyonu

UMFIX: Universal Molecular Fixative

v: hacim

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

ÖZET

BAZI AMFİBİ VE SÜRÜNGEN TÜRLERİNİN KOLEKSİYON ÖRNEKLERİNDEN DNA AMPLİFİKASYONU

Selin ERTÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. C. Varol TOK

12/01/2012, 118

Bu çalışmada; ağırlıklı olarak Çanakkale ve civarından olmak üzere, yurdumuzda dağılışı gösteren bazı amfibi ve sürüngen türlerinden örnekler içeren ve ÇOMÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan koleksiyon materyalinin, moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır. Koleksiyonda bulunan amfibi ve sürüngen türlerinden 40'ına ait örneklerin DNA izolasyonları ve PCR yöntemi ile DNA çoğaltma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra; koleksiyona kayıtlı yarı zehirli (*Telescopus fallax* ve *Malpolon monspessulanus*) ve zehirli yılan türlerine ait örneklerle (*Montivipera xanthina* ve *Macrovipera lebetina*) ileri moleküler teknikler uygulanarak DNA dizi analizleri yapılmıştır.

Çalışmada moleküler düzeyde değerlendirilen koleksiyon, 2003-2010 yılları arasında farklı lokalitelerden toplanmış örnekleri içermektedir. Bu örneklerin 2003-2005 yılları arasında toplananları formaldehitli alkol karışımı ile tespit edilip alkol içerisinde korunurken, 2006 yılından sonra koleksiyona dahil edilen örnekler sadece alkol ile tespit edilip korunmuştur. Formaldehitin moleküler çalışmaları olumsuz etkilediği bilindiğinden, bu örnekler için literatürde tespit edilmiş 6 farklı DNA izolasyon protokolü uygulanmış, belirlenen en uygun protokol en iyi sonucu elde edecek şekilde düzenlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada; Türkiye Amfibi ve Sürüngen çeşitliliğinin üçte birlik kısmını kapsayan 40 türe ait örneklerin DNA'larının izole edilmesiyle ileride yapılacak moleküler çalışmaların alt yapısı oluşturulmuştur. Çalışmada zehirli ve yarı zehirli yılan türlerine ait örneklerin DNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmiş olması; doğada nadir bulunan bu türlerin DNA envanterinin ortaya konulması açısından ayrıca önem arz etmektedir.

Sonuç olarak; mevcut müze ve koleksiyon materyalinin önemli bir kısmının moleküler anlamda değerlendirilmesiyle, daha sonra yapılacak moleküler zootaksonomik çalışmalarda doğadan mümkün olduğunca az yeni materyal kullanılarak, çalışmalar gerekleştirilebilecektir.

Anahtar Szckler: Türkiye, DNA İzolasyonu, DNA Amplifikasyonu, DNA Dizi Analizi, Urodela, Anura, Lacertilia, Ophidia.

ABSTRACT

DNA AMPLIFICATION OF SOME AMPHIBIAN AND REPTILIAN SPECIES FROM COLLECTION SAMPLES

Selin ERTÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. C. Varol TOK

12/01/2012, 118

At this study, our target was to examine some amphibian and reptilian samples which were collected from Çanakkale and surroundings and protected in a collection of Biology Department of ÇOMÜ, at molecular level. DNA isolation and amplification with PCR technique steps were done with samples of 40 species of the collection. As well as DNA sequence analysis of the venomous (*Montivipera xanthina* and *Macrovipera lebetina*) and the semi-venomous (*Telescopus fallax* and *Malpolon monspessulanus*) species of the collection were made by using some advanced molecular techniques.

This study contains collection samples which were collected between 2003-2009 years from different localities. The samples were collected between 2003-2005 years, were fixed by formaldehyde and preserved in ethanol. The other samples which were collected in 2006 and later, were fixed and preserved by ethanol. Six different DNA isolation protocol were determined from literature for the formalin fixed samples because of negative effects of formaldehyde on the molecular studies. The protocol which gave best results, was choosen anad arranged for our samples.

At this study, with the DNA isolation of samples of 40 species which includes one-third part of Turkey's Amphibian and Reptilian Biodiversity, the infrastructure of future studies were composed. These samples, considered in this sense, were collected from different localities and this would be useful for systematic and also phylogenetic studies. The performed DNA sequence analysis of venomous and semi-venomous species of collection would be important by determining DNA inventory of these rare species.

As a result, it was contributed to carry on molecular zootaxonomic studies by using less living sample with the evaluation of existing collection material at molecular level.

Keywords: Turkey, DNA isolation, DNA amplification, DNA sequence analysis, Urodela, Anura, Lacertilia, Ophidia.

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
BÖLÜM 1- GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Bir Fiksatif Olarak Formaldehit.....	4
2.2. Formaldehitin Moleküler Çalışmalar Üzerindeki Etkisi.....	6
2.3. Alkolün Fiksatif Olarak Kullanımı	9
2.4. Moleküler Çalışmaların Tarihçesi.....	10
BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1. Çalışılan Örnekler Hakkında Bilgi.....	12
3.2.Yöntem	32
3.2.1. Doku Alımı	33
3.2.2. DNA İzolasyonu	34
3.2.2.1. Alkol ile Tespit Edilen Örneklerin DNA İzolasyonu	34
3.2.2.2. Formaldehit ile Tespit Edilen Örneklerin DNA İzolasyonu	35
3.2.2.2.1. I. Metot	35
3.2.2.2.2. II. Metot	35
3.2.2.2.3. III. Metot	36
3.2.2.2.4. IV. Metot	37
3.2.2.2.5. V. Metot.....	37
3.2.2.2.6. VI. Metot	37

3.2.3. DNA Miktarının Ölçümü	38
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	38
3.2.4.1. Primer seçimi.....	40
3.2.4.2. PCR Programının Seçimi	41
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	42
3.2.6. DNA Dizi Analizi	42
3.2.6.1. Maxam-Gilbert Metodu	43
3.2.6.2. Sanger-Coulson Metodu.....	43
BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	45
4.1. DNA İzolasyonunun Fiksateye Bağlı Sonuçları.....	45
4.1.1. Alkol ile Fikse Edilen Örneklerin İzolasyon Bulguları	45
4.1.2. Formaldehit ile Fikse Edilen Örneklerin İzolasyon Bulguları.....	73
4.2. DNA Çoğaltma İşlemi Bulguları.....	83
4.2.1. Alkolle Fikse Edilmiş Örneklerin DNA Çoğaltma Bulguları	84
4.2.1.1. 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular	84
4.2.1.2. Cytochrome B Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular	88
4.2.2. Formaldehitli Fikse Edilmiş Örneklerin DNA Çoğaltma Bulguları	93
4.2.2.1. 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular	93
4.2.2.2. Cytochrome B Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular	94
4.2.2.3. Formaldehitli Alkol Karışımı ile Fikse Edilmiş Örneklerle Ait İstisnai Bulgular	95
4.3. DNA Dizi Analizi Bulguları.....	96
4.4. Tartışma	103
4.4.1. Formaldehit Fiksasyonunun Moleküler Çalışmalardaki Rolü	103
4.4.2. Alkol Fiksasyonunun Moleküler Çalışmalardaki Rolü	107
4.4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	107
BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	108

KAYNAKLAR	110
ÇİZELGELER.....	I
ŞEKİLLER.....	II
ÖZGEÇMİŞ	X

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İnsanoğlunun, eski çağlardan itibaren doğadan toplayarak birçok canlı ve cansız örnek ile büyük koleksiyonlar oluşturmaları; bugünkü bilimsel büyük müzelere temel teşkil etmiştir. Müzeler, tarihin eski dönemlerinde yaşamış canlı gruplarını belirli bir sistematik ve evrimsel düzen içerisinde inceleyerek, hem günümüzü hem de geleceği aydınlatma amacı taşır (Koç, 2009).

Müzecilik kavramı ilk olarak 17. yüzyılda İtalya’da kurulan Uffizi Galerisi’nin açılması ile ortaya çıkmış ve bunu Oxford Üniversitesi’nin Tıbbi Bilimler Okulu’nun bir bölümü olarak açılan Ashmoleon Müzesi izlemiştir. Yurdumuzda ise müzeciliğin ortaya çıkışı 19. yüzyıl ortalarına rastlar. İlk olarak, 1846 yılında Müşir Fethi Ahmet Paşa tarafından, İstanbul’da eski silahların teşhir edildiği bir müze kurulmuştur (Sıkı ve Tosunoğlu, 2002).

Müzelerin tarihi gelişimi içinde Tabiat Tarihi Müzeleri’nin önemli bir yeri vardır. Doğanın milyonlarca yıl öncesine dayanan bilinmeyenleri; yapılan jeolojik, paleontolojik, paleoantropolojik ve prehistorik çalışma ve araştırmalarla aydınlanmaktadır. Yurdumuzda ilk Tabiat Tarihi Müzesi MTA Genel Müdürlüğü tarafından 1968 yılında kurulmuş ve bunu Ege Üniversitesi bünyesinde 1973 yılında kurulan ikinci Tabiat Tarihi Müzesi izlemiştir (Sıkı ve Tosunoğlu, 2002). Tabiat Tarihi Müzeleri; biyolojik çeşitliliğin korunması düşüncesi ele alındığında; ulusal ve uluslararası alandaki yükümlülüklerin doğurduğu bir gereksinimdir (DPT, 2007). Bu kurumlar; yok olmuş ya da olacak olan nesillere ulaşma ve bu canlı gruplarıyla çalışma ve hatta muhafaza edilmiş gruplar ile günümüz canlılarını bir çok yönden karşılaştırma imkanı sunması nedeniyle ayrıca önem arz etmektedir.

Tabiat tarihi müzelerindeki koleksiyonlar, taksonomik çalışmalardaki morfolojik değerlendirmeler konusunda büyük rol oynar. Ancak son zamanlarda, bu koleksiyonları sistematik çalışmaların yanı sıra DNA çalışmalarında da kullanmak, sistematik alanında kaçınılmaz hale gelmiştir. Biyolojik barkodlama tekniğinin geliştirilmesi ile (Hebert ve ark., 2003; Schander ve Willassen, 2005) koleksiyon materyali aynı zamanda DNA bankası görevi de görmeye başlamıştır.

Bu çalışma ile; müzelerde formaldehitli alkol ve alkol ile fikse edilerek saklanan materyalin moleküler çalışmalar için uygunluğu araştırılmış, olumsuz etkiler giderilmeye çalışılmıştır. Çalışılan koleksiyon; 2003 yılında oluşturulmaya başlanmış olup bir süre (2003-2005) fiksatif olarak formaldehit-alkol karışımı kullanılmıştır. İlerleyen dönemlerde ise yalnızca alkol fiksasyonu tercih edilmiştir. Polimerleşme eğilimi olduğundan, ticari olarak saf halde satılamayan formaldehit (HSDB), hızlı reaksiyona girebilme özelliğiyle biyolojik materyallerin saklanmasında yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır (Tsokos ve Herbst, 2005; Fineschi ve ark., 2006).

Formaldehit tespit solüsyonu olarak, örneklerin uzun süreli saklanmasında yararlı olmasına rağmen, son yıllarda müze materyali ile yapılan moleküler çalışmalarda birçok problemle karşı karşıya kalınmıştır. Müzelerde bulunan ve formaldehit veya formaldehitli solüsyon ile fikse edilen koleksiyonlar örnek bakımından oldukça kullanışlı kaynaklardır. Ancak literatür kapsamındaki uygulamalarda belirtildiğine göre; formaldehit ile tespit edilmiş örneklerde birçok metodolojik sorun tespit edilmiş ve DNA dizi analizleri için de uygun olmadıkları görülmüştür (Friedman ve Desalle, 2008). Bunun nedeni; tespit solüsyonu ve tespit süresinin, ekstrakte edilen DNA'nın miktarını ve kalitesini düşürmesidir (Schander ve Halanych, 2003; Bucklin ve Allen, 2004). Formaldehit doku içerisine girdiğinde formik aside dönüşerek DNA'yı hidrolize eder (Gillio-Tos ve ark., 2007). Bu nedenle formaldehit, fiksasyon esnasında hücrelere nüfuz ettikten sonra proteinlerin ve DNA'nın amino ve imino grupları ile etkileşime girerek protein-protein ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına sebep olur (Orlando ve ark., 1997; Jackson, 1999). Formaldehit uygulaması N-glikozidik bağların hidrolizi ile AP bölgeler oluşturabilir ve hatta fosfodiester bağlarının hidrolizinin yavaşlamasına neden olabilir (Gavrilov ve Razin, 2009).

Alkol ise; genetik materyalde formaldehitin yarattığı zararı yaratmaması nedeni ile daha kullanışlıdır ve bu sebeple son zamanlarda moleküler çalışmalarda daha iyi sonuçlar alabilmek için, tespit solüsyonu olarak formaldehite tercih edilmektedir (Seutin ve ark., 1991; Shiozawa ve ark., 1992; Pavelic ve ark., 1996; Liu ve ark., 2001; Fukatsu, 2002). Zoolojik materyal günümüzde çoğunlukla alkolde saklanmaktadır. Alkol; sırf formaldehit kullanılarak yapılan fiksasyonun üzerinden uzun süre geçmişse, formaldehitin uzaklaştırılması için iyi bir ortam oluşturabilmektedir (Schander ve Halanych, 2003).

Koleksiyon materyalinin çalışmaya dahil edilen örnekleri 24 farklı lokaliteden toplanmıştır. Tüm örneklerden DNA izolasyonu yapılarak, çeşitli bariyerlerle ayrılan

bölgeler arasında, alttür ve türleşme durumlarını karşılaştırmaya yönelik moleküler çalışmalara zemin hazırlanmıştır. İzolasyonda; karaciğer hücrelerinin (hepatositler) polinükleer olması ve karaciğerin vücuttaki en büyük organlardan biri olması nedeni ile karaciğer dokusu tercih edilmiştir. Bu sayede elde edilen DNA miktarının daha fazla olacağı düşünülmüştür.

Zehirli ve yarı zehirli yılan türleri için DNA izolasyonu ve DNA çoğaltma işlemlerinin yanı sıra dizi analizleri de gerçekleştirilmiştir. Böylece bu grupların genetik envanterleri oluşturulmuştur. Bu şekilde; canlı örnek olmadan da moleküler çalışmaların yapılabileceği tespit edilmiştir.

Tüm canlı gruplarının; kuşkusuz doğal çevre üzerindeki baskının sonucunda doğal yaşam ortamlarının bozulmasıyla sayıları azalmakta ve hatta bazı grupların nesilleri tehlikeye girmektedir (DPT, 2007). Bu tezin amacı; mevcut koleksiyon materyalini moleküler düzeyde incelenebilir kılmak ve daha sonraki moleküler sistematik çalışmaların, doğadan toplanacak çok daha az yeni materyal ile yapılmasını olası kılmaktır. Böylece; doğada çeşitli sebeplerle zarar gören amfibi ve sürüngen populasyonlarının, bol materyale gereksinim duyulan sistematik çalışmalar nedeniyle zarar görmesinin önüne geçmektir.

BÖLÜM 2**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarının, Akdeniz ve Karadeniz'in ortasında yer alan Türkiye; coğrafi konumu nedeniyle zengin bir biyolojik varlığa sahiptir. Bu biyolojik çeşitlilikte; küçük bir yüzölçümü içinde 'iklim ve topoğrafik farklılıklar, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilikler, deniz, göl ve akarsu gibi farklı su ortamları, 0-5000 metreler arasında değişen yükseklik farklılıkları ve değişken bitki coğrafyalarının yaşandığı bir bölgede bulunması rol oynamaktadır (Ekim, 2005).

Türkiye; tür çeşitliliği açısından zengin olmasına karşılık, varolan türlerin miktarı gitgide azalmaktadır (Işık, 2005). 19. yüzyıl itibariyle ortaya çıkan müzecilik kavramı tam da bu sebeple bir hayli önem kazanmıştır. Olası çalışmalar için doğadan örnek toplanması yerine daha önceden toplanmış örneklerin değerlendirilmesi; biyoçeşitliliğin devamı için üzerinde durulması gereken bir konudur. Ne var ki; müze materyallerinin saklanma koşulları, her zaman çalışmaların devamına olanak vermemektedir. Yapılan bu çalışma ile; mevcut koleksiyon materyali, saklanma koşulları göz önüne alınarak moleküler düzeyde incelemeye tabi tutulmuştur.

2.1. Bir Fiksatif Olarak Formaldehit

Formaldehit; suda çözünebilen, oda sıcaklığında gaz halde bulunan renksiz bir kimyasaldır. Formaldehit tespit solüsyonu olarak ilk defa 1859'da Butlerow tarafından kullanılmış, ardından biyolojik ve medikal örneklerin tespitinde kullanılmaya başlamıştır (Schander ve Skage, 2007). Bir fiksatif olarak formaldehitin konsantrasyonu önemlidir. Zoolojik materyal için sıklıkla %1- 10 formaldehit çözeltileri kullanılmaktadır. Bu çözeltilerden formalin; 37 gram formaldehit gazının, su ile 100 ml'ye tamamlanması ile elde edilir ve çoğunlukla formaldehit, formalin olarak kullanılır. Formalin, materyallerde postmortem değişikliklerin oluşmasını engeller, örneklerin yıllarca incelenebilir halde kalmalarını sağlar (Schander ve Halanych, 2003).

Moleküler sistematikçilerin yaptıkları çalışmalarda formaldehit ile tespit edilmiş materyalden DNA ekstraksiyonu, başarılı bir amplifikasyonun en kritik aşamasıdır. Çoğu zoolojik müze materyalinde; formaldehit fiksasyonunun kullanılması ve fiksasyon detaylarının bilinmemesi izolasyon esnasındaki en büyük problemi oluşturmaktadır.

Çalışılan formollü materyal bir başkası tarafından tespit edilmiş olabilmektedir ve bu nedenle ekstraksiyon aşaması dikkate alınması gereken en önemli aşama haline gelir. Formaldehitin tamponlanmış olup olmaması, fiksasyon süresi ve sıcaklığı, elde edilen DNA miktarını ve kalitesini etkileyen unsurlardır (Schander ve Halanych, 2003).

Formaldehitin fiksasyon süresine bağlı olarak dokularda yarattığı etkiyi incelemek için birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu varılan genel kanı; özellikle belirli oranlarda seyreltilmemiş formaldehit ile gerçekleştirilen uzun süreli fiksasyonun, elde edilen DNA miktarını azalttığı yönündedir. Fiksasyona maruziyet süresi uzadıkça DNA ile fiksatifin girdiği direkt ve dolaylı reaksiyon sayısı da artmaktadır (Rogers ve ark., 1990; Greer ve ark., 1991; Forsthoefel ve ark., 1992; Hamazaki ve ark., 1993). Karlsen ve arkadaşları (1994) yaptıkları araştırmada; 8 ve 48 saat süresince fikse edilen dokulardan izole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu arasında bir korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır. Ancak 96 saat fikse olmuş dokulardan elde edilen DNA için bunun geçerli olmadığını belirtmişler ve uzun süren fiksasyonlarda, artan reaksiyon sayısının ekstraksiyon kapasitesini de değiştirdiğini öne sürmüşlerdir.

Benzer biçimde; Inoue ve arkadaşları 1996 yılındaki çalışmalarında; 1-6 gün boyunca %10'luk formaldehit ile fikse edilmiş dokudan DNA ekstraksiyonunu başarmış; ancak 7 gün fikse edilmiş dokudan DNA elde edememişlerdir.

Fiziksel etmenlerden pH ile yapılan çalışmalarda; düşük pH'da bulunan ya da yüksek formik asit içerikli formaldehitin; DNA'da seyreltilmiş formaldehitten daha çok degradasyon yarattığı rapor edilmiştir (Koshiba ve ark., 1993).

Fiksasyonda sıcaklığın etkisini gözlemlemek için; Waren 1983 yılında yaptığı çalışmada formaldehit çözeltilerini kaynatma yöntemini denemiştir. Bu şekilde formaldehit çift zincirli DNA karşısında inaktif olmasına rağmen, yüksek kaynama sıcaklığının DNA'yı denatüre ettiği gözlemlenmiştir. Tek zincirli DNA formaldehit ile hidroksimetilasyon yoluyla hemen reaksiyona girmiş ve zincirlerin tekrar bağlanmasını engellemiştir. Bu çalışmayı 1993 yılında Koshiba ve arkadaşlarının çalışmaları izler. Yapılan araştırmada yüksek fiksasyon sıcaklığının yüksek oranda DNA degradasyonu ile sonuçlandığı kanıtlanmıştır. Benzer biçimde, 1994 yılında yaptıkları çalışma ile O' Leary ve arkadaşları 0°C'de fiksasyonun PCR için uygun olmayan DNA kalıbı sağladığını ve bunun da büyük ihtimalle DNA çift sarmalının süper-kıvrılma fenomenine bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bununla beraber; fikse edilecek örneklerin toplanma ve fikse edilme işlemi arasında geçen süre, örnekten örneğe değişmektedir. Bu faktör de çoğaltılabilir DNA ekstrakte

etmeyi ciddi anlamda etkilemektedir (France ve Kocher, 1996; Schander ve Halanych, 2003).

2.2. Formaldehitin Moleküler Çalışmalar Üzerindeki Etkisi

Formaldehit fiksasyonunun kimyasal etkisi ilk olarak French ve Edsall (1945) ve Walker (1964) tarafından rapor edilmiştir (Schander ve Halanych, 2003). Formaldehit fiksasyonu DNA degradasyonuna sebep olur. Bu nedenle de ilgili çalışmada, PCR yoluyla çoğaltılacak DNA örneklerinde 400 baz çiftinden aşağısının hedeflenmesi önerilmektedir (Shibata, 1994).

Formaldehit fiksasyon esnasında ilk olarak belirli amino asitlerin fonksiyonel gruplarına bağlanarak proteinleri denatüre eder. Girdiği ilk reaksiyonda oksijen atomları, aminlerin hidrojen bağlarını çeker ve böylece çapraz bağlı proteinler oluşur. Proteinlerle girilen bu reaksiyonlar gözlemlendiğinde; karmaşık ve çok sayıda oldukları ve çoğunlukla pH, formaldehitin tamponlanmış olup olmaması, konsantrasyon, sıcaklık, fiksasyon süresi gibi fiziksel faktörlerden etkilendikleri sonucuna varılmıştır (Thompson, 1966; Crisan ve Mattson, 1993; Hamazaki ve ark., 1993; Koshiba ve ark., 1993). Bu reaksiyonların bir kısmı hızlı, diğerlerinin yavaş olmasının yanı sıra; bazılarının tersinir, diğerlerinin ise tersinir olmadığı gözlemlenmiştir (French ve Edsall, 1945; Freifelder ve Davison, 1963; Jackson, 1978; Yu ve ark., 1980, Schander ve Halanych, 2003).

Fiksasyon esnasında sağlanan fiziksel koşullar, sadece izolasyon aşamasını etkilemekle kalmaz; ileri aşamaları da etkiler. Yapılan çalışmalarda bu etkiler araştırılmıştır. Örneğin; nötral pH'da formaldehitin; DNA bazlarından Adenin, Guanin ve Sitozin ile reaksiyona girerken Timin ile girmediği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konulmuştur (Fraenkel-Conrat, 1954; McGhee ve von Hippel, 1975a, b, 1976a, b; Neubauer ve ark., 1992). Bu, reaktif bir formaldehit-metilen grup bileşiği oluşmasına neden olmaktadır. Karlsten ve arkadaşları 1994 yılındaki çalışmalarıyla, bu reaktifin PCR esnasında primerlerin bağlanmasını ve renatürasyonu engellediğini, bunun yanı sıra replikasyonu da baskıladığını göstermişlerdir. Çalışmada, DNA-protein çapraz bağlarının sadece %2,5'lik kısmının 200 baz çiftinden fazlasında polimeraz enziminin işlevini bozmaya yeteceği belirtilmiştir.

Yine 1994 yılında De Giorgi ve arkadaşları; formaldehitin, çoğaltma işlemini engelleyici etkilerini test etmiş ve özellikle yüksek formaldehit konsantrasyonlarının çoğaltma işlemi esnasında inhibitör bir etki yarattığı sonucuna varmışlardır. Pusch ve arkadaşlarının 1997 yılındaki çalışması da bunu destekler yöndedir. Araştırmalarının

sonucu olarak çoğaltma işlemini engelleyen sebebin formaldehitin zarar verdiği DNA olduğunu gözlemlemişlerdir. Tipik küçük fragmentli DNA sarmalının, PCR'ın birincil denatürasyon aşamasında sağlam iki zincire ayıramadığını, daha küçük fragmentlere ayrıldığını; bunun da, DNA segmentini çoğaltma şansını azalttığını tespit etmişlerdir (Pusch ve ark., 1997).

Benzer biçimde; fiksasyon süresinin de yapılacak işlemleri etkilediği ortaya konulmuştur. Gavrilov ve Razin'in 2009'daki çalışmasında süre bakımından karşılaştırma yapılmıştır. Söz konusu çalışmada; yeni alınmış dokular ve formaldehitte fikse edilmiş dokulardan elde edilen DNA miktar ve kalitesi karşılaştırılmıştır. Alınan sonuçlara göre; formaldehit fiksasyonu, izole edilen DNA'yı çoğaltma işlemini sınırlamaktadır. Fikse edilmiş dokudan ve taze dokudan izole edilen DNA çoğaltıldığında, fikse edilmiş dokudan elde edilen DNA miktarında %20 oranında bir azalma olduğu ortaya konmuştur.

Bir diğer problem de; formaldehit fiksasyonunun nükleotitlerin yerini değiştirme olasılığını arttırmasıdır. Karlsen ve arkadaşlarının 1994'te formaldehit ile fikse edilen dokular üzerinde yaptıkları araştırmada, çift zincirli DNA'nın değişime uğramış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Fiziksel etmenlerin yanı sıra müze materyali kullanılırken en sık karşılaşılan problemlerden birinin de kontaminasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu tür çalışmalar yapan Cawkwell ve Quirke (2000), bu problemin iki türlü olduğunu belirtmişlerdir. İlk olarak; arşivsel DNA'nın az ya da çok degrade olabildiğini ve bu nedenle herhangi bir kontaminantın amplifikasyon sırasında DNA ile rekabete girdiğini tespit etmişler, ikinci olarak; saklama esnasında işleme tabii tutulan materyalin, hiç dokunulmayan materyale oranla daha zayıf bir DNA kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir.

Formaldehit fiksasyonu sadece müze materyali muhafazasında kullanılmakla kalmaz, arşiv materyali fiksasyonunda da rol alır. Arşiv materyalini fikse ederek saklamak yerine, özellikle histopatolojik çalışmalarda parafine gömülmüş dokulardan seri kesitler almak, zoolojik ve tıbbi disiplinler için rutin bir işlemdir. Dokuyu parafine gömerek kesit almak, moleküler çalışmalar için iyi bir DNA kaynağı olabilmektedir. Ancak dokuyu parafin bloklara gömmeden önce uygulanan ön işlemlerde kullanılan formaldehit, yine benzer biçimde moleküler çalışmaları olumsuz yönde etkilemektedir. Dokuları parafine gömme aşamalarından biri de formaldehit ya da Bouin fiksasyonudur. Bouin fiksatif de içerik olarak pikrik asit, formaldehit ve asetik asit içerir. Formaldehit içerikli Bouin's fiksatif ile fikse edilen dokudan elde edilen DNA'nın PCR için elverişli olmadığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. (Gall ve ark., 1993; O'Leary ve ark., 1994; Pavelic ve ark.,

1996). Yine Crisan ve Mattson 1993 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında; fikse edilip parafine gömülen dokudan yüksek kalitede DNA ekstraktı elde etmeyi etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Bu etmenlerin en önemlilerinin; fiksatifin kimyasal kompozisyonu, fiksasyon süreci, dokunun hipoksi süreci, örnek boyutu ve fiksasyona olan geçirgenliği ve saklama süresinin uzunluğu olarak belirlemişlerdir.

Shi ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada formaldehit ile fikse edilip parafine gömülerek saklanan dokulardan DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Kullanılan DNA izolasyon metotlarında anlık yüksek sıcaklık ve düşük pH değerleri uygulaması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, rutin enzimatik DNA izolasyon protokolleri sonucu elde edilen DNA miktarından daha fazla DNA izole edilebilmiştir. Yaptıkları çalışmayı biraz daha geliştirerek 2004 yılında yeni bir uygulama yapmışlardır. Alkali çözeltiler içerisinde uygulanan yüksek sıcaklığın; formaldehit ile fikse edilmiş ve parafine gömülerek muhafaza edilen dokulardan izole edilen DNA'nın kalitesi ve miktarında artış yaratıp yaratmayacağını araştırmışlardır. Bunun için 15 farklı yöntem belirlemişlerdir. Hepsinde alkali solüsyonlar kullanmış, Tween-20, GITC ve SDS gibi maddeler eklenerek her koşul göz önünde tutulmaya çalışılmıştır. %0,1 oranında GITC içeren 0,1 M NaOH/ KOH çözeltileri ve 20 dakika boyunca 120°C uygulaması sonucu elde edilen DNA miktarının en fazla olduğu tespit edilmiştir.

Gillio-Tos ve arkadaşları (2007) çalışmalarında 365 örneğin 25 yıldır parafine gömülü halde muhafaza edilen dokularından DNA izolasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada formaldehitin DNA üzerindeki olumsuz etkisi açıkça görülmüş ve var olan DNA izolasyon protokolleri, bu olumsuz etkiyi ortadan kaldıracak biçimde düzenlenmeye çalışılmıştır.

Okello ve arkadaşları (2010) çalışmalarında; 3-13 yıl parafine gömülü halde muhafaza edilmiş dokulardan bütün halde DNA izole etmek üzere 10 farklı izolasyon protokolü denemişlerdir. Bu metotların hepsinde farklı miktarlarda DNA elde ederken, en fazla miktarı klasik fenol-kloroform metodu ile elde etmişlerdir.

Formaldehit fiksasyonunun nükleik materyal üzerindeki bu olumsuz etkisi belirlendikten sonra bu etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla, formaldehiti dokulardan uzaklaştırmaya yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Rumph ve Williams (1986); 100 gün boyunca formaldehite maruz kalmış dokularla, 50-75 gün boyunca formaldehit maruziyetine tabii tutulmuş dokulardan formaldehiti ayırtırmaya çalışmışlardır. Bu işlem sonrasında; formaldehitin, 100 gün maruz kalan dokudan daha rahat ayrıştığını rapor etmişlerdir. 50-75 günlük süreçte, formaldehit ve doku arasında ikincil reaksiyonların

gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir. Ancak; saklama işlemi süresince oluşan formik asit, metanol, metil format ve birçok bileşiğin polimeri gibi yabancı maddelerle etkileşimden arta kalanlar araştırılmamıştır.

Shedlock ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada; ön parçalama aşamasında eklenen glisin DNA miktarında önemli bir artışa neden olduğunu, diğer primer amino gruplarının da benzer etki yaratabileceği sonucuna varmışlardır. Ancak kesin bir yargıya varabilmek için bu konu üzerinde çalışılmaya devam edilmelidir.

İzolasyon esnasında eklenen bazı maddeler formaldehitin neden olduğu protein çapraz bağlarını kırabilecek özelliktedir ve bunların, formaldehit ile fikse edilmiş dokulardan DNA ekstraksiyonunda kullanılması yeni ihtimaller doğurabilir. Formaldehitin uzaklaştırılmasında yararlı olan bir diğer kimyasal da fenoksietanoldür (Frølich ve ark., 1984). Ancak bu maddenin DNA'yı koruma etkisi araştırılmamıştır (Schander ve Halanych, 2003). Benzer biçimde; DTT (Johnson ve ark., 1995; Shedlock ve ark., 1997) ve DTE (Chatigny, 2000) gibi protein çapraz bağlarını kıran kimyasallar birkaç çalışmada kullanılmıştır.

Formaldehit; protein-protein ve protein-DNA arasında oluşturduğu çapraz bağlanmalar nedeniyle yapılan araştırmalarda zaman zaman bir ajan olarak da kullanılmıştır. 1997 yılında Fragoso ve Hager yaptıkları çalışmada nükleozom sınırlarını belirlemek için bir prosedür tanımlamıştır. Oluşturulan prosedürde; formaldehit bir protein-DNA çapraz bağlanma ajanı olarak kullanılmış ve DNA'daki histon oktomerlerinin yeri belirlenmiştir.

Orlando ve arkadaşları (1997) çalışmalarında; kromatin yapıların düzenlenmesinde görev alan proteinlerin DNA ile bağlantılı olup olmadığını belirlemek için formaldehit kullanmışlardır. Bir araya gelerek multiprotein kompleksleri oluşturan bu proteinler ile bağlantılı DNA elementlerini belirlemek için; standart DNA-protein analizlerine alternatif bir yöntem geliştirmişlerdir. Kromatin yapılarının formaldehit etkisiyle çapraz bağlar yapan hücrelerini incelemişler, kromozomal proteinlerin DNA hedeflerini belirlemeye yönelik bir immunopresipitasyon stratejisi kullanmışlardır.

2.3. Alkolün Fiksatif Olarak Kullanımı

Formaldehit gibi alkol de örneklerin muhafazasında kullanılan bir fiksatiftir ve formaldehitin nükleik materyalde yarattığı olumsuz etkiyi yaratmayışı ile günümüzde daha çok tercih edilmektedir. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalar vasıtasıyla formaldehitin ve alkolün DNA üzerindeki etkileri araştırılmış ve moleküler çalışmaların sağlıklı bir biçimde

yürütülebilmesi için uygunlukları tespit edilmiştir.

Ben-Ezra ve arkadaşları (1990); yürüttükleri çalışmada fiksasyonun nükleik materyal üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bunun için patoloji örneklerini formaldehit, Bouin, Zenker, etanol ve amfinix gibi fiksatifler içerisinde 6, 24, 48, 72 ve 168 saat gibi farklı sürelerde tutmuşlardır. Böylece fiksatifin nükleik asitler üzerinde süreye bağlı etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır. Formaldehit gibi çapraz bağlanmayı indükleyen fiksatifler çoğaltma işlemini büyük oranda engellemişken, etanol bazlı amfinix gibi fiksatifler ve etanol, çapraz bağ oluşumuna neden olmadıklarından PCR esnasında herhangi bir problem teşkil etmemişlerdir.

Fiallo ve arkadaşları 1992 yılında yaptıkları çalışmada %10'luk formaldehit çözeltisi, etanol ve mercury bazı gibi standart fiksatiflerin *Mycobacterium leprae* türünün genetik materyali üzerindeki etkilerine bakmışlardır. İzole edilen DNA'nın PCR yöntemi ile çoğaltılması aşamasında oluşabilecek olumsuzluklar çalışılmıştır. Alınan sonuçlara göre; mercury bazı, Zenker ve Cornay's solüsyonlarının PCR'ı olumsuz yönde etkiledikleri görülmüştür. Ancak %10'luk formaldehit çözeltisinin PCR için çok daha engelleyici bir unsur olduğu; en bariz etkisini de 24 saati aşan fiksasyon süreçlerinde gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışılan fiksatifler içerisinde çoğaltma işlemini en az etkileyen etanol bazlı fiksatifler olmuştur.

Lau ve arkadaşları (2004); etanole karşılık formaldehit fiksasyonunu karşılaştırmışlardır. Beyin dokusundan alınan parçaları fikse ederek parafine gömmüşler ve ardından histolojik ve moleküler bazda karşılaştırmışlardır. Etanolle fikse edilen dokulardan elde edilen verim %70 iken, formaldehit ile fikse edilenlerde bu oran çok daha düşük olmuştur.

Cox ve arkadaşlarının (2005) çalışmalarında %70'lik nötral tamponlu formaldehit, Davidson's II, %70'lik etanol, UMFIX, Cornay's, Bouin, fosfat tamponlu tuz çözeltisi, %30'luk süktroz gibi farklı fiksatifler kullanılmıştır. Sıçan karaciğer dokuları bu fiksatiflere maruz bırakılarak, daha sonra parafine gömülmüştür. RNA izolasyonu yapılan örneklerde en iyi sonuç etanolden alınmıştır.

2.4. Moleküler Çalışmaların Tarihçesi

1839 yılında Schleiden ve Schwann'ın hücreyi tanımlamaları; biyolojinin diğer bir çok alt dalı gibi moleküler biyoloji alanının da gelişimine zemin hazırlanmıştır. Bunu; 1953 yılında Watson, Wilkins ve Crick'in çift sarmallı DNA yapısını keşifleri izlemiştir. Zamanla deneysel araştırmaların hız kazanması ile de yeni moleküler teknikler

geliştirilmiştir. Bunlardan biri de 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'dur. Bu teknikle Saiki 1993 yılında Nobel Ödülü almaya layık görülmüştür (Dilsiz, 2004). 2000 yılında insan genom projesinin tamamlanmasıyla da gen yapısının incelenmesini olanaklı kılan DNA dizileme teknikleri ortaya çıkmıştır (Brown, 2009).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Ana Bilim Dalı elemanları tarafından farklı lokalitelerden toplanmış amfibi ve sürüngen örneklerine ait koleksiyon materyali moleküler düzeyde incelenmiştir. Örnekler toplandıkları dönemlerde gruplara özgü farklı tespit karışımları kullanılarak (amfibilere daha az yoğunluklu, sürüngenlere ise daha yoğun formaldehit-alkol karışımı) tespit edilmiştir.

İlk dönemlerde tespit solüsyonu olarak; %4-9 formaldehit-etil alkol çözeltisi kullanılırken, 2006 yılı itibariyle, ileriki dönemlerde yapılabilecek moleküler çalışmaların daha sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için koleksiyon örneklerinin tespitinde ve saklanması yüksek yoğunluklu etil alkol (%95) kullanılmış, formaldehit kullanılmamıştır. Tespit edilmiş halde muhafaza altında tutulan amfibi ve sürüngen türlerine ait örnekler bu tez kapsamında DNA izolasyonu, DNA çoğaltma gibi işlemler uygulanmıştır.

