

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE İHTİYOFANASINDAKİ MULLİDAE AİLESİNDEKİ TÜRLERİN
FİLOGENETİK YAKINLIKLARININ MORFOLOJİK VE GENETİK FARKLARLA
KORELASYONU**

Emre KESKİN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Alp CAN

ANKARA
2007

Prof. Dr. Alp CAN danışmanlığında, Emre KESKİN tarafından hazırlanan bu çalışma 23/08/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nejat AKAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Alp CAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat BİLECENOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Nejat AKAR

Enstitü Müdürü

Türkiye İhtiyofaunasındaki Mullidae Ailesindeki Türlerin Filogenetik Yakınlıklarının Morfolojik Ve Genetik Farklarla Korelasyonu

ÖZET

Bu çalışmada, Mullidae ailesine ait *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus moluccensis* ve *Upeneus pori* türleri ile *Mullus barbatus ponticus* alt türüne ait örneklerin, mtDNA'da bulunan Sitokrom B, 12S rRNA ve Sitokrom Oksidaz II bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak çoğaltılmış ve dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonrası elde edilen veriler kullanılarak yapılan filogenetik analizleri sonucunda türlerin birbirleri ile olan ilişkileri ortaya konulmuştur.

Çalışmada, özellikle *Mullus barbatus* ile alt türü olarak kabul edilen *Mullus barbatus ponticus* arasındaki filogenetik ilişki, ilk defa dizi analizi ile elde edilen veriler yoluyla ortaya konulmuştur.

Çalışmanın sonucunda, analizi yapılan üç bölgeden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dört farklı filogenetik yöntem ile çizilen dendrogramlarda, *Mullus* ve *Upeneus* cinslerine ait türler ayrılarak iki ayrı dal oluşturmuştur. Beklendiği gibi, *Upeneus pori* ve *Upeneus moluccensis* *Upeneus* dalı altında birbirinden ayrılırken, *Mullus barbatus* ile *Mullus surmuletus* da *Mullus* dalı altında birbirinden ayrılmıştır. Gösterdiği morfolojik farklılıklar ile alt tür olarak tanımlanan *Mullus barbatus ponticus* ise, *Mullus barbatus* örneklerinden, genetik bir farklılık göstermemektedir.

Anahtar kelimeler: 12S rRNA, Filogeni, Morfoloji, mtDNA, Mullidae, Mullus, Mullus barbatus ponticus, Sitokrom B, Sitokrom Oksidaz II, Upeneus

Correlation of Phylogenetic Relationships in Terms of Morphologic and Genetic Diversity among Mullidae Species in Turkish Ichtyofauna

ABSTRACT

In this study, Cytochrome B, 12S rRNA and Cytochrome Oxidase II regions of mtDNA belonging to the species *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus moluccensis*, *Upeneus pori* and the subspecies *Mullus barbatus ponticus* of Mullidae family were amplified with polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis were performed. The relationship between the species was revealed as a result of phylogenetic analysis of the data, gathered from sequence analysis.

Phylogenetic relationship between *Mullus barbatus* and its subspecies *Mullus barbatus ponticus* was revealed, by using the data obtained from sequence analysis, for the first time.

At the end of the study, similar results were obtained from all of the three regions that were analysed. *Mullus* and *Upeneus* split into two different branches in the dendrograms constructed by using four different methods. As expected, *Upeneus pori* and *Upeneus moluccensis* split up under *Upeneus* branch, *Mullus barbatus* and *Mullus surmuletus* split up under *Mullus* branch. *Mullus barbatus ponticus*, which was defined as subspecies according to its morphological differences, shows no genetic difference from *Mullus barbatus* samples.

Keywords: 12S rRNA, Cytochrome B, Cytochrome Oxidase II, Morphology, mtDNA, Mullidae, Mullus, Mullus barbatus ponticus, Phylogeny, Upeneus.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Alp CAN'a,

Tez çalışmam boyunca, laboratuvar çalışmalarım sırasında benden bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Tez çalışmamın belirlenmesi sırasında ve çalışmalarım boyunca bilgi ve önerileriyle bana yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Murat BİLECENOĞLU'na,

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkan ve olanakları bana açan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'na ve başta Devrim AYDIN olmak üzere tüm çalışanlarına,

Ayrıca benim bu günlere gelmemde her türlü destek ve teşviklerini esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli aileme, özellikle dedem Şaban KESKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emre KESKİN
Ankara, Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Mullidae (Barbungiller).....	2
2.1.1. Mullidae ailesine ait türlerin dünyadaki dağılımı.....	2
2.1.2. Mullidae ailesine ait türlerin Türkiye'deki dağılımı.....	3
2.1.3. Barbun: <i>Mullus barbatus</i> Linnaeus, 1758.....	3
2.1.4. Karadeniz barbunu: <i>Mullus barbatus ponticus</i> (Essipov, 1927).....	4
2.1.5. Tekir: <i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758.....	5
2.1.6. Paşa barbunu: <i>Upeneus moluccensis</i> (Bleeker, 1855).....	6
2.1.7. Nil barbunu: <i>Upeneus pori</i> (Ben-Tuvia & Golani, 1989).....	7
2.2. Taksonomi.....	8
2.2.1. Morfolojik taksonomi.....	8
2.2.2. Moleküler taksonomi.....	9
2.3. Mitokondriyal DNA (mtDNA).....	9
2.4. Jel Elektroforezi.....	10
2.4.1. DNA elektroforezi.....	11
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR).....	11
2.6. DNA Dizi Analizi.....	13
2.7. Filogenetik Analiz.....	15
2.7.1. Filogenetik ağaçlar.....	15
2.7.1.1. Parsimoni.....	17
2.7.1.2. Maksimum olasılık ve genetik uzaklık.....	17
2.7.2. Ağaçların güvenilirlik dereceleri.....	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Örneklerin elde edilmesi.....	20
3.2.2. Morfolojik karakterlerin kontrolü ve ölçümleri.....	21
3.2.3. Doku örneklerinin elde edilmesi.....	22
3.2.4. DNA izolasyonu.....	23
3.2.4.1. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi.....	24
3.2.4.2. Promega Genomic DNA Purification Kit ile DNA izolasyonu.....	25
3.2.5. DNA'nın spektrofotometrik analizi.....	25
3.2.6. DNA konsantrasyonunun ayarlanması.....	25
3.2.7. Jel elektroforezi.....	25
3.2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	26
3.2.8.1. Primer konsantrasyonunun ayarlanması.....	26
3.2.8.2. Primerin erime sıcaklığının hesaplanması.....	27
3.2.8.3. Primer optimizasyonu.....	27
3.2.9. Dizi analizi.....	28
3.2.9.1. Saflaştırma (Pürifikasyon).....	28
3.2.9.1.1. Kolon yöntemi.....	28
3.2.9.1.2. Plate yöntemi.....	28
3.2.9.2. Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu.....	29
3.2.9.3. Etanol/EDTA/Sodyum Asetat presipitasyonu.....	30
3.2.10. Filogenetik analiz.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. Morfolojik Analiz.....	31
4.2. Moleküler Analiz.....	34
4.2.1. DNA izolasyonu.....	34
4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	35
4.2.3. Dizi analizi.....	36

4.2.4. Filogenetik analiz.....	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	64
EKLER.....	67
EK 1.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Mullus barbatus</i>	3
Şekil 2.2. <i>Mullus barbatus</i>	4
Şekil 2.3. <i>Mullus barbatus ponticus</i>	4
Şekil 2.4. <i>Mullus barbatus ponticus</i>	5
Şekil 2.5. <i>Mullus surmuletus</i>	5
Şekil 2.6. <i>Mullus surmuletus</i>	6
Şekil 2.7. <i>Upeneus moluccensis</i>	6
Şekil 2.8. <i>Upeneus moluccensis</i>	7
Şekil 2.9. <i>Upeneus pori</i>	7
Şekil 2.10. Kemikli balıklarda temel vücut bölümleri.....	8
Şekil 2.11. mtDNA.....	9
Şekil 2.12. Jel elektroforezi.....	10
Şekil 2.13. Agaroz jel.....	11
Şekil 2.14. PCR yöntemi.....	12
Şekil 2.15. Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi.....	13
Şekil 2.16. DNA dizi analizi.....	14
Şekil 2.17. Elektroforegram.....	15
Şekil 2.18. Filogenetik ağaç çizimi.....	16
Şekil 2.19. Vertikal ağaçlar.....	16
Şekil 2.20. Köksüz ağaç.....	17
Şekil 3.1. Örnekleme yapılan istasyonların uydu görüntüsü.....	20
Şekil 3.2. Ölçümü yapılan morfometrik karakterler.....	21
Şekil 3.3. İnsizyon.....	22
Şekil 3.4. Diseksiyon.....	23
Şekil 4.1. İki <i>Mullus barbatus</i> örneğinden elde edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde yapılan elektroforetik analizinin görüntüleri.....	35
Şekil 4.2. <i>Mullus barbatus ponticus</i> örneklerine (214-225) ait dört farklı bölgenin PCR ürünlerinin %2'lik jelde görüntüsü.....	36
Şekil 4.3. Akdeniz <i>Mullus barbatus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	38
Şekil 4.4. Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	38
Şekil 4.5. Akdeniz <i>Upeneus pori</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	38
Şekil 4.6. Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	39
Şekil 4.7. Ege <i>Mullus barbatus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	39
Şekil 4.8. Ege <i>Mullus surmuletus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	39
Şekil 4.9. Marmara <i>Mullus barbatus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	40
Şekil 4.10. Marmara <i>Mullus surmuletus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	40
Şekil 4.11. Karadeniz <i>Mullus barbatus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	40
Şekil 4.12. Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	41
Şekil 4.13. Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i> , CytB bölgesi DNA dizisi.....	41
Şekil 4.14. Akdeniz <i>Mullus barbatus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	41
Şekil 4.15. Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	42
Şekil 4.16. Akdeniz <i>Upeneus pori</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	42
Şekil 4.17. Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	42
Şekil 4.18. Ege <i>Mullus barbatus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	43
Şekil 4.19. Ege <i>Mullus surmuletus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	43
Şekil 4.20. Marmaraz <i>Mullus barbatus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	43
Şekil 4.21. Marmara <i>Mullus surmuletus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	44
Şekil 4.22. Karadenizdeniz <i>Mullus barbatus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	44
Şekil 4.23. Karadenizdeniz <i>Mullus surmuletus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	44
Şekil 4.24. Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i> , 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.....	45
Şekil 4.25. Akdeniz <i>Mullus barbatus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	45
Şekil 4.26. Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	45
Şekil 4.27. Akdeniz <i>Upeneus pori</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	46
Şekil 4.28. Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	46
Şekil 4.29. Ege <i>Mullus barbatus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	46
Şekil 4.30. Ege <i>Mullus surmuletus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	47
Şekil 4.31. Marmara <i>Mullus barbatus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	47
Şekil 4.32. Marmara <i>Mullus surmuletus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	47

Şekil 4.33. Karadeniz <i>Mullus barbatus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	48
Şekil 4.34. Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	48
Şekil 4.35. Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i> , COII bölgesi DNA dizisi.....	48
Şekil 4.36. CytB bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı.....	52
Şekil 4.37. CytB bölgesi için çizilen ME (Minimum Evolution) dendrogramı.....	53
Şekil 4.38. CytB bölgesi için çizilen MP (Maximum Parsimony) dendrogramı.....	53
Şekil 4.39. CytB bölgesi için çizilen UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı.....	53
Şekil 4.40. 12S rRNA bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı.....	54
Şekil 4.41. 12S rRNA bölgesi için çizilen ME (Minimum Evolution) dendrogramı.....	54
Şekil 4.42. 12S rRNA bölgesi için çizilen MP (Maximum Parsimony) dendrogramı.....	54
Şekil 4.43. 12S rRNA bölgesi için çizilen UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı.....	55
Şekil 4.44. CO II bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı.....	55
Şekil 4.45. CO II bölgesi için çizilen ME (Minimum Evolution) dendrogramı.....	55
Şekil 4.46. CO II bölgesi için çizilen MP (Maximum Parsimony) dendrogramı.....	56
Şekil 4.47. CO II bölgesi için çizilen UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı.....	56
Şekil 5.1. <i>Mullus barbatus</i> türlerine ve <i>Mullus barbatus ponticus</i> alt türüne ait morfolojik karakter uzunluklarını gösteren grafik.....	58
Şekil 5.2. <i>Mullus barbatus</i> türlerine ve <i>Mullus barbatus ponticus</i> alt türüne ait Standart Boy/Morfolojik Karakter değerleri.....	59
Şekil 5.3. <i>Mullus surmuletus</i> türlerine ait morfolojik karakter uzunluklarını gösteren grafik.....	59
Şekil 5.4. <i>Mullus surmuletus</i> türlerine ait Standart Boy/Morfolojik Karakter değerleri.....	60
Şekil 5.5. <i>Upeneus moluccensis</i> ve <i>Upeneus pori</i> türlerine ait morfolojik karakter uzunluklarını gösteren grafik.....	60
Şekil 5.6. <i>Upeneus moluccensis</i> ve <i>Upeneus pori</i> türlerine ait Standart Boy/Morfolojik Karakter değerleri.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mullidae ailesinin sınıflandırılması.....	2
Çizelge 2.2. Mullidae ailesine ait türlerin ülkemiz denizlerindeki dağılımı.....	3
Çizelge 2.3. <i>Mullus barbatus ponticus</i> 'u <i>Mullus barbatus</i> 'dan ayıran morfolojik karakterler.....	5
Çizelge 3.1. Türlerin bölgesel dağılımı ve örnek sayısı.....	20
Çizelge 3.2. Primerler.....	26
Çizelge 3.3. Reaksiyon protokolü.....	27
Çizelge 3.4. DTCS karışımı.....	29
Çizelge 3.5. Optimizasyon için hazırlanan protokoller.....	29
Çizelge 4.1. Morfolojik karakterlerin numaralandırması.....	31
Çizelge 4.2. Akdeniz, Ege Denizi, Karadeniz ve Marmara Denizi'nden elde edilen <i>Mullus barbatus</i> ve <i>Mullus barbatus ponticus</i> türlerinin ölçülen morfolojik karakterlerinin ortalama değerleri (cm)	31
Çizelge 4.3. Akdeniz, Ege Denizi, Karadeniz ve Marmara Denizi'nden elde edilen <i>Mullus surmuletus</i> türlerinin ölçülen morfolojik karakterlerinin ortalama değerleri (cm).....	32
Çizelge 4.4. Akdeniz'den elde edilen <i>Upeneus moluccensis</i> ve <i>Upeneus pori</i> türlerinin ölçülen morfolojik karakterlerinin ortalama değerleri (cm).....	32
Çizelge 4.5. <i>Mullus barbatus</i> türlerinde ve <i>Mullus barbatus ponticus</i> alt türünde, "Standart Boy" un diğer morfolojik karakterlere oranı.....	33
Çizelge 4.6. <i>Mullus surmuletus</i> türlerinde, "Standart Boy" un diğer morfolojik karakterlere oranı.....	33
Çizelge 4.7. <i>Upeneus moluccensis</i> ve <i>Upeneus pori</i> türlerinde, "Standart Boy" un diğer morfolojik karakterlere oranı.....	34
Çizelge 4.8. DNA izolasyonu yapılamayan örnekler.....	35
Çizelge 4.9. Primer çiftlerinin optimum erime sıcaklıkları ve MgCl ₂ konsantrasyonlar.....	35
Çizelge 4.10. PCR sonrası sonuç alınamayan örnekler.....	36
Çizelge 4.11. Dizi analizinde kullanılmak üzere seçilen örnekler.....	37
Çizelge 4.12. Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu için uygulanan protokol.....	37
Çizelge 4.13. Korunmuş bölgeler.....	49
Çizelge 4.14. Örneklerin CytB bölgelerinin nükleotit kompozisyonu (%).....	49
Çizelge 4.15. Örneklerin 12S rRNA bölgelerinin nükleotit kompozisyonu (%).....	50
Çizelge 4.16. Örneklerin COII bölgelerinin nükleotit kompozisyonu (%).....	50
Çizelge 4.17. CytB bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).....	51
Çizelge 4.18. 12S rRNA bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).....	51
Çizelge 4.19. CO II bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).....	52

SİMGELER DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
tRNA	Transfer RNA
Log	Logaritma
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
Kb	Kilobaz
Bç	Baz çifti
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
pM	Pikomol
U	Ünite
OD	Optic density; Optik yoğunluk
UV	Ultraviyole
A	Adenin
C	Cytosin; Sitozin
G	Guanin
T	Timin
Ort	Ortalama

1.GİRİŞ

Mısır'da Nil Nehri üzerine kurulan Asuan Barajı ve farklı ekolojik özelliklere sahip Kızıldeniz ile Akdeniz'in 1869 yılında Süveyş Kanalı ile birleştirilmesi, Akdeniz'de büyük bir biyo-ekolojik değişimin başlamasına neden olmuştur. Bunun sonucunda ekolojik uyumu yüksek birçok canlı grubu Akdeniz'e göç etmiştir (Ben-Tuvia 1978). Süveyş Kanalı'nın açılması üçyüzden (bunların yaklaşık 50'si balık olmak üzere) fazla türün Kızıldeniz'den Akdeniz'e göç etmesine neden olmuştur (Por 1978, Boudouresque 1999, Galil 2000). Bu göçle ilgili olarak ilk kez Por, "Leşepsiyen Göç" terimini kullanmıştır. Kızıldeniz'den Akdeniz'e göç ederek kendilerine uygun biyotoplar bulan, zamanla çoğalıp popülasyonlar oluşturan ve içinde bazı omurgasızların da bulunduğu bu göçmen türlere Süveyş Kanalı'nın mimarı olan Fransız diplomat ve inşaat mühendisi "Ferdinand de Lesseps" anısına "Leşepsiyen Göçmenler" adı verilmiştir (Mater vd 1995).

