

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE EGE VE AKDENİZ SAHİLLERİ MÜREKKEPBALIĞI (*Sepia officinalis* L. 1758) POPULASYONLARI: GENETİK YAPISI VE DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

Olgaç GÜVEN

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE EGE VE AKDENİZ SAHİLLERİ MÜREKKEPBALIĞI (*Sepia officinalis*, L. 1758) POPULASYONLARI: GENETİK YAPISI VE DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

Olgaç GÜVEN

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 23/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF (Danışman)

Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

Doç. Dr. Alp SALMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZBAŞ

ÖZET

TÜRKİYE EGE VE AKDENİZ SAHİLLERİ MÜREKKEPBALIĞI (*Sepia officinalis*, L. 1758) POPULASYONLARI: GENETİK YAPISI VE DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

Olgaç GÜVEN

Doktora Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışmanı: Prof.Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Haziran 2011, 86 sayfa

Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak artan besin ihtiyacının karşılanabilmesi amacı ile denizel stokların üzerinde de önemli baskı oluşmuş ve kemikli balıkların stoklarında önemli azalmalar gözlenmiştir. Balıkçılık sektörü devam eden ihtiyacı karşılayabilmek amacı ile alternatif avlara yönelmektedir. Kafadanbacaklılar avcıları olan kemikli balıkların stoklarının azalmasının da etkisi ile kendi stoklarının arttırma şansı bulmalarından dolayı besin ihtiyacı arayışına çözüm oluşturabilecek bir potansiyel taşımaktadırlar. Kemikli balıkların sömürülmesi esnasında karşılaşılan sorunların tekrar yaşanmaması için sürdürülebilir bir avlama ve balıkçılık yönetiminin gerekliliği yadsınamaz. Bu amaçla, ekonomik önem taşıyan kafadanbacaklı türlerinin biyolojik özelliklerinin ve stoklarının sınırlarının belirlenmesi sağlıklı bir balıkçılık yönetiminin gerçekleştirilebilmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bir kafadanbacaklı türü olan *Sepia officinalis* L. 1758, Avrupa ve ülkemiz su ürünleri pazarında önem taşıyan bir canlıdır ve ülkemiz denizlerinde yaygın olarak bulunur. Ayrıca türün biyolojik özellikleri göz önüne alındığında, dağılım gösterdiği bölgelerde gen akışına etki eden faktörlerin belirlenmesi açısından da model olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Bu tez çalışması, ülkemiz Akdeniz ve Ege Denizi sahillerinde dağılım gösteren mürekkepbalığı populasyonlarının

moleküler biyoloji metodları kullanılarak, çalışma alanındaki genetik varyasyonun araştırılması ve populasyon yapılarının belirlenmesini amacı ile değerlendirilmesi hedeflemiştir.

Yirmiiki istasyondan örneklenen toplam 225 bireyde, populasyonların geçmişte ve günümüzdeki populasyon dinamiklerinin karakterize edilmesi amacı ile mtCOI gen bölgesi çalışılmıştır. Ayrıca beş istasyondan temin edilen toplamda 341 bireyde, 5 polimorfik mikrosatelit lokusuna ait verilerle mürekkepbalığı populasyonları arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gerçekleştirilen bilgisayar analizleri sonucunda mtCOI gen bölgesinin değerlendirilmesi ile çalışma alanında ikisi Ege Denizi kaynaklı, diğer ikisi ise Akdeniz kaynaklı 4 farklı haplotip grubu belirlenmiştir. Örnekleme bölgeleri arasında gözlenen genetik farklılaşma miktarları incelendiğinde tüm çalışma alanının içerisinde gen akışını baskılayan dört yarı geçirgen bariyer bölgesinin varlığı ortaya konulmuştur. Bunlardan ilk ikisi Marmaris – Finike bölgeleri arasında konumlanmıştır. Deniz zemininin ani derinleşmesi sonucunda oluşan bu bariyer bölgeleri Akdeniz ve Ege Denizi'nde bulunan türe ait haplotip gruplarının birbirinden izole olmasına neden olduğu görülmektedir. Bir diğer bariyer bölgesi de Taşucu örnekleme bölgesinde belirlenmiştir. Mersin Körfezi ve İskenderun Körfezi'nin sığ kesimlerinin tür için daha uygun bir yaşam bölgesi oluşturması ve batıya gidildikçe ani derinleşmelerin söz konusu olması, belirlenen biyolojik bariyerin oluşmasına etki eden faktörlerdir. Bariyer etkisi ile Mersin Körfezi ve İskenderun Körfezi'nin oluşturduğu alan tüm diğer bölgelerden belirgin bir şekilde farklılık göstermektedir. Çalışma sonucunda belirlenmiş olan son bariyer bölgesi ise İzmir Körfezi'ni diğer bölgelerden ayırmaktadır.

Türe özgü beş polimorfik mikrosatelit bölgesinin değerlendirilmesi sonucunda da Akdeniz ve Ege Denizi'nin genetik olarak birbirinden ayrıldığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışma alanında dağılım gösteren 3 farklı mürekkepbalığı populasyonu tespit edilmiştir. Bunlardan ilki Akdeniz de bulunan Mersin Körfezi ve Antalya Körfezi'nden örneklenen bireylerin oluşturduğu populasyon, ikincisi Marmaris ve Seferihisar bölgelerinden örneklenen bireylerin oluşturduğu populasyon ve üçüncüsü ise Doğu Ege Denizi'nde bulunan Enez bölgesinden toplanan bireylerin oluşturduğu populasyondur.

Çalışmamız sonunda mürekkebalığı türünün populasyon yapılanmasının, türün değerlendirildiği önceki çalışmalarda bildirilenin tersine mesafeye bağılı genetik farklılaşmadan kaynaklanmadığı ancak derinlik etkisi altında şekillendiğı tespit edilmiştir. Belirlenen dört filogrubun demografik geçmişı incelendiğinde, filogruların son buzul çağı sonrasında ortam koşullarının düzelmesi ile genişlediğı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Mürekkebalığı, Populasyon yapılanması, Gen akışı,

Genetik farklılaşma.

JÜRİ: Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

Doç. Dr. Alp SALMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZBAŞ

ABSTRACT

CUTTLEFISH (*Sepia officinalis* L., 1758) POPULATIONS ALONG TURKISH COAST LINES OF THE AEGEAN AND MEDITERRANEAN SEAS: GENETIC STRUCTURE AND POPULATION DYNAMICS

Olgaç GÜVEN

Ph.D. Thesis in Fisheries Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Beria FALAKALI MUTAF

June 2011, 86 pages

Along with the increase of world population, increasing food demand cause fishing pressure on marine resources and decline in fish stocks. To provide the food demand, commercial fishing sector is in search of alternative food sources. Cephalopod species which have a potential of being the solution for the problem find the opportunity to increase their population sizes without the predatory pressure of fishes. To avoid the problems faced during the exploitation of fishes, it is also important to provide a sustainable fisheries management for cephalopod fisheries with a supportive knowledge on their biological features and the geographic limits. As a cephalopod species *Sepia officinalis* L. 1758 is distributed in our seas and has an important place in fisheries markets. Also this species is an ideal candidate for testing physical and evolutionary factors restricting gene flow in its distribution area. The aim of the thesis is to determine the genetic variation and population structuring of common cuttlefish around Turkish coasts of the Mediterranean and the Aegean Seas as a model species with molecular methods.

mtCOI sub units of 225 individuals of *S. officinalis* from 22 sampling locations were analyzed to characterize the present and past population dynamics. Besides five polymorphic microsatellite loci of 341 individuals from five localities were analyzed to evaluate the genetic relationships between common cuttlefish populations.

As a result of computer analyses of mtCOI gen region, four phylogroups two originated from the Aegean Sea and two originated from the Mediterranean Sea, were determined. Four semi conductive barrier regions, effecting gene flow through the sampling areas, had been determined from genetic differentiation between the sapling regions. First two of these barriers, originating from the sudden depth, were found to be located between Marmaris – Finike sampling areas and caused separation of haplotype groups located in the Mediterranean and the Aegean Sea. This barrier region seemed to be formed by the suitability of Mersin Bay and Iskenderun Bay as a good living area for these organisms and the effect of sudden increase of depth towards the western part. Eastern part of this barrier region showed remarkably different genetic characteristics. The last barrier region was found to be located in İzmir Bay and seemed to separate this region from the rest of the sampling areas.

Separation of the Aegean Sea and the Mediterranean Sea was also observed with the results of the analyses of species specific five polymorphic microsatellite regions. Besides three different common cuttlefish populations have been determined through the stud area. The first population was found to be located in Mersin Bay and Antalya Bay, the second population was located between Marmaris and Seferihisar sampling locations and the last population was located in Enez sampling location in northern part of the Aegean Sea.

It is determined that on the contrary of previous studies, the structure of common cuttlefish populations formed under the effect of depth changes, not because of the genetic isolation by distance. Analyses of demographic history of four phylogroups revealed that these phylogroups expanded their sizes upon the reestablishment of the sustainable environmental conditions after the last glacial period.

KEY WORDS: Cuttlefish, Population structure, Gene flow, Genetic variation.

COMMITTEE: Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Prof. Dr. Battal ÇIPLAK

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

Doç. Dr. Alp SALMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZBAŞ

ÖNSÖZ

Su ürünleri genetik kaynakları günümüz çevre koşulları ve avcılık baskısına bağlı olarak hızla azalma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bu nedenle pek çok ülkede genetik kaynakların populasyon bazında karakterizasyonu yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı *Sepia officinalis* türünü model olarak alıp, bu türün Türkiye'nin Ege ve Akdeniz sahillerinde bulunan populasyonlarının genetik yapısı ve evrimsel dinamiklerinin incelenmesi ve denizlerimizde yaşayan türlerin populasyon özelliklerinin en iyi şekilde belirlenmesi amacı ile gen akışına etki eden faktörlerin karakterize edilmesidir.

Son yıllarda biyolojik bilimlerin birçok alanında hızla gelişen düzeylerdeki moleküler incelemeler, canlıların genetik yapıları ve filogenilerinin daha iyi öğrenilmesine olanak sağlanmaktadır.

Tezimin hazırlanması esnasında yakınımnda bulunan birçok kişinin desteğini aldım. Bu kişiler arasında öncelikle yürümeye karar verdiğim yolda her zaman bana destek veren göremediklerimi bana gösteren danışmanım Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF'a, kariyerim için seçtiğim yolda yürümeye başlarken fikirleri ve bilimsel katkıları ile kararlarımın şekillenmesinde desteği olan Prof. Dr. Battal ÇIPLAK'a, sağladığı olanaklar ile, tezim kapsamında gerçekleştirdiğim analizler konusunda bana önemli katkılar sağlayan ikinci danışmanım Aberystwyth Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Paul SHAW'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tüm laboratuvar çalışmalarım esnasında bilgilerini ince ayrıntısına kadar benimle paylaşan ve her aşamada bana destek veren Londra Üniversitesi'nden arkadaşlarım Romina NOVO HENRIQUES ve Niall MCKEOWN'a teşekkür ederim. Geçen bu zorlu süreç boyunca benden maddi manevi hiçbir şeyi esirgemeyen ve varlıkları hayattaki en önemli dayanağım olan biricik aileme beni bu günlere kadar destekledikleri için minnettarlığımı ifade etmek istiyorum. Gerek yurt dışında geçirdiğim süreç, gerekse de tezimin yazım aşamasında sabırla yanımda olan, her anlamda bana desteğini esirgemeyen Cemile KÖKÇEN'e sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. On yıllık lisansüstü eğitimimin başladığı günlerden sonuna geldiğim bu günlere kadar gerek fikirleri, gerek destekleri ile yanımda olan beni düşünen mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Tüm planlamalarımı, veri analizlerimi yaptığım odamda yaşadığım sıkıntılara ortak olan ve büyük bir sabırla beni destekleyen oda arkadaşım Mesut YILMAZ'a sonsuz

teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca tezimin bilgisayar analizlerini gerçekleştirdiğim sürede katkıları ve paylaştığı fikirleri için Sarp KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım. Tamamlamış olduğum bu yol çok çaba sarf ederek ilerlediğim bir yoldur. Bu yolun sonuna ulaşmış olmak bana çok büyük mutluluk vermesinin yanında, gelecekte karşılaşacağım sorunların üstesinden gelebilmek anlamında kendime güvenimi daha da güçlendirmiştir.

Gerçekleştirilen çalışma TÜBİTAK, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'nın lisansüstü öğrencilere yönelik programlarından "2214 – Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için)" kapsamında desteklenmiştir. Çalışmanın laboratuvar uygulamaları kısmı Londra Üniversitesi, Royal Holloway Koleji, Biyolojik Bilimler Okulu, Ekoloji, Evrim ve Davranış merkezinde gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	6
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Örnekleme.....	16
3.2. DNA İzolasyonu.....	18
3.3. mtCOI Geni Dizilerinin Edinilmesi.....	19
3.4. Mikrosatelit Lokuslarının Genotiplerinin Belirlenmesi.....	20
3.5. Verilerin Analizi.....	22
3.5.1. mtCOI sekanslarının analizi.....	22
3.5.2. Mikrosatelit genotip verilerinin analizi.....	24
4. BULGULAR.....	26
4.1. mtCOI Sekanslarının Analizleri.....	26
4.2. Polimorfik Mikrosatelit Lokusları Analiz Sonuçları.....	47
5. TARTIŞMA.....	62
5.1. Genetik çeşitlilik ve farklılaşma.....	62
5.2. Filogeni.....	64
5.3. Populasyonların coğrafik-genetik yapılanması.....	68
5.4. Demografik geçmiş.....	74
6. SONUÇ.....	66
7. KAYNAKLAR.....	79
Özgeçmiş	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
N	Örnek sayısı
π	Nükleotid çeşitliliği
Θ_1	Populasyon genişlemesi öncesi populasyonun büyüklüğü
Θ_2	Populasyon genişliği sonrası populasyonun büyüklüğü
h	Haplotip çeşitliliği
H_E	Beklenen heterozigotluk frekansı
H_O	Gözlenen heterozigotluk frekansı
k	Nükleotid farklılaşmasının ortalama miktarı
K	Hipotetik populasyon sayısı
bç	Baz çifti
μ l	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
L	Litre
ddH ₂ O	Çift distile su
M	Molar
mM	Milimolar
°C	Santigrat derece
RPM	Dakikadaki devri sayısı
r	Ragedness test istatistiği
sn	Saniye
t	Populasyon büyümesinden buyana geçen nesil sayısı
V _b	Grup içi populasyonlar arası varyasyon
V _a	Populasyon içi varyasyon
S	Polimorfik bölge sayısı

Kısaltmalar

AMOVA	Moleküler Varyans Analizi
BSP	Bayesian Skyline Plot
CI	Tutarlılık indeksi (Concistency index)

CTAB	Setrimonium bromit
dak	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Diaminoethan-tetraasetik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
F_{ST}	Grup içi, populasyonlar arası fiksasyon indeksi
F_{CT}	Gruplar arası fiksasyon indeksi
F_{SC}	Gurup içi, populasyonlar arası fiksasyon indeksi
R_{ST}	Grup içi, populasyonlar arası fiksasyon indeksi (SMM modeli altında)
HKY+I	Hasegawa, Kishino ve Yano baz değişim modeli + değişim göstermeyen bölgeler.
H-W	Hardy Weinberg prensibi
IAA	İzomil alkol
IAM	Sınırsız allel mutasyon modeli (infinite allele mutation model)
IBD	Mesafeye bağlı izolasyon (Isolation by distance)
MCL	Maksimum birleşik tutumluluk modeli
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
ML	Maksimum olasılık (Maximum likelihood)
MP	Maksimum tutumluluk (Maximum parsimony)
mtCOI	Mitokondriyal sitokrom oksidaz geni I. alt ünitesi
N	Birey sayısı
N_a	Lokus başına allel sayısı
ND 5/6	Mitokondriyal gen bölgeleri
NJ	Komşu bağlama (Neighbor-joining)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RI	Tutma indeksi (Retention Index)
SMM	Adım adım mutasyon modeli (Stepwise mutation model)
TBR	Ağaç bölme – bağlama dal değişimi
Ti/Tv	Transisyon / Transversiyon oranı
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	1950 – 2009 yılları arasında tüm dünyada avlanan toplam av miktarları.....	2
Şekil 1.2.	1950 – 2009 yılları arasında FAO'nun 37 numaralı balıkçılık bölgesinde avlanan toplam kemikli balık miktarları.....	2
Şekil 1.3.	1950 – 2009 yılları arasında FAO'nun 37 numaralı balıkçılık bölgesinde gerçekleştirilmiş olan kafadanbacaklılara ait avcılık miktarları.....	2
Şekil 1.4.	Ülkemiz denizlerinde 1950 – 2009 yılları arasında avlanan toplam kafadanbacaklı miktarları.....	3
Şekil 2.1.	Kafadanbacaklı ana gruplarının filogenisi.....	6
Şekil 2.2.	Mürekkepbalığı dış morfolojisi.....	9
Şekil 2.3.	Mürekkepbalığının tanımlayıcı özelliklerinin şematik çizimleri.....	10
Şekil 2.4.	Mürekkepbalığının (<i>Sepia officinalis</i>) bilinen yayılış alanı.....	10
Şekil 3.1.	Çalışma kapsamında örneklemelerin gerçekleştirildiği bölgeler.....	17
Şekil 4.1.	mtCOI bölgesine ait baz dizilerinin analizi sonucunda elde edilmiş olan olasılık haritalama diyagramı.....	30
Şekil 4.2.	Belirlenen 49 haplotip kullanılarak oluşturulmuş olan haplotip ağı.....	31
Şekil 4.3.	Filogenetik analiz sonucunda belirlenen dört filogrubun coğrafik dağılımı ve her bir grubu oluşturan haplotiplarının bölgelere göre frekansları.....	32
Şekil 4.4.	Network analizi sonucunda tespit edilmiş olan 4 filogenetik grubun bölgelere göre dağılım frekansı.....	33
Şekil 4.5.	Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede dağılım gösteren <i>Sepia officinalis</i> türüne ait haplotiplerin komşu bağlama algoritması ile edinilmiş diyagramı.....	38
Şekil 4.6.	Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede dağılım gösteren <i>Sepia officinalis</i> türüne ait haplotiplerin maksimum tutumluluk algoritması ile hesaplanan maksimum tutumluluk ağacı	39

Şekil 4.7.	Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede dağılım gösteren <i>Sepia officinalis</i> türüne ait filogeninin maksimum olasılık algoritması ve HKY + I nükleotid değişim modeli altında çözümlenmesi.....	40
Şekil 4.8.	Bayesian filogeni hesaplaması sonucunda elde edilen ağaç ve ana dallar için destek değerleri.....	41
Şekil 4.9.	CV örnekleme bölgesinden başlayarak her bir örnekleme bölgesinin sırayla katılması ile oluşturulan 2'li grupla belirlenen farklılaşma oranları.....	42
Şekil 4.10.	mtCOI alt bölgesi için genetik farklılık miktarları değerlendirilmesi ile belirlenen ve türün gen akışına sınır getiren bariyer bölgelerinin coğrafik konumları.....	43
Şekil 4.11.	Belirlenen filogenetik grupların uyumsuzluk dağılım grafikleri.....	46
Şekil 4.12.	Geçmişten günümüze populasyon büyüklüğü değişimini gösteren BSP grafiği.....	47
Şekil 4.13.	5 mikrosatelit lokusu için allel frekanslarının bölgelere göre dağılımı.	50
Şekil 4.14.	Mikrosatelit verilerinin değerlendirilmesi sonucunda belirlenen populasyon yapılanması.....	52
Şekil 4.15.	Türkiye Ege Denizi ve Akdeniz sahillerinde bulunan <i>Sepia officinalis</i> türünün populasyon yapılanması.....	53
Şekil 4.16.	Structure analizi sonuçları.....	54
Şekil 4.17.	Çalışma bölgesindeki populasyon yapılanmalarının örnekleme bölgelerine bazında incelenmesi ve Ege Denizi ve Akdeniz'de bulunan populasyonların yapılanması.....	55
Şekil 4.18.	Genetik farklılıklar ile coğrafik mesafelerin serpilme diyagramı.....	56
Şekil 4.19.	Mikrosatelit lokusları için genetik farklılık miktarları değerlendirilmesi ile belirlenen ve türün gen akışına sınır getiren bariyer bölgelerinin coğrafik konumları.....	57
Şekil 5.1.	Türün dağılım gösterdiği bölgelerin tümünde belirlenmiş olan haplotipler ile oluşturulmuş network.....	67
Şekil 5.2.	Ege Denizi ile Akdeniz arasında gen akışını sınırlandıran ani derinlik artışı.....	68

Şekil 5.3.	İskenderun Körfezi ve Mersin Körfezi'ni oluşturtan sığ bölgeler.....	69
Şekil 5.4.	Antalya Körfezi'nde bulunan sığ bölgeler.....	69
Şekil 5.5.	Kuşadası ile Bodrum örnekleme bölgeleri arasında kalan sığ kesimin.	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

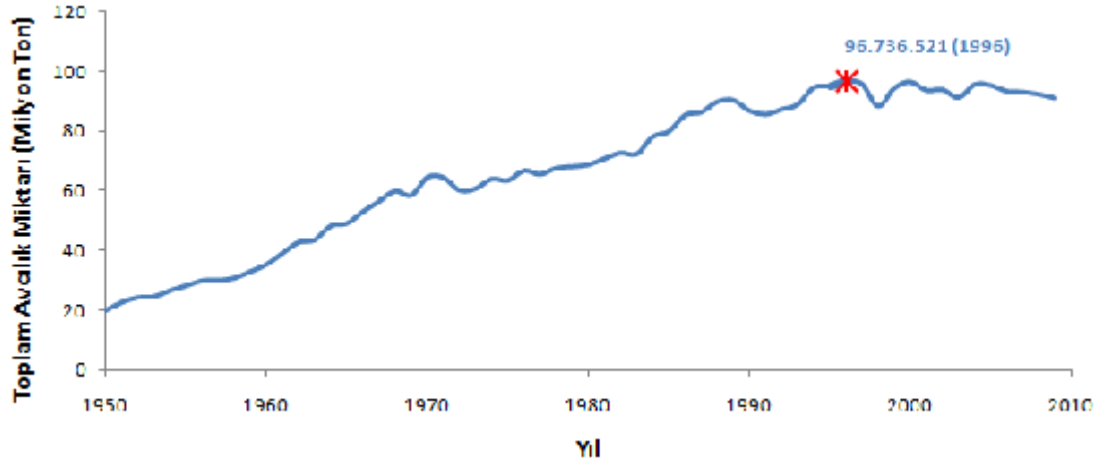
Çizelge 3.1.	Çalışma kapsamında Ege Denizi ve Akdeniz’de örnekleme gerçekleştirilen istasyonlar ve örneklenen birey sayıları.....	16
Çizelge 3.2.	CTAB DNA izolasyon protokolü.....	18
Çizelge 3.3.	Saflaştırma Tamponu.....	19
Çizelge 3.4.	Reaksiyon karışımı.....	19
Çizelge 3.5.	Standart PZR koşulları.....	20
Çizelge 3.6.	Mürekkkepbalığı (<i>Sepia officinalis</i>) türüne özgü polimorfik mikrosatelit lokusları.....	20
Çizelge 3.7.	Mikrosatelit primerleri için kullanılan uygun reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımları.....	21
Çizelge 4.1.	Belirlenen hoplotiplerin kodları ve bölgelere göre dağılımı.....	27
Çizelge 4.2.	Örnekleme bölgelerinde genetik çeşitlilik.....	28
Çizelge 4.3.	Genetik farklılaşmanın belirlenmesinde incelenen grupları oluşturan örnekleme bölgeleri ve birey sayıları.....	29
Çizelge 4.4.	Gruplandırılmış örnekleme bölgelerinin arasında gözlenen genetik farklılaşma.....	29
Çizelge 4.5.	Tespit edilen atasal haplotiplerin bölgelere göre yayılışı.....	34
Çizelge 4.6.	Analizlerde kullanılacak dış grubun belirlenmesi amacı ile değerlendirilen türler.....	35
Çizelge 4.7.	Tespit edilen filogruplar için tarafsızlık analizleri sonuçları ve demografik parametreler.....	44
Çizelge 4.8.	Beş örnekleme bölgesi için incelenen beş mikrosatelit DNA lokusunda belirlenen genetik çeşitlilik değerleri.....	49
Çizelge 4.9.	Değerlendirilen tüm lokuslar için örnekleme gruplarının null allel doğrulaması öncesi ve sonrası genetik farklılaşması.....	51
Çizelge 4.10.	Oluşturulan gruplar arasında, iki farklı model kullanılarak tespit edilmiş olan gruplar arası ve grupları oluşturan populasyonlar arası farklılaşma değerleri ve tüm lokuslar için F-istatistikleri sonuçları.....	59

Çizelge 4.11.	Her bir lokus için, IAM modeli kullanılarak belirlenmiş olan gruplar arası ve grupları oluşturan populasyonlar arası farklılaşma değerleri ve F-istatistikleri sonuçları.....	60
Çizelge 4.12.	Her bir lokus için, SMM modeli kullanılarak belirlenmiş olan gruplar arası ve grupları oluşturan populasyonlar arası farklılaşma değerleri ve F-istatistikleri sonuçları.....	61
Çizelge 5.1.	Atlantik Okyanusu ve Akdeniz’de değerlendirilen mikrosatelit belirteçleri için belirlenmiş allel büyüklükleri.....	63

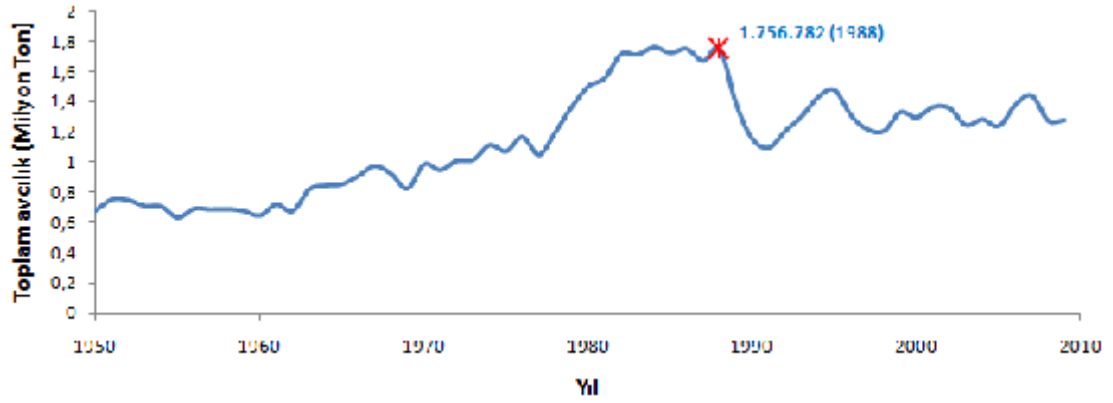
1. GİRİŞ

Nüfus artışına paralel olarak artan besin gereksinimlerinin karşılanması amacı ile tüm dünyada doğal stoklar hızla tüketilmektedir. Tarih boyunca birçok medeniyet tarafında; değerlendirilmiş olan su ürünleri de, günümüzde gereksinime cevap verebilmek amacı ile giderek artan miktarlarda talep görmektedir. Anonim (2009)'nun yayınladığı balıkçılık istatistikleri verilerini incelediğimizde, dünya çapında gerçekleştirilen toplam su ürünleri avcılığının yıllara göre değişimi, stoklar üzerinde her geçen gün artan av baskısını özetlemektedir (Şekil 1.1). 1950'li yıllarda 2 – 3.5 milyon ton arasında değişen avlanan miktarı, 1996 yılında 96.736.521 milyon ton ile 1950 – 2009 yılları arasında gözlenen en yüksek miktara ulaşmıştır. 1996 yılı sonrasında avlanan miktarlarındaki artış yerini azalmaya bırakmıştır. Özellikle büyük yırtıcı balık türleri üzerinde oluşan yoğun avcılık baskısı sonucunda doğada bu türlerin stoklarında önemli azalmalar gözlenmiştir (Hilborn 2007). Üst grup avcı türler olan balıkların sayısının azalması, fırsatçı türler olan kafadanbacaklıların üzerlerindeki avcı baskısının azalmasına neden olmuştur (Caddy ve Rodhouse 1998). Denizel biyokütlerde balıkların azalması ile oluşan boşluk kafadanbacaklı türlerinin populasyon büyüklüklerini arttırmasına fırsat sağlamıştır (Roper vd 1984). Bu nedenle alternatif besin kaynakları arayışı içerisinde olan insanlar ilgilerini kafadanbacaklı türlerine yönlendirmiştir. Son yıllarda yüksek protein değerlerine sahip zengin bir besin kaynağı olan kafadanbacaklı sınıfı üyeleri dünya pazarlarında da balıklardan boşalan yeri doldurmaya başlamıştır.

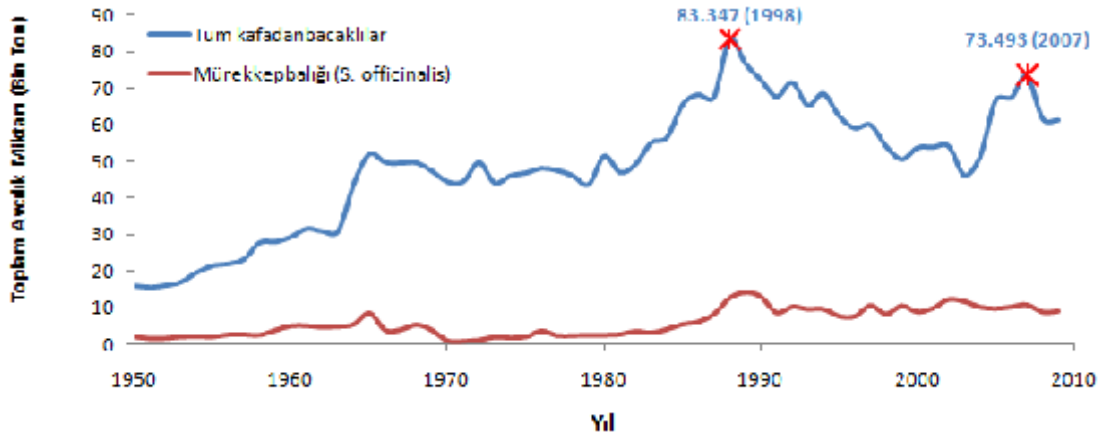
FAO değerlendirmelerinde, ülkemiz denizlerini de kapsayan 37 numaralı (Akdeniz ve Karadeniz) ana avlanma sahası verilerine göre, 1998 yılına kadar benzer bir değişim gösteren kemikli balık ve kafadanbacaklı av miktarları belirtilen yıl içinde sırası ile 1.756.782 ton ve 83.346,5 ton seviyelerine ulaştığı bildirilmiştir (Şekil 1.2 ve 1.3). Ancak kemikli balıklar için sonraki dönemlerde avlama miktarlarında önemli bir değişimin gözlenmediği halde kafadanbacaklı av miktarı 2007 yılında 73.492,5 milyon ton ile tarihteki ikinci tepe noktasına ulaşmıştır (Şekil 1.3). Gözlenen bu durum yukarıda belirtilen biyokütlerdeki değişimin ve bunun balık pazarlarına yansımalarının Akdeniz'deki hikâyesini özetlemektedir (Anonim 2009).



Şekil 1.1. 1950 – 2009 yılları arasında tüm dünyada avlanan toplam av miktarları (Anonim 2009'dan yararlanılarak)



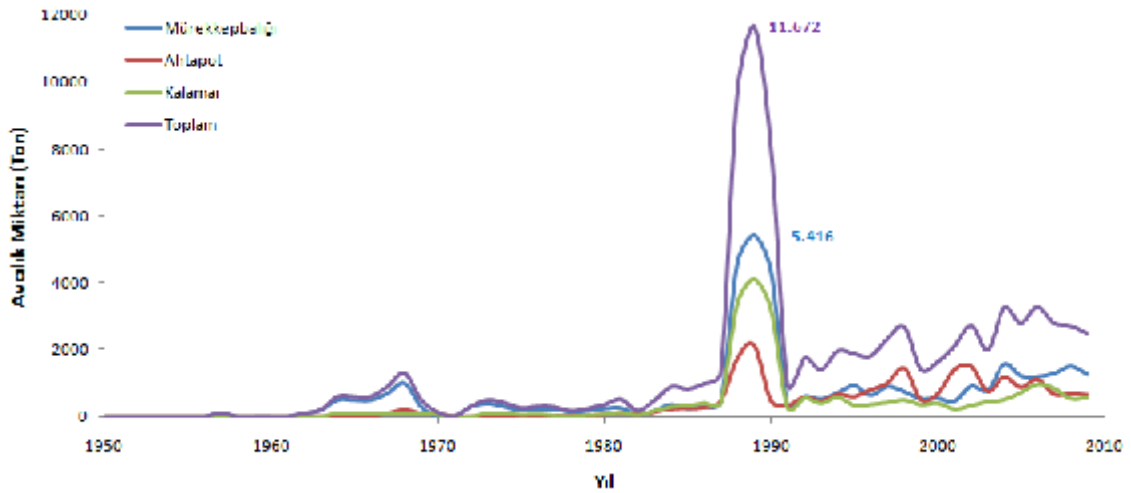
Şekil 1.2. 1950 – 2009 yılları arasında FAO'nun 37 numaralı balıkçılık bölgesinde avlanan toplam kemikli balık miktarları (Anonim 2009'dan yararlanılarak oluşturulmuştur)



Şekil 1.3. 1950 – 2009 yılları arasında FAO'nun 37 numaralı balıkçılık bölgesinde gerçekleştirilmiş olan kafadanbacaklılara ait avcılık miktarları (Anonim 2009'dan yararlanılarak oluşturulmuştur)

Otuzyedi numaralı avcılık bölgesinde yer alan 21 ülkede kafadanbacaklı avcılığı gerçekleştirilmesine rağmen, mürekkebalığı türünün avlanmasına dair dokuz ülkeye ait (Arnavutluk, Cezayir, Kıbrıs, Fransa, Yunanistan, Libya, Slovenya, Tunus ve Türkiye) veri bulunmaktadır. 1950 – 2009 yıllarında bu ülkeler arasında en yüksek toplam avlama 168.204 ton ile Tunus da gerçekleştirilirken Ülkemiz toplam 39.070 ton ile 3 sırada yer almaktadır. Bölgede avlanan mürekkebalığı avcılığı, toplam kafadanbacaklı avının yaklaşık 1/8 ini oluşturmaktadır (Şekil 1.3).