3.1. Çalışılan Örnekler Hakkında Bilgi

Çalışma dahilinde koleksiyonumuzda bulunan; Classis: Amphibia familyalarından Salamandridae (*Mertensiella caucasica*, *Lyciasalamandra luschani*, *Triturus karelinii*, *Ommatotriton vittatus*, *Lissotriton vulgaris*), Bufonidae (*Bufo bufo*, *Pseudepidalea viridis*), Hylidae (*Hyla arborea*), Pelobatidae (*Pelobates syriacus*), Ranidae (*Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis*, *Pelophylax ridibundus*) türlerine ait örnekler çalışmada kullanılmıştır. Classis: Reptilia familyalarından ise; Agamidae (*Laudakia stellio*, *Phrynocephalus persicus*), Gekkonidae (*Asaccus elisae*), Lacertidae (*Darevskia valentini*, *Eremias suphani*, *Eremias strauchi*, *Anatololacerta danfordi*, *Lacerta laevis*, *Apathya cappadocica*, *Lacerta viridis*, *Lacerta trilienata*, *Parvilacerta parva*, *Podarcis muralis*, *Podarcis taurica*), Scincidae (*Trachylepis vittata*, *Trachylepis aurata*), Boidae (*Eryx jaculus*), Colubridae (*Dolichophis caspius*, *Platycephalus najadum*, *Dolichophis jugularis*, *Hemorrhois nummifer*, *Platycephalus collaris*, *Coronella austriaca*, *Eirenis modestus*, *Malpolon monspessulanus*, *Natrix natrix*, *Natrix tessellata*, *Telescopus fallax*), Viperidae (*Macrovipera lebetina*, *Montivipera xanthina*) türlerine ait örnekler çalışılmıştır. Çalışmaya, koleksiyonda bulunan kaplumbağa türleri morfolojilerine zarar verilmek istenmediğinden

dahil edilmemiştir. Bunun dışında kalan türlerden yeterli sayıda örnek içeren 42 tür çalışılmıştır. Türlerle ait örneklerin bilgisi Çizelge 1.'de verilmiştir;

Çizelge 1. Türlerle ait örneklerin tespit edilme şekli ve doku bilgileri

Tür	Demirbaş No	Tespit Bilgisi	Lokaliteler -Kodlar	Alınan Doku Sayısı	Doku Kodları
<i>Mertensiella caucasica</i>	69/08-1	Alkol	Uzungöl/Trabzon-M.cauc TRB1 A-1	2	M.cauc TRB1 A-1/1
					M.cauc TRB1 A-1/2
	69/08-2		Uzungöl/Trabzon-M.cauc TRB1 A-2	2	M.cauc TRB1 A-2/1
					M.cauc TRB1 A-2/2
	69/08-3		Uzungöl/Trabzon-M.cauc TRB1 A-3	2	M.cauc TRB1 A-3/1
					M.cauc TRB1 A-3/2
<i>Lyciasalamandra luschani</i>	3/06-1	Alkol	Gökbek/Muğla-Lyc lus. MUG 1 A-1	2	Lyc lus. MUG 1 A-1/1
					Lyc lus. MUG 1 A-1/2
	3/06-2		Gökbek/Muğla-Lyc lus. MUG 1 A-2	2	Lyc lus. MUG 1 A-2/1
					Lyc lus. MUG 1 A-2/2
<i>Triturus karelinii</i>	1/06-1	Alkol	Özbek/Ç.kale-T.kareli ÇNK1 A-1	2	T.kareli ÇNK1 A-1/1
					T.kareli ÇNK1 A-1/2
	1/06-2		Özbek/Ç.kale-T.kareli ÇNK1 A-2	2	T.kareli ÇNK1 A-2/1
					T.kareli ÇNK1 A-2/2
	63/09	Alkol	Kavak/Gelibolu-T.kareli ÇNK 3 A-1	2	T.kareli ÇNK3 A-1/1
					T.kareli ÇNK3 A-1/2
<i>Ommatotriton vittatus</i>	70/08-1	Alkol	Uzungöl/Trabzon-Om.vit TRB1 A-1	2	Om.vit TRB1 A-1/1
					Om.vit TRB1 A-1/2
	70/08-2		Uzungöl/Trabzon-Om.vit TRB1 A-2	2	Om.vit TRB1 A-2/1

					Om.vit TRB1 A-2/2
	70/08-3		Uzungöl/Trabzon-Om.vit TRB1 A-3	2	Om.vit TRB1 A-3/1
					Om.vit TRB1 A-3/2
<i>Lissotriton vulgaris</i>	3/04	Formaldehit	Lapseki/Ç.kale-Lis vul ÇNK 1 F-1	2	Lis vul ÇNK 1 F-1/1
					Lis vul ÇNK 1 F-1/2
	8/04	Formaldehit	Kilitbahir/Ç.kale-Lis vul ÇNK 2 F-1	2	Lis vul ÇNK 2 F-1/1
					Lis vul ÇNK 2 F-1/2
	51/07	Alkol	Kirazlı/Çanakkale-Lis vul ÇNK 1 A-1	2	Lis vul ÇNK 1 A-1/1
					Lis vul ÇNK 1 A-1/2
<i>Bufo bufo</i>	10/03	Formaldehit	Kepez/Ç.kale-Bufo ÇNK 1 F-1	2	Bufo ÇNK 1 F-1/1
					Bufo ÇNK 1 F-1/2
	20/05	Formaldehit	Bayramiç/Ç.kale-Bufo ÇNK 3 F-1	2	Bufo ÇNK 3 F-1/1
					Bufo ÇNK 3 F-1/2
	39/07	Alkol	Söğütlü/Ç.kale-Bufo ÇNK 1 A-1	2	Bufo ÇNK 1 A-1/1
					Bufo ÇNK 1 A-1/2
<i>Pseudepidalea viridis</i>	51/03	Formaldehit	Merkez/Ç.kale-P.vir ÇNK 1 F-1	2	P.vir ÇNK 1 F-1/1
					P.vir ÇNK 1 F-1/2
	49/07	Alkol	Kirazlı/Ç.kale-P.vir ÇNK 1 A-1	2	P.vir ÇNK 1 A-1/1
					P.vir ÇNK 1 A-1/2
	3/06	Alkol	G.ada/Ç.kale-P.vir ÇNK 6 A-1	2	P.vir ÇNK 6 A-1/1
					P.vir ÇNK 6 A-1/2
<i>Hyla arborea</i>	80/04	Formaldehit	Kepez/Ç.kale-Hyla ÇNK 1 F-1	2	Hyla ÇNK 1 F-1/1
					Hyla ÇNK 1 F-1/2
	14/04	Formaldehit	Kilitbahir/Ç.kale-Hyla ÇNK 2 F-1	2	Hyla ÇNK 2 F-1/1

					Hyla ÇNK 2 F-1/2
	14/08	Alkol	Merkez/Ç.kale-Hyla ÇNK 1 A-1	2	Hyla ÇNK 1 A-1/1
					Hyla ÇNK 1 A-1/2
<i>Pelobates syriacus</i>	15/05	Formaldehit	Şekerpınar/Ç.kale-Pel.syr ÇNK 1 F-1	2	Pel.syr ÇNK 1 F-1/1
					Pel.syr ÇNK 1 F-1/2
	13/08-1	Alkol	Merkez/Ç.kale-Pel.syr ÇNK 1 A-1	2	Pel.syr ÇNK 1 A-1/1
					Pel.syr ÇNK 1 A-1/2
	13/08-2		Merkez/Ç.kale-Pel.syr ÇNK 1 A-2	2	Pel.syr ÇNK 1 A-2/1
					Pel.syr ÇNK 1 A-2/2
<i>Rana dalmatina</i>	15/04	Formaldehit	Behramlı/Ç.kale-R.dal ÇNK 2 F-1	2	R.dal ÇNK 2 F-1/1
					R.dal ÇNK 2 F-1/2
	1/08	Alkol	Behramlı/Ç.kale-R.dal ÇNK 2 A-1	2	R.dal ÇNK 2 A-1/1
					R.dal ÇNK 2 A-1/2
	7/09	Alkol	Behramlı/Ç.kale-R.dal ÇNK 2 A-2	2	R.dal ÇNK 2 A-2/1
					R.dal ÇNK 2 A-2/2
<i>Rana macrocnemis</i>	8/05	Formaldehit	Baraj Gölü/Erzurum-R.macro ERZ1 F-1	2	R.macro ERZ1 F-1/1
					R.macro ERZ1 F-1/2
	87/06	Alkol	Akşehir/Konya-R.macro KNY A-1	2	R.macro KNY A-1/1
					R.macro KNY A-1/2
	73/08	Alkol	Uzungöl/Trabzon-R.macro TRB 1 A-1	2	R.macro TRB 1 A-1/1
					R.macro TRB 1 A-1/2
<i>Pelophylax ridibundus</i>	73/04	Formaldehit	Biga/Ç.kale-P.rid ÇNK 1 F-1	2	P.rid ÇNK 1 F-1/1
					P.rid ÇNK 1 F-1/2
	58/09	Alkol	Lapseki/Ç.kale-P.rid ÇNK 1 A-1	2	P.rid ÇNK 1 A-1/1

					P.rid ÇNK 1 A-1/2
	92/09	Alkol	G.ada/Ç.kale-P.rid ÇNK 6 A-1	2	P.rid ÇNK 6 A-1/1
					P.rid ÇNK 6 A-1/2
<i>Laudakia stellio</i>	114/06	Alkol	Tarsus/Mersin-L.stell MRS 1 A-1	2	L.stell MRS 1 A-1/1
					L.stell MRS 1 A-1/2
	129/07	Alkol	Gölbaşı/Hatay-L.stell HTY A-1	2	L.stell HTY A-1/1
					L.stell HTY A-1/2
	110/09	Alkol	Kale/Sinop-L.stell SNP A-1	2	L.stell SNP A-1/1
					L.stell SNP A-1/2
<i>Phrynocephalus persicus</i>	86/08-1	Alkol	Melekli/Iğdır-P.pers IDR A-1	2	P.pers IDR A-1/1
					P.pers IDR A-1/2
	86/08-2		Melekli/Iğdır-P.pers IDR A-2	2	P.pers IDR A-2/1
					P.pers IDR A-2/2
	86/08-3		Melekli/Iğdır-P.pers IDR A-3	2	P.pers IDR A-3/1
					P.pers IDR A-3/2
<i>Asaccus elisae</i>	91/08-1	Alkol	Birecik/Urfa-A.elis URF A-1	2	A.elis URF A-1/1
					A.elis URF A-1/2
	91/08-2		Birecik/Urfa-A.elis URF A-2	2	A.elis URF A-2/1
					A.elis URF A-2/2
	91/08-3		Birecik/Urfa-A.elis URF A-3	2	A.elis URF A-3/1
					A.elis URF A-3/2
<i>Darevskia valentini</i>	79/08	Alkol	Bayburt-D.val BYB A-1	2	D.val BYB A-1/1
					D.val BYB A-1/2
	118/08	Alkol	Ayder/Rize-D.val RİZ A-1	2	D.val RİZ A-1/1

					D.val RİZ A-1/2
	111/09	Alkol	Kale/Sinop-D.val SNP A-1	2	D.val SNP A-1/1
					D.val SNP A-1/2
<i>Eremias strauchi</i>	84/08-1	Alkol	Melekli/Iğdır-E.stra IDR A-1	2	E.stra IDR A-1/1
					E.stra IDR A-1/2
	84/08-2		Melekli/Iğdır-E.stra IDR A-2	2	E.stra IDR A-2/1
					E.stra IDR A-2/2
	84/08-3		Melekli/Iğdır-E.stra IDR A-3	2	E.stra IDR A-3/1
					E.stra IDR A-3/2
<i>Eremias suphani</i>	53/03-1	Formaldehit	Zeve/Van-E.suph VAN F-1	2	E.suph VAN F-1/1
					E.suph VAN F-1/2
	53/03-2			2	E.suph VAN F-2/1
					E.suph VAN F-2/2
	53/03-3			2	E.suph VAN F-3/1
					E.suph VAN F-3/2
<i>Anatololacerta danfordi</i>	58/04	Formaldehit	Çan/Ç.kale-L.danf ÇNK 1 F-1	2	L.danf ÇNK 1 F-1/1
					L.danf ÇNK 1 F-1/2
	54/06	Alkol	Sultaniye/Muğla-L.danf MUG 2 A-1	2	L.danf MUG 2 A-1/1
					L.danf MUG 2 A-1/2
	78/07	Alkol	Akşehir/Konya-L. danf KNY A-1	2	L. danf KNY A-1/1
					L. danf KNY A-1/2
<i>Lacerta laevis</i>	115/06	Alkol	Tarsus/Mersin-L.laev MRS 1 A-1	2	L.laev MRS 1 A-1/1
					L.laev MRS 1 A-1/2
	22/07	Alkol	Reyhanlı/Antakya-L.laev HTY A-1	2	L.laev HTY A-1/1

					L.laev HTY A-1/2
	27/07	Alkol	Reyhanlı/Antakya-L.laev HTY A-2	2	L.laev HTY A-2/1
					L.laev HTY A-2/2
<i>Apathya cappadocica</i>	110/06	Alkol	Sakçaözü/Antep-A.cappa ATP A-1	2	A.cappa ATP A-1/1
					A.cappa ATP A-1/2
	25/07	Alkol	Reyhanlı/Antakya-A.cappa HTY A-1	2	A.cappa HTY A-1/1
					A.cappa HTY A-1/2
	133/07	Alkol	Gölbaşı/Hatay-A.cappa HTY A-2	2	A.cappa HTY A-2/1
					A.cappa HTY A-2/2
<i>Lacerta viridis</i>	27/04	Formaldehit	Kalkım/Ç.kale-L.vir ÇNK 3 F-1	2	L.vir ÇNK 3 F-1/1
					L.vir ÇNK 3 F-1/2
	38/07	Alkol	Ağı dağı/Ç.kale-L.vir ÇNK 1 A-1	2	L.vir ÇNK 1 A-1/1
					L.vir ÇNK 1 A-1/2
	34/07	Alkol	Kalkım/Ç.kale-L.vir ÇNK 3 A-1	2	L.vir ÇNK 3 A-1/1
					L.vir ÇNK 3 A-1/2
			Kalkım/Ç.kale-L.vir ÇNK 3 A-2	2	L.vir ÇNK 3 A-2/1
					L.vir ÇNK 3 A-2/2
<i>Lacerta trilenata</i>	4/04	Formaldehit	Özbek/Ç.kale-L.tri ÇNK 1 F-1	2	L.tri ÇNK 1 F-1/1
					L.tri ÇNK 1 F-1/2
	13/04	Formaldehit	Kilitbahir/Ç.kale-L.tri ÇNK 2 F-1	2	L.tri ÇNK 2 F-1/1
					L.tri ÇNK 2 F-1/2
	31/04	Formaldehit	Kalkım/Ç.kale-L.tri ÇNK 3 F-1	2	L.tri ÇNK 3 F-1/1
					L.tri ÇNK 3 F-1/2
<i>Parvilacerta parva</i>	9/05	Formaldehit	Baraj Gölü/Erzurum-P.parva ERZ1 F-1	2	P.parva ERZ1 F-1/1

					P.parva ERZ1 F-1/2
	76/06	Alkol	O.Karabağ/Afyon- P.parva AFY 1 A-1	2	P.parva AFY 1 A-1/1
					P.parva AFY 1 A-1/2
	58/08	Alkol	Gerede/Bolu -P.parva BOL 1 A-1	2	P.parva BOL 1 A-1/1
					P.parva BOL 1 A-1/2
<i>Podarcis muralis</i>	28/04	Formaldehit	Kalkım/Ç.kale-P. mura ÇNK 3 F-1	2	P. mura ÇNK 3 F-1/1
					P. mura ÇNK 3 F-1/2
	36/07	Alkol	Ağı dağı/Ç.kale- P.mura ÇNK 1 A-1	2	P.mura ÇNK 1 A-1/1
					P.mura ÇNK 1 A-1/2
<i>Podarcis taurica</i>	34/03	Formaldehit	Gelibolu/Ç.kale-P. taur ÇNK 2 F-1	2	P. taur ÇNK 2 F-1/1
					P. taur ÇNK 2 F-1/2
	130/08	Alkol	Gelibolu/Ç.kale-P.taur ÇNK 2 A-1	2	P.taur ÇNK 2 A-1/1
					P.taur ÇNK 2 A-1/2
	101/09	Alkol	Kavak/Ç.kale-P.taur ÇNK 3 A-1	2	P.taur ÇNK 3 A-1/1
					P.taur ÇNK 3 A-1/2
<i>Trachylepis aurata</i>	6/05	Formaldehit	Kampüs/Ç.kale-T.aura ÇNK 1 F-1	2	T.aura ÇNK 1 F-1/1
					T.aura ÇNK 1 F-1/2
	53/07	Alkol	Atikhisar/Ç.kale- T.aura ÇNK 1 A-1	2	T.aura ÇNK 1 A-1/1
					T.aura ÇNK 1 A-1/2
<i>Eryx jaculus</i>	39/04	Formaldehit	Dardanos/Ç.kale-Eryx ÇNK 1 F-1	3	Eryx ÇNK 1 F-1/1
					Eryx ÇNK 1 F-1/2
					Eryx ÇNK 1 F-1/3
	60/04	Formaldehit	Kampüs/ Ç.kale-Eryx ÇNK 1 F-2	3	Eryx ÇNK 1 F-2/1
					Eryx ÇNK 1 F-2/2

					Eryx ÇNK 1 F-2/3
	67/06	Alkol	Kampüs/Ç.kale- Eryx ÇNK 1 A-1	3	Eryx ÇNK 1 A-1/1
					Eryx ÇNK 1 A-1/2
					Eryx ÇNK 1 A-1/3
	21/08	Alkol	Bozcaada/Ç.kale-Eryx ÇNK5 A-1	3	Eryx ÇNK5 A-1/1
					Eryx ÇNK5 A-1/2
					Eryx ÇNK5 A-1/3
	87/08	Alkol	Melekli/ İğdır-Eryx IDR 1 A-1	3	Eryx IDR 1 A-1/1
					Eryx IDR 1 A-1/2
					Eryx IDR 1 A-1/3
	95/08	Alkol	Ceyhan/Adana-Eryx ADN A-1	3	Eryx ADN A-1/1
					Eryx ADN A-1/2
					Eryx ADN A-1/3
<i>Dolichophis caspius</i>	6/08	Alkol	Kampüs/Ç.kale-Casp. ÇNK 1 A-1	2	Casp. ÇNK 1 A-1/2
					Casp. ÇNK 1 A-1/3
	12/08	Alkol	Troya/Ç.kale-Casp. ÇNK 1 A-2	3	Casp. ÇNK 1 A-2/1
					Casp. ÇNK 1 A-2/2
					Casp. ÇNK 1 A-2/3
	127/08	Alkol	Troya/Ç.kale-Casp. ÇNK 1 A-3	3	Casp. ÇNK 1 A-3/1
					Casp. ÇNK 1 A-3/2
					Casp. ÇNK 1 A-3/3
	19/06	Alkol	Kavak/Gelibolu-Casp ÇNK 3 A-1	3	Casp ÇNK 3 A-1/1
					Casp ÇNK 3 A-1/2
					Casp ÇNK 3 A-1/3

	31/09	Alkol	Kavak/Gelibolu-Casp ÇNK 4 A-1	3	Casp ÇNK 4 A-1/1
					Casp ÇNK 4 A-1/2
					Casp ÇNK 4 A-1/3
	36/09	Alkol	Kavak/Gelibolu-Casp ÇNK 4 A-2	3	Casp ÇNK 4 A-2/1
					Casp ÇNK 4 A-2/2
					Casp ÇNK 4 A-2/3
	14/06	Alkol	Bozcaada/Ç.kale-Casp ÇNK 5 A-1	3	Casp ÇNK 5 A-1/1
					Casp ÇNK 5 A-1/2
					Casp ÇNK 5 A-1/3
	20/08	Alkol	Bozcaada/Ç.kale-Casp ÇNK 5 A-2	2	Casp ÇNK 5 A-2/2
					Casp ÇNK 5 A-2/3
	74/2009	Alkol	Gökçeada/Ç.kale-Casp ÇNK 6 A-1	3	Casp ÇNK 6 A-1/1
					Casp ÇNK 6 A-1/2
					Casp ÇNK 6 A-1/3
	120/2008	Alkol	Tortum/Erzurum-Casp ERZ A-1	3	Casp ERZ A- 1/1
					Casp ERZ A- 1/2
					Casp ERZ A- 1/3
<i>Platycephalus najadum</i>	29/07	Alkol	G.yalı/Ç.kale-Naj. ÇNK 1 A-1	3	Naj. ÇNK 1 A-1/1
					Naj. ÇNK 1 A-1/2
					Naj. ÇNK 1 A-1/3
	106/09	Alkol	Çardak/Ç.kale-Naj. ÇNK 1 A-2	3	Naj. ÇNK 1 A-2/1
					Naj. ÇNK 1 A-2/2
					Naj. ÇNK 1 A-2/3
	88/07	Alkol	Dereçine/Afyon-Naj AFY 2 A-1	3	Naj AFY 2 A- 1/1

					Naj AFY 2 A-1/2
					Naj AFY 2 A-1/3
	88/07	Alkol	Dereçine/Afyon-Naj AFY 2 A-2	3	Naj AFY 2 A-2/1
					Naj AFY 2 A-2/2
					Naj AFY 2 A-2/3
	92/2007	Alkol	Akşehir/Konya-Naj KNY A-1	3	Naj KNY A-1/1
					Naj KNY A-1/2
					Naj KNY A-1/3
<i>Dolichophis jugularis</i>	59/06	Alkol	İztuzu/Muğla-D.jug MUG 1 A-1	3	D.jug MUG 1 A-1/1
					D.jug MUG 1 A-1/2
					D.jug MUG 1 A-1/3
	31/06	Alkol	Sancak/Muğla-D.jug MUG 2 A-1	3	D.jug MUG 2 A-1/1
					D.jug MUG 2 A-1/2
					D.jug MUG 2 A-1/3
	64/06	Alkol	Köyceğiz/Muğla-D.jug MUG 2 A-2	3	D.jug MUG 2 A-2/1
					D.jug MUG 2 A-2/2
					D.jug MUG 2 A-2/3
<i>Hemorrhoids nummifer</i>	66/07	Alkol	Akşehir/Konya-H.num KNY A-1	3	H.num KNY A-1/1
					H.num KNY A-1/2
					H.num KNY A-1/3
	103/07	Alkol	Dereçine/Afyon-H.num AFY 2 A-1	3	H.num AFY 2 A-1/1
					H.num AFY 2 A-1/2
					H.num AFY 2 A-1/3
<i>Platycephalus collaris</i>	38/08	Alkol	Troya/Ç.kale-P.col ÇNK 1 A-1	3	P.col ÇNK 1 A-1/1

					P.col ÇNK 1 A-1/2
					P.col ÇNK 1 A-1/3
	45/09	Alkol	Demirköy/Kırklareli-P.col KRK1 A-1	3	P.col KRK1 A-1/1
					P.col KRK1 A-1/2
					P.col KRK1 A-1/3
	43/06	Alkol	Gökbel/Muğla-P.col MUG 1 A-1	2	P.col MUG 1 A-1/1
					P.col MUG 1 A-1/2
<i>Coronella austriaca</i>	75/08	Alkol	Uzungöl/Trabzon-C.aus TRB1 A-1	3	C.aus TRB1 A-1/1
					C.aus TRB1 A-1/2
					C.aus TRB1 A-1/3
<i>Eirenis modestus</i>	35/08	Alkol	Atikhisar/Ç.kale-E.mod ÇNK 1 A-1	3	E.mod ÇNK 1 A-1/1
					E.mod ÇNK 1 A-1/2
					E.mod ÇNK 1 A-1/3
	136/07	Alkol	Kemaliye/Erzincan-E.mod EZC A-1	3	E.mod EZC A-1/1
					E.mod EZC A-1/2
					E.mod EZC A-1/3
<i>Malpolon monspessulanus</i>	43/03	Formaldehit	Kampüs/Ç.kale-Malp. ÇNK 1 F-1	3	Malp. ÇNK 1 F-1/1
					Malp. ÇNK 1 F-1/2
					Malp. ÇNK 1 F-1/3
	42/04	Formaldehit	Kampüs/Ç.kale-Malp. ÇNK 1 F-2	3	Malp. ÇNK 1 F-2/1
					Malp. ÇNK 1 F-2/2
					Malp. ÇNK 1 F-2/3
	106/07	Alkol	Karaköy/Ç.kale-Malp. ÇNK 1 A-1	3	Malp. ÇNK 1 A-1/1
					Malp. ÇNK 1 A-1/2

					Malp. ÇNK 1 A-1/3
	96/09	Alkol	Kavak/Gelibolu-Malp. ÇNK 4 A-1	3	Malp. ÇNK 4 A-1/1
					Malp. ÇNK 4 A-1/2
					Malp. ÇNK 4 A-1/3
	104/09	Alkol	Kavak/Gelibolu-Malp. ÇNK 4 A-2	3	Malp. ÇNK 4 A-2/1
					Malp. ÇNK 4 A-2/2
					Malp. ÇNK 4 A-2/3
	30/08	Alkol	Bozcaada/Ç.kale-Malp. ÇNK5 A-1	2	Malp. ÇNK5 A-1/1
					Malp. ÇNK5 A-1/3
	172/09	Alkol	G.ada/Ç.kale-Malp. ÇNK6 A-1	3	Malp. ÇNK6 A-1/1
					Malp. ÇNK6 A-1/2
					Malp. ÇNK6 A-1/3
	35/06	Alkol	Sancak/Muğla-Malp. MUG2 A-1	3	Malp. MUG2 A-1/1
					Malp. MUG2 A-1/2
					Malp. MUG2 A-1/3
	104/06	Alkol	Üçkuyu/Afyon-Malp. AFY2 A-1	3	Malp. AFY2 A-1/1
					Malp. AFY2 A-1/2
					Malp. AFY2 A-1/3
	88/08-1	Alkol	Melekli/Iğdır-Malp. IDR2 A-1	2	Malp. IDR2 A-1/1
					Malp. IDR2 A-1/2
	88/08-2		Melekli/Iğdır-Malp. IDR2 A-2	1	Malp. IDR2 A-2/1
	88/08-3		Melekli/Iğdır-Malp. IDR2 A-3	2	Malp. IDR2 A-3/1
					Malp. IDR2 A-3/2
Natrix natrix	66/04	Formaldehit	Ezine/Ç.kale-Natrix ÇNK 1 F-1	3	Natrix ÇNK 1 F-1/1

					Natrix ÇNK 1 F-1/2
					Natrix ÇNK 1 F-1/3
	68/04	Formaldehit	Ezine/Ç.kale-Natrix ÇNK 1 F-2	3	Natrix ÇNK 1 F-2/1
					Natrix ÇNK 1 F-2/2
					Natrix ÇNK 1 F-2/3
	71/04	Formaldehit	Kampüs/Ç.kale-Natrix ÇNK 1 F-3	3	Natrix ÇNK 1 F-3/1
					Natrix ÇNK 1 F-3/2
					Natrix ÇNK 1 F-3/3
	22/03	Formaldehit	Behramlı/Ç.kale-Natrix ÇNK 2 F-1	3	Natrix ÇNK 2 F-1/1
					Natrix ÇNK 2 F-1/2
					Natrix ÇNK 2 F-1/3
	9/04	Formaldehit	Kilitbahir/Ç.kale-Natrix ÇNK 2 F-2	3	Natrix ÇNK 2 F-2/1
					Natrix ÇNK 2 F-2/2
					Natrix ÇNK 2 F-2/3
	157/09	Alkol	Kampüs/Ç.kale-Natrix ÇNK 1 A-1	3	Natrix ÇNK 1 A-1/1
					Natrix ÇNK 1 A-1/2
					Natrix ÇNK 1 A-1/3
	44/08	Alkol	Kavak/Ç.kale-Natrix ÇNK 4 A-1	3	Natrix ÇNK 4 A-1/1
					Natrix ÇNK 4 A-1/2
					Natrix ÇNK 4 A-1/3
	32/09	Alkol	Kavak/Ç.kale-Natrix ÇNK 4 A-2	3	Natrix ÇNK 4 A-2/1
					Natrix ÇNK 4 A-2/2
					Natrix ÇNK 4 A-2/3
	160/09	Alkol	Kavak/Ç.kale-Natrix ÇNK 4 A-3	2	Natrix ÇNK 4 A-3/1

					Natrix ÇNK 4 A-3/2
	99/09	Alkol	G.ada/Ç.kale-Natrix ÇNK 6 A-1	3	Natrix ÇNK 6 A-1/1
					Natrix ÇNK 6 A-1/2
					Natrix ÇNK 6 A-1/3
	107/09	Alkol	G.ada/Ç.kale-Natrix ÇNK 6 A-2	3	Natrix ÇNK 6 A-2/1
					Natrix ÇNK 6 A-2/2
					Natrix ÇNK 6 A-2/3
	147/09	Alkol	G.ada/Ç.kale-Natrix ÇNK 6 A-3	2	Natrix ÇNK 6 A-3/1
					Natrix ÇNK 6 A-3/3
	9/06-1	Alkol	Bolvadin/Afyon-Natrix AFY 1 A-1	3	Natrix AFY 1 A-1/1
					Natrix AFY 1 A-1/2
					Natrix AFY 1 A-1/3
	9/06-2		Bolvadin/Afyon-Natrix AFY 1 A-2	3	Natrix AFY 1 A-2/1
					Natrix AFY 1 A-2/2
					Natrix AFY 1 A-2/3
	78/06	Alkol	Eber/Afyon-Natrix AFY 1 A-3	2	Natrix AFY 1 A-3/1
					Natrix AFY 1 A-3/2
	68/07	Alkol	Akşehir/Konya-Natrix KNY A-2	1	Natrix KNY A-2/2
	112/09	Alkol	Merkez/Sinop-Natrix SNP A-1	2	Natrix SNP A-1/1
					Natrix SNP A-1/2
<i>Natrix tessellata</i>	16/04	Formaldehit	Biga/Ç.kale-N.tes ÇNK 1 F-1	3	N.tes ÇNK 1 F-1/1
					N.tes ÇNK 1 F-1/2
					N.tes ÇNK 1 F-1/3
	36/04	Formaldehit	Bayramiç/Ç.kale-N.tes ÇNK 3 F-1	3	N.tes ÇNK 3 F-1/1

					N.tes ÇNK 3 F-1/2
					N.tes ÇNK 3 F-1/3
	24/09-1	Alkol	Kalkım/Ç.kale- ÇNK 3 A-1	N.tes 3	N.tes ÇNK 3 A-1/1
					N.tes ÇNK 3 A-1/2
					N.tes ÇNK 3 A-1/3
	24/09-2	Alkol	Kalkım/Ç.kale- ÇNK 3 A-2	N.tes 3	N.tes ÇNK 3 A-2/1
					N.tes ÇNK 3 A-2/2
					N.tes ÇNK 3 A-2/3
	38/09	Alkol	Kavak/Ç.kale- ÇNK 4 A-1	N.tes 3	N.tes ÇNK 4 A-1/1
					N.tes ÇNK 4 A-1/2
					N.tes ÇNK 4 A-1/3
	65/09	Alkol	Kavak/Ç.kale- ÇNK 4 A-2	N.tes 3	N.tes ÇNK 4 A-2/1
					N.tes ÇNK 4 A-2/2
					N.tes ÇNK 4 A-2/3
	83/09	Alkol	Kavak/Ç.kale- ÇNK 4 A-3	N.tes 2	N.tes ÇNK 4 A-3/2
					N.tes ÇNK 4 A-3/3
	46/06	Alkol	Gökbil/Muğla-N.tes MUG 1 A-1	1	N.tes MUG 1 A-1/3
	57/06	Alkol	Köyceğiz/Muğla-N.tes MUG 2 A-1	2	N.tes MUG 2 A-1/2
					N.tes MUG 2 A-1/3
	12/2007	Alkol	Gölbaşı/Adıyaman-N.tes ADI A-1	3	N.tes ADI A-1/1
					N.tes ADI A-1/2
					N.tes ADI A-1/3
	69/07	Alkol	Akşehir/Konya-N.tes KNY A-1	3	N.tes KNY A-1/1
					N.tes KNY A-1/2

					N.tes KNY A-1/3
	109/09-1	Alkol	Sapanca/A.pazarı-N.tes ADA A-1	3	N.tes ADA A-1/1
					N.tes ADA A-1/2
					N.tes ADA A-1/3
<i>Telescopus fallax</i>	3/05	Formaldehit	İntepe/Ç.kale-Telesc. ÇNK1 F-1	3	Telesc. ÇNK1 F-1/1
					Telesc. ÇNK1 F-1/2
					Telesc. ÇNK1 F-1/3
	28/05	Formaldehit	Behramlı/Ç.kale-Telesc. ÇNK 2 F-1	3	Telesc. ÇNK 2 F-1/1
					Telesc. ÇNK 2 F-1/2
					Telesc. ÇNK 2 F-1/3
	112/07	Alkol	S.alan/Ç.kale-Telesc. ÇNK1 A-1	3	Telesc. ÇNK1 A-1/1
					Telesc. ÇNK1 A-1/2
					Telesc. ÇNK1 A-1/3
	23/08	Alkol	Kampüs/Ç.kale-Telesc ÇNK1 A-2	3	Telesc. ÇNK1 A-2/1
					Telesc. ÇNK1 A-2/2
					Telesc. ÇNK1 A-2/3
	36/08	Alkol	Atikhisar/Ç.kale-Telesc ÇNK1 A-3	3	Telesc. ÇNK1 A-3/1
					Telesc. ÇNK1 A-3/2
					Telesc. ÇNK1 A-3/3
	28/08	Alkol	İztuzu/Muğla-Telesc. MUG 1 A-1	3	Telesc. MUG 1 A-1/1
					Telesc. MUG 1 A-1/2
					Telesc. MUG 1 A-1/3
	28/06	Alkol	Zeytinalanı/Muğla-Telesc MUG 2 A-1	3	Telesc MUG 2 A-1/1
					Telesc MUG 2 A-1/2

					Telesc MUG 2 A-1/3
	64/08	Alkol	Erbağ/Tokat-Telesc. TKT A-1	3	Telesc. TKT A-1/1
					Telesc. TKT A-1/2
					Telesc. TKT A-1/3
<i>Macrovipera lebetina</i>	107/07	Alkol	Harmanlı/Adıyaman- Macro ADI A-1	3	Macro ADI A-1/1
					Macro ADI A-1/2
					Macro ADI A-1/3
<i>Montivipera xanthina</i>	7/05	Formaldehit	Kampüs/Ç.kale-M.x ÇNK 1 F-1	3	M.x ÇNK 1 F-1/1
					M.x ÇNK 1 F-1/2
					M.x ÇNK 1 F-1/3
	70/06	Alkol	Dardanos/Ç.kale-M.x ÇNK1 A-1	3	M.x ÇNK1 A- 1/1
					M.x ÇNK1 A- 1/2
					M.x ÇNK1 A- 1/3
	10/07	Alkol	Göleköy/Ç.kale-M.x ÇNK 1 A-2	3	M.x ÇNK1 A- 2/1
					M.x ÇNK1 A- 2/2
					M.x ÇNK1 A- 2/3
	94/06	Alkol	Dereçine/Afyon-M.x AFY 2 A-1	1	M.x AFY 2 A-1/3
	55/07	Alkol	Dereçine/Afyon-M.x AFY 2 A-2	1	M.x AFY 2 A-2/2
	56/07	Alkol	Dereçine/Afyon-M.x AFY 2 A-3	3	M.x AFY 2 A-3/1
					M.x AFY 2 A-3/2
					M.x AFY 2 A-3/3

Koleksiyona ait türler öncelikli olarak toplandıkları bölgelere göre düzenlenmiştir. Her birinin toplandıkları tarih ve şehirler belirlenmiş, örneklerin toplandığı bu şehirler iklim ve fiziki haritalar baz alınarak incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucu bu şehirler de kendi içlerinde bölümlere ayrılmıştır. Bölümlere ayrılırken ekolojik ve fiziksel

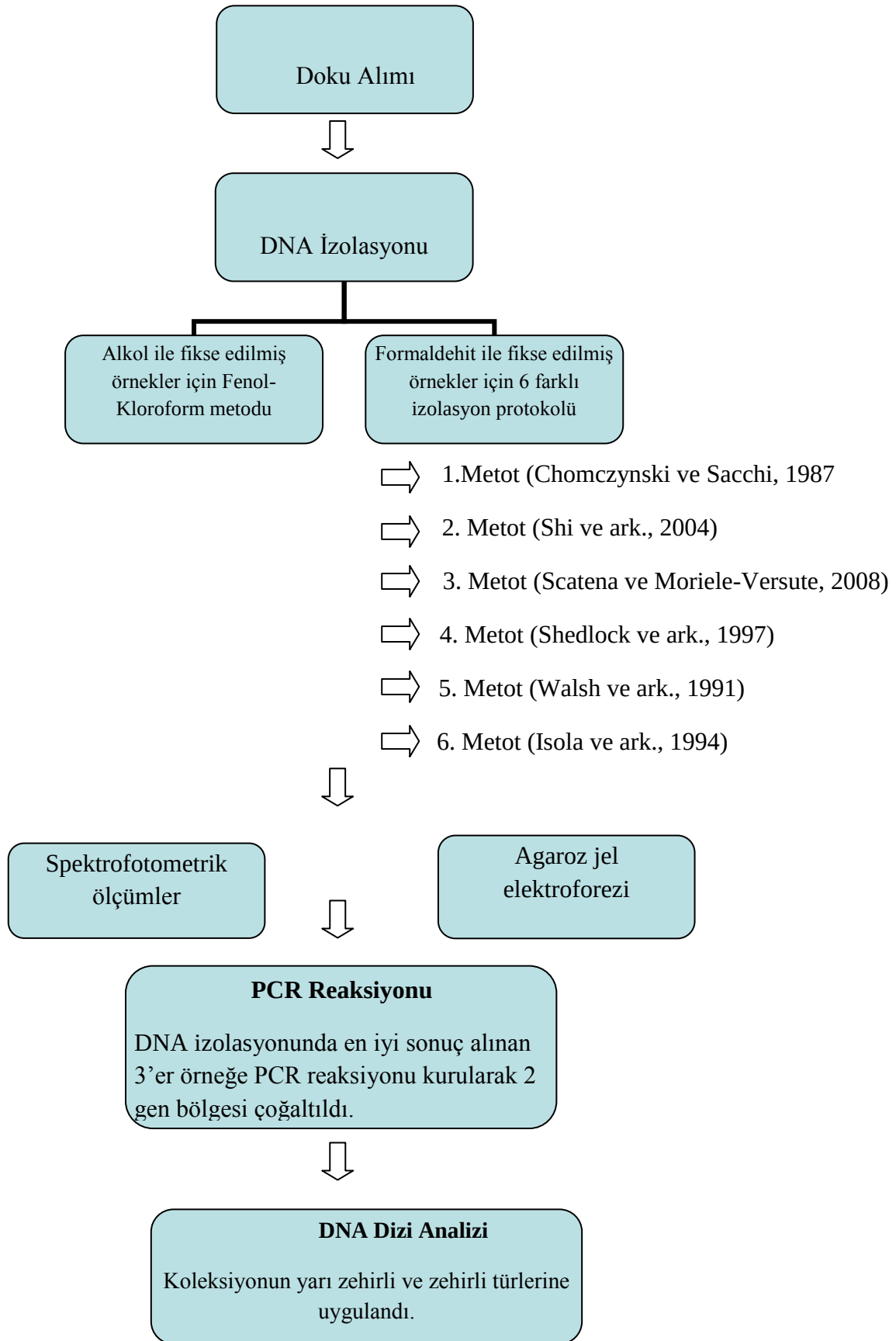
bariyerler göz önünde tutulmuştur. Bu şekilde; ileride yapılması olası filogeni çalışmalarında bölgeler arasında bulunabilecek farklılıkların ekolojik açıdan rahatlıkla değerlendirilebileceği düşüncesindeyiz. Örnek toplanan şehirlerin ayrıldığı bölgeler aşağıda tablo halinde Çizelge 2.'de sunulmuştur.

Çizelge 2. Örnek toplanan şehirlerin ekolojik bariyerler baz alınarak lokalize edilmiş hali

Şehir	Bölge Kodu	Bölgeye dahil edilen alanlar
Çanakkale	ÇNK 1	Merkez, Karacaören, Kepez, Lapseki, Ezine, Kumkale, Çan, Güzelyalı, Şekerpınar, Assos, Biga, Yenice, İntepe, Ayvacık
Çanakkale	ÇNK 2	Kilitbahir, Behramlı, Gelibolu
Çanakkale	ÇNK 3	Kalkım, Hamdibey, Bayramiç
Çanakkale	ÇNK 4	Kavak Deltası
Çanakkale	ÇNK 5	Bozcaada, Tavşan Adası
Çanakkale	ÇNK 6	Gökçeada
İstanbul	İST 1	Anadolu yakası
İstanbul	İST 2	Avrupa yakası
Kırklareli	KRK 1	Dupnisa, Demirköy, Dereköy, İğneada
Kırklareli	KRK 2	Babaeski
Adapazarı	ADA	Sapanca Gölü
Muğla	MUG 1	İztuzu, Gökbel, Çandır
Muğla	MUG 2	Zeytinalanı, Sancak, Dalyan, Sultaniye, Fethiye
Muğla	MUG 3	Yaylaköy, Yeşilköy, Çubucak
Mersin	MRS 1	Tarsus
Mersin	MRS 2	Fındıkpınarı, Mut
Adana	ADN	Ceyhan
Hatay	HTY 1	Hassa, Reyhanlı
Hatay	HTY 2	Samandağ, Kızılçöl, Harbiye
Adıyaman	ADI	Gölbaşı, Kuruçay, Harmanlı, Göksu, Tut
Gaziantep	ATP	İslahiye, Sakçaozü
Şanlıurfa	URF	Birecik
Van	VAN	Zeve

Iğdır	IDR 1	Doğubayazıt
Iğdır	IDR 2	Aralık, Taşburun
Erzincan	EZC	Kemaliye
Erzurum	ERZ 1	Baraj Gölü
Erzurum	ERZ 2	Tortum
Bayburt	BYB	Bayburt
Rize	RİZ	Ayder Yaylası
Trabzon	TRB 1	Uzungöl, Sürmene
Trabzon	TRB 2	Maçka
Ordu	ORD	İkizce, Çamaş
Sinop	SNP	Kale, Karakum
Tokat	TKT	Erbağ, Niksar, Çamiçi
Bolu	BOL 1	Gerede, Yedigöller
Bolu	BOL 2	Düzce
Afyon	AFY 1	Bolvadin, Pınarkaya, Eber, Çayırpınar, Karabağ, Gözpınarı
Afyon	AFY 2	Karapınar, Üçkuyu, Yakasenek, Sultandağı
Konya	KNY	Tuzlukçu, Yaylabeleden, Gölçayır, Akşehir

3.2.Yöntem

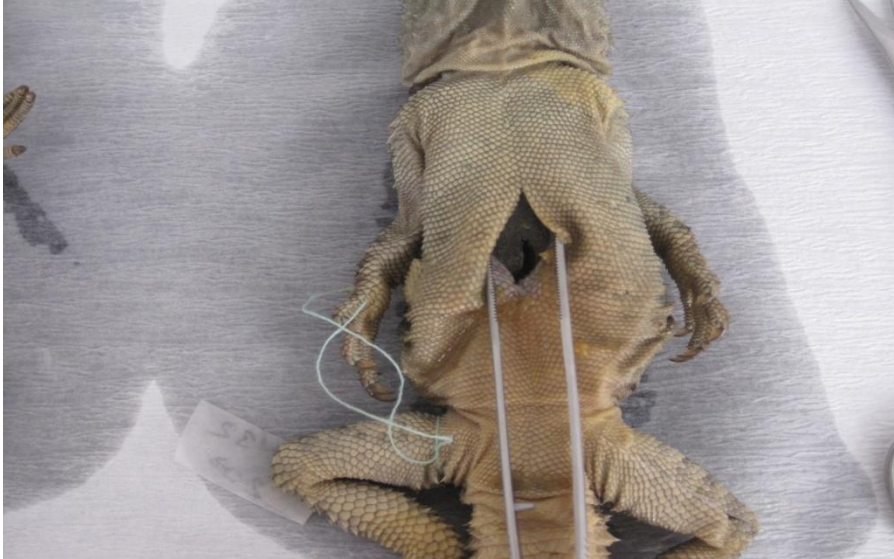


Şekil 1. Çalışma esnasında izlenen yol haritası.

Lokalitelere göre ayrılmış her bir türe ait örneklerden en az üçer tanesi seçilerek ileriki aşamalara tabi tutulmuştur. Öncelikli olarak doku alınmış ve ardından DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu tamamlanan örneklerin DNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş, ardından PCR reaksiyonu kurulmuştur.

3.2.1. Doku Alımı

Seçilen örneklerden doku alımı disseksiyon makası ve pens ile gerçekleştirilmiş, örneklerin ventral bölgesinde, karaciğerin lokalize olduğu bölgede bir-iki santimetrelilik kesiler açılmıştır. Disseksiyon kurallarına uygun şekilde, örneklerin vücut büyüklüklerine göre karaciğer dokusundan en az bir, en fazla üç parça doku örneği alınmıştır. Alınan dokular alkolle ya da formaldehitte tespit edilmiş olmaları göz önüne alınarak farklı koşullarda muhafaza edilmiştir. Alkolle tespit edilen örneklerin alınan dokuları 1,5 ml'lik mikrotüplere alınmış, üzerine % 95'lik alkol eklenerek tüpler bir sonraki aşamaya dek -20°C'de tutulmuştur. Formaldehitte tespit edilen örneklerden alınan dokular ise; yine 1,5 ml'lik mikrotüplere alınmış, üzerine deiyonize su eklenerek oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bir sonraki aşamaya dek zaman zaman ilave edilen deiyonize su değiştirilerek doku formaldehitten arındırılmaya çalışılmıştır.



Şekil 2. Örneklerden doku alımı esnasında açılan kesiler.

3.2.2. DNA İzolasyonu

3.2.2.1. Alkol ile Tespit Edilen Örneklerin DNA İzolasyonu

Dokulara Fenol-Kloroform metodu (Chomczynski ve Sacchi, 1987) ile DNA izolasyonu uygulanmıştır.

- -20°C’de muhafaza edilen dokular alkolden çıkarılıp deiyonize su ile yıkanmış, ardından yaklaşık 45 dakika kadar -20°C’de bekletilmiş porselen havanlarda 500 µl STE solüsyonu ile ezilmiş, uygulanan mekanik kuvvetle hücre içeriğine ulaşılmaya çalışılmıştır.
- Ezme işlemi tamamlandıktan sonra, spatul yardımıyla mikrotüpe alınan doku özütünün üzeri STE ile 500 µl’ye tamamlanmıştır. Karışımın üzerine 25 µl %10’luk SDS (25°C) ve 5 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklenerek 56°C’deki Nüve Bath nb 20 marka su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu sayede uygulanan mekanik etkinin yanında kimyasal olarak da nükleus içerisindeki nükleik asitler ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.
- Ertesi gün, örneklerin üzerine 500 µl Fenol-Kloroform eklenmiş, karışım çalkalanarak Hettich Mikro 200R marka santrifüjde 13000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiş ve üstte oluşan temiz faz bir başka mikrotüpe alınmıştır. Böylece fenol-kloroform vasıtasıyla hücresel proteinler çöktürülmüş, üst kısımda nükleik asitler kalmıştır.
- Alınan üst faza -20°C’de beklemiş absol alkolden 1000 µl eklenmiş, alınan üst faz hacminin 1/10’u kadar Sodyum-asetat ilavesi yapılmıştır. Alkol ilavesi ile fenol-kloroform kalıntıları yok edilmeye çalışılmış, soğuk alkol ve Sodyum-asetat eklemeleri ile DNA’yı kondanse hale getirmek amaçlanmıştır. 14000 rpm’de 4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- İşlemin ardından alkol dökülerek mikrotüp dibinde bulunan DNA üzerine sırasıyla 350 µl absol alkol ve 150 µl deiyonize su eklenmiştir. Santrifüj işlemi tekrarlanmış, alkol tekrar dökülmüştür. Azalan alkol serileriyle fenol-kloroformun tamamen temizlenmesi sağlanmıştır. Son aşama olarak; tüplerin ağzı açılarak temiz bir ortama ters çevrilmiş tüp dibinde bulunduğu varsayılan DNA pelleti kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra üzerlerine 50-100 µl PCR suyu eklenmiş, tüp kenarları parafilm ile çevrilerek, özütün çözülmesi için 45 dakika 56°C’deki su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüplerin bir süre soğumaları beklenmiş, ardından çözünmüş DNA örnekleri -20°C’ye konulmuştur.

3.2.2.2. Formaldehit ile Tespit Edilen Örneklerin DNA İzolasyonu

Formaldehit ile tespit edilmiş örneklerden DNA izolasyonu yapmak için önce yapılmış çalışmalardan birçok farklı yöntem çalışma kapsamında denenmiştir.

3.2.2.2.1. I. Metot (Chomczynski ve Sacchi, 1987)

Formaldehit ile tespit edilmiş örneklerden bir kısmına da Fenol-Kloroform metodu uygulanmıştır. Oda sıcaklığında deiyonize suda bekletilen dokular porselen havan yerine steril bagetler yardımıyla mikrotüp içerisinde, 500 µl STE solüsyonu ile ezilmiştir. Karışımın üzerine 25 µl %10'luk SDS (25°C) ve 5 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklenerek 56°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, örneklerin üzerine 500 µl Fenol-Kloroform eklenmiş ve 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş, üstte oluşan temiz faz bir başka mikrotüpe alınmıştır. Alınan üst faza -20°C'de beklemiş absol alkolden 1000 µl eklenmiş, alınan üst faz hacminin 1/10'u kadar Sodyum-asetat ilavesi yapılmıştır. 14000 rpm'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmıştır. İşlemin ardından alkol dökülerek mikrotüp dibinde bulunan pellet üzerine sırasıyla 350 µl absolüt alkol ve 150 µl deiyonize su eklenmiştir. Santrifüj işlemi tekrarlanmış, alkol tekrar dökülmüştür. Son olarak; tüplerin ağzı açılarak temiz bir ortama ters çevrilmiş tüp dibinde bulunduğu varsayılan DNA pelleti kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra üzerlerine 20-50 µl PCR suyu eklenmiş, tüp kenarları parafilm ile çevrilerek, özütün çözülmesi için 45 dakika 56°C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüplerin bir süre soğumaları beklenmiş, ardından çözünmüş DNA örnekleri -20°C'ye konulmuştur.