Bu göçmen canlılar arasında Mullidae (Actinopterygii, Perciformes) ailesine ait türler ekonomik olarak büyük önem taşır. Mullidae ailesi, içerisinde 15 farklı cins barındırır ve bunlardan sadece üç cinse (*Mullus*, *Upeneus* ve *Pseudupeneus*) ait tür Akdeniz ihtiyofaunasında bulunur (Whitehead vd 1986). Türkiye ihtiyofaunasında ise bu sayı ikiye (*Mullus* ve *Upeneus*) inmektedir.

Ülkemizde Mullidae ailesinin de içinde bulunduğu demersal balıklar ve bunların avcılığı önemlidir. Demersal balıklardan olan barbun (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758), tekir (*Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758), paşa barbunu (*Upeneus moluccensis* (Bleeker, 1855)) ve nil barbunu (*Upeneus pori* (Ben-Tuvia & Golani, 1989)) ekonomik açıdan oldukça değerli balıklardır. 2000 yılı verilerine göre yılda 2450 ton barbun, 2300 ton da tekir avlanırken bu miktarlar 2004 verilerinde 1848 ton barbun ve 961 ton tekir olarak kayıtlara geçmiştir (Anonim 2004). Yüksek ekonomik değerleri nedeniyle Mullidae ailesine ait türler üzerindeki av baskısı artmaktadır ve bu nedenle ülkemizdeki popülasyonlar olumsuz yönde etkilenmektedir. Av araçları ve teknolojilerinin de gelişmesi ile bu olumsuzluğu desteklemektedir.

Ekolojik ve ekonomik olarak büyük öneme sahip bu türlerin biyolojileri ve ekolojileri ile ilgili birçok araştırma (Labropoulou ve Eleftheriou 1997, Platell 1998, Martin 1999, Mazzola vd 1999, Çelik ve Torcu 2000, Levi ve Francour 2004, Özbilgin vd 2004, Metin 2005, İşmen 2006) yapılmasına rağmen bu türlerin genetik yapıları ile ilgili yapılan çalışmalar çok kısıtlıdır. Özellikle ülkemizde bulunan Mullidae ailesine ait türlerin genetik yapıları, birbirleri ile ve İndo-Pasifik türlerle olan genetik yakınlıkları ve bu türlerle ilişkileri sonrası oluşan genetik farklılıklar hakkında bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada; Türkiye ihtiyofaunasında bulunan *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus moluccensis* ve *Upeneus pori* türleri ile sadece Karadeniz'de bulunan *Mullus barbatus ponticus* alt türüne ait örneklerin morfolojik ve moleküler düzeyde ayrılmasıyla bu türlerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Akdeniz, Ege Denizi, Marmara Denizi ve Karadeniz'in çeşitli noktalarından toplamda 242 adet örnek toplanmış, örneklerin morfolojik ayırımıda sıkça kullanılan karakterleri incelenmiş ve tür ayırımı anahtarları yardımıyla morfolojik ayırımı yapılmıştır. Moleküler incelemelerde ise örneklerin mitokondriyal DNA'larından filogenetik çalışmalarda anlam ifade eden bölgeleri (16S rRNA, 12S rRNA, Sitokrom B (Cytochrome B; CytB), Sitokrom Oksidaz II (Cytochrome Oxydase II; COII) polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile çoğaltılıp, incelenen türler arasındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya çıkarılması amacı ile dizi analizi uygulanmıştır.

Bu çalışmanın bir amacı da Karadeniz'de bulunan *Mullus barbatus ponticus* alt türünün Akdeniz, Ege Denizi, Karadeniz ve Marmara Denizi'nden elde edilen *Mullus barbatus* örnekleri ile olan moleküler yakınlığının ortaya çıkarılmasıdır. Bu alt türe ilişkin daha önce yapılmış herhangi bir moleküler çalışma bulunmamaktadır. Sadece morfolojik karakterlerden yola çıkılarak alt tür olduğuna karar verilen *Mullus barbatus ponticus*'un filogenideki yeri, bu çalışma ile moleküler olarak da incelenmiştir. Mullidae ailesi ile ilgili benzer çalışmalar farklı araştırmacılar tarafından yapılmış olsa da, Türkiye ihtiyofaunasında bulunan tüm Mullidae ailesine ait türlerin moleküler olarak incelendiği kapsamlı bir çalışma daha önce yapılmamıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Mullidae (Barbungiller)

Mullidae ailesinin üyelerinin boyları 15-40 cm arasında değişir. 10 yıl kadar yaşayabilir ve 1 veya 2. yaşlarından itibaren cinsi olgunluğa erişirler (Can ve Bilecenoğlu 2005). Su sıcaklığının 14°C'ye yükselmesi ile derinlerden sahillere sürüler halinde göçerler. Mayıs ayından Temmuz ayına kadar sığ sulara yumurtalarını bırakırlar. Yumurtaları 0.8 mm çapında ve pelajiktir (Atay ve Bekcan 2000).

Erginleri su sıcaklığı 24°C'yi bulunca, yavrular ise sonbaharda derinlere göçerler. Kışı 100-300 m derinlikte geçirirler. Larvalar planktonla, erginler dipte küçük omurgasız hayvanlar ve balıkların yavruları ile beslenirler. Renkleri, sırtta hafifçe esmer kırmızı, yanları erguvan kırmızısı veya sarımsı pembe, karın genellikle açık renklidir (Atay ve Bekcan 2000).

Fanyalı ağlar ve trol ağlarıyla avlanırlar. Ayrıca sepet, paraketa ve olta ile de yakalanırlar. Sularımızda dört önemli türü (barbun, tekir, paşa barbunu, nil barbunu) bulunur (Atay ve Bekcan 2000).

Çizelge 2.1. Mullidae ailesinin sınıflandırılması (Myers vd 2006).

Alem	Animalia Eumetazoa Bilateria Deuterostomia
Şube	Chordata Craniata
Alt Şube	Vertebrata
Üst Sınıf	Gnathostomata Euteleostomi
Sınıf	Actinopterygii
Alt Sınıf	Neopterygii Teleostei
Üst Takım	Acanthopterygii
Takım	Perciformes
Alt Takım	Percoidei
Aile	Mullidae

2.1.1. Mullidae ailesine ait türlerin dünyadaki dağılımı

Mullidae ailesi, içerisinde hem Atlanto-Mediteran hem de İndo-Pasifik zoocoğrafik kökene ait türler bulundurmaktadır. Çok geniş bir dağılıma sahip olan Mullidae ailesine ait türler, Doğu Atlantik'te, Avrupa ve Afrika kıyıları boyunca, İngiltere adalarından Kanarya Adaları'na kadar ve tüm Akdeniz'de (Whitehead vd 1986); 100–300 m derinliklere kadar uzanabilen sahil bölgesinin, dipleri kumlu-çamurlu ya da tamamen çamurlu kesimlerinde dağılım gösterir (Akşiray 1987).

2.1.2. Mullidae ailesine ait türlerin Türkiye’deki dağılımı

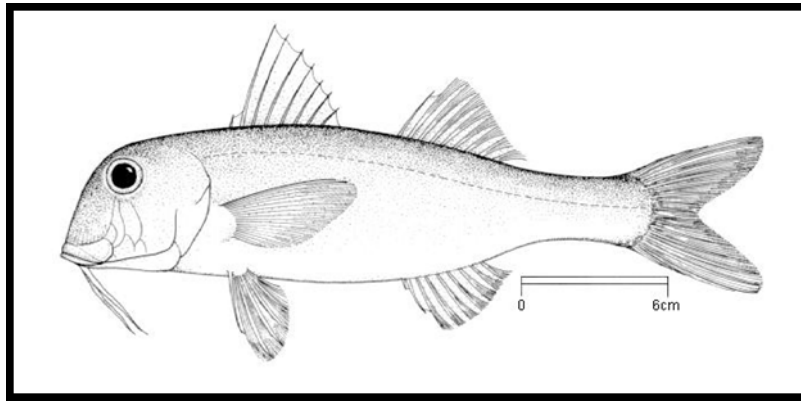
Mullidae’ye ait türler sularımızda en fazla Akdeniz, Ege Denizi’nin Anadolu sahillerinde, Marmara Denizi kıyılarında ve az miktarda da Karadeniz’de bulunur (Atay ve Bekcan 2000, Can ve Bilecenoğlu 2005). Mullidae ailesine ait türlerin ülkemiz denizlerindeki dağılımı Çizelge 2.2.’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Mullidae ailesine ait türlerin ülkemiz denizlerindeki dağılımı (Bilecenoğlu vd 2002).

	Akdeniz	Ege	Marmara	Karadeniz
<i>Mullus barbatus</i> (barbun)	+	+	+	+
<i>Mullus surmuletus</i> (tekir)	+	+	+	+
<i>Mullus barbatus ponticus</i> (Karadeniz barbunu)	-	-	-	+
<i>Upeneus moluccensis</i> (paşa barbunu)	+	+	-	-
<i>Upeneus pori</i> (nil barbunu)	+	-	-	-

2.1.3. Barbun: *Mullus barbatus* Linnaeus, 1758

Zoocoğrafik köken olarak Atlanto–Mediterran bir türdür. Demersal bir tür olan *Mullus barbatus*’un yaşam ortamını 2-200 m derinliklerde, kumlu ve çamurlu zeminler oluşturur. 200 m’nin altındaki derinliklerde nadiren rastlanır (Whitehead vd 1986, Fischer vd 1987, Mater vd 2003). Türkiye’de Karadeniz, Marmara Denizi, Ege Denizi ve Akdeniz’de yaygın olarak bulunur (Bilecenoğlu vd 2002).



Şekil 2.1. *Mullus barbatus* (Bauchot 1987).

Boyu en çok 30 cm olmakla beraber, 10-20 cm boydaki bireyler yaygındır (Whitehead vd 1986, Fischer vd 1987, Mater vd 2003). Birinci sırt yüzgecinde 7–8 diken ışın, ikinci sırt yüzgecinde 1 diken, 7–8 yumuşak ışın bulunur. Yanal çizgide 31–35 adet büyük pul vardır. Baş profili diktir. Çene altında göğüs yüzgecinden daha kısa olan bir çift barbel (bıyık) vardır. Alt çenede çok küçük kadifemsi dişler mevcut iken üst çene dişsizdir. Vücudu sırtta kırmızı veya kahverengi tonlardadır; yanlarda kırmızı lekelere rastlanır; karın kısmı beyaz renktedir (Can ve Bilecenoğlu 2005).

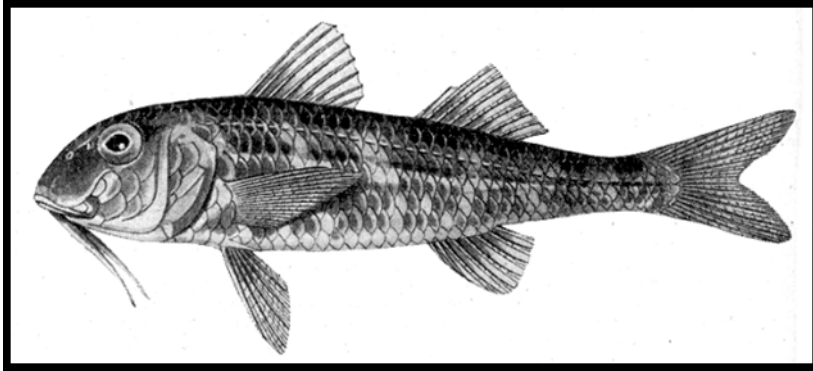
Karadeniz’de Haziran–Ağustos ayları, Marmara Denizi’nde ve Ege Denizi’nde Nisan – Eylül ayları, Akdeniz’de Mayıs–Eylül ayları arasında ürerler, ancak en yüksek yumurtlama Haziran–Temmuz aylarında gerçekleşir. İlk eşeyssel olgunluğa yaklaşık 14 cm boy ve 1. yaşta erişir. Larva döneminden 3–4 cm boya ulaşmaya kadar su kütlesi içinde yaşarlar (pelajik), sonra dip bölgelere inerler (Whitehead vd 1986, Fischer vd 1987, Akyol vd 2000, Mater ve Çoker 2002) .



Şekil 2.2 *Mullus barbatus* (Anonim 2006a).

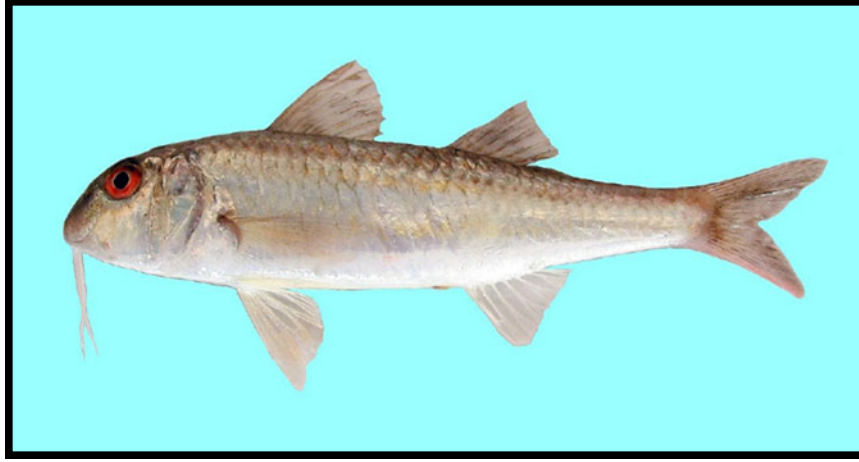
Ekonomik değeri çok yüksektir. Ailenin diğer türleri olan *Mullus surmuletus* ve *Upeneus moluccensis* ile birlikte yılda 4750 ton avlanmaktadır (Anonim 2000). Avcılığı dip, trol ve uzatma ağlarıyla yapılır.

2.1.4. Karadeniz barbunu: *Mullus barbatus ponticus* (Essipov, 1927)



Şekil 2.3. *Mullus barbatus ponticus* (Svetovidov 1964).

Karadeniz’de bulunan *Mullus barbatus ponticus*, alt türü olduğu *Mullus barbatus*’tan gözetimindeki pul sayısı, alt çene uzunluğu ve renk farklılığı gibi morfolojik karakterlerin farklılığı ile ayrılmaktadır. Bu karakterler Çizelge 2.3.’de gösterilmiştir.



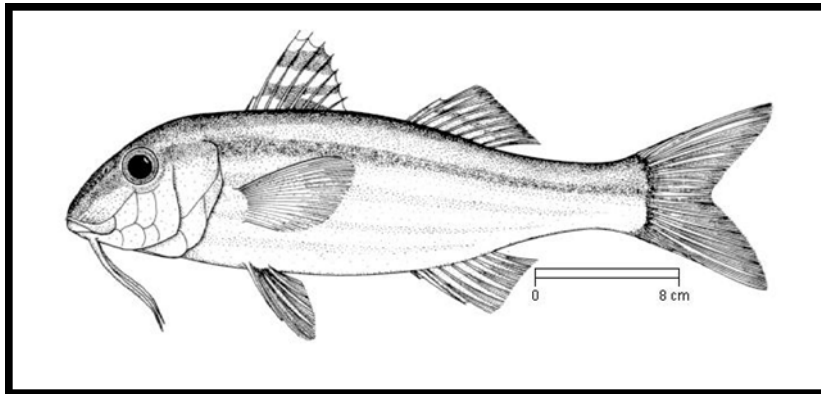
Şekil 2.4. *Mullus barbatus ponticus* (Anonim 2006b).

Çizelge 2.3. *Mullus barbatus ponticus*'u *Mullus barbatus*'dan ayıran morfolojik karakterler (Hureau 1986).

	<i>Mullus barbatus</i>	<i>Mullus barbatus ponticus</i>
Renk	Kırmızı-Kahverengi	Gümüşü, sırt bölgesinde koyu renklenme var
Alt Çene	Gözün ön kısmı hizasına ulaşır	Gözün ön kısmı hizasına ulaşmaz
Gözaltı pul sayısı	3	4

2.1.5. Tekir: *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758

Zoocoğrafik köken olarak Atlanto-Mediteran bir türdür. Demersal bir tür olan *Mullus surmuletus*' un yaşam ortamı 5-100 m derinliklere kadar olan kumlu, çamurlu ve kayalık zeminlerdir (Whitehead vd 1986, Fischer vd 1987, Mater vd 2003). Türkiye'de Karadeniz, Marmara Denizi, Ege Denizi ve Akdeniz' de yayılım gösterir (Bilecenoğlu vd 2002).



Şekil 2.5. *Mullus surmuletus* (Bouchot 1987).