Türkiye için bildirilen av miktarlarını incelediğimizde, avcılığı yapılan kafadanbacaklıların mürekkebalığı, ahtapotlar ve kalamarlar olmak üzere üç ana grup altında değerlendirildiği görülmektedir (Şekil 1.4). 1989 yılında tüm gruplar için en yüksek av miktarları elde edilmiştir. Bu gruplar arasında 1995 yılına kadar en yüksek av miktarını mürekkebalıkları için vermiştir. Bunun yanında 1995 – 2009 yılları arasında kalamar veya mürekkebalıkları dönemsel olarak en yüksek av miktarlarını vermiştir.



Şekil 1.4. Ülkemiz denizlerinde 1950 – 2009 yılları arasında avlanan toplam kafadanbacaklı miktarları (FAO, 2009'dan yararlanılarak oluşturulmuştur)

Dünya çapında balıkçılık stokları azalmaktadır. Sürdürülebilir balıkçılık yönetimi çabalarının genelde tamamen başarısız olmadığı, ancak uygulamalardan kaynaklanan sorunlar nedeni ile dünyanın belirli bölgelerinde başarıdan çok uzakta kaldığı görülmüştür. Avrupa'da gerçekleştirilen en güncel çalışmalarda, bölgede karşı karşıya olunan aşırı balıkçılık baskısının azaltılabilmesi adına çözümler aranmaya çalışılmakta ve sorunun çözümü için sürdürülebilir balıkçılığın, ekosistem dikkate

alınarak gerçekleştirilmesinin önemi vurgulanmıştır (Gascuel vd 2011). Balık stoklarının azalmaya devam etmesi durumunda ilerleyen dönemlerde gereksinimin karşılanabilmesi adına kafadanbacaklı türleri üzerindeki av baskısının artacağı düşünülmektedir.

Ülkemizde balıkçılık yönetimi adına ilgili bakanlıklar tarafından bölgesel veya tür bazında gerçekleştirilen koruma kontrol çabaları söz konusudur. Daha kapsamlı sürdürülebilir balıkçılık yönetiminin hayata geçirilebilmesi için, yetkililerin korunacak bölge ve bölge içerisinde bulunan stoklar hakkında temel verilere sahip olması, planlanmış olan uygulamaların başarıya ulaşmasında büyük öneme sahiptir. Bir bölge için balıkçılık yönetiminin planlanması öncesinde, bölgedeki türlerin tespit edilmesi, türlerin populasyon yapılarının, üreme izolasyonlarının belirlenmesi, gen akışına etki eden faktörlerin ortaya konulması ve balıkçılığın gen havuzu üstündeki etkilerinin ayrıntılı olarak ortaya konulması gerekir.

Bu nedenle ekonomik öneme sahip mürekkepbalığı türünün model canlı olarak ele alınarak, sürdürülebilir balıkçılık yönetim planlanmasına yardımcı olacak populasyon bilgisine ulaşmak çalışmada temel amaçtır. Genetik verilerin morfometrik çalışmalar, markalama çalışmaları gibi klasik yöntemler ile birlikte kullanılması, incelenen populasyonların dinamiklerinin belirlenmesi açısından önemli katkısı vardır.

Bireylerde ait genetik bilginin belirlenmesine ve bu bilginin ekolojik çalışmalarda kullanımına olanak sağlayan araçlar olarak moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Hedeflenen amaçlara ulaşmak adına farklı özellikler taşıyan DNA tabanlı moleküler belirteçler tercih edilmektedir. Çalışmamız kapsamında incelenen populasyonların genetik özelliklerinin ortaya konulması amacı ile örneklenen bireylerin mitokondriyal DNA'larında sitokrom oksidaz I gen bölgesi (COI) ve genomik DNA'larında türe özgü 5 adet polimorfik mikrosatelit lokusu incelenmiştir.

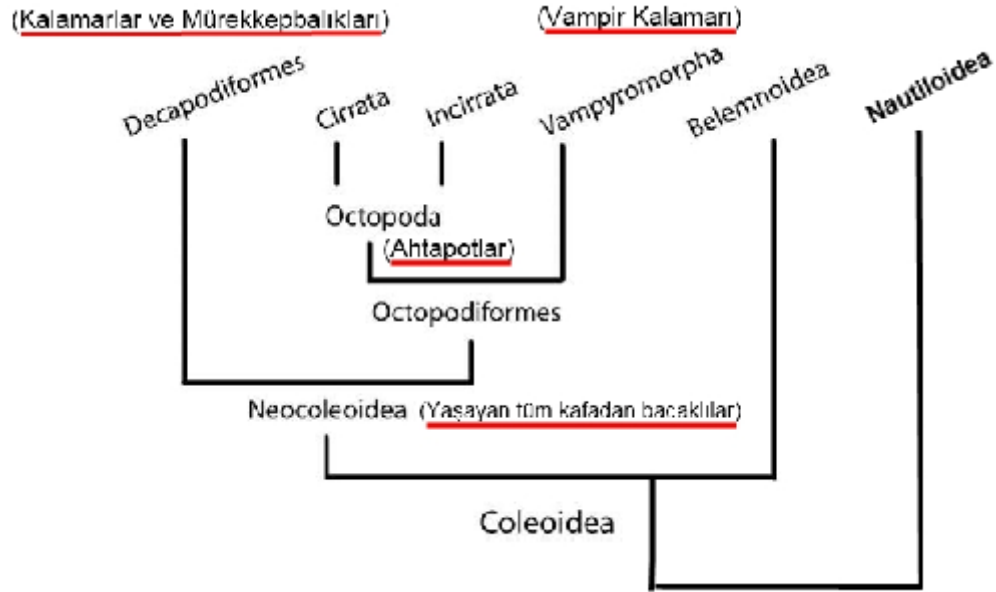
Mitokondriler hücre içerisinde yoğun adenzin trifosfat (ATP)'ın sentezi ile enerji kaynağı olarak kullanılan organellerdir. Hücresel solunumda kullanılan proteinlerin çoğunluğu mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanmaktadır. mtDNA kromozomal proteinlerden yoksun halkasal bir DNA sarmalıdır. Genomik DNA'ya oranla çok daha kısa bir bölge olmasından dolayı ekolojik çalışmalarda tercih

edilmektedir (Awise 2000, Freeland 2008). Ayrıca taşıdığı gen bölgelerinin iyi korunması nedeni ile evrensel olduğunun belirlenmiş olması birçok çalışmada tercih edilen primerlerin kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Nükleer DNA'da görülen ve hücre bölünmesi ardından gerçekleşmiş hataların düzeltilmesi görevini yüklenmiş olan onarım mekanizmalarına oranla mtDNA da daha zayıf bir onarım mekanizması işlev görmektedir. Bu nedenle korunan gen bölgeleri dışında kalan bölgelerde yüksek miktarlarda mutasyon oranları gözlenmektedir. Yüksek mutasyon oranlarının neticesinde mtDNA bol miktarda polimorfizm göstermekte ve bu özelliklerinden dolayı filogenetik ve filocoğrafik çalışmalarda tercih edilmektedir. Ayrıca rekombinasyon gözlenmemesinden dolayı bireyler annelerinin mtDNA'sının bir kopyasını taşımaktadırlar. Bu nedenle genomik DNA'ya oranla daha sağlıklı sonuçlar elde edilmektedir. mtDNA, haploit özellikte olması ve tek bir ebeveynden kalıtılması nedeniyle incelenen popülasyondaki genomik DNA'nın dörtte biri miktarındadır. Bundan dolayı nispeten daha az sayıda DNA kopyası değerlendirildiğinden, incelenen popülasyonların demografik tarihinde yaşadıkları darboğaz veya ani genişleme olaylarının belirlenmesinde daha hassas sonuçlar vermektedir. Belirtilen özellikleri nedeni ile genetik soyun belirlenmesi çalışmalarında tercih edilen moleküler belirteçler içermektedir (Freeland 2008).

Mikrosatelitler (basit baz dizisi tekrarları - SSRs), altı baz çiftine kadar uzunluğa sahip ardı ardına dizilen ve birden fazla tekrar gösteren DNA parçalarıdır (Tautz 1989). Genellikle nükleer genom içerisinde bulunmalarına rağmen bazı türlerde mitokondrinin genomunda da varlıkları tespit edilmiştir. Diğer baz dizilerine oranla çok daha yüksek mutasyon gösterirler. Uzak geçmişte gerçekleşen evrimsel değişimlerin hikâyesinin ortaya konulmasında kullanışlı olmamalarına rağmen yüksek mutasyon oranlarına sahip olmalarından dolayı bireyler ve popülasyonlar arasındaki farklılaşmanın ortaya konulmasında ve popülasyonların coğrafik yapılanmalarının belirlenmesinde çok elverişli belirteçlerdir. Ayrıca günümüze yakın gerçekleşmiş olan genetik değişimlerin ortaya konulmasına da olanak sağlarlar.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Yumuşakçalarının Cephalopoda sınıfı üyeleri 43 familyaya ait yaklaşık 1000 kadar tür ile temsil edilmektedir. Cephalopoda sınıfı Octopoda (ahtapotlar), Decapoda (mürekkepbalıkları ve kalamarlar) olarak adlandırılan iki takım ve tek bir tür barındıran Vampyromorpha (vampir kalamar) ile 6 tür barındıran Nautilidae takımlarından oluşur (Young vd 1998) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kafadanbacaklı ana gruplarının filogenisi (Boyle ve Rodhouse 2005'dan düzenlenerek)

Tamamı denizel ortamlarda yaşamlarını sürdürürler. Yüzey sularından 5000 m ye varan derinliklere kadar uzanan geniş bir derinlik konturunda dağılım gösterirler. Soliter olarak yaşamını sürdüren türlerin yanında milyonlarca birey içeren sürüler oluşturan türleri de vardır. Bilateral simetri gösteren vücutları, çok gelişmiş bir baş ve ayak ile manto ile sarılı iç organların toplandığı kısımda oluşur. Dokunaçlar üzerinde türe bağlı olarak vantuz ve/veya kancalar bulunur. Tümünde olamamak kaydı ile birçok tür, gerek boyut gerekse de morfolojik yapı bakımından eşeyssel dimorfizm gösterir. Dişi bireyler genellikle erkek bireylere oranla daha büyüktür. Erkek bireyler, üreme esnasında dişi bireye üreme hücresi paketlerini aktarmak için özelleşmiş olan kolları (hektokotlus) sayesinde dişi bireylerden ayırt edilebilir. Kafadanbacaklılar sınıfı bilinen en büyük yumuşakça türlerini barındırır. Dev kalamar dışında kalan birçok tür de 50 – 60 kg vücut ağırlığına ulaşmaktadır. Sınıf üyelerinin büyük bir kısmı 1 – 10 kg vücut

ağırlığına sahiplerdir. Evrimsel süreç içerisinde yaşam ortamlarına uyum sağlamak üzere dış kabuk körelmiştir. Bu durum kuvvetli kaslardan oluşan mantonun gelişimine neden olmuştur. Mantolarının kasılıp gevşemesi sayesinde solunumlarını ve hunilerinden basınçlı olarak bıraktıkları su sayesinde hareketlerini sağlarlar. Yumurta bakımı yapan türlerin dişi bireyleri, hunileri ile oluşturdukları su sirkülasyonu sayesinde zemine sabitledikleri yumurtalarının etrafındaki oksijen seviyesini yükseltirler. Huninin bir diğer işlevi ise mürekkep kesesi içerisinde toplanan mürekkebin manto boşluğundan dışarı atılmasını sağlamaktır. Bu sayede peşlerine düşen avcılarını şaşırtarak buldukları bölgeden uzaklaşırlar (Roper vd 1984).

Birçok tür geceleri daha sığ bölgelerde, gündüzleri ise daha derin bölgelerde bulunmak amacı ile vertikal olarak göç davranışı gösterir. Yırtıcı canlılar olan kafadanbacaklılar, besin olarak avlarının yalnızca yüksek kalitede besin değerine sahip parçalarını tercih ederler. Düşük besin değeri taşıyan ve sindirimi zor olan kısımları besin olarak almazlar. Yüksek metabolik hızları sayesinde besini çok etkin bir şekilde vücut kütlelerini arttırmakta kullanmaları sayesinde çok erken dönemlerde ergin birey boyutlarına ulaşabilirler (Boyle ve Rodhouse 2005). Erginleri ufak balıklar, karidesler, yengeçler ve diğer kafadanbacaklı türleri ile beslenirler. Örneğin ahtapotların diyeti içerisinde diğer kafadanbacaklılara ek olarak bivalvler de bulunmaktadır. Buna karşılık bu sınıf üyeleri balinalar, foklar, deniz kuşları, bentik ve pelajik balıkların en önemli besin kaynağını oluşturmaktadırlar. Besin zinciri içerisinde av ve avcı olarak üstlendikleri rol nedeni ile kafadanbacaklı organizmaların varlıkları doğal dengenin korunmasında büyük önem taşımaktadır.

Kafadanbacaklılar ayrı eşeyli canlılardır. Üreme esnasında erkek bireyler gametlerini spermatafor denilen yapılar ile paketler halinde dişi bireylere aktarırlar. Dişi bireyler dölleme işlemini yumurtaların bırakılması esnasında gerçekleştirirler. Kalamarlarda, mürekkepbalıkları ve ahtapotların tersine üreme amacı ile sürüler oluşturma davranışı vardır. Üreme sonrasında ergin bireyler kısa zamanda ölür. Bu nedenle belirli türler dışında yaşam süreleri buldukları bölgedeki su sıcaklığına bağlı olarak 1 ila 2 yıl arasında değişmektedir. Türe bağlı olarak, deniz zeminine konumlandırılan birkaç büyük yumurtadan, planktonda serbest halde bulunan ve milyonlarca yumurtadan oluşan kitlelere kadar farklı şekillerde kuluçka dönemine

sahiplerdir. Diğer yumuşakça türleri ile karşılaştırıldığında yumurta sayıları azdır. Yumurtalarında embrioyu beslemek amacı ile büyük besin taneleri bulunur. Ahtapotlarda yumurta bakımı söz konusudur. Kuluçka süreleri deniz suyu sıcaklığı ile ters orantılıdır. Yumurtadan çıkan bireyler başkalaşım göstermezler ve ergin bireylerin minyatürleridir.

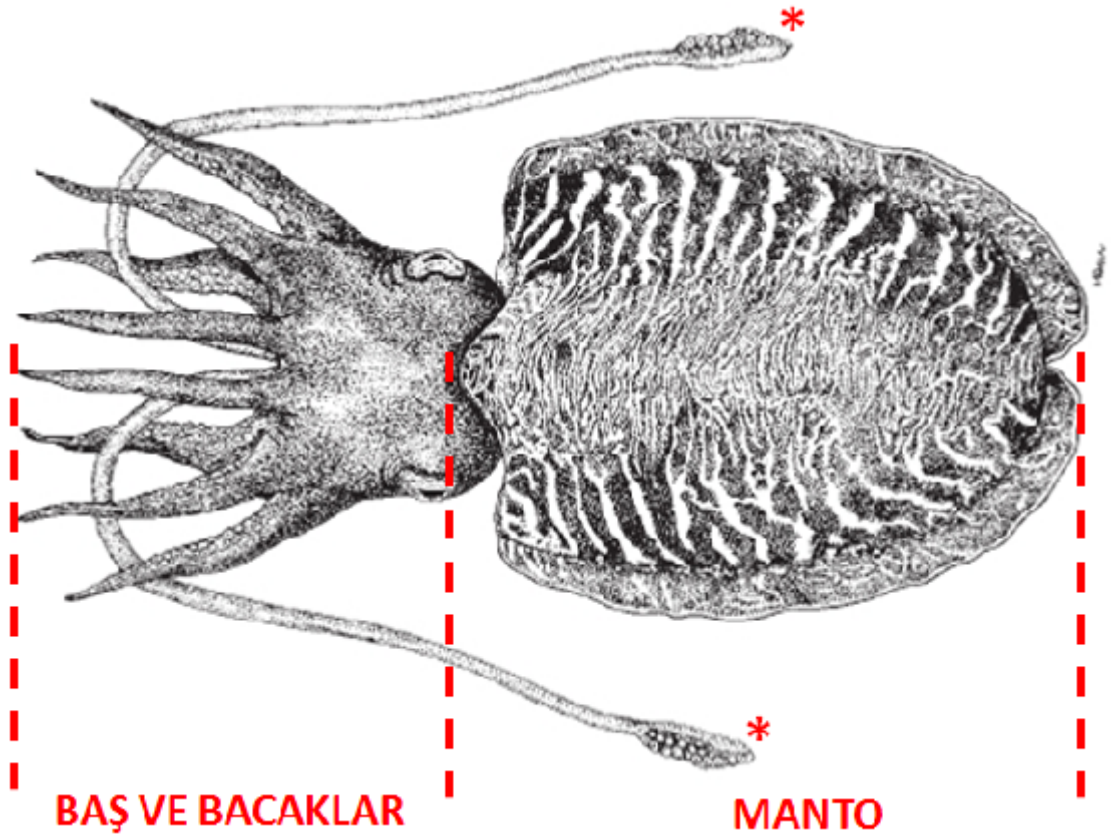
Biyolojik ve ekolojik özellikler göz önünde bulundurulduğunda, kafadanbacaklı sınıfı üyelerinin, gen akışına etki ederek popülasyonların yapılanmasına şekil veren fiziksel ve evrimsel faktörlerin belirlenmesinde model olarak incelenmeye uygun olduğu görülmektedir.

Çalışmamız kapsamında değerlendirdiğimiz tür olan mürekkepbalığı (Şekil 2.2), yaşam döngüsünü 0 – 200 m derinlikler arasında geçiren nektobentik özellikte bir türdür. Dağılım gösterdiği bölgelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri etkisinde 1 ila 2 yıl arasında bir yaşam süresine sahiptir. Üreme kabiliyetine erken dönemde erişirler ve ömürleri boyunca yalnızca bir defa üreme aktivitesi gösterirler. Yumurtalarını 1 ila 10 m derinlikler arasında kalan sahil bölgelerinde, zeminde bulunan sert cisimlerin, su bitkilerinin üzerine bırakırlar. Yumurtalardan çıkan yavrular da nektobentik davranış sergilerler. Ergin bireyler mevsimsel olarak sahil bölgeleri ile derin sular arasından göç gerçekleştirirler de yüzme kabiliyetleri gelişmemiştir. Doğu Atlantik ve Karadeniz dışında tüm Akdeniz de dağılım göstermektedir (Şekil 2.4) (Boletzky 1987).

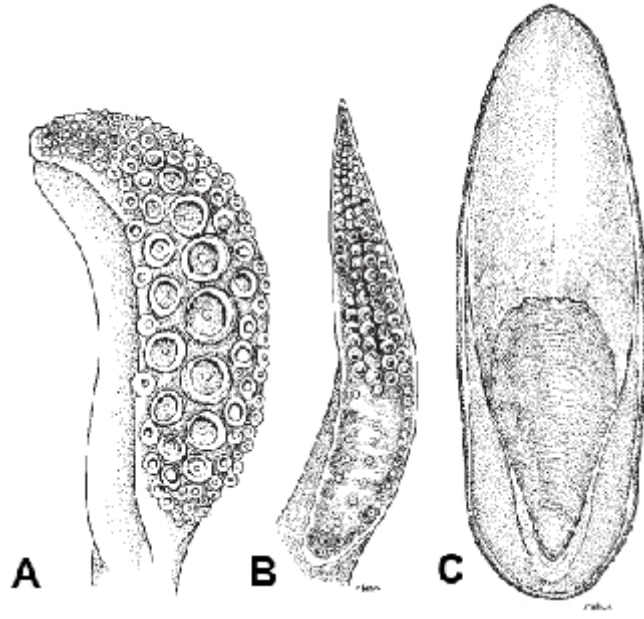
Türün taksonomik konumu (Boyle ve Rodhouse, 2005);

Alem: Animalia
Şube: Mollusca
Sınıf: CEPHALOPODA
Altsınıf: COLEOIDEA Bather 1888
Üsttakım: DECABRACHIA Boettger 1952
Takım: SEPIOIDEA Naef 1916 (cuttlefish)
Aile: SEPIIDAE Keferstein 1866 (cuttlefish)
Cins: *Sepia*
Tür: *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758)

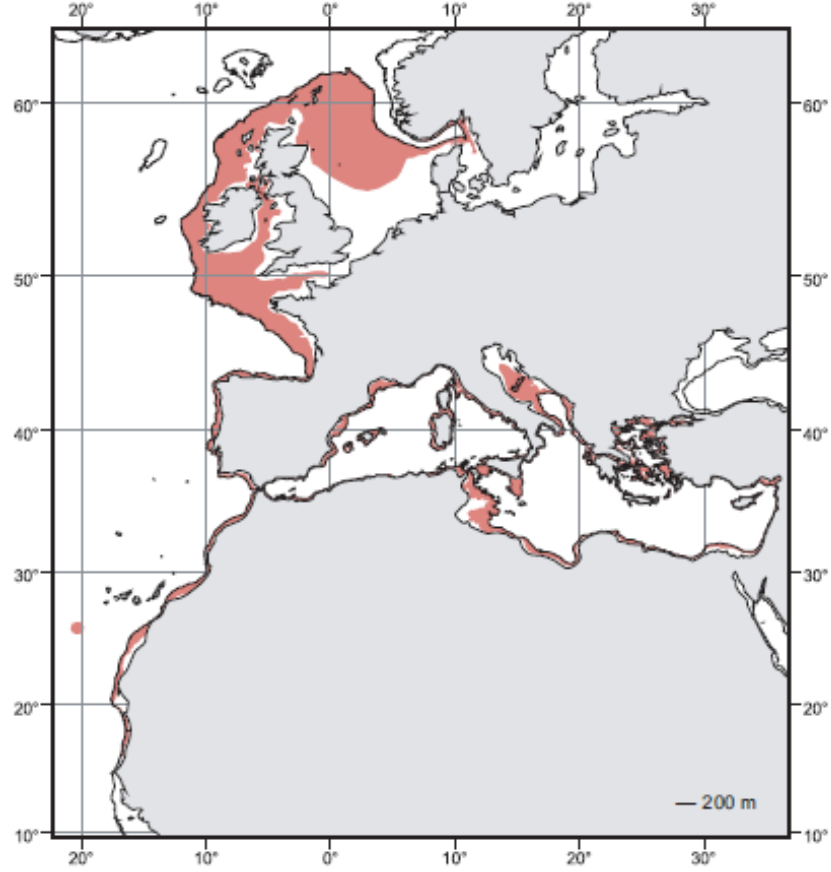
Türün tanımlayıcı özellikleri: Belirgin yüzgeçleri vardır ve mantonun arka kısımlarına doğru hafifçe genişler. Kollar üzerinde 4 sıra vantuz bulunur. Erkek bireylerde ventral konumlu sol kol hektokotilüs adı verilen bir yapıya dönüşmüştür. Hektokotil üzerinde 6 sıra normal boyutlu vantuz bulunur. (Şekil 2.3 A). Tentaküller üzerinde 5 – 6 adet enine konumlu vantuz bulunur. Tentaküllerin orta kısımlarında çapı diğer vantuzların iki katı olan 5 – 6 adet vantuz yer alır (Şekil 2.3 B). Manto desteği olan kabuğun posterior kısmı yuvarlaktır ve kitin bir kılıf ile desteklenen kısa bir diken bulunur (Şekil 2.3 C) (Jereb ve Roper 2005).



Şekil 2.2. Mürekkepbalığı dış morfolojisi (* Tentaküller) (Jereb ve Roper 2005)



Şekil 2.3. Mürekkebalığının tanımlayıcı özelliklerinin şematik çizimleri (A. Tentakül yapısı; B. Hektokotil yapısı; C. Vücut destek kabuğu) (Jereb ve Roper 2005)



Şekil 2.4. Mürekkebalığının (*Sepia officinalis*) bilinen yayılış alanı (Jereb ve Roper 2005)

Mürekkepbalığı (*Sepia officinalis*, L. 1758) Akdeniz’de dağılım gösteren kafadanbacaklılar arasında yüksek miktarlarda avlanan türlerden birisidir. Türün insanlar tarafından farkedilmesi uzun yıllar öncesine dayanmaktadır. Aristo, (~ MÖ 330), "Historia Animalium" isimli eserinde mürekkepbalıklarının yaşam şekilleri ve üreme özelliklerine dair birçok tanımlama yapmıştır. Günümüzde de türe olan ilgi devam etmektedir. Yirminci yüzyıl içerisinde kafadanbacaklıların özelliklerini ortaya koymaya yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Mürekkepbalığı en kolay temin edilen ve çevresel faktörlere en kolay uyum sağlayan tür olması nedeni ile kafadanbacaklı araştırmalarında model tür olarak tercih edilmiştir. Tompsett (1939), *Sepia* cinsinin anatomik özelliklerini gösteren ayrıntılı çizimler yayınlamıştır. Türün biyolojik özelliklerinin derlendiği en önemli çalışmalardan birisi Boletzky (1987)’nin “Kafadanbacaklıların Yaşam Döngüleri” isimli kitapta yayınladığı kısımdır. Bahsi geçen çalışmalar türün araştırmacılar tarafından tanınmasına olanak vermiştir. İlerleyen yıllarda türün üreme özelliklerinin ortaya konulduğu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Bouchaud 1991, Gauvrit vd 1997, Hanlon vd 1999, Laptikhovsky vd 2003). Üreme özelliklerinin ortaya konulmasının ardından araştırmacıların yöneldiği sonraki çalışmalar ise, türün yetiştiricilik koşullarına uyumunun ortaya konulmasının amaçlandığı uygulamalardır (Forsythe vd 1994, Domingues vd 2001).

Ülkemizde ise kafadanbacaklılar faunasının belirlenmesi amacı ile Katağan vd (1993) ve Salman vd (1997, 1998a, 2002)’nin sırası ile Marmara Denizi, Ege Denizi, Kuzey Kıbrıs ve Doğu Akdeniz’de çalışmalar sürdürmüşlerdir. Gerçekleştirilen bu çalışmaların ürünü olan ve kafadanbacaklıların özelliklerinin belirtildiği, denizlerimizde bulunan kafadanbacaklı türlerinin bildirildiği ve belli başlı türlerin yetiştiricilik uygulamalarının açıklandığı ilk Türkçe kitapçık Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı katkısı ile yayımlanmıştır (Salman vd 1998b). Daha sonraki yıllarda diğer kafadanbacaklı türlerinin değerlendirildiği birçok çalışmanın yanında, Güven (2004) Akdeniz’de, Onsoy ve Salman (2005) Ege Denizi’nde mürekkepbalığının üreme özelliklerini araştırmışlardır.

Son yıllarda geleneksel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların yanında mürekkepbalığı türünün popülasyonlarının coğrafik-genetik yapılanmasının

ortaya konulabilmesi için genetik belirteçlerin kullanıldığı birçok araştırma çalışması gerçekleştirilmiştir (Pérez-Losada vd 1999, Pérez-Losada vd 2002, Garoia vd 2004, Wolfram vd 2006, Pérez-Losada vd 2007, Turan ve Yağlıoğlu 2010).

Türün dağılım gösterdiği bölgelerden Atlantik Okyanusu – Akdeniz ayrımının çalışma alanı olarak belirlendiği iki çalışma söz konusudur. Bunlardan ilkinde araştırmacılar türün bölgedeki populasyonlarının coğrafik yapılanmasını belirlemek amacı ile allozim farklılaşmasını incelenmiştir (Pérez-Losada vd 1999). Çalışma sonunda, Messinian da Cebelitarık Boğazı'nın kapanması sonucunda Akdeniz ve Atlantik Okyanusu'nun birbirinden ayrılması ve 100 – 200 m' lere varan su seviyesi azalmalarına dikkat çekilmektedir. Bu olay, populasyonların birbirlerinden izole olmalarına neden olmuş ancak, boğazın açılması sonrasında populasyonlar arasında ikinci bir temasın gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bahsi geçen olayın, geçidin her iki yanında bulunan populasyonların yapılanmasında birincil etkiye sahip olduğu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Ayrıca bölgesinin hidrografik özelliklerinin de Akdeniz'den Atlantik Okyanusu'na gen akışına engel olurken Atlantik kaynaklı gen akışına fırsat tanıdığı belirtilmiş ve bu durumda populasyonların yapılanmasında ikincil önem taşıyan fiziksel etki olduğunu savunmuşlardır.

Shaw ve Pérez-Losada (1999) populasyonlar arasındaki varyasyonların belirlenmesinde daha etkin olan türe özgü yedi polimorfik mikrosatelit lokus belirlemiştir. Allozimler seçilim baskılarından etkilenmelerine rağmen, mikrosatelit belirteçler populasyon yapılanmasının belirlenmesinde daha etkin sonuçlar vermektedir. Yeni moleküler belirteçlerin varlığı, önceki yıllarda gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda elde edilen sonuçların ayrıntılı olarak irdelenmesine olanak sağlamıştır. Mikrosatelit belirteçler varlığında araştırmacılar türün populasyon yapılanmasının daha ayrıntılı incelenmesini sağlamak üzere bölgede yeni bir çalışma gerçekleştirme olanağı bulmuşlardır (Pérez-Losada vd 2002). Bu çalışmada araştırmacılar, Akdeniz – Atlantik Okyanusu geçişinde mürekkepbalığının genetik yapılanmasına etki eden faktörlerin belirlenmesi amacı ile alternatif hipotezleri test etmişlerdir. Ayrıca Cebelitarık Boğazı'nın tür için günümüzde halen gen akışına kısıtlama getiren bir engel oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, daha önceden gerçekleştirilmiş olan allozim farklılaşmasının değerlendirildiği çalışmanın sonuçlarında da belirtilen,

son buzul çağlarında Cebelitarık Boğazı'nın kapanması sonucunda Atlantik Okyanusu ile Akdeniz'in birbirinden ayrılmış olmasının populasyonların yapılanmalarında etkin olması fikrini desteklemişlerdir. İspanya'da bulunan Almeira ile Cezayir'de bulunan Oran bölgeleri arasında varlığı bilinen güçlü okyanus akıntılarının etkisi ile belirtilen bölgeler arasında uzanan ve gen akışını baskılayan bir bariyerin varlığı ve bariyerin iki yanında ayrı gen havuzlarının bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca türün bölgesel olarak gösterdiği genetik varyasyonun coğrafik mesafeler ile korelasyon göstermesi nedeni ile tür için mesafeye bağlı izolasyon hipotezinin geçerliliği bildirilmiştir.

İtalyan araştırmacılar, ülkeleri için yüksek öneme sahip olan Adriyatik Denizi balık stoklarının belirlenmesine yönelik gerçekleştirdikleri ve FAO tarafından desteklenen ADRIAMED projesi kapsamında bölgedeki türlerin populasyonlarının yapılanmalarını ortaya koymayı amaçlayan araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu proje kapsamında *S. officinalis*'in incelendiği çalışmada, türe özgü mikrosatelit belirteçler değerlendirilerek, türün Adriyatik Denizi içerisindeki genetik varyasyonunun ortaya konulması amaçlanmıştır (Garoia vd 2004). Çalışma sonunda bölgede türün gen akışına etki edebilecek herhangi bir fiziksel faktörün olmadığına değinilmiş ve homojen dağılım gösteren tek bir gen havuzunun varlığı bildirilmiştir.

S. officinalis türünün dağılım bölgesinin kuzeyini oluşturan İngiliz Kanalı ve Biscay Körfezi'nde, türün bireylerinin farklı üreme özellikleri gösterdiğini bildiren (Mangold 1966, Boucaud-Camou ve Boismery 1991) ve kesin kanıtlanmamış olsa da Biscay Körfezi ile İngiliz Kanalı'nda bulunan *S. officinalis* populasyonlarının ayrıldığını bildiren çalışmalar (Le Goff ve Daguzan 1991, Dunn 1999, Wang vd 2003) söz konusudur. Wolfram vd (2006) bu çalışmaların ortaya attığı görüşü test etmek amacı ile mürekkepbalığında polimorfik mikrosatelit bölgelerindeki farklılaşmaları incelemiş ve türün bölgedeki genetik varyasyonunun ve populasyon yapılanmasını belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonrasında araştırmacılar, karşılaştırdıkları iki bölge arasında önemli miktarda gen akışı olmasına rağmen homojen tek bir populasyon oluşturmadıklarını ve ortak bir üreme özelliği göstermediklerini vurgulamışlardır.