3.2.2.2.2. II. Metot (Shi ve ark., 2004)

Formaldehitli örneklerden bir kısmı bu protokol ile çalışılmıştır. Örneklerden alınan üçer dokunun her biri, Shi ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışma göz önüne alınarak 3 farklı solüsyonla muamele edilmiştir.

1. Solüsyon: 0,1 M NaOH (pH:12,93)
2. Solüsyon: 0,1 M NaOH ve %0,5 Tween-20 (pH: 12,82)
3. Solüsyon: 0,1 M NaOH ve % 1 SDS (pH: 12,78)

- Her bir materyalden alınan 3 dokunun her biri yukarıdaki solüsyonlardan biri ile işleme tabi tutulmuştur. Dokuların üzerine 500 µl ilgili solüsyon eklenerek dokular ezilmiştir. Ezilen dokular otoklavlanmış mikrotüplere alınarak üzerleri 500 µl'ye tamamlanmış ve mikrotüpler 120°C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sterilizasyon

işlemleri ALP marka otoklavda yapılmıştır.

- İnkübasyon sonrasında 15 dakika tüplerin soğuması beklenerek üzerlerine 500 µl Fenol-Kloroform eklenmiştir. Tüpler 12000 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir, üst fazlar alınarak üzerlerine üst faz hacmi kadar kloroform ilavesi yapılmış ve tekrar 12000 rpm’de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Ardından tekrar üst fazlar alınarak üzerlerine 1/10 hacimde 3 M Sodyum-asetat eklenmiş, vortekslenerek aynı üst fazın hacminde izopropanol ilavesi yapılmıştır. 1 gece boyunca -20°C’ de bekletilmiştir.
- Ertesi gün, 12000 rpm’de +4°C’de 5 dakika santrifüj edilmiş, üst fazlar dökülerek özütler 100 µl %75’ lik alkol ile yıkanmıştır. Ardından mikrotüpler kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan mikrotüplere 50 µl deiyonize su eklenerek 56°C’de DNA’nın çözünmesi için beklenmiş ve ardından -20°C’ye konulmuştur.

3.2.2.2.3. III. Metot (Scatena ve Morielle-Versute, 2008)

Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerle uygulanan bir diğer protokol de Scatena ve Morielle-Versute’un 2008 yılında yaptıkları çalışma baz alınarak planlanmıştır.

- Alınan doku örnekleri 15 dakika boyunca HBSS (1,4 mM NaCl, 70 mM KCl, 4,2 mM Na₂PO₄, 3 mM KH₂PO₄, 5 mM glukoz, 0,045 mM fenol kırmızısı) ile yıkanmıştır.
- Ardından daha küçük parçalara ayrılan doku parçaları 1 ml HBSS içeren steril tüplerde 24 saat bekletilmiştir.
- Ertesi gün örnekler; 5 ml Tris-EDTA içeren (pH: 8,0) bir başka tüpe aktarılmış ve bu şekilde 37°C’lik su banyosunda 5 gün boyunca bekletilmiştir. Bekletme süresince her 48 saatte bir dokunun içerisinde bulunduğu solüsyon değiştirilmiştir. Bu şekilde formalin kalıntıları uzaklaştırılmaya çalışılmıştır.
- Süre sonunda doku örnekleri; pH’ı 10,6 olan glisin-NaOH (0,2 M glisin) solüsyonunun bulunduğu tüpe alınarak 37°C’lik su banyosunda bir saat tutulmuştur. Ardından 5 dakika boyunca oda sıcaklığında 2600 rpm (3000 g) santrifüj edilmiştir.
- Üst faz atılarak pellet; 300 µl Lizis Tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, %2’lik SDS (v/v), 4 mg/ml proteinaz K) içeren mikrotüpe alınmıştır. Bütün gece boyunca 56°C’lik su banyosunda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonuçlanmadan bir saat önce 10 µg/ml’lik RNaz solüsyonundan 1 µl eklenmiştir. Yeniden oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 2600 rpm (3000 g)’de santrifüj edilmiştir.

- Steril mikrotüplerin yarısına buz halindeki absol alkol konularak üst faz buraya eklenmiştir. 9025 rpm (12000 g)'de santrifüj tekrarlanarak DNA çöktürülmüştür.
- Üst faz atılarak kurutulan DNA üzerine 100-200 µl TE tamponu eklenmiştir.

3.2.2.2.4. IV. Metot (Shedlock ve ark., 1997; Chakraborty ve ark., 2006)

Shedlock ve arkadaşlarının 1997 yılındaki çalışmalarında kullanılan protokol baz alınarak bazı formaldehitli örnekler çalışıldı.

- Alınan dokular 3 defa 24 saat boyunca 1X GTE (100 mM glisin, 10 mM Tris-HCl (pH: 8,0), 1 mM EDTA) ile yıkanmıştır.
- Ardından dokular kurutulmuş ve 800 µl ekstraksiyon tamponu (%1 SDS, 25 mM Tris-HCl (pH: 7,5), 100 mM EDTA) içerisinde parçalanarak 65°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- 1 M DTT'den 20 µl ve 10 mg/ml proteinaz K'dan 50 µl eklenerek 10 saat inkübe edilmiş, 25 µl proteinaz K ve 10 µl RNaz (10 mg/ml) eklenmiştir.
- Ardından öncelikle fenol ve 2 defa fenol-kloroform-izoamil alkol ile yıkanmıştır.
- Son olarak; %95'lik etanolden 2,5 hacim alınarak çöktürme işlemi yapılmıştır. %70'lik etanol ile yıkanarak, 40 µl TE tamponu (pH: 8,0) içerisinde çözündürülmüştür.

3.2.2.2.5. V. Metot (Walsh ve ark., 1991; Chakraborty ve ark., 2006)

- Çalışılan materyal üzerine 1 ml tampon (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, %2 SDS (pH: 7,5)) eklenerek 12000 rpm'de santrifüjlenerek yıkanmıştır.
- Üst faz atılarak örnekler 200 µl %5'lik Chelex ile karıştırılmış ve 37°C'de yarım saat inkübe edilmiştir. Bu esnada 2 µl proteinaz K (10 mg/ml) ve 7 µl 1 M DTT eklenmiştir.
- Ardından 10-20 saniye yüksek hızda santrifüjlenerek tekrar 8-10 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilmiştir. Tekrar 5 dakika boyunca yüksek hızda döndürülmüştür.

3.2.2.2.6. VI. Metot (Isola ve ark., 1994)

Isola ve arkadaşlarının yaptıkları araştırma üzerinde çalışılmış, DNA izolasyon protokolleri gerçekleştirilen çalışmaya uyarlanmıştır.

- Deiyonize su içerisinde bekletilen dokular sudan uzaklaştırılmış, dokuların üzerine Hidroliz Tamponu (5 ml 1M Tris-HCl, 0,2 ml 0.5M NaCl, 0,5 ml %0,5'lik Tween-20 ve deiyonize su) eklemesi yapılmıştır. Bu ilave; dokunun ağırlığı tartılarak

belirlenmiş, en az 400, en fazla 750 µl eklenmiştir.

- Ardından dokular steril edilen bagetlerle bu solüsyon içerisinde ezilmiş, mekanik etki ile hücresel içeriğin dışarı çıkarılması sağlanmıştır. Ezilen dokuların üzerine yine ağırlıklarıyla doğru orantılı olarak (30-70 µl) proteinaz-K eklenmiş, böylece kimyasal etki ile de nükleik asitler açığa çıkarılmaya çalışılmıştır. Tüplerin etrafı parafilm ile sarılmış, vortekslenen tüpler 56°C'deki su banyosunda bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün su banyosunun sıcaklığı 65°C'ye çıkarılan örneklerin inkübasyonu 4-5 saat daha devam ettirilmiştir. Süre bitiminde tüpler soğutularak üzerine 250 µl fenol-kloroform eklemesi yapılmış, hücresel atıkların çöktürülmesi için 14000 rpm'de 15 dakika boyunca +4° C'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası alınan tüplerin üst fazında toplandığı düşünülen nükleik asitler temiz tüpe alınmıştır. Tüpler üzerine 500 µl absol alkol eklemesi yapılmış, bu şekilde fenol-kloroform artıkları temizlenmeye çalışılmıştır.
- 14000 rpm'de 20 dakika +4° C'de santrifüj işlemi tekrarlanmış, tüp dibine çöktüğü varsayılan DNA pelletinin üzeri boşaltılarak temiz bir zeminde kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan örneklerin üzerine 50 µl PCR suyu eklenerek DNA'nın çözülmesi için 45 dakika boyunca 56° C'de inkübe edilmiştir.

3.2.3. DNA Miktarının Ölçümü

DNA izole edildikten sonra DNA'nın saflık derecesi ve miktarının ölçülmesi gerekmektedir. Bunun için izole edilen DNA miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçüm, Moleküler Zootaksonomi Laboratuvarı'nda bulunan WPA Biowave DNA 18V DC marka spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm için izole edilen alkol örneklerinin DNA'sından 1µl alınmış ve üzerine 99 µl PCR suyu eklenmiştir. Formaldehit örnekleri içinse 1 µl DNA üzerine 19µl PCR suyu eklenmiştir. Toplam çözelti Kuartz küvetine aktarılmış ve ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen DNA konsantrasyonunun yanı sıra 260/280 nm aralığı, 260/230 nm aralığı gibi değerler de dikkate alınmıştır.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gen mühendisliğinin temel basamaklarından olan gen çoğaltma (amplifikasyon) işlemi, gen klonlama şeklinde yapılabilirken, günümüzde *in vitro* koşullarda ve daha kısa sürede yapabilmek polimeraz zincir reaksiyonu ile mümkündür. Bu işlem ile; DNA'da

hedef bölgenin çoğaltılabilmesi ve DNA’da mutasyonların belirlenmesi sağlanır (Dilsiz, 2004).

PCR; temel olarak 3 aşamadan oluşmaktadır;

1. Denatürasyon; Yüksek sıcaklık uygulaması ile çift iplikli DNA yapısının tek ipliklere ayrılması,
2. Primerlerin bağlanması (Annealing); Primerlerin uygun sıcaklık uygulaması ile kalıp DNA’ya bağlanması,
3. Amplifikasyon; Uygun enzim kullanımı (Taq DNA polimeraz) ile zincirin 5’→3’ yönünde uzaması.

Bu aşamaların belirli sayıda tekrarı vasıtasıyla istenilen bölge defalarca kez çoğaltılmış olur. Bu noktada; tekrar sayısı, kalıp olarak kullanılan DNA’nın konsantrasyonuna bağlıdır.

PCR reaksiyonu esas olarak; DNA’nın kendisini eşlemesi (replikasyon) aşamasından temel alınarak oluşturulmuştur. Replikasyon esnasında çeşitli enzimler kullanılarak DNA’nın sarmal yapısı açılır ve her bir iplikçik kalıp görevi görür. Ayrılan DNA ipliklerinin karşılıklarına uygun olacak biçimde primer RNA’lar sentezlenir. PCR sırasında ise; DNA sarmalının ayrılma işlemi sıcaklık uygulaması ile sağlanır ve tıpkı replikasyonda oluşturulan Primer RNA’lara benzer biçimde sentetik oligonükleotitler kullanılarak, çoğaltılmak istenen gen bölgesinin başlangıç ve sonuna bu sentetik oligonükleotitler (PCR primerleri) bağlanır. Tüm bu işlemler sırasında sıcaklık ayarı ve döngü sayısı termal bir makine yardımıyla sağlanır (Devrim ve Kaya, 2004).

Çalışma alkol ve formaldehit ile tespit edilmiş materyalden alınan her 2 veya 3 dokudan da DNA izolasyonu yapılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Ardından her bir tür için en iyi konsantrasyonun elde edildiği dokulardan iki gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bu işlem PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çoğaltılan gen bölgeleri mitokondriyal DNA’nın Cytochrome B ve 16S rRNA genleridir. Bu bölgelerin çalışılan türlerdeki uzunluğu 500-600 bp olduğu görülmüştür (NCBI).

Çalışmada bilinen PCR komponentlerinin (dNTP, MgCl₂, Taq polimeraz, Taq polimeraz tamponu, primerler ve deiyonize su) yanı sıra BSA ve DMSO gibi ilaveler de yapılmıştır. Tüm komponentlerin miktarları hesaplanarak 0,5 ml’lik PCR karışım tüpü

içerisine eklenmiştir. Alkolle fikse edilmiş örneklerde standart komponentler kullanılmışken, formaldehit ile fikse edilmiş örneklerde daha iyi sonuçlar almak adına farklı tip enzimler (Dream Taq Polymerase, Go Taq Polymerase) ve buna bağlı olarak farklı enzim tamponları da (Dream Taq Polymerase Buffer, Go Taq Polymerase Buffer) kullanılmıştır.

3.2.4.1. Primer seçimi

Çalışılan gen bölgeleri türler için korunmuş bölgeler olduğundan ortak primerler kullanılmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalarda kullanılmış primerler araştırılarak en uygun olanlar dejenere hale getirilmiştir. Bu aşamada NCBI sitesindeki veri tabanları ve BLAST uygulaması kullanılmıştır.

Çizelge 3. DNA Çoğaltma İşlemi Esnasında Kullanılan Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Kaynak
Cyt B-F	5' TTYGGCTCYCTWCTAGGACTMTG 3'	Dizayn edildi.
Cyt B-R	5' GGGTGRAAYCGRATTTTGTC 3'	Ujvari ve Madsen, 2008.
16S rRNA-F	5' CAACTGTTTACCAAAAACAT 3'	Guha ve Kashyap, 2005.
16S rRNA-R	5' TAGATAGAAACCGACCTGGAT T 3'	Whiting ve ark., 2002.

Yapılmış çalışmalar incelendiğinde; formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden izole edilen DNA miktarı, alkol ile fikse edilmiş örneklerden izole edilen DNA miktarı ile karşılaştırıldığında; çok daha az miktarda olduğu görülmüştür. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerde çoğaltılmaya çalışılan gen bölgeleri büyük olduğundan çok sağlıklı sonuçlar elde edilememiş ve bir de çalışılan bölgeler ikiye bölünerek ve buralara uygun yeni primerler tasarlanarak çoğaltma işlemleri yapılmıştır. Bu nedenle bu örnekler için, seçilen primerlere ek olarak ikincil primerler de kullanılmıştır. Kullanılan bu primer dizileri Çizelge 4'te sunulmuştur.

Çizelge 4. Formaldehitli Örnekler için Kullanılan Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Kaynak
Cyt B-F	5' TTYGGCTCYCTWCTAGGACTMTG 3'	Dizayn edildi.
Cyt B-R (2)	5' GCAACAGTCATYACCAAYCT 3'	Dizayn edildi.
Cyt B-R	5' GGGTGRAAYCGRATTTTGTC 3'	Ujvari ve Madsen, 2008.
Cyt B-F (2)	5' AGRTTGGTRATGACTGTTGC 3'	Dizayn edildi.

16S rRNA-F	5' CAACTGTTTACCAAAAACAT 3'	Guha ve Kashyap, 2005.
16S rRNA-R (2)	5' GTAAACCTTCTTGTCGATGG 3'	Dizayn edildi.
16S rRNA-R	5' TAGATAGAAACCGACCTGGAT T 3'	Whiting ve ark., 2002.
16S rRNA-F (2)	5' ACA TGT CRA AYT ACC ACC TG 3'	Dizayn edildi.

3.2.4.2. PCR Programının Seçimi

Yapılan DNA izolasyon işleminin ardından elde edilen DNA örnekleri PCR metodu ile DNA çoğaltma aşamasına tabii tutulmuştur. Bu yöntem, 1985'te kullanılmaya başlanan, *in vitro* ortamda DNA kopyaları çoğaltmaya yarayan bir metottur. PCR; hücre bölünmesi sırasında meydana gelen DNA replikasyon aşamasının basitleştirilmiş bir şeklidir (Litt ve Luty, 1989).

Tüm PCR komponentleri hazırlandıktan sonra her bir komponentten ne kadar alınması gerektiği hesaplanmıştır. Çalışılacak her bir gen bölgesi için 0,5 ml'lik karışım tüpü, BIOSAN DNA/RNA UV Cleaner UVC/T-AR marka PCR kabini içerisinde hazırlanmış ve tüm komponentler belirlenen miktarlarda karışım tüplerine konulmuştur. Çoğaltılması istenen her bir DNA için 0,2 ml'lik PCR tüpü hazırlanmış ve PCR karışımı tüplere dağıtılmıştır. Her bir PCR tüpünün üzerine ilgili DNA eklenmiş ve kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklıkları baz alınarak PCR programları oluşturulmuştur. Gerekli denemeler yapıldıktan sonra alkol ve formaldehit ile fikse edilmiş örnekler için iki ayrı program seçilmiştir. Oluşturulan PCR programı şu şekildedir;

Çizelge 5. Kullanılan PCR Programları

Alkol ile Fikse edilmiş Örnekler için PCR Programı	Formaldehit ile Fikse edilmiş Örnekler için PCR Programı
95°C'de 2 dakika,	95°C'de 5 dakika,
95°C'de 30 saniye,	95°C'de 30 saniye,
58°C'de 30 saniye,	58°C'de 30 saniye,
72°C'de 30 saniye	72°C'de 30 saniye

Son 3 işlem; alkolle fikse edilmiş örneklerde 35 defa, formaldehit ile fikse edilmiş örneklerde 40 defa tekrarlanmıştır. Ardından 72°C'de 10 dakika tutulmuş ve 10°C'de

bekleme moduna alınmıştır. PCR işlemini gerçekleştirmek için Techne TC-5000 marka thermal-cyclers kullanılmıştır.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Çoğaltılan gen bölgelerinin sağlıklı bir biçimde çoğalıp çoğalmadığını görebilmek ve PCR uygulaması sırasında oluşabilecek hataları ortaya çıkarılabilmek için agaroz jel elektroforezi uygulaması yapılmıştır. Bu işlem için öncelikli olarak agaroz jel hazırlanmıştır. TBE solüsyonu ve agaroz kullanılarak %2'lik agaroz jel hazırlanmış, DNA'yı görünebilir hale getirebilmek için jele Ethidium Bromide eklenmiştir. Bu kimyasalın mutajenik etkisinden korunmak için işlem çeker ocakta gerçekleştirilmiştir. Ardından hazırlanan jel, elektroforez tankına dökülerek donması için bir süre beklenmiştir. Donan jele yüklenen DNA örnekleri Thermo Scientific Owl Easycast B2 marka elektroforez ile yürütülmüştür. Yürütme işlemi gerçekleştikten sonra referans seçilen marker baz alınarak DNA bütünlüğü değerlendirilmiştir. Görüntüleme işlemi; Quantum ST-4-1100/26 MX programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İçerisinde DNA örneği bulunmayan negatif örnekte bant gözlenmiş ise PCR reaksiyonunun kurulduğu aşamada kontaminasyon olduğu anlaşılmış ve sterilizasyon sağlanarak PCR işlemi tekrarlanmıştır. DNA örneklerinde ise; bant oluşumu gözlenmemişse PCR koşulları ($MgCl_2$ konsantrasyonu ve bağlanma sıcaklığı) değiştirilerek PCR aşaması tekrarlanmıştır. Ancak görülebilir bariz bantlar oluşmuşsa ilgili tür için PCR koşullarının optimize edildiği düşünülmüştür.

3.2.6. DNA Dizi Analizi

2000 yılında insan genom projesinin tamamlanması ile hücresel aktiviteleri düzenleyen genom ayrıntılı olarak incelenmeye başlanmıştır. Son yıllarda; genom varyasyonları, genetik düzenleyici sistemlerin, kromatin ağ yapısının hakkında bilgi edinebilmenin yolu DNA dizileme yönteminin geçer hale gelmiştir (Üstek ve ark., 2011). DNA dizileme tekniği 1970'li yıllardan itibaren kullanılmakta olup, klonlanması planlanan gen bölgesinin nükleotid dizilimini ortaya çıkarmak amacıyla geliştirilmiştir (Brown, 2009). Bu işlem iki farklı biçimde gerçekleştirilebilir;

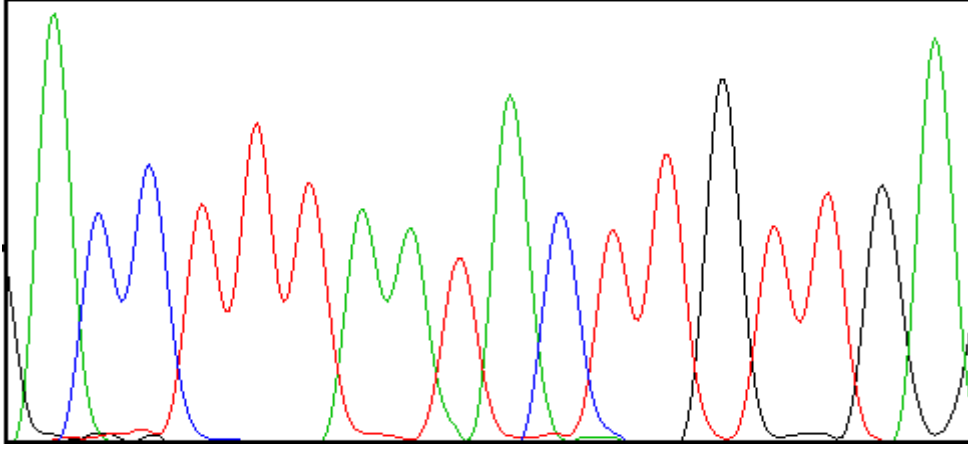
3.2.6.1. Maxam-Gilbert Metodu

Bu metod, DNA'nın kimyasala ayıraçlar vasıtasıyla kesilmesi esasına dayanmaktadır. Metodun uygulanması esnasında DNA'nın çift sarmal yapısının bozularak tek iplik oluşumuna gerek yoktur ve özellikle kısa DNA fragmentleri için kullanılır. Oldukça kolay uygulanabilir bir yöntem olmasına karşılık, işlem süresince kullanılan kimyasal maddelerin fazlasıyla toksik olması nedeniyle günümüzde pek tercih edilmemektedir (Dilsiz, 2004).

3.2.6.2. Sanger-Coulson Metodu

Zincir sonlandırma metodu olarak da bilinen teknik; DNA'nın tek ipliği ile çalışılması koşulunu gerektirir (Brown, 2009). Temel olarak; DNA zincirinin enzimlerce sentezi ve bu sentezin dideoksinükleotidtrifosfat kullanılarak istenilen bazlardan itibaren sonlandırılması ile karakterizedir. Bu işlem için, DNA çift sarmalını oluşturan iplikler sıcaklık uygulaması ile denatüre edilerek birbirinden uzaklaştırılır. Ardından ipliklerden biri M13 adı verilen vektöre klonlanır. Elde edilen rekombinant M13 molekülünden; DNA primeri, DNA polimeraz ve deoksinükleotidtrifosfatlarca her bir baz için reaksiyon başlatılır. Her bir deoksinükleotidtrifosfat kendine uygun nükleotit için iplikçiğin uzamasını durdurur (Dilsiz, 2004).

Bu işlem, çalışma kapsamındaki familyalardan Colubridae familyasına ait yarı zehirli yılan türlerinin örnekleri (*Malpolon monspessulanus* ve *Telescopus fallax*) ile Viperidae familyasının zehirli türlerine ait örnekler (*Macrovipera lebetina* ve *Montivipera xanthina*) ileri moleküler çalışmalara tabii tutulmuş ve DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR aşaması başarıyla gerçekleştirildikten sonra PCR ürünleri; saflaştırılma işlemleri yapılmadan 0,2 ml'lik PCR tüplerinde sekans analizi yapılmak üzere Ankara İntergen Genetik Merkezi'ne gönderilmiştir. Burada hem 16S rRNA, hem de Cytochrome B gen bölgeleri için çift yönlü okuma yapılmıştır. Gelen sonuçları değerlendirmek için DNA Sequence Analysis Software-Sequencher 5.0 programı kullanılmıştır. Aynı türe ait örneklerin, aynı gen bölgesine ait dizileri üst üste getirilerek birleştirilmiş; böylece aynı türe ait örneklerin her bir gen bölgesi için ortak bir dizi elde edilmiştir. Elde edilen diziler, aynı program dahilindeki kromatogramlar ile karşılaştırılarak dizilerin devamlılığı kontrol edilmiş, eksik bazların bulunduğu noktalara kromatogram kullanılarak müdahale edilmiştir. Bu işlem yapılırken kromatogramda yüksek pik veren baz esas alınmıştır.



Şekil 3: DNA dizi analizlerinin kromatografik örneği (Yeşil pik: Adenin, Mavi pik: Sitozin, Kırmızı pik: Timin, Siyah Pik: Guanin bazlarını temsil etmektedir).

Bazların doğruluğu kontrol edildikten sonra grafiklerin düzgün olmadığı kısımlar kesilerek kromatogram kapatılmıştır. Elde edilen diziler; NCBI veri tabanında BLAST işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemle, elde edilen diziler ile daha önce sisteme eklenen diziler karşılaştırılmış, aynı türlere ait gen bölgelerinin dizileri ile uyumlulukları kontrol edilmiştir.

BÖLÜM 4**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. DNA İzolasyonunun Fiksatif Bağı Sonuçları**

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan zooloji koleksiyonuna ait, çalışmada kullanılacak amfibi ve sürüngen örnekleri belirlenmiştir. Örnekler, toplandıkları yıllar ve lokaliteler göz önüne alınarak, fiksasyonlarında kullanılan tespit solüsyonlarına göre gruplandırılmıştır.

Takip eden süreçte öncelikli olarak doku alım işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir örneğin karaciğerinden, örneğin vücut büyüklüğü göz önüne alınarak 2-3 parça doku alınmıştır. Doku alımı gerçekleştirilen örneklerde kesi yapılan yerler düzgün bir biçimde kapatılarak tekrar alkol fiksatifine içerisinde bırakılmıştır. Türler için örnekler, fiksasyon koşulları baz alınarak DNA izolasyon protokolleri uygulanmıştır. Alkol ile fikse edilmiş örnekler rutin fenol-kloroform metodu uygulanırken, formaldehit ile fikse edilmiş örnekler literatürde belirtilen 6 farklı izolasyon metodu uygulanarak en uygun metod geliştirilmeye çalışılmıştır. Gerçekleştirilen DNA izolasyonları sonucunda elde edilen DNA örnekleri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve ardından %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Böylece örneklerin miktar ve boyutları belirlenmiştir.

4.1.1. Alkol ile Fikse Edilen Örneklerin İzolasyon Bulguları

Alkol ile fikse edilen örnekler Chomczynski ve Sacchi'nin 1987 yılına ait çalışmalarında geliştirdikleri fenol-kloroform metodu kullanılarak izolasyon yapılmıştır. Bu işlem sonrasında gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler Çizelge 6.'da sunulmuştur.

Çizelge 6. Alkol ile fikse edilmiş örneklerden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Doku Kodları	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
M.cauc TRB1 A-1/1	485	0,144	0,098	1,902	-32,3
M.cauc TRB1 A-1/2	475	0,044	-0,003	1,979	-5,588
M.cauc TRB1 A-2/1	2435	0,531	0,305	1,866	2,59
M.cauc TRB1 A-2/2	1045	0,23	0,137	1,802	3,125

M.cauc TRB1 A-3/1	355	0,046	0,011	1,972	-2,63
M.cauc TRB1 A-3/2	35	-0,034	-0,04	7	-0,109
Lyc lus. MUG 1 A-1/1	80	-0,023	-0,031	2	-2,286
Lyc lus. MUG 1 A-1/2	425	0,047	0,087	1,889	1,7
Lyc lus. MUG 1 A-2/1	135	0,017	-0,002	3,375	-0,794
Lyc lus. MUG 1 A-2/2	580	0,317	0,264	1,841	0,779
T.kareli ÇNK1 A-1/1	340	0,014	0,048	2	4,85
T.kareli ÇNK1 A-1/2	295	0,04	0,009	2,107	-0,922
T.kareli ÇNK1 A-2/1	610	0,23	0,177	1,768	4,357
T.kareli ÇNK1 A-2/2	30	-0,131	-0,128	0,667	-0,176
T.kareli ÇNK3 A-1/1	50	-0,102	-0,102	1	-0,526
T.kareli ÇNK3 A-1/2	685	0,205	0,146	1,756	4,029
Om.vit TRB1 A-1/1	1465	0,3	0,164	1,866	2,873
Om.vit TRB1 A-1/2	305	0,004	-0,024	1,848	2,3
Om.vit TRB1 A-2/1	1165	0,271	0,165	1,835	4,66
Om.vit TRB1 A-2/2	1470	0,368	0,238	1,793	1,861
Om.vit TRB1 A-3/1	1370	0,332	0,209	1,815	3,114
Om.vit TRB1 A-3/2	1135	0,276	0,165	1,957	2,768
Lis vul ÇNK 1 A-1/1	30	-0,118	-0,116	0,75	-0,146
Lis vul ÇNK 1 A-1/2	10	-0,174	-0,177	-2	-0,067
Bufo ÇNK 1 A-1/1	90	-0,135	-0,145	2,25	-18
Bufo ÇNK 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.vir ÇNK 1 A-1/1	70	-0,081	-0,088	2	-0,778
P.vir ÇNK 1 A-1/2	1120	0,207	0,096	1,982	4,148
P.vir ÇNK 6 A-1/1	80	-0,024	-0,032	2	-0,593
P.vir ÇNK 6 A-1/2	85	0,007	0,004	1,214	-2,429
Hyla ÇNK 1 A-1/1	1165	0,267	0,16	1,849	2,709
Hyla ÇNK 1 A-1/2	1370	0,243	0,111	1,93	3,753
Pel.syr ÇNK 1 A-1/1	1565	0,264	0,115	1,909	4,672
Pel.syr ÇNK 1 A-1/2	1850	0,362	0,186	1,907	2,782

Pel.syr ÇNK 1 A-2/1	605	0,116	0,052	2,123	2,881
Pel.syr ÇNK 1 A-2/2	535	0,087	0,032	2,058	-1,07
R.dal ÇNK 2 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
R.dal ÇNK 2 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
R.dal ÇNK 2 A-2/1	185	0,065	0,047	1,947	-0,804
R.dal ÇNK 2 A-2/2	520	0,12	0,069	1,962	-3,25
R.macro KNY A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
R.macro KNY A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
R.macro TRB 1 A-1/1	80	-0,023	-0,031	2	-2,286
R.macro TRB 1 A-1/2	635	0,143	0,084	1,868	25,4
P.rid ÇNK 1 A-1/1	1980	0,423	0,251	1,768	2,152
P.rid ÇNK 1 A-1/2	2160	0,481	0,261	2,038	2,067
P.rid ÇNK 6 A-1/1	475	0,086	0,037	2,065	5
P.rid ÇNK 6 A-1/2	245	-0,001	0,029	2,33	-0,628
L.stell MRS 1 A-1/1	-15	-0,141	-0,139	3	0,094
L.stell MRS 1 A-1/2	-80	-0,249	-0,24	2,286	0,286
L.stell HTY A-1/1	840	0,036	-0,047	1,976	4,2
L.stell HTY A-1/2	540	0,314	0,364	1,862	3,6
L.stell SNP A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
L.stell SNP A-1/2	55	-0,183	-0,185	1,222	-0,524
P.pers IDR A-1/1	455	0,056	0,005	2,275	-1,685
P.pers IDR A-1/2	500	0,172	0,127	1,818	7,692
P.pers IDR A-2/1	125	0,029	0,015	2,273	-1
P.pers IDR A-2/2	105	0,029	0,017	2,3	7
P.pers IDR A-3/1	100	0,015	0	4	-1,33
P.pers IDR A-3/2	135	0,024	0,012	1,8	-3
A.elis URF A-1/1	30	-0,263	-0,265	1,5	0
A.elis URF A-1/2	35	-0,215	-0,216	1,167	-0,33
A.elis URF A-2/1	40	0,01	0,006	2	-0,087
A.elis URF A-2/2	110	0	-0,015	3	-1,6

A.elis URF A-3/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
A.elis URF A-3/2	-50	-0,147	-0,142	1,25	0,238
D.val BYB A-1/1	825	0,14	0,064	1,854	8,25
D.val BYB A-1/2	1065	0,196	0,098	1,852	3,179
D.val RİZ A-1/1	-40	-0,064	-0,068	0,692	0,11
D.val RİZ A-1/2	-50	-	-	-	-
D.val SNP A-1/1	1135	0,263	0,2	1,694	1,908
D.val SNP A-1/2	235	0,1	0,079	1,808	-23,5
E.stra IDR A-1/1	45	0,241	-0,243	0,818	0,333
E.stra IDR A-1/2	135	0,024	0,012	1,8	-3
E.stra IDR A-2/1	995	0,195	0,106	1,809	4,234
E.stra IDR A-2/2	385	0,037	0	1,925	-2,08
E.stra IDR A-3/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
E.stra IDR A-3/2	235	0,036	0,016	1,741	11,7
A.danf MUG 2 A-1/1	90	0,273	0,267	1,5	0
A.danf MUG 2 A-1/2	475	0,044	-0,003	1,979	-5,58
A. danf KNY A-1/1	1925	0,503	0,331	1,808	2,163
A. danf KNY A-1/2	50	-0,102	-0,102	1	-0,526
L.laev MRS 1 A-1/1	30	-0,118	-0,116	0,75	-0,146
L.laev MRS 1 A-1/2	90	-0,135	-0,145	2,25	-18
L.laev HTY A-1/1	185	0,065	0,047	1,947	-0,804
L.laev HTY A-1/2	10	-0,174	-0,177	-2	-0,067
L.laev HTY A-2/1	354	0,099	0,036	1,829	2,138
L.laev HTY A-2/2	405	0,117	0,046	1,807	2,038
A.cappa ATP A-1/1	35	0,046	0,01	1,972	-2,63
A.cappa ATP A-1/2	510	0,168	0,12	1,889	-3
A.cappa HTY A-1/1	520	0,12	0,069	1,962	-3,25
A.cappa HTY A-1/2	136	0,024	0,012	1,8	-3
A.cappa HTY A-2/1	20	-0,205	-0,203	0,667	-0,167
A.cappa HTY A-2/2	-75	-0,155	-0,15	1,5	0,294

L.vir ÇNK 1 A-1/1	15	-0,03	-0,033	-0,55	-0,05
L.vir ÇNK 1 A-1/2	45	0,244	0,235	0,988	0,344
L.vir ÇNK 3 A-1/1	70	0,013	0,017	1,41	0,35
L.vir ÇNK 3 A-1/2	-80	0,249	0,24	2,286	0,286
L.vir ÇNK 3 A-2/1	540	0,314	0,264	1,862	3,6
L.vir ÇNK 3 A-2/2	430	0,075	0,034	1,911	2,966
P.parva AFY 1 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.parva AFY 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.parva BOL 1 A-1/1	130	0,02	0,009	1,733	-3,174
P.parva BOL 1 A-1/2	100	0,01	0	2	-10
P.mura ÇNK 1 A-1/1	185	0,071	0,048	2,643	9,25
P.mura ÇNK 1 A-1/2	250	0,055	0,026	2,381	12,5
P.taur ÇNK 2 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.taur ÇNK 2 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.taur ÇNK 3 A-1/1	2940	0,638	0,371	1,832	2
P.taur ÇNK 3 A-1/2	1970	0,442	0,259	1,867	2,962
T.aura ÇNK 1 A-1/1	1213	0,617	0,401	1,803	2,137
T.aura ÇNK 1 A-1/2	985	0,249	0,152	1,97	4,69
Eryx ÇNK 1 A-1/1	-70	0,012	0,016	1,4	0,35
Eryx ÇNK 1 A-1/2	-45	0,042	0,051	0,818	0,243
Eryx ÇNK 1 A-1/3	5	-0,02	-0,023	-0,5	-0,05
Eryx ÇNK5 A-1/1	-40	0,008	0,002	0,571	0,258
Eryx ÇNK5 A-1/2	-40	0	-0,001	0,889	0,308
Eryx ÇNK5 A-1/3	-50	0,024	0,027	1,429	0,37
Eryx IDR 1 A-1/1	210	0,027	0,008	1,826	42
Eryx IDR 1 A-1/2	305	0,04	0,024	1,848	20,3
Eryx IDR 1 A-1/3	85	0,007	0,04	1,214	-2,429
Eryx ADN A-1/1	80	-0,024	-0,032	2	-0,593
Eryx ADN A-1/2	-45	-0,149	-0,144	2,25	0,196
Eryx ADN A-1/3	10	-0,174	-0,177	-2	-0,067

Casp. ÇNK 1 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp. ÇNK 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp. ÇNK 1 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp. ÇNK 1 A-2/1	70	0,012	0,016	1,4	0,35
Casp. ÇNK 1 A-2/2	5	0,02	0,023	0,5	0,05
Casp. ÇNK 1 A-2/3	385	0,037	0	1,925	-2,08
Casp. ÇNK 1 A-3/1	485	0,144	0,098	1,902	-32,3
Casp. ÇNK 1 A-3/2	582	0,322	0,267	1,844	0,797
Casp. ÇNK 1 A-3/3	85	0,007	0,004	1,214	2,429
Casp ÇNK 3 A-1/1	50	0,024	0,027	1,429	0,37
Casp ÇNK 3 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 3 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 4 A-1/1	20	-0,019	-0,03	0,571	-0,111
Casp ÇNK 4 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 4 A-1/3	40	-0,064	-0,068	0,692	0,11
Casp ÇNK 4 A-2/1	485	0,14	0,098	1,902	-3,23
Casp ÇNK 4 A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 4 A-2/3	1310	0,244	0,126	1,819	7,936
Casp ÇNK 5 A-1/1	610	0,23	0,177	1,798	4,36
Casp ÇNK 5 A-1/2	585	0,117	0,992	1,48	0,67
Casp ÇNK 5 A-1/3	940	0,168	0,082	1,843	9,895
Casp ÇNK 5 A-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 5 A-2/2	10	-0,242	-0,246	-1	-0,044
Casp ÇNK 5 A-2/3	580	0,318	0,264	1,841	0,788
Casp ÇNK 6 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 6 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ÇNK 6 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ERZ A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ERZ A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Casp ERZ A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-

Naj. ÇNK 1 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj. ÇNK 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj. ÇNK 1 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj. ÇNK 1 A-2/1	856	0,171	0,09	1,88	1,68
Naj. ÇNK 1 A-2/2	14	0,248	0,237	1,647	0,418
Naj. ÇNK 1 A-2/3	50	0,282	0,274	5	0
Naj AFY 2 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj AFY 2 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj AFY 2 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj AFY 2 A-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj AFY 2 A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj AFY 2 A-2/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj KNY A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj KNY A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Naj KNY A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
D.jug MUG 1 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
D.jug MUG 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
D.jug MUG 1 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
D.jug MUG 2 A-1/1	-40	0,08	0,002	0,571	0,258
D.jug MUG 2 A-1/2	-50	0,024	0,027	1,429	0,37
D.jug MUG 2 A-1/3	50	0,147	0,145	1,25	0,238
D.jug MUG 2 A-2/1	-70	0,012	0,016	1,4	0,35
D.jug MUG 2 A-2/2	10	-	-	-2	0,6
D.jug MUG 2 A-2/3	-45	0,042	0,051	0,818	0,243
H.num KNY A-1/1	35	0,215	0,216	1,167	0,333
H.num KNY A-1/2	70	0,081	0,088	2	0,778
H.num KNY A-1/3	45	0,241	0,243	0,818	0,333
H.num AFY 2 A-1/1	227	0,04	0,03	1,18	0,51
H.num AFY 2 A-1/2	1150	0,223	0,116	1,87	3,77
H.num AFY 2 A-1/3	1985	0,401	0,211	1,918	2,545

P.col ÇNK 1 A-1/1	610	0,23	0,177	1,768	4,357
P.col ÇNK 1 A-1/2	686	0,206	0,148	1,757	4,029
P.col ÇNK 1 A-1/3	1370	0,332	0,209	1,815	3,114
P.col KRK1 A-1/1	-45	-0,241	-0,243	0,818	0,333
P.col KRK1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.col KRK1 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.col MUG 1 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.col MUG 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
C.aus TRB1 A-1/1	475	0,044	0,003	1,797	-5,558
C.aus TRB1 A-1/2	825	0,14	0,065	1,864	8,32
C.aus TRB1 A-1/3	385	0,037	0,002	1,926	-2,06
E.mod ÇNK 1 A-1/1	275	1,546	1,532	1,341	2,5
E.mod ÇNK 1 A-1/2	295	1,529	1,516	1,283	3,05
E.mod ÇNK 1 A-1/3	270	1,517	1,55	1,35	7,714
E.mod EZC A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
E.mod EZC A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
E.mod EZC A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 A-1/1	70	-0,081	-0,088	2	-0,778
Malp. ÇNK 1 A-1/2	-45	-0,241	-0,243	0,818	0,333
Malp. ÇNK 1 A-1/3	90	-0,135	-0,145	2,25	-18
Malp. ÇNK 4 A-1/1	1085	0,093	-0,015	1,99	2,89
Malp. ÇNK 4 A-1/2	470	-0,117	-0,163	1,958	-11,7
Malp. ÇNK 4 A-1/3	840	0,036	-0,047	1,976	4,2
Malp. ÇNK 4 A-2/1	340	-0,014	-0,048	2	4,85
Malp. ÇNK 4 A-2/2	395	-0,119	-0,158	1,975	-39,5
Malp. ÇNK 4 A-2/3	250	-0,11	-0,139	2,381	-1,35
Malp. ÇNK5 A-1/1	30	-0,131	0,128	1,667	-0,176
Malp. ÇNK5 A-1/2	50	-0,102	-0,102	1	-0,526
Malp. ÇNK5 A-1/3	30	-0,118	-0,116	0,75	-0,146
Malp. ÇNK6 A-1/1	310	-0,168	-0,201	2,138	-3,647

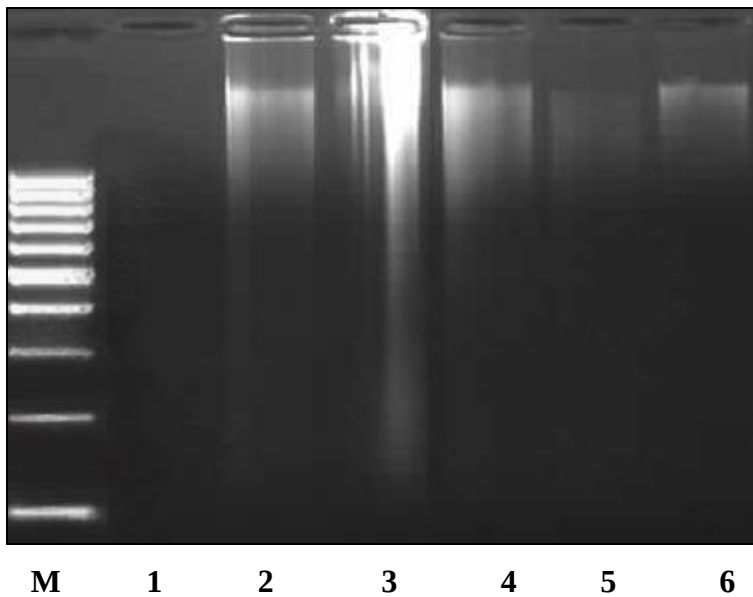
Malp. ÇNK6 A-1/2	425	-0,047	-0,087	1,889	17
Malp. ÇNK6 A-1/3	410	0,081	0,124	2,103	5,857
Malp. MUG2 A-1/1	-75	-0,155	-0,15	1,5	0,294
Malp. MUG2 A-1/2	-30	-0,257	-0,254	2	0,171
Malp. MUG2 A-1/3	-110	-,0194	-0,181	2,444	0,333
Malp. AFY2 A-1/1	-140	-0,248	-0,237	1,647	0,418
Malp. AFY2 A-1/2	-50	-0,282	-0,274	5	-
Malp. AFY2 A-1/3	-50	-0,147	-0,145	1,25	0,238
Malp. IDR2 A-1/1	35	-0,215	-0,216	1,167	-0,333
Malp. IDR2 A-1/2	-90	-0,273	-0,267	1,5	-
Malp. IDR2 A-2/1	10	-0,24	-0,243	-2	-0,083
Malp. IDR2 A-3/1	540	0,314	0,264	1,862	0
Malp. IDR2 A-3/2	995	0,195	0,106	1,809	4,234
Natrix ÇNK 1 A-1/1	1470	0,368	0,238	1,793	1,861
Natrix ÇNK 1 A-1/2	1565	0,264	0,115	1,909	4,672
Natrix ÇNK 1 A-1/3	1970	0,442	0,259	1,867	2,962
Natrix ÇNK 4 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 4 A-1/2	10	0,24	0,243	2	0,083
Natrix ÇNK 4 A-1/3	1530	0,379	0,23	1,913	3,187
Natrix ÇNK 4 A-2/1	1215	0,249	0,132	1,929	2,359
Natrix ÇNK 4 A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 4 A-2/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 4 A-3/1	765	0,154	0,074	2,013	3,923
Natrix ÇNK 4 A-3/2	1840	0,368	0,192	1,917	2,746
Natrix ÇNK 6 A-1/1	90	0,273	0,267	1,5	0
Natrix ÇNK 6 A-1/2	15	0,048	0,049	1,5	0,273
Natrix ÇNK 6 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 6 A-2/1	680	0,13	0,066	1,889	-5,44
Natrix ÇNK 6 A-2/2	2295	0,459	0,237	1,937	3,825
Natrix ÇNK 6 A-2/3	55	0,003	0,003	2,2	1