Boyları en çok 40 cm olmakla beraber genellikle 25 cm'yi geçmez (Whitehead vd 1986, Fischer vd 1987, Mater vd 2003). Birinci sırt yüzgecinde 7–8 diken ışın, ikinci sırt yüzgecinde 1 diken ve 7–8 yumuşak ışın bulunur. Birinci sırt yüzgecindeki sarı leke ve baş profilinin eğimli olmasıyla *Mullus barbatus* türünden kolayca ayırt edilebilir. Çenesinin altında bir çift barbeli olup, uzunluğu göğüs yüzgeci uzunluğundan fazladır. Alt çenesinde çok küçük, kadifemsi dişler mevcuttur, ancak üst çenesi dişsizdir. Yanal çizgide 33-37 adet pul vardır. Vücudu sırtta kahverengi veya kırmızı, karında ise beyaz renktedir. Gözünün arkasından başlayıp kuyruğa kadar uzanan kırmızımsı bir şerit mevcuttur. Ayrıca yanlarda 2–3 adet sarı şeride rastlanır. Kuyruk yüzgeci genellikle sarımsı tondadır (Can ve Bilecenoğlu 2005).

Ege Denizi'nde Mart–Haziran, Akdeniz'de Mayıs–Ağustos ayları arasında ürerler. Yumurta ve larvaları pelajiktir. İlk eşeyssel olgunluk boyu 14 cm'dir (Whitehead vd 1986, Fischer vd 1987, Mater vd 2003).

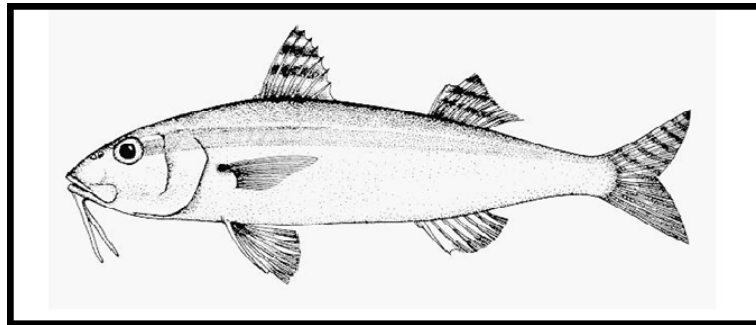


Şekil 2.6. *Mullus surmuletus* (Anonim 2006c).

Ekonomik değeri çok yüksektir. Avcılığı dip trolü ve uzatma ağlarının yanı sıra oltayla ve zıpkınla da yapılır.

2.1.6. Paşa barbunu: *Upeneus moluccensis* (Bleeker, 1855)

Zoocoğrafik köken olarak İndo-Pasifik bir türdür (Can ve Bilecenoğlu 2005). Demersal bir tür olan *Upeneus moluccensis*'in yaşam ortamı derinliği 100 m'yi geçmeyen kumlu ve çamurlu ortamlardır (Atay ve Bekcan 2000). Türkiye'de Akdeniz ve Ege Denizi'nde yayılım gösterir (Bilecenoğlu 2002).



Şekil 2.7. *Upeneus moluccensis* (De Bruin vd 1995).

Boyu en fazla 24 cm uzunluğa erişebilir ve genellikle 10-15 cm uzunlukta olur. Alt çenenin altında bir çift uzun bıyık bulunur. Burun oldukça az derin ve yuvarlaktır. Vücudu gümüşümsü renkli ve gözden itibaren kuyruk yüzgecine kadar belirgin sarı bantlıdır. Vücudu uzun, yanlardan hafif basık, sırt yüzgeçleri birbirinden ayrılmış, birinci sırt yüzgeci ilki çok küçük 8 dikenli, ikinci sırt yüzgeci bir diken ve 8 ışıklıdır (Atay ve Bekcan 2000).



Şekil 2.8. Upeneus moluccensis (Randall 1997).

Üreme dönemi Mayıs ile Temmuz ayları arasındadır. Ekonomik değeri yüksek olan bu türün avcılığında trol, manyat, uzatma ağları ve voli ağları kullanılmaktadır.

2.1.7. Nil barbunu: *Upeneus pori* (Ben-Tuvia & Golani, 1989)

Zoocoğrafik köken olarak İndo-Pasifik bir türdür. Demersal bir tür olan *Upeneus pori*'nin yaşam ortamı derinliği 50 m'yi geçmeyen kumlu ve çamurlu ortamlardır. Türkiye'de sadece Akdeniz de yayılım gösterir (Can ve Bilecenoğlu 2005).

Boyu en fazla 17 cm uzunluğa erişebilir ve genellikle 5-14 cm uzunlukta olur. Vücut uzamış, önden silindirik görünümde ve orta noktaya doğru basıktır. Birbirinden çok net ayrılmış 2 sırt yüzgecine sahiptir. Birinci diken en uzunudur. İkinci sırt yüzgeci anal yüzgecin karşısında bulunur. Kuyruk yüzgeci derinlemesine ve çatalımsı görünümündedir. Çenesinde bir çift barbel bulunur. Sırt yüzgeçleri arasında dört sıra pul bulunur. Renk geride ve yanlarda alacalı, kahverengi-kırmızımsı, karın beyazımsıdır. Kuyruk yüzgecinin üst lobunda 3-7 adet beyaz aralıklı, kırmızımsı-kahverengi şerit, alt lobunda aynı renklerde 4-5 şerit bulunur (Hureau 1986).



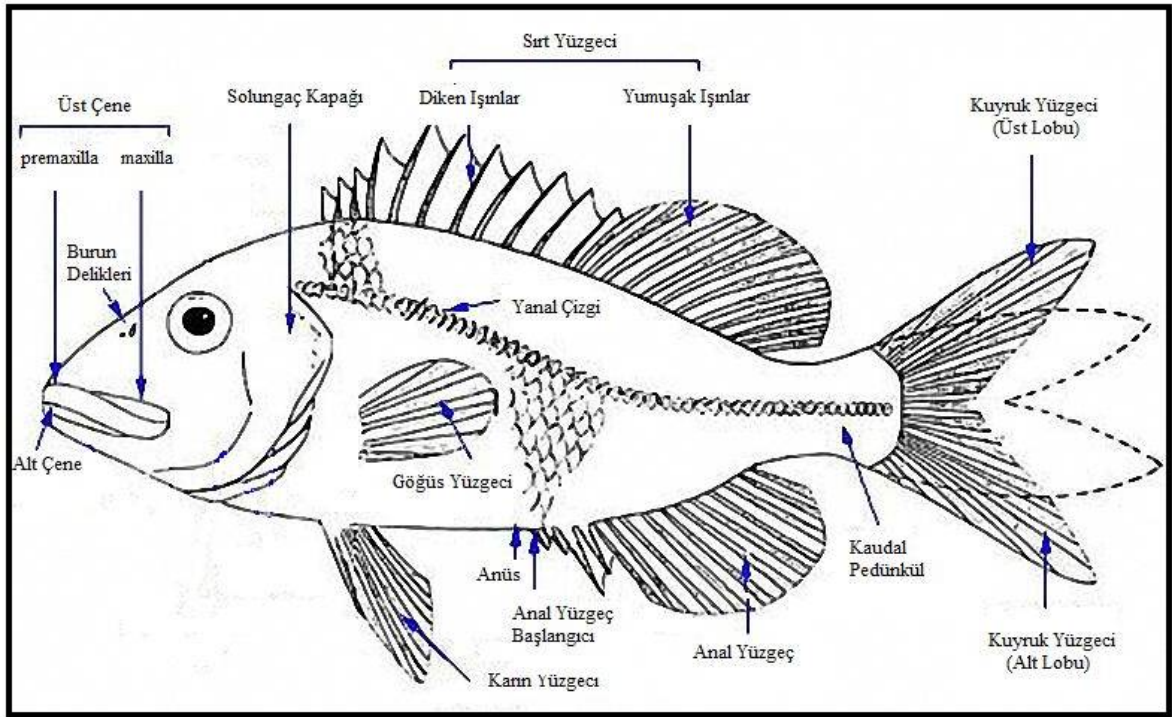
Şekil 2.9. Upeneus pori (Randall 1997).

2.2. Taksonomi

Taksonomi, canlıların benzerlik, akrabalık ya da köken ilişkisiyle sınıflandırılması olarak tanımlanır. Bugüne kadar taksonomide kullanılan morfolojik karakterlere dayalı taksonominin yanı sıra, moleküler genetiğin gelişmesiyle canlıların genetik yapılarından yola çıkılarak yapılan taksonomi çalışmalarıyla da evrimsel sürece dair çok önemli bilgiler elde edilmektedir (Qi vd 2007).

2.2.1. Morfolojik taksonomi

Morfolojik taksonomi çalışmalarının iki önemli aşaması bulunur. Bunlardan birincisi teşhistir. Teşhis yapılırken örnekler daha önceden taksonomide yerleri belirlenmiş bireylerle karşılaştırılır ve taksonomik açıdan anlam taşıyan karakterleri açısından değerlendirilir. Bu karakterler bir taksona ait bireyleri diğer bir taksona ait bireylerden kesin olarak ayırt edebilen karakterlerdir.



Şekil 2.10. Kemikli balıklarda temel vücut bölümleri.

İkinci aşama ise sınıflandırmadır. Sınıflandırmada tür, cins, aile gibi taksonomik gruplar çeşitli özellikleri bakımından birbirleriyle karşılaştırılarak düzenlenir. Sınıflandırma yapılırken taksonların birbirleri ile akrabalıkları önem taşır.

2.2.2. Moleküler taksonomi

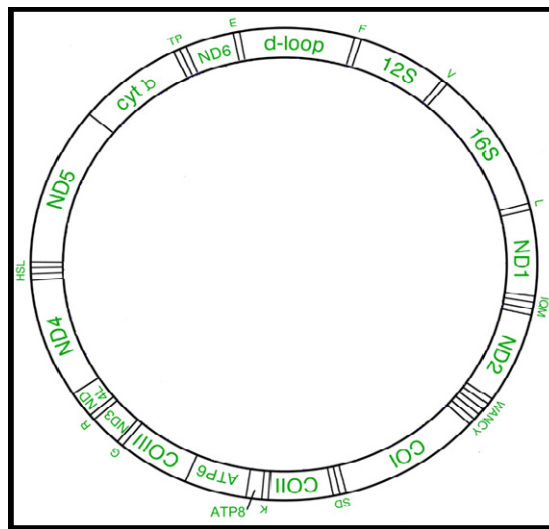
Balıklarda yürütülen sistematik çalışmalar, diğer birçok canlı türünde de olduğu gibi klasik olarak morfolojik karakterlerden yola çıkılarak yapılmaktadır. Bugüne kadar oluşturulan taksonomik sınıflandırmalarda genellikle morfolojik karakterlerden yararlanılmıştır. Moleküler genetik alanındaki gelişmeler sonrasında genetikçiler ve taksonomistler, türleri tanımlamada, her bir türün sahip olduğu farklı genetik yapıdan yararlanma yolunu seçmişlerdir.

Canlıların taksonomik yerlerinin kesin olarak belirlenebilmesi için kimi zaman değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmamaktadır. Ayrıca canlıların yaşadıkları farklı habitatlar da morfolojik ve anatomik yapılarında farklı değişimler meydana gelmesine neden olacağından, aynı türlere ait bireyler morfolojik ve anatomik olarak birbirinden farklılıklar gösterebilirler. Taksonomik çalışmalarda bizi genetik yapıdan faydalanmaya iten en önemli neden de genotipin fenotipten daha üstün, kararlı bir yapıya sahip olmasıdır. Bir karakteri birden fazla lokusun belirlemesi, bir genin birden fazla karakteri etkilemesi ve genotip-çevre etkileşimi gibi ilişkiler morfoloji yoluyla elde edilen bilgilerin tek başına yeterli olmasını engellemektedir (Klug ve Cummings 2000). Bu sebeple günümüzde taksonomi ve filogeni çalışmalarında DNA'yı, özellikle de mitokondriyal DNA'yı hedef alan moleküler teknikler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

2.3. Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Günümüzde, mitokondriyal DNA'nın moleküler temeli ve genlerinin fonksiyonları ile ilgili çok fazla bilgi bulunmaktadır. Pek çok ökaryotta mtDNA çift zincirli kapalı halkasal yapıdadır, yarı saklı (semikonservatif) olarak kendini eşler ve ökaryotların bir özelliği olan kromozomal proteinlere bağlı değildir. Büyüklüğü bakımından mtDNA organizmadan organizmaya farklılık gösterir. İnsan da dahil pek çok hayvanda mtDNA, 16.000 ila 18.000 bç (16-18 kb) büyüklüğündedir. Omurgalılarda organel başına 5 ila 10 mtDNA molekülü bulunurken, bitkilerde ise bu sayı organel başına 20-40 kopyaya kadar çıkabilir (Klug ve Cummings 2000).

Birkaç istisna dışında gen tekrarı hiç yoktur ya da çok azdır ve replikasyonu çekirdek DNA'sından sentezlenen enzimlere bağlıdır. Mitokondriyal genler, ribozomal RNA'ları, 20'den fazla tRNA'yı ve organelin hücre solunum görevini yapabilmesi için gerekli pek çok proteini kodlamaktadır (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.11. mtDNA (Sorenson 2003).

Çekirdekdeki DNA ile mtDNA'nın farklı evrimsel kökenlerden geldikleri ve mtDNA'nın bakterilerde bulunan halkasal genomlardan türediği düşünülmektedir. Bu özelliği ile prokaryot hücreden ökaryot hücreye geçiş konusuna ışık tutar. Ayrıca evrimsel süreçle ilgili birçok çalışmaya da dayanak olmuştur. Eşeyli üreyen ökaryotlarda döllenme esnasında sadece yumurta hücresindeki mitokondriyer zigot içerisinde kalır. Spermatozoidin çoğunlukla tek olan mitokondrisi ise döllenme gerçekleştiğinde spermle birlikte ölür. Böylece normal diploid hücre DNA'sı hem anne hem de babadan gelen genlerle oluşurken, mitokondriyal DNA sadece anneden alınmış olur (Meusel vd 1993).

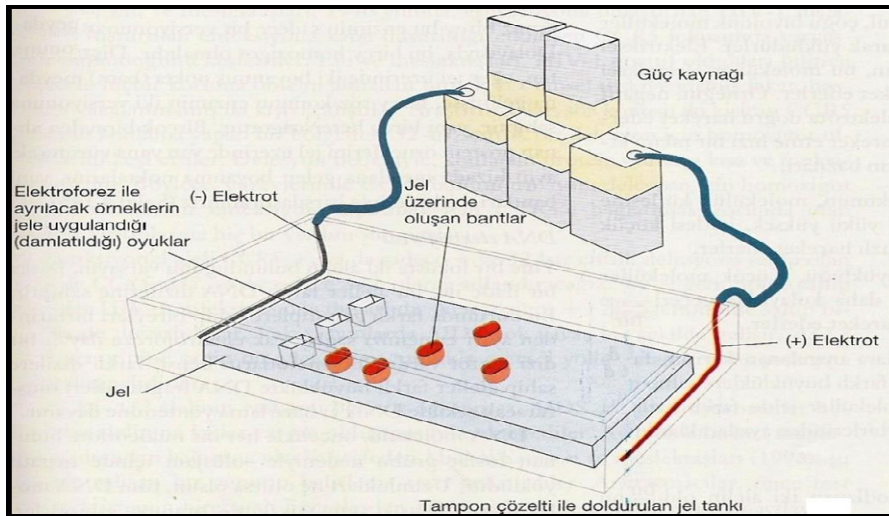
Mitokondriyal DNA'nın taksonomik çalışmalarda önemli olan özellikleri şöyle özetlenebilir:

1. Sadece anneden gelen halkasal kod dizisine sahiptir.
2. Kod dizisi hücre DNA'sından çok daha kısa.
3. Sadece mutasyonlarla değişim göstermiş.
4. Mayoz bölünme geçirmemiş.
5. Mutasyonlar takip edilerek filogenetik soy ağacı oluşturmaya imkan tanır.

Bu bilgiler ışığında, incelediğimiz türlerin mtDNA'sında bulunan, yüksek evrimsel stabiliteye sahip ve filogenetik çalışmalarda sıkça kullanılan genlerin, moleküler teknikler ile izolasyonu, bunların jel elektroforezinde görüntülenmesi, polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılıp, dizi analizlerinin yapılması ile elde edilecek verilerden yola çıkarak yapılacak bir filogenetik analiz ile daha doğru bir taksonomik inceleme yapmak mümkün olacaktır.

2.4. Jel Elektroforezi

Elektroforez, yüklü moleküllerin, bir elektriksel alan uygulandığında, sıvı içeren bir ortamda hareket hızlarının ölçüldüğü bir yöntemdir (Klug ve Cummings 2000). Temel bir elektroforez seti Şekil 2.12.'de görüldüğü gibidir. Jelin kendisi nişasta, agar veya poliakrilamid gibi bileşenlerin birinden yapılmış olan jelatin benzeri gözenekli bir levhadır. Jelin bir ucunda bazen de ortasında, örneklerin jele uygulandığı kuyular bulunur. Ayrıştırılacak molekül karışımı içeren solüsyon pipet aracılığıyla bu kuyulara doldurulur. Daha sonra, ıslak kalmasını ve elektrik akımını iletmesini sağlamak için jel, bir tampon çözelti içerisinde yerleştirilir. Elektrotlara bağlanmış olan bir güç kaynağı jel ortamında bir elektriksel alanın oluşmasını sağlar (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.12. Jel elektroforezi (Freeman ve Herron 1999).