Tüm bu çalışmaların ardından, Pérez-Losada vd (2007) mürekkepbalığı türünün değerlendirildiği ve türün günümüz-geçmiş populasyon dinamiklerinin ortaya konulduğu en kapsamlı çalışmayı gerçekleştirmiştir. Çalışma kapsamında Atlantik Okyanusu ve Akdeniz'den örneklemeler yapılmış ve örneklenen bireylerin mtCOI gen

bölgesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda mesafeye bağlı genetik farklılaşmanın türün geçmişteki ve günümüzdeki populasyon yapılanmasında birincil etken olduğu fikrini belirtmişlerdir. Çalışmada Atlantik Okyanusu ile Akdeniz arasında gözlenen ve gen akışına etki eden birçok bariyerin belirlenmesine rağmen Akdeniz içerisinde yalnızca Batı Akdeniz ile Ege Denizi arasında gen akışını kısıtlayan bir bariyer bölgesinin varlığı bildirilmiştir. Bariyer bölgelerin birçok türün populasyon yapılanmasında etken olmasına rağmen, yapılan analizler sonucunda belirlenen bariyer bölgeleri ve komşu bölgeler ile arasında gerçekleşen göçler nedeni ile bu faktörün *S. officinalis* türünün populasyon yapılanmasında önemli etkilerinin olmadığını belirtmişlerdir.

Son olarak çalışmamız ile aynı bölgede, *S. officinalis* türünün populasyon yapılanmasının belirlenmesi amacı ile mtDNA ND 5/6 bölgesinin değerlendirildiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Turan ve Yağlıoğlu 2010). Çalışmada genetik verilere ek olarak bireylerin morfometrik ölçümleri ve mürekkepbalığı kemiğinin kimyasal özellikleri de bölgeler arasındaki farklılaşmayı gözlemek amacı ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar çalışma bölgeleri olan Akdeniz (İskenderun Körfezi, Antalya Körfezi), Ege Denizi ve Marmara Denizi'nden toplamda 4 bölgeden örnekleme gerçekleştirmişler ve çalışma sonucunda değerlendirilen bölgelerin tamamının genetik, morfometrik ve kimyasal özellikleri bakımından birbirleri ile farklılık gösterdiklerini bildirmişlerdir.

İncelenen çalışmaların tamamında birçok değişik faktörün etkisi altında *S. officinalis* türü populasyonlarının arasında genetik farklılaşmalar gözlemlendiği bildirilmiştir. Araştırmacıların birçoğu gen akışına etki eden bariyer bölgelerinin varlığından ve etkilerinden bahsetmişlerdir. Bunun yanında mesafeye bağlı genetik farklılaşmanın mürekkepbalığı için populasyon yapılanmasında önemli etkisi olduğu fikri öne çıkmaktadır.

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında mtCOI bölgesi ve beş polimorfik mikrosatelit lokusunun değerlendirilmesi ile;

- ❖ *Sepia officinalis* türünün ülkemiz Akdeniz ve Ege Denizi sahillerindeki genetik çeşitliliğinin saptanması,

- ❖ Bölgesel olarak farklılaşmış alt populasyonların bulunup bulunmadığının belirlenmesi,
- ❖ Türkiye sahil populasyonlarının geçmişte yaşamış oldukları değişim veya gelecekte yaşanması olası dinamiklerin tahmin edilmesi,
- ❖ Türkiye sahil populasyonlarının Akdeniz'in diğer populasyonları ile ilişkileri veya genetik farklılıklarının saptanması amaçlanmaktadır.

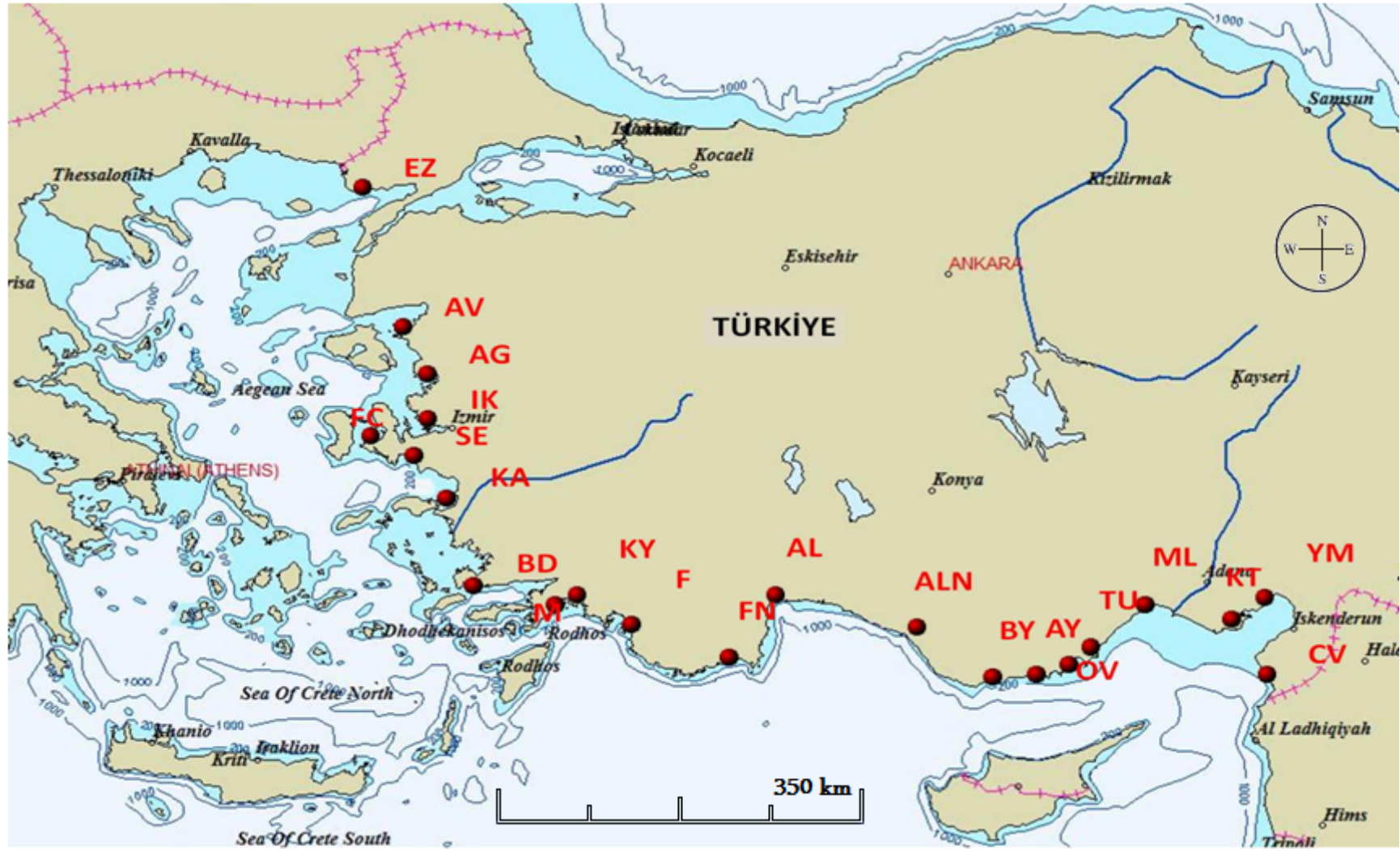
3. Materyal ve Metot

3.1. Örnekleme

Sunulan çalışmada Ege Denizi ve Akdeniz sahillerinde belirlenmiş olan 22 istasyondan ticari balıkçı tekneleri ile örnekleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Örneklemler kapsamında her biri kendi örnekleme bölgesine sahip balıkçı barınakları tercih edilmiştir. Örneklemler bizzat her istasyon ziyaret edilerek gerçekleştirilmiştir. Belirlenen istasyonların kodları ve doku alınan bireylerin sayısı Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında Ege Denizi ve Akdeniz’de örnekleme gerçekleştirilen istasyonlar ve örneklenen birey sayıları (N: birey sayısı)

	İstasyon Adı	İstasyon Kodu	N
Akdeniz	Çevlik	CV	5
	Yumurtalık	YM	5
	Karataş	KT	5
	Mersin Limanı	ML	77
	Taşucu	TU	4
	Ovacık	OV	5
	Aydıncık	AY	5
	Bozyazı	BY	5
	Alanya	ALN	4
	Antalya Limanı	AL	80
	Fenike	FN	5
	Fethiye	F	15
Ege Denizi	Köyceğiz	KY	15
	Marmaris	M	50
	Bodrum	BD	14
	Kuşadası	KA	4
	Seferihisar	SE	57
	Çeşme	FC	5
	İzmir Körfezi	IK	5
	Aliğa	AG	5
	Ayvalık	AV	5
	Saroz Körfezi	EZ	72



Şekil 3.1. Çalışma kapsamında örneklemelerin gerçekleştirildiği bölgeler

3.2. DNA İzolasyonu

Örneklenen bireylerin tentaküllerinin ağız bölgesine yakın kısımlarından alınan doku parçaları moleküler işlemler uygulanıncaya kadar etil alkol içerisinde cryo-tüplerde saklanmıştır. Dokulardan total DNA'nın izolasyonu amacı ile CTAB DNA izolasyon protokolü kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. CTAB DNA izolasyon protokolü (Freeland 2008'den)

1. Bireylerden alınan ~ 50 mg doku örneği 1.5 ml hacimli tüplerde aktarıldı.
2. Tüplere 400 µl saflaştırma tamponu (CTAB) (Çizelge 3.3) eklendi.
3. İnkübasyon öncesi tüplerin içerisine 10 µl proteinaz K * (10mgml⁻¹) eklendi.
4. Tüpler inkübasyon amacı ile 55 °C'de 2 saat süre ile bekletildi.
5. Tüp içerisine 400 µl Kloroform : IAA eklenerek 10 dak. çalkalandı.
6. Tüpler 13000 rpm'de 10 dak. süre ile santrifü edildi ve süpernatant 1.5 ml hacimli yeni bir tüpe aktarıldı.
7. Yeni tüp içerisindeki süpernatanta 500 µl – 20 °C bekletilmiş saf etanol ilave edildi ve tüpler 1 saat süre ile derin dondurucuda bekletildi.
8. Derin dondurucudan alınan tüpler 13000 rpm'de 10 dak. süre ile santrifüj edildi ve tüp içerisindeki süpernatant (etanol) uzaklaştırıldı.
9. Peletler yıkanmak ve nükleik asitler dışında kalan diğer maddelerin uzaklaştırılması amacı ile % 70'lik etanol eklendi.
10. Tüp içerisindeki süpernatant (etanol) uzaklaştırıldı ve peletler 10 dak. süre ile 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde kurutuldu.
11. İçerisindeki etanol tamamen uzaklaştırılmış olan tüplerde bulunan peletler 100 µl ddH₂O ile sulandırıldı.
12. DNA'lar 4 °C 'de saklandı.

* Proteinaz K, moleküler biyoloji uygulamalarında genellikle proteinlerin parçalanmasını ve bu sayede nükleik asitlerin kontamine olmasını engeller. Ayrıca nükleaz enzimini inaktif duruma getirmesinden dolayı nükleik asitler arasında bulunan fosfodiester bağların korunmasına olanak sağlar (Freeland 2008).

Çizelge 3.3. Saflaştırma Tamponu

Kullanılan Kimyasallar	Miktar
CTAB	% 2
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM (pH 8)
Tris – HCl	100 mM (pH 8)

3.3. mtCOI Gen Dizilerinin Eldesi

Çalışma kapsamında *Sepia officinalis* popülasyonlarının geçmişte ve günümüzdeki genetik dinamiklerinin karakterize edilmesi amacı ile mitokondriyal sitokrom oksidaz geninin birinci alt birimi (mtCOI) analiz edilmiştir. Bu kapsamda 22 örnekleme bölgesinden toplamda 225 bireyden izole edilmiş DNA'lardan, Folmer vd'nin (1994) dizayn ettikleri primerler (**HCO1-2198** – 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT-3' ve **LCO1-1490** 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG-3') kullanılarak COI gen bölgesi (625 bp) çoğaltılmıştır. Hedeflenen gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltımı esnasında omurgasız canlılar ile yapılan çalışmalarda tercih edilen standart PZR koşulları (Çizelge 3.5) kullanıldı. Belirlenen optimum reaksiyon karışımı çizelge 3.4'de verilmiştir.

PZR ürünleri % 2 lik agaroz jellere yüklenerek hedeflenen ürünün varlığı belirlendi. Daha sonra elde edilmiş olan PZR ürünleri incelenen bireylerin mtCOI alt ünitesi dizileri belirlenmesi amacı ile Macrogen (Güney Kore) firmasından hizmet alımı yoluyla belirlenmiş ve elde edilen diziler bilgisayar analizlerinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Reaksiyon karışımı

Kimyasallar	Konsantrasyon	Miktar
Taq Tampon	10X	2.5 µl
Çözeltisi		
Mg ₂ Cl	25 mM	0.75 µl
dNTP'ler	10 mM	2.5 µl
Primerler	10 mM	2.5 µl (Her bir primer)
Taq		0.1 µl
ddH ₂ O		4.15 µl
		Toplam: 15 µl

Çizelge 3.5. Standart PZR koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre
95 (başlangıç denatürasyon)	3 dak.
95 (denatürasyon)	30 sn.
45 (Primerlerin bağlanması)	45 sn.
72 (DNA sentezi)	1 dak.
72	5 dak.

3.4. Türe Özgü Mikrosatelit Lokuslarının Genotiplerinin Belirlenmesi

Örneklemlerin gerçekleştirildiği istasyonlar içerisinde, birey sayısı daha fazla olan 5 istasyondan (Mersin Liman, Antalya Liman, Marmaris, Seferihisar, Saroz Körfezi) toplamda 341 birey için, populasyon içi genetik çeşitlilik ve populasyonlar arası genetik farklılıkların belirlenebilmesi amacı ile Shaw ve Pe'rez-Losada (1999) tarafından tanımlanmış mikrosatelit lokusları değerlendirilmiştir. Bahsi geçen mikrosatelit lokusları ile gerçekleştirilmiş önceki çalışmalarda bildirilen SOF1 – SOF5 ve SOF7 arasında gözlenen bağlantı dengesizliği durumundan dolayı bildirilmiş türe özgü yedi mikrosatelit lokusundan beşi ile (Çizelge 3.6) çalışılmıştır.

Çizelge 3.6. Mürekkepbalığı (*Sepia officinalis*) türüne özgü polimorfik mikrosatelit lokusları (Shaw ve Pe'rez-Losada, 1999' dan düzenlenerek)

Lokus	Primerler	T (°C)	Allel Boyu (bp)	Allel Sayısı	H_o — % (H_E)
SOF1 (ATT)17	F: CgCggTTTgTCTACACCAg	51	217–223	16	57–82
	R: AATCATTTCAGTATgTCggAAg		235–274		(54–83)
SOF2 (AAT)16	F: CAgTTATATCAgTTTTCCAAAAGC	51	157–187	11	76–84
	R: ATTAACAgTTTTCAgCAACgA				(81–87)
SOF3 (AAT)15	F: ATATCTggCTgAAAACAAAATC	56	172–220	23 (16)*	74–85
	R: AATgAgTCTATTggAgTCTTTACC		(185–203)*		(80–84)
SOF4 (ATT)10...5...4	F: ATAACCTCTgAgATgAggTATTgTg	55	132–171	14	24–59
	R: ggACTATgTCATCTTCgTTGC				(68–82)
SOF6 (ATT)17	F: ggATTgTTgAggTTTTcTgTg	56	218–257	14	71–86
	R: CAACTAgCCCAgAACgATTg				(80–88)

* SOF3 iki paralel allel dizisi sergilemektedir.

Hedeflenen baz dizilerinin PZR ile çoğaltımı esnasında seçilen her bir lokus için kullanılan uygun reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımları çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Mikrosatelit primerleri için kullanılan uygun reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımları

SOF1		
<u>Reaksiyon karışımı</u>		
Taq Tampon Çözeltisi	10X	2.5 µl
Mg ₂ Cl	25 mM	0.75 µl
dNTP’ler	10 mM	2.5 µl
Primerler	10 mM	2.5 µl (Her bir primer)
Taq		0.1 µl
ddH ₂ O		4.15 µl
<u>PZR koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>
1. basamak	94 (başlangıç denatürasyon)	2 dak.
2. basamak	93 (denatürasyon)	30 sn.
3. basamak	60 – 50 (Primerlerin bağlanması)*	45 – 30 sn.
4. basamak	72 (Dizi sentezi)	1 dak.
5. basamak	20	10 sn.
SOF2		
<u>Reaksiyon karışımı</u>		
Taq Tampon Çözeltisi	10X	2.5 µl
Mg ₂ Cl	25 mM	0.75 µl
dNTP’ler	10 mM	2.5 µl
Primerler	10 mM	2.5 µl (Her bir primer)
Taq		0.1 µl
ddH ₂ O		4.15 µl
<u>PZR koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>
1. basamak	94 (başlangıç denatürasyon)	3 dak.
2. basamak	93 (denatürasyon)	30 sn.
3. basamak	59 – 49 (Primerlerin bağlanması)*	45 – 30 sn.
4. basamak	72 (Dizi sentezi)	1 dak.
5. basamak	20	5 dak.
SOF3, SOF4, SOF6		
<u>Reaksiyon karışımı</u>		
Taq Tampon Çözeltisi		2.5 µl
Mg ₂ Cl	10X	0.75 µl
dNTP’ler	25 mM	2.5 µl
Primerler	10 mM	2.5 µl (Her bir primer)
Taq	10 mM	0.1 µl
ddH ₂ O		4.15 µl
<u>PZR koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>
1. basamak	94 (başlangıç denatürasyon)	3 dak.
2. basamak	93 (denatürasyon)	30 sn.
3. basamak	60 – 55 (Primerlerin bağlanması)**	45 – 30 sn.
4. basamak	72 (Dizi sentezi)	1 dak.
5. basamak	20	5 dak.

* Her döngüde sıcaklık 1 °C düşürüldü

** Her döngüde sıcaklık 0.5 °C düşürüldü

Elde edilen ürünler, ALFexpress™ (Pharmacia Biotech) dizi analizi cihazı kullanılarak % 6'lık poliakrilamid jel içerisinde ayrıştırılmıştır. Sonuçlar Fragment Manager 1.2 programı kullanılarak incelenmiş ve ürünlerin boyları tespit edilmiştir. SOF3 dışında tüm lokuslardaki alleller 3 bç farkı tekrarlı motifi göstermektedir. SOF3 lokusunda ise Shaw ve Pe´rez-Losada (1999)'da da bildirildiği üzere, 1 bç fark ile iki paralel iki allel dizisi gözlenmiştir.

3.5. Verilerin Analizi

3.5.1. mtCOI sekanslarının analizi

Nükleotid dizileri CLUSTAL X (Thompson vd 1997) kullanılarak hizalanmıştır. Elde edilen mtCOI gen bölgesine ait tanımlayıcı istatistikler (haplotip sayısı, polimorfik pozisyon sayısı, parsimonik bilgilendirici pozisyon sayısı), haplotip çeşitliliği (h), nükleotid çeşitliliği (π) ve ortalama nükleotid farklılaşmasının miktarı (k) DNASP 5.10.01 (Librado ve Rozas 2009) programından yararlanılarak tespit edilmiştir.

Çalışma alanındaki populasyon farklılaşmaların belirlenebilmesi amacı ile elde edilen sekanslardan oluşan veri setinden örnekleme bölgelerinin ikili karşılaştırmalı F_{ST} değerlerinin tespit edilmesi amacı ile Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier ve Lischer 2010) programından faydalanılmıştır.

Analizler sonucu elde edilen, bireylere ait baz dizilerinin hangi tür filogenetik analizlere uygun olduğunun belirlemek amacı ile, TreePuzzle (Schmidt vd 2002) programı kullanılarak olasılık haritalama analizi (Strimmer ve Haeseler 1997) gerçekleştirilmiştir.

Haplotipler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacı ile Network 4.5.1.6 (Bandelt vd 1999) programından faydalanılarak median joining-network oluşturulmuştur.

Veri seti için en uygun nükleotid değişim modelini belirlemek amacı ile jMODELTEST 0.1.1 (Posada 2008) programı kullanılmış ve elde edilen model maksimum olasılık ve Bayesian analizlerinde kullanılmıştır.

Veri setini oluşturan diziler arasındaki evrimsel ilişkisini ortaya koyabilmek için filogenetik ağaç analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla MEGA 4.0 (Tamura vd 2007) programı kullanılarak, maksimum bileşik tutumluluk modeli (MCL) altında komşu bağlama (Neighbor-joining – NJ), yakın komşu değişimi üçüncü derece tarama seçeneği ile 10 tekrarlı maksimum tutumluluk (Maximum parsimony – MP) ve belirlenen

evrimsel model kullanılarak PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) programı ile 10 tekrar ve ağaç bölme ve bağlama (TBR) dal değişimi ile maksimum olasılık (Maximum likelihood – ML) algoritmaları uygulanmıştır. Elde edilen ağaçların güvenilirliğinin test edilmesi amacı ile NJ ve MP algoritmalarında 1000 tekrarlı, ML algoritmasında ise 100 tekrarlı seç-bağla (bootstrap) filogeni testi (Felsenstein 1985) gerçekleştirilmiştir.

Bayesian filogeni hesaplamaları MRBAYES 3.1.2 (Ronquist ve Huelsenbeck 2003) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her Markov zinciri rastgele bir ağaçtan başlatılmış ve 5.0×10^7 döngü gerçekleştirilmiştir. Her 1000. döngü zincir için örneklenmiştir. Analizler HKY basit nükleotid modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca her bir kodon pozisyonunun kendi oranına sahip olmasına olanak veren kodon bölümlenme modeline göre de analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerin kararlılığı TRACER 1.5.0 (Rambaut ve Drummond 2003) programı kullanılarak kontrol edilmiştir.

Türün populasyon yapılanmasının belirlenmesi amacı ile Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı kullanılarak 22 örnekleme bölgesinden oluşturulan gruplar arasında 10.000 değişimli moleküler varyans analizleri (AMOVA) gerçekleştirilmiştir.

Gen akışına engel oluşturan bariyerlerin belirlenmesi amacı ile Monmonier'in maksimum farklılık algoritmasını kullanan Barrier 2.2 (Manni vd 2004) programını kullanarak, araştırma alanı içerisinde bulunan genetik bariyerlerin tespiti amaçlanmıştır.

Türün incelenen bölgedeki tarihsel demografik durumunu (nükleotid çeşitliliğinin nötraliteden uzaklaşıp uzaklaşmadığı) ortaya koymak amacı ile DNASP 5.10.01 (Librado ve Rozas 2009) programı kullanılarak Tajima' D (Tajima 1989) testi, Fu ve Li'nin D* ve F* testleri ve Fu' F_s testi (Fu 1997) gerçekleştirilmiştir. Tarihsel süreç içerisinde türün belirlenen filogenetik gruplarının genişleme geçirip geçirmediklerinin belirlenmesi amacı ile uyumsuzluk dağılımı analizleri (Mismatch Distribution) (Harpending 1994) aynı program kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm örnekleme grubu için zaman içerisinde populasyon büyüklüklerinin değişimini belirlemek amacı ile Beast 1.6.1 (Drummond ve Rambaut 2007) programı kullanılarak Bayesian Skyline Plot (BSP) (Minin vd 2008) analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tracer 1.5.0 (Rambaut ve Drummond 2003) programı kullanılarak grafik

haline getirilmiştir. Katı moleküler saat hipotezinin gerçekçi olamayan varsayımlardan kaçınmak için analiz esnasında log-normal gevşek moleküler saat hipotezi tercih edilmiştir. Analizler esnasında daha özgün bir ortalama baz değişimi oranının olmamasından dolayı Wilke (2003)'nin Protostomia için belirlediği oran (alt sınır: 0.015 – üst sınır: 0.025) kullanılmıştır.

3.5.2. Mikrosatelit genotip verilerinin analizi

Seçilen mikrosatelit primerleri kullanılarak elde edilen ürünler poliakrilamit jel içerisinde ayrıştırılıp ve allel boyları belirlenerek veri seti oluşturulmuştur. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacı ile Genepop 4.0 (Rousset 2008) programından faydalanıldı. Bu amaçla allel büyüklüğü, lokus başına allel sayısı (N_a), gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca Genepop programı kullanılarak tüm lokuslara ait genotipler olası Hardy Weinberg dengesinden sapmalar ve bağlantı dengesizliklerinin belirlenmesi amacı ile test edilmiştir.

Örnekleme bölgeleri arasındaki genetik farklılaşmanın (F_{ST} değerleri) ortaya konulması amacı ile Genepop 4.0 (Rousset 2008) programı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca null allellerden kaynaklanan hataların etkisinin düzeltilmesi amacı ile FreeNA (Chapuis ve Estoup 2007) programı kullanılarak genetik farklılaşma tespit edilmiştir.

Örnekleme bölgeleri arasındaki mesafenin, incelenen gruplar arasındaki genetik farklılaşmaya etkisinin belirlenmesi amacı ile “Isolation by Distance” ağ servisinden (Jensen vd 2005) (sürüm 3.16) yararlanılarak 10.000 tekrarlı Mantel test gerçekleştirildi. Analiz esnasında örnekleme bölgelerine ait F_{ST} değerleri ve null allel düzeltilmesi sonrası elde edilen F_{ST} değerleri ile bölgeler arasındaki coğrafik mesafeler kullanılmıştır.

Türün incelenen bölgedeki populasyon yapılanmasının belirlenebilmesi için bayesian metodunun kullanılan Structure 2.3.3 (Falush vd 2007) programı tercih edilmiştir. Structure programı, herhangi bir ön bilgiye gereksinim duymaksızın allel frekansları arasındaki ilişkilerden yararlanarak, Markov zinciri sayısının ve uzunluğunun saptanması yöntemi ile incelenen bireyleri gruplara ayırır. Analiz gerçekleştirilirken, bireylerde çalışılan lokuslar açısından bir genetik karışım varlığını kabul eden “admixture modeli” kullanıldı ve allel frekanslarının bağımsız olduğu

öngörüldü. Populasyonu oluşturan grup sayısını ifade eden K değerinin 1 – 8 arasında olduğu öngörülmüş ve hesaplamalar esnasında her bir K değeri için 20 tekrar gerçekleştirilmiştir. 100000 tekrarlı yazdırma (Length of burnin period) ve yazdırma sonrası 100000 tekrarlı simülasyon (Number of MCMC reps after burnin) yapılmıştır. Uygun K değerinin (populasyon sayısının) belirlenmesi esnasında K değerleri arasındaki olasılık değişimi miktarlarının değerlendirildiği ΔK istatistik metodu kullanılmıştır (Evanno vd 2005).

Gen akışına engel oluşturan bariyerlerin belirlenmesi amacı ile Monmonier'in maksimum farklılık algoritmasını kullanan Barrier 2.2 (Manni vd 2004) programı kullanılmıştır.

Bireylerin örneklendiği 5 farklı bölgede 5 farklı mikrosatelit lokusu değerlendirilerek türün populasyon yapılanmasının ortaya konulması amacı ile Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier ve Lischer 2010) programı kullanılarak oluşturulan gruplar arasında tüm lokuslar ve her bir lokus için 10.000 değişimli moleküler varyans analizleri (AMOVA) gerçekleştirilmiştir. Yapılan hesaplamalarda sırası ile beş lokus için tüm populasyonların ve tek tek her bir lokus için tüm populasyonların değerlendirildiği analizler gerçekleştirilmiştir. Haplotipler arasındaki mesafenin hesaplanmasında farklı allelerin sayılarının değerlendirildiği F_{ST} ve mikrosatelit verilerinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere geliştirilmiş olan, farklılıkların karelerinin değerlendirildiği R_{ST} (Slatkin 1995) metotlarının her ikisi de kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. mtCOI Sekanslarının Analizi

Sepia officinalis türüne ait mtCOI için 225 bireyin dizileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda tüm veri setinde 49 özgün haplotipin varlığı belirlenmiştir. Belirlenen haplotipler saptandıkları popülasyon başına paylaşılan birey sayısı ve analizlerde kullanılan haplotip kodları ve toplam birey sayıları Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Toplam haplotip ve nükleotit çeşitliliği sırası ile ($h = 0.925 \pm 0.007$) ve ($\pi = 0.01202$) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Tek tek örnekleme bölgelerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde haplotip çeşitliliğinin 1 e yakın değerlere ulaştığı görülmektedir. Çalışmamız için tercih ettiğimiz mtCOI bölgesinin mutasyona uğrama hızının fazla olması, yüksek haplotip çeşitliliği değerlerinin gözlenmesine neden olmaktadır. Genetik çeşitliliğin tespiti amacı ile nükleotid farklılaşma miktarlarının değerlendirilmesi bizi daha sağlıklı sonuçlara ulaştıracaktır. Baz dizilerinin 47 bölgesinde varyasyon görülürken bu farklılaşmaların yalnızca 29’u parsimonik anlamda önem taşımaktadır. Nükleotid farklılaşmasının ortalama miktarı (k) ise 7.513 dır.

Popülasyonların farklılaşma derecelerini belirlemek için yakın veya benzer coğrafyalarda gelişmiş popülasyonlar gruplanmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre İskenderun ve Mersin Körfezleri’nde konumlanmış olan ve bölgenin sığ sularında görece daha rahat üreme birliği oluşturacağı ön görülen istasyonlar Doğu Akdeniz grubu altında toplanmıştır. Mersin Körfezi’nin sığ sularının bitimi ile Antalya Körfezi’nin sığ bölgelerinin başlangıcına kadar konumlanmış olan istasyonlar Orta Akdeniz grubu altında toplanmıştır. Antalya Körfezi’nin batısında yer alan sığ bölgelerin bitiminden başlayarak Ege Denizi ile Akdeniz’in ayırım bölgesi olduğu ön görülen Marmaris Körfezi’ne kadar konumlanmış istasyonlar Batı Akdeniz grubu altında toplanmıştır. Marmaris Körfezi ile Kuşadası Körfezi arasında kalan bölgede bulunan istasyonlar Güney Ege grubu altında toplanmıştır. İzmir Körfezi’ni de içine alarak Çanakkale boğazının güneyinde kalan bölgede bulunan istasyonlar Kuzey Ege ve Çanakkale boğazının kuzey kısmında yer alan tek istasyon olan Enez istasyonu da analiz için Saroz olarak gruplanmışlardır.

Çizelge 4.1. Belirlenen hoplotiplerin kodları ve bölgelere göre dağılımı

	EZ	AV	AG	IK	FC	SE	KA	BD	M	KY	F	FN	AL	ALN	BY	AY	OV	TU	ML	KT	YM	CV	Total		
HP1			1																					1	
HP2													1												1
HP3													1												1
HP4													5												5
HP5													1												1
HP6														1											1
HP7														1											1
HP8		1																							1
HP9		1																							1
HP10		1																							1
HP11																1									1
HP12																1									1
HP13								1																	1
HP14								1																	1
HP15								1																	1
HP16								3																	3
HP17								1																	1
HP18															1										1
HP19																							1		1
HP20																							1		1
HP21	1																								1
HP22	1																								1
HP23											1														1
HP24										1															1
HP25	2								1																3
HP26	1								2																3
HP27					3															1					4
HP28																				1					1
HP29																				2		1			3
HP30																				1					1
HP31																				1					1
HP32															3					2		1			6
HP33																	1								1
HP34	1		3						1				1		1	1	2		14	2			3	29	
HP35												1					2								3
HP36						1			1																2
HP37						1																			1
HP38						1						4	12	2											19
HP39						1																			1
HP40	7	1	1	4	1	7			9				1			2								33	
HP41	1			1		2	1	4	6																15
HP42	4	1				10	2		4				1												22
HP43										5	11														17
HP44	2				1	2	1	3		9	3														23
HP45																									1
HP46																									1
HP47																						1	2		3
HP48																									1
HP49																									1
Toplam	20	5	5	5	5	25	4	14	24	15	15	5	23	4	5	5	5	4	22	5	5	5	5	225	

Çizelge 4.2. Örnekleme bölgelerinde genetik çeşitlilik

	CV	YM	KT	ML	TU	OV	AY	BY	ALN	AL	FN	
N	5	5	5	22	4	5	5	5	4	23	5	
k	3	4	4	7	3	3	4	3	3	8	2	
S	3	4	9	18	12	8	10	9	11	17	2	
h	0.700	0.900	0.900	0.597	0.833	0.800	0.900	0.700	0.833	0.700	0.400	
π	0.0026	0.0029	0.0086	0.0061	0.0096	0.0074	0.0064	0.0083	0.0096	0.0087	0.0013	
	F	KY	M	BD	KA	SE	FC	IK	AG	AV	EZ	Toplam
N	15	15	24	14	4	25	5	5	5	5	20	225
k	3	3	7	7	3	8	3	2	3	5	9	49
S	2	2	18	8	12	18	11	11	9	15	17	46
h	0.448	0.562	0.790	0.868	0.833	0.773	0.700	0.400	0.700	1.000	0.847	0.925
π	0.0009	0.0010	0.0093	0.0028	0.0125	0.0085	0.0074	0.0070	0.0083	0.0131	0.0087	0.0120

N: Birey sayısı, **k:** Nükleotid farklılaşmasının ortalama miktarı, **S:** Farklılık gösteren bölge sayısı, **h:** Haplotip çeşitliliği, **π :** Nükleotid çeşitliliği

Çizelge 4.3. Genetik farklılaşmanın belirlenmesinde incelenen grupları oluşturan örnekleme bölgeleri ve birey sayıları

Grupları oluşturan örnekleme bölgelerinin kodları						N
Doğu Akdeniz	CV	YM	KT	ML		37
Orta Akdeniz	TU	OV	AY	BY	ALN	23
Batı Akdeniz	AL	FN	F	KY		58
Güney Ege	M	BD	KA	SE		67
Kuzey Ege	FC	IK	AG	AV		20
Saroz	EZ					20

Gerçekleştirilen ikili F_{ST} analiz sonuçlarına göre en yüksek farklılık miktarı 0.42122 ile Saroz ile Doğu Akdeniz grupları arasında görülmektedir. Ayrıca Doğu Akdeniz grubunun tüm diğer bölgelerden belirgin miktarda farklılaştığı gözlenmiştir. Değerler göz önünde bulundurulduğunda Akdeniz ve Ege Denizi'nde dağılım gösteren popülasyonlar arasında da bir ayrımın var olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.4).