Natrix ÇNK 6 A-3/1	40	0,064	-0,068	0,692	0,11
Natrix ÇNK 6 A-3/2	1620	0,387	0,238	1,851	3,057
Natrix ÇNK 6 A-3/3	720	0,159	0,091	1,895	-12
Natrix AFY 1 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-2/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-3/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix AFY 1 A-3/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix KNY A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix SNP A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix SNP A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ÇNK 3 A-1/1	1320	0,235	0,11	1,83	3,752
N.tes ÇNK 3 A-1/2	1130	0,276	0,166	1,857	2,767
N.tes ÇNK 3 A-1/3	1165	0,272	0,165	1,835	4,66
N.tes ÇNK 3 A-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ÇNK 3 A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ÇNK 3 A-2/3	70	0,012	0,016	1,4	0,35
N.tes ÇNK 4 A-1/1	395	0,119	0,158	1,975	39,5
N.tes ÇNK 4 A-1/2	475	0,127	0,167	1,858	12,7
N.tes ÇNK 4 A-1/3	425	0,047	0,087	1,883	17
N.tes ÇNK 4 A-2/1	10	-	-	-3	0
N.tes ÇNK 4 A-2/2	10	0,25	0,253	2,1	0,086
N.tes ÇNK 4 A-2/3	100	0,01	0	2	-10
N.tes ÇNK 4 A-3/2	485	0,037	0,015	2,106	2,357
N.tes ÇNK 4 A-3/3	435	0,051	0,006	2,112	4,579
N.tes MUG 1 A-1/3	20	-0,249	-0,24	2,286	0,286
N.tes MUG 2 A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-

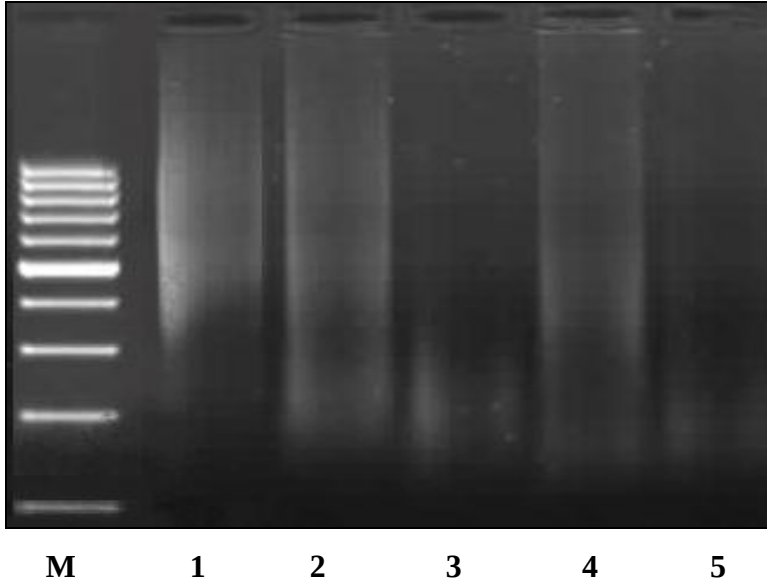
N.tes MUG 2 A-1/2	75	0,155	-0,15	1,5	0,298
N.tes MUG 2 A-1/3	432	0,063	0,022	1,77	3,185
N.tes ADI A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ADI A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ADI A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes KNY A-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes KNY A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes KNY A-1/3	40	0,01	0,006	2	0,381
N.tes ADA A-1/1	80	0,031	0,043	4	1,067
N.tes ADA A-1/2	20	0,205	0,203	0,667	0,167
N.tes ADA A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ADA A-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ADA A-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ADA A-2/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK1 A-1/1	10	-0,036	-0,039	-2	-0,087
Telesc. ÇNK1 A-1/2	40	0,01	0,006	2	-0,381
Telesc. ÇNK1 A-1/3	80	-0,031	-0,043	4	-1,067
Telesc. ÇNK1 A-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK1 A-2/2	105	0	-0,014	3	-1,5
Telesc. ÇNK1 A-2/3	85	0,006	0	0,545	-1,214
Telesc. ÇNK1 A-3/1	125	0,029	0,015	2,273	-1
Telesc. ÇNK1 A-3/2	80	-0,023	-0,031	2	-2,286
Telesc. ÇNK1 A-3/3	85	0,046	0,035	2,833	-1,889
Telesc. MUG 1 A-1/1	10	-0,212	-0,211	0,667	-0,095
Telesc. MUG 1 A-1/2	-15	-0,141	-0,139	3	0,094
Telesc. MUG 1 A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc MUG 2 A-1/1	-80	-0,249	-0,24	2,286	0,286
Telesc MUG 2 A-1/2	20	-0,205	-0,203	0,667	-0,167
Telesc MUG 2 A-1/3	55	-0,183	-0,185	1,222	-0,524
Telesc. TKT A-1/1	100	0,242	0,246	1	0,044

Telesc. TKT A-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. TKT A-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Macro ADI A-1/1	250	0,055	0,026	2,381	12,5
Macro ADI A-1/2	430	0,075	0,034	1,911	2,966
Macro ADI A-1/3	435	0,051	0,005	2,122	4,579
M.x ÇNK1 A-1/1	275	1,546	1,532	1,341	2,5
M.x ÇNK1 A-1/2	295	1,529	1,516	1,283	3,105
M.x ÇNK1 A-1/3	270	1,517	1,5	1,35	7,714
M.x ÇNK1 A-2/1	105	0,029	0,017	2,33	7
M.x ÇNK1 A-2/2	15	0,048	-0,049	1,5	-0,273
M.x ÇNK1 A-2/3	55	0,003	-0,003	2,2	-1
M.x AFY 2 A-1/3	135	0,024	0,012	1,8	3
M.x AFY 2 A-2/2	575	0,081	0,023	2,081	2,5
M.x AFY 2 A-3/1	130	0,02	0,009	1,733	-3,714
M.x AFY 2 A-3/2	100	0,01	0	2	-10
M.x AFY 2 A-3/3	235	0,036	0,016	1,741	11,7

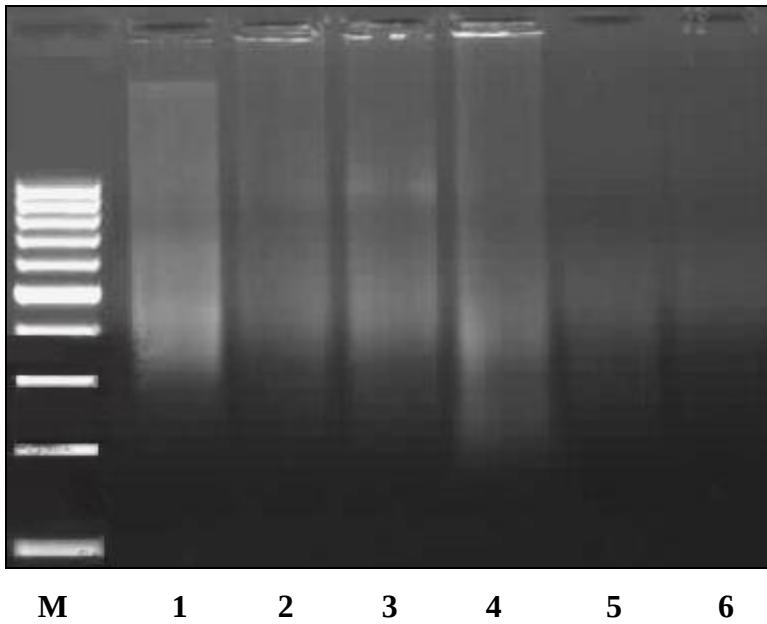
DNA miktarları sayısal olarak ölçüldükten sonra %1'lik agaroz jel hazırlanarak örnekler elektroforetik olarak da ölçülmüştür. Elektroforez görüntüleri aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4. Alkolle fikse edilmiş *Mertensiella caucasica* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: M. cauc TRB 1 A-1/1, 2: M. cauc TRB 1 A-1/2, 3: M. cauc TRB 1 A-2/1, 4: M. cauc TRB 1 A-2/2, 5: M. cauc TRB 1 A-3/1, 6: M. cauc TRB 1 A-3/1, M: 100 bp marker).

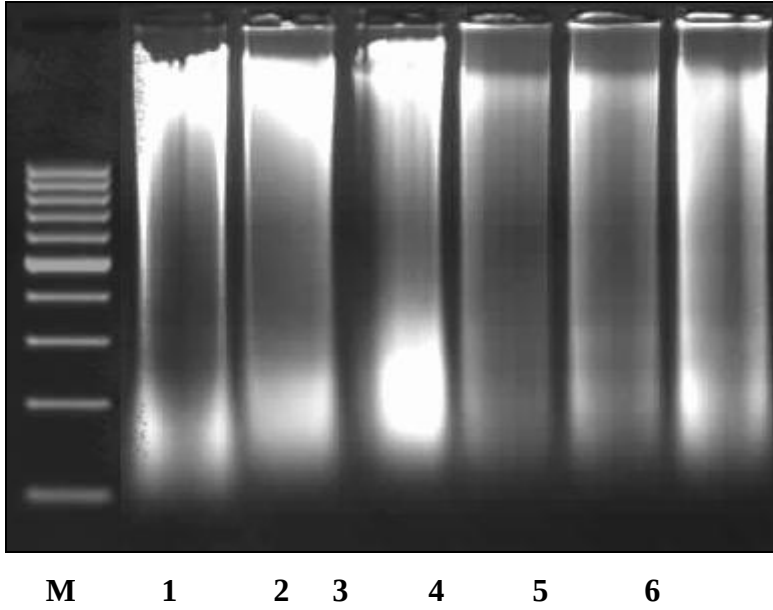


Şekil 5. Alkolle fikse edilmiş *Lyciasalamandra luschani* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Lyc lus. MUG 1 A-1/1, 2: Lyc lus. MUG 1 A-1/2, 3: Lyc lus. MUG 1 A-2/1, 4: Lyc lus. MUG 1 A-2/2, 5: Lyc lus. MUG 1 A-3/1, M: 100 bp marker).

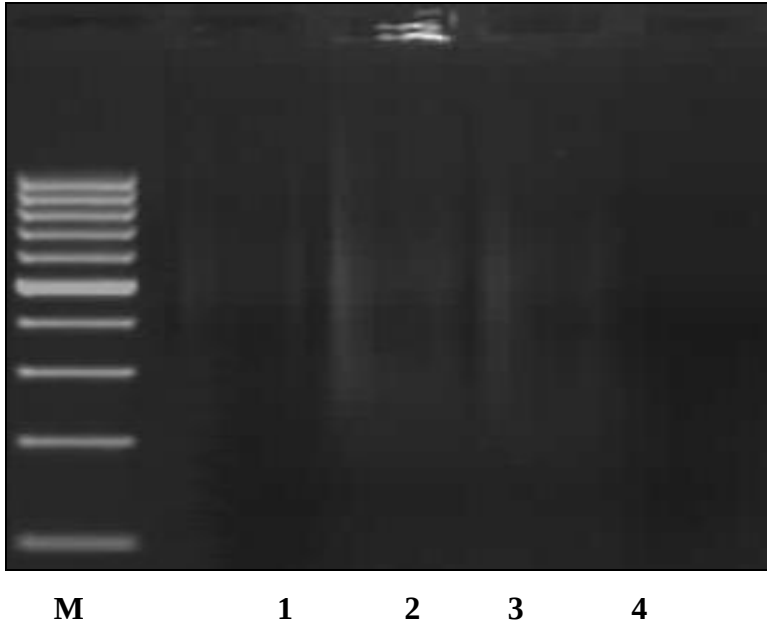


Şekil 6. Alkolle fikse edilmiş *Triturus karelinii* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: T. kareli ÇNK 1 A-1/1, 2: T. kareli ÇNK 1 A-1/2, 3: T. kareli ÇNK 1 A-2/1, 4: T.

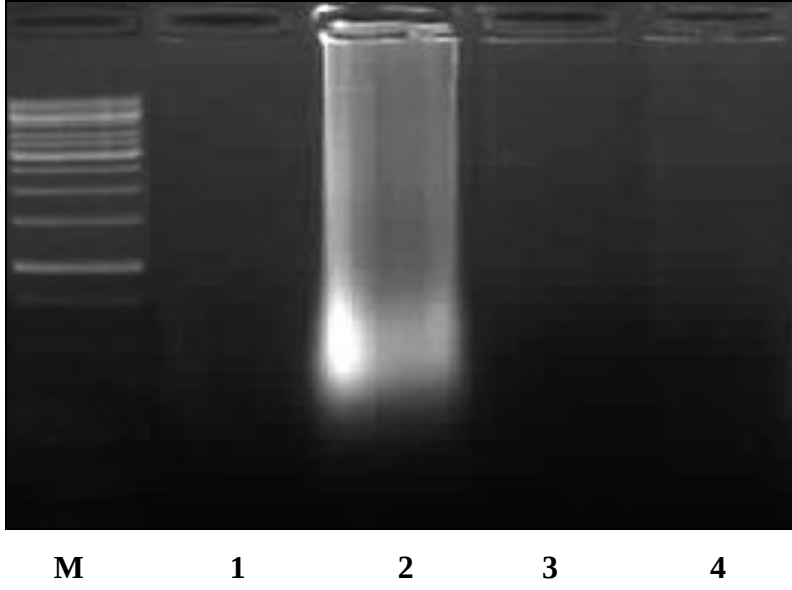
kareli ÇNK 1 A-2/2, 5: T. kareli ÇNK 3 A-1/1, 6: T. kareli ÇNK 3 A-1/2, M: 100 bç marker).



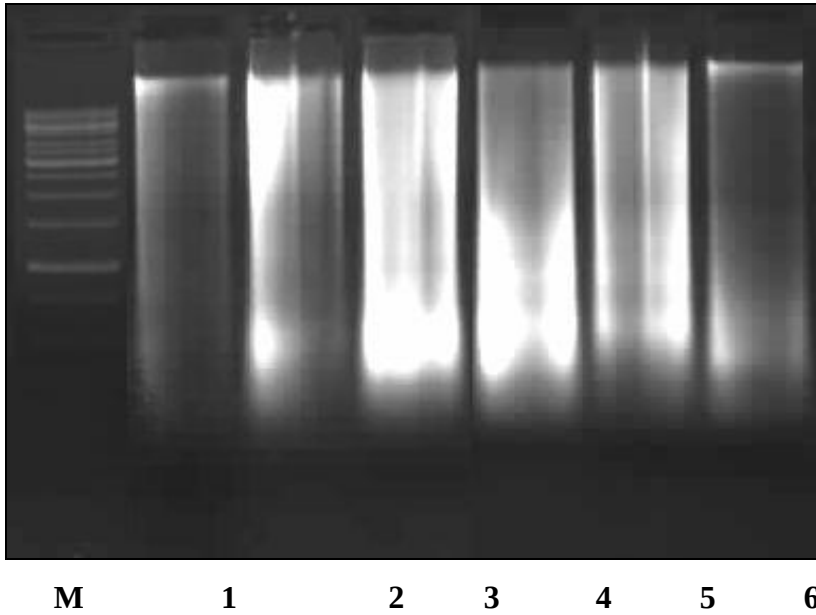
Şekil 7. Alkolle fikse edilmiş *Ommatotriton vittatus* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Om. vit TRB1 A-1/1, 2: Om. vit TRB1 A-1/2, 3: Om. vit TRB1 A-2/1, 4: Om. vit TRB1 A-2/2, 5: Om. vit TRB1 A-3/1, 6: Om. vit TRB1 A-3/2, M: 100 bç marker).



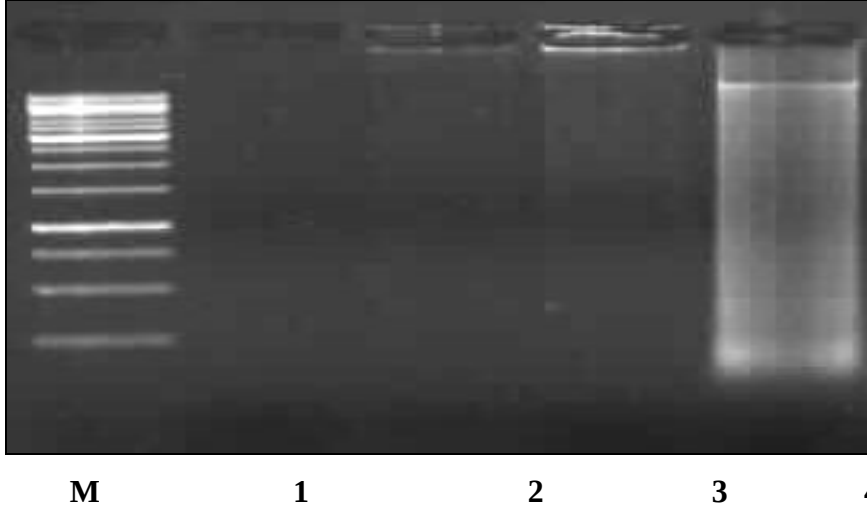
Şekil 8. Alkolle fikse edilmiş *Lissotriton vulgaris* ve *Bufo bufo* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Lis vul ÇNK 1 A-1/1, 2: Lis vul ÇNK 1 A-1/2, 3: Bufo ÇNK 1 A-1/1, 4: Bufo ÇNK 1 A-1/2, M: 100 bç marker).



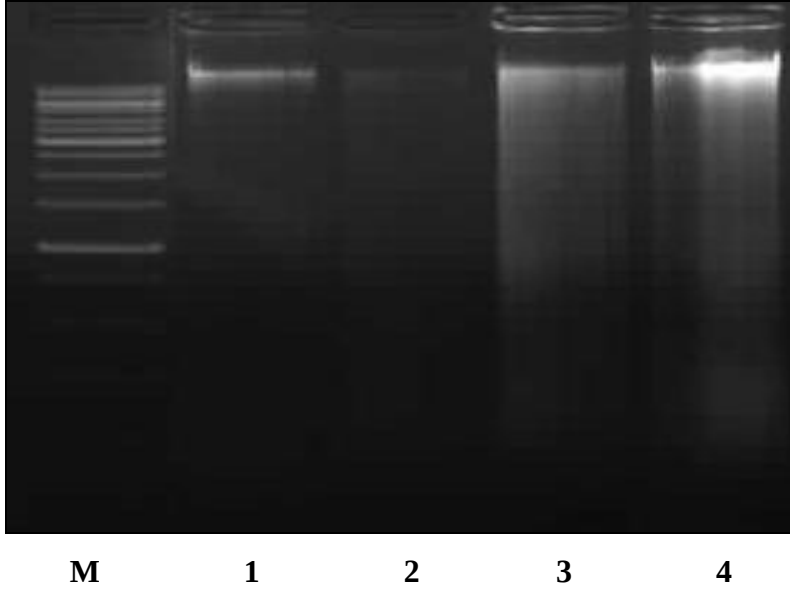
Şekil 9. Alkolle fikse edilmiş *Pseudepidalea viridis* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Pel syr ÇNK 1 A-1/1, 2: Pel syr ÇNK 1 A-1/2, 3: Pel syr ÇNK 6 A-1/1, 4: Pel syr ÇNK 6 A-1/2, M: 100 bç marker).



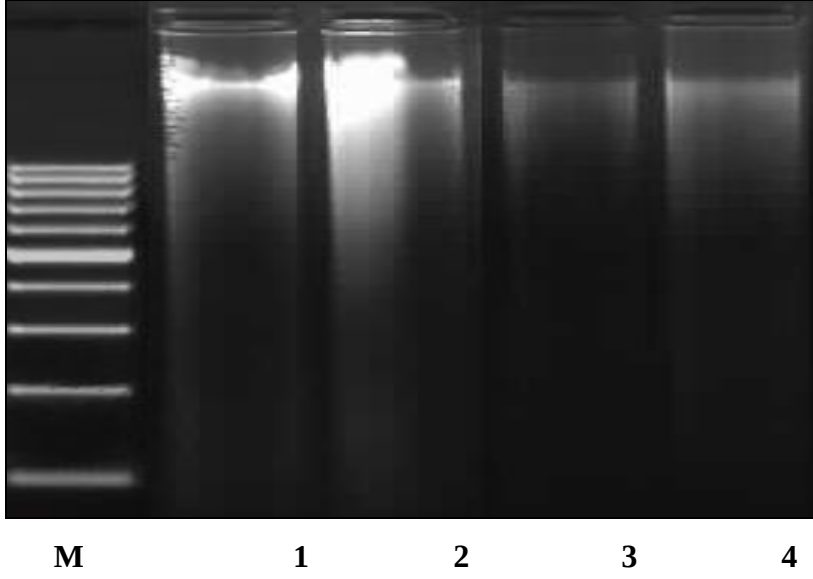
Şekil 10. Alkolle fikse edilmiş *Hyla arborea* ve *Pelobates syriacus* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Hyla ÇNK1 A-1/1, 2: Hyla ÇNK1 A-1/2, 3: Pel syr ÇNK 1 A-1/1, 4: Pel syr ÇNK 1 A-1/2, 5: Pel syr ÇNK 1 A-2/1, 6: Pel syr ÇNK 1 A-2/2, M: 100 bp marker).



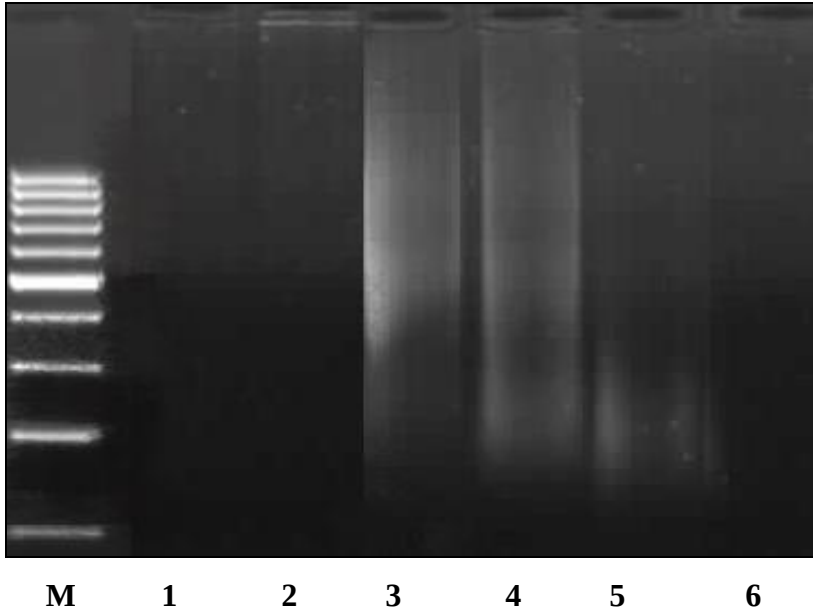
Şekil 11. Alkolle fikse edilmiş *Rana dalmatina* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: R.dal ÇNK 2 A-1/1, 2: R.dal ÇNK 2 A-1/2, 3: R.dal ÇNK 2 A-2/1, 4: R.dal ÇNK 2 A-2/2, M: 100 bç marker).



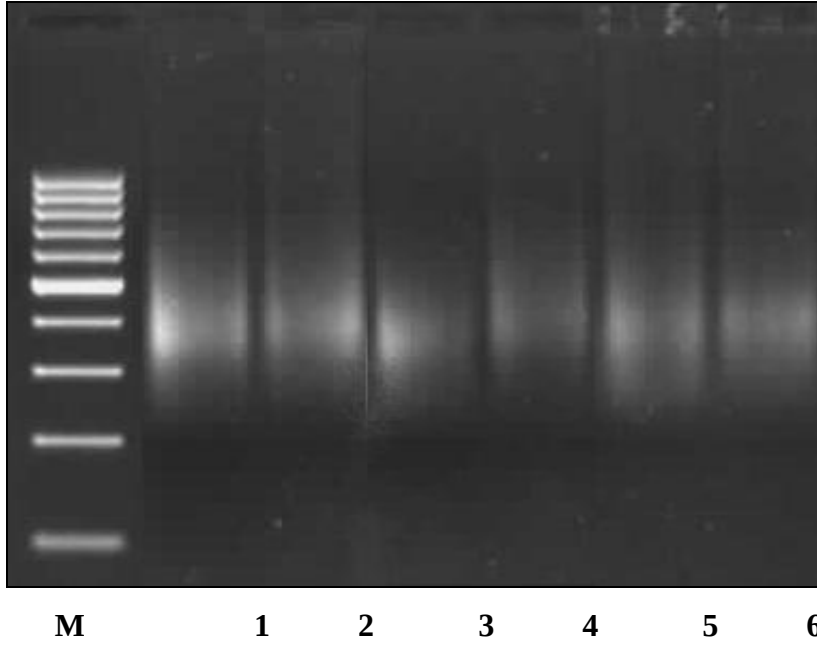
Şekil 12. Alkolle fikse edilmiş *Rana macrocnemis* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: R.macro KNY A-1/1, 2: R.macro KNY A-1/2, 3: R.macro TRB 1 A-1/1, 4: R.macro TRB 1 A-1/2, M: 100 bç marker).



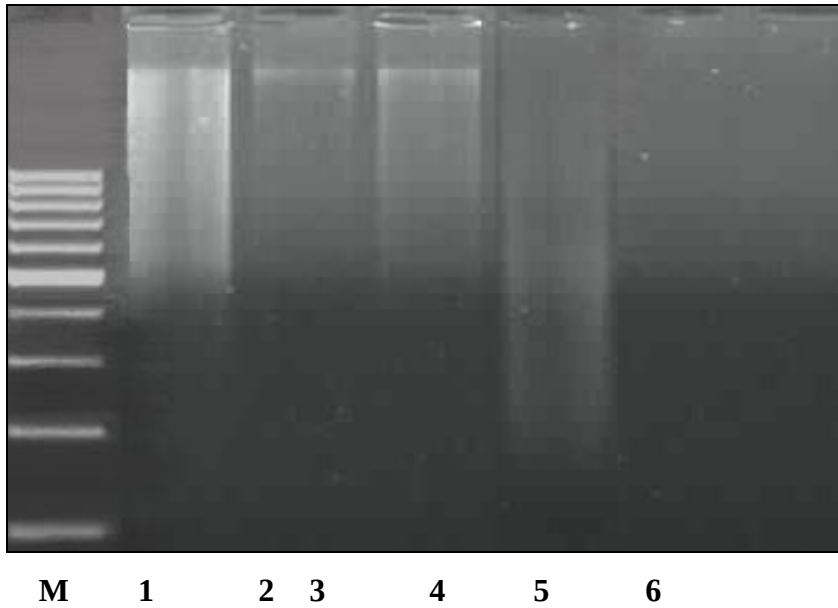
Şekil 13. Alkolle fikse edilmiş *Pelophylax ridibundus* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: P. rid ÇNK 1 A-1/1, 2: P. rid ÇNK 1 A-1/2, 3: P. rid ÇNK 6 A-1/1, 4: P. rid ÇNK 6 A-1/2, M: 100 bç marker).



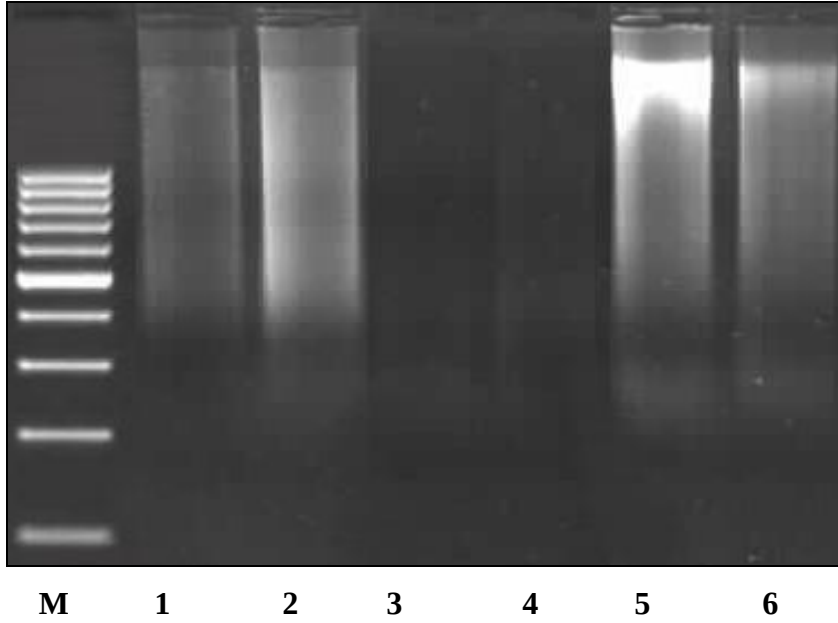
Şekil 14. Alkolle fikse edilmiş *Laudakia stellio* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: L. stell MRS 1 A-1/1, 2: L. stell MRS 1 A-1/2, 3: L. stell HTY 1 A-1/1, 4: L. stell HTY 1 A-1/2, 5: L. stell SNP A-1/1, 6: L. stell SNP A-1/2, M: 100 bç marker).



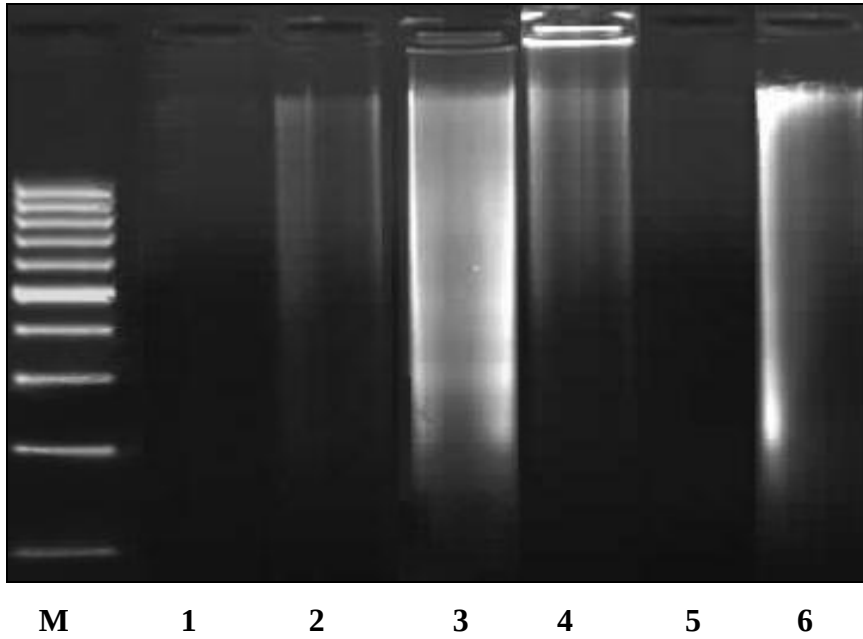
Şekil 15. Alkolle fikse edilmiş *Phrynocephalus persicus* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: P. pers IDR A-1/1, 2: P. pers IDR A-1/2, 3: P. pers IDR A-2/1, 4: P. pers IDR A-2/2, 5: P. pers IDR A-3/1, 6: P. pers IDR A-3/2, M: 100 bç marker).



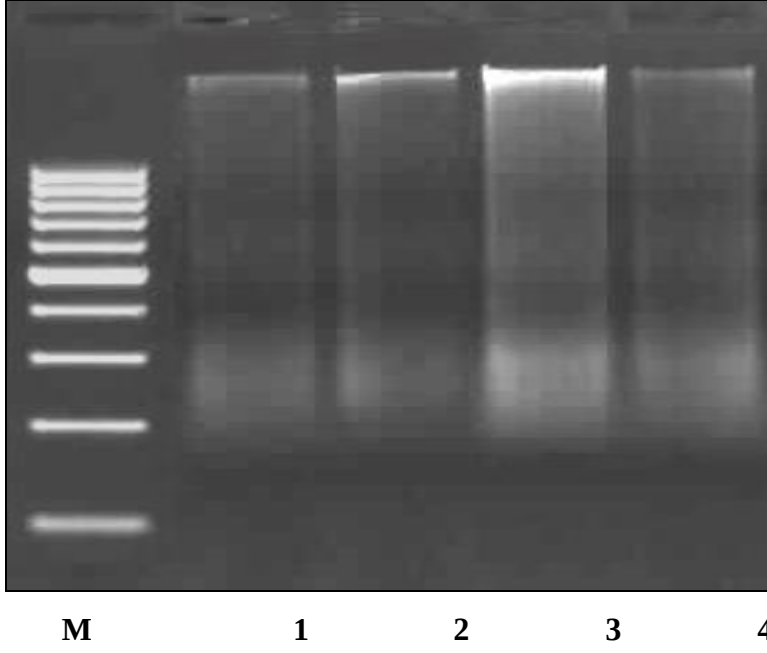
Şekil 16. Alkolle fikse edilmiş *Asaccus elisae* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: A. elis URF A-1/1, 2: A. elis URF A-1/2, 3: A. elis URF A-2/1, 4: A. elis URF A-2/2, 5: A. elis URF A-3/1, 6: A. elis URF A-3/2, M: 100 bç marker).



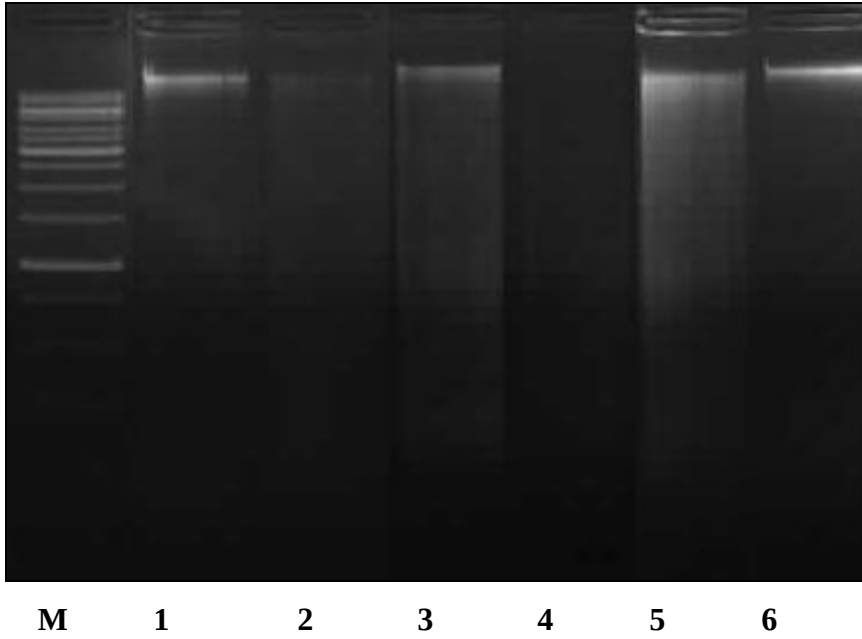
Şekil 17. Alkolle fikse edilmiş *Darevskia valentini* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: D. val BYB A-1/1, 2: D. val BYB A-1/2, 3: D. val RİZ A-1/1, 4: D. val RİZ A-1/2, 5: D. val SNP A-1/1, 6: D. val SNP A-1/2, M: 100 bç marker).



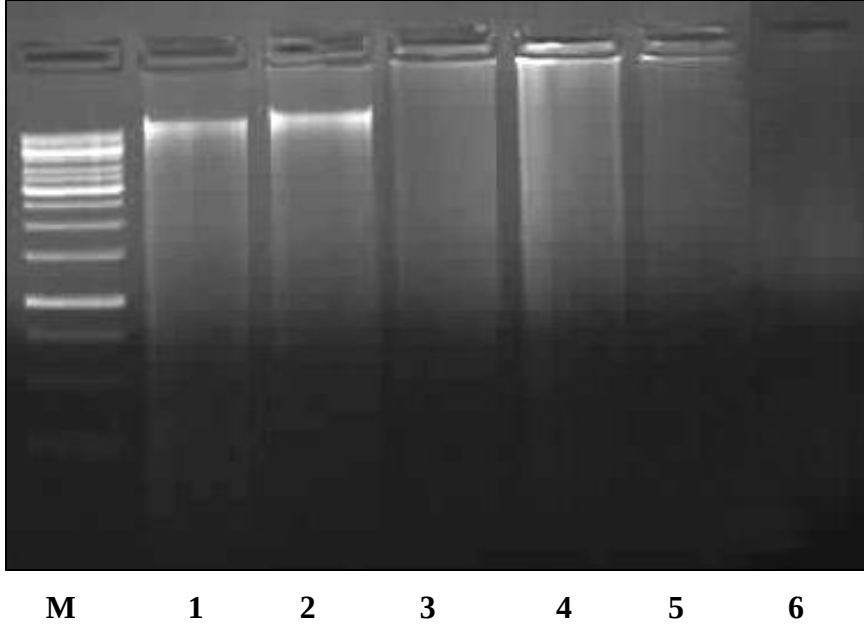
Şekil 18. Alkolle fikse edilmiş *Eremias strauchi* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: E.stra IDR A-1/1, 2: E.stra IDR A-1/2, 3: E.stra IDR A-2/1, 4: E.stra IDR A-2/2, 5: E.stra IDR A-3/1, 6: E.stra IDR A-3/2, M: 100 bç marker).



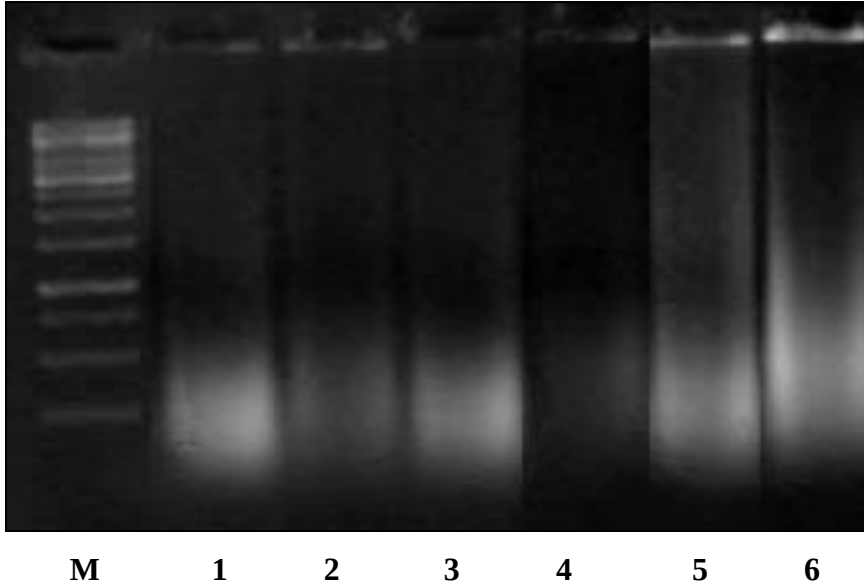
Şekil 19. Alkolle fikse edilmiş *Anatololacerta danfordi* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: L.danf MUG 2 A-1/1, 2: L.danf MUG 2 A-1/2, 3: L.danf KNY A-1/1, 4: L.danf KNY A-1/2, M: 100 bç marker).



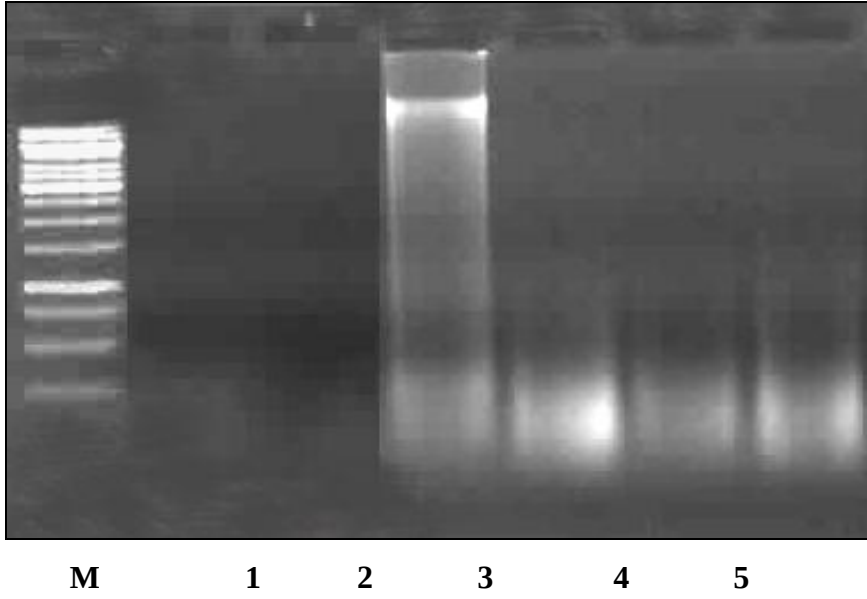
Şekil 20. Alkolle fikse edilmiş *Lacerta laevis* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: L.laev MRS 1 A-1/1, 2: L.laev MRS 1 A-1/2, 3: L.laev HTY A-1/1, 4: L.laev HTY A-1/2, 5: L.laev HTY A-2/1, 6: L.laev HTY A-2/2, M: 100 bç marker).



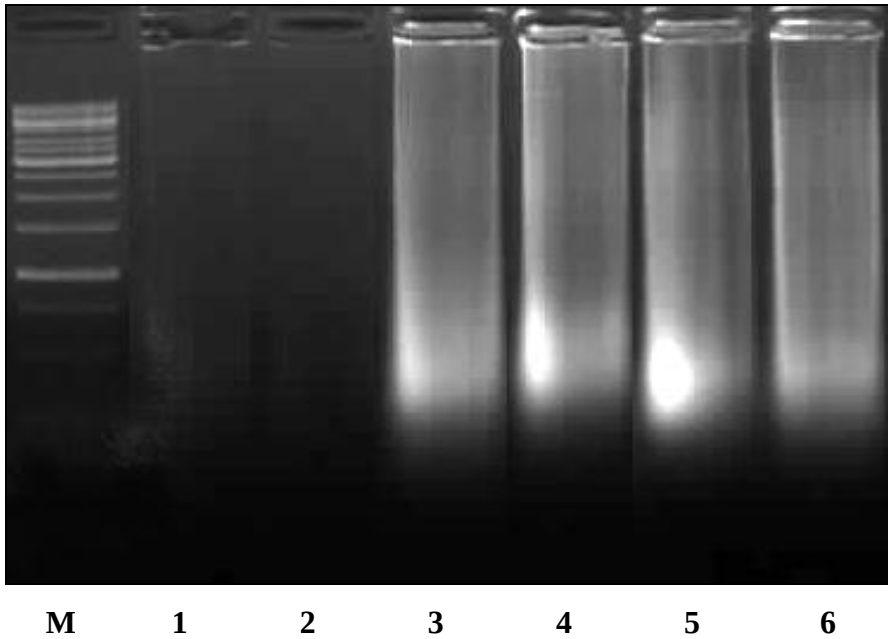
Şekil 21. Alkolle fikse edilmiş *Apathya cappadocica* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: A.cappa ATP A-1/1, 2: A.cappa ATP A-1/2, 3: A.cappa HTY A-1/1, 4: A.cappa HTY A-1/2, 5: A.cappa HTY A-2/1, 6: A.cappa HTY A-2/2, M: 100 bç marker).