Proteinler ve DNA dahil, çoğu biyolojik molekül çözeltilerde elektriksel olarak yüklüdür. Elektriksel olarak yüklü olduklarından, bu moleküller elektriksel alanın etkisi ile jelde hareket ederler. Örneğin, negatif yüklü moleküller pozitif elektrota doğru hareket ederler. Bir molekülün jelde hareket etme hızı bir takım etkenlerle belirlenir. Bunların bazıları;

1. Molekülün elektrik yükünün, molekülün kütlesine olan oranı. Elektriksel yükü yüksek, kütlesi küçük olan moleküller daha hızlı hareket ederler.
2. Molekülün fiziksel büyüklüğü – Küçük moleküller jeldeki gözeneklerden daha kolaylıkla geçerler ve dolayısıyla daha hızlı hareket ederler.

Eğer jel üzerindeki kuyulara uygulanan karışım farklı yük-kütle oranları ve/veya farklı büyüklüklere sahip moleküller içeriyorsa, bu moleküller jelde farklı hızlarda hareket edeceklerinden birbirlerinden ayrılacaklardır (Freeman ve Herron 1999).

2.4.1. DNA elektroforezi

DNA molekülü, öncelikle her bir nükleotidte bulunan fosfat grubu nedeniyle solüsyon içinde negatif yüklüdür. Uzunlukları ne olursa olsun, tüm DNA molekülleri yaklaşık aynı yük/kütle oranına sahiptirler. Ancak, küçük DNA molekülleri elektroforez jelinde daha hızlı hareket ederler. Eğer bir jel üzerinde değişik uzunluğa sahip DNA fragmentleri içeren bir karışım yürütülürse, bu DNA fragmentleri büyüklüklerine göre birbirinden ayrılır. Eğer jel üzerindeki bantları boyar veya flüoresans hale getirerek görünür kılırsak, bu bantları fragment büyüklüğüne göre ayırt edebiliriz (Şekil 2.13.) (Freeman ve Herron 1999).



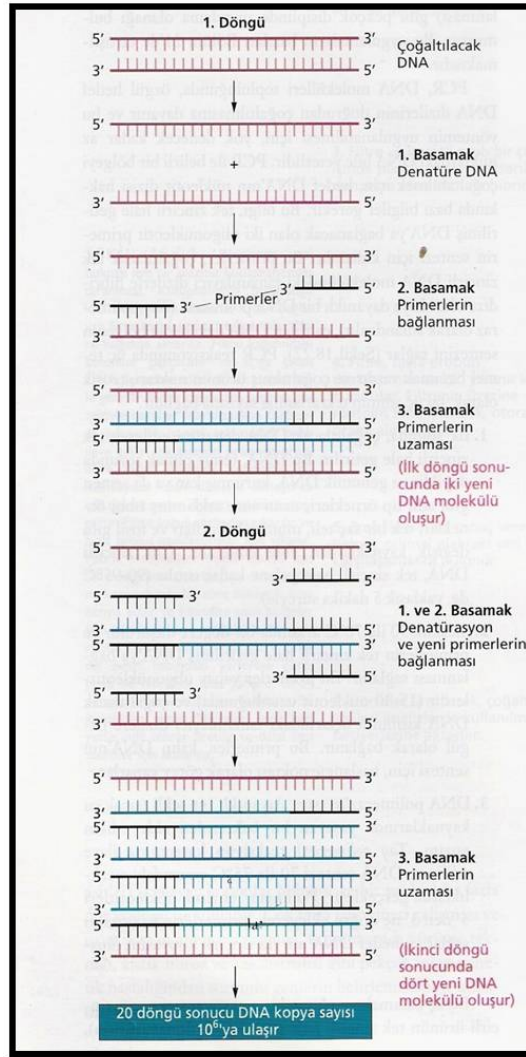
Şekil 2.13. Agaroz jel. Etidyum bromür ile boyanmış ve ultraviyole ışığı altında görüntülenmiş DNA parçalarının birbirlerinden ayrımını gösteren agaroz jel (Freeman ve Herron 1999).

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR)

1986 yılında geliştirilen PCR, moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim ve adli vakalar gibi pek çok disiplinde uygulama olanağı bulmuştur (Klug ve Cummings 2000).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için, nanogram düzeyindeki miktarlarda DNA bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotit primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz (Taq polimeraz olarak adlandırılır), çalışan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar (Şekil 2.14.). PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır:

1. İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA, temiz olmak zorunda değildir ve genomik DNA değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95°C'de, yaklaşık 5 dakika süreyle).
2. Sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir (15-30 nükleotit uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.
3. DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilen enzim, Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug ve Cummings 2000).



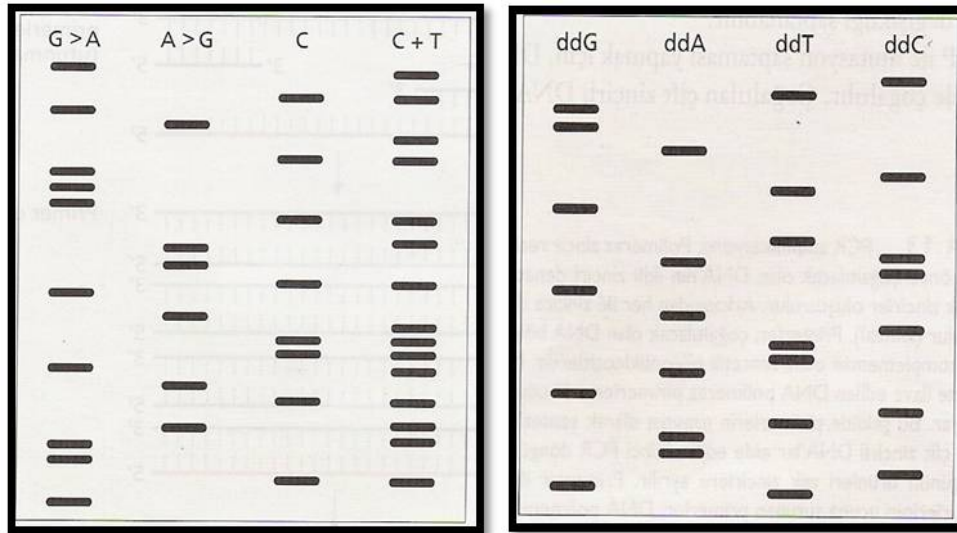
Şekil 2.14. PCR yöntemi. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR), çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir; her bir zincir daha sonra küçük tamamlayıcı primerler ile birleşir. Primerler, çoğaltılacak DNA parçasının uç bölgelerine komplementer olan sentetik oligonükleotitlerdir. Tek zincirli DNA'yı kalıp olarak kullanan DNA polimeraz enzimi, primerin 3' ucundan itibaren nükleotitleri ilave ederek primeri uzatır. Sonuçta, primerin içinde bulunduğu yeni zincirin sentezlenmesi ile çift zincirli DNA molekülü oluşur. İkinci PCR döngüsünde ilk döngüde oluşan ürünler denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir, primerler ilave edilir ve DNA polimeraz primerleri uzatır. Tekrarlanan döngüler sonucu orijinal DNA dizisi 1,000,000 katdan daha fazla çoğalmış olur.

Bu üç basamaktan oluşan bir reaksiyon seti; çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denaturation), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension), bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. Yirmibeş-otuz döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1.000.000 kez artma olur. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir (Klug ve Cummings 2000).

2.6. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. 1940'larda DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemleri bulunmasına karşın DNA'daki nükleotit dizilerinin doğrudan kimyasal analizi 1960'larda geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır (Klug ve Cummings 2000).

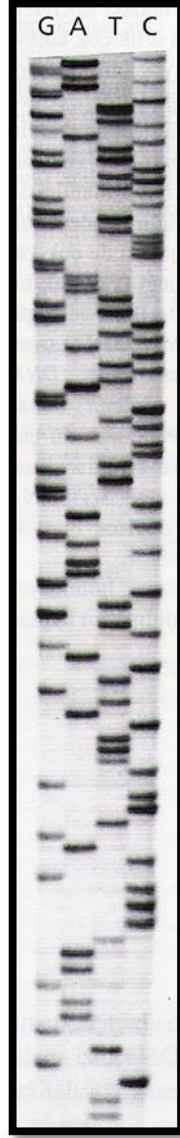
1970'lerde daha etkin ve doğrudan nükleotit dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmanları elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin geliştirilmesine paralel olarak dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır (her baz için bir tane). Bu dört reaksiyonun ürünleri, bir nükleotit uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır. Jel hattındaki her bir bant belirli bir baza karşılık gelmektedir ve jeldeki bantlardan DNA parçasının dizisi okunabilmektedir (Şekil 2.15.) (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.15. Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi. Sırasıyla Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi ile elde edilen nükleotit dizileri (Klug ve Cummings 2000).

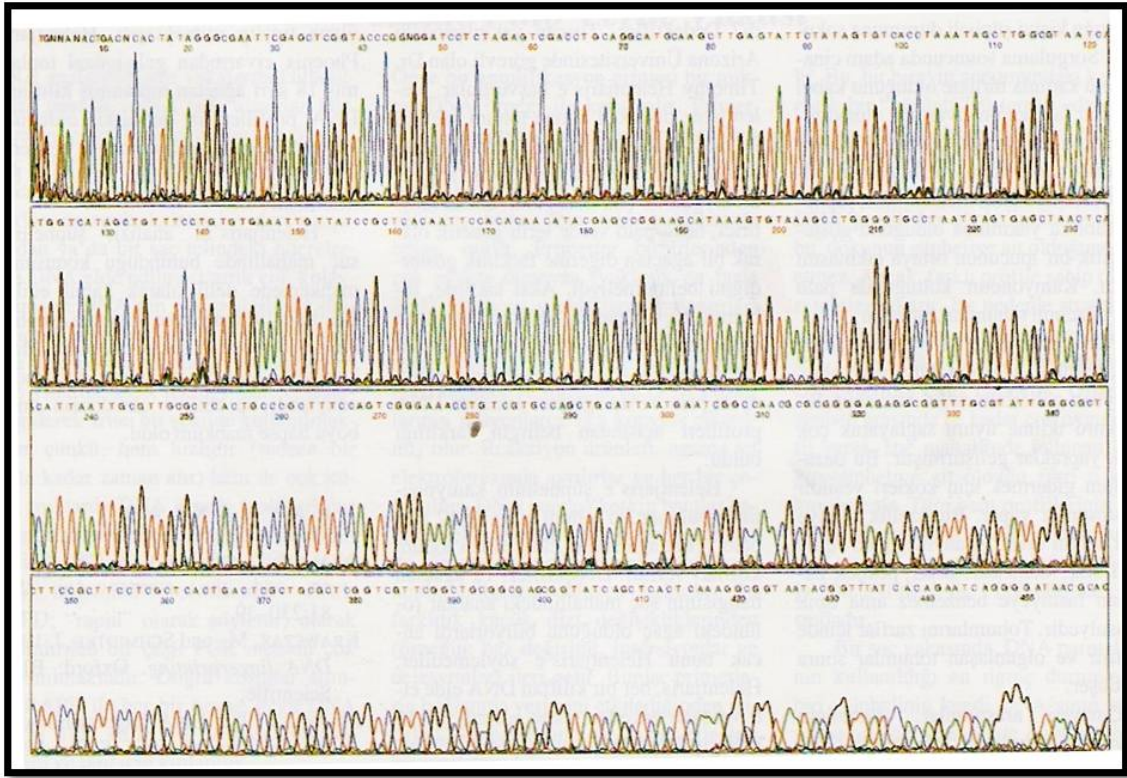
DNA dizi analizinde en çok kullanılan yöntem, tek zincirli DNA kalıbının tamamlayıcı zincirinin DNA polimeraz enzimi ile 5'den 3'ne doğru sentezlenmesi işlemine dayanır. DNA dizi analizi reaksiyonlarında normal nükleotitlerin yanı sıra, dideoksinükleotit adı verilen özgül baz analogları kullanılır. DNA parçasındaki nükleotit dizisinin tayini için, her biri ayrı tüplerde olmak üzere dört reaksiyon seti hazırlanır.

Her tüpte, tek zincirli bir DNA kalıbı (dizisi belirlenecek olan DNA parçası), uygun bir primer, DNA polimeraz, dört nükleotit ve oransal olarak daha az miktarda dört tip dideoksinükleotitlerden sadece biri bulunur. DNA sentezi olurken, DNA polimeraz, arada sırada, uzayan DNA zincirinin yapısına nükleotitlerin yanı sıra dideoksinükleotitleri de sokar. Bu nükleotit analogu 3' hidroksil grubu içermediği için bir sonraki nükleotit ile 3' bağı oluşturamaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır. Her bir tüpte uzunlukları birbirinden birer nükleotit farklı olan, değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Her bir reaksiyon tüpündeki örnekler jel elektroforezine yan yana yüklenerek, tüplerdeki DNA parçaları birbirinden ayrılır. Parçaların jel üzerinde görünüşleri sağlandığında merdivene benzer bantlar serisi ortaya çıkar. Dizi aşağıdan yukarı doğru okunarak, baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5'den 3'ne doğru nükleotit dizisi belirlenmiş olur (Şekil 2.16.) (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.16. DNA dizi analizi. Dört ayrı DNA dizi reaksiyonu (her bir hatta) sonucu oluşan bazların ayrımını gösteren DNA dizi analizi jelinin fotoğrafı (Klug ve Cummings 2000).

Genomların dizi analizi için, otomatik DNA dizi analizi aletleri ve radyoaktif izotop yerine flüoresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Şekil 2.17.) (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.17. Elektrofogram. DNA dizi analizi her bir baz için ayrı flüoresan boyaların kullanıldığı makinelerde otomatik olarak yapılabilir; ayrılan bazlar yatay eksen boyunca soldan sağa doğru okunur (Klug ve Cummings 2000).

DNA dizi analizi; genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ve gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların (proteinlerle genler arasındaki birlikteliğin kesin göstergesidir) sayısı, yeri ve çeşidi ile ilgili bilgiler verir. Dizi analizi ayrıca, prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin aminoasit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılır (Klug ve Cummings 2000).

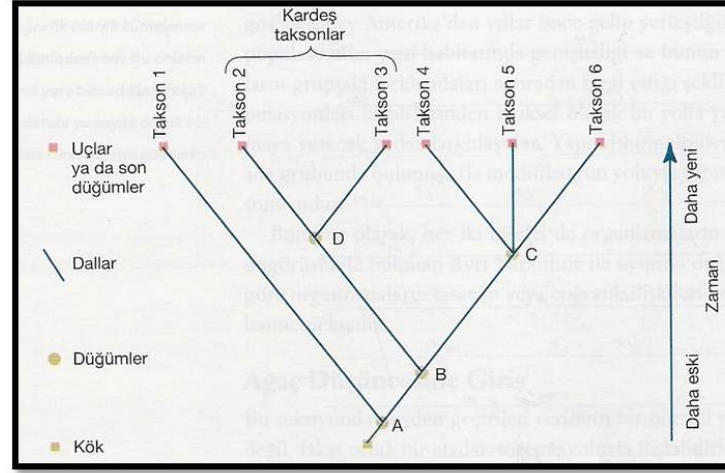
2.7. Filogenetik Analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla filogenetik analizlerden yararlanılmaktadır. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde meydana gelen değişikliklerin hızını ve karakterini belirlemeye ve böylece genler ile organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymada en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizler yoluyla filogenetik ağaçlara dönüştürülmesidir (Saitou ve Imanishi 1989).

2.7.1. Filogenetik ağaçlar

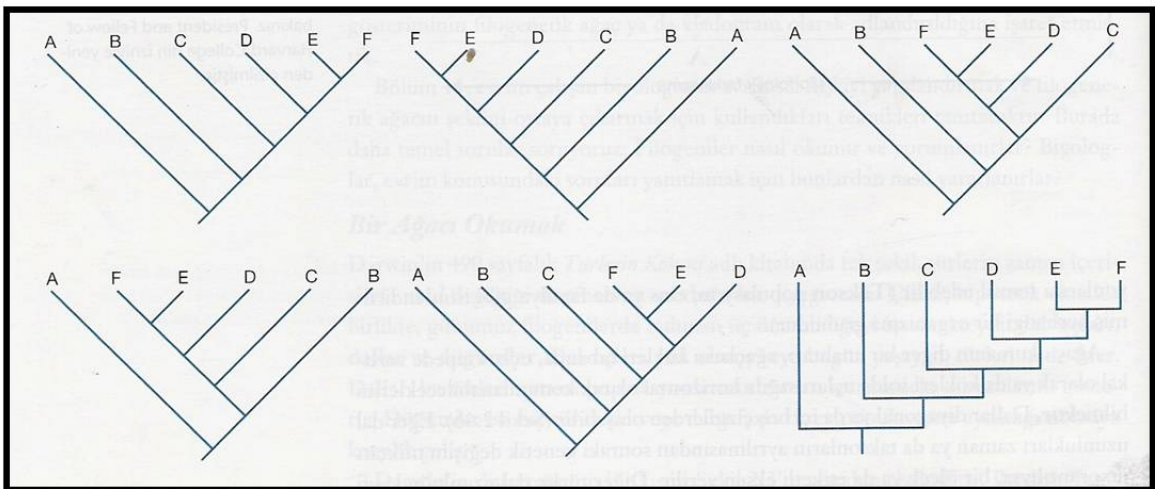
Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm ve dallardan oluşur. Dalları, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman ve Herron 1999).