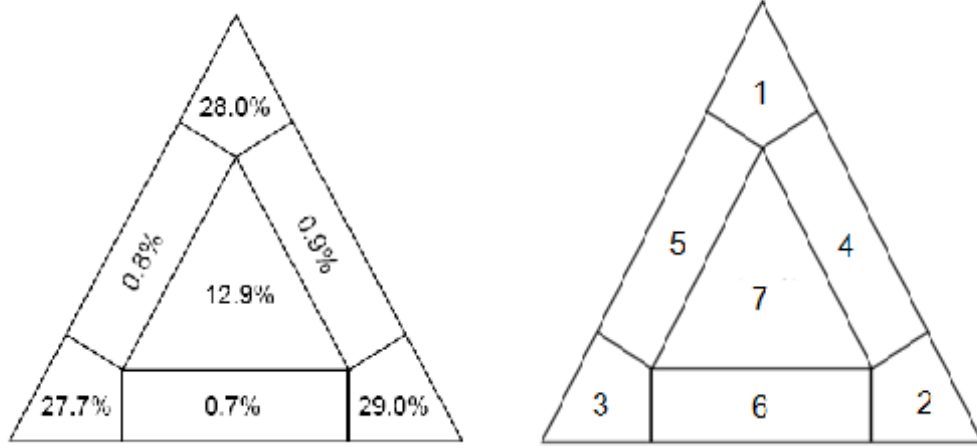
Çizelge 4.4. Gruplandırılmış örnekleme bölgelerinin arasında gözlenen genetik farklılaşma (F_{ST} değerleri)

	Doğu Akdeniz	Orta Akdeniz	Batı Akdeniz	Güney Ege	Kuzey Ege
Doğu Akdeniz	-				
Orta Akdeniz	0.09229***	-			
Batı Akdeniz	0.13859***	0,0171	-		
Güney Ege	0.39303***	0.15615***	0.20863***	-	
Kuzey Ege	0.40336***	0.12871***	0.16612***	0.0011	-
Saroz	0.42122***	0.13977**	0.18092**	-0.0191	-0.0372

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$

Gerçekleştirilen olasılık haritalama analizi sonucunda elde etmiş olduğumuz diyagram (Şekil 4.1), yıldız tipi evrimleşmenin ifade edildiği bölgenin % 12.9, ağaç ile çözümlenebilecek bir filogenin varlığını ifade eden kısmın % 84.7 ve ağ şeklinde ifade edilebilecek bir filogeni varlığını % 2.4 oranında göstermektedir. Bu sonuçlara göre elimizdeki veri setinin dikotomik filogenetik ağaç yöntemi ile çözümlenebileceği ancak elde edilecek ağaçlarda sekansların gösterdiği evrimsel gelişime bağlı politomik kısımların bulunacağı anlaşılmaktadır. Verinin daha net ortaya konulabilmesi için

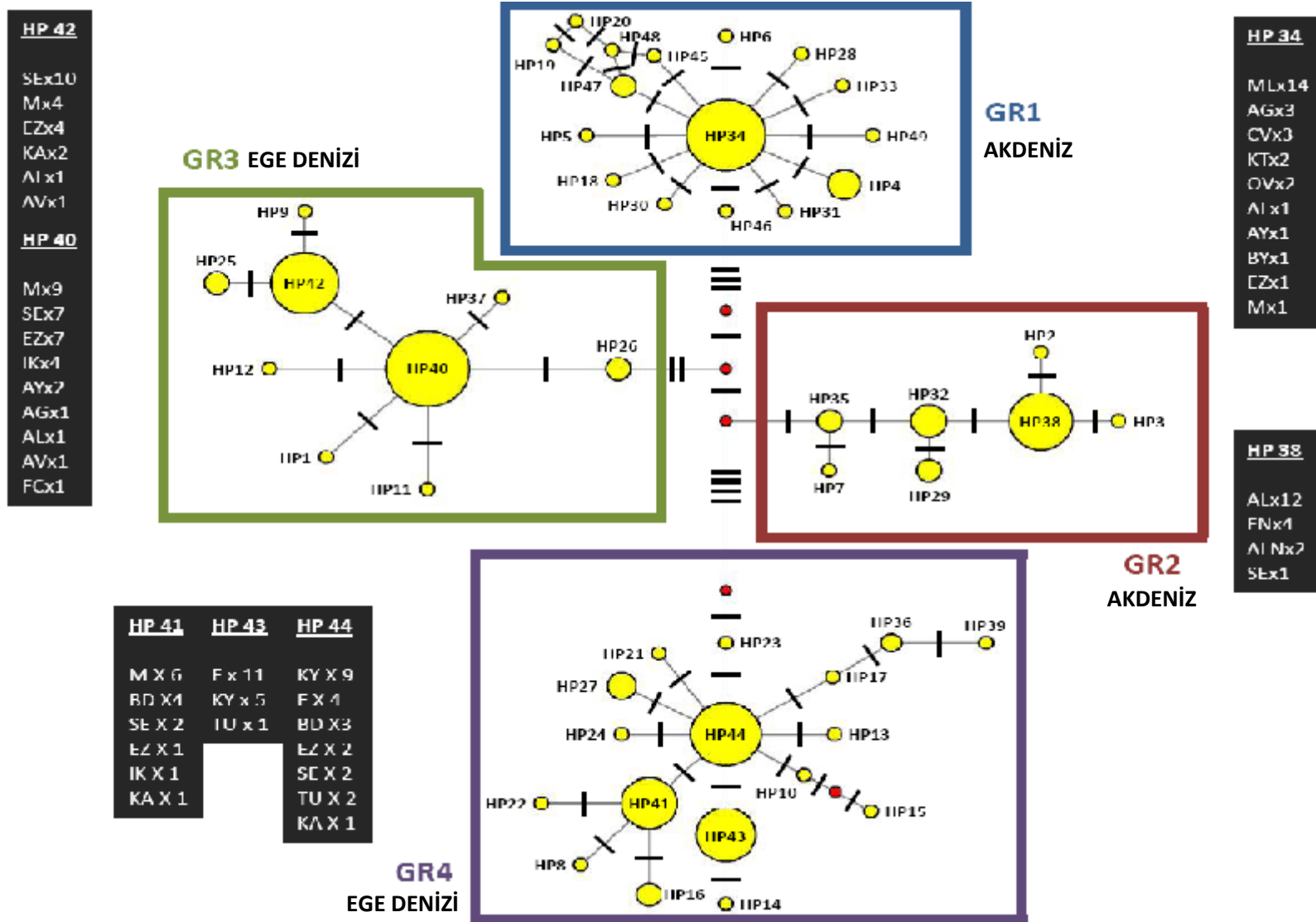
gerçekleştirilecek olan filogenetik ağaç analizlerinin ağ tipi filogeninin ifade edilmesinde tercih edilen network analizi ile desteklenmesi gerekliliği görülmektedir.



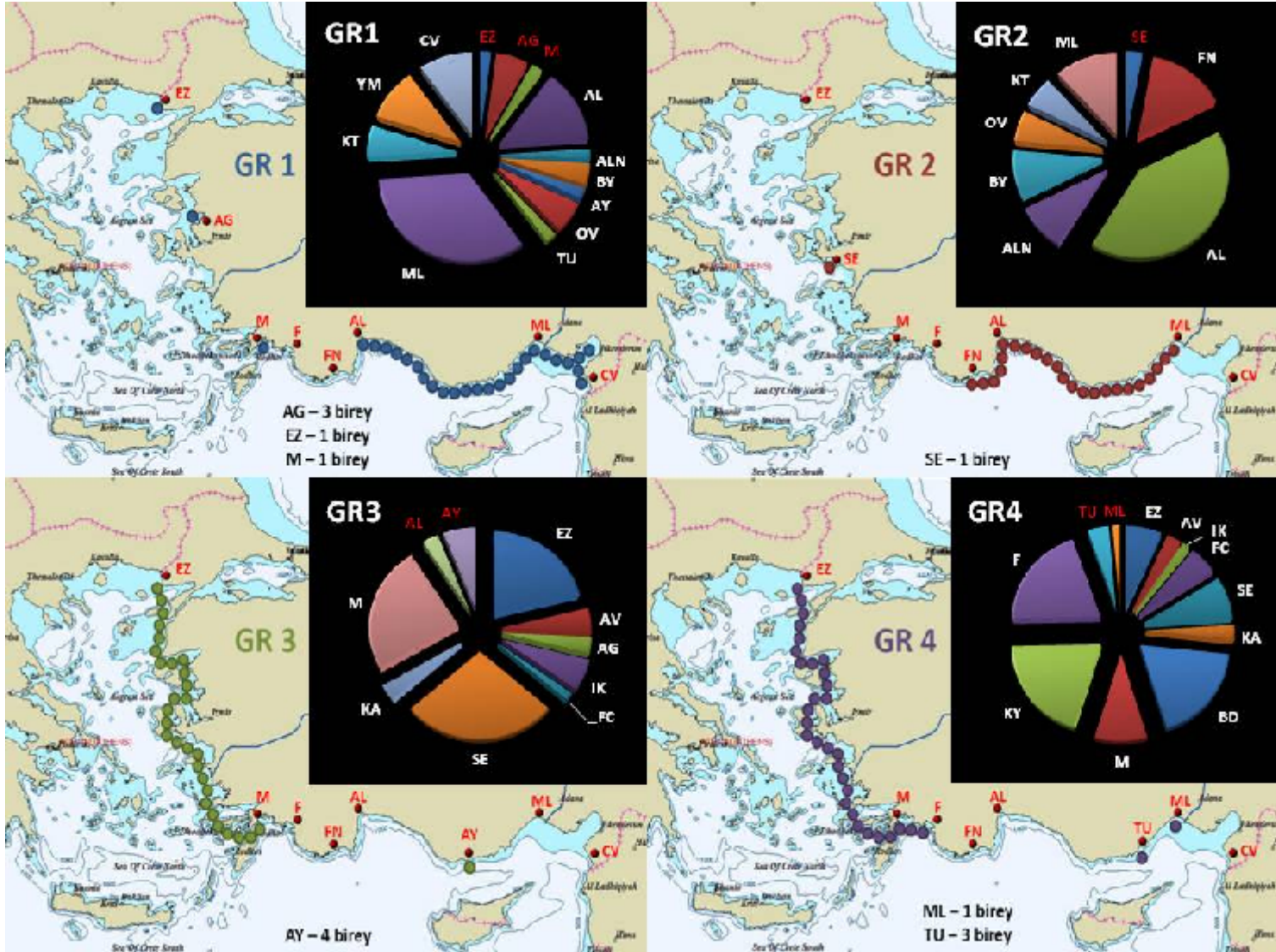
Çözümlemiş bölgeler (1+2+3) = % 84.7
Kısmen çözümlenmiş bölgeler (4+5+6) = % 2.4
Çözümlememiş bölge (7) = % 12.9

Şekil 4.1. mtCOI bölgesine ait baz dizilerinin analizi sonucunda elde edilmiş olan olasılık haritalama diyagramı

Belirlenen 49 haplotip ile gerçekleştirilen network analizi sonucunda ikisi Ege Denizi, diğer ikisi ise Akdeniz kökenli dört farklı haplotip grubu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Yapılan analizlerde GR1, GR2, GR3 ve GR4 olarak isimlendirilecek olan bu haplotip grupları ana hatları ile sırası ile Çevlik – Antalya Limanı (CV – AL), Mersin Limanı – Finike (ML – FN), Mersin – Enez (M – EZ), Fethiye – Enez (F – EZ) istasyonları arasında kalan bölgelerde örneklenen bireyleri kapsamaktadır. GR1 50 birey ve birisi (HP34) atasal olmak üzere 16 haplotip, GR2 34 birey ve birisi (HP38) atasal olmak üzere 7 haplotip, GR3 66 birey ve ikisi (HP40 – HP42) atasal olmak üzere 9 haplotip, GR4 ise 75 birey ve üçü (HP41 – HP43 – HP44) atasal olmak üzere 17 haplotip bulundurmaktadır (Şekil 4.2, 4.3). Elde edilen network incelendiğinde belirlenmiş olan filogenetik grupların atasal haplotiplerden yıldız şeklinde evrimleşmenin gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum daha önceden gerçekleştirmiş olduğumuz likelihood-mapping analizinde % 12.9'luk yıldız şeklinde evrimin gerçekleştiğine dair elde edilen sonucu desteklemektedir.

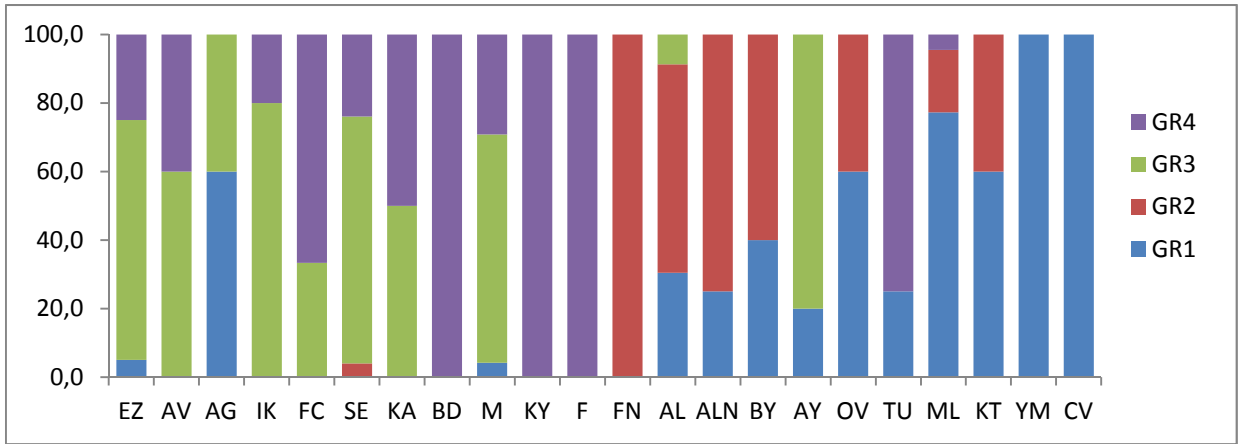


Şekil 4.2. Belirlenen 49 haplotip kullanılarak oluşturulmuş olan haplotip ağı (Atasal haplotipleri oluşturan bireyler belirtilmiştir)



Şekil 4.3. Filogenetik analiz sonucunda belirlenen dört filogrubun coğrafik dağılımı ve her bir grubu oluşturan haplotiplarının bölgelere göre frekansları

Filogrupların örnekleme bölgelerine göre dağılımını incelediğimizde Fethiye (F) ve Finike (FN) arasında kalan bölgenin Ege Denizi (GR3, GR4) ve Akdeniz'de dağılım gösteren filogenetik gruplara (GR1, GR2) sınır teşkil ettiği görülmektedir. Grupları oluşturan bölgeler ve birey sayıları incelendiğinde, sırası ile GR1'in İskenderun Körfezi'nden köken alarak batıya doğru genişlediği, GR2'nin Antalya Körfezi'ni köken alarak doğuya doğru dağılım gösterdiği, GR3'ün tüm Ege Denizinde dağılım gösterdiği ve GR4'ün Fethiye (F) – Köyceğiz (KY) bölgesini köken alarak Ege Denizi'nde dağılım gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Network analizi sonucunda tespit edilmiş olan 4 filogenetik grubun bölgelere göre dağılım frekansı

Network analizi sonuçları incelendiğinde filogrupları oluşturan haplotiplerin bazılarının atasal haplotip özelliği taşıdığı görülmektedir. Olasılık haritalama analizi sonucunun işaret ettiği ağsı yıldız filogenide bu atasal haplotiplerden köken alan evrimleşmeden kaynaklanmaktadır. Belirlenen atasal haplotiplerin örnekleme bölgelerine göre yayılışını incelediğimizde GR4 filogrubunda bulunan HP41 dışında kalan atasal haplotiplerin tamamının örnekleme alanının tümünde temsil edildiği görülmektedir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Tespit edilen atasal haplotiplerin bölgelere göre yayılışı (Bölgede temsil edilen haplotip kırmızı renk ile belirtilmiştir, her bir bölgede haplotipi temsil eden birey birey sayısı belirtilmiştir)

Haplotip kodu	Dahil olduğu filogenetik grup	EZ	AV	AG	IK	HL	SE	KA	BU	M	KY	F	FN	AL	ALN	BY	AY	OV	LU	ML	KI	YM	CV
HIF 34	GR1	1		3						1				1		1	1	2		14	2		3
HIF 38	GR2						1						1	12	2								
HIF 40	GR3	7	1	1	4	1	7			9				1			2						
HIF 41	GR4	1			1		2	1	4	6													
HIF 42	GR3	4	1				10	2		4				1									
HIF 44	GR4	2				1	2	1	3		9	3							2				

Network analizi sonucunda tespit edilmiş filogenetik grupların evrimsel hikayesinin ortaya konulabilmesi amacı ile likelihood-mapping analizi % 84.7 oranında filogenetik ağaç çözümlemesini önermektedir. Elde edilen bu değer filogeninin çözümlenmesinde ağaç yönteminin temel filogenetik yapının ortaya konuşmasında etkin olmasına karşın, tam anlamı ile filogenini ortaya konulmasında yetersiz kalacağını göstermektedir.

Filogenetik ağaç analizlerinde ağacın iç dallarının en iyi şekilde çözümlenmesini sağlamak amacı ile en uygun dış grubun belirlenmesi önem taşımaktadır. Çalışılan türün Doğu Akdeniz dışında kalan dağılım alanında gerçekleştirilmiş olan benzer bir çalışmada filogenetik analizler sırasında dış grup olarak *Sepia hierredda* tercih edilmiş olsa da, yapılan incelemelerde elimizdeki veri seti için yeterli çözümlenme yapamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle *Sepia* genusuna dahil ondokuz tür için mtCOI geni alt bölgesi kullanılarak yapılmış olan eski çalışmalarda elde edilmiş sekanslar (Çizelge 4.6) GENBANK veri tabanından temin edilmiş ve baz farklılık oranları göz önünde bulundurularak en uygun dış grup olarak *Sepia bertheloti* (D'Orbigny 1835) türü belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Analizlerde kullanılacak dış grubun belirlenmesi amacı ile değerlendirilen türler

Tür	GenBank Kodu	Kaynak
<i>Sepia furcata</i>	AY530210	Chuan-Wen. ve Chung-Cheng, 2005
<i>Sepia hirunda</i>	AY530213	Chuan-Wen. ve Chung-Cheng, 2005
<i>Sepia elegans</i>	AY293707	Nishiguchi, vd 2004
<i>Sepia latimanus</i>	AY185506	Lin vd 2004
<i>Sepia pharaonis</i>	AF359555	Lin vd 2004
<i>Sepia esculenta</i>	AF359554	Lin vd 2004
<i>Sepia robsoni</i>	AF350495	Lin vd 2004
<i>Sepia subtenuipes</i>	AB430414	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia recurvirostra</i>	AB430413	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia tokioensis</i>	AB430412	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia tenuipes</i>	AB430411	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia madokai</i>	AB430407	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia gibba</i>	AB430405	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia bertheloti</i>	AB430403	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia aureomaculata</i>	AB430402	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia andreana</i>	AB430401	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia aculeata</i>	AB430400	Yoshida vd (Yayınlanmamış)
<i>Sepia kobeensis</i>	AB193813	Masa-aki vd 2006
<i>Sepia pardex</i>	AB193809	Masa-aki vd 2006

Filogenetik ağaç analizlerinde kullanılmak üzere jModeltest programı kullanılarak Akaike Information Criterion (AIC)' e göre denenen 56 farklı model arasından veri seti için en uygun model olarak HKY + I (Hasegawa vd 1985) belirlenmiştir. Bu modele göre baz frekansları (A = 0.2823, C = 0.1891, G = 0.1564, T = 0.3722), baz değişim oranları (AC = 2.6276, AG = 7.8847, AT = 1.4791, CG = 1.1113, CT = 7.1552, GT = 1.0), (Ti/Tv oranı = 3.4661) ve korunan bölgelerin oranı (p-inv = 0.7761) olarak tespit edilmiştir.

Maksimum tutumluluk algoritması ile gerçekleştirilen analiz çalışılan bölge için eşit derecede parsimonik uzunlukta (132 adım) 9571 farklı ağaç hesaplamıştır (CI=0.81065, RI=0.8996). Bu ağaçların tümünde desteklenen dalları gösteren katı uyum ağacı ve 1000 tekrarlı full-heuristik ağaç taramalı seç-bağla dal destek değerleriyle birlikte Şekil 4.6. de verilmiştir.

Örneklenen bireylere ait mtCOI baz dizilerinin evrimsel hikayesinin filogenetik ağaç çözümü yöntemi ile belirlenmesi amacı ile farklı yaklaşımlarda gerçekleştirilen analiz sonuçlarının birbirleri ile uyduğu ve temel 4 filogenetik grubu işaret ettikleri görülmektedir. Elde edilen bu sonuç network analizi sonucunda elde edilen sonuç ile örtüşmektedir. Komşu bağlama algoritması (NJ) (Şekil 4.5) ve maksimum tutumluluk algoritması (MP) (Şekil 4.6) sonuçları incelendiğinde Doğu Akdeniz'den köken alan GR1 soy hattı ile geri kalan bölgelerde bulunan üç soy hattının oluşturduğu bazal bir dallanmanın varlığını ortaya koymaktadır. GR2-GR3-GR4'ün oluşturduğu dalı daha ayrıntılı incelediğimizde ise, tüm Ege Denizi'nde dağılım gösteren GR3 ün diğer gruplardan bazal dal olacak şekilde ayrıldığı ve Akdeniz'de konumlanan GR2 ve Ege Denizi'nde konumlanan GR4'nin monofiletik olduğu görülmektedir.

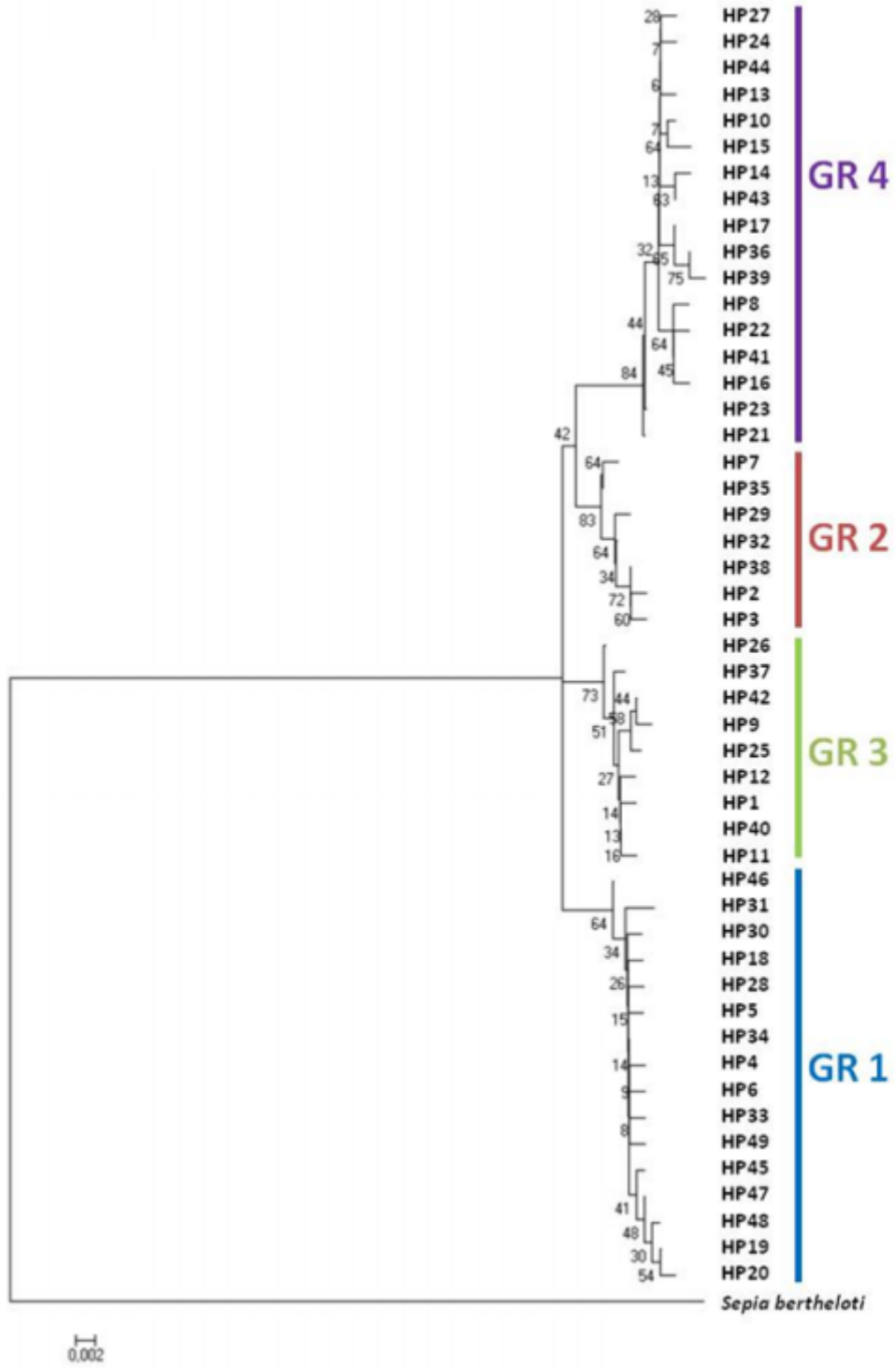
Bunun yanında AIC'in önerdiği HKY+I maksimum olasılık algoritması (Şekil 4.7) ve bayesian analiz (Şekil 4.8) sonuçları bazal bir dörtlü dallanma ortaya koymaktadır. Bu durum, filogenetik grupların yakın bir geçmişte ortak bir atadan hızlı bir farklılaşma sonucunda ortaya çıktıkları düşüncesini akla getirmesinin yanında, GR1 ve GR4 de gözlenen çözümlenememiş politomik kısımların grup içerisinde gözlenen yıldız şeklindeki evrimleşme durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen tüm analizlerde, ağaç tabanından dallara doğru incelemeye devam ettiğimizde bootstrap desteklerinde düşme olduğu görülmektedir. Gerçekleştirilmiş tüm ağaç çözümlenmeleri içerisinde, ana dallara en yüksek destekleri maksimum olasılık algortması belirlemiştir. Buna göre GR1 (85), GR2 (68) ve GR4 (57) oranında destek görmüştür. Aynı dallara verilen Bayesian posterior olasılık değerleri ise; GR1 (81), GR2 (85), GR3 (65) ve GR4 (68) şeklindedir.

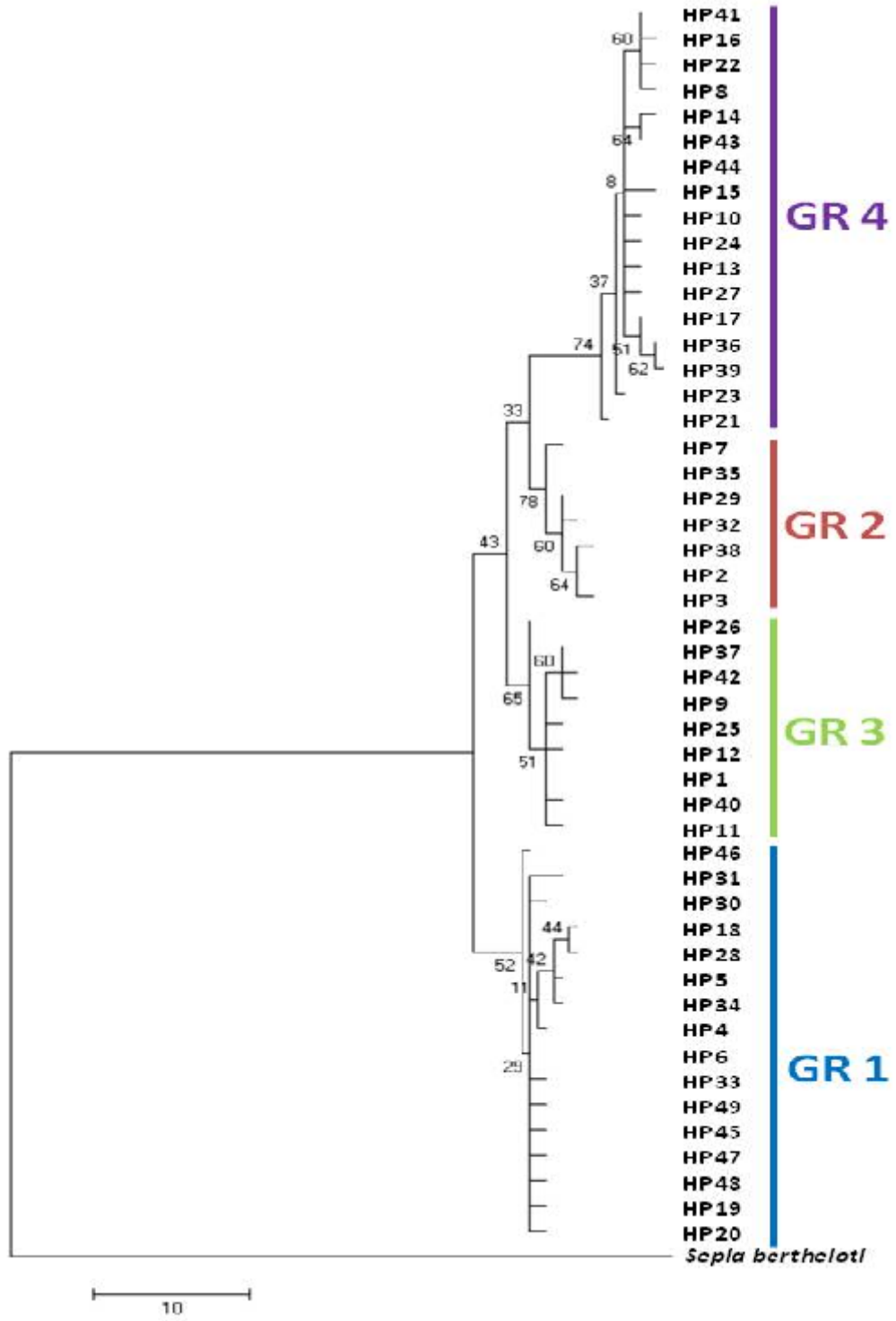
Filogenetik ağaç çözümlemesi analizleri değerlendirildiğinde dış grup olarak kullanılmış olan *Sepia bertheloti* türünün kullanılabilecek en uygun seçenek olmasına karşın ana soy hatlarını oluşturan dalların uç kısımlarında gözlenen politomileri çözümlemede yetersiz kaldığı görülmektedir. Buna rağmen Network analizinde de belirlenmiş olan dört ana soy hattının varlığı filogenetik ağaç çözümlenmeleri ile de desteklenmiştir.

S. officinalis türünün çalışma bölgesi içerisinde gösterdiği moleküler varyasyon miktarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen AMOVA analizleri sonucunda, İskenderun Körfezi'nde yer alan CV, YM, KT, ML ve TU örnekleme noktalarının oluşturduğu grubun tüm diğer bölgeleri ile arasında ($V_a = \% 20.78$) belirgin bir farklılaşma tespit edilmiştir. Ayrıca KY – M örnekleme alanları arasında kalan bölge ile tür için Akdeniz ve Ege Denizi'nin ayırım noktasının varlığı gözlenmiştir ($V_a = \% 21.56$) (Şekil 4.9).