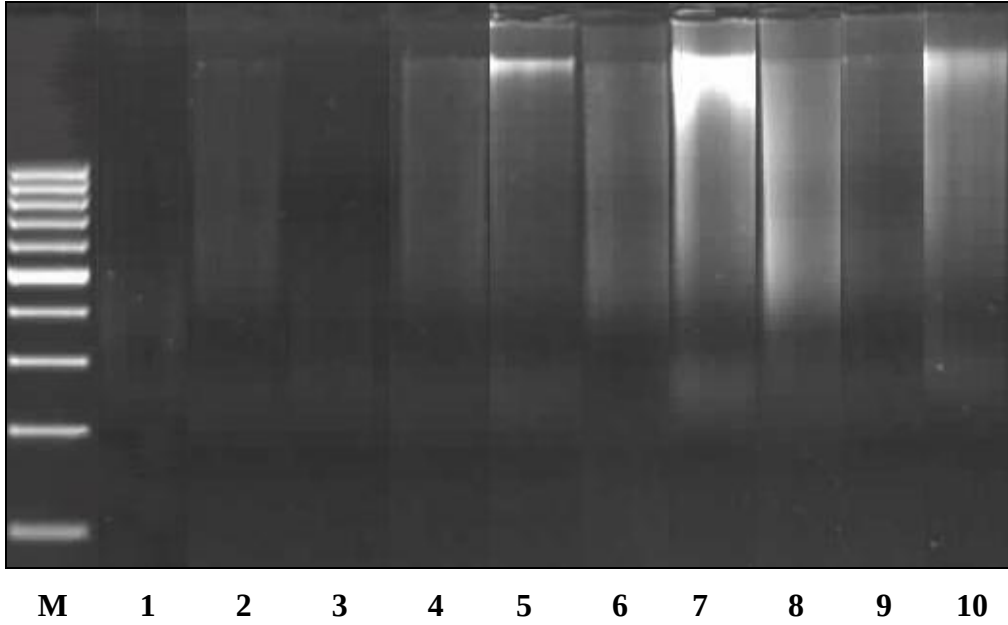
Şekil 22. Alkolle fikse edilmiş *Lacerta viridis* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: L.vir ÇNK 1 A-1/1, 2: L.vir ÇNK 1 A-1/2, 3: L.vir ÇNK 3 A-1/1, 4: L.vir ÇNK 3 A-1/2, 5: L.vir ÇNK 3 A-2/1, 6: L.vir ÇNK 3 A-2/2, M: 100 bç marker).



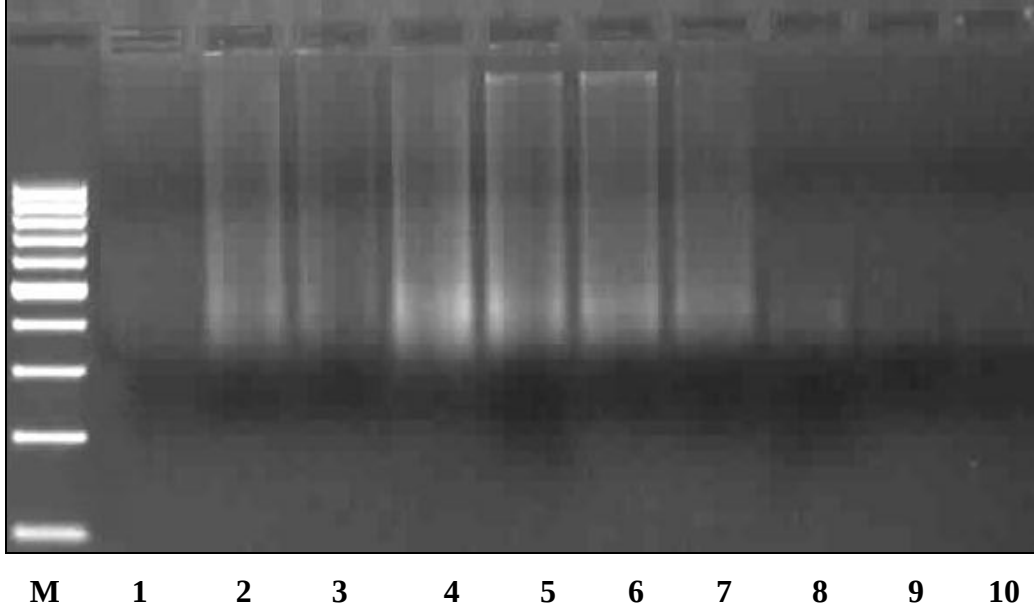
Şekil 23. Alkolle fikse edilmiş *Parvilacerta parva* ve *Podarcis muralis* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: *P. parva* AFY 1 A-1/1, 2: *P. parva* AFY 1 A-1/2, 3: *P. parva* BOL 1 A-1/1, 4: *P. parva* BOL 1 A-1/2, 5: *P. mura* ÇNK 1 A-1/1, 6: *P. mura* ÇNK 1 A-1/2, M: 100 bç marker).



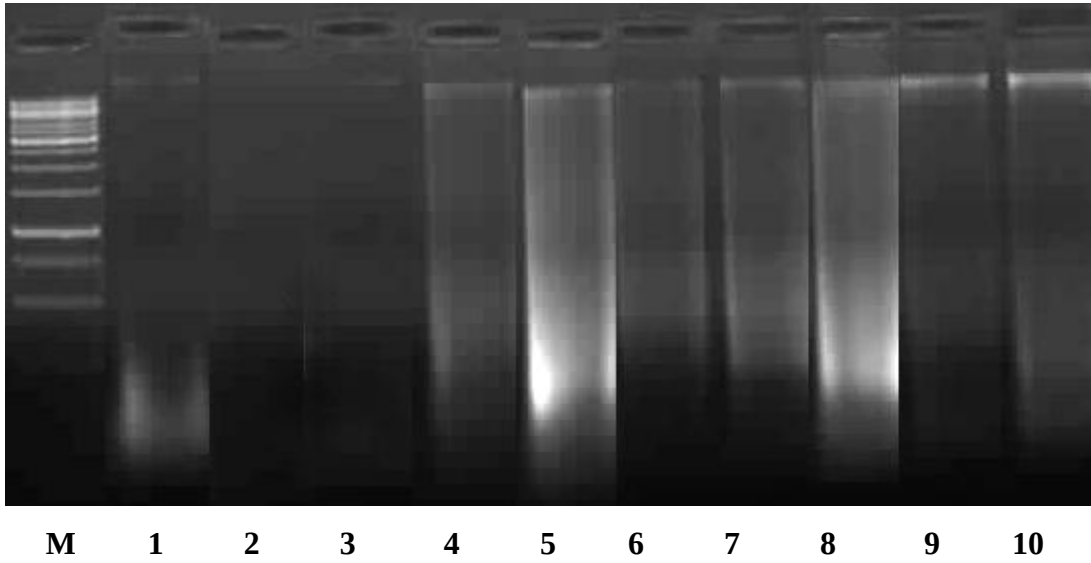
Şekil 24. Alkolle fikse edilmiş *Podarcis taurica* ve *Trachylepis aurata* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: *P. taur* ÇNK 2 A-1/1, 2: *P. taur* ÇNK 2 A-1/2, 3: *P. taur* ÇNK 3 A-1/1, 4: *P. taur* ÇNK 3 A-1/2, 5: *T. aura* ÇNK 1 A-1/1, 6: *T. aura* ÇNK 1 A-1/2, M: 100 bç marker).



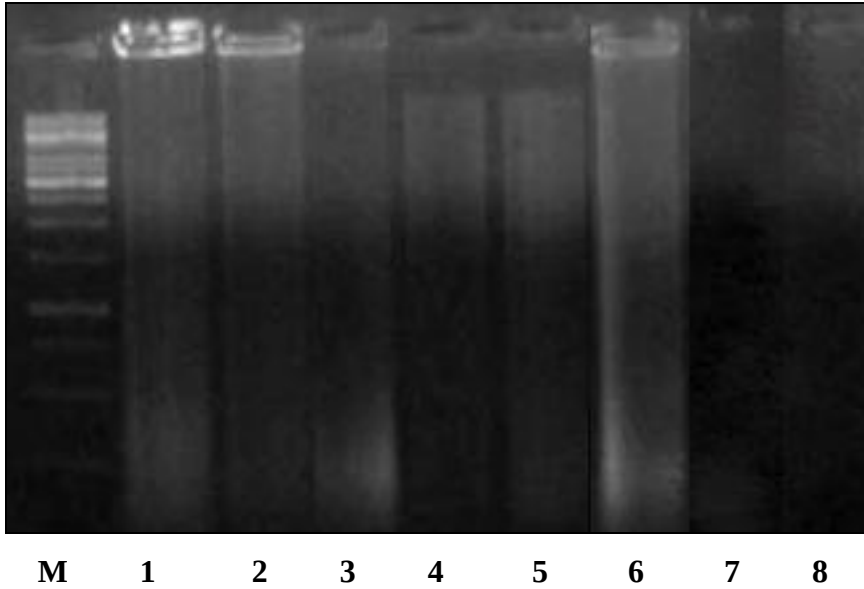
Şekil 25. Alkolle fikse edilmiş *Eryx jaculus* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Eryx ÇNK 1 A-1/1, 2: Eryx ÇNK 1 A-1/2, 3: Eryx ÇNK 1 A-1/3, 4: Eryx ÇNK 5 A-1/1, 5: Eryx ÇNK 5 A-1/2, 6: Eryx IDR 1 A-1/1, 7: Eryx IDR 1 A-1/2, 8: Eryx ADN A-1/1, 9: Eryx ADN A-1/2, 10: Eryx ADN A-1/3, M: 100 bç marker).



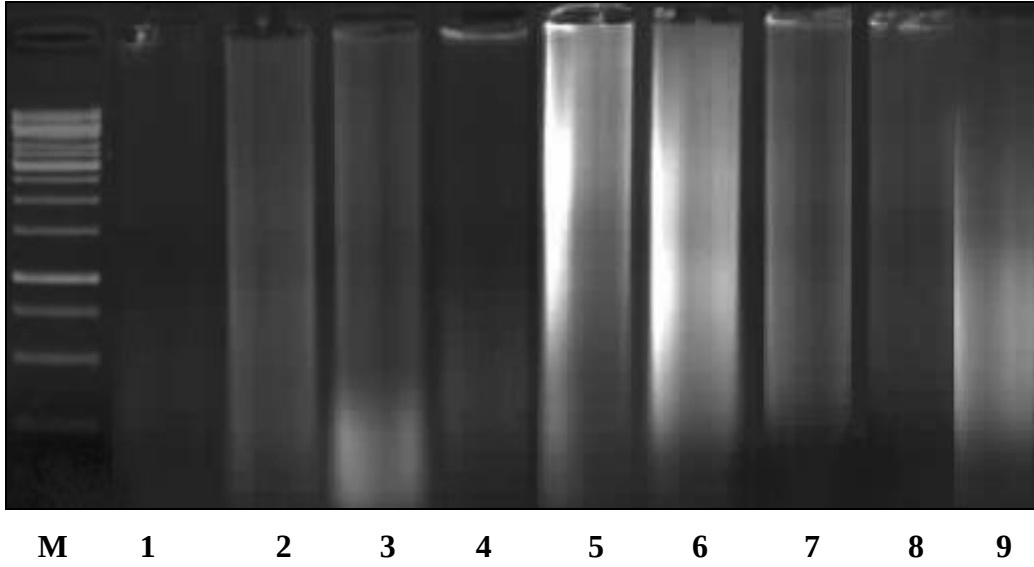
Şekil 26. Alkolle fikse edilmiş *Dolichophis caspius* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-1 (1: Casp. ÇNK 1 A-1/2, 2: Casp. ÇNK 1 A-1/3, 3: Casp. ÇNK 1 A-2/1, 4: Casp. ÇNK 1 A-2/2, 5: Casp. ÇNK 1 A-2/3, 6: Casp. ÇNK 1 A-3/1, 7: Casp. ÇNK 1 A-3/2, 8: Casp. ÇNK 1 A-3/3, 9: Casp. ÇNK 3 A-1/1, 10: Casp. ÇNK 3 A-1/2, M: 100 bç marker).



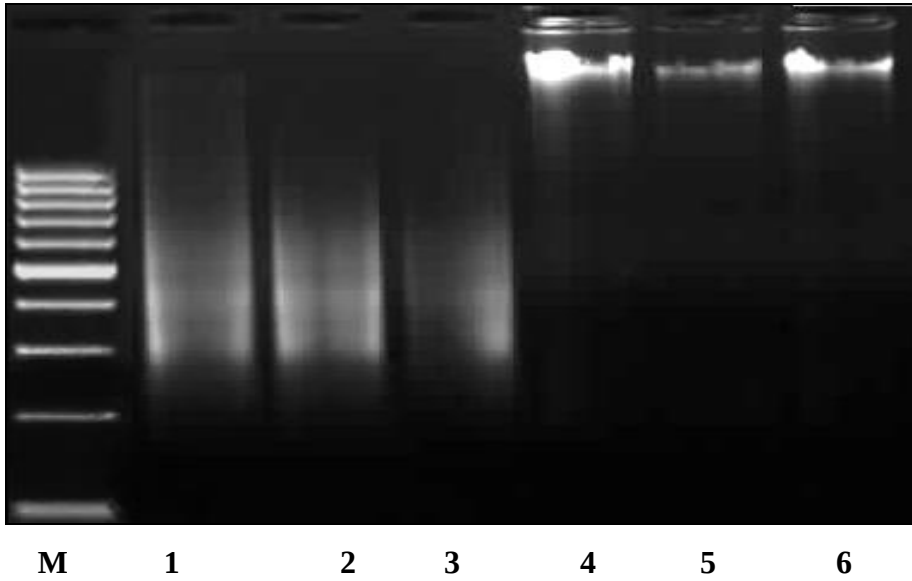
Şekil 27. Alkolle fikse edilmiş *Dolichophis caspius* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-2 (1: Casp. ÇNK 4 A-1/1, 2: Casp. ÇNK 4 A-1/2, 3: Casp. ÇNK 4 A-1/3, 4: Casp. ÇNK 4 A-2/1, 5: Casp. ÇNK 4 A-2/3, 6: Casp. ÇNK 5 A-1/1, 7: Casp. ÇNK 5 A-1/2, 8: Casp. ÇNK 5 A-1/3, 9: Casp. ÇNK 5 A-2/2, 10: Casp. ÇNK 5 A-2/3, M: 100 bç marker).



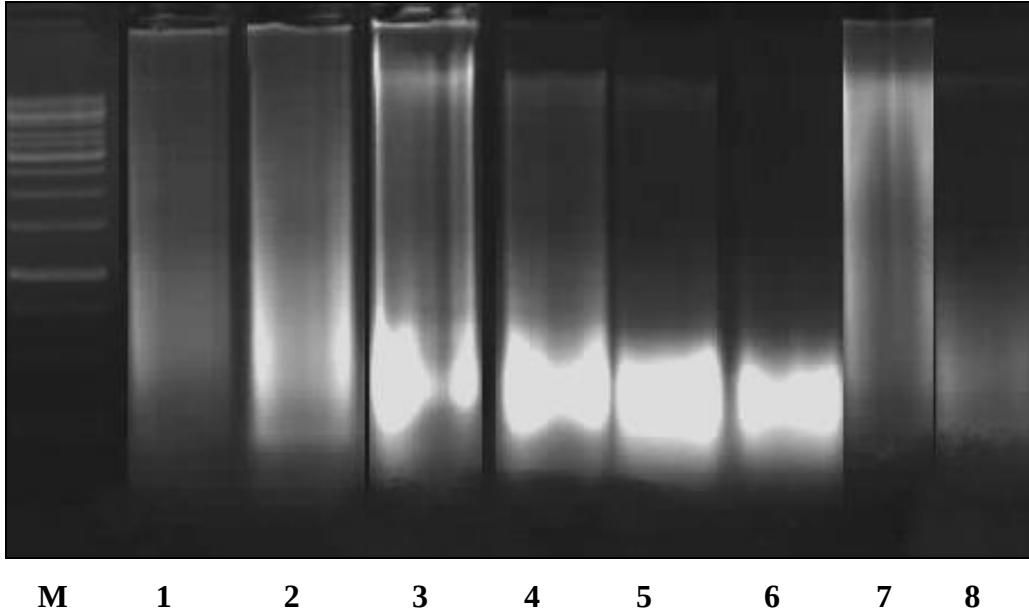
Şekil 28. Alkolle fikse edilmiş *Platycephalus najadum* ve *Dolichophis jugularis* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Naj. ÇNK 1 A-2/1, 2: Naj. ÇNK 1 A-2/2, 3: Naj. ÇNK 1 A-2/3, 4: D. jug MUG 2 A-1/1, 5: D. jug MUG 2 A-1/2, 6: D. jug MUG 2 A-1/3, 7: D. jug MUG 2 A-2/1, 8: D. jug MUG 2 A-2/2, M: 100 bç marker).



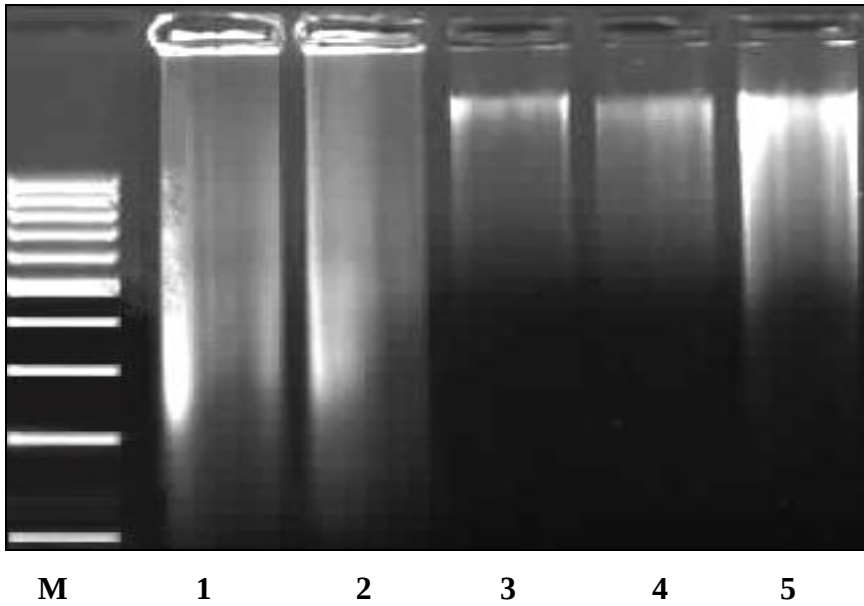
Şekil 29. Alkolle fikse edilmiş örneklerin *Hemorrhhois nummifer* ve *Platycephs collaris* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: H. num KNY A-1/1, 2: H. num KNY A-1/2, 3: H. num KNY A-1/3, 4: H. num AFY 2 A-1/1, 5: H. num AFY 2 A-1/2, 6: H. num AFY 2 A-1/3, 7: P. col ÇNK 1 A-1/1, 8: P. col ÇNK 1 A-1/2, 9: P. col ÇNK 1 A-1/3, M: 100 bp marker).



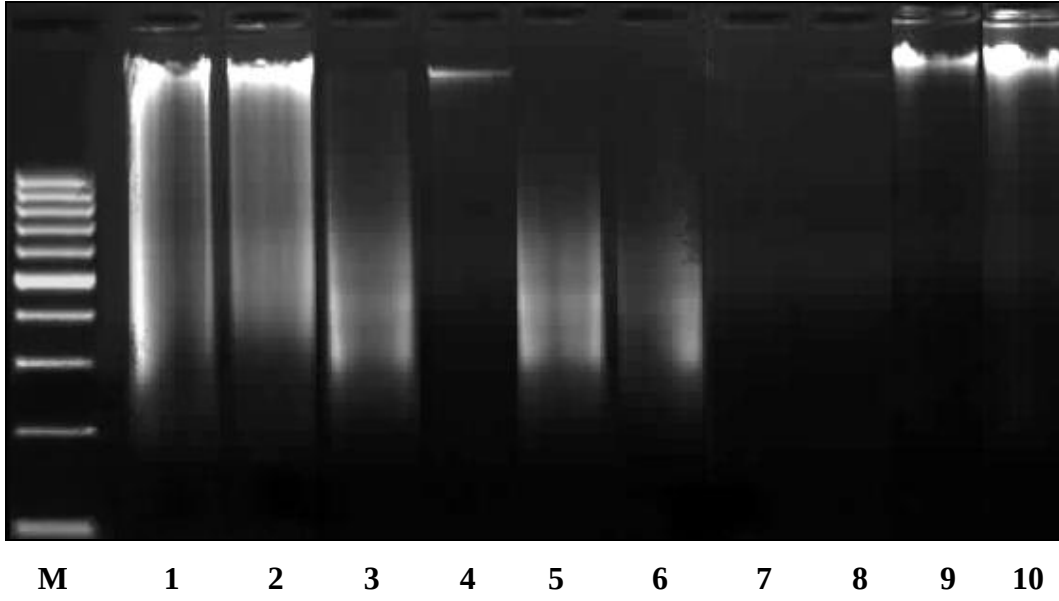
Şekil 30. Alkolle fikse edilmiş örneklerin *Coronella austriaca* ve *Eirenis modestus* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: C. aus TRB 1 A-1/1, 2: C. aus TRB 1 A-1/2, 3: C. aus TRB 1 A-1/3, 4: E. mod ÇNK 1 A-1/1, 5: E. mod ÇNK 1 A-1/2, 6: E. mod ÇNK 1 A-1/3, M: 100 bp marker).



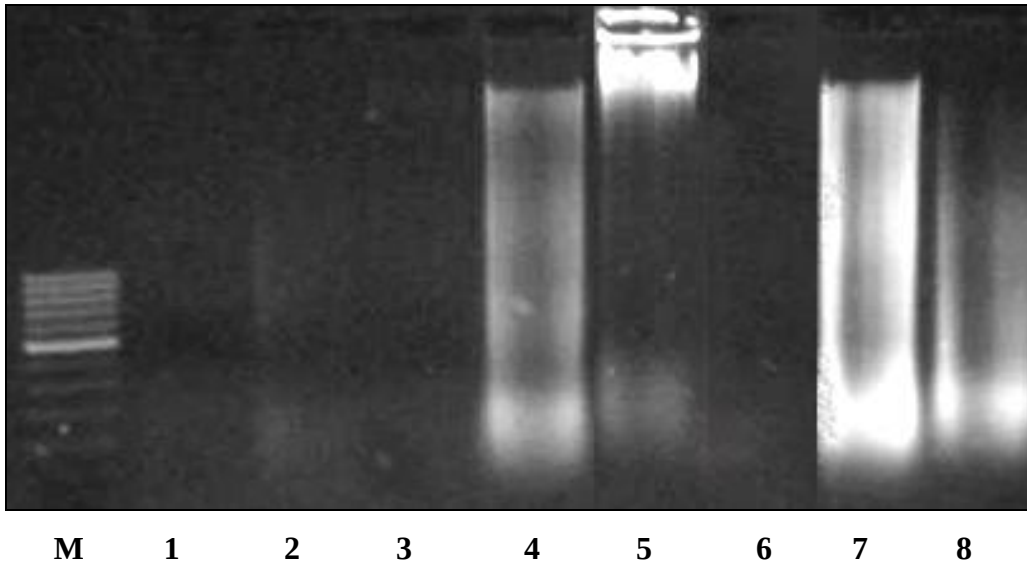
Şekil 31. Alkolle fikse edilmiş *Malpolon monspessulanus* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-1 (1: Malp. ÇNK 4 A-1/1, 2: Malp. ÇNK 4 A-1/2, 3: Malp. ÇNK 4 A-1/3, 4: Malp. ÇNK 4 A-2/1, 5: Malp. ÇNK 4 A-2/2, 6: Malp. ÇNK 4 A-2/3, 7: Malp. ÇNK 5 A-1/1, 8: Malp. ÇNK 5 A-1/3, M: 100 bç marker).



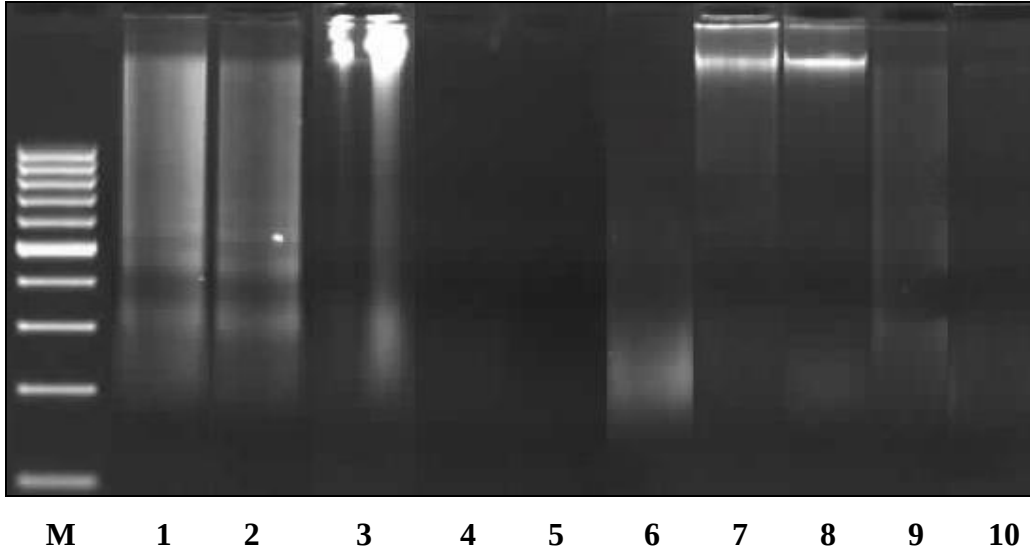
Şekil 32. Alkolle fikse edilmiş *Malpolon monspessulanus* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-2 (1: Malp. ÇNK 6 A-1/1, 2: Malp. ÇNK 6 A-1/2, 3: Malp. ÇNK 6 A-1/3, 4: Malp. IDR 2 A-3/1, 5: Malp. IDR 2 A-3/2, M: 100 bç marker).



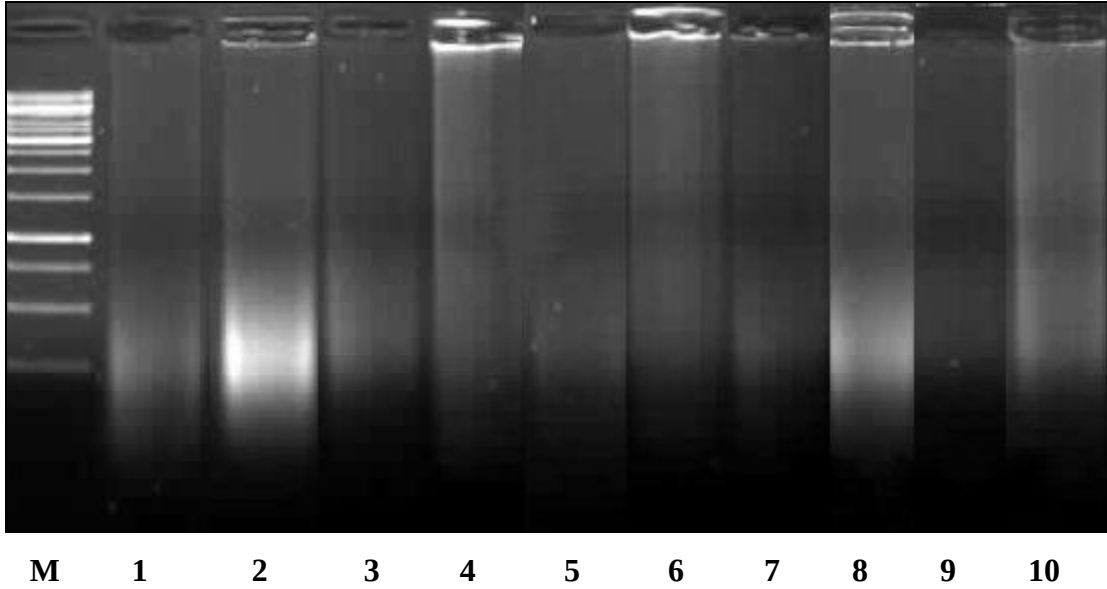
Şekil 33. Alkolle fikse edilmiş *Natrix natrix* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları -1 (1: Natrix ÇNK 1 A-1/1, 2: Natrix ÇNK 1 A-1/2, 3: Natrix ÇNK 1 A-1/3, 4: Natrix ÇNK 4 A-1/1, 5: Natrix ÇNK 4 A-1/2, 6: Natrix ÇNK 4 A-1/3, 7: Natrix ÇNK 4 A-2/1, 8: Natrix ÇNK 4 A-2/2, 9: Natrix ÇNK 4 A-3/1, 10: Natrix ÇNK 4 A-3/2, M: 100 bç marker).



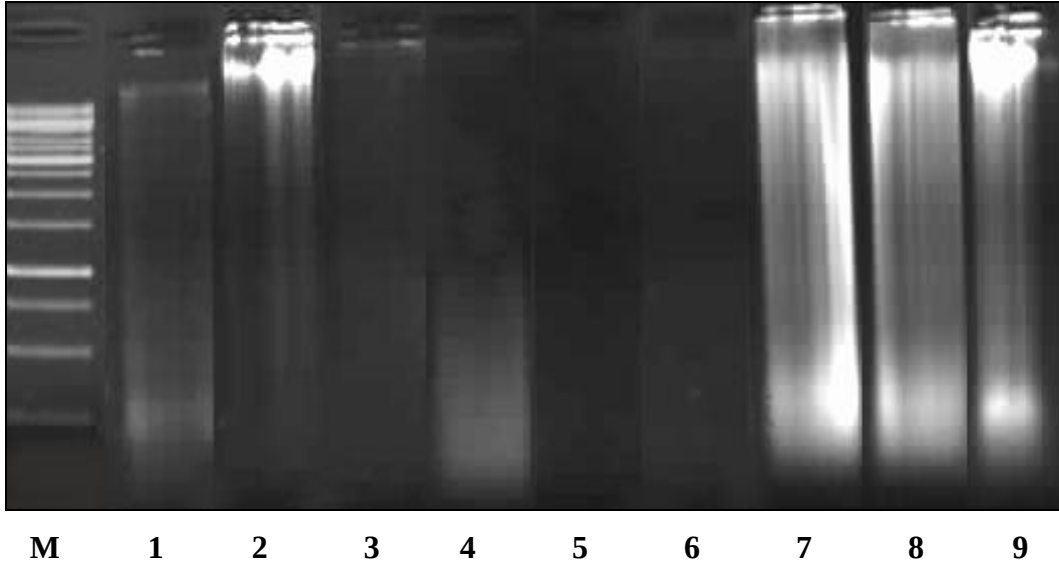
Şekil 34. Alkolle fikse edilmiş *Natrix natrix* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-2 (1: Natrix ÇNK 6 A-1/1, 2: Natrix ÇNK 6 A-1/2, 3: Natrix ÇNK 6 A-1/3, 4: Natrix ÇNK 6 A-2/1, 5: Natrix ÇNK 6 A-2/2, 6: Natrix ÇNK 6 A-2/3, 7: Natrix ÇNK 6 A-3/1, 8: Natrix ÇNK 6 A-3/3, M: 100 bç marker).



Şekil 35. Alkolle fikse edilmiş *Natrix tessellata* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: N. tes ÇNK 3 A-1/1, 2: N. tes ÇNK 3 A-1/2, 3: N. tes ÇNK 3 A-1/3, 4: N. tes ÇNK 3 A-2/1, 5: N. tes ÇNK 3 A-2/2, 6: N. tes ÇNK 3 A-2/3, 7: N. tes ÇNK 4 A-1/1, 8: N. tes ÇNK 4 A-1/2, 9: N. tes ÇNK 4 A-1/3, 10: N. tes ÇNK 4 A-2/1 , M: 100 bç marker).



Şekil 36. Alkolle fikse edilmiş *Telescopus fallax* türüne ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Telesc. ÇNK 1 A-2/1, 2: Telesc. ÇNK 1 A-2/2, 3: Telesc. ÇNK 1 A-2/3, 4: Telesc. ÇNK 1 A-3/1, 5: Telesc. ÇNK 1 A-3/2, 6: Telesc. ÇNK 1 A-3/3, 7: Telesc. MUG 1 A-1/1, 8: Telesc. MUG 1 A-1/2, 9: Telesc. MUG 1 A-1/3 , 10: Telesc. TKT A-1/1, M: 100 bç marker).



Şekil 37. Alkolle fikse edilmiş *Macrovipera lebetina* ve *Montivipera xanthina* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: Macro ADI A-1/1, 2: Macro ADI A-1/2, 3: Macro ADI A-1/3, 4: M.x. ÇNK 1 A-2/1, 5: M.x. ÇNK 1 A-2/2, 6: M.x. ÇNK 1 A-2/3, 7: M.x. AFY 2 A-3/1, 8: M.x. AFY 2 A-3/2, 9: M.x. AFY 2 A-3/3, M: 100 bç marker).

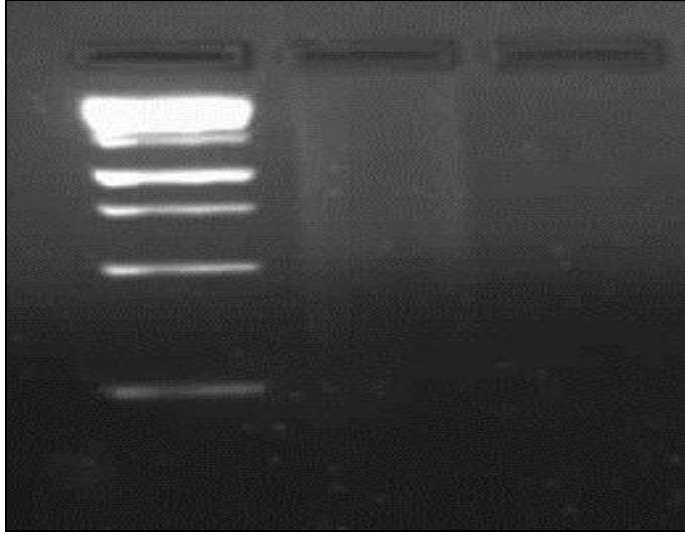
4.1.2. Formaldehit ile Fikse Edilen Örneklerin İzolasyon Bulguları

Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden DNA izolasyonunda kullanılan her bir protokol için, öncelikli olarak aynı örneğin dokuları tercih edilmiş ve hangi metodun daha kullanışlı olduğu test edilmeye çalışılmıştır. Bu işlemin sonucunda elde edilen DNA örnekleri, spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş ve %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

• 1. Metot Uygulamasının Bulguları

Çizelge 7. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 1. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Protokol	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Chomczynski ve Sacchi, 1987	35	-0,183	0,188	1,22	-0,524
Chomczynski ve Sacchi, 1987	42	-0,166	0,211	-0,78	-0,312



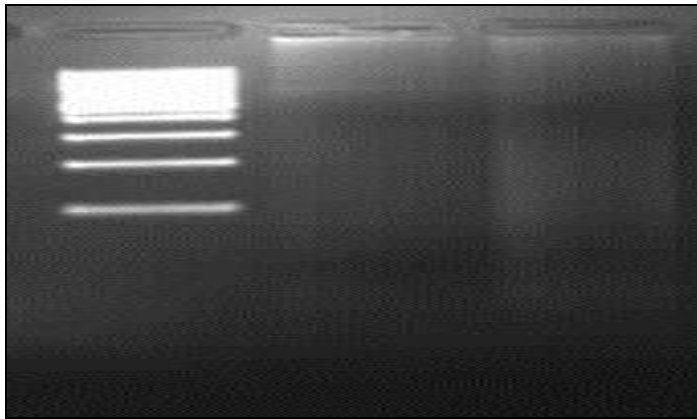
M **1** **2**

Şekil 38. Formaldehitte fiks edilmiş *Eremias suphani* türüne ait örneklerin 1. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları (**1:** F-1/1, **2:** F-1/2, **M:** 100 bç marker).

• 2. Metot Uygulamasının Bulguları

Çizelge 8. Formaldehit ile fiks edilmiş örneklerden 2. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Protokol	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Shi ve ark., 2004	58	1,1	0,57	2.06	1.59
Shi ve ark., 2004	62	0,8	0,48	1,66	2,33



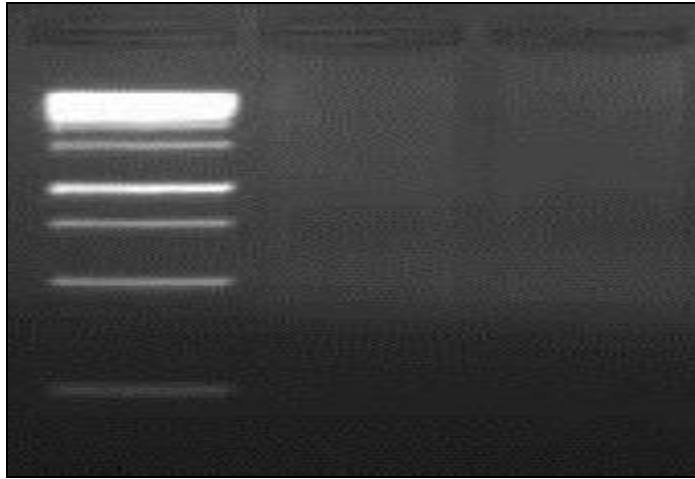
M **1** **2**

Şekil 39. Formaldehitte fikse edilmiş *Eremias suphani* türüne ait örneklerin 2. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları (1: F-2/1, 2: F-2/2, M: 100 bç marker).

• 3. Metot Uygulamasının Bulguları

Çizelge 9. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 3. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Protokol	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Scatena ve Morielle-Versute, 2008	12	0,25	0,16	1,54	1,02
Scatena ve Morielle-Versute, 2008	23	0,74	0,58	1,27	0,97



M

1

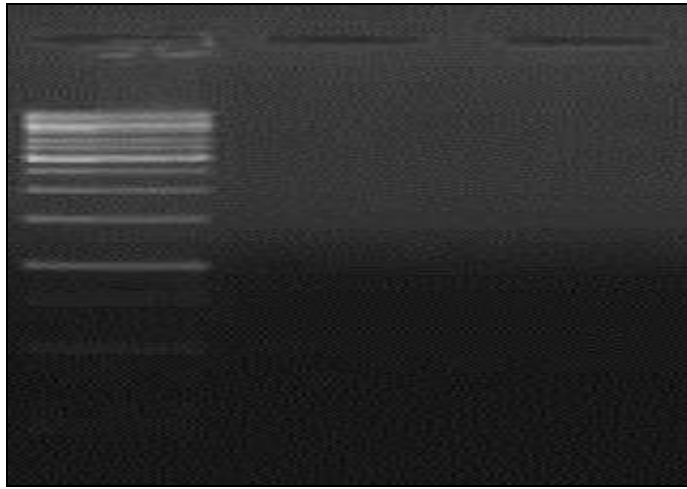
2

Şekil 40. Formaldehitte fikse edilmiş *Eremias suphani* türüne ait örneklerin 3. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları (1: F-3/1, 2: F-3/2, M: 100 bç marker).

• 4. Metot Uygulamasının Bulguları

Çizelge 10. Formaldehit ile fıkse edilmiş örneklerden 4. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Protokol	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Shedlock ve ark., 1997; Chakraborty ve ark., 2006	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Shedlock ve ark., 1997; Chakraborty ve ark., 2006	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-



M

1

2

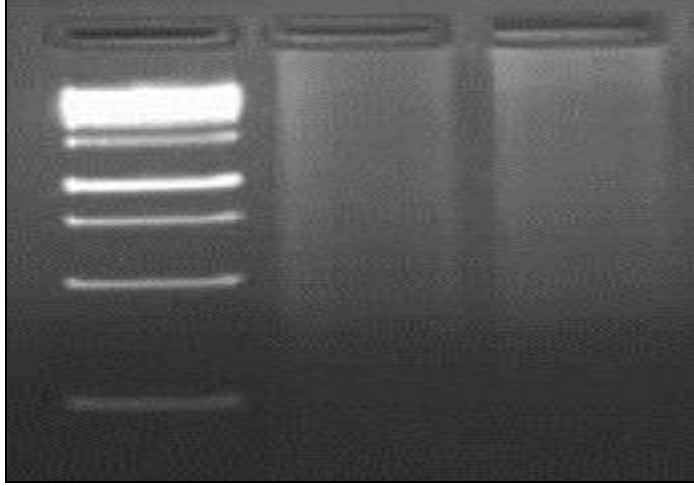
Şekil 41. Formaldehit ile fıkse edilmiş *Eremias suphani* türüne ait örneklerin 4. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları (1: F-4/1, 2: F-4/2, M: 100 bç marker).

• 5. Metot Uygulamasının Bulguları

Çizelge 11. Formaldehit ile fıkse edilmiş örneklerden 5. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Protokol	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Walsh ve ark., 1991; Chakraborty ve ark., 2006	96	1,91	1,11	1,72	1,58

Walsh ve ark., 1991; Chakraborty ve ark., 2006	78	1,58	1,02	1,55	1,32
---	----	------	------	------	------

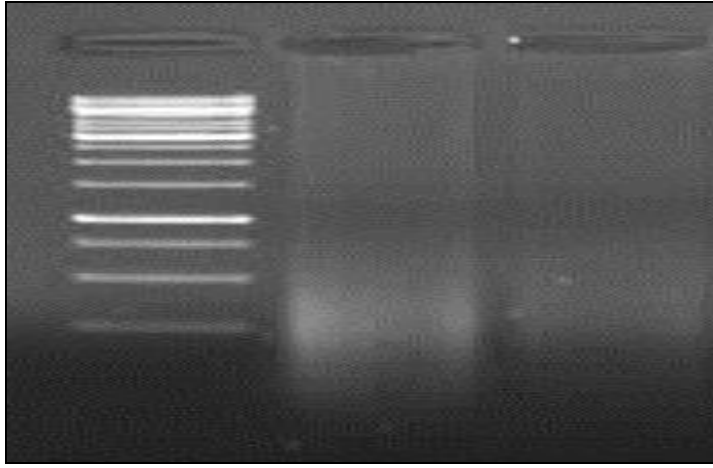
**M****1****2**

Şekil 42. Formaldehitte fikse edilmiş *Eremias suphani* türüne ait örneklerin 5. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları (**1**: F-5/1, **2**: F-5/2, **M**: 100 bç marker).

- 6. Metot Uygulamasının Bulguları

Çizelge 12. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 6. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri

Protokol	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Isola ve ark., 1994	124	2,49	1,41	1,75	1,64
Isola ve ark., 1994	113	1,98	1,56	1,27	1,12



M

1

2

Şekil 43. Formaldehitte fikse edilmiş *Eremias suphani* türüne ait örneklerin 6. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları (1: F-6/1, 2: F-6/2, M: 100 bç marker).

Alınan sonuçlar doğrultusunda; çalışmada denenmiş olan DNA izolasyon protokollerinden en sonuncusu olan ve daha önce parafin bloklara gömülen dokudan DNA elde etmek amacıyla geliştirilen metodun daha kullanışlı olduğu görülmüştür. Bunun üzerine çalışma dahilindeki formaldehitte fikse edilmiş örneklerden doku alınarak mevcut DNA izolasyon protokolü uygulanmıştır. Yapılan izolasyon işleminin ardından DNA örneklerinin miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve Çizelge 8’de sunulmuştur.