Şekil 2.18., günümüzde filogeniler çizmenin bir yolunu göstermektedir. Bu ağaçta Takson 1'den Takson 6'ya kadar işaretlenen dal uçları önemli bir noktayı açıklamaktadır: Bir filogeni üzerinde dal ucu, dal veya düğümler popülasyondan veya türden, şube ya da aleme kadar herhangi bir taksonomik düzeydeki canlı popülasyonlarını temsil edebilir (Freeman ve Herron 1999).



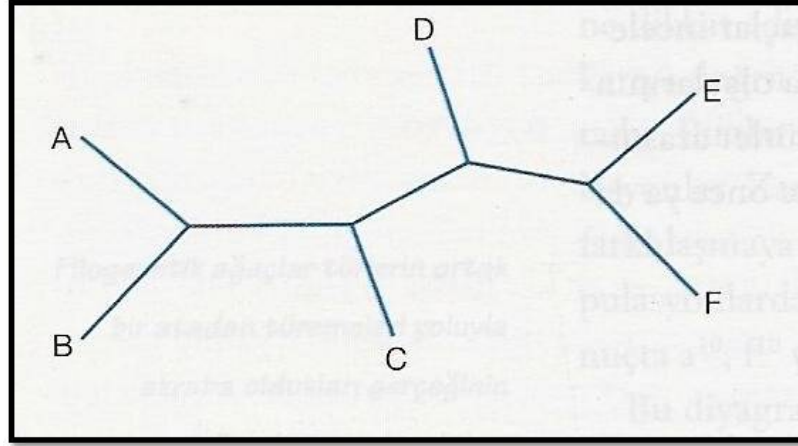
Şekil 2.18. Filogenetik ağaç çizimi. Bu ağacı okumak için en alttan başlanıp yukarıya doğru devam edilir. A ile gösterilen düğümden bulunan popülasyon 1-6 taksonlarının ortak atasıdır. Bu gruplardan biri Takson 1'e evrimleşmiş; diğeri ise 1-5 taksonlarının ortak atası olan düğüm B'de ki popülasyona evrimleşmiştir (Freeman ve Herron 1999).

Ağaç okumanın diğer bir anahtarı, ağaçları kökleri tabanda, uçları tepede vertikal olarak ya da kökleri solda, uçları sağda horizontal olarak konumlanabileceklerini bilmektir. Dallar diyagonal ya da içi boş çizgilerden oluşabilir (Şekil 2.18.). Eğer dal uzunlukları zaman ya da taksonların ayrılmasından sonraki genetik değişim miktarı ile orantılıysa, bir ölçek ya da etiketli eksen verilir. Diğer türlü, dal uzunluğu keyfi olup okumayı kolaylaştırmak için çizilirler (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.19. Vertikal ağaçlar. Bu diyagramlar, aynı evrimsel ilişkileri temsil eden altı farklı yolu göstermektedir. Burada tüm ağaçlar vertikal olarak konumlanmış köklü ağaçlar olup, bazal taksonlar aşağıda, türemiş olanlar ise uca doğru yer alırlar (Mayden ve Wiley 1992).

Son olarak evrimsel ağaçlar köklü ya da köksüz olabilirler. Köklü ağaçlar inceleme altındaki soy hattının nereden köklendiğini tanımladığı için ayrılma olaylarının açığa çıkma sırasını da ortaya koyarlar. Köksüz ağaçlar, bunun tersine, türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymakla birlikte, hangi düğüm ya da dalların tarihte önce ya da sonra açığa çıktıklarına işaret etmezler (Şekil 2.19.) (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.20. Köksüz ağaç. Bu köksüz ağaç Şekil 2.19.'da çizilmiş olan ağaçların taksonları arasındaki aynı ilişkiyi göstermektedir. Ancak bir kökü yoktur, yani evrimsel süreçte hangi dalın önce hangisinin sonra açığa çıktığı konusunda bilgi vermez (Freeman ve Herron 1999).

Filogeni tahmini yaparak ağaç çizimi yapmak için, genetik farklılıklara ait verileri kullanan çeşitli yöntemler vardır.

2.7.1.1. Parsimoni

Parsimoni, bir gözlemin en basit (en az karmaşık) olarak açıklanması şeklinde tanımlanabilir. Parsimoni yöntemleri, her bir türün en az evrimsel değişikliklerine dayanan ağaçları karşılaştırır ve en basit muhtemel ağacı seçer (Klug ve Cummings 2000). Parsimoniye göre en iyi ağaç, tüm karakterler için en az karakter durum değişimini ifade eden ağaçtır. Kelime anlamı tutumluluk olan parsimoni, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca varılırken, karmaşık yerine basit açıklamaların seçilmesi olarak açıklanabilir (Freeman ve Herron 1999).

Parsimoni, olası birçokları arasında hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yaklaşım sağlar. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. Parsimoniyi davet eden mantık basit ve zorlayıcıdır. Birçok durumda, konvergans ve geriye dönüşün, ortak bir atadan gelen değişime bağlı olan benzerliğe oranla daha az olabileceklerini varsayabiliriz (Freeman ve Herron 1999).

2.7.1.2. Maksimum olasılık ve genetik uzaklık

Bilgiyi daha etkili kullanmak ve olası birçok ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağını yaratmak için, Joseph Felsenstein 1981'de maksimum olasılık tahmini olarak bilinen yeni ve güçlü bir yaklaşım sundu (Freeman ve Herron 1999).

Moleküler filogeniler için olasılık yaklaşımının temeli şu soruyu sormaktır: farklı tipteki nükleotit değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir? Bu stratejiyi hayata geçirmek için, bir bilgisayar programı her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar (verilen belirlenmiş bir karakter modeli altında). Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılıkları toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak rapor edilir. Öyleyse, yarışan ağaç topolojilerinin kabul ya da reddi için kriter en yüksek olasılığı olan ağacı seçmektir. Maalesef, olasılık metodları hesaplamada yavaşlar ve bu teknikle çok büyük veri setleri, daha hızlı parsimoni metodları kullanılarak yapıldığı kadar, kapsamlı analiz edilemezler (Freeman ve Herron 1999).

Oldukça radikal bir yaklaşım, ayrı karakterler verisini (morfolojik bir özelliğin varlığı veya yokluğu ya da bir gendeki homolog bir bölgede bir nükleotidin kimliği gibi) bir uzaklık değerine dönüştürmektedir (Swofford vd 1996). Örneğin, iki takson arasında nükleotit pozisyonu yüzdesi farklılıkları hesaplanabilir (%10 farklılık, 100 baz başına ortalama 10 nükleotidin değiştiği anlamına gelir). Ayrı karakterlerin tek bir uzaklık ölçüsüne dönüştürülmesi, spesifik bilginin kaybı ile sonuçlanır, fakat taksonlar arasındaki toplam benzerlik derecesini ifade edebilir (Freeman ve Herron 1999).

Olasılık metodlarında olduğu gibi, uzaklık analizleri de araştırmacıların çoklu karakterlerden gelen bilgiyi iki takson arasındaki tek bir bütün uzaklığın ölçümüne çevirmek için bir karakter evrim modeli öngörmelerine gereksinim duyar. DNA dizileri için yaygın biçimde kullanılan bir formül, aynı yerdeki çoklu baz değişimleri için transisyon ve transversiyon baz değişimlerinin frekansındaki farklılıkları düzeltir (Kimura 1980, Wakely 1996).

Uzaklık verisinden bir filogeni tahmini yapmak için, taksonları kümeleyen bir bilgisayar programı kullanılır; yani, en benzer formlu sonuçlar arasında biri diğerine yakın bulunur. Taksonları kümelemeyi benzerlikler temelinde yapan bu genel stratejiye fenetik yaklaşım adı verilir (Sneath ve Sokal 1973). Tercih edilen ağaç, taksonlar arasında toplam mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır. Birkaç farklı kümeleme algoritması yaygın biçimde kullanılmakta olup, analiz edilen mesafenin doğası konusunda az ya da çok sınırlayıcı öngörülerde bulunabilirler (Freeman ve Herron 1999).

2.7.2. Ağaçların güvenilirlik dereceleri

En tutumlu ağaçların güvenilirlik derecelerini istatistiksel olarak değerlendirmek mümkündür (Bremer 1994, Swofford vd 1996, Huelsenbeck ve Rannala 1997). Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri seç-bağla testi (bootstrapping) olarak adlandırılır. Seç-bağla testi belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir. Seç-bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Örneğin, çalışmada 300 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa, bilgisayar bu pozisyonlardan birini rastgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öge olarak kullanmakla seç-bağla testine başlar. Daha sonra, rastgele seçtiği bir pozisyon, yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı olma şansı 1/300'dür). Bilgisayar orijinal verinin rastgele bir örneklemesini temsil eden, 300 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlemi tekrarlamak suretiyle araştırmacı, yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesini %50, %80 ya da %100 şeklinde ortaya koyabilir. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusundaki güvenimiz artmaktadır. Eğer belli bir dal için seç-bağla desteği az ise, %50'nin altında diyelim, araştırmacı genellikle ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda da yayınladığı ağaçta bu dalı tek düğümünden çok çatallı (politomi) (belirsizlik noktası) olarak verecektir (Freeman ve Herron 1999).

İkinci bir yaklaşım ise sade parsimoniden başka bir filogenetik metot kullanmaktır. Maksimum olasılık (maximum likelihood) ve genetik uzaklık (genetic distances) gibi alternatif metotlar kullanılabilir. Bu metotlar, karakterlerin nasıl evrimleştikleri konusunda farklı varsayımlar ve en iyi filogeni araştırmasında benzer taksonları bir araya getirmede farklı metotlar kullanırlar. Oldukça farklı olan bu metotlar, aynı en iyi filogeni üzerinde anlaşılırsa, bu durum en iyi ağacın gerçekten de bulunduğu konusunda bir dereceye kadar güven verir (Huelsenbeck ve Hillis 1993, Hillis vd 1994). Çatıştıkları zaman, analiz edilen durumun ağaçları içerisinde en geçerli olanın seçilmesinde, hangi kriterlerin kullanılacağı üzerinde bir yargıya varmak durumunda kalırız. Benzer bir durumla, tamamen farklı veri setlerinden çıkarsanan ağaçları karşılaştırırken de yüz yüze kalırız. Farklı çalışmalardan elde edilen ağaçlar, yarışan tahminler olarak işlem görürler. Çatışmaları durumunda, araştırmacılar karakterleri homoplasiye daha az açık olduğu düşünülen ve daha büyük veri setlerinden hesaplanan ağaçlara daha fazla güvenirler (Freeman ve Herron 1999).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, Akdeniz (Mersin, Anamur, Bozyazı, Taşucu, Silifke, İskenderun), Ege (İzmir, Çeşme, Urla), Marmara (İstanbul, Çanakkale) ve Karadeniz (Samsun, Sinop, Ordu) bölgelerinden belirlenen istasyonlardan, toplamda 242 adet, Mullidae ailesinden dört farklı tür (*Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus moluccensis*, *Upeneus pori*) ve bir alt türe (*Mullus barbatus ponticus*) ait bireyler kullanılmıştır. Türlerin bölgesel dağılımı ve örnek sayısı Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

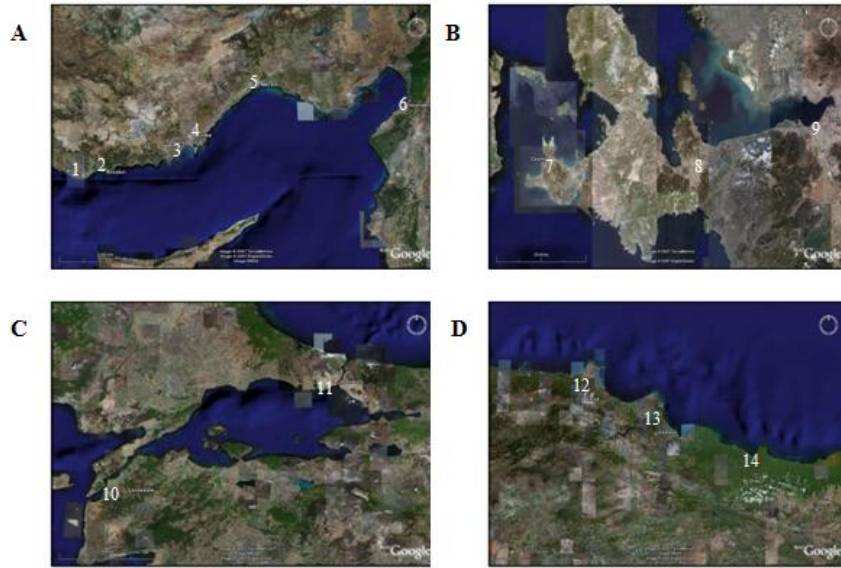
Çizelge 3.1. Türlerin bölgesel dağılımı ve örnek sayısı.

	Akdeniz	Ege Denizi	Marmara Denizi	Karadeniz
<i>Mullus barbatus</i> (barbun)	21	20	20	20
<i>Mullus surmuletus</i> (tekir)	20	40	20	20
<i>Upeneus moluccensis</i> (paşa barbunu)	20	-	-	-
<i>Upeneus pori</i> (nil barbunu)	21	-	-	-
<i>Mullus barbatus ponticus</i> (Karadeniz barbunu)	-	-	-	20

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin elde edilmesi

Örneklerin elde edilmesinde bölgede bulunan yerel trol ağı donanımlı balıkçı teknelerinden yardım alınmıştır. Avlanan balıklar arasından istenilen türe ait örnekler seçilmiştir. İstenilen türün elde edilemediği durumlarda yerel belediyelere bağlı su ürünleri hallerinden istenilen türe ait örnekler araştırılmış, uygun koşullarda olanlar bu şekilde temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Örneklemeye yapılan istasyonların uydu görüntüsü. A) Akdeniz: 1. Anamur 2. Bozyazı 3. Taşucu 4. Silifke 5. Mersin 6. İskenderun B) Ege: 7. Çeşme 8. Urla 9. İzmir C) Marmara: 10. Çanakkale 11. Marmara D) 12. Sinop 13. Samsun 14. Ordu.

Örnekler elde edildikten sonra hemen buz içerisine alınmış, morfolojik ve genetik incelemelerin yapılacağı laboratuvar'a taşınmıştır. Özellikle genetik incelemelerde kullanılacak dokuların zarar görmesini engellemek için soğuk zincirin doğru uygulanmasına özen gösterilmiştir.

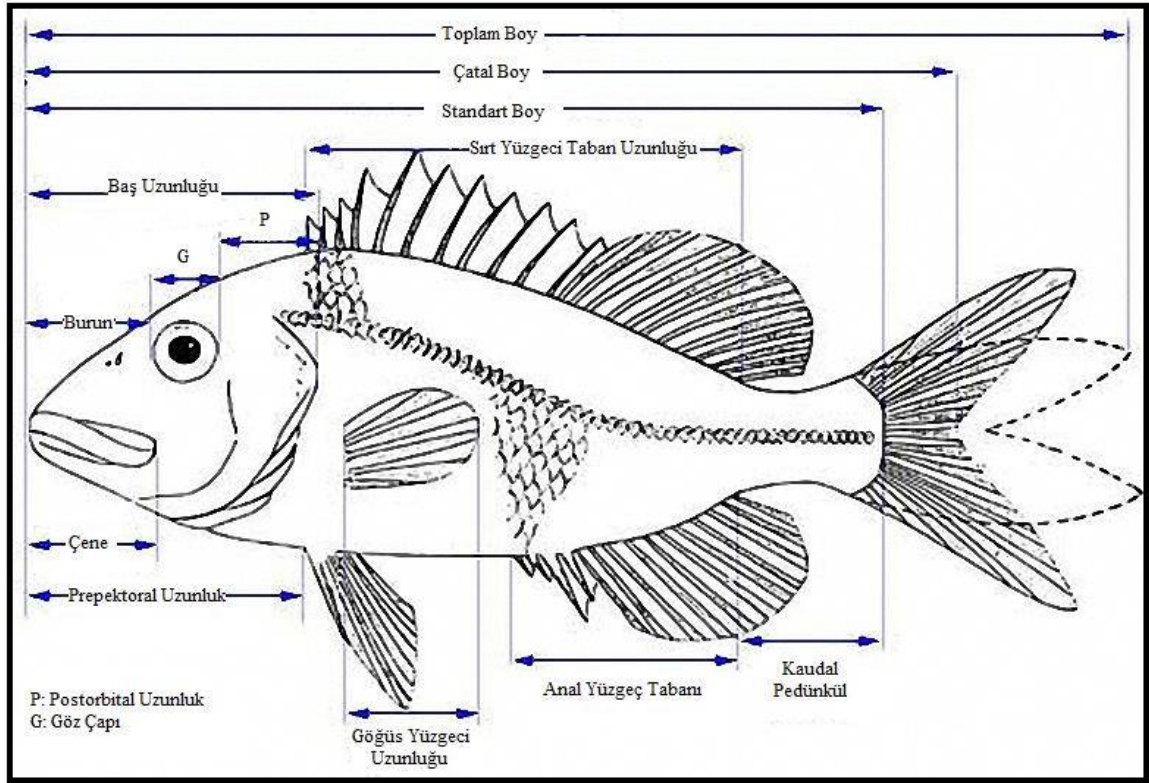
3.2.2. Morfolojik karakterlerin kontrolü ve ölçümleri

Buz içerisinde laboratuvara getirilen örneklerin, Mamuris vd (1999) çalışmasından yola çıkılarak belirlenen onüç morfometrik karakteri ölçülmüştür. Tüm ölçümler 0,1 mm hassasiyette gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasında büyüklük farkı fazla ise, allometrik büyümeden kaynaklanabilecek olası varyasyonları en düşük seviyeye çekebilmek için tüm ölçümler aşağıdaki şekilde standardize edilmiştir :

$$E = \log Y - b(\log X - \log X_1)$$

(e: standardize ölçüm; Y: karakter uzunluğu; b: her popülasyon için logY'nin logX'e eğimi, X: türün standart uzunluğu, X₁: incelenen türlerin ortalama uzunluğu) (Reist 1985).