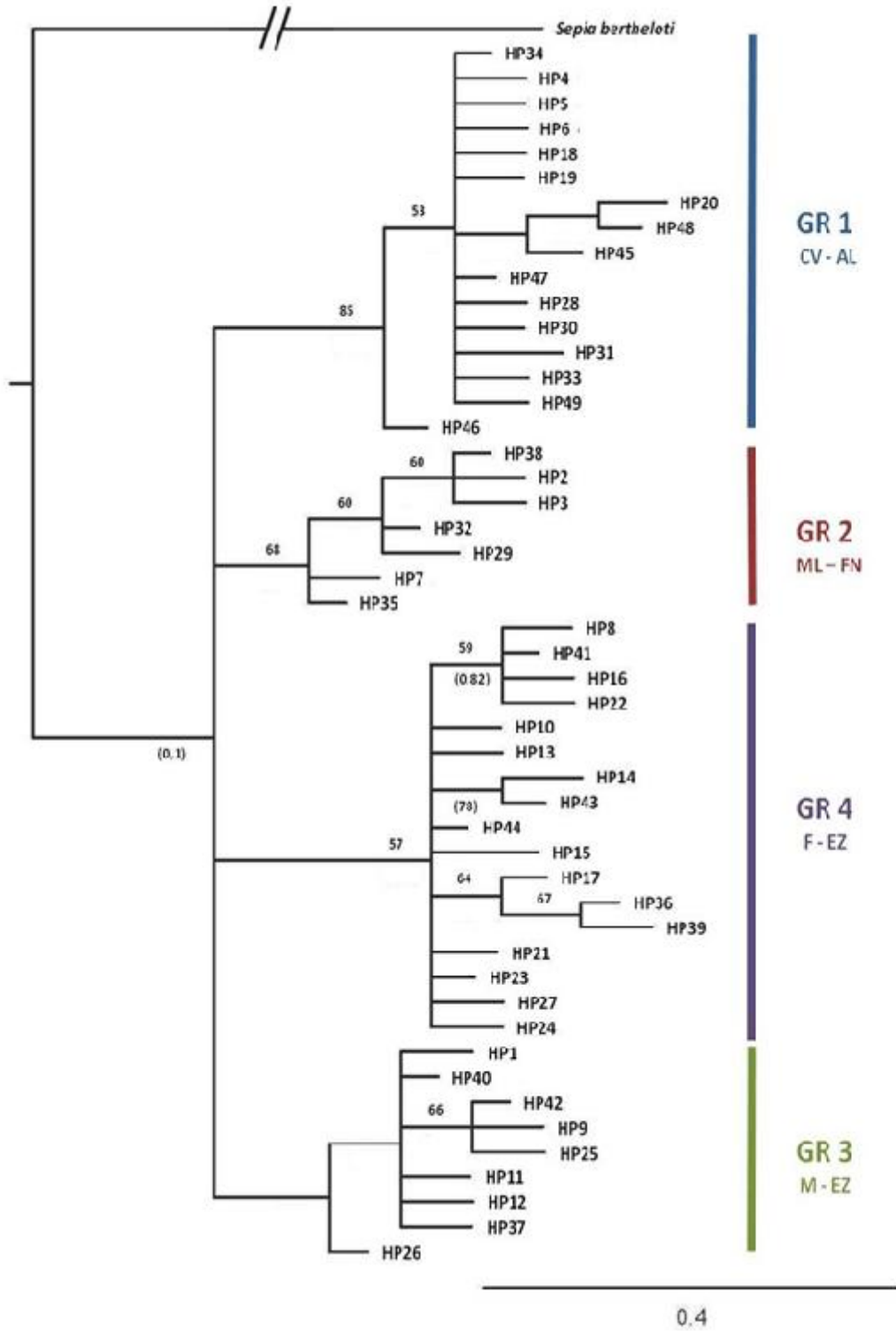
Araştırma bölgesinde incelenen türün gen akışına engel oluşturan ve bu sayede populasyon yapılanmasına etki eden fiziksel bir engelin varlığını araştırmak amacı ile gerçekleştirilen maksimum farklılık algoritmasının analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10). Gerçekleştirilen analizde birbirine yakın örnekleme bölgeleri arasındaki genetik farklılaşma oranları karşılaştırılmış ve yakın bölgeler arasındaki yüksek farklılaşma miktarları değerlendirilerek dört bariyer bölgesi belirlenmiştir. Buna göre Finike (FN) ile Fethiye (F) ve Köyceğiz (KY) ile Marmaris (M) örnekleme noktaları arasında kalan bölgelerde en yüksek farklılaşma değerlerine bağlı olarak 1. ve 2. bariyer bölgeleri tespit edilmiştir. Belirlenen bu alanda sahil şeridi boyunca devam eden ani derinleşmeler söz konusudur. Bölge gen akışına engel oluşturmakta ve çalışmamız kapsamında incelediğimiz Akdeniz ve Ege Denizi arasında sınır teşkil etmektedir.



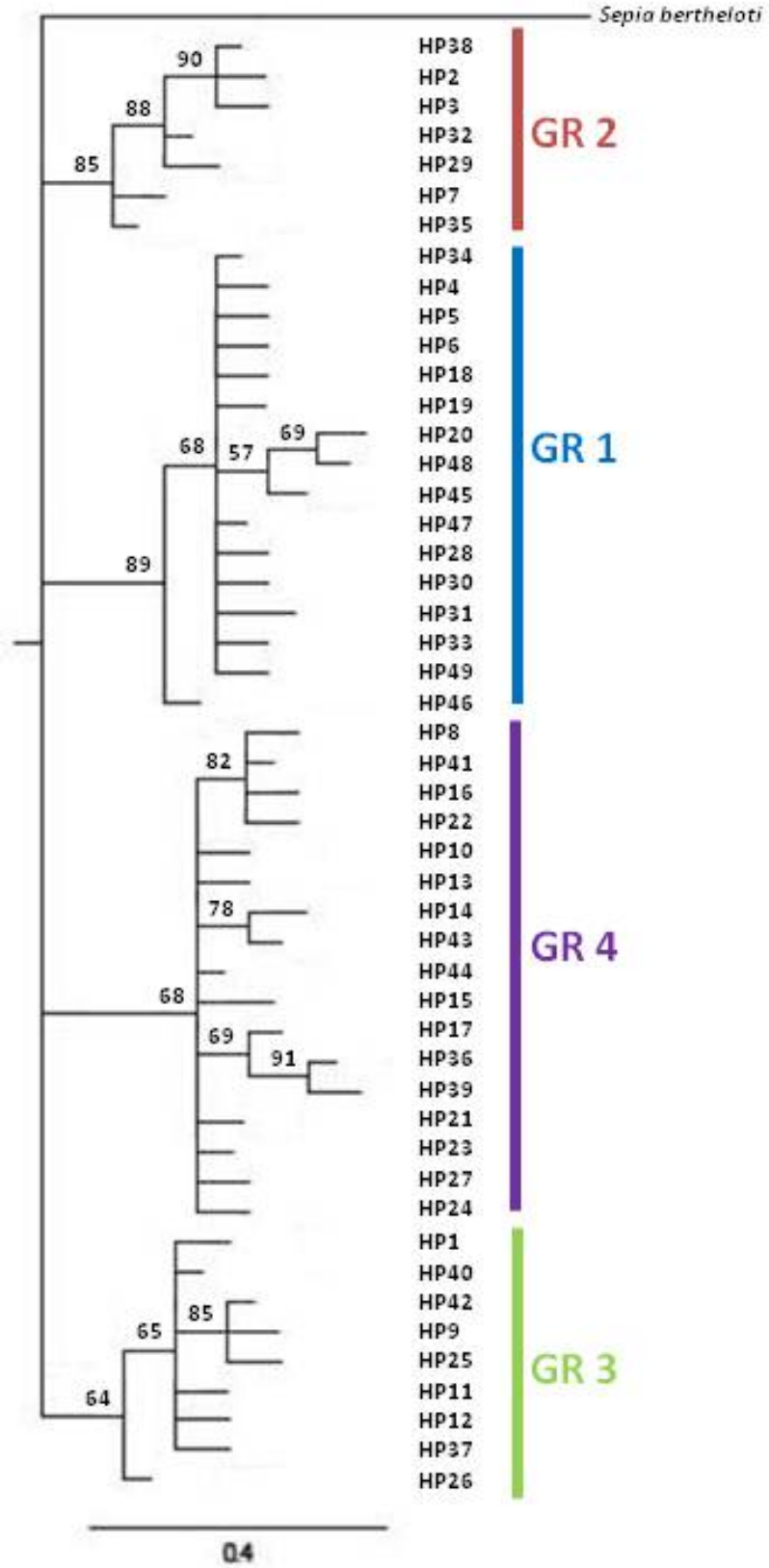
Şekil 4.5. Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede dağılım gösteren *Sepia officinalis* türüne ait filogeninin komşu bağlama algoritması ile çözümlenmesi. (Dallar için hesaplanan 1000 tekrarlı bootstrap filogeni testi destek değerleri ifade ettiği dalın üstünde belirtilmiştir)



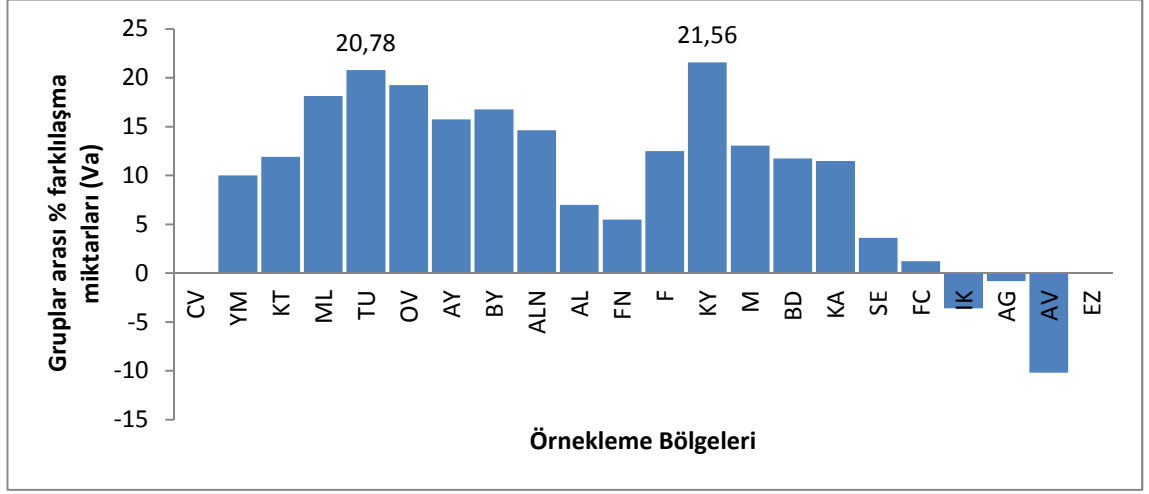
Şekil 4.6. Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede dağılım gösteren *Sepia officinalis* türüne ait filogeninin maksimum tutumluluk algoritması ile çözümlenmesi. (Dallar için hesaplanan 1000 tekrarlı bootstrap filogeni testi destek değerleri ifade ettiği dalın üstünde belirtilmiştir)



Şekil 4.7. Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede dağılım gösteren *Sepia officinalis* türüne ait filogeninin maksimum olasılık algoritması ve HKY + I nükleotid değişim modeli altında çözümlenmesi (Sırası ile ana dallar için hesaplanan 100 tekrarlı seç-bağla (bootstrap) filogeni testi destek değerleri belirtilmiştir)

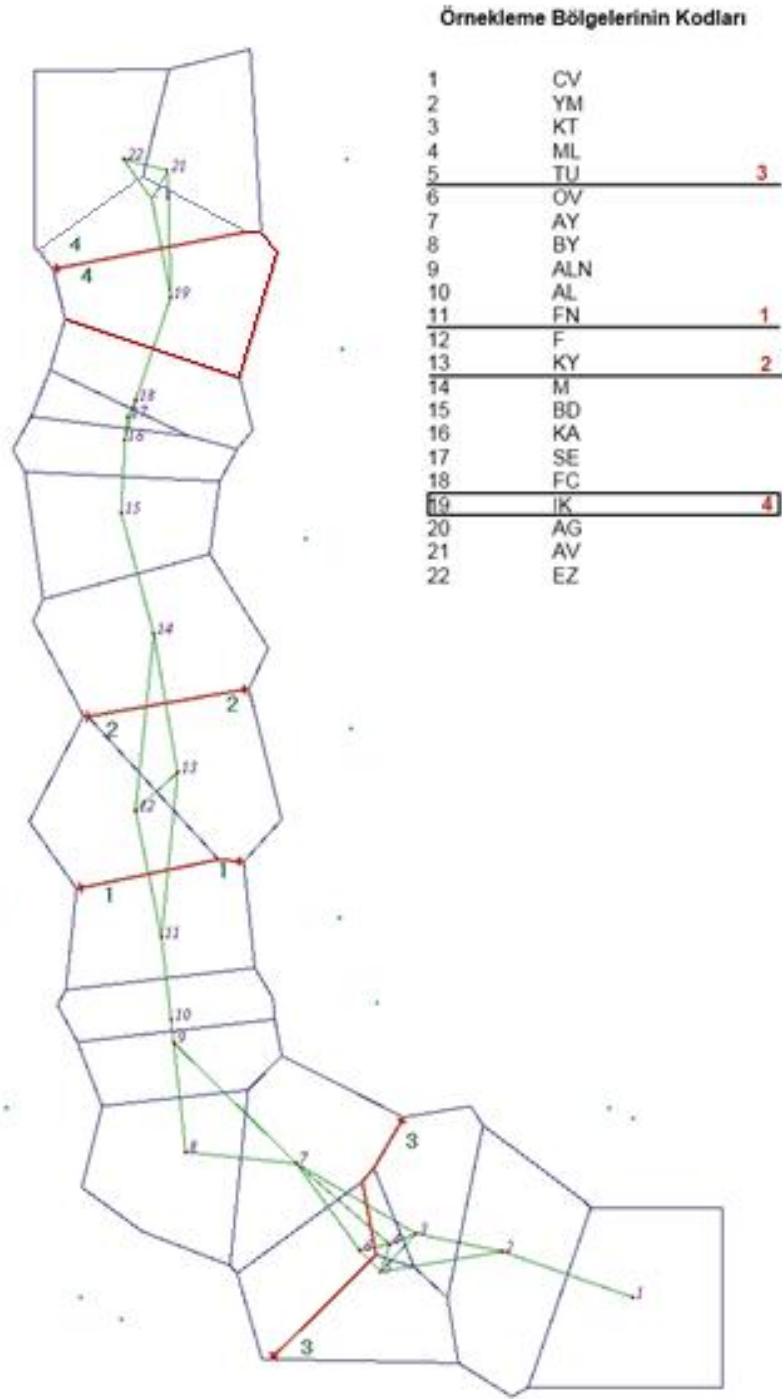


Şekil 4.8. Bayesian filogeni çözümü sonucu elde edilen ağaç ve ana dallar için destek değerleri (Posterior probability)



Şekil 4.9. CV örnekleme bölgesinden başlayarak her bir örnekleme bölgesinin sırayla katılması ile oluşturulan 2’li grupların belirlenen farklılaşma miktarları

Gerçekleştirilmiş olan AMOVA analizlerinde de Köyceğiz (KY) örnekleme bölgesinin doğusu ile batısında konumlanmış populasyonlar arasında en yüksek farklılaşma değeri (% 21.56) elde edilmiştir. Belirlenen üçüncü bariyerin konumu ise Taşucu (TU) ile Ovacık (OV) örnekleme noktaları arasındadır. Bahsi geçen bölgedeki derinlik değişimleri incelediğinde bölgenin nispeten sığ olan Mersin Körfezi ve İskenderun Körfezi’nin tür için uygun üreme alanlarının sınırı olduğu görülmektedir. AMOVA analiz sonuçları incelendiğinde TU örnekleme noktasının doğu ve batısında bulunan populasyonlar arasında ise en yüksek ikinci farklılaşma değerleri (20.78) tespit edilmiştir. Belirlenen dördüncü bariyer bölgesi ise İzmir Körfezi’nde bulunan populasyonları kısmen izole edecek şekildedir.



Şekil 4.10. mtCOI alt bölgesi için genetik farklılık miktarları değerlendirilmesi ile belirlenen ve türün gen akışını sınırlayan bariyer bölgelerinin coğrafik konumları

Filogenetik gruplara ait Tajima D değerleri incelendiğinde, grupların tamamında yüksek miktardaki yeni mutasyonlara bağlı populasyon genişlemesi durumu gözlenmiştir. Değerlendirilen gruplar içerisinde yalnızca GR1 0.02 önem seviyesinde anlamlı çıkmıştır. Tüm diğer gruplar içinde negatif değerler elde edilmiştir. Fu'nun F_S testi sonuçlarını incelediğimizde tüm gruplar için negatif değerlerin elde edildiğini görmekteyiz. Bu durum bize yakın zamanda gerçekleşen bir populasyon genişlemesini göstermektedir. Fu ve Li'nin D^* ve F^* testlerinin sonuçları da populasyon genişlemesi sonucunu desteklemektedir. Elde edilen tüm sonuçlar 0.05 ve 0.02 önem seviyelerinde anlamlı çıkmıştır (Çizelge 4.7). Elde edilen tüm bu negatif değerler, filogrupların tamamında yüksek miktarda yeni ortaya çıkmış ender haplotiplerin varlığından kaynaklanmaktadır. Gözlenen bu durum yakın zamanda gerçekleşmiş olan populasyon genişlemesine işaret etmektedir.

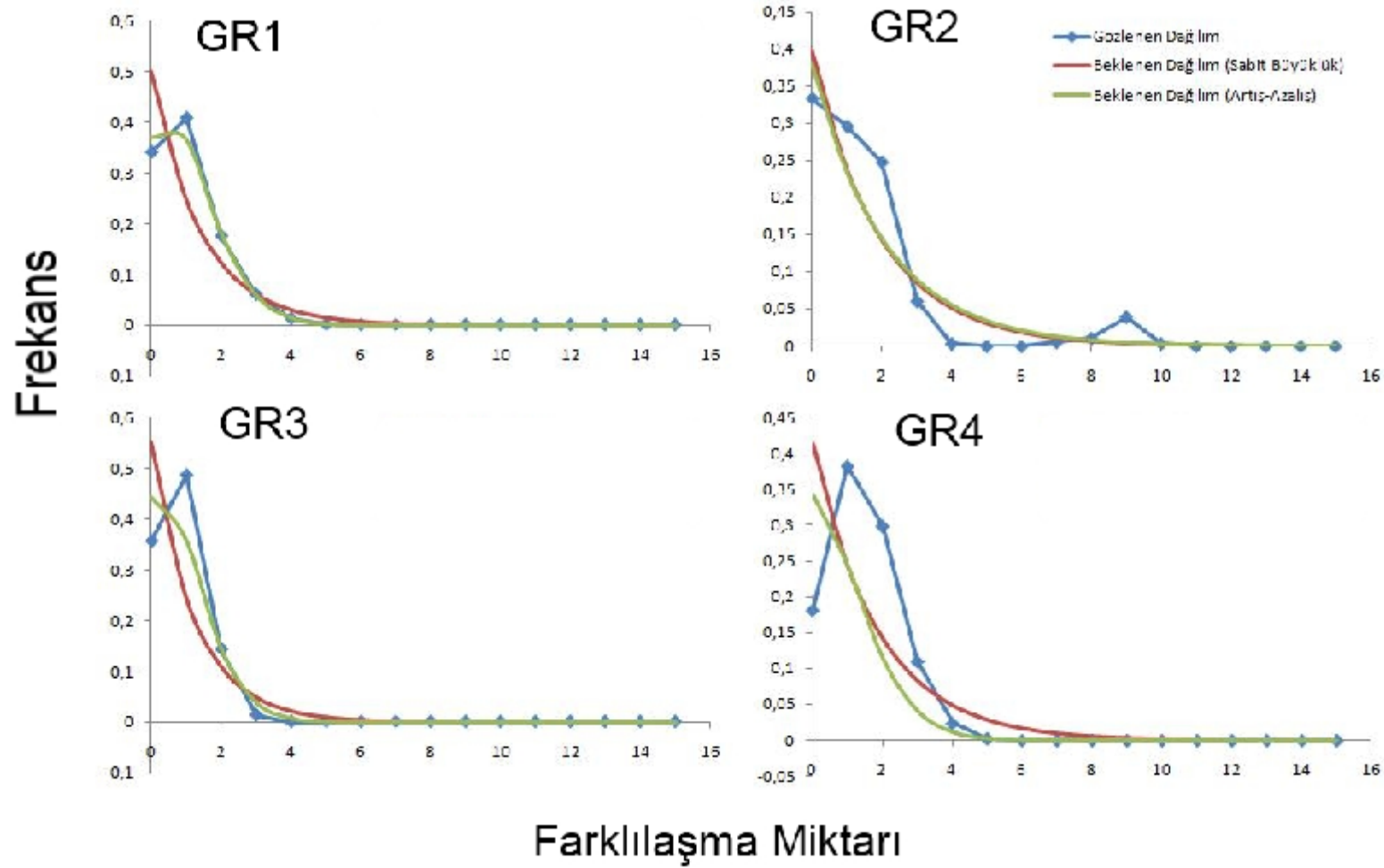
Çizelge 4.7. Tespit edilen filogruplar için tarafsızlık analizleri sonuçları ve demografik parametreler

	GR1	GR2	GR3	GR4
S	14	13	8	16
π	0.00159	0.00509	0.00130	0.00227
Tajima'nın D	-2.07073*	-1.70124	-1.34041	-1.73849
Fu ve Li'nin D^* testi	-3.29454*	-3.08126*	-2.47972*	3.48690**
Fu ve Li'nin F^* testi	-3.40793**	-3.10446*	-2.47963*	3.40268**
Fu'nun F_S testi	-15.853	-2.079	-4.667	-11.362
Tau	0.993	0	0.813	1.419
θ_1	0	1.622	0	0
θ_2	1000	1000	1000	1000
r	0.0753	0.0442	0.1525	0.0910
t (% 0,7 / Milyon yıl)	0.1135	-	0.0929	0.1622
t (% 2,5 / Milyon yıl)	0.0318	-	0.0260	0.0454

S: Polimorfik bölge sayısı; **π :** Nükleotid çeşitliliği; **Tau (2ut):** Populasyonun büyüme zamanı (u:tüm gen bölgesinin mutasyon hızı; t: populasyon büyümesinden buyana geçen kuşak süresi); **θ_1** ve **θ_2** , sırası ile büyüme öncesi ve sonrası populasyon büyüklükleri; **r:** Reggedness istatistik tesiti (Harpending, 1994).

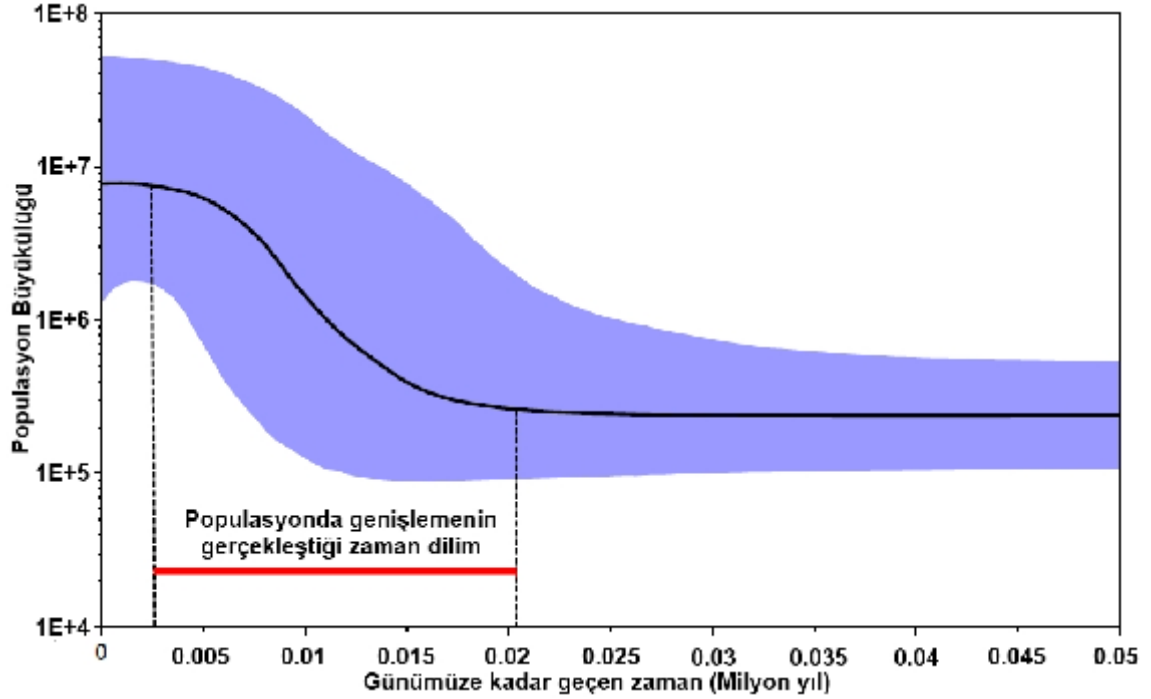
* P < 0.05; ** P < 0.02

Filogenetik grupların iç genetik varyasyonunun kullanılması yöntemi ile tarihsel demografilerinin ortaya konulabilmesi amacı ile “uyumsuzluk dağılım” analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç grafikleri incelendiğinde GR2 dışında kalan tüm gruplar tek tepeli (unimodal) bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Çok tepeli dağılım gösteren GR2 için r değerinin ($r = 0.0422$; $p < 0.05$) düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum GR2 grubu için popülasyonda tarihsel bir genişlemesinin söz konusu olmadığını göstermektedir. Grupta belirlenen büyüme, günümüzde halen devam etmekte olan bir büyümedir. Gruplara ait filogenetik ağaç çözümlenmeleri de incelendiğinde haplotip artışının ağacın dal uçlarına yakın gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum popülasyon büyümesinin yakın zamanlarda gerçekleştiği fikri güçlenmektedir (Şekil 4.11). Nötralite testleri sonucunda belirlenmiş olan popülasyon büyümesi olayı uyumsuzluk dağılımı analizleri sonuçları ile de destek görmüştür. Analiz sonuçlarına göre filogruplar için büyümenin belirlenmesinde kullanılan % 0.7/milyon yıl mutasyon oranı için 92.900 – 162.200 yıl, % 0.25/milyon mutasyon oranı yıl için ise 26.000 ile 45.400 yıl önce gerçekleştiği hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Belirlenen filogenetik grupların uyumsuzluk dağılım grafikleri

Çalışma alanında dağılım gösteren *Sepia officinalis* türünün populasyonlarının geçmişteki dinamikleri incelendiğinde, belirlenen dört kladın oluşturulduğu populasyonun günümüzden 0.003 – 0.020 milyon yıl önce ki zaman aralığında genişlemeye başladığı görülmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Zaman içinde populasyon genişlemesinde değişimini gösteren BSP grafiği (Mavi bölgeler % 95 HPD aralığını göstermektedir)

4.2. Polimorfik Mikrosatelit Lokusları Analiz Sonuçları

Tüm örnekler için beş mikrosatelit lokusunun belirlenmiş olan allel büyüklükleri ve değişkenlik değerleri çizelge 4.8’ da verilmiştir. Locus başına ortalama allel sayısı 7.0 – 15.0 arasında değişim göstermektedir. SOF4 lokusu dışında kalan tüm lokuslar için ortalama beklenen ve gözlenen heterozigotluk miktarı sırası ile 0.624 – 0.902 ve 0.621 – 0.918 olarak tespit edilmiştir. Seferihisar (SE) örnekleme noktası en düşük ortalama gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerlerine sahiptir.

Beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerlerinin arasındaki farkın tüm populasyonlar için benzer olduğu görülmektedir. Bu durum türün tüm populasyonlarında eşit oranda genetik çeşitlilik barındırdığını göstermektedir. Lokuslar göz önünde bulundurulduğunda ise beklenen – gözlenen heterozigotluk farkının SOF1,

SOF2, SOF3 ve SOF6 lokusları için çok yüksek olmadığı gözlenmiştir. SOF4 lokusu incelendiğinde ise tüm örnekleme bölgeleri için H_e ve H_o değerlerinde HW dengesinden belirgin sapmanın olduğu ve heterozigot noksanlığının varlığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Bu durum incelenen lokus için primerin kalıp DNA molekülüne bağlanamaması sonucunda ortaya çıkan ve heterozigot eksikliğine neden olan null-allel varlığının göstergesidir. Ayrıca F_{IS} değerleri incelendiğinde de SOF4 lokusu için tüm örnekleme bölgelerinde heterozigot azlığı gözlenmektedir. Sözü edilen bu lokus için genetik farklılaşma analizlerinde null-allel varlığı göz önünde bulundurulmuştur.

Değerlendirilen mikrosatelit lokusları için gerçekleştirilen 50 karşılaştırmalı bağlantı dengesizliği testi sonucunda önemli bir ilişki tespit edilmemiştir. ($p < 0.05$).