Çizelge 13. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden izole edilen DNA’ların spektrofotometrik ölçümleri

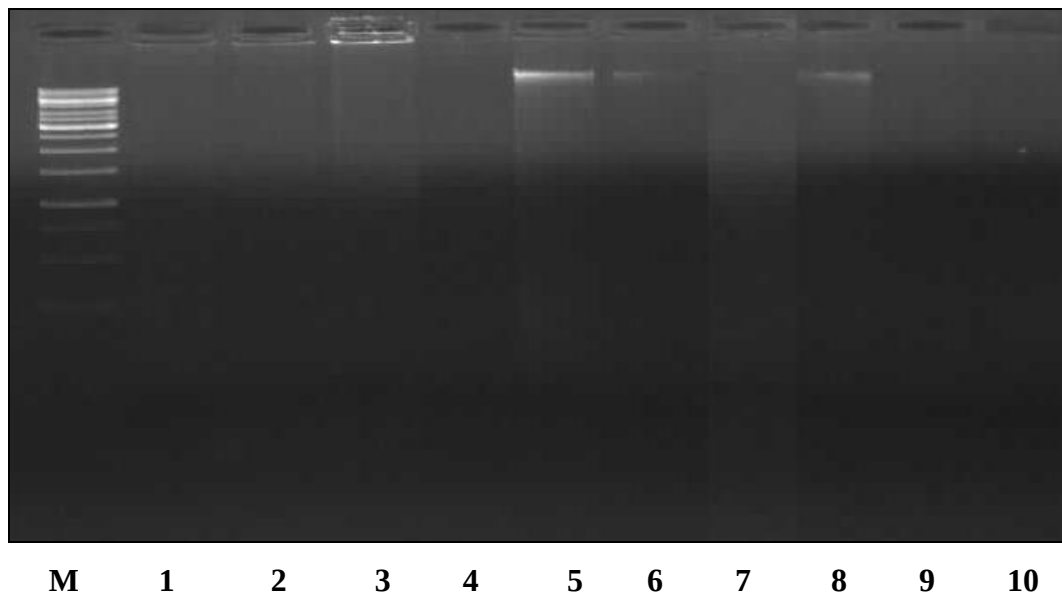
Doku Kodları	Konsantrasyon (µg/µl)	A260 (nm)	A280 (nm)	260/280	260/230
Lis vul ÇNK 1 F-1/1	35	-0,034	-0,04	7	-0,109
Lis vul ÇNK 1 F-1/2	5	-0,02	-0,023	-0,5	-0,05
Lis vul ÇNK 2 F-1/1	75	0,155	0,15	1,5	0,294
Lis vul ÇNK 2 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Bufo ÇNK 1 F-1/1	1095	0,265	0,617	1,8	4,212
Bufo ÇNK 1 F-1/2	210	0,163	0,183	1,909	3,5
Bufo ÇNK 3 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-

Bufo ÇNK 3 F-1/2	1465	0,3	0,164	1,86	2,873
P.vir ÇNK 1 F-1/1	1120	0,207	0,096	1,882	4,148
P.vir ÇNK 1 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Hyla ÇNK 1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Hyla ÇNK 1 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Hyla ÇNK 2 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Hyla ÇNK 2 F-1/2	405	0,118	0,046	1,906	2,036
Pel.syr ÇNK 1 F-1/1	1970	0,442	0,259	1,867	2,962
Pel.syr ÇNK 1 F-1/2	2455	0,541	0,305	1,866	2,59
R.dal ÇNK 2 F-1/1	30	0,257	0,254	2	0,171
R.dal ÇNK 2 F-1/2	11	0,194	0,181	2,444	0,333
R.macro ERZ1 F-1/1	90	0,135	0,145	2,25	18
R.macro ERZ1 F-1/2	15	0,141	0,139	3	0,094
P. rid ÇNK 1 F-1/1	80	0,249	0,24	2,286	0,286
P. rid ÇNK 1 F-1/2	847	0,307	0,153	1,865	2,088
L.danf ÇNK 1 F-1/1	1465	0,3	0,039	1,866	2,874
L.danf ÇNK 1 F-1/2	1135	0,294	0,21	1,695	1,908
L.vir ÇNK 3 F-1/1	797	0,159	0,09	1,7	1,06
L.vir ÇNK 3 F-1/2	125	0,181	0,195	2,273	0,781
L.tri ÇNK 1 F-1/1	1165	0,284	0,166	1,835	4,66
L.tri ÇNK 1 F-1/2	30	0,263	0,265	1,5	0
L.tri ÇNK 2 F-1/1	1470	0,368	0,239	1,796	1,861
L.tri ÇNK 2 F-1/2	575	0,081	0,023	2,106	2,357
L.tri ÇNK 3 F-1/1	432	0,063	0,022	1,77	3,185
L.tri ÇNK 3 F-1/2	245	0,038	0,018	1,741	11,8
P.parva ERZ1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P.parva ERZ1 F-1/2	140	0,005	0,015	1,556	7
P. mura ÇNK 3 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P. mura ÇNK 3 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
P. taur ÇNK 2 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-

P. taur ÇNK 2 F-1/2	50	0,024	0,027	1,429	0,37
T.aura ÇNK 1 F-1/1	45	0,042	0,051	0,818	0,243
T.aura ÇNK 1 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Eryx ÇNK 1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Eryx ÇNK 1 F-1/2	40	0,08	0,002	0,571	0,258
Eryx ÇNK 1 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Eryx ÇNK 1 F-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Eryx ÇNK 1 F-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Eryx ÇNK 1 F-2/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 F-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 F-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Malp. ÇNK 1 F-2/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 1 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 1 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 1 F-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 1 F-2/2	90	0,058	0,05	1,8	0,947
Natrix ÇNK 1 F-2/3	50	0,018	0,025	3,33	0,5
Natrix ÇNK 1 F-3/1	30	0,036	0,039	2	0,087
Natrix ÇNK 1 F-3/2	155	0,078	0,056	3,444	6,2
Natrix ÇNK 1 F-3/3	185	0,071	0,048	2,643	9,25
Natrix ÇNK 2 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 2 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 2 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 2 F-2/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 2 F-2/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Natrix ÇNK 2 F-2/3	28	0,03	0,016	2,274	-1

N.tes ÇNK 1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ÇNK 1 F-1/2	100	0,015	0	4	1,33
N.tes ÇNK 1 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
N.tes ÇNK 3 F-1/1	50	0,052	0,023	2,381	12,5
N.tes ÇNK 3 F-1/2	15	-0,048	-0,05	1,6	-0,273
N.tes ÇNK 3 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK1 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK1 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK 2 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK 2 F-1/2	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
Telesc. ÇNK 2 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
M.x ÇNK 1 F-1/1	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-
M.x ÇNK 1 F-1/2	62	0,212	0,27	1,23	0,096
M.x ÇNK 1 F-1/3	Ölçüm yapılamadı	-	-	-	-

DNA miktarları sayısal olarak ölçüldükten sonra %1'lik agaroz jel hazırlanarak örnekler elektroforetik olarak da ölçülmüştür. Elektroforez görüntüleri aşağıda sunulmuştur.



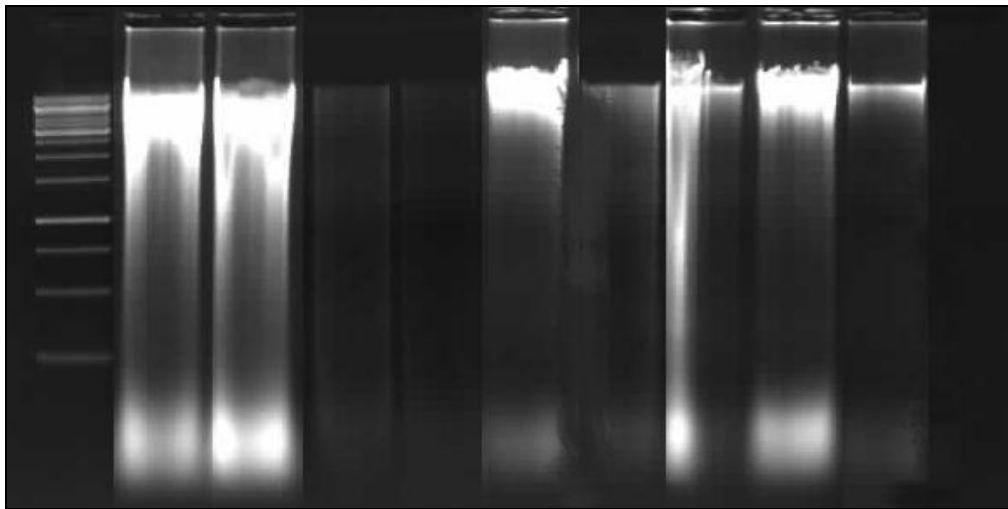
Şekil 44. Formaldehitte fikse edilmiş *Lissotriton vulgaris*, *Bufo bufo*, *Pseudepidalea*

viridis ve *Hyla arborea* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (**1:** Lis vul ÇNK 1 F-1/1, **2:** Lis vul ÇNK 1 F-1/2, **3:** Lis vul ÇNK 2 F-1/1, **4:** Lis vul ÇNK 2 F-1/2, **5:** Bufo ÇNK 1 F-1/1, **6:** Bufo ÇNK 1 F-1/2, **7:** Bufo ÇNK 3 F-1/1, **8:** Bufo ÇNK 3 F-1/2, **9:** P. vir ÇNK 1 F-1/2, **10.** Hyla ÇNK 1 F-1/1, **M:** 100 bç marker).



M **1** **2** **3** **4** **5** **6** **7** **8** **9**

Şekil 45. Formaldehitte fikse edilmiş *Pelobates syriacus*, *Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis*, *Pelophylax ridibundus* ve *Eremias suphani* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (**1:** Pel syr ÇNK 1 F-1/1, **2:** Pel syr ÇNK 1 F-1/2, **3:** R. dal ÇNK 2 F-1/1, **4:** R. dal ÇNK 2 F-1/2, **5:** R. macro ERZ 1 F-1/1, **6:** R. macro ERZ 1 F-1/2, **7:** P. rid ÇNK 1 F-1/2, **8:** E. suph VAN F-1/1, **9:** E. suph VAN F-1/2, **M:** 100 bç marker).



M **1** **2** **3** **4** **5** **6** **7** **8** **9** **10**

Şekil 46. Formaldehitte fikse edilmiş *Anatololacerta danfordi*, *Lacerta viridis* ve *Lacerta trilineata* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: L. danf ÇNK 1 F-1/1, 2: L. danf ÇNK 1 F-1/2, 3: L. vir ÇNK 3 F-1/1, 4: L. vir ÇNK 3 F-1/2, 5: L. tri ÇNK 1 F-1/1, 6: L. tri ÇNK 1 F-1/2, 7: L. tri ÇNK 2 F-1/1, 8: L. tri ÇNK 2 F-1/2, 9: L. tri ÇNK 3 F-1/1, 10: L. tri ÇNK 3 F-1/2, M: 100 bç marker).



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

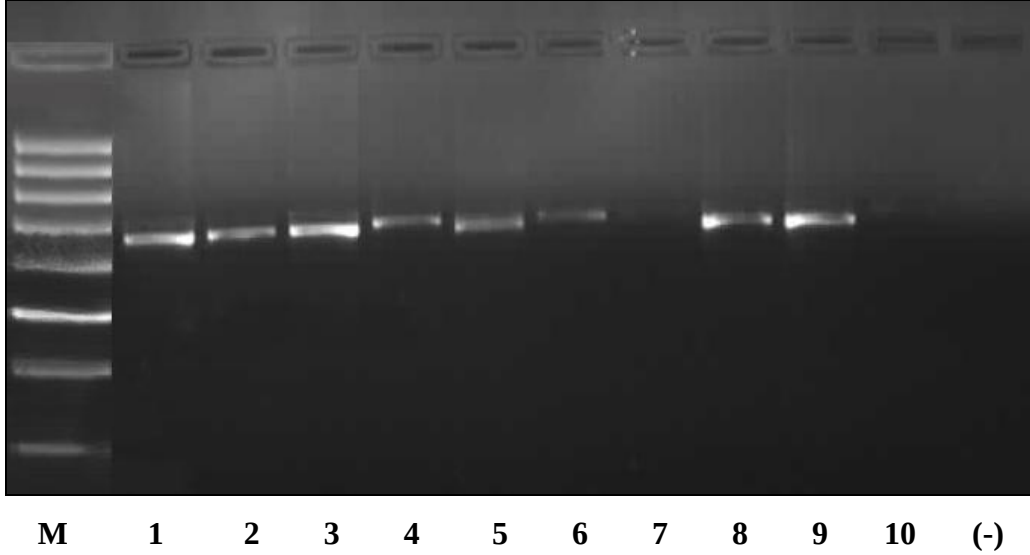
Şekil 47. Formaldehitte fikse edilmiş *Parvilacerta parva*, *Podarcis taurica*, *Trachylepis aurata*, *Eryx jaculus*, *Natrix natrix*, *Natrix tessellata* ve *Montivipera xanthina* türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları (1: P. parva ERZ 1 F-1/2, 2: P. taur ÇNK 2 F-1/2, 3: T. aura ÇNK 1 F-1/1, 4: Eryx ÇNK 1 F-1/2, 5: Natrix ÇNK 1 F-2/2, 6: Natrix ÇNK 1 F-2/3, 7: Natrix ÇNK 1 F-3/1, 8: N. tes ÇNK 3 F-1/1, 9: N. tes ÇNK 3 F-1/2, 10: M.x. ÇNK 1 F-1/2, M: 100 bç marker).

4.2. DNA Çoğaltma İşlemi Bulguları

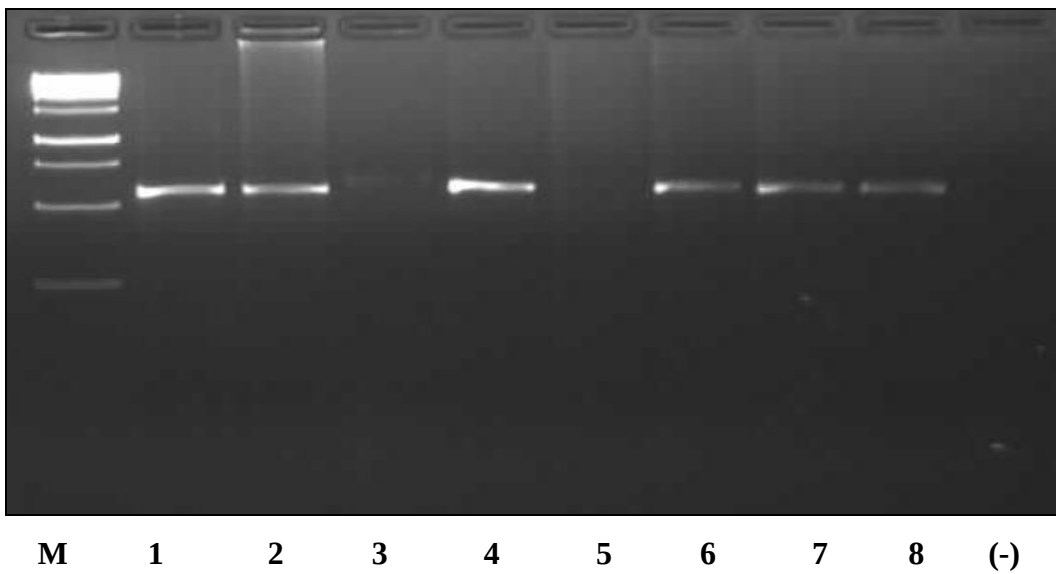
İzole edilen DNA örnekleri spektrofotometrik ve elektroforetik tayinleri yapıldıktan sonra bu değerler baz alınarak her bir tür için en iyi sonucun alındığı DNA örnekleri belirlenmiştir. Seçilen DNA örneklerinin 16S rRNA ve Cytochrome B gen bölgeleri için PCR yöntemiyle çoğaltma işlemi uygulanmıştır.

4.2.1. Alkolle Fikse Edilmiş Örneklerin DNA Çoğaltma Bulguları

4.2.1.1. 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular

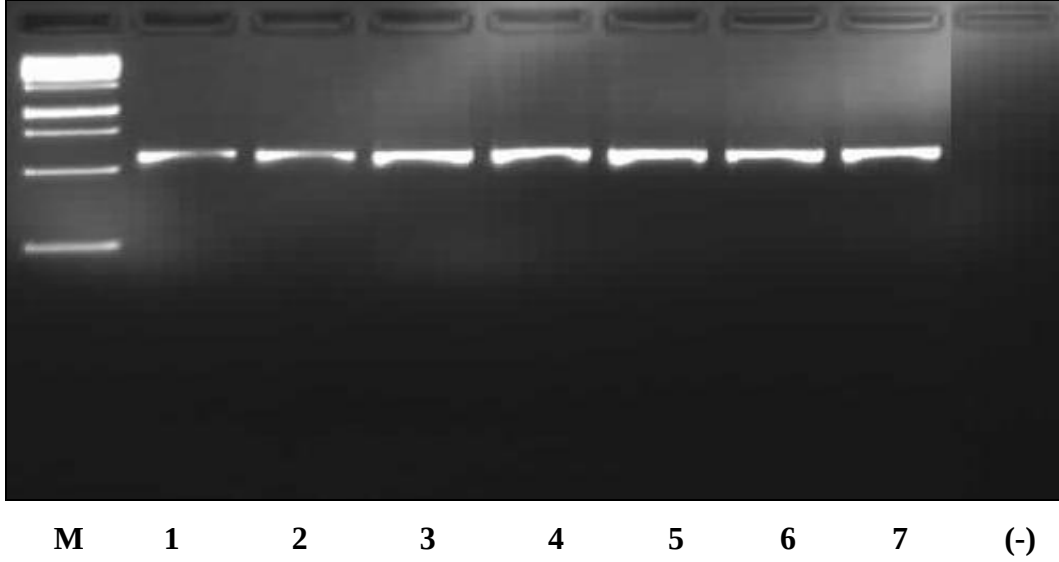


Şekil 48. Alkolle fikse edilmiş *Mertensiella caucasica*, *Lyciasalamandra luschani*, *Triturus karelinii*, *Lissotriton vulgaris*, *Ommatotriton vittatus* ve *Bufo bufo* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: M. cauc TRB 1 A-2/1, 2: M. cauc TRB 1 A-2/2, 3: Lyc. lus MUG 1 A-1/2, 4: Lyc. lus MUG 1 A-2/2, 5: T. kareli ÇNK 1 A-1/1, 6: T. kareli ÇNK 1 A-2/1, 7: Lis vul ÇNK 1 A-1/1, 8: Om. vit TRB 1 A-1/1, 9: Bufo ÇNK 1 A-1/1, 10. Bufo ÇNK 1 A-1/2, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

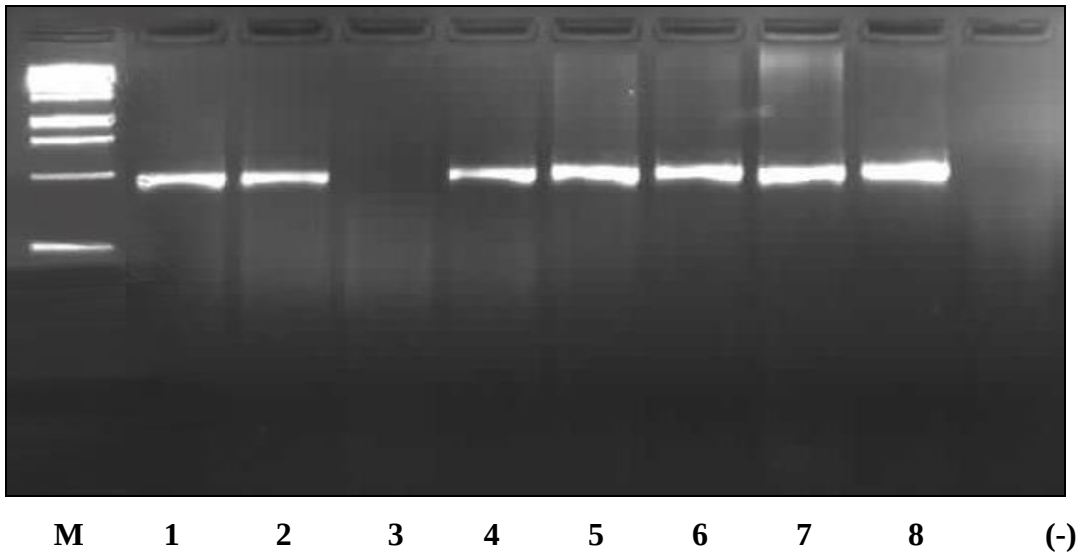


Şekil 49. Alkolle fikse edilmiş *Hyla arborea*, *Pseudepidalea viridis*, *Rana dalmatina* ve

Pelobates syriacus türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (**1:** Hyla ÇNK 1 A-1/1, **2:** Hyla ÇNK 1 A-1/2, **3:** P. vir ÇNK 1 A-1/1, **4:** P. vir ÇNK 1 A-1/2, **5:** R. dal ÇNK 2 A-1/1, **6:** R. dal ÇNK 2 A-2/2, **7:** Pel syr ÇNK 1 A-2/1, **8:** Pel syr ÇNK 1 A-2/2, **(-):** negatif kontrol, **M:** 1 kb marker).

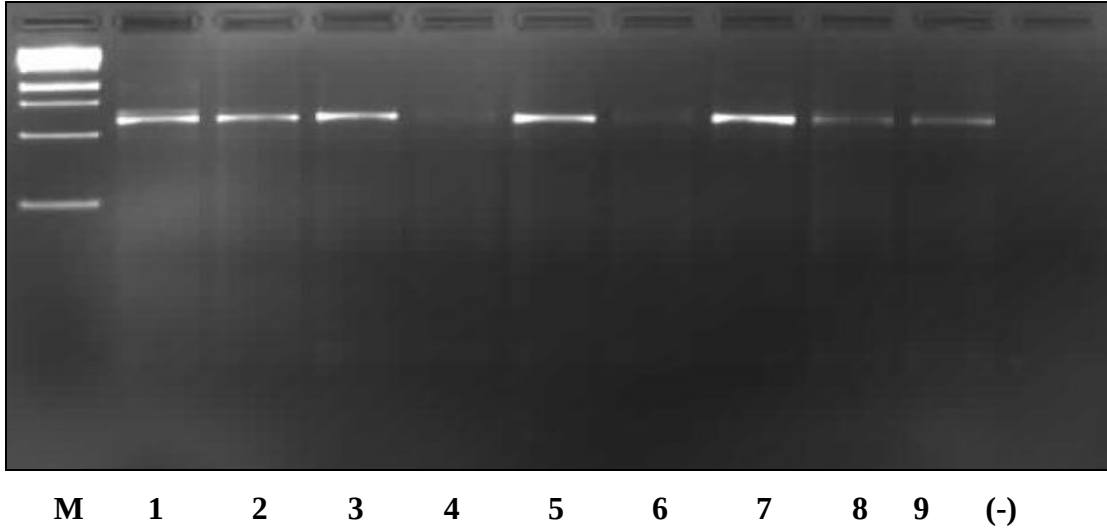


Şekil 50. Alkolle fıkse edilmiş *Rana macrocnemis*, *Pelophylax ridibundus*, *Laudakia stellio* ve *Phrynocephalus persicus* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (**1:** R. macro TRB 1 A-1/2, **2:** P. rid ÇNK 1 A-1/1, **3:** P. rid ÇNK 1 A-1/2, **4:** L. stell HTY A-1/1, **5:** L. stell HTY A-1/2, **6:** P. pers IDR A-1/1, **7:** P. pers IDR A-1/2, **(-):** negatif kontrol, **M:** 1 kb marker).

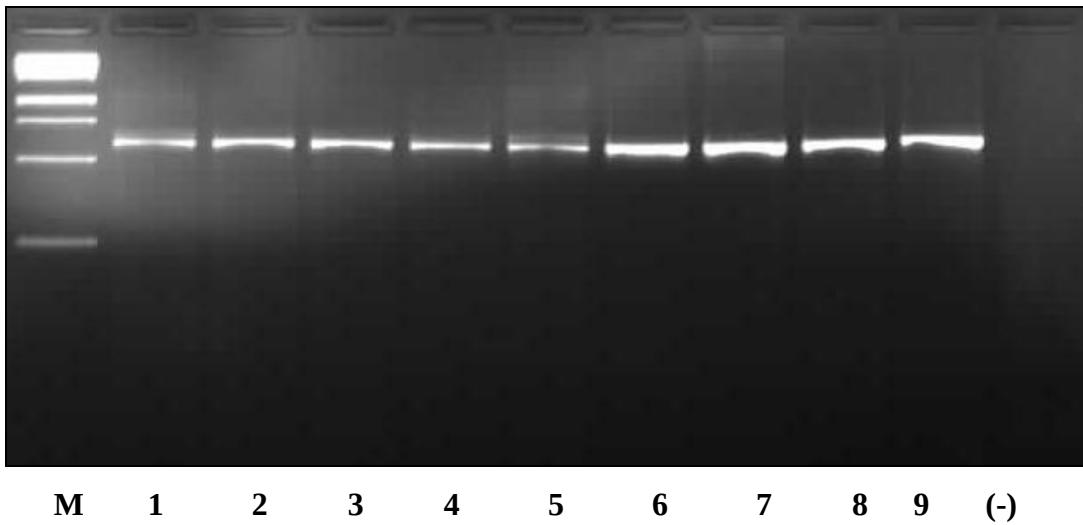


Şekil 51. Alkolle fıkse edilmiş *Darevskia valentini*, *Asaccus elisae*, *Eremias strauchi*,

Anatoloacerta danfordi ve *Lacerta laevis* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: D. val BYB A-1/2, 2: D. val SNP A-1/1, 3: A. elis URF A-1/1, 4: E. stra IDR A-1/2, 5: E. stra IDR A-2/1, 6: L. danf. MUG 2 A-1/2, 7: L. danf KNY A-1/1, 8: L. laev HTY A-2/1, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

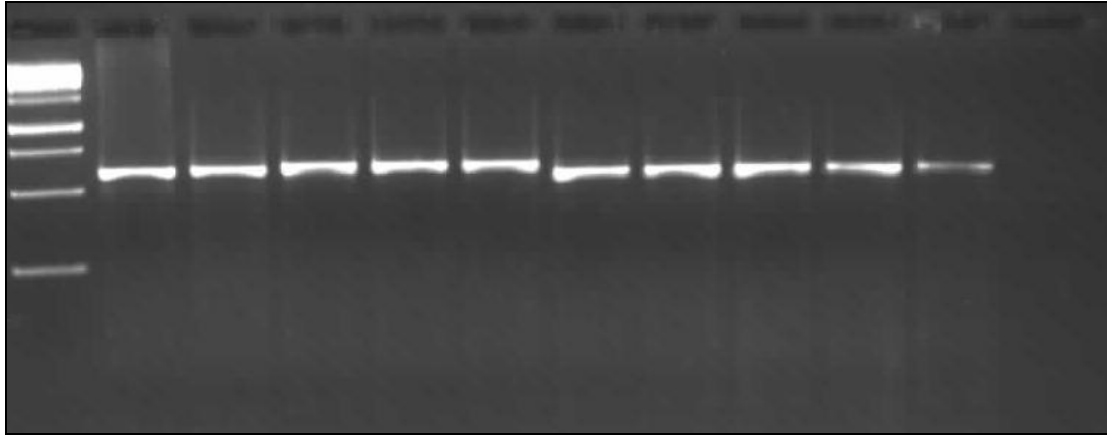


Şekil 52. Alkolle fikse edilmiş *Apathya cappadocica*, *Lacerta viridis*, *Parvilacerta parva*, *Podarcis muralis* ve *Podarcis taurica* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: A. cappa ATP A-1/1, 2: A. cappa HTY A-1/1, 3: L. vir ÇNK 3 A-2/1, 4: L. vir ÇNK 1 A-1/1, 5: P. parva BOL 1 A-1/1, 6: P. parva BOL 1 A-1/2, 7: P. mura ÇNK 1 A-1/1, 8: P. mura ÇNK 1 A-1/2, 9: P. taur ÇNK 3 A-1/1, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).



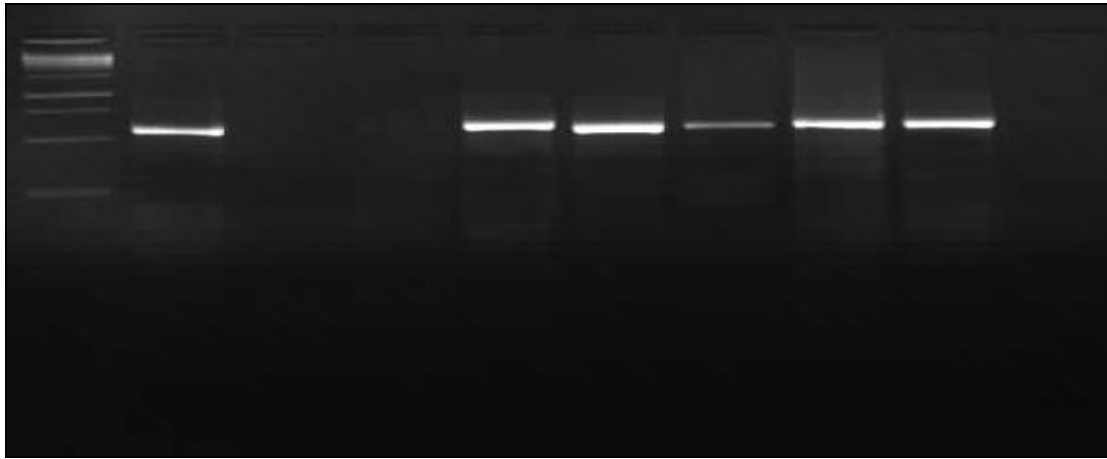
Şekil 53. Alkolle fikse edilmiş *Podarcis taurica*, *Trachylepis aurata*, *Eryx jaculus*, *Dolichophis caspius* ve *Platyceps najadum* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: P. taur ÇNK 3 A-1/2, 2: T. aura ÇNK 1 A-1/1, 3: T. aura ÇNK 1 A-1/2, 4:

Eryx IDR 1 A-1/2, **5:** Eryx ADN A-1/1, **6:** Casp ÇNK 4 A-2/3, **7:** Casp ÇNK 5 A-1/3, **8:** Naj ÇNK 1 A-2/1, **9:** Naj ÇNK 1 A-2/2, **(-):** negatif kontrol, **M:** 1 kb marker).



M **1** **2** **3** **4** **5** **6** **7** **8** **9** **10** **(-)**

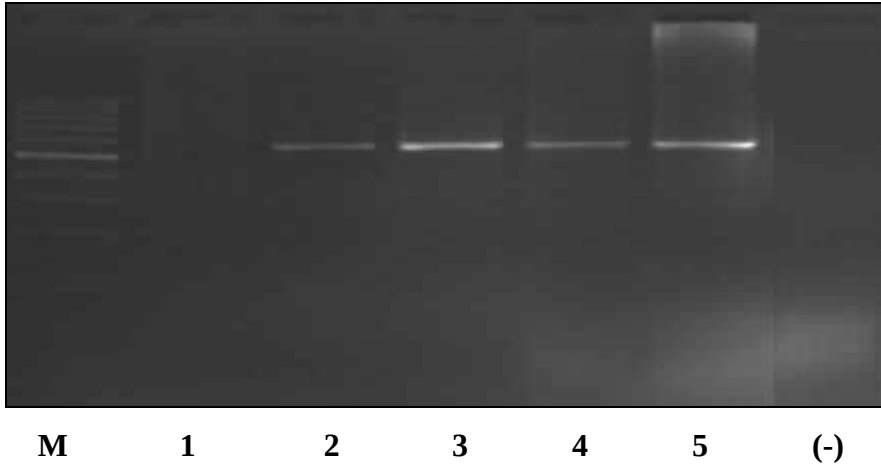
Şekil 54. Alkolle fikse edilmiş *Dolichophis jugularis*, *Hemorrhoids nummifer*, *Platycephalus collaris*, *Coronella austriaca* ve *Eirenis modestus* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (**1:** D. jug MUG 2 A-1/3, **2:** D. jug MUG 2 A-2/2, **3:** H. num AFY 2 A-1/2, **4:** H. num AFY 2 A-1/3, **5:** P. col ÇNK 1 A-1/2, **6:** P. col ÇNK 1 A-1/3, **7:** C. aus TRB 1 A-1/1, **8:** C. aus TRB 1 A-1/2, **9:** E. mod EZC A-1/1, **10:** E. mod EZC A-1/2 **(-):** negatif kontrol, **M:** 1 kb marker).



M **1** **2** **3** **4** **5** **6** **7** **8** **(-)**

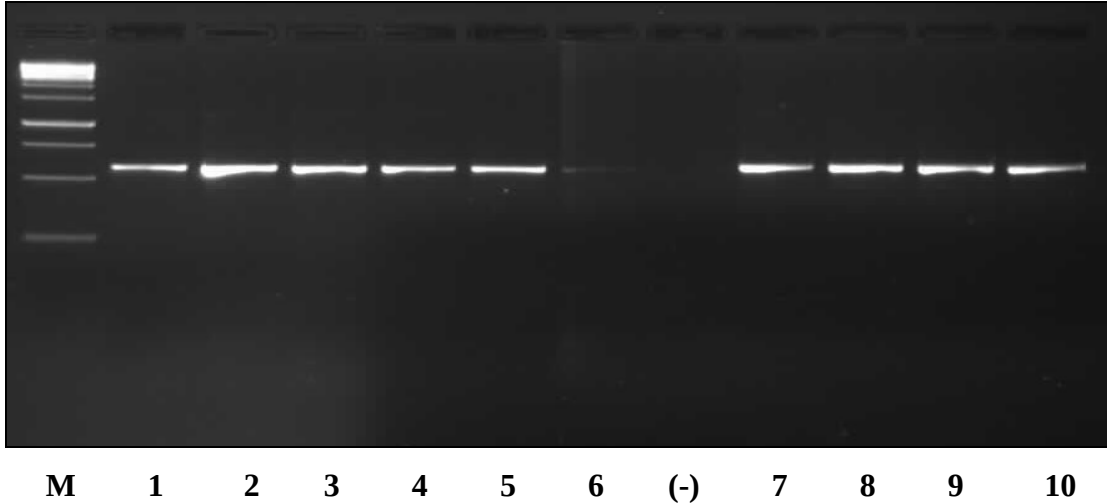
Şekil 55. Alkolle fikse edilmiş *Malpolon monspessulanus*, *Natrix natrix*, *Natrix tessellata* ve *Telescopus fallax* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (**1:** Malp ÇNK 4 A-1/1, **2:** Malp ÇNK 5 A-1/2, **3:** Natrix ÇNK 4 A-1/2, **4:** Natrix ÇNK 1 A-1/1, **5:** N. tes ÇNK 4 A-3/1, **6:** N. tes MUG 2 A-1/1, **7:** Telesc ÇNK 1 A-2/2, **8:** Telesc ÇNK 1 A-

3/1, (-): negatif kontrol, **M**: 1 kb marker).



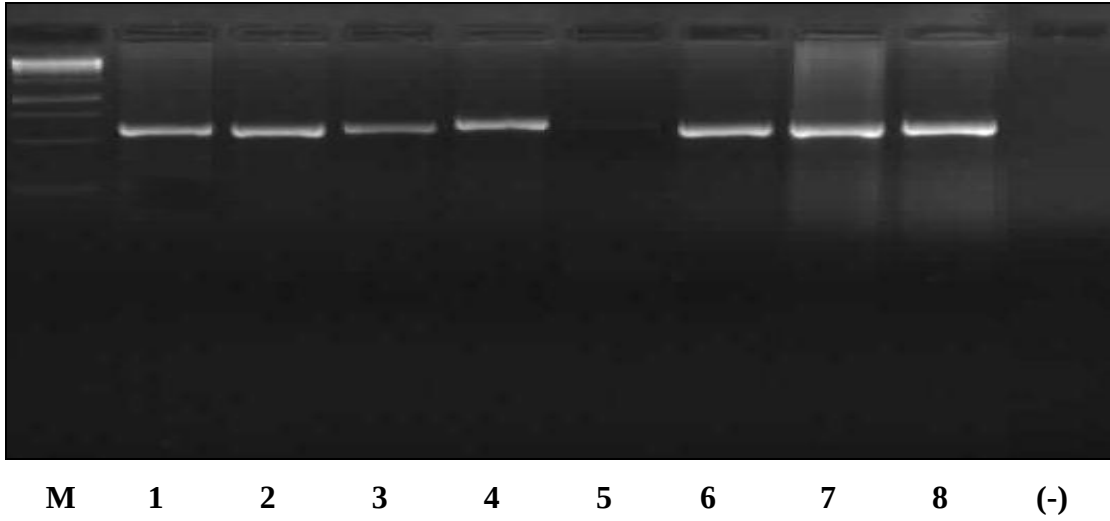
Şekil 56. Alkolle fikse edilmiş *Macrovipera lebetina* ve *Montivipera xanthina* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: Macro ADI A-1/1, 2: Macro ADI A-1/2, 3: M.x. AFY 2 A-3/1, 4: M.x. AFY 2 A-3/2, 5: M.x. AFY 2 A-3/3, (-): negatif kontrol, **M**: 1 kb marker).

4.2.1.2. Cytochrome B Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular

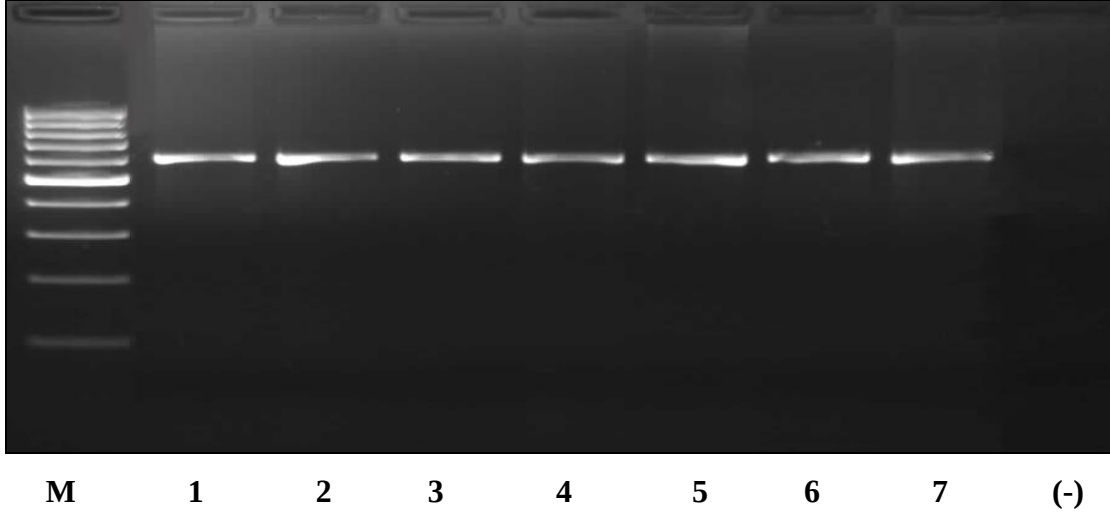


Şekil 57. Alkolle fikse edilmiş *Mertensiella caucasica*, *Lyciasalamandra luschani*, *Triturus karelinii*, *Lissotriton vulgaris*, *Ommatotriton vittatus* ve *Bufo bufo* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: M. cauc TRB 1 A-2/1, 2: M. cauc TRB 1 A-2/2, 3: Lyc. lus MUG 1 A-1/2, 4: Lyc. lus MUG 1 A-2/2, 5: Lis vul ÇNK 1 A-1/1, 6: T. kareli ÇNK 1 A-1/1, 7: T. kareli ÇNK 1 A-2/1, 8: Om. vit TRB 1 A-1/1, 9: Bufo ÇNK 1 A-1/1,

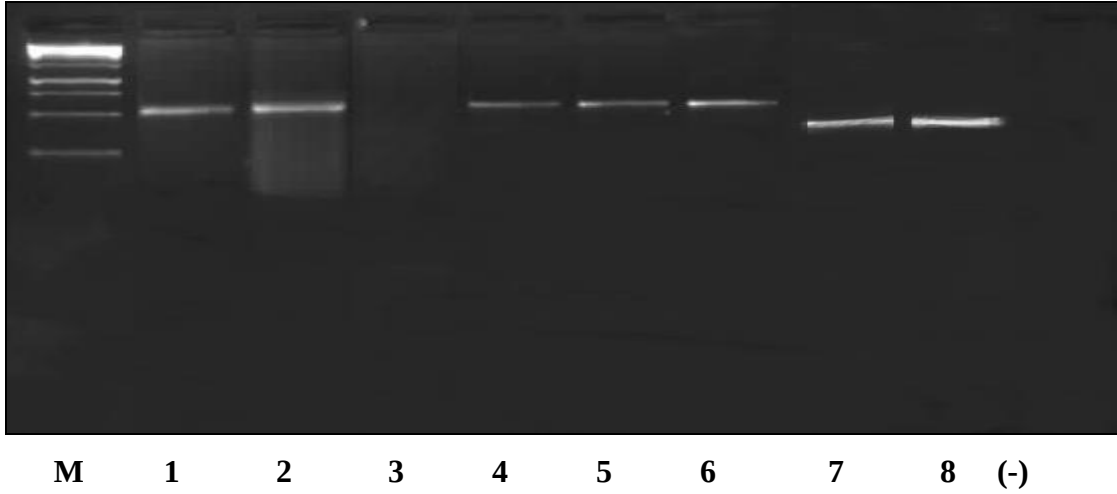
10. Bufo ÇNK 1 A-1/2, (-): negatif kontrol, **M**: 1 kb marker).



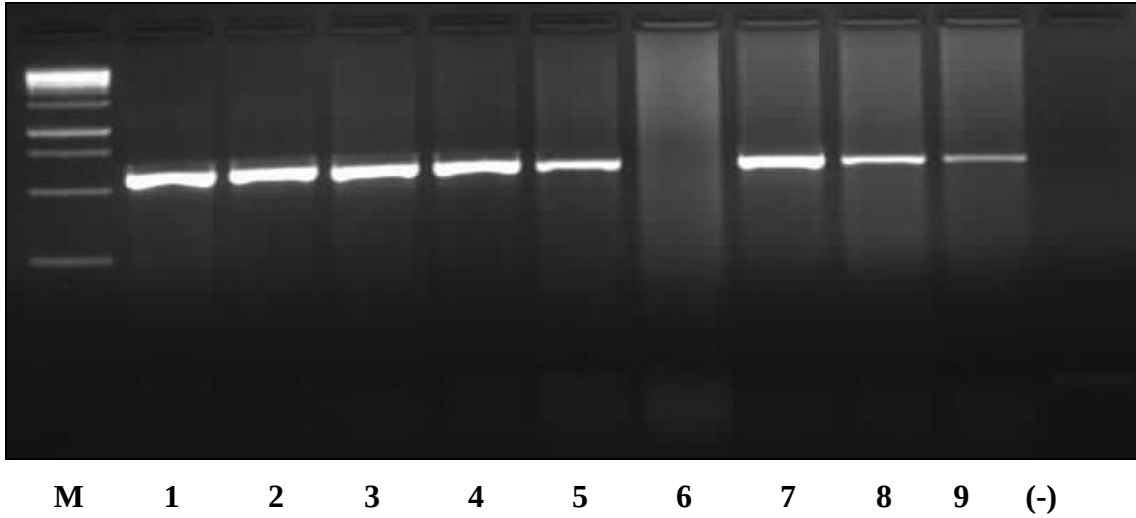
Şekil 58. Alkolle fikse edilmiş *Hyla arborea*, *Pseudepidalea viridis*, *Rana dalmatina* ve *Pelobates syriacus* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: Hyla ÇNK 1 A-1/1, 2: Hyla ÇNK 1 A-1/2, 3: P. vir ÇNK 1 A-1/1, 4: P. vir ÇNK 1 A-1/2, 5: R. dal ÇNK 2 A-1/1, 6: R. dal ÇNK 2 A-2/2, 7: Pel syr ÇNK 1 A-2/1, 8: Pel syr ÇNK 1 A-2/2, (-): negatif kontrol, **M**: 1 kb marker).