Elde edilen değerler internet üzerinden erişilebilen veritabanlarındaki (<http://www.fishbase.org>, <http://www.fishtrace.org>) değerler ile karşılaştırılmıştır.

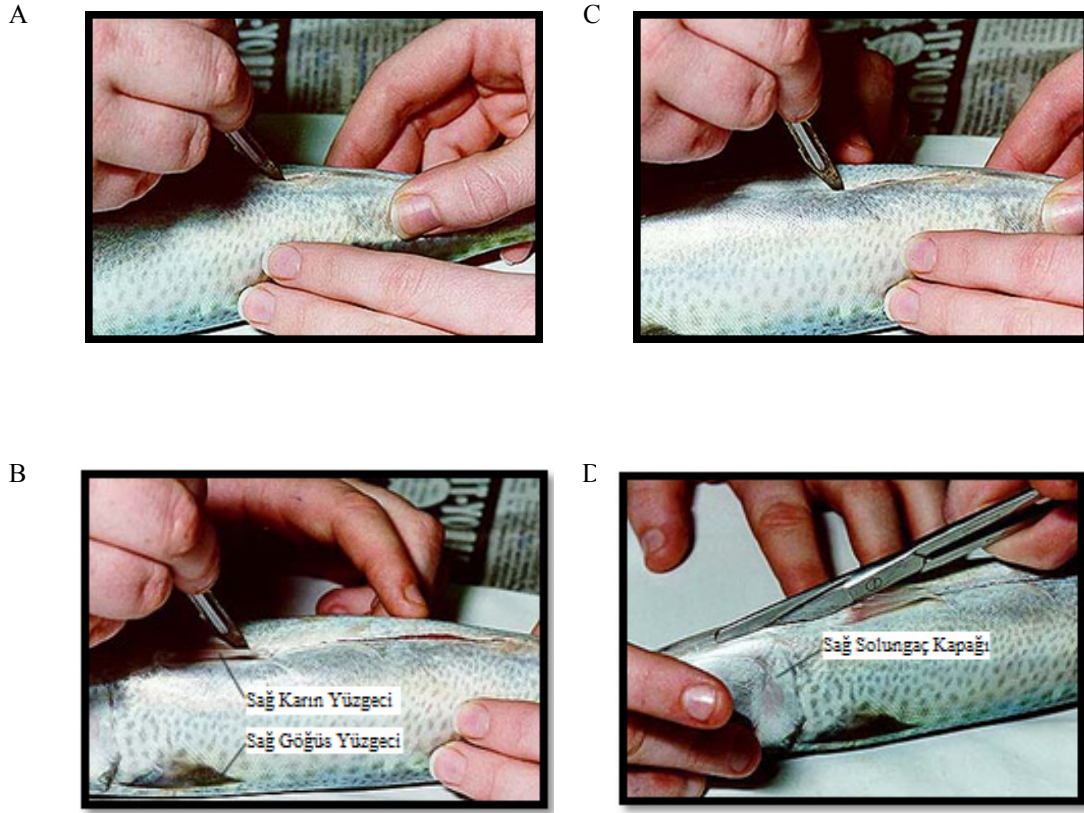


Şekil 3.2. Ölçümü yapılan morfometrik karakterler.

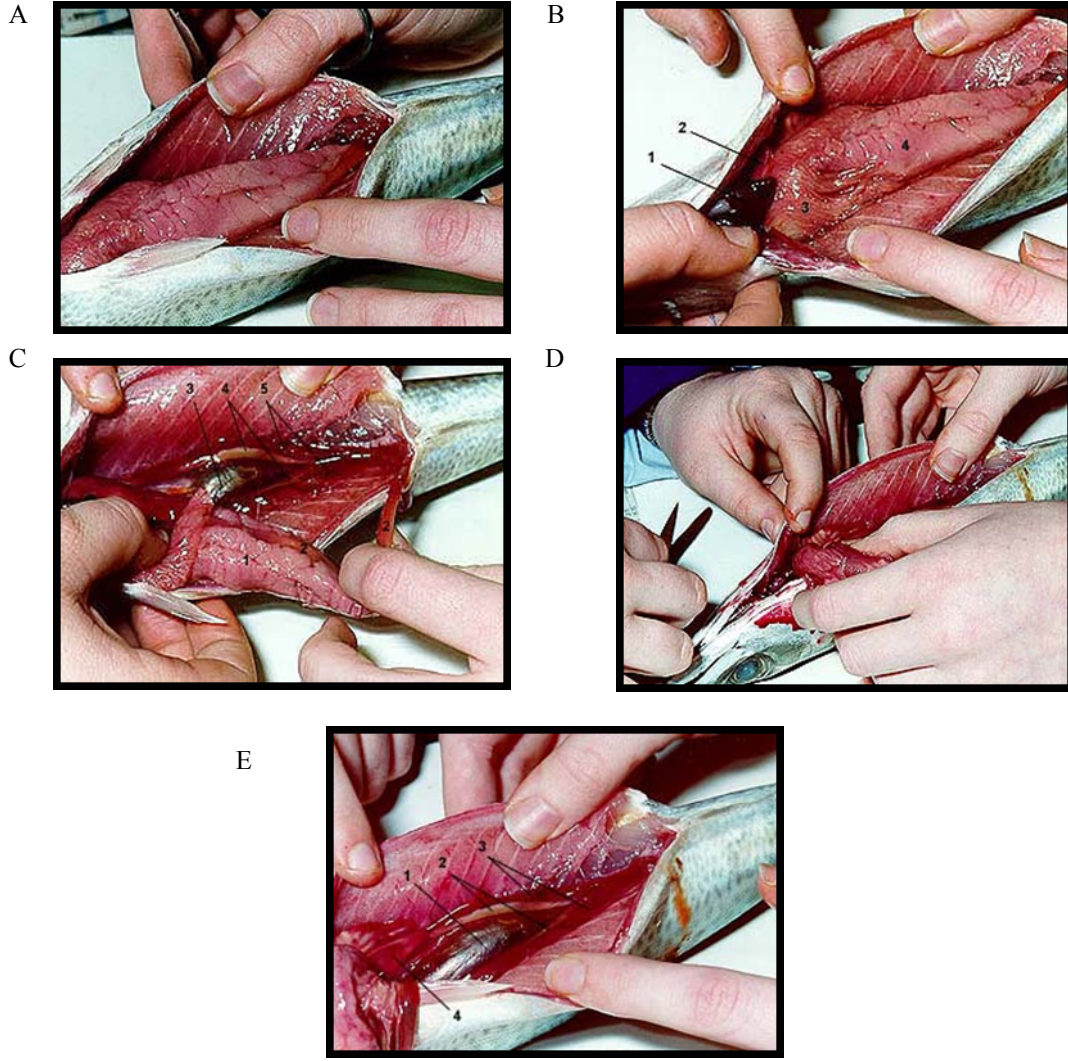
Bu ölçümlerle beraber tür ayırım anahtarında (Hureau 1986) belirtilen morfolojik özellikler incelenerek örneklerin morfolojik incelemeleri tamamlanmıştır.

3.2.3. Doku örneklerinin elde edilmesi

Morfometrik ölçümler tamamlandıktan sonra örneklerden DNA izolasyonunda kullanmak üzere diseksiyon (Şekil 3.3. ve 3.4.) ile karaciğer, sırt kası ve pul örnekleri alınmıştır. Örneklerin saklanması için iki grup oluşturulmuştur. Birinci grup içerisinde %95 etanol bulunan steril tüplere yerleştirilerek -20°C’de saklanmıştır. İkinci grup ise içerisinde etanol bulunmayan steril tüplere yerleştirilerek DNA izolasyonunda kullanılana kadar saklanmak üzere -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.3. İnsizyon. A) Diseksiyona, bistüri yardımı ile anüsten başlanır. B) İnsizyon balığın karnı boyunca baş kısmına doğru devam eder. C) İnsizyona, karın yüzgeçleri arasından ön kısma doğru devam edilir. D) Karın yüzgeçlerine bağlı kemikleri kesmek için makas kullanılır.



Şekil 3.4. Diseksiyon. A) İnsizyon ile birbirinden ayrılan iki kısım birbirinden ayrılarak vücut boşluğu'na ulaşılır. B) Görülen iç organlar 1.Kalp, 2.Karaciğer, 3.Pilorik Çekum, 4.Adipoz Doku C) Görülen iç organlar 1.Adipoz Doku, 2.Mide, 3.Yüzme Kesesi, 4.Gonadlar, 5.Böbrek. D)Karaciğere ulaşmak için, mide ve ona bağlı diğer organlar vücut boşluğundan çıkartılır. E) Mide ve ona bağlı diğer organların vücut boşluğundan ayrılması ile ortaya çıkan iç organlar: 1.Yüzme Kesesi, 2.Gonadlar, 3.Böbrekler, 4.Karaciğer.

3.2.4. DNA izolasyonu

Mullus cinsine ait *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus* türleri ve *Mullus barbatus ponticus* alt türü ile *Upeneus* cinsine ait *Upeneus pori* ve *Upeneus moluccensis* örneklerinden elde edilen dokulardan DNA izolasyonu için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi ve Promega DNA İzolasyon kiti kullanılarak iki farklı yöntem denenmiştir.

3.2.4.1. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi

DNA izolasyonuna başlamadan önce izolasyon boyunca kullanılacak çözeltiler hazırlanmıştır:

1. Sodyum Tris EDTA (STE):

0.1 M NaCl (Sigma S5886)

10 mM TrisHCl (Sigma T5941)

1 mM EDTA pH:8,0 (Sigma E5134)

2. %10 Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS):

100 g SDS (Sigma L4390) alınıp 900 ml distile suda, 68°C'ye ayarlanmış su banyosunda (Labline Aquabath) eritilir ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır. HCl (Riedel-de Haen 07102) ile pH=7,2'ye ayarlanır. Kullanmadan önce 0,20 µm gözenekli steril filtreden (Sartorius Minisart) geçirilir.

3. Sodyum Asetat (pH=7.0) (3M):

408,1 g Sodyum Asetat (Sigma S2889) 800 ml distile suda eritilir, pH=7,0'a ayarlanır ve 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan önce otoklavlanır (Hirayama Hiclave HVA110).

4. Tris EDTA (TE):

1ml Tris HCl (1M, pH=8,0) ve 0,2 ml EDTA (0,5M, pH=8,0) distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan önce otoklavlanır.

10-20 mg doku örneği 2 ml'lik tüpe (ROTH 7083.1) alınır. Üzerine 500 µl STE eklenir. STE içerisinde bulunan doku örnekleri homojenizatör (Sonic Vibra Cell VC 130) yardımı ile parçalanarak homojen hale getirilir. Homojenize hale gelen doku örnekleri üzerine 30 µl %10 SDS, 5 µl Proteinase-K (800 U/ml, Fermentas E00491) ve 3µl RNase (100000 U/ml, BioLabs RNase If M0243L) eklenir. Tüpün ağzı parafin ile kapatılarak 56°C'ye ayarlanmış su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılır. Ertesi gün tüpün içerisine 500 µl 25:24:1 oranında Fenol:Kloroform:İzoamilalkol karışımından (Fluka 77617) eklenir. Fenol:Kloroform:İzoamilalkol karışımı kullanılmadan önce çalkalanmalıdır. Daha sonra tüpün ağzı kapatılır ve vorteks (LabTech LVM-202) yardımı ile beyaz renk alana kadar karıştırılır. Beyaz renk aldıktan sonra tüp 4°C'ye ayarlanmış santrifüj cihazı (Hettich Mikro 22 R) ile 14000 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu işlem sonrasında tüp içerisindeki karışım üç faza ayrılır. Ortadaki faz alt ve üst fazları birbirinden ayırır. Üst faz, alt faza temas edilmeden yeni bir 2 ml'lik tüpe alınır. Yeni tüpe tekrar 500 µl 25:24:1 oranındaki Fenol:Kloroform:İzoamilalkol karışımından eklenir. Tüpün ağzı kapatılarak vorteks yardımı ile beyaz renk alıncaya kadar karıştırılır ve 4°C'ye ayarlanmış santrifüj cihazı ile 14000 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Üç faza ayrılan karışımın üst fazı, alt faza temas etmeden tekrar yeni bir tüpe alınır. Temiz tüpe alınmış olan süpernatant üzerine, karışımla aynı oranda %95'lik etanol (AppliChem A4230) ve karışımın 1/10'u oranında Sodyum Asetat eklenir. Tüpün kapağı kapatılır ve karışım yavaşça alt üst edilerek çalkalanır. Bu aşamada tüpün içerisinde, beyaz yumak şeklinde DNA görülür. Örnek bulunan tüp 4°C'ye ayarlanmış santrifüj cihazı içerisine yerleştirilerek 18000 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj cihazından çıkarılan tüpte bulunan alkol yavaşça dökülür. Bu aşamada DNA tüpün dibinde pelet halde bulunduğundan alkolle beraber tüpten uzaklaşmayacaktır. Ortamdaki tuzu (Sodyum asetat) uzaklaştırmak için DNA üzerine %70'lik etanol'den 500 µl ilave eklenir. Tüpün dibinde pelet halde bulunan DNA'yı kaldırmak için tüpün dibine parmakla yavaşça vurulur. Bu işlemin ardından 4°C'ye ayarlanmış santrifüj cihazı ile 14000 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Tüpteki alkol dikkatlice dökülür. Dökülerek uzaklaştırılmayan alkol pipet (Gilson Pipetman) yardımı ile mümkün olduğunca uzaklaştırılır. İçerisinde DNA bulunan tüp ağzı açık bir biçimde çeker ocak altında 15 dakika süre ile kurumaya bırakılır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra alkolden arındırılmış olan DNA üzerine 100 µl distile su veya TE tampon eklenerek çözülür ve 37°C'de 3-4 saat bekletilir. Daha sonra kullanılana kadar bekletmek üzere 4°C'de saklanır.

3.2.4.2. Promega Genomic DNA Purification Kit ile DNA izolasyonu

DNA izolasyonu üretici firma tarafından sağlanan protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir:

600 µl Nuclei Lysis Solution, 15 ml'lik santrifüj tüpüne (TPP 91015) alınır ve buz üzerinde soğutulur. 10–20 mg taze doku örneği, içerisinde soğutulmuş Nuclei Lysis Solution (Promega A7943) bulunan santrifüj tüpüne alınır ve 10 saniye süre ile bir homojenizatör yardımı ile homojenize edilir. Elde edilen lizat 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne (Isolab ETTP0003) aktarılır. Tüpün kapağı parafin ile kaplanarak, daha önceden 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda, 15–30 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında lizat üzerine 3 µl RNase A (4mg/ml, Promega A7973) eklenir ve 2–5 defa alt üst edilerek karıştırılır. Karışım 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15-30 dakika boyunca inkübasyona bırakılır. Bu aşamadan sonra devam etmeden önce örneğin oda sıcaklığında 5 dakika soğutulması gerekmektedir. Oda sıcaklığında soğutulan örnek üzerine 200 µl Protein Precipitation Solution (Promega A7953) eklenir ve vorteks yardımı ile 20 saniye boyunca yüksek hızda karıştırılır. Karıştırdıktan sonra örnek 5 dakika buz üzerinde soğutulur. Daha sonra örnek 13000–16000 g devirde 4 dakika süre ile santrifüjlenir. Çöken protein beyaz bir pelet olarak görülecektir. DNA'yı içeren süpernatant, dikkatli bir biçimde alınarak, içerisinde 600 µl, oda sıcaklığında Isopropanol (Riedel-de Haen 24137) içeren 1,5 ml'lik temiz bir tüpe aktarılır. Çözelti, DNA iplikçığı görülebilir hale gelene kadar, alt üst edilerek yavaşça karıştırılır. Örnek oda sıcaklığında, 13000-16000 g'de, 1 dakika süre ile santrifüj edilir. Bu aşamada DNA beyaz pelet halinde görülebilir olacaktır. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılır. DNA üzerine 600 µl, oda sıcaklığında %70 etanol eklenir ve DNA'yı yıkamak için birkaç kez alt üst edilerek karıştırılır. Örnek bir kez daha, oda sıcaklığında, 13000-16000 g'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir. Tüpte bulunan Etanol pipet yardımı ile dikkatlice uzaklaştırılır. Bu aşamada DNA peleti çok gevşek olduğundan, pipetle etanol uzaklaştırılırken DNA'yı da çekmemeye özen gösterilmelidir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra tüp kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek 10-15 dakika boyunca kuruması beklenir. Kurutma işlemi de tamamlandıktan sonra DNA üzerine 100 µl DNA Rehydration Solution (Promega A7963) eklenir ve 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 1 saat süre ile inkübasyona bırakılarak çözülmesi sağlanır. Daha sonra kullanılana kadar bekletmek üzere 4°C'de saklanır.