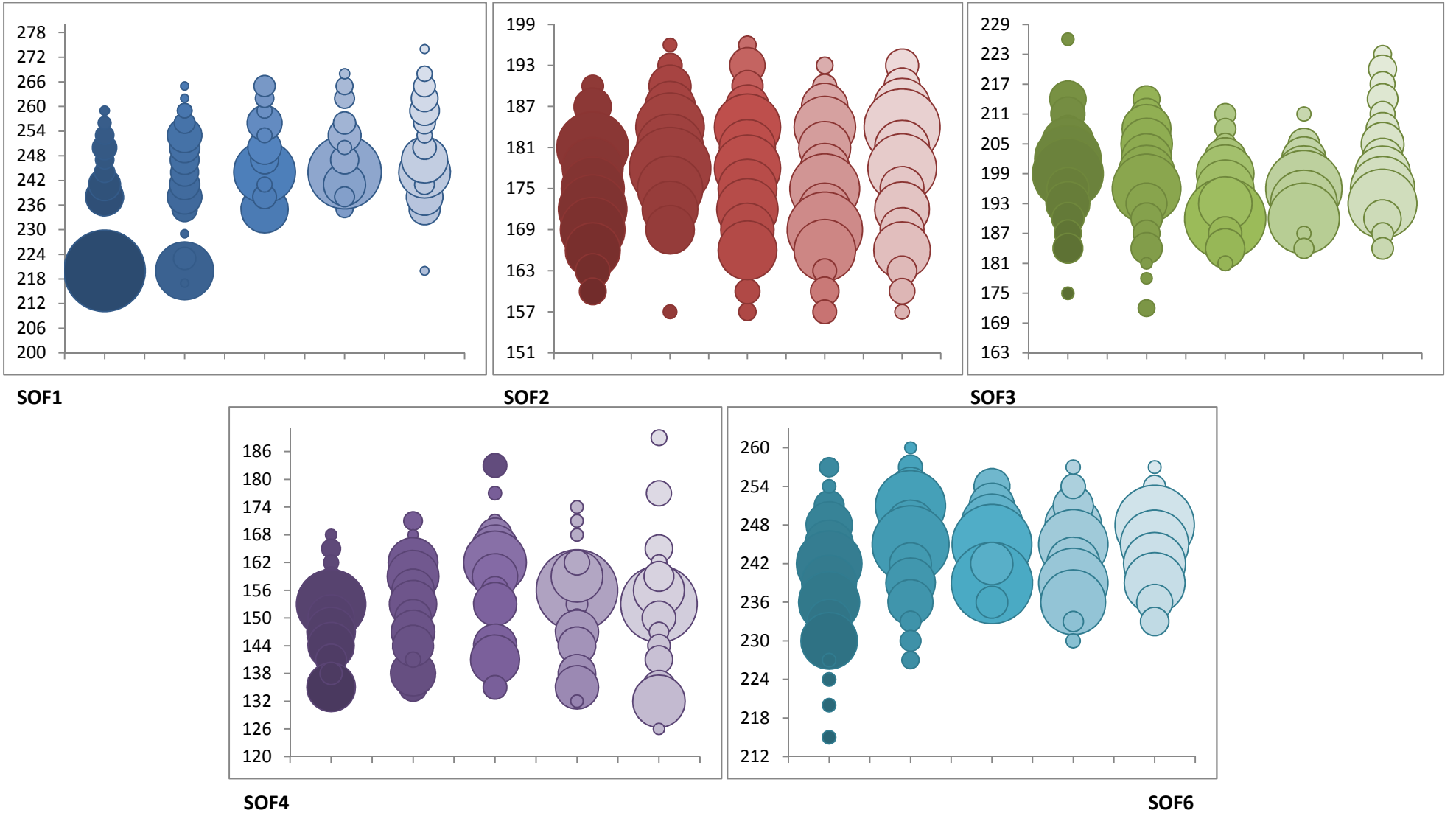
Tüm lokuslara ait allel frekansları incelendiğinde, SOF1 lokusu dışında kalan tüm allel frekansları bakımından belirgin bir coğrafi farklılığının olmadığı görülmektedir. SOF1 lokusu allel frekansları incelendiğinde ise ML ve AL bölgelerinin oluşturduğu Akdeniz popülasyonlarının frekans dağılımı açısından Ege Denizi popülasyonlarından belirgin bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca SOF3 ve SOF6 lokusların da Akdeniz de dağılım gösteren gruplara özgü, SOF4 lokusunda ise Ege Denizi'nde dağılım gösteren gruplara özgü allellerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

Popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın tüm lokuslar göz önünde bulundurularak hesaplanması sonucunda, Ege Denizi'nde yer alan EZ ve SE grupları arasındaki farklılaşmanın, Akdeniz de yer alan ML, AL ve M gruplar ile belirlenen farklılaşma miktarlarından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Benzer bir durum Akdeniz de konumlanmış olan gruplar için de geçerlidir. SOF4 lokusunda tespit edilmiş null-allel etkisinin ortadan kaldırılması için FreeNA programı ile gerçekleştirilmiş olan ENA düzeltmesi sonrasında elde edilmiş olan F_{ST} değerleri incelendiğinde ise gruplar arasındaki farklılaşmanın azalmasına rağmen halen varlığını koruduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. Beş örnekleme bölgesi için incelenen beş mikrosatelit DNA lokusunda belirlenen genetik çeşitlilik değerleri

Lokus	Örnekleme Bölgeleri					Ortalama	(SD)
	ML	AL	M	SE	EZ		
SOF1 (ATT)							
N	n = 66	n = 80	n = 50	n = 57	n = 71		
Allel büyüklüğü	220 - 259	217 - 265	235 - 265	235 - 268	220 - 274	217 - 274	
N_a	10	15	11	11	14	12.2	(2.2)
H_e	0.624	0.862	0.819	0.729	0.873	0.781	(0.105)
H_o	0.621	0.850	0.860	0.702	0.859	0.778	(0.111)
Fis (W&C)	0.0047	0.0143	-0.0501	0.0368	0.0159	0.0043	(0.033)
SOF2 (AAT)							
N	n = 66	n = 79	n = 49	n = 57	n = 72		
Allel büyüklüğü	160 - 190	157 - 196	157 - 196	157 - 193	157 - 193	157 - 196	
N_a	11	11	13	13	13	12.2	(1.1)
H_e	0.887	0.869	0.902	0.891	0.896	0.889	(0.013)
H_o	0.864	0.810	0.918	0.877	0.819	0.858	(0.044)
Fis (W&C)	0.0259	0.0682	-0.0179	0.0151	0.0851	0.0353	(0.042)
SOF3 (AAT)							
N	n = 75	n = 79	n = 50	n = 57	n = 72		
Allel büyüklüğü	175 - 226	172 - 214	181 - 211	184 - 211	184 - 223	172 - 226	
N_a	13	14	11	9	14	12.2	(2.2)
H_e	0.872	0.885	0.841	0.815	0.881	0.859	(0.030)
H_o	0.840	0.873	0.860	0.825	0.847	0.849	(0.018)
Fis (W&C)	0.0369	0.0134	-0.0223	-0.0113	0.0383	0.011	(0.028)
SOF4 (ATT)							
N	n = 75	n = 80	n = 48	n = 57	n = 72		
Allel büyüklüğü	135 - 168	135 - 171	135 - 183	132 - 174	126 - 189	126 - 189	
N_a	12	13	13	13	14	13.0	(0.7)
H_e	0.861	0.901	0.887	0.815	0.842	0.861	(0.034)
H_o	0.453	0.388	0.625	0.456	0.333	0.451	(0.110)
Fis (W&C)	0.4734***	0.5697***	0.2957***	0.4404***	0.6040***	0.477	(0.121)
SOF6 (AAT)							
N	n = 64	n = 79	n = 45	n = 57	n = 71		
Allel büyüklüğü	215 - 257	227 - 260	236 - 254	230 - 257	233 - 257	215 - 260	
N_a	14	12	7	10	9	10.4	(2.7)
H_e	0.879	0.850	0.803	0.846	0.824	0.840	(0.029)
H_o	0.828	0.772	0.689	0.667	0.775	0.746	(0.067)
Fis (W&C)	0.0581	0.0915	0.1419*	0.2116	0.0603	0.113	(0.065)
Toplam							
Ortalama N_a	12.0	13.0	11.0	11.2	12.8	12.0	
(SD)	1.6	1.6	2.4	1.8	2.2	(1.0)	
Ortalama H_e	0.825	0.873	0.850	0.819	0.863	0.846	
(SD)	0.113	0.020	0.043	0.059	0.029	(0.040)	
Ortalama H_o	0.721	0.739	0.790	0.705	0.727	0.736	
(SD)	0.179	0.200	0.126	0.164	0.222	(0.166)	
AR	11.24	11.91	10.90	10.71	12.25	Toplam 12.71	

Örnek büyüklüğü (n), standart sapma (SD), lokus başına allel sayısı (N_a), beklenen heterozigotluk (H_e), gözlenen heterozigotluk (H_o), tüm lokus ve bölgeler için F_{IS} değerleri ve bölgelere göre ortalama allel zenginliği (AR). (*P < 0.05, *** P < 0.001)

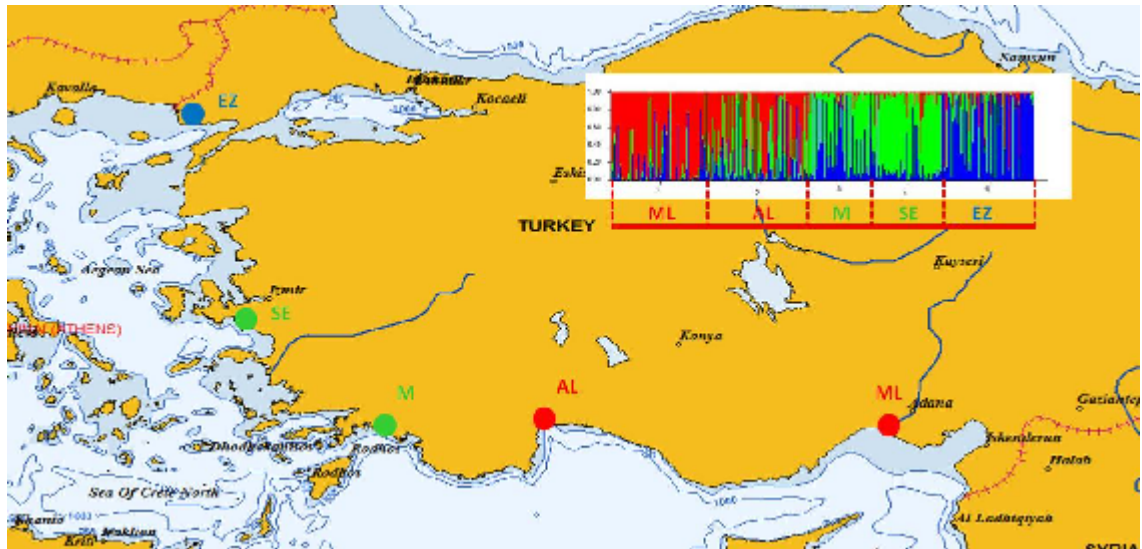


Şekil 4.13. Beş mikrosatelit lokusu için allel frekanslarının bölgelere göre dağılımı. Y-ekseni allel büyüklüğünü göstermektedir. X-ekseninde soldan sağa doğru doğu-batı düzleminde örnekleme bölgeleri (ML, AL, M, SE, EZ) sıralanmaktadır (Çember büyüklükleri allelin frekansını belirtmektedir)

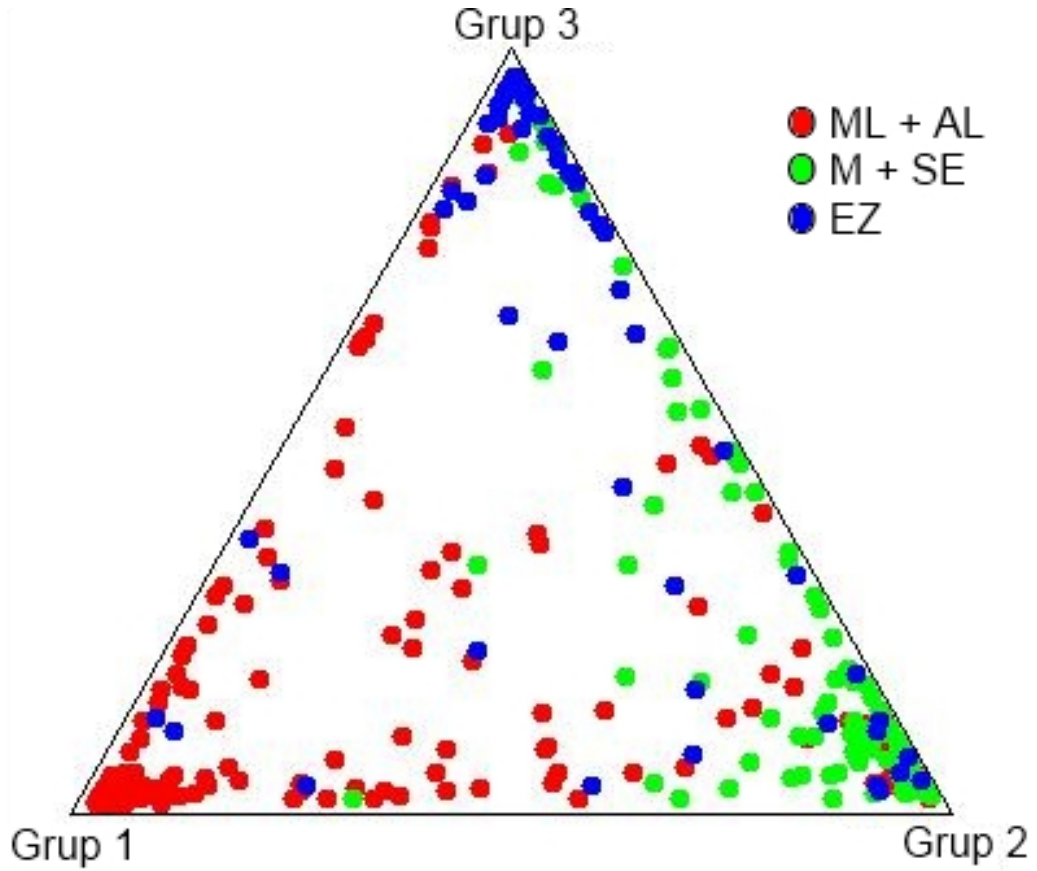
Çizelge 4.9. Değerlendirilen tüm lokuslar için örnekleme gruplarının null allel doğrulaması öncesi ve sonrasında genetik farklılaşması (Üst çaprazda null-allel doğrulaması yapılmış, alt çapraz null-allel doğrulaması yapılmamış ikili F_{ST} değerleri bulunuyor)

Tüm Lokuslar	ML	AL	M	SE	EZ
ML	-	0.0294	0.0852	0.0902	0.0644
AL	0.0316	-	0.0418	0.0543	0.0324
M	0.0882	0.0416	-	0.0284	0.0248
SE	0.0936	0.0539	0.0335	-	0.0344
EZ	0.0648	0.0363	0.0300	0.0399	-
SOF1	ML	AL	M	SE	EZ
ML	-	0.0542	0.2544	0.2921	0.2135
AL	0.0554	-	0.1030	0.1427	0.0734
M	0.2568	0.1030	-	0.0452	0.0234
SE	0.2936	0.1427	0.0452	-	0.0582
EZ	0.2164	0.0739	0.0234	0.0582	-
SOF2	ML	AL	M	SE	EZ
ML	-	0.0136	0.0000	0.0023	0.0132
AL	0.0134	-	0.0043	0.0217	0.0084
M	0.0001	0.0046	-	0.0008	-0.0034
SE	0.0026	0.0218	0.0008	-	0.0126
EZ	0.0127	0.0079	-0.0039	0.0121	-
SOF3	ML	AL	M	SE	EZ
ML	-	0.0153	0.0519	0.0565	0.0248
AL	0.0154	-	0.0441	0.0343	0.0102
M	0.0520	0.0441	-	0.0082	0.0349
SE	0.0563	0.0343	0.0082	-	0.0163
EZ	0.0249	0.0102	0.0349	0.0163	-
SOF4	ML	AL	M	SE	EZ
ML	-	0.0222	0.0510	0.0654	0.0168
AL	0.0308	-	0.0260	0.0466	0.0381
M	0.0653	0.0262	-	0.0825	0.0557
SE	0.0845	0.0451	0.0984	-	0.0778
EZ	0.0261	0.0549	0.0754	0.0958	-
SOF6	ML	AL	M	SE	EZ
ML	-	0.0444	0.0522	0.0155	0.0366
AL	0.0467	-	0.0209	0.0171	0.0307
M	0.0567	0.0235	-	0.0097	0.0173
SE	0.0183	0.0195	0.0091	-	0.0144
EZ	0.0376	0.0320	0.0170	0.0145	-

Populasyonların coğrafik yapılanması ortaya koymak amacı ile beş bölgeden örneklenen bireylerde incelenen 5 lokusa ait mikrosatelit veri setinin Structure programı kullanılarak analiz edilmesi sonucunda, çalışmanın gerçekleştirildiği Türkiye Ege Denizi ve Akdeniz sahillerinde temel anlamda 3 ana grubun varlığı belirlenmiştir. Tespit edilen populasyonlardan ilkinin ülkemiz Akdeniz sahillerinde bulunan iki (ML, AL) istasyondan temin edilmiş olan bireyler oluşturmaktadır. Belirlenen ikinci populasyon Güney Ege Denizi'nde bulunan Marmaris ve Seferihisar örnekleme bölgelerinden temin edilmiş olan bireylerden oluşmaktadır. Üçüncü populasyon ise Kuzey Ege de yer alan tek örnekleme bölgesi olan Enez örnekleminin oluşturduğu populasyondur (Şekil. 4.14). Üçgen grafik kullanılarak örneklenen bireylerin belirlenen gruplara göre dağılımına baktığımızda, gruplar arasında birden çok grubun özelliğini ifade eden bireyler olsa bile belirgin bir gruplaşmanın varlığı gözlenmektedir (Şekil. 4.15). İncelenen her bir bireyin belirlenen 3 populasyon grubu içerisinde ne şekilde dağılım gösterdiğinin ayrıntısını görebilmek amacı ile bar grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.16). Grafik üzerinde, dikey eksende incelenen bireyin belirlenen gruplara oransal olarak benzerlik durumu (Grup 1: Kırmızı; Grup 2: Yeşil; Grup 3: Mavi), yatay eksen ise incelenen birey sayısı verilmiştir. Parantez içerisinde bireyin dâhil olduğu örnekleme noktası belirtilmiştir (1-ML; 2-AL; 3-M; 4-SE; 5-EZ).

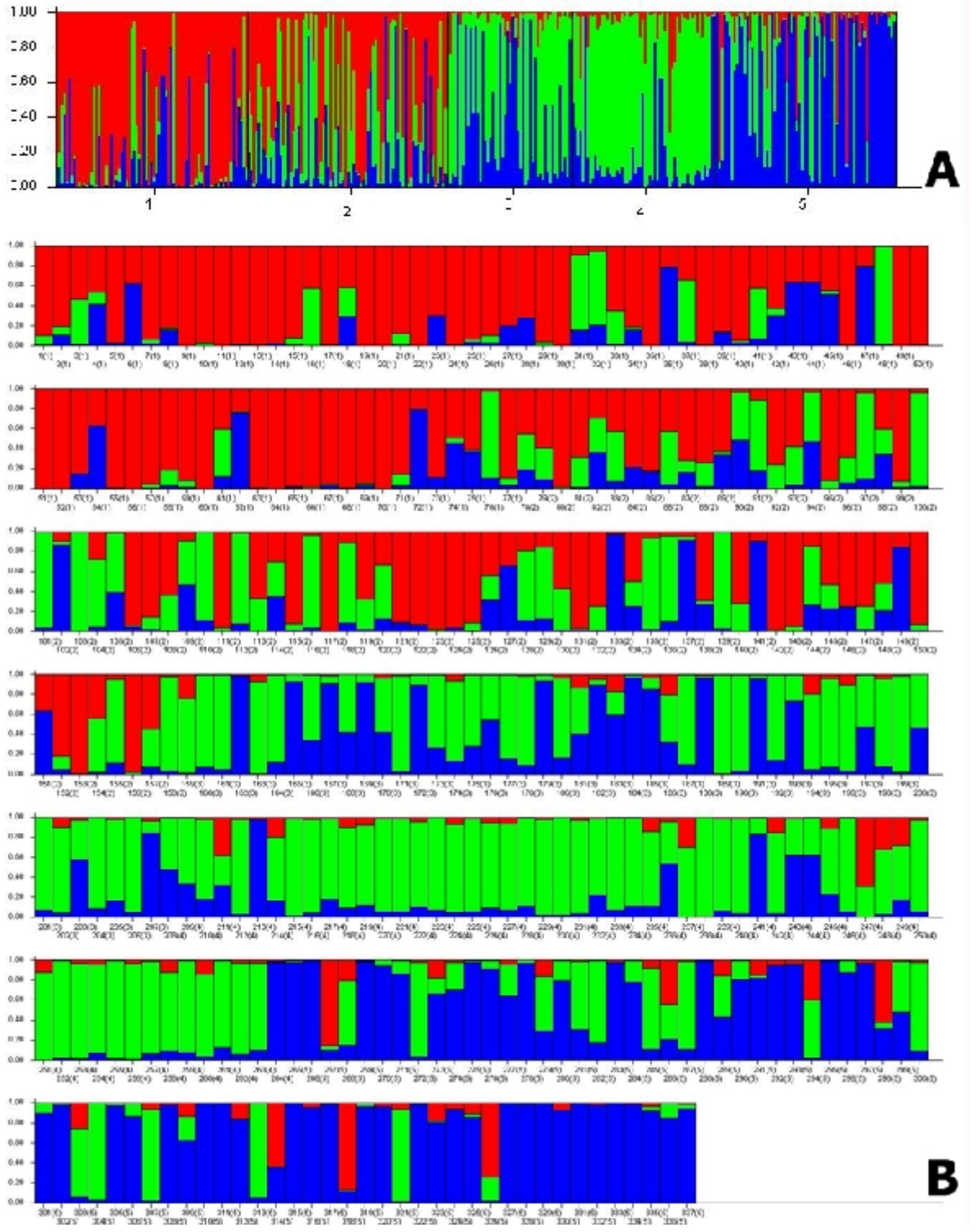


Şekil 4.14. Mikrosatelit verilerinin değerlendirilmesi sonucunda belirlenen populasyon yapılanması

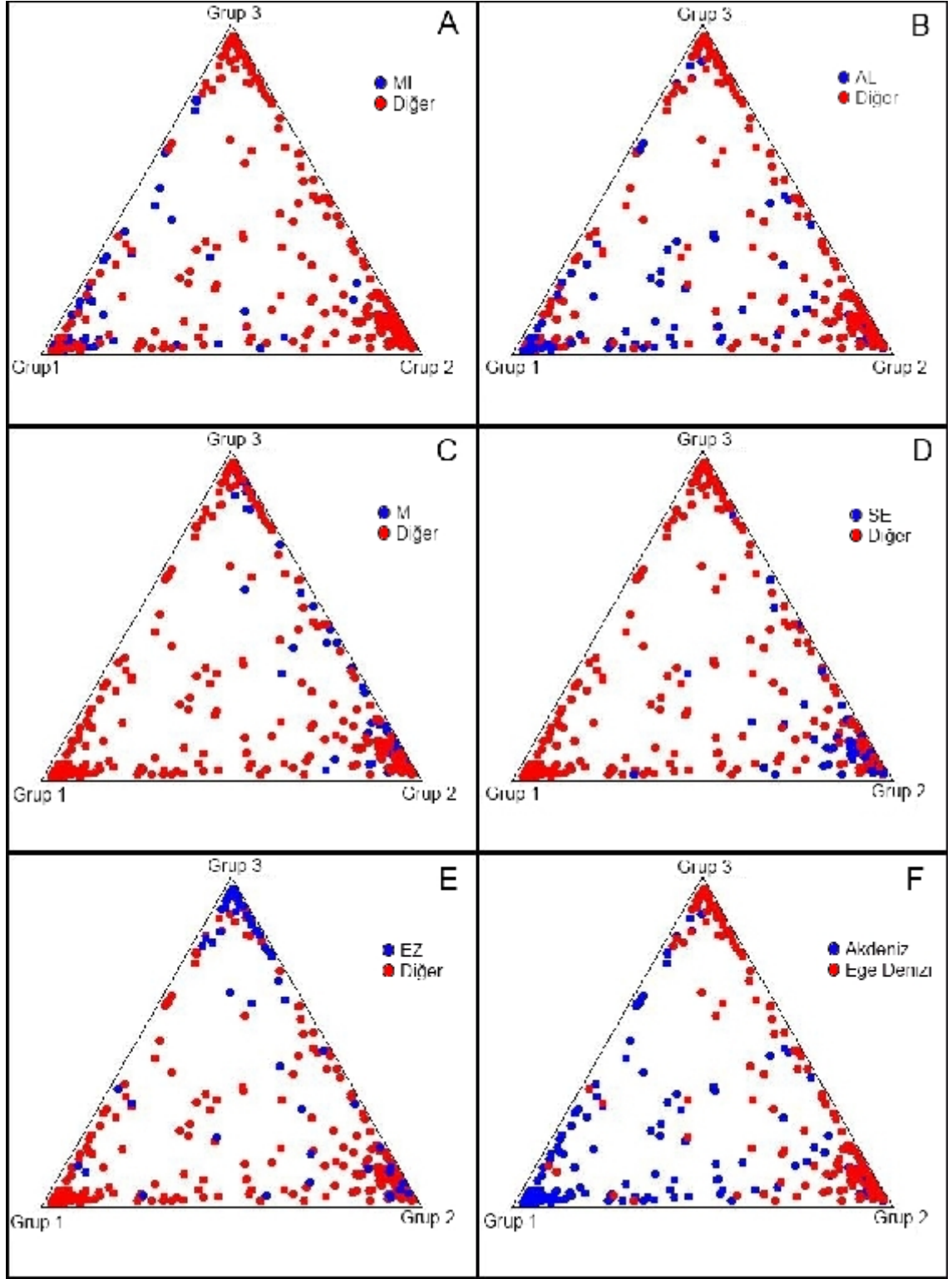


Şekil 4.15. Türkiye Ege Denizi ve Akdeniz sahillerinde bulunan *Sepia officinalis* türünün populasyon yapılanması

Veri setinde örnekleme bölgelerinin tek tek değerlendirildiği ve Ege Denizi ve Akdeniz ayrımı göz önünde bulundurularak oluşturulan alt grup için üçgen dağılım grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.17). Elde edilen grafik incelendiğinde ML ve AL istasyonlarından temin edilen bireylerin yoğunlukla birinci grubu oluşturduğu, M ve SE istasyonlarından temin edilen bireylerin yoğunlukla ikinci grubu oluşturduğu ve EZ istasyonundan örneklenen bireylerin de üçüncü grubu oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca ülkemiz denizleri için ML – AL (Akdeniz) / M – SE - EZ (Ege Denizi) şeklinde gerçekleşen populasyon ayrımının varlığı tespit edilmiştir.

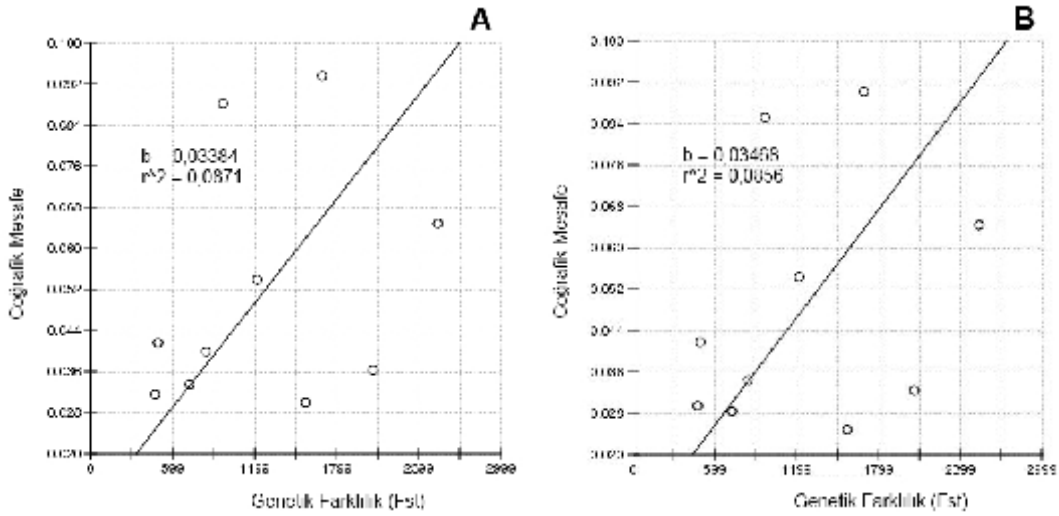


Şekil 4.16. Structure analizi sonuçları. Grafikler de yer alan her bir dikey kolon analize dâhil edilen bir bireyi temsil etmektedir. (A. Tek bir satır içerisinde özetlenmiş çubuk grafik, B. Çoklu satırla ifade edilmiş olan analiz sonuçları)



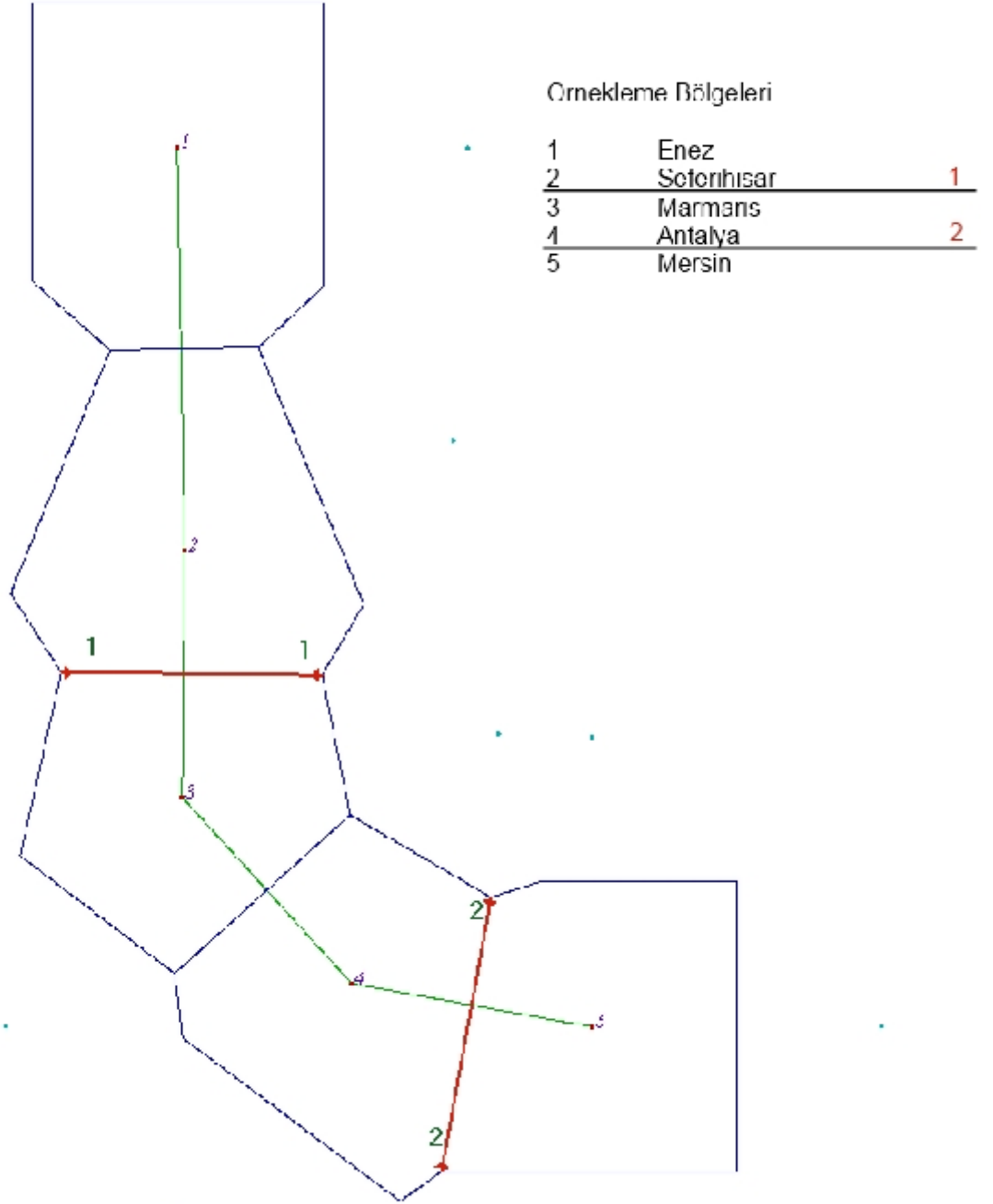
Şekil 4.17. Çalışma bölgesindeki popülasyon yapılarının örnekleme bölgelerine bazında incelenmesi ve Ege Denizi ve Akdeniz’de bulunan popülasyonların yapılanması

Örnekleme bölgeleri arasında bulunan coğrafik mesafe ile tespit edilen genetik farklılık miktarları arasında ilişki olup olmadığının belirlenmesi amacı ile Mantel testi gerçekleştirilmiştir. Test sonuçlarına göre null-allel doğrulaması öncesi ($r= 0.2926$, $P= 0.1850$) ve sonrasında ($r= 0.2952$, $P= 0.1939$) genetik farklılık ile coğrafik mesafe arasında önemli bir ilişki tespit edilmemiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Genetik farklılıklar ile coğrafik mesafelerin serpilme diyagramı. (A. F_{ST} değerleri ile coğrafik farklılaşmaların ilişkisi; B. Null allel doğrulaması ardından belirlenen F_{ST} değerleri ile coğrafik farklılaşmaların ilişkisi)

Barrier programı kullanılarak gerçekleştirilmiş olan maksimum farklılık analizi sonuçlarına göre, mikrosatelit belirteçleri kullanarak incelediğimiz Akdeniz ve Ege Denizi sahillerimiz de konumlanmış beş örnekleme noktası arasında gen akışına kısıtlama getiren iki bariyer bölgesi tespit edilmiştir. Bunlardan ilki Seferihisar (SE) ve Marmaris (M) örnekleme bölgeleri arasında bulunmaktadır. İkinci bariyerin konumu ise Antalya Limanı (AL) ile Mersin Limanı (M) örnekleme bölgeleri arasındadır (Şekil 4.19).



Sekil 4.19. Mikrosatelit lokusları için genetik farklılık miktarları değerlendirilmesi ile belirlenen ve türün gen akışına sınır getiren bariyer bölgelerinin coğrafik konumları.

Türün çalışma bölgesinde ki popülasyon yapılanması, genetik farklılaşma ve gen akışı miktarlarının değerlendirilmesi yöntemi olan moleküler varyans analizi (AMOVA) ile belirlenmiştir. Moleküler varyans hesaplamaları esnasında benzer verilerin değerlendirilmesinde kabul gören IAM (infinite allele mutation) ve SMM (step-wise mutation) modellerinin her ikisi de denenmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, SMM metodunun IAM metoduna oranla, bölgeler arasında ve bölgeleri oluşturan popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın daha yüksek oranlarda olduğuna işaret ettiği gözlenmiştir (Çizelge 4.10). Bunun yanında SMM metodu kullanılarak elde edilen sonuçlarda, bölgeleri oluşturan popülasyonların içindeki ve bireyler arasındaki genetik farklılaşma değerlerinin ise IAM metodu sonuçlarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuçların yorumlanması esnasında mikrosatelit verileri için daha geçerli sonuçlar verdiği bildirilmiş olan SMM metodu tercih edilmiştir. Akdeniz ve Ege Denizi'nin ayrımının gerçekleştiği öngörülen AL – M lokaliteleri arasında kalan bölgeyi vurgulamak için oluşturulan grupta (ML-AL/M-SE-EZ) en yüksek gruplar arası farklılaşmanın varlığı belirlenmiştir (% 18.74, Va: 75.705). Ayrıca ML lokalitesinin tüm diğer bölgelerden farklılığının belirlenmesi amacı ile oluşturulan grupta ise % 16.31 gruplar arası farklılaşma gözlenmiştir (Va: 67.396). Structure programı ile belirlenen popülasyon yapılanması doğrultusunda oluşturulan gruplandırmanın analizi sonunda da % 16.19 oranla (Va: 63.165) en yüksek üçüncü farklılaşma değeri tespit edilmiştir. Popülasyon içerisindeki heterozigot miktarını değerlendiren F-istatistiklerine göre, incelenen gruplar arasında (0.074 – 0.202) ve grupları oluşturan popülasyonlar arasında (-0.024 – 0.187) önemli bir genetik farklılaşma olmadığı görülmektedir ($p < 0.05$). Popülasyonları oluşturan bireyler arasındaki farklılığın genetik varyasyonun temel nedeni olduğu görülmektedir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.10. Oluşturulan gruplar arasında, iki farklı model kullanılarak tespit edilmiş olan gruplar arası ve grupları oluşturan populasyonlar arası farklılaşma değerleri ve tüm lokuslar için F-istatistikleri sonuçları

IAM modeli

Bölgelerin gruplandırılması	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}
ML / AL-M-SE-EZ	0.023	1.34	0.079	4.62	0.047	0.013
ML-AL / M-SE-EZ	0.057	3.31	0.054	3.11	0.032	0.033
ML-AL-M / SE-EZ	0.020	1.16	0.078	4.54	0.046	0.012
ML-AL-M-SE / EZ	-0.019	-1.12	0.098	5.77	0.057	-0.011
ML-AL / M-SE / EZ	0.047	2.76	0.053	3.09	0.032	0.028

SMM modeli

Bölgelerin gruplandırılması	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}
ML / AL-M-SE-EZ	67.396	16.31	42.979	10.4	0.124	0.163
ML-AL / M-SE-EZ	75.705	18.74	25.451	6.30	0.078	0.187
ML-AL-M / SE-EZ	26.266	6.80	57.229	14.82	0.159	0.068
ML-AL-M-SE / EZ	-8.976	-2.42	76.746	20.71	0.202	-0.024
ML-AL / M-SE / EZ	63.165	16.19	24.204	6.20	0.074	0.162

Örnekleme bölgeleri arasındaki moleküler varyansın belirlenmesi amacı ile oluşturulan gruplarda incelenen beş lokusun her birinin gösterdiği farklılaşma miktarları IAM ve SMM modelleri kullanılarak ayrı ayrı belirlenmiştir (Çizelge 4.11, 4.12). Buna göre, tüm lokuslar içerisinde en yüksek gruplar arası varyasyon değerleri SOF1 lokusu için tespit edilmiştir. Tüm diğer lokuslar arasında SOF6 lokusu incelenen gruplamalar için ikinci yüksek varyasyon değerlerini vermiştir. Ayrıca her lokus için F-istatistikleri de hesaplanmıştır. Buna göre incelenen tüm gruplandırmalar için her lokus benzer sonuçlar vermektedir. Tüm lokuslar birlikte değerlendirildiğinde ulaşılan ve populasyonları oluşturan bireyler arasındaki farklılığın genetik varyasyonun temel nedeni olduğu fikri, her lokus tek tek değerlendirildiğinde de kabul görmektedir.