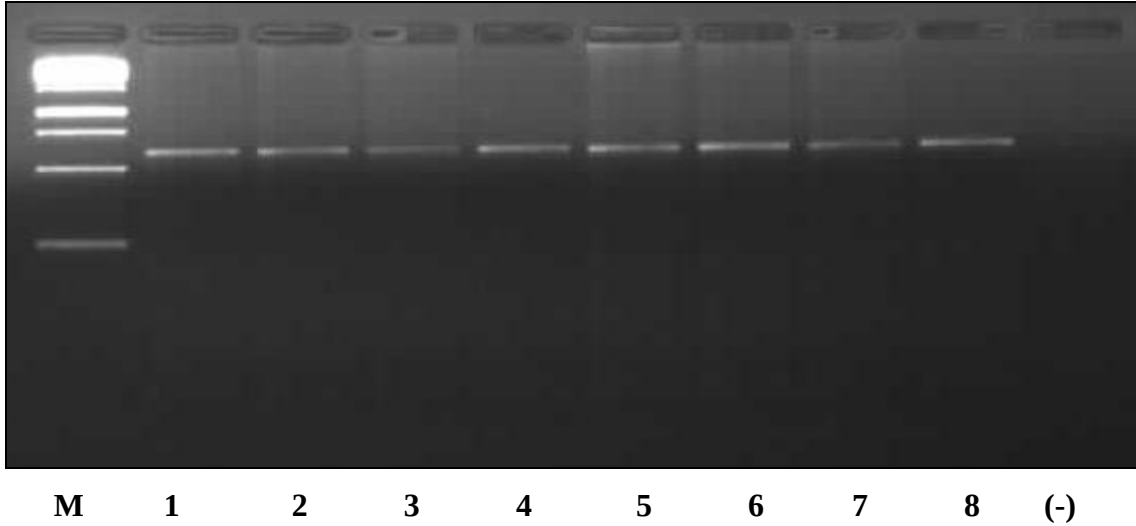
Şekil 59. Alkolle fikse edilmiş *Rana macrocnemis*, *Pelophylax ridibundus*, *Laudakia stellio* ve *Phrynocephalus persicus* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: R. macro TRB 1 A-1/2, 2: P. rid ÇNK 1 A-1/1, 3: P. rid ÇNK 1 A-1/2, 4: L. stell HTY A-1/1, 5: L. stell HTY A-1/2, 6: P. pers IDR A-1/1, 7: P. pers IDR A-1/2, (-): negatif kontrol, **M**: 1 kb marker).



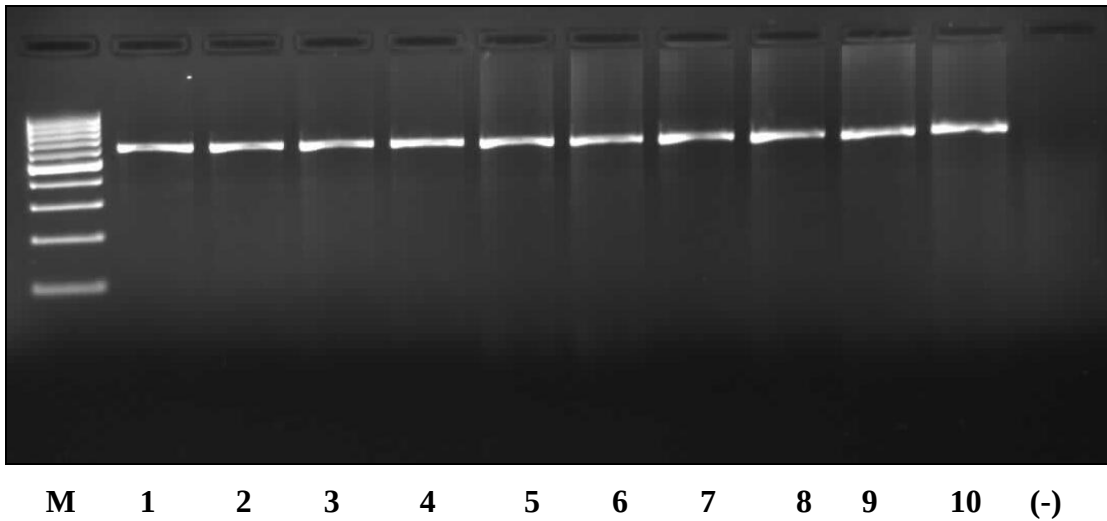
Şekil 60. Alkolle fikse edilmiş *Darevskia valentini*, *Asaccus elisae*, *Eremias strauchi*, *Anatololacerta danfordi* ve *Lacerta laevis* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: D. val BYB A-1/2, 2: D. val SNP A-1/1, 3: A. elis URF A-1/1, 4: E. stra IDR A-1/2, 5: E. stra IDR A-2/1, 6: L. danf. MUG 2 A-1/2, 7: L. danf KNY A-1/1, 8: L. laev HTY A-2/1, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).



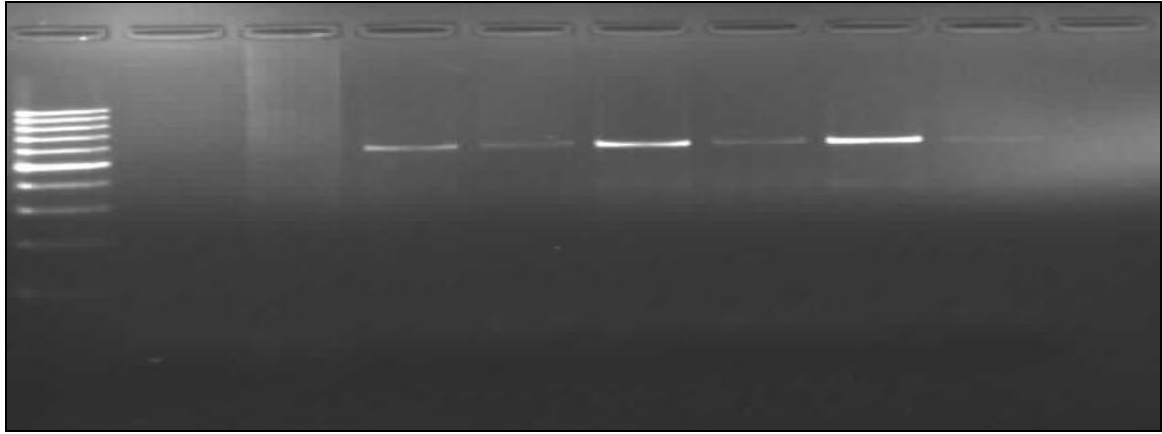
Şekil 61. Alkolle fikse edilmiş *Apathya cappadocica*, *Lacerta viridis*, *Parvilacerta parva*, *Podarcis muralis* ve *Podarcis taurica* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: A. cappa ATP A-1/1, 2: A. cappa HTY A-1/1, 3: L. vir ÇNK 3 A-2/1, 4: L. vir ÇNK 1 A-1/1, 5: P. parva BOL 1 A-1/1, 6: P. parva BOL 1 A-1/2, 7: P. mura ÇNK 1 A-1/1, 8: P. mura ÇNK 1 A-1/2, 9: P. taur ÇNK 3 A-1/1, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).



Şekil 62. Alkolle fikse edilmiş *Podarcis taurica*, *Trachylepis aurata*, *Eryx jaculus*, *Dolichophis caspius* ve *Platycephalus najadum* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: P. taur ÇNK 3 A-1/2, 2: T. aura ÇNK 1 A-1/1, 3: T. aura ÇNK 1 A-1/2, 4: Eryx IDR 1 A-1/2, 5: Eryx ADN A-1/1, 6: Casp ÇNK 4 A-2/3, 7: Casp ÇNK 5 A-1/3, 8: Naj ÇNK 1 A-2/1, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

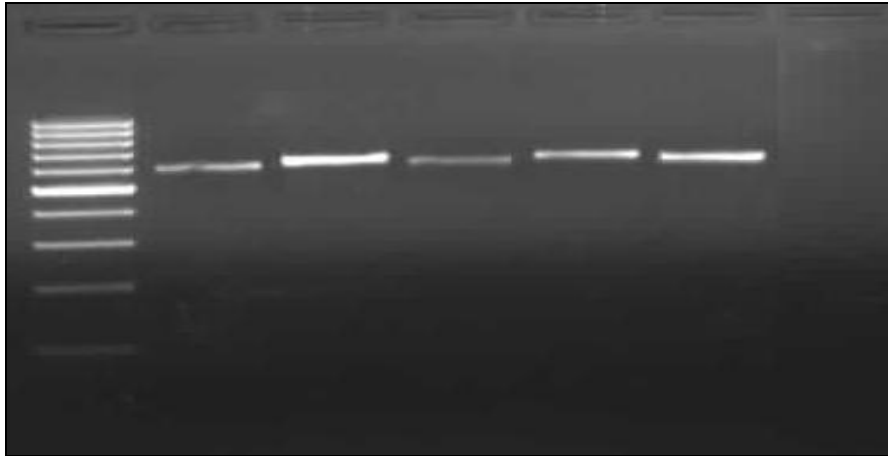


Şekil 63. Alkolle fikse edilmiş *Dolichophis jugularis*, *Hemorrhoids nummifer*, *Platycephalus collaris*, *Coronella austriaca* ve *Eirenis modestus* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: D. jug MUG 2 A-1/3, 2: D. jug MUG 2 A-2/2, 3: H. num AFY 2 A-1/2, 4: H. num AFY 2 A-1/3, 5: P. col ÇNK 1 A-1/2, 6: P. col ÇNK 1 A-1/3, 7: C. aus TRB 1 A-1/1, 8: C. aus TRB 1 A-1/2, 9: E. mod EZC A-1/1, 10: E. mod EZC A-1/2 (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).



M 1 2 3 4 5 6 7 8 (-)

Şekil 64. Alkolle fikse edilmiş *Malpolon monspessulanus*, *Natrix natrix*, *Natrix tessellata* ve *Telescopus fallax* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: Malp ÇNK 4 A-1/1, 2: Malp ÇNK 5 A-1/2, 3: Natrix ÇNK 4 A-1/2, 4: Natrix ÇNK 1 A-1/1, 5: N. tes ÇNK 4 A-3/1, 6: N. tes MUG 2 A-1/1, 7: Telesc ÇNK 1 A-2/2, 8: Telesc ÇNK 1 A-3/1, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

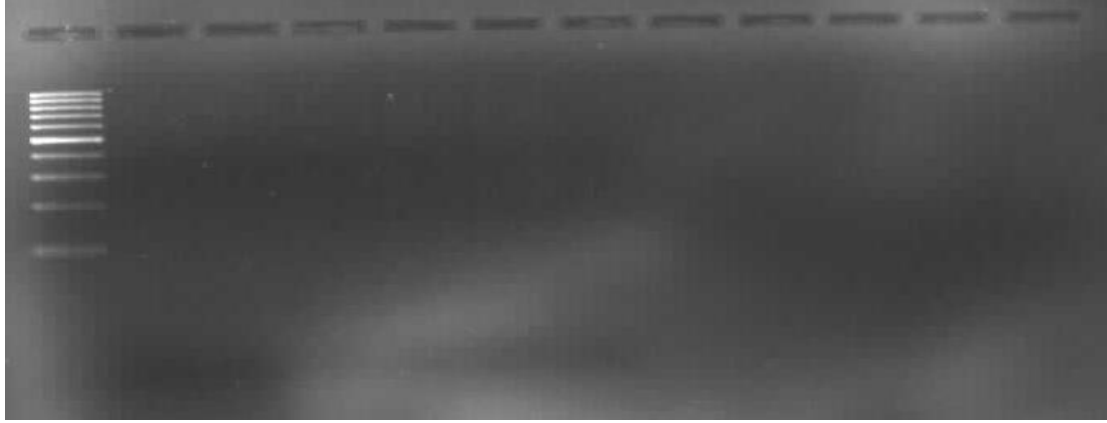


M 1 2 3 4 5 (-)

Şekil 65. Alkolle fikse edilmiş *Macrovipera lebetina* ve *Montivipera xanthina* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: Macro ADI A-1/1, 2: Macro ADI A-1/2, 3: M.x. AFY 2 A-3/1, 4: M.x. AFY 2 A-3/2, 5: M.x. AFY 2 A-3/3, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

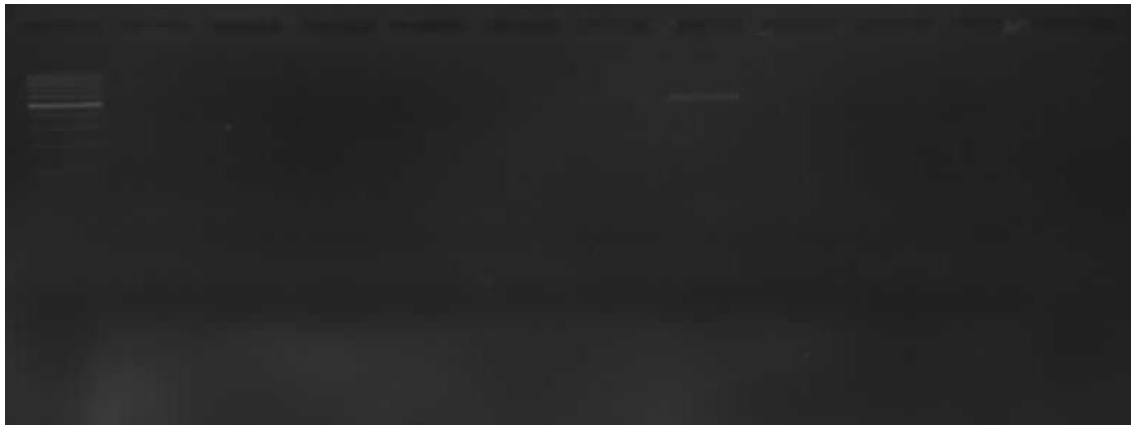
4.2.2. Formaldehitte Fikse Edilmiş Örneklerin DNA Çoğaltma Bulguları

4.2.2.1. 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (-)

Şekil 66. Formaldehitte fikse edilmiş *Lissotriton vulgaris*, *Bufo bufo*, *Pseudepidalea viridis*, *Hyla arborea*, *Pelobates syriacus*, *Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis*, *Pelophylax ridibundus*, *Anatololacerta danfordi* ve *Lacerta viridis* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: Lis vul ÇNK 1 F-1/1, 2: Bufo ÇNK 1 F-1/2, 3: P. vir ÇNK 1 F-1/1, 4: Hyla ÇNK 2 F-1/2, 5: Pel. syr ÇNK 1 F-1/1, 6: R. dal ÇNK 2 F-1/1, 7: R. macro ERZ 1 F-1/2, 8: P. rid ÇNK 1 F-1/1, 9: L. danf ÇNK 1 F-1/1, 10: L. vir ÇNK 3 F-1/2, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (-)

Şekil 67. Formaldehitte fikse edilmiş *Lacerta trilineata*, *Parvilacerta parva*, *Podarcis muralis*, *Podarcis taurica*, *Trachylepis aurata*, *Eryx jaculus*, *Malpolon monspessulanus*, *Natrix natrix*, *Telescopus fallax* ve *Montivipera xanthina* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: L. tri ÇNK 1 F-1/2, 2: P. parva ERZ 1 F-1/2, 3: P. mura ÇNK 3 F-1/2, 4: P. taurica ERZ 1 F-1/2, 5: T. aurata ERZ 1 F-1/2, 6: E. jaculus ERZ 1 F-1/2, 7: M. monspessulanus ERZ 1 F-1/2, 8: N. natrix ERZ 1 F-1/2, 9: T. fallax ERZ 1 F-1/2, 10: M. xanthina ERZ 1 F-1/2, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

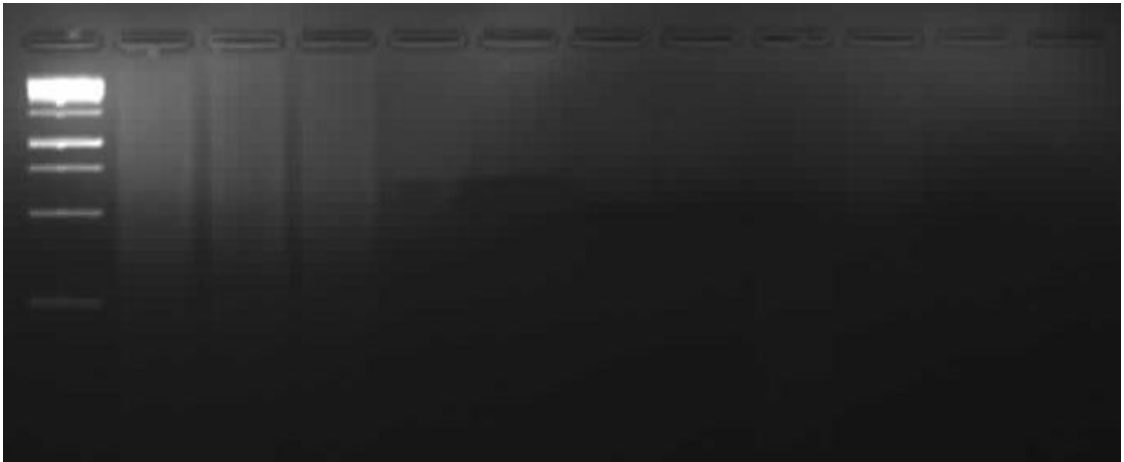
1/1, **4:** P. taur ÇNK 2 F-1/2, **5:** T. aura ÇNK 1 F-1/1, **6:** Eryx ÇNK 1 F-1/2, **7:** Malp ÇNK 1 F-1/1, **8:** Natrix ÇNK 1 F-1/1, **9:** Telesc ÇNK 1 F-1/1, **10:** M.x. ÇNK 1 F-1/2, **(-):** negatif kontrol, **M:** 1 kb marker).

4.2.2.2. Cytochrome B Gen Bölgesinin Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular



M **1** **2** **3** **4** **5** **6** **7** **8** **9** **10** **(-)**

Şekil 68. Formaldehitte fikse edilmiş *Lissotriton vulgaris*, *Bufo bufo*, *Pseudepidalea viridis*, *Hyla arborea*, *Pelobates syriacus*, *Rana dalmatina*, *Rana macrocnemis*, *Pelophylax ridibundus*, *Anatololacerta danfordi* ve *Lacerta viridis* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (**1:** Lis vul ÇNK 1 F-1/1, **2:** Bufo ÇNK 1 F-1/2, **3:** P. vir ÇNK 1 F-1/1, **4:** Hyla ÇNK 2 F-1/2, **5:** Pel. syr ÇNK 1 F-1/1, **6:** R. dal ÇNK 2 F-1/1, **7:** R. macro ERZ 1 F-1/2, **8:** P. rid ÇNK 1 F-1/1, **9:** L. danf ÇNK 1 F-1/1, **10:** L. vir ÇNK 3 F-1/2, **(-):** negatif kontrol, **M:** 1 kb marker).

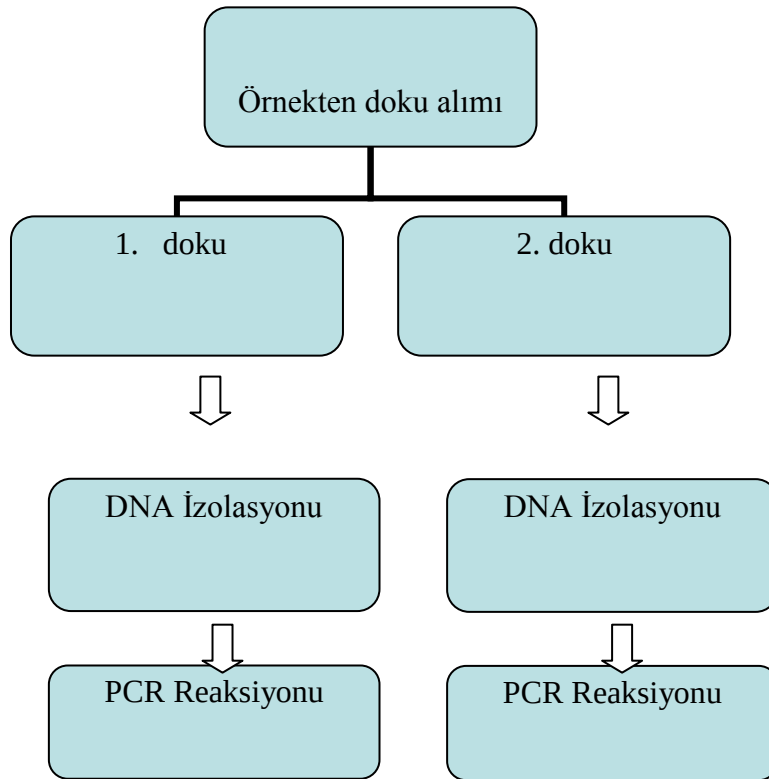


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (-)

Şekil 69. Formaldehitte fikse edilmiş *Lacerta trilineata*, *Parvilacerta parva*, *Podarcis muralis*, *Podarcis taurica*, *Trachylepis aurata*, *Eryx jaculus*, *Malpolon monspessulanus*, *Natrix natrix*, *Telescopus fallax* ve *Montivipera xanthina* türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları (1: L. tri ÇNK 1 F-1/2, 2: P. parva ERZ 1 F-1/2, 3: P. mura ÇNK 3 F-1/1, 4: P. taur ÇNK 2 F-1/2, 5: T. aura ÇNK 1 F-1/1, 6: Eryx ÇNK 1 F-1/2, 7: Malp ÇNK 1 F-1/1, 8: Natrix ÇNK 1 F-1/1, 9: Telesc ÇNK 1 F-1/1, 10: M.x. ÇNK 1 F-1/2, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

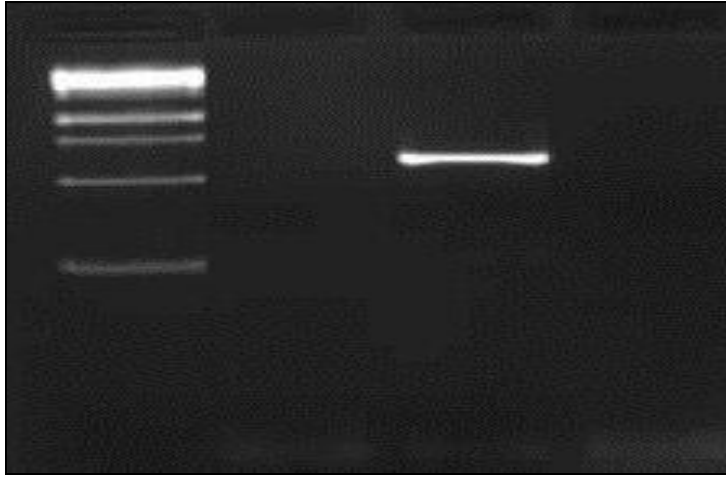
4.2.2.3. Formaldehitli Alkol Karışımı ile Fikse Edilmiş Örneklerle Ait İstisnai Bulgular

Çalışma esnasında DNA izolasyon aşaması tamamlanan formaldehitli alkol ile fikse edilmiş örneklerden PCR reaksiyonu kurulduğu sırada, bazı örneklerde farklı sonuçlar alınmıştır. Aynı örneğin karaciğer dokusundan 2 parça halinde alınarak aynı koşullarda DNA izolasyonu yapılan ve PCR reaksiyonu kurulan örneklerin birinden başarılı bir sonuç elde edilirken, diğerinden sonuç alınamamıştır.



Şekil 70. Formaldehitte fikse edilmiş *Lacerta trilineata* türüne ait bir örnek için izlenen yol

Yapılan işlemlerin ardından alınan sonuçlar şu şekildedir;



M 1 2 (-)

Şekil 71. Formaldehitte fikse edilmiş *Lacerta trilineata* türüne ait bir örneğin DNA çoğaltma bulguları (1: Örnekten alınan ilk doku parçası, 2: Örnekten alınan ikinci doku parçası, (-): negatif kontrol, M: 1 kb marker).

4.3. DNA Dizi Analizi Bulguları

Koleksiyon dahilinde bulunan yarı zehirli ve zehirli yılan türlerine ait örneklerin yalnızca alkol ile fikse edilmiş olanların PCR yöntemiyle DNA çoğaltma işlemleri başarıyla tamamlanmış, ardından örnekler iki gen bölgesinin dizi analizleri İntergen Genetik Merkezi'ne gönderilmiştir. Gelen örnekler değerlendirmeye tabii tutularak NCBI veritabanı kullanılarak BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) işlemi yapılmıştır. Böylece çalışılan her bir türün önceki çalışmalarla gösterdiği uyumluluk hizalama işlemi gerçekleştirilerek kontrol edilmiştir.

Query	1	AGGATCAAACATCTCCACCTGATGAACTTCGGATCCATACTCCTAACTTGCCTAATACT	60
Sbjct	45	AGGATCAAACATCTCCACCTGATGAACTTCGGATCCATACTCCTAACTTGCCTAATACT	104
Query	61	CCAAATCATAACCGGATTCTTCTTAGCAATCCACTATACAGCAGATGTAAATCTAGCCTT	120
Sbjct	105	CCAAATCATAACCGGATTCTTCTTAGCAATCCACTATACAGCAGATGTAAATCTAGCCTT	164
Query	121	CTCATCAGTGGTCCATATCACACGAGATGTGCCATATGGGTGAATTATACAAAATACCCA	180
Sbjct	165	CTCATCAGTGGTCCATATCACACGAGATGTGCCATATGGGTGAATTATACAAAATACCCA	224
Query	181	CGCAATCGGAGCATCCCTATTTTTCATTTGTATCTACACCCATATCGCTCGAGGACTCTA	240
Sbjct	225	CGCAATCGGAGCATCCCTATTTTTCATTTGTATCTACACCCATATCGCTCGAGGACTCTA	284
Query	241	TTACGGCTCATAACATAAAACAAAGTCTGGTTATCGGGAACAACACTACTAATCATCCT	300
Sbjct	285	TTACGGCTCATAACATAAAACAAAGTCTGGTTATCGGGAACAACACTACTAATCATCCT	344
Query	301	AATAGCAACAGCATTCTTCGGGTACGTCCTGCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGCCGC	360
Sbjct	345	AATAGCAACAGCATTCTTCGGGTACGTCCTGCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGCCGC	404
Query	361	AACAGTAATTACCAACCTACTAAGTCTATCCCTTATCTAGGAACAACCATAACAACCTTG	420
Sbjct	405	AACAGTAATTACCAACCTACTAAGTCTATCCCTTATCTAGGAACAACCATAACAACCTTG	464
Query	421	ATTATGAGGAGGATTCTCAATCAATAACCCAACCCCTTACCCGCTTCTTTGCCTTACACTT	480
Sbjct	465	ATTATGAGGAGGATTCTCAATCAATAACCCAACCCCTTACCCGCTTCTTTGCCTTACACTT	524
Query	481	CATCCTCCCC	490
Sbjct	525	CATCCTCCCC	534

Şekil 72: *Malpolon monspessulanus* türünün **Cytochrome B** gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 490 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AY188029.1 erişim numaralı *Malpolon monspessulanus* Cytochrome B gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %100 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	1	CAAGTATTAAGGCAACGCCTGCCAGTGAACAATTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGT	60
Sbjct	18	CAAGTATTAAGGCAACGCCTGCCAGTGAACAATTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGT	77
Query	61	GCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTATTAAATTGTAGACCCGTATGAAAGGCCAAAATGAGG	120
Sbjct	78	GCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTATTAAATTGTAGACCCGTATGAAAGGCCAAAATGAGG	137
Query	121	GCCTAACTGTCTCTTATAATTAATCAATTAAACTGATCTCCCAGTACAAAAGCTGGAATA	180
Sbjct	138	GCCTAACTGTCTCTTATAATTAATCAATTAAACTGATCTCCCAGTACAAAAGCTGGAATA	197
Query	181	GAAACATAAGACCAGAAGACCCTGTGAAGCTTAAACTAAACTATTAAACCATATAATAGC	240
Sbjct	198	CTAACATAAGACCAGAAGACCCTGTGAAGCTTAAACTAAACTATTAAACCATATAATAGC	257
Query	241	TCCTATCGGTTGGGGCGACCTTGGaaaaaaaaGAACTTCCAAACAACATAGGCTCTTAA	300
Sbjct	258	TCCTTTTCGGTTGGGGCGACCTTGGAAAAAAAAAAGAACTTCCAAACAACATAGGCTCTTAA	317
Query	301	ACCTACTTATAAGGCCAACAAAGCCAAACAACGACCCAGCATTGCTAATTAATGAAACAAG	360
Sbjct	318	ACCTACTTATAAGGCCAACAAAGCCAAACAACGACCCAGCATTGCTGATTAATGAAACAAG	377
Query	361	TTACTCCAGGGATAACAGCGCTATCTTCTTCAAGAGCCCATCTCAAAAAGGAGGTTTACG	420
Sbjct	378	TTACTCCAGGGATAACAGCGCTATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAAGGTTTACG	437
Query	421	ACCTCGATGTTGGATCAGGACTTCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGGTTTCGTTGTTT	480
Sbjct	438	ACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAAGGGTTTCGTTGTTT	497
Query	481	AACGATTAATAGTCCC	496
Sbjct	498	AACGATTAATAGTCCC	513

Şekil 73: *Malpolon monspessulanus* türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 496 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AY188068.1 erişim numaralı *Malpolon monspessulanus* 16S rRNA gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun % 99 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	1	GGATCCAATATCTCAACTTGATGAACTTCGGATCCATGCTACTGACCTGTTCAATTATA	60
Sbjct	46	GGATCCAATATCTCAACTTGATGAACTTCGGATCCATGCTACTCACCTGTTCAATTATA	105
Query	61	CAAACTATCACGGGCTTCTTCTTAGCCATCCACTACACGCCAACATCAACTTAGCCTTT	120
Sbjct	106	CAAACTATCACGGGCTTCTTCTTAGCCATCCACTACACGCCAACATCAACTTAGCCTTT	165
Query	121	TCATCCGTCATCCACATCACCCGAGACGTACCCTACGGGTGAATCATACAAAACCTCCAC	180
Sbjct	166	TCATCCGTCATCCACATCACCCGAGACGTACCCTACGGGTGAATCATACAAAACCTCCAC	225
Query	181	GCCATCGGAGCATCAATATTCTTCATCTGTGTTTATATCCATATCGCACGTGGACTTTAC	240
Sbjct	226	GCCATCGGAGCATCAATATTCTTCATCTGTGTTTATATCCATATCGCACGTGGACTTTAC	285
Query	241	TACGGATCTTACTTAAATAAAAAACGTATGACTATCTGGGACTACCTCCTCTTCATCCTA	300
Sbjct	286	TACGGATCTTACTTAAATAAAAAACGTATGACTATCTGGGACTACCTCCTCTTCATCCTA	345
Query	301	ATAGCAACAGCCTTTTTTGGCTACGTTCTACCATGGGGACAGATATCTTTCTGAGCCGCA	360
Sbjct	346	ATAGCAACAGCCTTTTTTGGCTACGTTCTACCATGGGGACAGATATCTTTCTGAGCCGCA	405
Query	361	ACAGTAATCACAAAACCTACTAACAGCAGTACCGTACATCGGCACCACACTCACCCTTGA	420
Sbjct	406	ACAGTAATCACAAAACCTACTAACAGCAGTACCGTACATCGGCACCACACTCACCCTTGA	465
Query	421	CTCTGAGGCGGATTCTCAATCAACGACCCAACCTGACTCGATTCTTTGCCCTTC	475
Sbjct	466	CTCTGAGGCGGATTCTCAATCAACGACCCAACCTGACTCGATTCTTTGCCCTTC	520

Şekil 74: *Telescopus fallax* türünün **Cytochrome B** gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 475 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AY188039.1 erişim numaralı *Telescopus fallax* Cytochrome B gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %99 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	1	GCAACGCCTGCCAGTGAACAATTTAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA	60
Sbjct	27	GCAACGCCTGCCAGTGAACAATTTAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA	86
Query	61	TAATCATTGTCTACTAATTATAGACTTGTATGAAAGGCCAAAATGAGGGTCTAACTGTCT	120
Sbjct	87	TAATCATTGTCTACTAATTATAGACTTGTATGAAAGGCCAAAATGAGGGTCTAACTGTCT	146
Query	121	CTTATAATTAATCAATTAAGCTGATCCCGGGTAATAAAGCCCGGATACCACCATAAGAC	180
Sbjct	147	CTTATAATTAATCAATTAAGCTGATCCCGGGTAATAAAGCCCGGATACCACCATAAGAC	206
Query	181	CAGAAGACCCTCTGAAGCTTAACTAACTATTAAACCCCATATAAGCTAATTTCTGTG-	239
Sbjct	207	CAGAAGACCCTCTGAAGCTTAACTAACTATTAAACCCCATATAAGCTAATTTCTG-GTT	265
Query	240	GGGGCGACCTTGGAaaaaaaGAACCTTCCAACAAAGTGACCTTACTCACACCAAATAGG	299
Sbjct	266	GGGGCGACCTTGGAaaaaaaGAACCTTCCAACAAAGTGACCTTACTCACACCAAATAGG	325
Query	300	CCTACAGGCCAATAAATGACCCAGCACAGCTGATAAATGAACCAAGTTACTCCAGGGATA	359
Sbjct	326	CCTACAGGCCAATAAATGACCCAGCACAGCTGATAAATGAACCAAGTTACTCCAGGGATA	385
Query	360	ACACCGCAATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAAGGTTTACGACCTCGATGTTGGA	419
Sbjct	386	ACACCGCAATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAAGGTTTACGACCTCGATGTTGGA	445
Query	420	TCAGGACATCCTAATGGTGCATCCGCTATTAAGCGTTCGTTTGTTCACGATTAATAGTC	479
Sbjct	446	TCAGGACATCCTAATGGTGCATCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAATAGTC	505
Query	480	CC	481
Sbjct	506	CC	507

Şekil 75: *Telescopus fallax* türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 481 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AY188078.1 erişim numaralı *Telescopus fallax* 16S rRNA gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %99 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	1	TGGCCTTCTCATCCATCATCCACATCACCCGAGATGTCCCATATGGCTGGATCATACAAA	60
Sbjct	83	TGGCCTTCTCATCCATCATCCACATCACCCGAGATGTCCCATATGGCTGGATCATACAAA	142
Query	61	ACACACACGCCATCGGAGCATCCATATTCTTCATTTGTATTTACACACACATTGCACGAG	120
Sbjct	143	ACACACACGCCATCGGAGCATCCATATTCTTCATTTGTATTTACACACACATTGCACGAG	202
Query	121	GCCTATATTACGGATCCTACTTAAATAAAGAAGTGTGACTGTCAGGCACCATCCTTCTAA	180
Sbjct	203	GCCTATATTACGGATCCTACTTAAATAAAGAAGTGTGACTGTCAGGCACCATCCTTCTAA	262
Query	181	TCATTCTTATAGCAACAGCCTTCTTCGGCTACGTCCTACCATGAGGTCAAATATCATTCT	240
Sbjct	263	TCATTCTTATAGCAACAGCCTTCTTCGGCTACGTCCTACCATGAGGTCAAATATCATTCT	322
Query	241	GAGCAGCAACAGTAATTACCAACCTCCTAACAGCAATCCCATATCTTGGGACCACTCTAA	300
Sbjct	323	GAGCAGCAACAGTAATTACCAACCTCCTAACAGCAATCCCATATCTTGGGACCACTCTAA	382
Query	301	CTACCTGACTATGAGGGGGCTTCTCTATCAACGACCCAACTGACTCGATTTTTTGCCC	360
Sbjct	383	CTACCTGACTATGAGGGGGCTTCTCTATCAACGACCCAACTGACTCGATTTTTTGCCC	442
Query	361	TCCACTTCATCGTACCTTTTACTATTATTTGCTATCCTCCATCCACATTCTACTCCTCC	420
Sbjct	443	TCCACTTCATCCTACCTTTTACTATTATTTGCTATCCTCCATCCACATTCTACTCCTCC	502
Query	421	ATAATGTGGGTTCCAGCAACCCACTAGGGACAAACTCTGACATCGACAAAATCACATTC	479
Sbjct	503	ATAATGAGGGTTCCAGCAACCCACTAGGGACAAACTCTGACATCGACAAAATCCCATTC	561

Şekil 76: *Montivipera xanthina* türünün **Cytochrome B** gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 479 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AJ275724.1 erişim numaralı *Montivipera xanthina* Cytochrome B gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %99 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	4	GAGAGTCCGACTGTCTCTTATAACAAATCAATTAAACTGATCTCCCAGTACAAAAGCTGG	63
Sbjct	9	GAGAGTCCGACTGTCTCTTATAACAAATCAATTAAACTGATCTCCCAGTACAAAAGCTGG	68
Query	64	GATACCACCATAAGACCAGAAGACCCTGTGAAGCTTTAACTAACCTATTAAACCTAATAA	123
Sbjct	69	GATACCACCATAAGACCAGAAGACCCTGTGAAGCTTTAACTAACCTATTAAACCTAATAA	128
Query	124	TAGCTAATTTTCGGTTGGGGCGACCTTGGAAACACAAAAGAACTTCCACACATATGACCTCC	183
Sbjct	129	TAGCTAATTTTCGGTTGGGGCGACCTTGGAAACACAAAAGAACTTCCACACATATGACCTCC	188
Query	184	TCATACAAAAGGCAAACAAGCTACATTAGACCCAGTATGTCTGATAAATGAACCTAAGTTA	243
Sbjct	189	TCATACAAAAGGCAAACAAGCCACATTAGACCCAGTATATCTGATAAATGAACCTAAGTTA	248
Query	244	CTCCAGGGATAACAGCGCTATATTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAGGTTTACGACC	303
Sbjct	249	CTCCAGGGATAACAGCGCTATATTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAGGTTTACGACC	308
Query	304	TCGATGTTGGATCAGGACATCCTAGCAATGCAACCGATTCTAAGGGTTTCGTTT	356
Sbjct	309	TCGATGTTGGATCAGGACATCCTAGCAATGCAACCGTTTCTAAGGGTTTCGTTT	361

Şekil 77: *Montivipera xanthina* türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 356 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AJ275777.1 erişim numaralı *Montivipera xanthina* 16S rRNA gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %99 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	1	TGCCTAATAATCCAAACCGTTACCGGGTTCTTCTGGCAGTCCACTACTCAGCCAATATT	60
Sbjct	19	TGCCTAATAATCCAAACCGTTACCGGGTTCTTCTGGCAGTCCACTACTCAGCCAATATT	78
Query	61	AACCTAGCCTTCTCATCCATCATCCACATCACCCGAGATGTGCCATACGGTTGAATCATA	120
Sbjct	79	AACCTAGCCTTCTCATCCATCATCCACATCACCCGAGATGTGCCATACGGTTGAATCATA	138
Query	121	CAGAACTCACATGCTATCGGCGCATCCATATTCTTCATTTGCATTTACACACACATTGCA	180
Sbjct	139	CAGAACTCACATGCTATCGGCGCATCCATATTCTTCATTTGCATTTACACACACATTGCA	198
Query	181	CGAGGGCTCTACTATGGGTCTTACCTAAATAAAGAAGTATGACTATCAGGCACCATCCTC	240
Sbjct	199	CGAGGGCTCTACTATGGGTCTTACCTAAATAAAGAAGTATGACTATCAGGCACCATCCTC	258
Query	241	CTAATCATCCTTATAGCAACAGCCTTCTTCGGTTACGTTTTACCATGAGGTCAAATATCA	300
Sbjct	259	CTAATCATCCTTATAGCAACAGCCTTCTTCGGTTACGTTTTACCATGAGGTCAAATATCA	318
Query	301	TTCTGAGCAGCAACAGTAATTACCAACCTCTTAACAGCAATCCCATACCTAGGAACAAC	360
Sbjct	319	TTCTGAGCAGCAACAGTAATTACCAACCTCTTAACAGCAATCCCATACCTAGGAACAAC	378
Query	361	CTTACCACCTTGACTATGAGGGGGCTTCTCCATCAACGACCCAACCTAACTCGATTTTTT	420
Sbjct	379	CTTACCACCTTGACTATGAGGGGGCTTCTCCATCAACGACCCAACCTAACTCGATTTTTT	438
Query	421	GCCCTTCACTTCATCCTACCTTTCACTATTATCTCATTATCTTCT	465
Sbjct	439	GCCCTTCACTTCATCCTACCTTTCACTATTATCTCATTATCTTCT	483

Şekil 78: *Macrovipera lebetina* türünün **Cytochrome B** gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 465 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AJ275713.1 erişim numaralı *Macrovipera lebetina* Cytochrome B gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %100 olduğu gözlemlenmiştir.

Query	6	GTCTCTTATAACAAATCAATTAACTGATCTCCCGTACAAAAGCTGGAATATCACCATA	65
Sbjct	21	GTCTCTTATAACAAATCAATTAACTGATCTCCCGTACAAAAGCTGGAATATCACCATA	80
Query	66	AGACCAGAAGACCTGTGAAGCTTTAACTAACCTATTAAACCAAATAAGCTATATTTCG	125
Sbjct	81	AGACCAGAAGACCTGTGAAGCTTTAACTAACCTATTAAACCAAATAAGCTATTTTCG	140
Query	126	GTTGGGCGACCTTGAACAAAAAGAACTTCCAAATATATGACTCCCTCATACTAAGGC	185
Sbjct	141	GTTGGGCGACCTTGAACAAAAAGAACTTCCAAATATATGACTCCCTCATACTAAGGC	200
Query	186	AAACAAGCCACATTAGACCCAGTATATCTGATAAATGAACCAAGTTACTCCAGGGATAAC	245
Sbjct	201	AAACAAGCCACATTAGACCCAGTATATCTGATAAATGAACCAAGTTACTCCAGGGATAAC	260
Query	246	AGCGCTATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAAAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	305
Sbjct	261	AGCGCTATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAAGAAAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC	320
Query	306	AGGACATCCTATCAATGCAACGGTTACTAAGGGTTTCGTTTGTTC AAC	352
Sbjct	321	AGGACATCCTAGCAATGCAACCGTTACTAAGGGTTTCGTTTGTTC AAC	367

Şekil 79: *Macrovipera lebetina* türünün **16S rRNA** gen bölgesinin hizalama sonucu (Query: Bulgularımız, Sbjct: Önceki bulgular)

Bu bulgunun elde edilmesi sırasında 352 bazlık bölge hizalanmıştır. Karşılaştırma yapmak üzere NCBI AJ275766.1 erişim numaralı *Macrovipera lebetina* 16S rRNA gen bölgesi seçilmiştir. İşlem sırasında uyumluluğun %99 olduğu gözlemlenmiştir.

4.4. Tartışma

4.4.1. Formaldehit Fiksasyonunun Moleküler Çalışmalardaki Rolü

Müze materyalinden yalnızca morfolojik ve morfolojiye dayalı sistematik çalışmalarda yararlanılmasının yanı sıra, moleküler taksonomi ve filogeni çalışmalarında da faydalanılması düşüncesi günümüzde oldukça yaygın hale gelmiştir. Ancak söz konusu materyalin tespitinde kullanılan fiksatif içeriği, materyalin toplanma ve fikse edilme aşamaları arasında geçen süre gibi fiziksel ve kimyasal etmenler bu noktada büyük önem kazanmaktadır. Bu anlamda; Schander ve Halanych (2003) çalışmalarında zoolojik müze

materyalindeki en büyük problemin; fiksatif olarak sırf formaldehit kullanılması ve fiksasyon detaylarının bilinmemesi olarak açıklamışlardır. Söz konusu çalışmada; alkolün, formaldehitin DNA üzerindeki olumsuz etkisini gidermekte kullanılabileceği rapor edilmiştir. Ancak çalışmamızda kullanılan formaldehitli alkol karışımı ile fikse edilmiş örneklerden moleküler bazda sağlıklı sonuçlar alamamamız; Schander ve Halanych'in bulgularını desteklememektedir.

Benzer biçimde; Rogers ve arkadaşları (1990), Greer ve arkadaşları (1991), Forsthoefel ve arkadaşları (1992) ve Hamazaki ve arkadaşlarının (1993); fiksasyon süresi ile DNA-fiksatif etkileşimi üzerine yaptıkları araştırmalarda, artan fiksasyon süresinin DNA-fiksatif etkileşimini de aynı oranda arttırdığını açıklamışlardır. Yine; Karlsen ve arkadaşlarının (1994) çalışmalarında, fiksasyonun süreye bağlı etkisi araştırılmış ve fiksatife maruziyet süresinin artmasıyla ekstraksiyon kapasitesinin olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir. Çalışmamız dahilindeki örnekler 2003 yılından itibaren muhafaza edilmeye başlanmış olup 2003-2005 yılları arasında toplananlar formaldehitli alkol ile, 2006 yılı itibariyle toplananlar ise sadece alkol ile fikse edilmiştir. Yaklaşık 6-8 yıldır formaldehitli alkol fiksasyonu ile muhafaza edilen bu örneklerden izole edilen DNA miktarları, ortalama 2-3 yıldır alkolle fikse edilip saklanan örneklerden elde edilen DNA miktarlarına oranla oldukça düşüktür ve elde edilen DNA'lar daha degrade durumdadır. Ancak formaldehitli alkol ile fikse edilmiş örnekler kendi aralarında değerlendirildiklerinde; 6 ya da 8 yıl muhafaza edilen örneklerden izole edilen DNA miktarları arasında kayda değer bir fark gözlemlenmemiştir.