3.2.5. DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'nın miktar ve saflık analizleri spektrofotometre'de (NanoDrop ND-1000) gerçekleştirildi. 1 µl DNA örneği cihaza pipet yardımı ile yerleştirildi. DNA konsantrasyonu 260 nm'de 1 OD'nin 50 ng/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplandı. DNA'nın saflığını değerlendirirken 260 nm/280 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/ protein'in absorpsiyon değeri) ve 260 nm/230 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/Fenol'ün absorpsiyon değeri) değerleri göz önüne alındı.

3.2.6. DNA konsantrasyonunun ayarlanması

Spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonları belirlenen örnekler, ana stoklarının kontamine olmaması ve tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının standardize edilmesi amacı ile DNA konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

3.2.7. Jel elektroforezi

DNA varlığını görüntülemek için jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. Jel Elektroforezine başlamadan önce agaroz jel ve gerekli çözeltiler hazırlanmıştır:

1. 5X Trisma Base EDTA (TBE):

54 g Trima Base (Sigma T6066), 27,5 g Borik Asit (Sigma B6768) ve 20 ml EDTA (5M, pH=8,0) 800–900 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanır.

2. Ethidium Bromide (10 mg/ml):

1 g Ethidium Bromide (Sigma E7637) 100 ml distile su içerisinde, manyetik karıştırıcı kullanılarak, boya çözülene kadar iyice karıştırılır.

3. DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus):

DNA Ladder üzerine 166 µl 6X Loading Dye (Fermantas 0611) ve 734 µl distile su ilave edilir. Vorteks yardımı ile yüksek hızda karıştırılır.

4. %1'lik Agaroz Jel:

1 g agaroz (Sigma A5093) hassas terazi (Shimadzu BX320H) ile tartıldı ve üzerine 100 ml 1X Trisma Base EDTA (TBE) eklendi. Mikrodalga fırın yardımı ile kaynatılarak agaroz'un çözülmesi sağlandı. Çözelti soğutulduktan sonra, çeker ocak altında, içerisine 5 µl Ethidium Bromide eklendi ve yavaşça karıştırılarak homojenize hale gelmesi sağlandı. Karışım son olarak jel tablasına yavaşça dökülerek 20-30 dakika, oda sıcaklığında, donana kadar beklenir.

%1'lik agaroz jel içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Scie-Plas HU10W) yerleştirilir. 2 µl DNA, 4 µl 6X Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenir. Jel'deki ilk kuyuya DNA Ladder yüklenir. Örnekler 100 voltta 30 dakika yürütülür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) aktarılır. Burada UV ışık altında görüntülenerek bütünlüğü saptanan DNA'nın görüntüsü, GeneSnap 6.08.04 yazılımı ile çekilerek, termal yazıcıdan (Sony UP-D895) çıktı alınır.

DNA izolasyonunun ardından tüm örnekler bir DNA indeks numarası verilmiştir.

3.2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

3.2.8.1. Primer konsantrasyonunun ayarlanması

Çalışmada kullanılacak primerler (Çizelge 3.2.) PCR analizinde kullanılmak üzere uygun konsantrasyonlara ayarlandı. PCR'da kullanılacak olan liyofilize primer, üretici firma tarafından verilen nmol değerlerinin 10 misli distile su ile sulandırılarak 100 pM/µl'lik stok primer elde edildi. Daha sonra stok primer 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak PCR reaksiyonunda kullanılacak 10 pM/µl'lik stok primer oluşturuldu.

Çizelge 3.2. Primerler.

Primer	Gen	Baz Dizisi
L1091 (Kocher vd 1989)	16S rRNA	5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'
H3080 (Palumbi vd 1991)	16S rRNA	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'
L14841 (Kocher vd 1989)	CytB	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
H15149 (Kocher vd 1989)	CytB	5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'
H1478 (Kocher vd 1989)	12S rRNA	5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'
L7450 (Normark vd 1991)	CO II	5'-AAAGGAAGGAATCGAACCC-3'
H8055 (Normark vd 1991)	CO II	5'-GCTCATGAGTGGAGGACGTCTT-3'

3.2.8.2. Primerin erime sıcaklığının hesaplanması

Primerin erime sıcaklığı 2AT + 4GC formülü ile hesaplanmıştır. Primer çiftinde bulunan forward ve reverse primerler aynı baz dizisine sahip olmadıklarından dolayı, erime sıcaklıkları ayrı ayrı hesaplandı. Reaksiyon tek bir erime sıcaklığına göre gerçekleşeceğinden forward ve reverse primerlerin erime sıcaklıkları toplanıp, ikiye bölünür ve sonuçtan beş çıkartılır. Böylece primer çiftinin erime sıcaklığı elde edilmiş oldu.

3.2.8.3. Primer optimizasyonu

Çalışmaya başlamadan önce primerlerin hesaplanan erime sıcaklığında çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacı ile optimizasyon reaksiyonu kurulmuştur. Bu amaçla tüm primer çiftleri ile, gradient thermocycler (MJ Research DNA Engine Tetrad2) kullanılarak, 50–66°C sıcaklık aralığında, 1, 1.5 ve 2 mM MgCl₂ konsantrasyonlarında, Çizelge 3.2.'deki reaksiyon protokolüne uygun şekilde optimizasyon için reaksiyon kurulmuştur.

Çizelge 3.3. Reaksiyon protokolü.

	1 mM MgCl ₂	1.5 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂
10X Taq Buffer with KCl* (Fermentas B38)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
MgCl₂ (25 mM) (Fermentas R0971)	1 µl	1.5 µl	2 µl
dNTP mix (10 mM) (Fermentas R0192)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer (Forward) (10 pM/µl)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer (Reverse) (10 pM/µl)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl, EP0402)	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
DNA (50 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
Distile Su	17.8 µl	17.3 µl	16.8 µl
Toplam Hacim	25 µl	25 µl	25 µl

*100 mM Tris-HCl (pH 8,8 at 25°C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40.

PCR Döngü Koşulları:

95°C'de 2 dakika

95°C'de 30 saniye, 50–66°C'de (Gradient) 30 saniye, 72°C'de 30 saniye (30 döngü)

72°C'de 10 dakika

Belirtilen reaksiyon koşulları ve PCR döngü koşullarında çoğaltılan DNA'lar %2'lik agaroz jele yüklenerek, 100 voltta 30 dakika boyunca yürütülür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine aktarıldı. Burada UV ışık altında görüntülenerek termal yazıcı yardımı ile çıktı alındı. İstenilen büyüklükte ışımaya veren banda sahip örneklerin erime sıcaklığı ve MgCl₂ konsantrasyonları kaydedilerek, ilgili primer çifti için optimum reaksiyon protokolü ve PCR döngü koşulları belirlendi.

Erime sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonları optimize edilen primer çiftleri, daha önce Çizelge 3.3.'de verilen reaksiyon protokolü ve Çizelge 3.3.'ün altında belirtilen PCR döngü koşullarına uygun olarak kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilir.

Belirtilen PCR koşullarında çoğaltılan DNA'lar %2'lik agaroz jel'de, 100 voltta 30 dakika yürütülür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine aktarılır. Burada UV ışık altında görüntülenerek termal yazıcı yardımı ile çıktı alınır. İstenilen büyüklükte bant elde edilemeyen örnekler, aynı koşullarda tekrar edilmiştir.

3.2.9. Dizi analizi

3.2.9.1. Saflaştırma (Pürifikasyon)

Dizi analizinde kullanılacak PCR ürünleri, iki farklı yöntem kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2.9.1.1. Kolon yöntemi

Kolon yöntemi ile PCR ürünlerinin saflaştırılmasında Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega A9282) kullanılmıştır. Buna göre, elde edilen PCR ürünlerinin hacimleri ölçülür. Üzerlerine 1:1 oranında Membran Binding Solution (Promega A9303) eklenir ve pipetleme yaparak karıştırılır. Kolonlar (Promega A129B) temiz tüpe (Promega A130B) takılır ve üzerlerine PCR ürünleri yüklenir. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir. Tüpler 14000 g'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlenir. Kolonların altında kalan kısım uzaklaştırılır. Kolonlara 700 µl Membrane Wash Solution (Promega A929C) eklenir. 14000 g'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlenir. Kolonların altında kalan kısım uzaklaştırılır. Membrane Wash Solution'dan 500 µl eklenerek işlem tekrarlanır. 14000 g'de bu kez 5 dakika süre ile santrifüjlenir. Kolonlar temiz tüplere takılıp, örnek isimleri tüplere ve kapaklarına yazılır. Tüplerin kapakları, bistüri yardımı ile tüpten ayrılır. 25 µl Nuclease Free Water (Promega P119E), kolon membranına değmeden, tam ortasına bırakılır. Oda sıcaklığında 1 dakika süre ile bekletilir. Daha sonra örnekler 14000 g'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlenir. Son olarak kolonlar atılır, tüplerin kapakları kapatılır ve kullanılına kadar 4°C'de saklanır.

Saflaştırılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jel'de, 100 voltta 30 dakika yürütüldü ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine aktarıldı. Burada UV ışık altında görüntülenerek termal yazıcı yardımı ile çıktı alındı.

3.2.9.1.2. Plate yöntemi

Plate yöntemi ile PCR ürünlerinin saflaştırılmasında Macherey-Nagel NucleoSpin Multi-96 Extract (Macherey-Nagel 740 626.4) kullanılmıştır. Buna göre, önce PCR ürünlerinin hacimleri ayarlanır. Eğer PCR ürün hacimleri 100 µl'nin altında ise, saflaştırma işlemine başlamadan önce, distile su veya Elution Buffer NE'den biri kullanılarak, hacim 100 µl'ye tamamlanır. Daha sonra PCR ürünleri 96 kuyulu Round Well Block'a aktarılır. Burada PCR ürünlerine, hacimlerinin beş misli kadar NTB Buffer eklenir ve pipetleme işlemi ile karıştırılır. Daha sonra örnekler NucleoSpin Extract Binding Plate'e aktarılır. Bu aşamada, vakum cihazına (Xiril 100-1-4) alınan örneklerin bulunduğu plate'e 0.4 bar vakum, 1 dakika süre ile uygulanır. Böylece örneklerin kolonlardan geçmesi ve DNA'nın silika membran'a bağlanması sağlanır. Bu işlemin ardından, silika membranı yıkamak için, kuyulara 900 µl NT3 Buffer eklenir. Tekrar 0,4 bar'lık bir vakum 1

dakika süre ile uygulanır. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanır ve kurutma kağıdının üzerine alınarak kolonların uç kısmında kalan yıkama çözeltilerinin uzaklaştırılması sağlanır. Kurutma işlemini tamamlamak için örnekler 10 dakika boyunca 0.4 bar'lık vakum uygulanır. Bu aşama yıkama solüsyonu içerisinde bulunan etanol'ü ortamdan tamamen uzaklaştırmak için önemlidir. Daha sonra plate 3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır ve ardından, altına Elution Plate U-bottom yerleştirildikten sonra, kolonlardaki örnekler üzerine 75–150 µl NE Elution Buffer (5mM Tris-HCl, pH 8,5) veya distile su (pH 8,5) eklenir ve 1 dakika süre ile 0,4 bar'lık bir vakum uygulanır. Elde edilen örnekler kullanılana kadar 4°C'de saklanır.

Saflaştırılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jel'de, 100 voltta 30 dakika yürütüldü ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine aktarıldı. Burada UV ışık altında görüntülenerek termal yazıcı yardımı ile çıktı alındı.

3.2.9.2. Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu

Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonunu gerçekleştirmek için CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter P/N 608000) kullanılmıştır. Reaksiyon hazırlanmadan önce steril bir mikrofüj tüpünde DTCS karışımı (Çizelge 3.4.) hazırlandı.

Çizelge 3.4. DTCS karışımı.

Bileşen	Hacim
10X Sequencing Reaction Buffer	200 µl
dNTP Mix	100 µl
ddUTP Dye Terminator	200 µl
ddGTP Dye Terminator	200 µl
ddCTP Dye Terminator	200 µl
ddATP Dye Terminator	200 µl
Polymerase Enzyme	100 µl
Toplam Hacim	1200 µl

Hazırlanan karışım 0,5 ml'lik tüplere 100'er µl olacak şekilde paylaştırıldı. Reaksiyon kurulmadan önce, Çizelge 3.5.'da gösterilen farklı protokollere göre, optimizasyon yapıldı.

Çizelge 3.5. Optimizasyon için hazırlanan protokoller.

Bileşen									
DTCS Premix	6 µl	4 µl	4 µl	4 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl	6 µl
Primer (1.6 pM/µl)	1 µl	1 µl	2 µl	1 µl	1 µl	2 µl	1 µl	2 µl	1 µl
DNA	2 µl	2 µl	4 µl	2 µl	2 µl	4 µl	2 µl	4 µl	2 µl
Distile Su	1 µl	3 µl	9 µl	2 µl	3.5 µl	10.5 µl	4.25 µl	11.25 µl	-
Tampon*	-	-	1 µl	1 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.75 µl	1.75 µl	-
Betain (5M)	-	-	-	-	-	-	-	-	2 µl
Toplam Hacim	10 µl	10 µl	20µl	10	10 µl	20 µl	10 µl	20 µl	11 µl

*Beckman Coulter Sequencing Reaction Buffer (S505175)

Hazırlanan reaksiyon karışımı dikkatlice karıştırıldı ve aşağıda verilen PCR döngü koşullarına göre reaksiyon gerçekleştirildi.

PCR Döngü Koşulları:

96°C'de 20 saniye, 50°C'de 20 saniye, 60°C'de 4 dakika (30 döngü).

3.2.9.3. Etanol/EDTA/Sodyum Asetat presipitasyonu

Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu gerçekleştirilen örneklerin etanol presipitasyonlarını gerçekleştirmek için örnekler Sekans Plate'e (Beckman Coulter 609801) aktarıldı. Örnek bulunan tüm kuyulara dijital multikanal pipet (Gilson Pipetman Concept) yardımı ile 2 µl EDTA (125 mM) ve 2 µl sodyum asetat (3M) eklendi. Bu noktada EDTA ve sodyum asetat'ın kuyuların çeperinde kalmamasına özen gösterilmelidir. Daha sonra otomatik dispenser (Brand Handy Step) yardımı ile örnek bulunan tüm kuyulara 50 µl %100 etanol eklendi. Daha sonra plate alüminyum folyo bant ile kapatıldı ve alt üst edilmek sureti ile karıştırıldı. Bu aşamadan sonra plate oda sıcaklığında 15 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası plate santrifüj cihazına (Beckman Coulter Allegra X-15R) yerleştirildi ve 4°C'de, 1650 g'de, 45 dakika süre ile santrifüjlendi. Daha sonra plate'in üzerindeki alüminyum folyo bant çıkarıldı, plate'in yerleştirildiği haznenin tabanına kurutma kağıdı yerleştirildi ve plate ters çevrilerek bu hazneye yerleştirildi. Bu şekilde 185 g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj işlemi tamamlanan plate'in örnek bulunan tüm kuyularına 70 µl etanol, otomatik dispenser yardımı ile eklendi ve bir kez daha santrifüj cihazına yerleştirilir. Bu aşamada 4°C'de, 1650 g'de, 15 dakika süre ile santrifüjlendi. Ardından hazneye yeni bir kurutma kağıdı yerleştirildi ve plate yine ters çevrilerek 1650 g'de 1 dakika süre ile santrifüjlendi. Bu işlemde de sonra plate, dizi analiz cihazına yerleştirilene kadar, ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanarak, 4°C'de saklandı.

Örneklerin bulunduğu plate otomatik sekans cihazına (Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System) yüklenmeden önce, tüm örneklerin üzerine 20 µl formamid (Amersham Biosciences 324838) eklenerek çözümleri sağlandı. Son olarak buharlaşmayı engellemek amacı ile tüm örneklerin üzerlerine 1 damla mineral yağ (Beckman Coulter S505019) damlatılmıştır.

Bu aşamaların ardından örneklerin bulunduğu plate otomatik sekans cihazına yüklendi ve cihazda bulunan dizi analizi protokollerinden, LFR-B protokolü seçilerek analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. Filogenetik analiz

Dizi analizi sonrası elde edilen tüm örneklere ait diziler, CEQ 8000 v9.0, Chromas Lite 2.01, MEGA4 ve Sequencher 4.7 yazılımları kullanılarak sıralanmıştır. Diziler sıralanırken GenBank veri tabanında kayıtlı AF227677, AF227675, AY368277, EF095566 numaralı dizilerden yararlanılmıştır. Daha önce GenBank'ta dizi kaydı bulunmayan *Upeneus pori*'nin CytB, 12S rRNA bölgelerine ait diziler ile diğer dört tür ve bir alt türün CO II bölgesine ait diziler GenBank'a kaydedilecektir. Diziler sıralandıktan sonra MEGA4 yazılımı kullanılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiş ve dendrogramlar oluşturulmuştur.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Morfolojik Analiz

Tür ayırma anahtarında (Hureau 1986) ilgili tür için belirtilen tüm morfolojik karakterler, örnekler üzerinde tespit edilmiştir. Morfolojik karakterlerin ölçümünde, tür ortalamasından belirgin sapma gösteren örneklere rastlanmadığından standardizasyon yapılmamıştır. Ölçülen morfolojik karakterler (Çizelge 4.1.), uzunluklar ve ortalama değerler (Çizelge 4.2., Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Morfolojik karakterlerin numaralandırması.