Çizelge 4.11. Her bir lokus için, IAM modeli kullanılarak belirlenmiş olan gruplar arası ve grupları oluşturan populasyonlar arası farklılaşma değerleri ve F-istatistikleri sonuçları

F_{ST} Metodu							
ML / AL-M-SE-EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	0.054	11.14	0.036	7.47	0.084	0.111	
SOF2	0.000	0.00	0.004	0.82	0.008	0.000	
SOF3	0.005	1.03	0.011	2.42	0.025	0.010	
SOF4	-0.007	-1.63	0.029	6.45	0.063	-0.016	
SOF6	0.009	2.00	0.009	2.02	0.021	0.020	
ML-AL / M-SE-EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	0.062	12.97	0.020	4.150	0.048	0.130	
SOF2	0.001	0.14	0.003	0.735	0.007	0.001	
SOF3	0.008	1.69	0.008	1.818	0.019	0.017	
SOF4	-0.007	-1.60	0.031	6.716	0.066	-0.016	
SOF6	0.001	0.28	0.012	2.695	0.027	0.003	
ML-AL-M / SE-EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	0.019	4.24	0.046	10.093	0.105	0.042	
SOF2	0.000	-0.10	0.004	0.880	0.009	-0.001	
SOF3	0.000	0.09	0.013	2.841	0.028	0.001	
SOF4	-0.001	-0.14	0.026	5.763	0.058	-0.001	
SOF6	-0.003	-0.76	0.014	3.344	0.033	-0.008	
ML-AL-M-SE / EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	-0.021	-4.87	0.067	15.314	0.146	-0.049	
SOF2	0.000	-0.03	0.004	0.834	0.008	0.000	
SOF3	-0.006	-1.45	0.016	3.536	0.035	-0.015	
SOF4	0.002	0.51	0.025	5.442	0.055	0.005	
SOF6	-0.002	-0.42	0.013	3.065	0.031	-0.004	
ML-AL / M-SE / EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	0.044	9.65	0.023	5.096	0.056	0.096	
SOF2	-0.003	-0.60	0.006	1.287	0.013	-0.006	
SOF3	0.008	1.71	0.007	1.564	0.016	0.017	
SOF4	-0.002	-0.47	0.028	6.043	0.060	-0.005	
SOF6	-0.002	-0.47	0.014	3.242	0.032	-0.005	

Çizelge 4.12. Her bir lokus için, SMM modeli kullanılarak belirlenmiş olan gruplar arası ve grupları oluşturan populasyonlar arası farklılaşma değerleri ve F-istatistikleri sonuçları

R_{ST} metodu							
ML / AL-M-SE-EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	80.627	36.31	27.578	12.42	0.195	0.363	
SOF2	1.018	1.67	3.328	5.44	0.055	0.017	
SOF3	-1.015	-1.67	6.935	11.43	0.112	-0.017	
SOF4	3.467	3.34	5.385	5.18	0.054	0.033	
SOF6	11.932	24.87	0.930	1.94	0.026	0.249	
ML-AL / M-SE-EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	81.356	39.68	9.806	4.78	0.079	0.397	
SOF2	-2.091	-3.50	5.047	8.45	0.082	-0.035	
SOF3	1.287	2.09	5.684	9.21	0.094	0.021	
SOF4	-1.479	-1.46	7.841	7.73	0.076	-0.015	
SOF6	-2.566	-6.42	7.392	18.50	0.174	-0.064	
ML-AL-M / SE-EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	36.485	19.32	38.548	20.41	0.253	0.193	
SOF2	-2.004	-3.35	4.955	8.29	0.080	-0.034	
SOF3	-3.822	-6.40	8.773	14.69	0.138	-0.064	
SOF4	-3.940	-3.93	9.273	9.24	0.089	-0.039	
SOF6	-3.290	-8.30	7.788	19.66	0.182	-0.083	
ML-AL-M-SE / EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	1.067	0.61	60.031	34.31	0.345	0.006	
SOF2	-2.619	-4.43	4.887	8.27	0.079	-0.044	
SOF3	-2.534	-4.24	7.571	12.66	0.121	-0.042	
SOF4	-5.601	-5.67	9.311	9.43	0.089	-0.057	
SOF6	-4.044	-10.47	7.565	19.58	0.177	-0.105	
ML-AL / M-SE / EZ	Va	%	Vb	%	F_{SC}	F_{CT}	
SOF1	60.183	32.05	13.764	7.33	0.108	0.320	
SOF2	-4.404	-7.39	7.159	12.02	0.112	-0.074	
SOF3	2.504	4.05	4.556	7.37	0.077	0.041	
SOF4	5.359	5.19	2.793	2.71	0.029	0.052	
SOF6	-5.668	-14.31	10.154	25.64	0.224	-0.143	

5. TARTIŞMA

5.1 Genetik Çeşitlilik ve Farklılaşma

Araştırmamız kapsamında mtCOI gen bölgesi *Sepia officinalis* türü için genetik farklılık belirlenmesi amacı ile ilk kez değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda örnekleme bölgeleri için genetik çeşitlilik miktarın (π) 0.0009 ile 0.0131 arasında değiştiği görülmüştür. Bu durum türün çalışma alanımız dışında kalan tüm dağılım bölgelerinde tespit edilen genetik çeşitlilik miktarı (0.001 – 0.012) ile örtüşmektedir (Pérez-Losada vd 2007). İncelenen 225 bireyde 49 özgün haplotipin varlığı belirlenmiştir. Belirlenen haplotiplerin 17'si Akdeniz ile Ege Denizi'nin ayırım noktası olarak önerilen bölgenin batısına özgüdür. Bunun yanında 26 haplotip ise bölgenin doğusuna özgü bulunmuştur. Belirlenen atasal haplotiplerden beşi her iki bölgede de bulunmaktadır (HP 34, 38, 40, 42 ve 44). Yalnızca bir atasal haplotip (HP 41) Ege Denizi'ne özgüdür. Pérez-Losada vd'nin (2007) türün dağılım alanında çalışmamız dışında kalan kısımlarında gerçekleştirdikleri araştırmalarında toplamda 259 bireyde 73 özgün haplotip belirlenmiştir. Her iki çalışmada da tespit edilen haplotipler karşılaştırıldığında yalnızca bir haplotipin paylaşıldığı görülmüştür. Araştırma kapsamında belirlenmiş olan haplotipler Doğu Akdeniz ve Ege Denizi'ne özgüdür. Çalışmamızda belirlenen haplotip çeşitliliği değerleri incelendiğinde ise 0.4 ile 1.0 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. İzmir Körfezi ve Finike örnekleme bölgeleri 0.4 ile en düşük haplotip çeşitliliğine sahiptir. Bunun yanında Akdeniz ile Ege Denizi'nin ayırım noktası olarak önerdiğimiz Fethiye ve Köyceğiz örnekleme noktalarında da düşük haplotip çeşitliliği oranları gözlenmiştir.

Mikrosatelit belirteçler ile araştırılmış olan genetik çeşitlik verilerine göre 5 örnekleme bölgesinde incelenen 5 lokus için beklenen heterozigotluk miktarları (H_E) 0.819 – 0.873 arasında değişmektedir. Ortalama beklenen heterozigotluk miktarı ise 0.846'dır. Kuzey Atlantik (Wolfram vd 2006) ($H_E = 0.556 - 0.795$, ortalama = 0.630), Adriyatik (Garoia vd 2004) ($H_E = 0.581 - 0.664$) ve Cebelitarık Boğazında (Pérez-Losada vd 2002) ($H_E = 0.614 - 0.784$, ortalama = 0.724) gerçekleştirilmiş olan çalışmalardan elde edilmiş sonuçlar incelendiğinde, türün çalışma alanımızda dağılım gösteren popülasyonlarının diğer bölgelere oranla daha yüksek genetik çeşitlilik gösterdiği gözlenmektedir. Bir diğer genetik çeşitlilik belirteci olan ortalama allel

sayıları, türün dağılım gösterdiği diğer bölgelerde gerçekleştirilen çalışmalarda (İber Yarımadası çevresi 9.0 – 10.7, Pérez-Losada vd 2002, Adriyatik Denizi 6.2 – 7.0, Garoia vd 2004, İngiliz Kanalı 6.0 – 10.9, Wolfram vd 2006) gözlenen değerler ile karşılaştırıldığında, gerçekleştirilen bu çalışmanın tüm diğer bölgelere oranla daha yüksek grup içi varyasyona sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz türe özgü beş mikrosatelit belirtecin Atlantik Okyanusu ve Akdeniz'deki genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacı ile kullanıldığı çalışmaların tamamında SOF4 lokusu için null allel etkisinin varlığı bildirilmiştir (Pérez-Losada vd 2002, Garoia vd 2004, Wolfram vd 2006). Yaptığımız analizler sonucunda benzer bir durum bizim veri setimiz için de belirlenmiştir. Gerçekleştirilen analizler esnasında bu durum göz önünde bulundurulmuştur.

Mikrosatelit bölgelerine ait belirlenen allel boyları diğer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında, SOF3, SOF4 ve SOF6 lokusları için Doğu Akdeniz'e özgü allellerin varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Atlantik Okyanusu ve Akdeniz'de değerlendirilen mikrosatelit belirteçleri için belirlenmiş allel büyüklükleri

Lokus	Pérez-Losada vd	Garoia vd 2004	Wolfram vd 2006	Çalışmamız
	2002 (Cebelitarık)	(Adriyatik)	(Kuzey Atlantik)	
SOF1	217 – 274	235 – 259	220 – 259	217 – 274
SOF2	157 – 187	154 – 202	148 – 184	157 – 196
SOF3	172 – 220	-	168 – 216	172 – 226
SOF4	132 – 171	141 – 153	130 – 163	126 – 189
SOF6	218 - 257	227 – 287	217 – 259	215 – 260

Populasyon farklılaşması ve populasyonlar arası genetik mesafenin belirlenmesi amacı ile tespit edilen fiksasyon indeksi (F_{ST}) değerleri her iki moleküler belirteç için değerlendirilmiştir. Değerlendirme esnasında mtCOI gen dizilerinin karşılaştırılmalarında oluşturulan bölgesel populasyon grupları (Çizelge 4.3) için ikili olarak ele alınmıştır. Mikrosatelit lokusları değerlendirilirken SOF4 lokusunda belirlenen null allel varlığı da göz önünde bulundurulmuş ve analiz esnasında SMM ve

IAM mutasyon modellerinin her ikisi de ayrı ayrı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, Ege Denizi ve Akdeniz’de konumlanmış populasyonlar arasında belirgin bir farklılık gözlenmiştir. Tür üzerine yapılmış önceki çalışmalarda, benzer farklılaşmalara örnekleme bölgelerinin arasındaki mesafenin ve/veya bölgeler arasında gen akışına kısıtlama getiren fiziksel bariyerlerin varlığının neden olduğu bildirilmiştir (Pérez-Losada vd 1999, Pérez-Losada vd 2002, Pérez-Losada vd 2007). Araştırmamız esnasında örnekleme bölgelerimiz arasındaki mesafeler, diğer çalışmalarda değerlendirilen bölgeler arasındaki mesafeler göz önünde bulundurulduğunda birbirlerine daha yakın konumlanmıştır. Ayrıca mesafenin, incelenen gruplar arasındaki genetik farklılaşma etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiş olan IBD analizi sonuçları incelendiğinde de mesafenin genetik çeşitlenmeye önemli oranda etki etmediği gözlenmiştir. Bu durum bizi, çalışma alanımızdaki genetik çeşitlenmenin, fiziksel faktörlerin gen akışı üzerine etkisinden kaynaklandığı fikrine yönlendirmektedir. İncelenen bölgede gen akışına birincil etki eden faktörün, incelenen türün biyolojik özellikleri göz önüne alındığında, deniz tabanındaki ani derinleşmeler olduğu düşünülmektedir.

5.2. Moleküler Filogeni

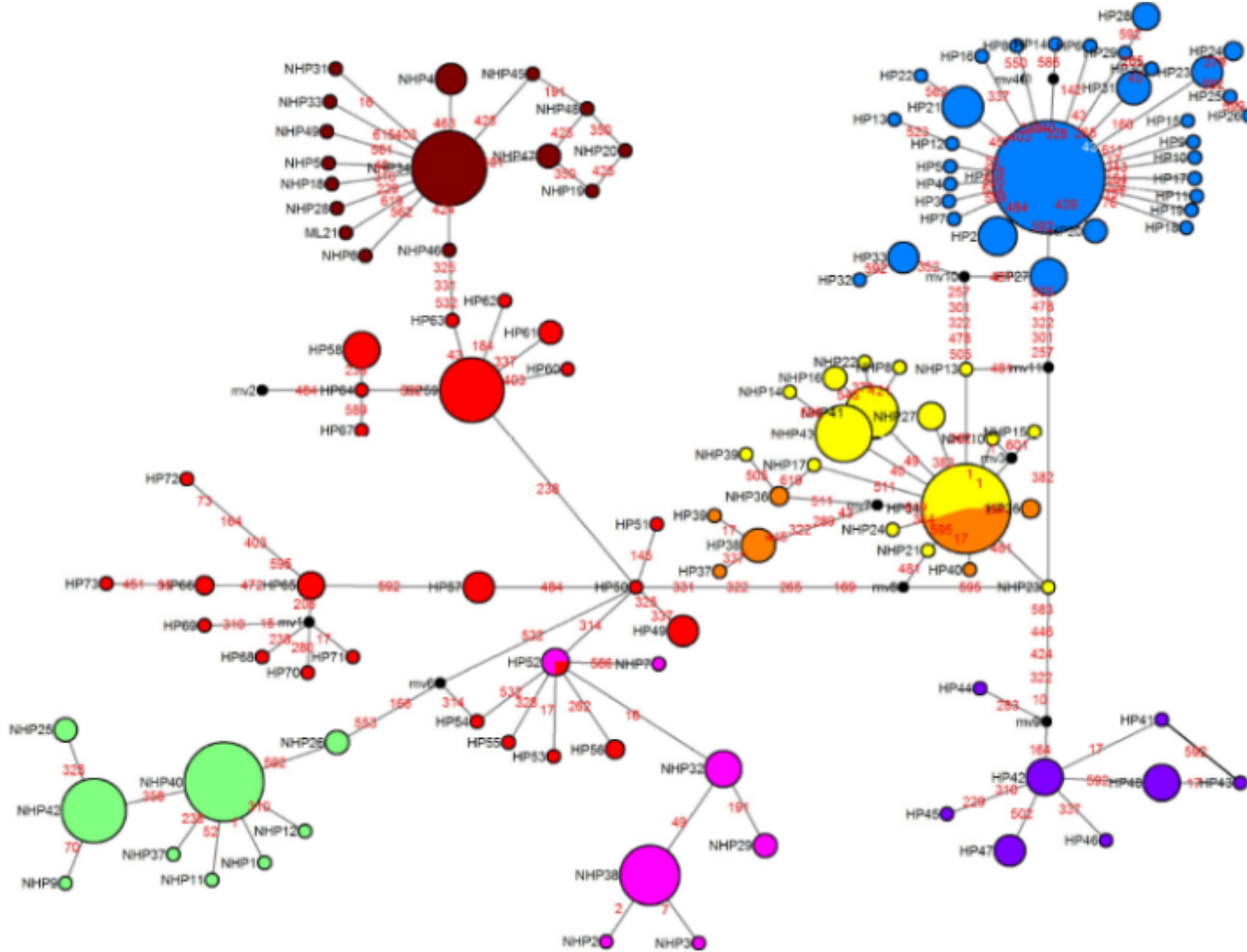
mtCOI gen alt bölgesine ait belirlenen 49 özgün haplotip baz dizisinin değerlendirildiği filogenetik ağaç çözümlene algoritmalarının (NJ, MP, ML, Bayesian) hiçbiri incelenen türün filogenetik durumunu tam olarak çözümlenmemiştir. Tüm algoritmaların ortak çıktısı çalışma alanında 4 filogenetik grubun var olduğudur. Belirlenen filogruplar en yüksek destek değerlerini ML algoritması ile gerçekleştirilen çözümlenmede almıştır. Bu ağacı incelediğimizde 4 filogrubun da politomik durumda olduğu görülmüştür. Olasılık haritalama analizi sonucunda veri seti için önerilen ağsı-yıldız filogeni çözümlenmesi doğrultusunda türün filogenisi hakkında tartışmalar ağ üzerinden gerçekleştirilecektir. Gerçekleştirilen network analizi sonuçları da filogenetik ağaç çözümlenmeleri ile örtüşmektedir ve 49 haplotipin, ikisi Akdeniz, ikisi de Ege Denizi’nde olmak üzere 4 filogenetik gruba dağıldığı görülmektedir. Belirlenen haplotipler içerisinde atasal özellik taşıyan haplotipler bulunmaktadır (HP 34, 38, 40, 41, 42, 44). Filogrupların belirlenen bu atasal haplotiplerden yıldız şeklinde evrimleştiği görülmüştür. Bu tip bir evrimleşme yakın zamanda gerçekleşmiş olan populasyon

büyümesi için tipik bir durumdur. Benzer bir evrimleşme Pérez-Losada vd'nin (2007) gerçekleştirdiği çalışmada da gözlenmiştir.

Pérez-Losada vd (2007)'nin *Sepia officinalis* türü için Atlantik Okyanusu'nda 10, Akdeniz'de 15 bölgeden temin ettikleri örnekler ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında 73 benzersiz haplotip tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu haplotipleri kullanılarak oluşturduğu networkte temel filogenetik yapıyı oluşturan 3 filogenetik grup belirlemişlerdir. Bu gruplardan ilki Akdeniz ve Atlantik Okyanusu örneklerinin birlikte oluşturdukları bir temel grup, ikincisi Akdeniz'de konumlanmış politomik üç kladın ve Ege-Iyon Denizi örneklerinin oluşturduğu grup ve üçüncüsü ise Batı Afrika ve Güney İberya Yarımadası'ndan temin edilen örneklerin oluşturduğu bir gruptur.

Mürekkepbalığı türünün Türkiye denizlerindeki soy hatlarının yerini daha iyi tanımlanması, belirlenen soy hatlarının türün bilinen diğer soy hatları ile karşılaştırılması sonucunda gerçekleştirilebilecektir. Bu düşünce ile gerçekleştirilen network analizinde, Pérez-Losada vd'nin (2007) çalışmasında tespit edilmiş olan 73 haplotip ve çalışmamızda belirlenmiş olan 49 haplotip birlikte değerlendirilmiş ve ülkemiz Akdeniz ve Ege Denizi sahillerinde bulunan mürekkepbalığı populasyonlarının genetik özellikleri açısından türün geri kalan dağılım alanı içerisinde nasıl konumlandığı tespit edilmiştir (Güven vd 2009) (Şekil 5.1). Şekil üzerinde Pérez-Losada vd'nin (2007) çalışmasında belirlenmiş olan filogenetik gruplar Mavi (Grup1), Turuncu ve Mor (Grup2) ve Kırmızı (Grup3) renkleri ile belirtilmiştir. Çalışmamız kapsamında belirlenen filogenetik gruplar ise Sarı (GR4), Kahverengi (GR1), Yeşil (GR3) ve Pembe (GR2) renkleri ile belirtilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, çalışmamızda tespit edilmiş olan tüm filogenetik grupların önceki çalışmada araştırmacıların Akdeniz içerisinde belirledikleri Grup2 kladının aynı gen havuzunda buldukları görülmektedir. Belirlediğimiz filogenetik gruplar içinde yalnızca diyagram üzerinde sarı renk ile ifade edilen GR4 filogenetik grubunun Ege-Iyon Denizi örneklerinin oluşturduğu gruba dahil olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmamız kapsamında Güney Ege'de tespit edilmiş olan ve GR4'ü oluşturan haplotiplerden birisi olan NHP23 haplotipinin, Pérez-Losada vd'nin (2007) çalışmalarında değinilen ve Ege Denizi'nde konumlanmış olan türün populasyonlarının Akdeniz'deki gruplarla bağlantısını sağlayan hipotetik haplotip olduğu tespit edilmiştir.

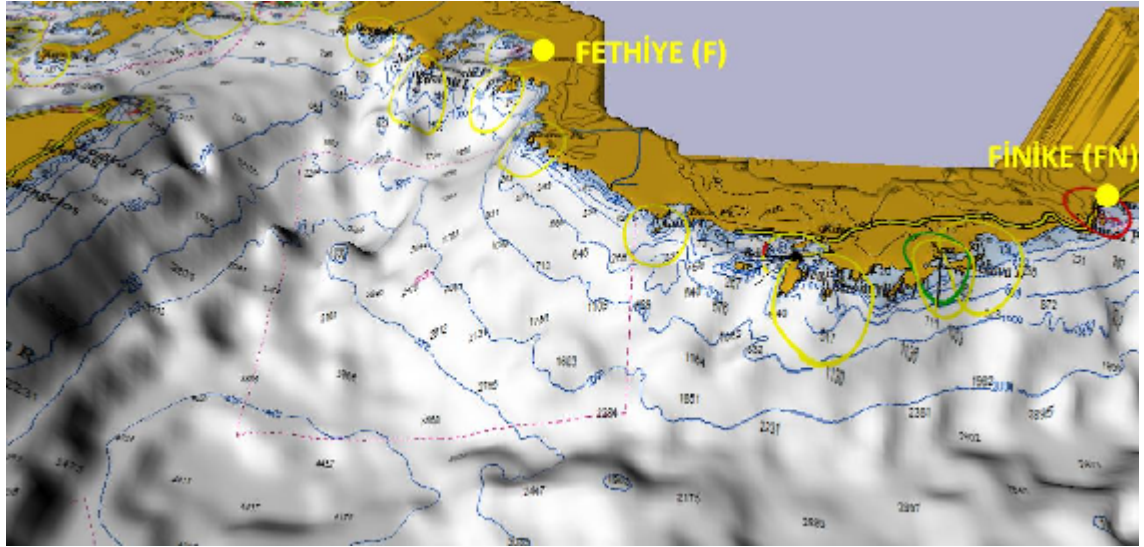
Türe ait belirlenmiş olan 3 ana kladdan yalnızca Akdenize özgü olan kladdın Türkiye sahillerinde temsil edildiği görülmektedir. Çalışmamız kapsamında belirlenmiş olan 4 filogrubun 2'si ülkemiz sahilleri için endemik olduğu vurgulanabilir. Bu filogruplardan ilki (GR1) coğrafik olarak Doğu Akdeniz sahillerimizde konumlanmıştır. İkinci endemik filogrup (GR3) ise Güney Ege Sahillerimizde yoğunlaşarak tüm Ege Denizi'nde yayılım göstermiştir.



Şekil 5.1. Türem dağılım gösterdiği bölgelerin tümünde belirlenmiş olan haplotipler ile oluşturulmuş network. (Pérez-Losada vd'nin (2007) çalışmasından elde edilen haplotipler HP 1 – 71; Çalışmamızdan kapsamında belirlenen haplotipler NHP 1 – 49)

5.3. Populasyon Yapılanması

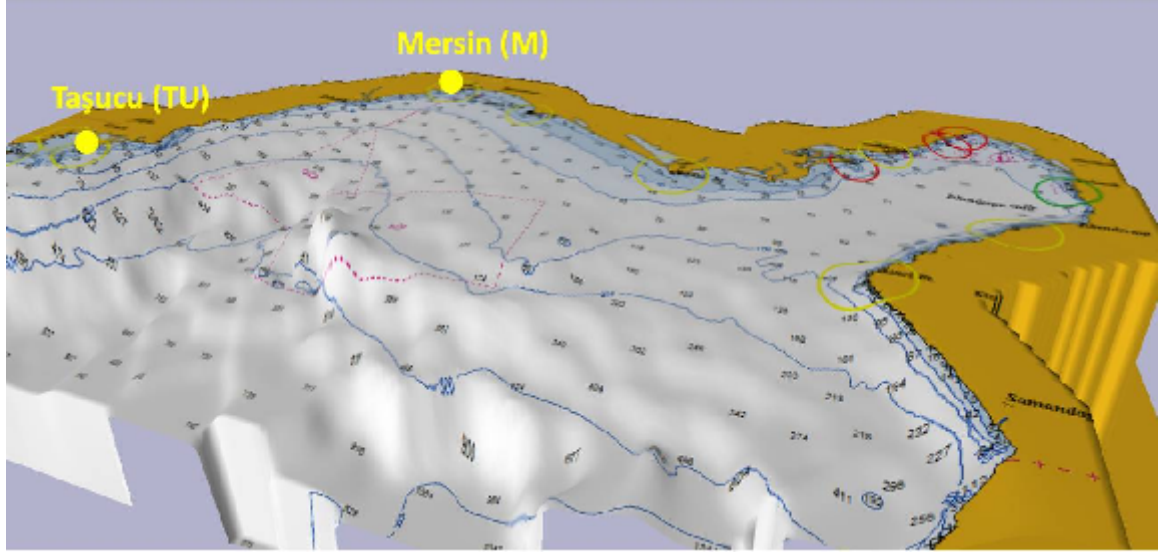
Populasyon yapılanmasının belirlenmesi amacı ile mtCOI gen bölgesi değerlendirilerek Network ve Barrier analizleri gerçekleştirilmiş ve belirlenen haplotiplerin coğrafik bölgelere göre dağılımı yorumlanmıştır. Analizler sonucunda Akdeniz ve Ege Denizi'nde dört filogenetik grubun varlığı tespit edilmiştir. F – FN örnekleme bölgeleri arasında bulunan ani derinlik artışının oluşturduğu fiziksel bariyerin etkisi altında gen akışının baskılandığı düşünülmektedir (Şekil 5.2).



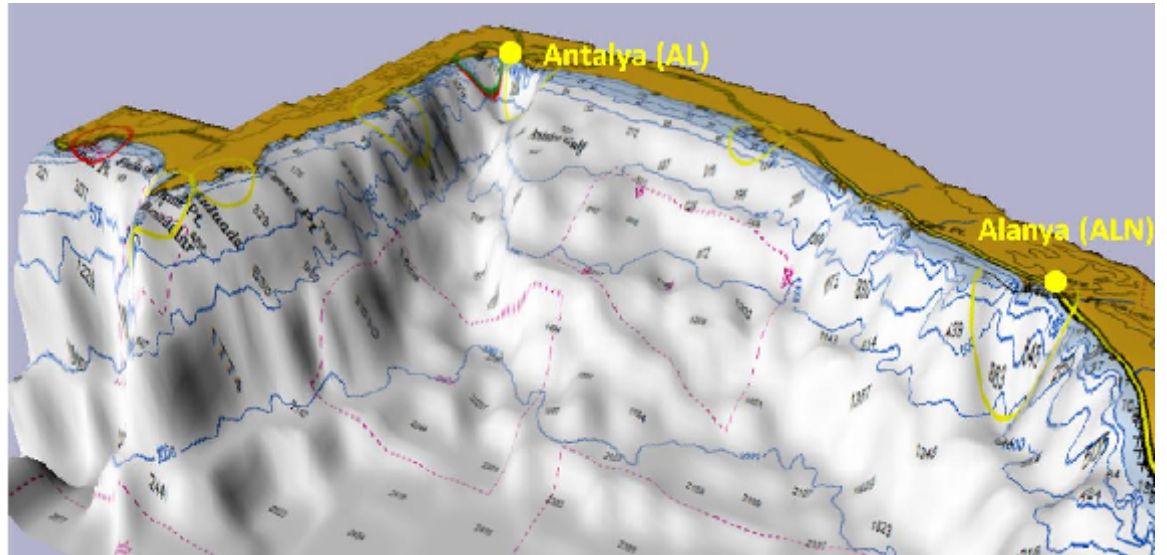
Şekil 5.2. Ege Denizi ile Akdeniz arasında gen akışını sınırlandıran ani derinlik artışı

Bunun yanında Akdeniz ve Ege Denizi'nde dağılım gösteren filogenetik grupların da yine derinlik etkisi altında şekillendiği görülmüştür. Belirlenen ikinci bir ayırımında Doğu Akdeniz'de bulunan Mersin ve İskenderun Körfezlerinin görece sığ sularında yaşamını sürdüren populasyonlar için söz konusudur (Şekil 5.3). Akdeniz de bulunan GR1 filogenetik grubu İskenderun ve Mersin Körfez'lerini oluşturan sığ kesimde yoğunlaştığı ve dağılım alanının Antalya Körfezi'ne kadar uzandığı görülmektedir. Aynı bölgede bulunan GR2 filogenetik grubu ise Antalya Körfezi'nde bulunan sığ kesimde yoğunlaşan ve Mersin Körfezine kadar ulaşan bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.4). Ege Denizi'nde bulunan filogenetik grupları incelediğimizde ise GR3'ün Güney Ege'de yoğun bir dağılım gösterirken tüm Ege Denizinde varlığını sürdürdüğü gözlenmiştir. Bunun yanında GR4'ün ise belirgin bir

yoğunlaşma göstermeksizin tüm Ege Denizinde dağılım gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 5.3. İskenderun ve Mersin Körfezleri'ni oluşturan sığ bölgeler



Şekil 5.4. Antalya Körfezi'nde bulunan sığ bölgeler

Çalışmamız kapsamında analizlerini gerçekleştirdiğimiz bir diğer belirteç olan mikrosatelit lokuslarının değerlendirilerek populasyon yapılanmasının belirlenmesi amacı ile Structure ve Barrier programları kullanılmıştır. Araştırma alanında üç farklı populasyonun varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan ilki Akdeniz'de dağılım

göstermektedir. Diğer iki populasyon ise Güney ve Kuzey Ege Denizi'nde konumlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar mtCOI belirteci analizi sonucunda elde edilen sonuçlar ile birlikte değerlendirildiğinde, Akdeniz ile Ege Denizi'nin gen akışını sınırlandıran derinliğe bağlı fiziksel bariyerin varlığı fikri destek görmektedir.

Kullanılan iki belirteç için elde edilen sonuçlarda Akdeniz içerisinde gözlenen populasyon yapılanması örtüşmektedir. Gerçekleştirilen örnekleme sıklığı sayesinde mtCOI nin değerlendirildiği analizler Akdeniz ile Ege Denizi arasında gözlenen ayrılma bölgesinin deha kesin belirlenebilmesine olanak tanımıştır.

Tür ile gerçekleştirilen benzer çalışmaları incelediğimizde;

Pérez-Losada vd'nin (1999) İber Yarımadası çevresinde gerçekleştirilen çalışmasında araştırmacılar allozim farklılaşmasının değerlendirerek populasyon yapılanmasının belirlemişlerdir. Çalışma sonunda, Cebelitarık Boğazı'nın, geçidin her iki yanında bulunan populasyonların yapılanmasında birincil etkiye sahip olduğunu bunun yanında bölgede bulunan hidrografik yapıların gen akışına etki ederek populasyon şekillenmesine ikincil etkiyi oluşturduğunu belirtmişlerdir.

İber Yarımadası çevresindeki gerçekleştirilen ikinci bir çalışmada mikrosatelit belirteçler kullanılmış ve populasyonların birbirlerinden ayıran hidrografik engeller (Almeria-Oran) belirtilmiştir (Pérez-Losada vd 2002). Yine aynı çalışmada fiziksel bariyerlere ek olarak uzaklığa bağlı olarak türün populasyonların farklılaşma gösterdikleri bildirilmiştir.