Formaldehitli alkol fiksasyonunun yarattığı olumsuz etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla düzenlenmiş altı farklı izolasyon protokolü tespit edilerek çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu protokollerin tespit edildiği referans çalışmalardan Okello ve arkadaşlarının (2010) çalışmalarında, formaldehit fiksasyonu sonrasında kullanılan 10 farklı protokol içerisinde Fenol-Kloroform metodunun en iyi sonucu verdiği rapor edilmiştir. Çalışmamız kapsamına alınan bu protokol, aynı oranda iyi sonuç vermemiş, bu durum çalışılan nükleik materyalin degrade halde olmasına bağlanmıştır. Uygulanan protokollerden biri de Shi ve arkadaşlarının (2004) araştırmalarından uyarlanmıştır. İlgili çalışmada; alkali çözeltiler içerisine alınan formaldehit ile fikse örnekler üzerine uygulanan yüksek sıcaklığın DNA kalitesi ve miktarında artış yaratıp yaratmayacağı araştırılmıştır. Benzer biçimde kurduğumuz deney düzeneğinde 0.1 M NaOH çözeltisi içerisine alınan dokulara 20 dakika boyunca 120°C sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Alınan sonuçlar başarılı bir izolasyonun

gerçekleşmediği yönündedir. Protokol uygulaması esnasında protein parçalayan herhangi bir enzim (Proteinaz K) kullanılmaması; sağlıklı bir izolasyonun gerçekleşmemesini düşündürmüştür.

Bunun yanı sıra; formaldehitin DNA üzerindeki olumsuz etkisi göz önüne alınarak, DNA ile oluşturduğu çapraz bağları kıracağı düşünülen bazı maddelerin eklendiği izolasyon protokolleri üzerinde durulmuştur. Bunlardan birisi Scatena ve Morielle-Versute (2008)'ün çalışmalarıdır. Çalışmada HBSS solüyonu kullanılarak formaldehit dokulardan arındırılmaya çalışılmış, ardından örnekler glisin-NaOH ile muamele edilmiştir. Glisinin bilinen en küçük ve esnek aminoasit olma özelliğinin, formaldehit-DNA etkileşimini bozabileceğini ve böylece nükleik materyalin formaldehitten arınabileceği ihtimalini düşündürmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak ilgili çalışmadaki protokol çalışmamızda da kullanılmış, ancak beklenen olumlu sonuçlar alınamamıştır. Benzer biçimde; Johnson ve arkadaşlarının (1995) ve Shedlock ve arkadaşlarının (1997) çalışmalarında formaldehit fiksasyonunun bir sonucu olarak oluşan çapraz bağları kırmak için glisine ek olarak DTT kullanılmıştır. Ancak bu birliktelik de formaldehiti dokulardan yeterince uzaklaştırmaya yeterli olmamış ve başarılı bir DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilememiştir.

Çalışma kapsamında formaldehitli alkol ile fikse edilen örneklerden DNA izole etmekte kullanılan yöntemlerden biri de Walsh ve arkadaşları (1991) ve Chakraborty ve arkadaşlarının (2006) kullanmış olduğu Chelex-100 metodudur. Chelex-100 iyon değişimi yoluyla diğer bileşikler arındırmakta kullanılması nedeniyle çalışmamızda da tercih edilmiştir. Ancak kullanılan bu yöntem sonucunda da başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirilememiştir. Chakraborty ve arkadaşlarının da denedikleri farklı yöntemler sonucu yalnızca formaldehit ile fikse edilmiş dokudan başarılı bir DNA izolasyonu gerçekleştiremedikleri; ancak farklı müze materyalinde kullanışlı olabileceğini belirtmeleri üzerine denenmiştir.

Formaldehitli örneklerden izolasyon yapmakta kullanılan son yöntem, Isola ve arkadaşlarının (1994) formaldehit ile fikse edilerek parafine gömülen arşiv materyalinden DNA izole etmekte kullandıkları yöntemidir. Bu metot kapsamında kullanılan Hidroliz Buffer içeriği formaldehitin DNA degradasyonu yaratmasında faydalı olan düşük pH ve düşük tuz konsantrasyonlarını dengelemekte kullanılmıştır. Alınan sonuçlar; kullanılan 6 farklı izolasyon yöntemi içerisinde en iyi sonuçların bu protokol uygulaması olduğunu ortaya koymuştur. Bunun sonucunda çalışma dahilindeki formaldehitli materyal dokuları bu yöntem ile izolasyona tabii tutulmuştur.

İzolasyon işlemlerinin tamamlanmasının ardından DNA örneklerine, PCR tekniği ile çoğaltma işlemi uygulanmıştır. Ancak hedeflenen gen bölgeleri yapılan tüm denemelere rağmen çoğaltılamamıştır. Bu hususta; Koshiba ve arkadaşları (1993) formaldehit fiksasyonu esnasında formik asidin düşük pH ve düşük tuz konsantrasyonları ile birleşerek DNA degradasyonu yarattığını rapor etmişlerdir. Karlsten ve arkadaşları (1994) da benzer sonuçlar almış ve bu durumu; formaldehit fiksasyonu esnasında meydana gelen formaldehit-metilen bileşiğinin, çoğaltma işlemi sırasında primerlerin bağlanmasını ve renatürasyonunu engellediğine bağlamışlardır. Yine; Pusch ve arkadaşlarının (1997) çalışması da aynı sonucu desteklemiş; DNA sarmalının, çoğaltma aşamasının ilk denatürasyon basamağında sağlam iki zincire ayrılamadığını, böylece çoğaltma işleminin olumsuz sonuçlandığını tespit etmişlerdir.

Chakraborty ve arkadaşlarının (2006) çalışmasında belirtildiğine göre; formaldehit ile fikse edilerek 3-4 yıl bu koşullarda saklanan örneklerden izolasyon, hedeflenen genin çoğaltılması ve dizi analizlerinin yapılması, aldehit fiksatiflerinin uzun süreli fiksasyonlarda DNA'da belirgin degradasyon yarattığını gösterir. Bu da; formalin türevlerinin çapraz bağlarla oluşturduğu karmaşık bileşikler nedeniyle çoğaltma ve dizi analizi işlemlerini engellediği gerçeğini pekiştirmektedir.

Çalışma boyunca yaptığımız denemeler sonucu formaldehitli alkol solüsyonu ile fikse edilen dokulardan DNA izolasyonu gerçekleştirebilmiş; ancak elde edilen DNA örneklerinden çoğaltma işlemi yapılamamıştır. Bunun için farklı Taq Polimeraz enzimleri (Dream Taq Polimeraz, Go Taq Polimeraz, Go Flexi Taq Polimeraz, Sibenzyme, Tahara enzim, Phusion enzim) ve farklı içerikli 10X Buffer ($+(NH_4)_2SO_4$ - $MgCl_2$ ve $+KCl$ - $MgCl_2$) gibi farklı komponentler denenmiş ancak sonuç değişmemiştir. Yalnızca bazı durumlarda bir örnekten alınan iki parça dokunun her biri aynı işlemlere tabi tutulmasına rağmen birinden sağlıklı PCR sonuçları alınabilirken, diğerinden alınamamıştır. Bu durumu; fiksasyon esnasında örneğe enjekte edilen formaldehitli alkol karışımının homojen dağılmayarak formaldehitin bazı noktalara ulaşamadığını ve bu nedenle dokunun belli bir bölümünden PCR sonuçları alınabilirken, formaldehite maruz kalmış kısımlarından sonuç alınamamasına bağlamaktayız.

Sonuç olarak; formaldehit fiksasyonu yapılan materyalin moleküler çalışmalar için kullanılabilir olmadığı literatürde belirtilmiş, yapılan çalışma ile de bu durum doğrulanmıştır.

4.4.2. Alkol Fiksasyonunun Moleküler Çalışmalardaki Rolü

Çalışmamız kapsamındaki örneklerin bir kısmı da alkol ile fikse edilmiş durumdadır. Bu örneklerden DNA izole etmek için Chomczynski ve Sacchi (1987)'nin kullanmış oldukları Fenol-Kloroform metodu kullanılmıştır. Alınan elektroforetik ve spektrofotometrik sonuçlar; alkol fiksasyonunun moleküler çalışmalar için herhangi bir engel teşkil etmeyeceğini göstermiştir.

Bu iki maddenin karşılaştırıldığı çalışmalar incelendiğinde; sonucun, aldığımız sonuçlar ile uyduğu görülmektedir. Ben-Ezra ve arkadaşlarının (1990) alkol bazlı fiksatifler ve formaldehitin etkilerini karşılaştırmaya yönelik çalışmalarında, formaldehitin moleküler çalışmaları büyük oranda engellediği, ancak benzer bir sıkıntının alkol bazlı fiksatiflerde yaşanmadığını belirtmişlerdir. Fiallo ve arkadaşları da (1992) benzer şekilde formaldehit ve alkol içerikli çeşitli fiksatiflerin, izole edilen DNA'nın çoğaltılması sırasında yarattığı etkileri araştırmışlar ve çalışılan fiksatiflerden çoğaltma işlemini en az etkileyenlerin etanol bazlı fiksatifler olduğunu tespit etmişlerdir. Lau ve arkadaşları (2004) ise; alkol ve formaldehit fiksasyonlarını moleküler düzeyde karşılaştırarak elde edilen verimin alkol fiksasyonunda formaldehit fiksasyonundan çok daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan çalışmanın sonuçlarına bakıldığında; formaldehit ve alkol ile fikse edilmiş örneklerden gerçekleştirilen karşılaştırmalı moleküler denemelerin de bugüne dek yapılan çalışmalarla örtüştüğü görülmektedir.

4.4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Günümüzde canlı gruplarının tayininde ve evrimsel süreçte geçirdikleri değişimleri anlamakta DNA dizi analizleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında da; koleksiyonda yer alan yarı zehirli (*Malpolon monspessulanus* ve *Telescopus fallax*) ve zehirli (*Montivipera xanthina* ve *Macrovipera lebetina*) yılan türlerinin DNA dizi analizleri gerçekleştirilerek bu türlerin iki gen bölgesi (16S rRNA ve Cytochrome B) için çift yönlü okuma yapılmıştır. Böylece diğer türlere nazaran doğada daha nadir bulunan ve gün geçtikçe yaşam alanları kısıtlanan bu canlı gruplarının bu bulguları olası yeni çalışmalarda kullanılmak üzere ortaya konulmuştur.

BÖLÜM 5**SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Müzecilik kavramı; öncelikli olarak doğada var olan çeşitli materyalin toplanıp sergilenmesi, insanlığa tanıtılması düşüncesinden ortaya çıksa da, zamanla bu amacın yanı sıra söz konusu materyalin muhafaza edilerek sonraki kuşaklara aktarımı gayesini de ilke edinmiştir. Müzeciliğe yüklenen bu misyon; insan etkisiyle olumsuz etkilenen doğanın bir sonucu olarak giderek azalan, nesilleri tükenmeye yüz tutan türlere ulaşma ve haklarında fikir sahibi olma fırsatı da yaratmaktadır. Bu noktada, saklanması istenen materyalin ne şekilde muhafaza edileceği önem kazanmıştır. Günümüzde müze ve koleksiyon örneklerini muhafaza etmekte yaygın olarak kullanılan fiksatifler formaldehit türevleri ve alkol bazlı fiksatiflerdir. Bu fiksatifler, örnekleri renk hariç morfolojik olarak korumada oldukça faydalı olmalarına rağmen; çalışmamız dahilindeki formaldehit fiksasyonu yapılmış örnekleri moleküler düzeyde incelemek mümkün olmamıştır. Formaldehitin, örneklerin nükleik materyali ile girdiği kimyasal etkileşimlerin bir sonucu olarak, örneklerden izolasyon yapılabilse dahi başarılı bir çoğaltma işlemi ve dizi analizi gerçekleştirilememiştir. Bu sonuç; Schander ve Halanych (2003)'in bulguları ile örtüşmemektedir. Müze materyalinin büyük bir çoğunluğunun %6-9'luk formaldehit-alkol karışımı ile fikse edilmiş olması ve uzun yıllar %70'lik alkolde saklanmış olmasına rağmen; formaldehitin olumsuz etkileri giderilememiştir.

Diğer yandan, sadece alkol ile fikse edilerek saklanan materyal ile gerçekleştirilen moleküler çalışmalardan başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu sayede alkol fiksasyonunun moleküler çalışmalar için bir engel teşkil etmediğini gözlemlemiş bulunmaktayız.

Mevcut biyoçeşitliliğe zarar vermeden de bazı araştırmaların yapılabilmesi açısından müze ve koleksiyonlar oldukça önem kazanmıştır. Müze ve koleksiyonlarda biyolojik örneklerin saklanabilmesi için, fiksasyon yapılması bir tercihten öte bir zorunluluktur. Ancak söz konusu örneklerden morfolojik ve sistematik çalışmaların yanında moleküler sistematik ve filogenik araştırmalarda da yararlanılması açısından, kullanılan fiksatifin nükleik materyale zarar vermemesi birinci koşul haline gelmektedir. Bu anlamda; kurulacak yeni koleksiyon ve müzelerde muhafaza edilecek örneklerin olası moleküler çalışmalarda kullanılabilir olması ve aynı zamanda uzun yıllar korunması için bir takım

önlemler alınması gerekmektedir. Bu açıdan; örneklerin fikse edilmeden önce moleküler çalışmalarda kullanılması düşünülen dokularından belirli miktarlarda parça alarak alkol içerisinde saklamak, ardından örneği az yoğunluklu (%3) formaldehit-alkol karışımı ile fikse etmek; hem moleküler düzeydeki araştırmaları engellemeyecek, hem de örneklerin saklama süresini uzatacaktır.

KAYNAKLAR

- Ben-Ezra J., Johnson D.A., Rossi J., Cook N. ve Wu A., 1990. Effect of Fixation on The Amplification of Nucleic Acids from Paraffin-Embedded Material by The Polymerase Chain Reaction. *J. of Histochem. and Cytochem.*, 39 (3): 351-354.
- Brown T.A., (Çeviri Editörleri: Bardakçı F., Yenidünya A.F. ve Yılmaz N.), 2009. *Gen Klonlama ve DNA Analizi* (5. Baskıdan Çeviri). Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., Ankara. 386 s.
- Bucklin A.ve Allen L.D., 2004. MtDNA Sequencing from Zooplankton After Long-Term Preservation in Buffered Formalin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 879-882.
- Butlerow A., 1859. U" Ber Einige Derivate des Jodmethylen. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 111: 242-252.
- Cawkwell L. ve Quirke P., 2000. Direct Multiplex Amplification of DNA from a Formalin Fixed, Paraffin Wax Embedded Tissue Section. *Mol. Pathol.*, 53: 51-52.
- Chakraborty A., Sakai M. ve Iwatsuki Y., 2006. Museum Fish Specimens and Molecular Taxonomy: A Comparative Study on DNA Extraction Protocols and Preservation Techniques. *J. of Applied Ichthyology*, 22: 160-166.
- Chatigny M.E., 2000. The Extraction of DNA from Formalin-fixed, Ethanol-Preserved Reptile and Amphibian Tissues. *Herpetol. Rev.*, 31: 86-87.
- Chomczynski P. ve Sacchi N., 1987. Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.*,162: 156-159.
- Cox M.L., Schray C.L., Luster C.N., Stewart Z.S., Korytko P.J., Khan K.N.M., Paulauskis J.D. ve Dunstan R.W., 2005. Assessment of Fixatives, Fixation and Tissue

- Processing on Morphology and RNA Integrity. *Ex. and Mol. Path.*, 80: 183-191.
- Crisan D. ve Mattson J.C., 1993. Retrospective DNA Analysis Using Fixed Tissue Specimens. *DNA Cell Biol.*, 12: 455-464.
- De Giorgi C., Sialer M.F. ve Lamberti F., 1994. Formalin-Induced Infidelity in PCR-Amplified DNA Fragments. *Mol. Cell. Probes*, 8: 459-462.
- Devrim A.K. ve Kaya N., 2004. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 10(2): 209-214.
- Dilsiz N., 2004. *Moleküler Biyoloji*. Palme Yayıncılık, Ankara. 220 s.
- DPT, 2007. 9. Kalkınma Planı 2007-2013: Çevre. *T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı*, Ankara. Yayın No: DPT: 2737- ÖİK: 688.
- Ekim T., 2005. Bitkiler. *Türkiye' nin Biyolojik Zenginlikleri*. Türkiye Çevre Vakfı, Ankara. 167 s.
- Fiallo P., Williams D.L., Chan G.P. ve Gillis T.P., 1992. Effects of Fixation on Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycobacterium leprae*. *J. of Clin. Microbiology*, 30 (12): 3095-3098.
- Fineschi V., Karch S.B., D'Errico S., Pomara C., Riezzo I. ve Turilazzi E., 2006. Cardiac Pathology in Death from Electrocution. *Int J. Legal Med.*, 120: 79–82.
- Forsthoefel K.F., Papp A.C., Snyder P.J. ve Prior T.W., 1992. Optimization of DNA Extraction from Formalin-fixed Tissue and Its Clinical Application in Duchenne Muscular Dystrophy. *Anat. Pathol.*, 98: 98-104.
- Fraenkel-Conrat H. (1954): Reaction of Nucleic Acid with Formaldehyde. *Biochem. Biophys. Acta*, 15: 307-309.
- Fragoso G. ve Hager G.L., 1997. Analysis of *in vivo* Nucleosome Positions by Determination of Nucleosome-Linker Boundaries in Crosslinked Chromatin.

Companion Methods Enzymol., 11, 246–252.

France, S.C. ve Kocher T.D., 1996. DNA Sequencing of Formalin-fixed Crustaceans from Archival Research Collections. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 5: 304-313.

Freifelder D. ve Davison P.F., 1963. Physicochemical Studies on The Reaction between Formaldehyde and DNA. *Biophys. J.*, 3: 49-63.

French, D. ve Edsall, J.T., 1945. The Reactions of Formaldehyde with Amino Acids and Proteins. In Anson M.L. ve Edsall J.T. Eds. *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, New York. 11: 277-335.

Friedman M. ve Desalle R., 2008. Mitochondrial DNA Extraction and Sequencing of Formalin-fixed Archival Snake Tissue. *Mitochondrial DNA*, 19 (5): 433-437.

Frølich K.W., Andersen L.M., Knutsen A. ve Flood P.R., 1984. Phenoxylethanol as a Nontoxic Substitute for Formaldehyde in Long-Term Preservation of Human Anatomical Specimens for Dissection and Demonstration Purposes. *Anat. Rec.*, 208: 271-278.

Fukatsu T., 2002. Acetone Preservation: A Practical Technique for Molecular Analysis. *Molecular Ecology*, 8 (11): 1935 –1945.

Gall K., Pavelic J., Jadro-Santel D., Poljak M. ve Pavelic K., 1993. DNA Amplification by Polymerase Chain Reaction from Brain Tissues Embedded in Paraffin. *Int. J. Exp. Path.*, 74: 333-337.

Gavrilov A. ve Razin S.V., 2009. Formaldehyde Fixation of Cells Does not Greatly Reduce The Ability to Amplify Cellular DNA. *Analytical Biochemistry*, 390: 94-96.

Gillio-Tos A., De Marco L., Fiano V., Garcia-Bragado F., Dikshit R., Boffetta P. ve Merletti F., 2007. Efficient DNA Extraction from 25-Year-Old Paraffin-

- Embedded Tissues: Study of 365 Samples. *Pathology*, 39 (3): 345-348.
- Greer C.E., Peterson S.L., Kiviat N.B. ve Manos N.M., 1991. PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues. Effects of Fixative and Fixation Time. *Am. J. Clin. Pathol.*, 95: 117-124.
- Guha S. ve Kashyap V.K., 2006. Molecular Identification of Lizard by RAPD & FINS of Mitochondrial 16S rRNA Gene. *Legal Medicine*. 8: 5-10.
- Hamazaki S., Koshiha M., Habuchi T., Takahashi R. ve Sugiyama T., 1993. The Effect of Formalin Fixation on Restriction Endonuclease Digestion of DNA and PCR Amplification. *Pathol. Res. Pract.*, 189: 553-557.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. ve deWard J.R., 2003. Biological Identification through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series*, 270: 313-321.
- HSDB; Hazardous Substances Data Bank (b.t.) Retrieved 16 Ağustos 2011, from a database of the National Library of Medicine's TOXNET System: <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
- Inoue T., Nabeshima K., Kataoka H. ve Kono M., 1996. Feasibility of Archival Non-Buffered Formalin-fixed and Paraffin Embedded Tissues for PCR Amplification: An Analysis of Resected Gastric Carcinoma. *Pathol. Int.*, 46: 997-1004.
- Isola J., DeVries S., Chu L., Ghazvini S. ve Waldman F., 1994. Analysis of Changes in DNA Sequence Copy Number by Comparative Genomic Hybridization in Archival Paraffin-Embedded Tumor Samples. *Am. J. of Pathol.*, 145: 1301-1308.
- Işık K., 2005. Ormanlar ve Milli Parklar. *Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri*. Türkiye Çevre Vakfı, Ankara. 233 s.
- Jackson V., 1978. Studies on Histone Organization in The Nucleosome Using Formaldehyde as a Reversible Cross-Linking Agent. *Cell.*, 15: 945-954.

- Jackson V., 1999. Formaldehyde Cross-Linking for Studying Nucleosomal Dynamics. *Methods*, 17 (2): 125-139.
- Johnson D.R., Levanat S. ve Bale A.E., 1995. Direct Molecular Analysis of Archival Tumor Tissue for Loss of Heterozygosity. *Biotechniques*, 19: 190-192.
- Karlsen F., Kalantari M., Chitemerere M., Johansson B., ve Hagmar B., 1994. Modifications of Human and Viral Deoxyribonucleic Acid by Formaldehyde Fixation. *Lab Invest.*, 71: 604–611.
- Koç, H., 2009. *Zoolojik Müze Metotları*. Ekim, 2011.
- Koshiba M., Ogawa K., Hamazaki S., Sugiyama T., Ogawa O. ve Kitajima T., 1993. The Effect of Formalin Fixation on DNA and The Extraction of High-Molecular-Weight DNA from Fixed and Embedded Tissues. *Pathol. Res. Practice*, 189: 66-72.
- Lau C.C., Fen Su J.M., Perlaky L., Li X-N., Eastwood-Leung H-C., Antalffy B. ve Armstrong D., 2004. Comparison of Ethanol versus Formalin Fixation on Preservation of Histology and RNA in Laser Capture Microdissected Brain Tissues. *Brain Pathol.*, 14: 175-182.
- Litt M. ve Luty J.A., 1989. A Hypervariable Microsatellite Revealed by *in vitro* Amplification of a Dinucleotide Repeat within The Cardiac Muscle Actin Gene. *Am. J. Hum. Genet*, 44: 397-401.
- Liu B-Z., Song L-S. ve Xiang J-H., 2001. DNA Isolation and RAPD Analysis of The *Argopecten irradians* Tissue Preserved with Different Methods. *Marine sciences*, 25: 51-53.
- McGhee J.D. ve Hippel P.H. von (1975a). Formaldehyde as a Probe of DNA Structure I. Reaction with Exocyclic Amino Groups of DNA Bases. *Biochem.*, 14: 1281-1296.
- McGhee J.D. ve Hippel P.H. von (1975b). Formaldehyde as a Probe of DNA Structure II.

- Reaction with Endocyclic Imino Groups of DNA Bases. *Biochem.*, 14: 1297-1303.
- McGhee J.D. ve Hippel P.H. von (1976a). Formaldehyde as a Probe of DNA Structure III. Mechanism of The Initial Reaction of Formaldehyde with DNA. *Biochem.*, 16: 3267-3276.
- McGhee J.D. ve Hippel P.H. von (1976b). Formaldehyde as a Probe of DNA Structure IV. Equilibrium Denaturation of DNA and Synthetic Polynucleotides. *Biochem.*, 16: 3276-3293.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information (b.t.). Retrieved 14 Temmuz 2011, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?term=cyt%20B>
- NCBI, National Center for Biotechnology Information (b.t.). Retrieved 14 Temmuz 2011, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?term=16S>
- Neubauer A., Neubauer B., He M., Effert P., Iglehart D., Frye R.A. ve Liu E., 1992. Analysis of Gene Amplification in Archival Tissue by Differential Polymerase Chain Reaction. *Oncogene*, 7 (5): 1019-1025.
- Okello J.B.A., Zurek J., Devault A.M., Kuch M., Okwi A.L., Sewankambo N.K., Bimenya G.S., Poinar D. ve Poinar H.N. (2010). Comparison of Methods in The Recovery of Nucleic Acids from Archival Formalin-fixed Parafin-Embedded Autopsy Tissues. *Analytical Biochemistry*. Doi: 10.1016/j.ab.2010.01.014.
- O’Leary J.J., Browne G., Landers J., Crowley M., Bailey-Healy I., Street J.T., Pollock A.M., Murphy J., Johnson M.I., Lewis F.A., Mohamdee O., Cullinane C. ve Doyle C.T., 1994. The Importance of Fixation Procedures and Its Suitability for Solution-Phase Polymerase Chain Reaction and PCR *in situ* Hybridization. *Histochem. J.*, 26: 337-346.
- Orlando V., Strutt H. ve Paro R., 1997. Analysis of Chromatin Structure by *in vivo* Formaldehyde Cross-Linking. *A Companion to Methods in Enzymol.*, 11: 205–214.

- Pavelić J., Gall-Troselj K., Bosnar M.H., Kardum M.M. ve Pavelić K., 1996. PCR Amplification of DNA from Archival Specimens. A Methodologica Approach. *Neoplasma*, 43 (2): 75-81.
- Pusch C.M., Giddings I. ve Scholz M., 1997. Repair of Degraded Duplex DNA from Prehistoric Samples Using *Escherichia coli* DNA Polymerase I and T4 DNA Ligase. *Nucleic Acids Research*, 26 (3): 857–859.
- Rogers B.B., Alpert L.C., Hine E.A.S. ve Buffone G.J., 1990. Analysis of DNA in Fresh and Fixed Tissue by Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Pathol.*, 136: 541-548.
- Rumph P.F. ve Williams J.C., 1986. A Comparison of The Efficiency of Water and Ethanol at Removing Formaldehyde from Immersion Fixed Muscle Tissues. *Anat. Histol. Embriyol.*, 15 (3): 269-276.
- Scatena M.P. ve Morielle-Versute E., 2008. Suitability of DNA Extracted from Archival Specimens of Fruit-Eating Bats of The Genus *Artibeus* (Chiroptera, Phyllostomidae) for Polymerase Chain Reaction and Sequencing Analysis. *Gen. and Mol. Biol.*, 31: 160-165.
- Schander C. ve Halanych K.M., 2003. DNA, PCR and Formalinized Tissue - A Short Review and Protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 3: 195-205.
- Schander C. ve Willassen E., 2005. What Can Biological Barcoding Do for Marine Biology? *Marine Biology Research*, 1: 79-83.
- Schander C. ve Skage M., 2007. DNA from Formalin-fixed Tissue: Extraction or Repair? That is The Question. *Marine Biology Research*, 3: 289-295.
- Seutin G, White B.N. ve Boag P.T., 1991. Preservation of Avian Blood and Tissue Samples for DNA Analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69 (1): 82-90.

- Shedlock A.M., Haygood M.G., Pietsch T.W. ve Bentzen P., 1997. Enhanced DNA Extraction and PCR Amplification of Mitochondrial Genes from Formalin-fixed Museum Specimens. *BioTechniques*, 22: 394-400.
- Shi S.R., Cote R.J. ve Taylor C.R., 2001. Antigen Retrieval Immunohistochemistry and Molecular Morphology in The Year 2001. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 9 (2):107–116.
- Shi S., Datar R., Liu C., Wu L., Zhang Z., Cote R.J. ve Taylor C.R., 2004. DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Heat-Induced Retrieval in Alkaline Solution. *Histochem. Cell Biol.*, 122: 211-218.
- Shibata D., 1994. Extraction of DNA from Paraffin-Embedded Tissue for Analysis by Polymerase Chain Reaction: New Tricks from an Old Friend. *Human Pathol.*, 25: 561-563.
- Shiozawa D.K., Kudo J., Evans R.P., Woodward S.R. ve Williams R.N., 1992. DNA Extraction from Preserved Trout Tissues. *Western North American Naturalist*, 52 (1): 29-34.
- Sıkı M. ve Tosunoğlu M., 2002. *Biyomüzeoloji*. E.U. Fen Fak. Kitaplar Serisi, No: 173. E.U. Basımevi, Bornova-İzmir. 72 s.
- Thompson, S.W., 1966. *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. Charles C. Thomas Publishers, Illinois. 1639 s.
- Tsokos M. ve Herbst H., 2005. Black Oesophagus: A Rare Disorder with Potentially Fatal Outcome. A Forensic Pathological Approach Based on Five Autopsy Cases. *Int J Legal Med.*, 119 (3): 146–152.
- Ujvari B. ve Madsen T., 2010. Complete Mitochondrial Genome of The Frillneck Lizard (*Chlamydosaurus kingii*, Reptilia; Agamidae), Another Squamate with Two Control Regions. *Mitochondrial DNA*. 19 (5): 465-470.

- Üstek D., Abacı N., Sırma S. ve Çakiris A., 2011. Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneysel Tıp Araş. Enst. Derg.*, 1(1): 11-18.
- Walker J.F., 1964. *Formaldehyde* (3. Baskı). American Chemical Society Monograph Series, Reinhold Publishing Corporation, New York. 486 s.
- Walsh P.S., Metzger D.A. ve Higuchi R., 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, 10: 506-513.
- Waren A., 1983. An Anatomical Description of *Eulima bilienata* Alder with Remarks on and A Revision of *Pyramidelloides* Nevill (Mollusca, Prosobranchia, Eulimidae). *Zool. Scr.*, 12: 273-294.
- Whiting A.S., Bauer A.M. ve Sites Jr. J.W., 2003. Phylogenetic Relationships and Limb Loss in Sub-Saharan African Scincine Lizards (Squamata: Scincidae). *Mol. Phylog. and Evol.* 29: 582-598.
- Yu F.M.C., Crane L.E., Lange P. ve Shapiro R., 1980. Isolation and Identification of Cross-Links from Formaldehyde Treated Nucleic Acids. *Biochem.*, 19: 5525-5531.

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1. Türlerle ait örneklerin tespit edilme şekli ve doku bilgileri	13
Çizelge 2. Örnek toplanan şehirlerin ekolojik bariyerler baz alınarak lokalize edilmiş hali	30
Çizelge 3. DNA Çoğaltma İşlemi Esnasında Kullanılan Primerler	40
Çizelge 4. Formaldehitli Örnekler için Kullanılan Primerler	40
Çizelge 5. Kullanılan PCR Programları.....	41
Çizelge 6. Alkol ile fikse edilmiş örneklerden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri	45
Çizelge 7. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 1. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri	73
Çizelge 8. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 2. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri.....	74
Çizelge 9. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 3. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri.....	75
Çizelge 10. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 4. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri.....	76
Çizelge 11. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 5. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri.....	76
Çizelge 12. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden 6. protokol ile izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri.....	77
Çizelge 13. Formaldehit ile fikse edilmiş örneklerden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri.....	78

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1. Çalışma esnasında izlenen yol haritası.....	32
Şekil 2. Örneklerden doku alımı esnasında açılan kesiler.....	33
Şekil 3 DNA dizileme analizlerinin kromatografik örneği.....	44
Şekil 4. Alkolle fikse edilmiş <i>Mertensiella caucasica</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	56
Şekil 5. Alkolle fikse edilmiş <i>Lyciasalamandra luschani</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları.....	57
Şekil 6. Alkolle fikse edilmiş <i>Triturus karelinii</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları.....	57
Şekil 7. Alkolle fikse edilmiş <i>Ommatotriton vittatus</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	58
Şekil 8. Alkolle fikse edilmiş <i>Lissotriton vulgaris</i> ve <i>Bufo bufo</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	58
Şekil 9. Alkolle fikse edilmiş <i>Pseudepidalea viridis</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	59
Şekil 10. Alkolle fikse edilmiş <i>Hyla arborea</i> ve <i>Pelobates syriacus</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	59
Şekil 11. Alkolle fikse edilmiş <i>Rana dalmatina</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	60

Şekil 12. Alkolle fikse edilmiş <i>Rana macrocnemis</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	60
Şekil 13. Alkolle fikse edilmiş <i>Pelophylax ridibundus</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	61
Şekil 14. Alkolle fikse edilmiş <i>Laudakia stellio</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	61
Şekil 15. Alkolle fikse edilmiş <i>Phrynocephalus persicus</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	62
Şekil 16. Alkolle fikse edilmiş <i>Asaccus elisae</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	62
Şekil 17. Alkolle fikse edilmiş <i>Darevskia valentini</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	63
Şekil 18. Alkolle fikse edilmiş <i>Eremias strauchi</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	63
Şekil 19. Alkolle fikse edilmiş <i>Anatololacerta danfordi</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	64
Şekil 20. Alkolle fikse edilmiş <i>Lacerta laevis</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	64
Şekil 21. Alkolle fikse edilmiş <i>Apathya capadocica</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	65
Şekil 22. Alkolle fikse edilmiş <i>Lacerta viridis</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	65

Şekil 23. Alkolle fikse edilmiş <i>Parvilacerta parva</i> ve <i>Podarcis muralis</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	66
Şekil 24. Alkolle fikse edilmiş <i>Podarcis taurica</i> ve <i>Trachylepis aurata</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	66
Şekil 25. Alkolle fikse edilmiş <i>Eryx jaculus</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	67
Şekil 26. Alkolle fikse edilmiş <i>Dolichophis caspius</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-1	67
Şekil 27. Alkolle fikse edilmiş <i>Dolichophis caspius</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları-2	68
Şekil 28. Alkolle fikse edilmiş <i>Platyceps najadum</i> ve <i>Dolichophis jugularis</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	68
Şekil 29. Alkolle fikse edilmiş <i>Hemorrhois nummifer</i> ve <i>Platyceps collaris</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	69
Şekil 30. Alkolle fikse edilmiş <i>Coronella austriaca</i> ve <i>Eirenis modestus</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	69
Şekil 31. Alkolle fikse edilmiş <i>Malpolon monspessulanus</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları - 1.....	70
Şekil 32. Alkolle fikse edilmiş <i>Malpolon monspessulanus</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları - 2.....	70
Şekil 33. Alkolle fikse edilmiş <i>Natrix natrix</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları - 1.....	71

Şekil 34. Alkolle fikse edilmiş <i>Natrix natrix</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları - 2.....	71
Şekil 35. Alkolle fikse edilmiş <i>Natrix tessellata</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	72
Şekil 36. Alkolle fikse edilmiş <i>Telescopus fallax</i> türüne ait örneklerin izolasyon bulguları	72
Şekil 37. Alkolle fikse edilmiş <i>Macrovipera lebetina</i> ve <i>Montivipera xanthina</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	73
Şekil 38. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Eremias suphani</i> türüne ait örneklerin 1. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları	74
Şekil 39. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Eremias suphani</i> türüne ait örneklerin 2. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları	74
Şekil 40. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Eremias suphani</i> türüne ait örneklerin 3. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları	75
Şekil 41. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Eremias suphani</i> türüne ait örneklerin 4. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları	76
Şekil 42. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Eremias suphani</i> türüne ait örneklerin 5. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları	77
Şekil 43. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Eremias suphani</i> türüne ait örneklerin 6. metot uygulamasına dair izolasyon bulguları	78
Şekil 44. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Bufo bufo</i> , <i>Pseudepidalea viridis</i> ve <i>Hyla arborea</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları	81

Şekil 45. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Pelobates syriacus</i> , <i>Rana dalmatina</i> , <i>Rana macrocnemis</i> , <i>Pelophylax ridibundus</i> ve <i>Eremias suphani</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları.....	82
Şekil 46. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Anatololacerta danfordi</i> , <i>Lacerta viridis</i> ve <i>Lacerta trilineata</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları.....	82
Şekil 47. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Parvilacerta parva</i> , <i>Podarcis taurica</i> , <i>Trachylepis aurata</i> , <i>Eryx jaculus</i> , <i>Natrix natrix</i> , <i>Natrix tessellata</i> ve <i>Montivipera xanthina</i> türlerine ait örneklerin izolasyon bulguları.....	83
Şekil 48. Alkolle fikse edilmiş <i>Mertensiella caucasica</i> , <i>Lyciasalamandra luschani</i> , <i>Triturus karelinii</i> , <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Ommatotriton vittatus</i> ve <i>Bufo bufo</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	84
Şekil 49. Alkolle fikse edilmiş <i>Hyla arborea</i> , <i>Pseudepidalea viridis</i> , <i>Rana dalmatina</i> ve <i>Pelobates syriacus</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları	84
Şekil 50. Alkolle fikse edilmiş <i>Rana macrocnemis</i> , <i>Pelophylax ridibundus</i> , <i>Laudakia stellio</i> ve <i>Phrynocephalus persicus</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	85
Şekil 51. Alkolle fikse edilmiş <i>Darevskia valentini</i> , <i>Asaccus elisae</i> , <i>Eremias strauchi</i> , <i>Anatololacerta danfordi</i> ve <i>Lacerta laevis</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları	85
Şekil 52. Alkolle fikse edilmiş <i>Apathya cappadocica</i> , <i>Lacerta viridis</i> , <i>Parvilacerta parva</i> , <i>Podarcis muralis</i> ve <i>Podarcis taurica</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları	86
Şekil 53. Alkolle fikse edilmiş <i>Podarcis taurica</i> , <i>Trachylepis aurata</i> , <i>Eryx jaculus</i> , <i>Dolichophis caspius</i> ve <i>Platyceps najadum</i> türlerine ait örneklerin DNA	

çoğaltma bulguları.....	86
Şekil 54. Alkolle fikse edilmiş <i>Dolichophis jugularis</i> , <i>Hemorrhois nummifer</i> , <i>Platycephalus collaris</i> , <i>Coronella austriaca</i> ve <i>Eirenis modestus</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	87
Şekil 55. Alkolle fikse edilmiş <i>Malpolon monspessulanus</i> , <i>Natrix natrix</i> , <i>Natrix tessellata</i> ve <i>Telescopus fallax</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları	87
Şekil 56. Alkolle fikse edilmiş <i>Macrovipera lebetina</i> ve <i>Montivipera xanthina</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	88
Şekil 57. Alkolle fikse edilmiş <i>Mertensiella caucasica</i> , <i>Lyciasalamandra luschni</i> , <i>Triturus karelinii</i> , <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Ommatotriton vittatus</i> ve <i>Bufo bufo</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	88
Şekil 58. Alkolle fikse edilmiş <i>Hyla arborea</i> , <i>Pseudepidalea viridis</i> , <i>Rana dalmatina</i> ve <i>Pelobates syriacus</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları	89
Şekil 59. Alkolle fikse edilmiş <i>Rana macrocnemis</i> , <i>Pelophylax ridibundus</i> , <i>Laudakia stellio</i> ve <i>Phrynocephalus persicus</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	89
Şekil 60. Alkolle fikse edilmiş <i>Darevskia valentini</i> , <i>Asaccus elisae</i> , <i>Eremias strauchi</i> , <i>Anatololacerta danfordi</i> ve <i>Lacerta laevis</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	90
Şekil 61. Alkolle fikse edilmiş <i>Apathya cappadocica</i> , <i>Lacerta viridis</i> , <i>Parvilacerta parva</i> , <i>Podarcis muralis</i> ve <i>Podarcis taurica</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	90
Şekil 62. Alkolle fikse edilmiş <i>Podarcis taurica</i> , <i>Trachylepis aurata</i> , <i>Eryx jaculus</i> , <i>Dolichophis caspius</i> ve <i>Platycephalus najadum</i> türlerine ait örneklerin DNA	

çoğaltma bulguları.....	91
Şekil 63. Alkolle fikse edilmiş <i>Dolichophis jugularis</i> , <i>Hemorrhois nummifer</i> , <i>Platycephalus collaris</i> , <i>Coronella austriaca</i> ve <i>Eirenis modestus</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	91
Şekil 64. Alkolle fikse edilmiş <i>Malpolon monspessulanus</i> , <i>Natrix natrix</i> , <i>Natrix tessellata</i> ve <i>Telescopus fallax</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	92
Şekil 65. Alkolle fikse edilmiş <i>Macrovipera lebetina</i> ve <i>Montivipera xanthina</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları	92
Şekil 66. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Bufo bufo</i> , <i>Pseudepidalea viridis</i> , <i>Hyla arborea</i> , <i>Pelobates syriacus</i> , <i>Rana dalmatina</i> , <i>Rana macrocnemis</i> , <i>Pelophylax ridibundus</i> , <i>Anatololacerta danfordi</i> ve <i>Lacerta viridis</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	93
Şekil 67. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lacerta trilineata</i> , <i>Parvilacerta parva</i> , <i>Podarcis muralis</i> , <i>Podarcis taurica</i> , <i>Trachylepis aurata</i> , <i>Eryx jaculus</i> , <i>Malpolon monspessulanus</i> , <i>Natrix natrix</i> , <i>Telescopus fallax</i> ve <i>Montivipera xanthina</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	93
Şekil 68. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Bufo bufo</i> , <i>Pseudepidalea viridis</i> , <i>Hyla arborea</i> , <i>Pelobates syriacus</i> , <i>Rana dalmatina</i> , <i>Rana macrocnemis</i> , <i>Pelophylax ridibundus</i> , <i>Anatololacerta danfordi</i> ve <i>Lacerta viridis</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	94
Şekil 69. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lacerta trilineata</i> , <i>Parvilacerta parva</i> , <i>Podarcis muralis</i> , <i>Podarcis taurica</i> , <i>Trachylepis aurata</i> , <i>Eryx jaculus</i> , <i>Malpolon monspessulanus</i> , <i>Natrix natrix</i> , <i>Telescopus fallax</i> ve <i>Montivipera xanthina</i> türlerine ait örneklerin DNA çoğaltma bulguları.....	94
Şekil 70. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lacerta trilineata</i> türüne ait bir örnek için	

izlenen yol.....	95
Şekil 71. Formaldehitte fikse edilmiş <i>Lacerta trilineata</i> türüne ait bir örneğin DNA çoğaltma bulguları.....	96
Şekil 72. <i>Malpolon monspessulanus</i> türünün Cytochrome B gen bölgesinin hizalama sonucu.....	97
Şekil 73. <i>Malpolon monspessulanus</i> türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu.....	98
Şekil 74. <i>Telescopus fallax</i> türünün Cytochrome B gen bölgesinin hizalama sonucu.....	99
Şekil 75. <i>Telescopus fallax</i> türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu.....	100
Şekil 76. <i>Montivipera xanthina</i> türünün Cytochrome B gen bölgesinin hizalama sonucu.....	101
Şekil 77. <i>Montivipera xanthina</i> türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu.....	102
Şekil 78. <i>Macrovipera lebetina</i> türünün Cytochrome B gen bölgesinin hizalama sonucu.....	102
Şekil 79. <i>Macrovipera lebetina</i> türünün 16S rRNA gen bölgesinin hizalama sonucu.....	103

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Selin ERTÜRK
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 07.08.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLER

c) Katıldığı projeler

Bazı Amfibi ve Sürüngen Türlerinin Koleksiyon Örneklerinden DNA Amplifikasyonu ÇOMÜ-BAP.

Türkiye’de 400 Kuzey Enleminin Kuzeyinde Yaşayan *Anguis fragilis* (Linnaeus, 1758) ve Kuzey Anadolu’daki *Pseudopus apodus* (Pallas, 1775) (Sauria: Anguidae) Türlerinin Dağılımları ve Sistematik Yönden Araştırılması TÜBİTAK.

İŞ DENEYİMİ

28.08.2009 – Devam ediyor: Araştırma Görevlisi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

İLETİŞİM

serturk@comu.edu.tr