Bir diğer çalışma da Adriyatik Denizi'nde gerçekleştirilmiştir (Garoia vd 2004). Bu çalışmada ise, Adriyatik Denizi'nde türün dağılımına etki edecek nitelikte hidrografik bir engel olmadığı ve mesafenin gen akışına etki etmediği bildirilmiştir. Bölgede bulunan populasyonlar homojen olarak dağılmakta ve tek bir gen havuzu oluşturmaktadır. Bu nedenle bölgede önemli bir populasyon yapılanmasının gözlemlendiği belirtilmiştir.

Pérez-Losada vd (2007)'nin Atlantik Okyanusu ve Akdeniz'de gerçekleştirdiği çalışma sonunda mesafeye bağlı genetik farklılaşmanın türün geçmişteki ve

günümüzdeki populasyon yapılanmasında birincil etken olduğu fikrini belirtmişlerdir. Ayrıca Batı Akdeniz ile Ege Denizi arasında gen akışını kısıtlayan olası bir bariyer bölgenin varlığı bildirilmiştir.

Yapılmış olan çalışmaların tamamında populasyon yapılanmalarının iki ana etken doğrultusunda şekillendiği bildirilmektedir. Bunlardan ilki mesafe etkisi diğeri ise çalışma bölgelerinde yer alan hidrografik bariyer bölgeleridir. Araştırmamızda bölgemizdeki populasyonların yapılanmalarının mesafenin etkisi ile şekillendiği fikri, gerçekleştirdiğimiz “Mantle Testi” sonucunda reddedilmiştir. Bunun yanında hidrografik engeller doğrultusunda populasyon yapılanmasının oluşması fikri tüm analiz sonuçlarında önemli destekler görmüştür. Çalışma alanımızla örtüşen coğrafyada Turan ve Yağlıoğlu (2010)’nun gerçekleştirdiği ve mtND 5/6 gen gölgesinin değerlendirildiği çalışmada Akdeniz’de 2, Ege Denizi’nde 1 ve Marmara Denizi’nde 1 olmak üzere 4 bölgeden örnekler temin edilmiş ve *S. officinalis* türünün bölgedeki populasyon yapılanması incelenmiştir. Belirtilen çalışma kapsamında örnekleme noktaları arasında herhangi bir haplotip paylaşımı olmadığı ve bölgeler arası önemli genetik farklılaşmanın varlığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumun, örnekleme bölgeleri arasındaki mesafe ve incelenen türün kısıtlı dağılım özelliği taşımasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz sonuçlarda da örnekleme bölgeleri arasında belirgin genetik farklılaşma değerleri gözlenmiştir ancak bu farklılaşmanın bölgeler arasındaki mesafeden ziyade gen akışına etki eden fiziksel faktörlerin varlığı sonucunda şekillendiği olasılığı daha güçlüdür. Çalışma alanında türün populasyon yapılanmasını belirleyen etken olarak ortaya iki farklı fikrin atılmasının, ülkemiz denizlerinin jeolojik ve hidrografik yapısının karmaşıklığından kaynaklanmaktadır. Mürekkepbalığının populasyon yapılanmasının sağlıklı bir şekilde belirlenebilmesi için bölgede gen akışına etki eden faktörlerin etkin bir şekilde ortaya konulması gereklidir. Bu durum çalışma alanında bulunan hidrografik faktörlerin dikkate alınarak örnekleme planının çıkartılmasını gerektirmektedir. Çalışmamızda gerçekleştirilen örnekleme planını, bölgedeki hidrografik yapıların etkilerinin ortaya konulmasında daha kapsamlı sonuçlar vermiş olması bahsi geçen farklılığın temel nedenidir.

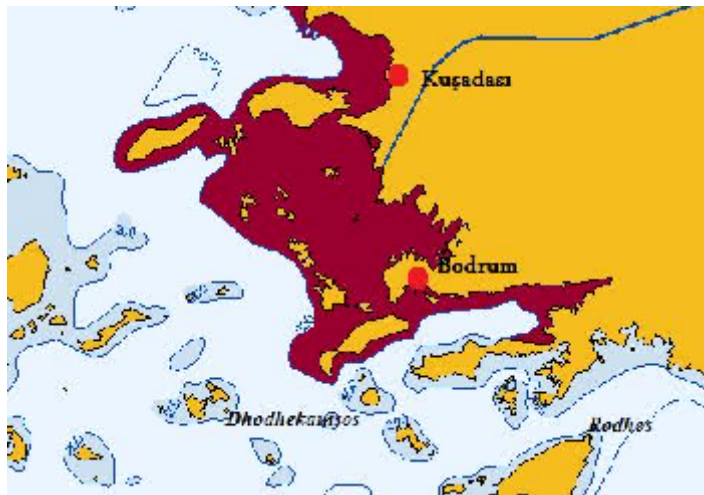
Network, Structure ve Barrier analizlerine ek olarak populasyonlar arasındaki genetik varyasyonun hiyerarşik düzeyde coğrafik dağılışını test etmek üzere mtCOI gen bölgesi ve beş mikrosatelit lokusuna ait veri setleri ile moleküler varyans analizleri (AMOVA) gerçekleştirilmiştir. AMOVA analizleri, mürekkebalığı populasyonlarının hem mikrocoğrafik hem de makrocoğrafik alandaki genetik yapılarının ortaya konulmasında katkı sağlamıştır. Tüm lokuslar için ve her lokus için tek tek, gruplar arasında, grup içinde populasyonlar arasında ve populasyon içinde farklılaşma oranları belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılaşma miktarları, makrocoğrafik varyasyonu, grup içinde populasyonlar arasında ve populasyon içinde ise mikrocoğrafik varyasyonu göstermektedir.

Çalışmamızda incelenen gruplandırmalar, örnekleme bölgelerinin coğrafik konumları ve gerçekleştirilmiş analiz sonuçlarına göre belirlenmiştir. mtCOI gen bölgesi için sonuçlarını değerlendirdiğimizde Taşucu (TU) örnekleme bölgesinin doğu kesiminde bulunan bölgelerin oluşturduğu grubun tüm diğer bölgelerden farklılık gösterdiği (Va= % 20,78) görülmüştür. Mikrosatellitlerin değerlendirildiği analizlerde bölgeyi ifade eden gruplamada, gruplar arası farklılaşma en yüksek ikinci değer olan % 16.31 (Va: 67.396) oranında gözlenmiştir. Bu durum İskenderun Körfezi ile Mersin Körfezi'nde konumlanmış olan mürekkebalığı populasyonlarının arasında gen akışını baskılayacak bir oluşumun olmadığı ve birlikte değerlendirilmesi gerekliliği fikrini desteklemektedir. Tüm diğer gruplamaların arasında, Mersin Limanı (ML) ile Köyceğiz (KY) örnekleme noktaları arasında kalan bölgenin doğusu ile batısında konumlanmış populasyonların karşılaştırıldığı gruplama için farklılaşma oranının en yüksek değere (Va= % 21,56) ulaştığı gözlemlenmiştir. Belirtilen bölgeyi ifade eden gruplandırma için mikrosatelit belirteçlerin analizi sonucu en yüksek gruplar arası farklılaşmanın varlığı belirlenmiştir (% 18.74; Va: 75.705). Bu durum tüm diğer analizlerde de işaret edilen Ege Denizi ve Akdeniz arasındaki derinliğe bağlı fiziksel bariyerin varlığı fikrini desteklemektedir.

Türün çalışma bölgemiz dışında kalan dağılım bölgelerinin de mtCOI gen bölgesinin değerlendirildiği AMOVA analiz sonuçlarını incelediğimizde, Atlantik Okyanusu ve Batı Akdeniz de konumlanmış olan populasyonların oluşturduğu grup ile Girit Adası'nın kuzeyinde yer alan iki ve Yunanistan'ın batısında yer alan bir bölgeden

temin edilen örneklerin oluşturduğu grup arasında en yüksek farklılaşma oranının (Va= % 68.8) varlığı bildirilmiştir (Pérez-Losada vd 2007). Bu sonuç çalışmamızda vurguladığımız Akdeniz ile Ege Denizi arasındaki gen akışının sınırlanmış olduğu fikrini desteklemektedir.

Araştırmanın gerçekleştirildiği bölgede bulunan populasyonlar arasında bulunan ve gen akışını kısıtlayan bariyer bölgelerinin belirlenmesi amacı ile mtCOI gen bölgesinin ve beş polimorfik mikrosatelit bölgesi değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen “Barrier Analizi” sonucunda Taşucu örnekleme bölgesinde yarı geçirgen bir bariyerin varlığı her iki moleküler beliriteç tarafından da belirlenmişti. Bunu yanında mikrosatelit verileri Marmaris ile Seferihisar populasyonları arasında gen akışının baskılandığını gösterirken mtCOI gen bölgesine ait verilerde bu tip belirgin bir farklılaşmaya rastlanmamıştır. İki belirtecin analiz sonuçlarında gözlenen farklılığın nedeni, mtCOI bölgesinin çalışılması amacı ile gerçekleştirilmiş olan örneklemenin mikrosatelit çalışmasında kullanılan örnekleme bölgelerine oranla daha sık olmasıdır. Kuşadası ile Bodrum örnekleme bölgeleri arasında kalan ve tür için uygun yaşam ortamı oluşturan 0 – 200 m derinlik konturlarının bulunduğu sığ kesimin (Şekil 5.5) bölgede türün genetik farklılaşması üzerinde etkisi daha etkin şekilde incelenmelidir. Bu nedenle çalışmamız sonucunda mürekkepbalığı populasyonlarının yapılanmasının daha net ifade edilebilmesi için bölgedeki mikrodatalit örnekleme noktalarını sıklaştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.



Şekil 5.5. Kuşadası ile Bodrum örnekleme bölgeleri arasında kalan sığ kesimin

5.4. Demografik Geçmiş

Çalışma bölgesi içerisinde belirlenen dört filogenetik grubun demografik tarihçesinin belirlenebilmesi amacı ile mtCOI gen bölgesi değerlendirilerek nötralite ve uyumsuzluk dağılımı analizleri gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları incelendiğinde tüm grupların demografik geçmişlerinde büyüme olduğu belirlenmiştir.

Bölgede bulunan tüm mürekkebalığı popülasyonlarının geçmişteki demografik değişiminin ortaya konulması amacı ile koalesent teorisinin kullanıldığı BSP analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda çalışma bölgesinde bulunan mürekkebalığı popülasyonlarının 0.003 – 0.020 MY arasında genişleme gösterdiği belirlenmiştir. Türün çalışma alanımız dışında kalan popülasyonlarının değerlendirildiği çalışmada son iki buzul devri arasında (0.130 – 0.020 MY) popülasyon büyüklüklerinde üstel bir artışın tespit edildiği bildirilmiştir (Pérez-Losada vd 2007). Çalışma alanımızda bulunan popülasyonlar için belirlediğimiz büyümenin zamanı ile diğer bölgeler için belirlenen zaman uyumaktadır.

İncelenen filogruplar için büyümenin % 0.7/milyon yıl mutasyon oranı için 92.900 – 162.200 yıl, % 0.25/milyon mutasyon oranı yıl için ise 26.000 ile 45.400 yıl önce gerçekleştiği hesaplanmıştır. Büyümenin gerçekleştiği zaman dilimi, son buzul döneminin bitişine denk gelmektedir. Dönem sonunda su seviyelerinde gözlenen artış mürekkebalığı türünün yaşaması için uygun alanların artmasına sebep olmuştur. Özellikle belirlenen 4 filogruptan GR1'in Mersin Körfezi ve İskenderun Körfezi'nde GR2'nin Antalya Körfezi'nde ve GR4'ün ise Güney Ege'de oluşan uygun yaşam koşulları neticesinde popülasyon büyüklüklerini arttırdıkları görülmüştür. Gerçekleştirilen “Nötralite Testleri” ve “Uyumsuzluk Dağılım Analizi” sonuçları belirlenen 4 filogrup için yakın dönemde gerçekleşmiş olan popülasyon büyüklüklerinin artışı desteklemektedir. Filogrupların temsil edildiği popülasyonların büyüklüklerin arttırmasına olanak veren uygun alanlar aynı zamanda filogrupların coğrafik olarak birbirinden kısmen ayrılmasına da neden olmuştur. Bu durum “Barrier Analiz” sonucunda tespit edilen yarı geçirgen bariyer bölgelerinin konumlandıkları bölgeler incelendiğinde daha net görülmektedir. Akdeniz ve Ege Denizi ayrımında etkin olan 2 bariyer bölgesi, Marmaris ile Finike örnekleme bölgeleri arasında belirlenmiştir. Bunun yanında Akdeniz'de Taşucu örnekleme bölgesinde tespit edilmiş

olan bariyer, Akdeniz içerisinde konumlanmış olan GR2 filogrubunun GR1 filo grubundan ayrıldığı bölgedir.

Gerek mtCOI gen bölgesi, gerekse mikrosatelit verilerinin değerlendirilmesi ile elde edilen genetik farklılaşma miktarları incelendiğinde, belirlenmiş olan filogrular arasında herhangi bir üreme izolasyonunun söz konusu olmadığı görülmüştür. Son buzul döneminin kısmen izole olmuş olan mürekkepbalığı populasyonlarında üreme izolasyonuna neden olacak kadar uzun sürmediği görülmektedir.

6. SONUÇ

Gerçekleştirilen bu tezin amacı *S. officinalis* türünün ülkemiz denizlerinden Akdeniz ve Ege Denizi sahillerindeki populasyonların genetik farklılaşmalarının ortaya konulması, populasyon yapılanmalarında etkin olan fiziksel ve evrimsel faktörlerin belirlenmesi ve türe ait populasyonların demografik geçmişlerinin ortaya konulmasıdır. Bunu yanında, mürekkepbalığının model olarak değerlendirilmesi sonucunda türün dağılım gösterdiği bölgede diğer türlerin populasyon yapılanmalarında da etkin olabilecek faktörlerin tespiti amaçlanmaktadır. Çalışmamız için tercih ettiğimiz her iki moleküler belirtecin değerlendirilmesi ile geçmişte ve günümüzde populasyonları etkileyen faktörleri etkin bir şekilde sınıma şansı bulunmuştur. Gerçekleştirilen örnekleme planı çalışma bölgesinde bulunan jeolojik ve hidrografik oluşumlar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

- ❖ Ortaya konulan etkin örnekleme, bölgede bulunan stokların sınırlarının belirlenmesine olanak sağlamıştır. Analizler sonucunda araştırma bölgesinde belirgin filocoğrafik ve genetik yapılanma tespit edilmiştir.
- ❖ Her iki moleküler belirteç için gerçekleştirilen analizler birlikte değerlendirildiğinde Akdeniz’de mürekkepbalığı populasyonlarının genişlemesine olanak tanıyan uygun derinlikte iki bölgenin varlığı tespit edilmiştir. Bu bölgelerin ilki Doğu Akdeniz’de yer alan İskenderun Körfezi ve Mersin Körfezi’nin oluşturduğu alandır. İkinci bölge ise Antalya Körfezi’de bulunmaktadır. Türün çalışma alanında bulunan populasyonlarının bahsi geçen bölgelerin varlığında yapılandığı görülmüştür.
- ❖ Marmaris ile Finike arasında bulunan deniz zemininin ani derinleşmesi nedeni ile türün gen akışı baskılanmış ve Ege Denizi’nde bulunan populasyonlar ile Akdeniz’de bulunan populasyonlar arasında bir ayrıma neden olan fiziksel bir etken oluşturmuştur.
- ❖ Ege Denizi’nde yer alan populasyonları değerlendirdiğimizde ise, biri Marmaris Körfezi ile Bodrum arasında kalan bölgede yoğunlaşan, ancak tüm Ege Denizi’nde de dağılım göstere bilen, diğeri ise tüm Ege Denizi’ne dağılım gösteren iki filogrubun varlığı tespit edilmiştir.
- ❖ Yapılan incelemeler doğrultusunda tür ile gerçekleştirilmiş birçok çalışmada önerilenin tersine populasyon yapılanmasına mesafenin etkisinin olmadığı,

yapılanmanın gerçekleşmesinde birinci derecede etkin olan nedenin bölgedeki fiziksel faktörler olduğu gözlemlenmiştir.

- ❖ Gerçekleştirilen demografik analizler sonucunda bölgede bulunan tüm populasyonlar için genişlemenin gerçekleştiği görülmektedir. Özellikle tür için uygun bir dağılım alanı sağlayan İskenderun Körfezi ve Mersin Körfezi'nde bulunan populasyonda önemli derecede büyüme belirlenmiştir. Bu durum türün aşırı avcılığa maruz kalmadığının göstergesidir. İleride gerçekleştirilecek sürdürülebilir balıkçılık yönetimi uygulamalarında dikkate alınması gereken en önemli konu, Akdeniz ve Ege Denizi'nde bulunan türe ait populasyonların birbirinden ayrı değerlendirilmeleri gerekliliğidir.

Çalışma kapsamında nektobentik özellikteki mürekkepbalığının populasyon yapılanması ortaya konulurken türün gen akışına etki eden faktörler belirlenmiştir. Belirlenen bu etkenlerin, bölgede dağılım gösteren diğer omurgalı ve omurgasız türlerine olası etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışma sonuçları bu anlamda gelecekte gerçekleştirilebilecek çalışmalara zemin oluşturmaktadır.

Çalışmamız kapsamında mürekkepbalığı türünün ülkemizde dağılım gösterdiği Akdeniz ve Ege Denizi değerlendirilmiştir. Ancak türün Marmara Denizi'nin güney kesimlerinde de dağılım gösterdiği bilinmektedir. Ege Denizi ile Marmara Denizi'nin bağlantısını sağlayan Çanakkale Boğazı'nın, dünyadaki benzer bölgelerin gen akışına etkisi göz önünde bulundurulduğunda, yapısında bulunan hidrografik özellikler nedeni ile türün bölgedeki gen akışına önemli etkilerinin olabileceği öngörülmektedir. Gelecekte Çanakkale Boğazı sisteminin mürekkepbalığı modelinin değerlendirilmesi ile gen akışına etkisinin ortaya konulması ülkemiz genetik çeşitliliğinin belirlenmesi açısından yararlı bir çalışma olacaktır.

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda türün populasyonlarının yapılanmasında hidrografik etkenlerin önemi ortaya konulmuştur. Daha önceki dönemlerde türün dağılım gösterdiği diğer bölgelerde gerçekleştirilmiş benzer çalışmalarda gen akışına etki edebilecek fiziksel şartların söz konusu olduğu bölgeler bildirilmiştir. Bu bölgelerin hidrografik özellikleri göz önünde bulundurularak gerçekleştirilecek daha kapsamlı örneklemeler sayesinde hidrografik sistemlerin gerçek etkilerinin belirlenmesi türün yapılanmasının daha sağlıklı bir şekilde ortaya konulmasına olanak verecektir. Ayrıca

Sepia officinalis türünün Akdeniz’de dağılım gösterdiği bölgelerden yalnızca Kıbrıs ve Güney Doğu Akdeniz bu güne kadar incelenmemiştir. Bu bölgelerin değerlendirilmeye katılması ile Akdeniz’in insan eli ile oluşturulmuş ikinci kapısı olan Süveyş Kanalı’nın türün popülasyonları üzerindeki etkileri de belirlenebilecektir.

Yine araştırmamızda belirlediğimiz diğer bir önemli konu, ekocoğrafik engellerin, gen akışını tamamı ile kesintiye uğratmasa da önemli etkilerinin olduğudur. Bu engellerin arkasında mürekkebalığı popülasyonları Mersin ve İskenderun Körfezleri’nde gözlendiği gibi kendilerine uygun ortamlar bulduklarında popülasyon büyüklüklerini arttırmaktadırlar. Türün biyolojik özellikleri göz önüne alındığında bariyerler arkasında oluşan bu kısmi üreme birliklerinin zaman içerisinde mürekkebalığı türüne etkilerinin izlenmesi, ilerleyen dönemlerde daha belirgin genetik farklılaşmaların varlığının araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Barrier programı ile gerçekleştirilen analizler sonucunda, kendine özgü fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle, Ege Denizi’ndeki diğer örnekleme bölgelerinden farklılık gösteren İzmir Körfezi, aynı zamanda ülkemizde *S. officinalis* türünü hedef alan balıkçılık faaliyetinin gerçekleştirildiği sayılı bölgelerden birisidir. Düşük haplotip çeşitliliği göz önüne alındığında, bölgede gerçekleştirilen avcılık faaliyetlerinin genetik çeşitliliğin kaybına neden olması riski söz konusudur. Bölgede daha kapsamlı gerçekleştirilecek incelemeler sonucunda popülasyonun avcılık baskısı altında olup olmadığı daha net ortaya konulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- ANONİM, 2009. Fishery statistics, Yearbook.
- AVISE, J.C., 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge.
- BANDELT, H.J., FORSTER, P., ROHL A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37 – 48 pp.
- BOLETZKY, S.V., 1987. *Sepia officinalis*. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*. Vol I. Academic Pres, 31 – 52 pp.
- BOUCHAUD, O., 1991. Etude de la reproduction de la seiche commune *Sepia officinalis* L. Danse le Golf edu Morbihan: premiers resultats. In: *The Cuttlefish* (E. Boucaud – Camou, ed.), 153 – 166 pp. Acta of the first international symposium on the cuttlefish *Sepia*, Centre de Publication de l'Université de Caen.
- BOUCAUD-CAMOU, E. and BOISMERY, J., 1991. The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L) in the English Channel. In: Boucaud-Camou, E. (Ed.), *The Cuttlefish, First International Symposium on the Cuttlefish Sepia*. Centre de Publications de l'Université de Caen, Caen, France, 179–189 pp.
- BOYLE, P. and RODHOUSE, P., 2005. *Cephalopods: Ecology and Fisheries*. Blackwell Science Ltd., 452 p.
- CADDY, J.F. and RODHOUSE, P.G., 1998. Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological change in global fisheries? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8: 431 – 444 pp.
- CHAPUIS, M.P. and ESTOUP, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621 – 631 pp.
- CHUAN-WEN, H. and CHUNG-CHENG, L., 2005. Two new species of *Sepia* (*Doratosepion*) (*Cephalopoda: Sepiidae*) from Taiwan, based on morphological and molecular data. *Phuket mar. biol. Cent. Res. Bull.* 66: 51 – 69 pp.

- DOMINGUES, P.M., KINGSTON, T., SYKES, A. and ANDRADE, J.P., 2001. Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. *Aquaculture Research*, 32: 923 – 930.
- DRUMMOND, A.J. and RAMBAUT, A., 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* 7: 214 p.
- DUNN, M.R., 1999. Aspects of the stock dynamics and exploitation of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), in the English Channel. *Fisheries Res.* 40: 277 – 293 pp.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. and GOUDET, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611 – 2620 pp.
- EXCOFFIER, L. and LISCHER, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564 – 567 pp.
- FALUSH, D., STEPHENS, M. and PRITCHARD, J.K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant data and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574 – 578 pp.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783 – 791 pp.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. and VRIJENHOEK, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294 – 299 pp.
- FORSYTHE, J.W., DERUSHA R.H. and HANLON, R.T., 1994. Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *Journal of Zoology, London*. 233: 175 – 192 pp.
- FREELAND, J.R., 2008. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. England. 388 p.

- FU, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915 – 925 pp.
- GAROIA, F., GUARNIERO, I., RAMSAK, A., UNGARO, N., LANDI, M., PICCINETTI, C., MANNINI, P. and TINTI, F., 2004. Microsatellite DNA variation reveals high gene flow and panmictic populations in the Adriatic shared stocks of the European squid and cuttlefish (Cephalopoda). *Heredity* 93: 166 – 174 pp.
- GASCUEL, D., BEZ, N., FOREST, A., GUILLOTREAU, P., LALOË, F., LOBRY, J., MAHÉVAS, S., MESNIL, B., RIVOT, E., ROCHETTE, S. and TRENKEL, V., 2011. A future for marine fisheries in Europe (Manifesto of the Association Franc, aise d’Halieumétrie. *Fisheries Research* 109: 1 – 6 pp.
- GAUVRIT, E., LE GOFF, R. and DAGUZAN, J., 1997. Reproductive cycle of the cuttlefish, *Sepia officinalis* L. in the northern part of the Bay of Biscay. *Journal of Molluscan Studies*, 63: 19 – 28 pp.
- GÜVEN, O., 2004. Antalya körfezinde yaşayan mürekkepbalığı (*Sepia officinalis*, L.1758) in eşeyssel olgunluk, yumurta verimi ve mevsimsel üreme özelliklerinin belirlenmesi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Tez çalışması. 66 p.
- GÜVEN, O., PÉREZ LOSADA, M. and SHAW, P.W., 2009. Phylogeographic structuring of common European cuttlefish (*Sepia officinalis*): genetic signatures of glacial cycle-induced population fragmentation and contemporary isolation by distance effects. CIAC Symposium, September 3rd-11th, Vigo, Spain.
- HANLON R.T., AMENT S.A. and GABR, H. 1999. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Marine Biology*. 134 (4) : 719 p.
- HARPENDING, R.C., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591 – 600 pp.
- HASEGAWA, M., KISHINO, K. and YANO, T., 1985. Dating the human– ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22: 160 – 174 pp.

- HILBORN, R., 2007. Reinterpreting the state of fisheries and their management. *Ecosystems*, 10 (8): 1362 –1369 pp.
- JENSEN, J.L., BOHONAK, A.J. and KELLEY, S.T., 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.16 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- JEREB, P. and ROPER, C.F.E. (eds), 2005. *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae)*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 1. Rome, FAO. 262 p. 9 colour plates.
- KATAGAN, T., SALMAN, A. and BENLİ, H.A., 1993. The Cephalopod Fauna of The Sea of Marmara. *Isr. J. Zool.*, Vol. 39: 255 – 261 pp.
- LAPTIKHOVSKY, V., SALMAN, A, ÖNSOY, B. and KATAGAN, T., 2003. Fecundity of the common cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda Sepiida): a new look an the old problem. *Sci. Mar.*, 67(3): 279 – 284 pp.
- LE GOFF, R. and DAGUZAN, J., 1991. Growth and life-cycles of the cuttlefish *Sepia officinalis* L (Mollusca, Cephalopoda) in South Brittany (France). *Bull. Mar. Sci.* 49, 341 – 348 pp.
- LIBRADO, P. and ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451 – 1452 pp.
- LIN, X.Z., ZHENG, X.D., X.SHU and WANG, R.C., 2004. Phylogeny of the cuttlefishes (Mollusca: Cephalopoda) based on COI and partial 16S rRNA gene sequences. *Acta Oceanol. Sin.*, 23 (4).
- MANGOLD, K., 1966. *Sepia officinalis* fromCatalonian Sea. *Vie EtMilieu Serie A— Biologie Marine* 17: 961 – 1012 pp.
- MANNI, F., GUÉRARD, E. and HEYER, E., 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation:how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology*, 76 (2): 173 – 190 pp.

- MASA-AKI, Y., KAZUHIKO, T., HIDETAKA, F., 2006. Phylogeny of Selected Sepiidae (Mollusca, Cephalopoda) Based on 12S, 16S, and COI Sequences, with Comments on the Taxonomic Reliability of Several Morphological Characters. *Zoological Science*, 23 (4): 341 – 351 pp.
- MININ, V.N., BLOOMQUIST, E.W. and SUCHARD, M.A., 2008. Smooth Skyride through a Rough Skyline: Bayesian Coalescent-Based Inference of Population Dynamics. *Mol. Biol. Evol.* 25 (7): 1459 – 1471 pp.
- NISHIGUCHI, M.K., LOPEZ J.E. and BOLETZKY, S.V., 2004. Enlightenment of old ideas from new investigations: more questions regarding the evolution of bacteriogenic light organs in squids. *Evolution and Development* 6 (1): 41–49 pp.
- ONSOY, B. and SALMAN, A., 2005. Reproductive biology of the common cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Sepiida:Cephalopoda) in the Aegean Sea. *J. Vet. Anim. Sci.*, 29: 613 – 619 pp.
- PÉREZ-LOSADA, M., GUERRA, A. and SANJUAN, A., 1999. Allozyme differentiation in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) from the NE Atlantic and Mediterranean. *Heredity*, 83: 280–289 pp.
- PÉREZ-LOSADA, M., GUERRA, A., CARVALHO, G.R., SANJUAN, A. and SHAW, P.W., 2002. Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity*, 89: 417– 424 pp.
- PÉREZ-LOSADA, M., NOLTE, M.J., CRANDALL, K.A. and SHAW, P.W., 2007. Testing hypotheses of population structuring in the Northeast Atlantic Ocean and Mediterranean Sea using the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mol Ecol.* 16 (13): 2667 – 2679 pp.
- POSADA, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25 (7): 1253–1256 pp.
- RAMBAUT, A. and DRUMMOND, A.J., 2003. tracer: MCMC trace analysis tool. <http://evolve.zoo.ox.ac.uk>. University of Oxford, Oxford.

- RONQUIST, F. and HUELSENBECK, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572 – 1574 pp.
- ROPER, C.F.E., SWEENEY, M.J. and NAUEN, C.E., 1984. FAO species catalogue. Vol. 3. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish. Synop., (125) Vol. 3: 277 p.
- ROUSSET, F., 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology*, Vol 8, Issue 1: 103-106 pp.
- SALMAN, A., KATAGAN, T. and BENLİ, H.A., 1997. Bottom Trawl Teuthofauna of The Aegean Sea. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 45 (2): 183-196 pp.
- SALMAN, A., KATAGAN, T. and BENLİ, H.A., 1998a. On The Cephalopod Fauna of Northern Cyprus. *Isr. J. Zool.*, Vol.44: 47-51 pp.
- SALMAN, A., KATAĞAN, T. ve BENLİ, H.A., 1998b. Türkiye Kafadanbacaklıları (Clasis: Cephalopoda) ve Yetiştiriciliği. T.C. Tarım Ve Köy işleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bodrum, Seri A, Yayın No, 12: 162 p.
- SALMAN A., KATAGAN T. and BENLİ, H.A., 2002. Cephalopod fauna of the Eastern Mediterranean. *Turk. J. Zool.* 26: 47 – 52 pp.
- SCHMIDT, H.A., STRIMMER, K., VINGRON, M., and VON HAESLER A., 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*. 18: 502 – 504 pp.
- SHAW, P.W. and PE´REZ-LOSADA, M., 1999. Polymorphic microsatellites in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mol. Ecol.* 9: 237–238 pp.
- SLATKIN, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462 pp.
- STRIMMER, K. and VON HAESLER, A., 1997. Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94: 6815 – 6819 pp.

- SWOFFORD, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAJIMA, F., 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, Vol 123: 585 – 595 pp.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and KUMAR S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596 – 1599 pp.
- TAUTZ, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res*, 17: 6463–6471.
- TOMPSETT, D.D., 1939. *Sepia*. LMBC Memoirs, vol. XXXII (ed. R. T. Daniel), 184 pp. Liverpool: The University Press of Liverpool.)
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876 – 82 pp.
- TURAN, C. and YAGLIOGLU, D., 2010. Population identification of common cuttlefish (*Sepia officinalis*) inferred from genetic, morphometric and cuttlebone chemistry data in the NE Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 74 (1): 77-86 pp.
- WANG, J., PIERCE, G.J., BOYLE, P.R., DENIS, V., ROBIN, J.-P. and BELLIDO, J.M., 2003. Spatial and temporal patterns of cuttlefish (*Sepia officinalis*) abundance and environmental influences—a case study using trawl fishery data in French Atlantic coastal, English Channel, and adjacent waters. *ICES J. Mar. Sci.* 60, 1149 – 1158 pp.
- WILKE, T., 2003. *Salenthydrobia* gen. nov. (Rissooidea: Hydrobiidae): a potential relict of the Messinian salinity crisis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137: 319 – 336 pp.
- WOLFRAM, K., MARK, F.C., JOHN, U., LUCASSEN, M. and PORTNER, H.O., 2006. Microsatellite DNA variation indicates low levels of genetic differentiation

mong cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) populations in the English Channel and the Bay of Biscay. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 1: 375 –3 83 pp.

YOSHIDA, M., TSUNEKI,K. and FURUYA,H., 2008. Partial sequences of mitochondrial genes of the cuttlefishes. (Yayınlanmamış)

YOUNG, R.E., VECCHIONE, M. and DONOVAN, D.T., 1998. The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology. *South African Journal of Marine Science*, 20: 393 – 420 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Olgaç GÜVEN 1977 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretimini İstanbul ve Sakarya illerinde tamamladı. Orta ve lise öğretimini Antalya ilinde bitirdi. 1996 yılında İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde lisans öğretimine başladı ve 2000 yılında mezun oldu. 2000 – 2001 yılları arasında Borusan Holding bünyesinde bulunan B-Net iletişim Hizmetleri A.Ş.'de kurumsal hizmet yetkilisi olarak görev yaptı. 2001 – 2004 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Su Ürünleri Mühendisliği anabilim dalında yüksek lisans öğretimini tamamladı. Doktora öğretimini ders aşamasının tamamlayıp doktora yeterliliğini almasının ardından, 2008 – 2009 yılları arasında doktora tezinin laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirmek amacı ile hak kazandığı TÜBİTAK bursunu değerlendirerek bir yıl süre ile İngiltere'de bulundu. Ağustos 2001 yılından bu yana Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.