Morfolojik Karakter		Morfolojik Karakter	
1	Toplam Boy	8	Burun
2	Çatal Boy	9	Çene
3	Standart Boy	10	Prepektoral Uzunluk
4	Sırt Yüzgeci Taban Uzunluğu	11	Göğüs Yüzgeci Uzunluğu
5	Baş Uzunluğu	12	Anal Yüzgeç Tabanı
6	Postorbital Uzunluk	13	Kaudal Pedünlük
7	Göz Çapı		

Çizelge 4.2. Akdeniz, Ege Denizi, Karadeniz ve Marmara Denizi'nden elde edilen *Mullus barbatus* ve *Mullus barbatus ponticus* türlerinin ölçülen morfolojik karakterlerinin ortalama değerleri (cm).

Morfolojik Karakter	Akdeniz	Ege	Karadeniz	Marmara	<i>M.b. ponticus</i>	Mb Ort	Mb+Mbp Ort
1	15,06	16,06	16,04	15,58	13,72	15,68	15,29
2	13,22	14,74	14,39	13,56	12,10	13,98	13,60
3	12,00	13,56	13,15	12,25	10,98	12,74	12,39
4	5,19	5,94	5,72	5,56	4,77	5,60	5,44
5	3,17	3,34	3,35	3,26	2,95	3,28	3,21
6	1,43	1,44	1,48	1,44	1,29	1,45	1,42
7	0,89	0,90	0,92	0,90	0,83	0,90	0,89
8	1,07	1,06	1,10	1,06	1,12	1,07	1,08
9	1,04	1,05	1,08	1,05	0,92	1,05	1,03
10	3,48	3,97	3,83	3,72	3,17	3,75	3,63
11	2,68	2,83	2,84	2,75	2,85	2,77	2,79
12	1,50	1,55	1,57	1,53	1,26	1,54	1,48
13	3,29	3,73	3,61	3,50	3,23	3,53	3,47

Çizelge 4.2.'de, "Akdeniz", "Ege", "Karadeniz" ve "Marmara" başlıklı sütunların altında, ilgili bölgelerden elde edilen *Mullus barbatus* örneklerinin morfolojik karakterlerinin ölçülen uzunluk değerleri verilmiştir. *M.b. ponticus*'a ait ortalama değerlerin farkını vurgulamak amacıyla bu alt türe ait değerler "*M.b. ponticus*" sütunu altında ayrı olarak verilmiştir. Yine aynı amaçla, Türkiye ihtiyofaunasında bulunan, tüm bölgelere ait morfolojik karakter değerlerinin ortalaması alınırken, "Mb Ort" sütununda sadece *M. barbatus*'lara ait değerler kullanılmış, "Mb+Mbp Ort" sütununda ortalamaya *M. barbatus ponticus*'a ait değerler de eklenmiştir.

Çizelge 4.3. Akdeniz, Ege Denizi, Karadeniz ve Marmara Denizi'nden elde edilen *Mullus surmuletus* türlerinin ölçülen morfolojik karakterlerinin ortalama değerleri (cm).

Morfolojik Karakter	Akdeniz	Ege	Ege 2	Karadeniz	Marmara	Ortalama
1	15,98	16,47	14,83	14,84	14,39	15,30
2	13,96	14,57	13,14	13,04	12,57	13,45
3	12,85	13,66	12,13	12,12	11,40	12,43
4	5,49	5,66	5,19	5,09	4,94	5,27
5	3,70	3,70	3,34	3,38	3,28	3,48
6	1,55	1,43	1,38	1,36	1,32	1,41
7	0,91	0,90	0,91	0,83	0,80	0,87
8	1,42	1,43	1,14	1,30	1,26	1,31
9	1,12	1,15	1,03	1,04	1,00	1,07
10	3,96	4,07	3,61	3,67	3,56	3,77
11	2,90	3,07	2,77	2,73	2,65	2,82
12	1,63	1,66	1,41	1,50	1,45	1,53
13	3,42	3,52	3,09	3,17	3,08	3,25

Çizelge 4.3.'de, "Akdeniz", "Ege", "Karadeniz" ve "Marmara" başlıklı sütunların altında, ilgili bölgelerden elde edilen *Mullus surmuletus* örneklerinin morfolojik karakterlerinin ölçülen uzunluk değerleri verilmiştir. "Ege 2" başlıklı sütun, renk olarak diğer *M. surmuletus* örneklerinden ayrılan örneklerinin bulunduğu gruba ait uzunluk değerlerini içermektedir. "Ortalama" başlığı altındaki sütunda ise elde edilen tüm *M. surmuletus* türlerinin morfolojik karakterlerine ait ortalama değerler verilmiştir.

Çizelge 4.4.'de, *U. moluccensis* ve *U. pori* başlıklı sütunlar altında, ilgili türlere ait, ölçülen morfolojik karakterlerin ortalama değerleri verilmiştir. Bu iki türe ait örnekler sadece Akdeniz'den elde edildiğinden, morfolojik karakter değerlerini diğer bölgelerdeki popülasyonlara ait morfolojik karakter değerleriyle karşılaştırma imkanı olmamıştır.

Çizelge 4.4. Akdeniz'den elde edilen *Upeneus moluccensis* ve *Upeneus pori* türlerinin ölçülen morfolojik karakterlerinin ortalama değerleri (cm).

Morfolojik Karakter	<i>U. moluccensis</i>	<i>U. pori</i>
1	14,50	15,29
2	12,80	13,44
3	11,71	12,03
4	5,18	5,26
5	3,13	3,12
6	1,46	1,32
7	0,88	0,83
8	0,96	1,02
9	0,99	1,00
10	3,55	3,55
11	2,73	2,25
12	1,47	1,37
13	2,87	3,02

“Standart Boy” değerlerinin diğer morfolojik karakterlerin değerlerine oranlanmasıyla elde edilen değerler Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Mullus barbatus türlerinde ve Mullus barbatus ponticus alt türünde, “Standart Boy” un diğer morfolojik karakterlere oranı.

Morfolojik Karakter	Akdeniz	Ege	Karadeniz	Marmara	M.b. Ponticus	Mb Ort	Mb+Mbp Ort
3/1	0,80	0,84	0,82	0,79	0,80	0,81	0,81
3/2	0,91	0,92	0,91	0,90	0,91	0,91	0,91
3/3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3/4	2,31	2,28	2,30	2,20	2,30	2,28	2,28
3/5	3,79	4,06	3,93	3,76	3,72	3,88	3,86
3/6	8,39	9,42	8,89	8,51	8,51	8,79	8,73
3/7	13,48	15,07	14,29	13,61	13,23	14,16	13,92
3/8	11,21	12,79	11,95	11,56	9,80	11,91	11,47
3/9	11,54	12,91	12,18	11,67	11,93	12,13	12,03
3/10	3,45	3,42	3,43	3,29	3,46	3,40	3,41
3/11	4,48	4,79	4,63	4,45	3,85	4,60	4,44
3/12	8,00	8,75	8,38	8,01	8,71	8,27	8,37
3/13	3,65	3,64	3,64	3,50	3,40	3,61	3,57

Çizelge 4.6. Mullus surmuletus türlerinde, “Standart Boy” un diğer morfolojik karakterlere oranı.

Morfolojik Karakter	Akdeniz	Ege	Ege 2	Karadeniz	Marmara	Ortalama
3/1	0,80	0,83	0,82	0,82	0,79	0,81
3/2	0,92	0,94	0,92	0,93	0,91	0,92
3/3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3/4	2,34	2,41	2,34	2,38	2,31	2,36
3/5	3,48	3,69	3,64	3,58	3,48	3,57
3/6	8,29	9,53	8,79	8,89	8,64	8,82
3/7	14,19	15,13	13,31	14,66	14,25	14,30
3/8	9,08	9,57	10,64	9,32	9,05	9,50
3/9	11,47	11,93	11,77	11,70	11,40	11,66
3/10	3,24	3,36	3,36	3,30	3,20	3,30
3/11	4,44	4,44	4,39	4,44	4,30	4,40
3/12	7,88	8,40	7,33	8,59	7,60	8,57
3/13	3,76	3,88	3,93	3,82	3,70	3,82

Çizelge 4.7. Upeneus moluccensis ve Upeneus pori türlerinde, “Standart Boy” un diğer morfolojik karakterlere oranı.

Morfolojik Karakterler	U. moluccensis	U. pori
3/1	0,81	0,79
3/2	0,91	0,89
3/3	1,00	1,00
3/4	2,26	2,29
3/5	3,74	3,86
3/6	8,02	9,09
3/7	13,38	14,52
3/8	12,26	11,80
3/9	11,89	12,03
3/10	3,30	3,39
3/11	4,30	5,34
3/12	7,97	8,80
3/13	4,09	3,98

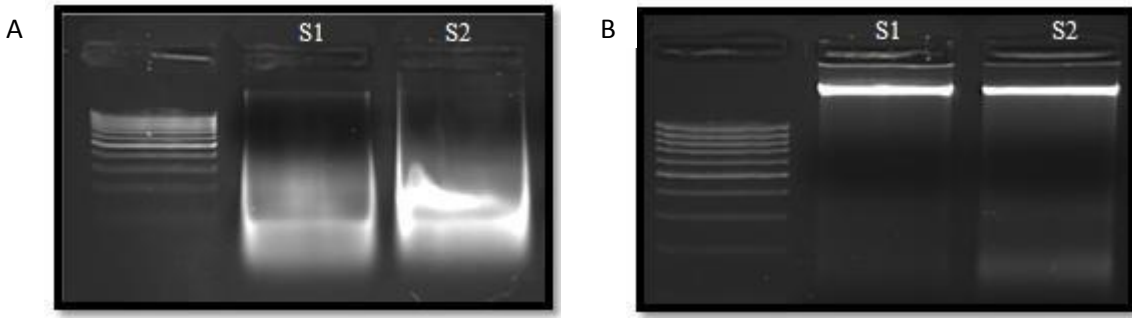
4.2. Moleküler Analiz

4.2.1. DNA izolasyonu

Türkiye denizlerinden elde edilen *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus pori* ve *Upeneus moluccensis* türleri ile *Mullus barbatus ponticus* alt türüne ait örneklerin DNA izolasyon sonuçları, 3 değişken doğrultusunda farklılıklar göstermiştir.

Bunlardan birincisi DNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılan, dokuyu saklama yöntemidir. Saklama koşulları, -20°C’de %95 etanol içeren ve içermeyen tüplerde olan doku örneklerinden, %95 etanol içeren tüplerde saklanan örneklerden daha çok miktarda (ng/µl) ve optimuma daha yakın A260/280 nm saflık değerine sahip DNA elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmada, -20°C’de, %95’lik etanol içeren tüpler içerisinde saklama yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir.

DNA izolasyonu sonuçlarını etkileyen ikinci değişken ise kullanılan DNA izolasyon yöntemi olmuştur. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi ile elde edilen DNA’lar miktar olarak Promega Genomic DNA Purification Kit ile elde edilen DNA’ların miktarından fazla olmasına rağmen, Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi ile elde edilen DNA’ların jel elektroforezi sonrasında elde edilen görüntülerinde tespit edilen DNA degradasyonunun, PCR aşamasında sorun yaratabileceğine karar verilmiştir. Bu nedenle, çalışmada Promega Genomic DNA Purification Kit kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.1. İki *Mullus barbatus* örneğinden izole edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde yapılan elektroforetik analizinin görüntüleri. A) Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi ile elde edilen DNA'da görülen degradasyon. B) Wizard Genomic DNA Purification Kit ile izole edilen DNA.

DNA sonuçlarını etkileyen son faktör ise, DNA izolasyonunda kullanılan doku çeşidi olmuştur. Üç farklı doku çeşidi (karaciğer, sırt kası, pul) ile gerçekleştirilen denemelerde en yüksek miktarda DNA (Ortalama 1136,01 ng/µl) karaciğer dokusundan elde edilmiştir. Sırt kası dokusundan izole edilen DNA'lar, saflık (A260/280 nm) bakımından en iyi sonuçları vermiş (Ortalama A260/280 = 1,86) olmasına rağmen miktar olarak karaciğer dokusunun çok gerisinde kalmıştır (Ortalama 133,56 ng/µl). Karaciğer dokusu ise saflık bakımından sırt kasına oranla daha kötü sonuçlar (Ortalama A260/280 = 1,93) vermesine rağmen, aradaki fark göz ardı edilebilecek kadar azdır. Üçüncü doku tipi olan pullardan elde edilen DNA ise hem miktar (Ortalama 21,32 ng/µl) hem de saflık (Ortalama A260/280 = 1,69) bakımından diğer iki dokunun çok altında kalmıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak çalışmaların karaciğer dokusu ile yürütülmesine karar verilmiştir.

Karaciğer dokusundaki bozulma yüzünden DNA izolasyonu yapılamayan örnekler (Çizelge 4.8.) araştırmadan çıkarılmıştır.

Çizelge 4.8. DNA izolasyonu yapılamayan örnekler.

Bölge	Tür	No
Akdeniz	<i>Upeneus pori</i>	7
Akdeniz	<i>Upeneus pori</i>	16, 19
Ege	<i>Mullus surmuletus</i>	3, 4, 5, 10, 14, 17
Karadeniz	<i>Mullus surmuletus</i>	13

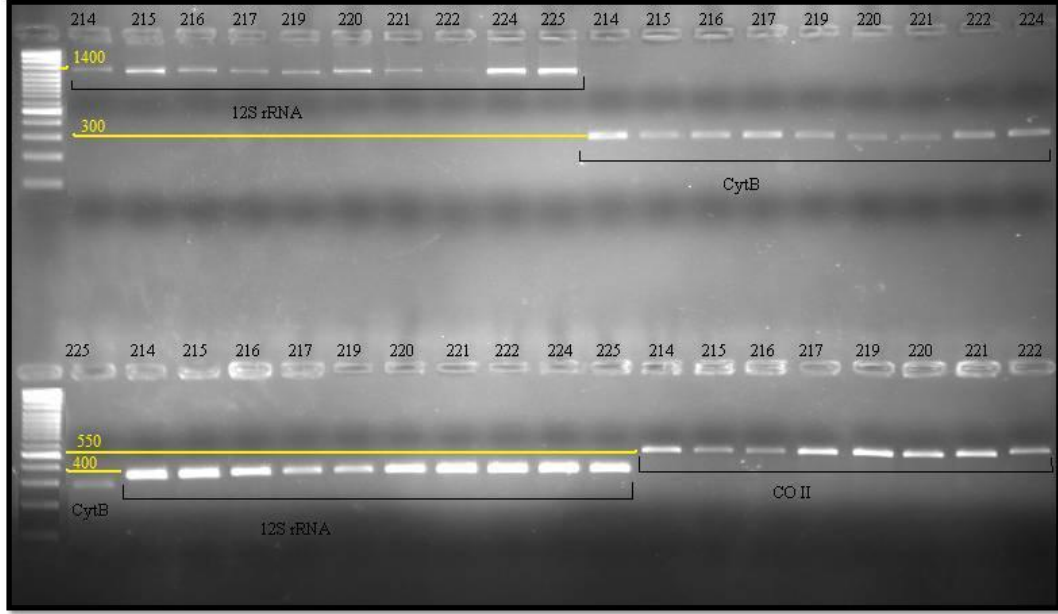
4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin optimum erime sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonları Çizelge 4.9.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Primer çiftlerinin optimum erime sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonları.

Primer Çifti	Gen	Erime Sıcaklığı	MgCl ₂ Konsantrasyonu
L1091 + H3080	16S rRNA	55°C	2 mM
L14841 + H15149	CytB	50°C	2 mM
L1091 + H1478	12S rRNA	64°C	2 mM
L7450 + H8055	CO II	50°C	2 mM

Primerler optimize edildikten sonra tüm örneklerin 16S rRNA, CytB, 12S rRNA ve CO II mtDNA bölgeleri çoğaltıldı. %2'lik agaroz jel kullanılarak yapılan elektroforetik analiz sonrasında görüntülenen örneklerden bant vermeyen veya zayıf bant veren örnekler tekrarlandı. Tekrarlar sonucunda da sonuç vermeyen örnekler (Çizelge 4.10.) araştırmadan çıkarıldı.



Şekil 4.2. *Mullus barbatus ponticus* örneklerine (214-225) ait dört farklı bölgenin PCR ürünlerinin %2'lik Jelde görüntüsü. Birinci kuyuya yüklenen belirteç yardımıyla çoğaltılan bölgelerin uzunlukları (bç) tespit edilebilmektedir.

Çizelge 4.10. PCR sonrası sonuç alınamayan örnekler.

Bölge	Tür	DNA İndeks No
Akdeniz	<i>Mullus barbatus</i>	6, 9, 11, 15, 16, 20
Akdeniz	<i>Mullus surmuletus</i>	33, 40
Akdeniz	<i>Upeneus pori</i>	51
Akdeniz	<i>Upeneus moluccensis</i>	69, 75, 76, 77
Ege	<i>Mullus barbatus</i>	84, 92, 95
Ege	<i>Mullus surmuletus</i> (2)	124, 125
Marmara	<i>Mullus barbatus</i>	135, 146, 151
Marmara	<i>Mullus surmuletus</i>	156, 159, 160, 164, 165, 166, 167, 169
Karadeniz	<i>Mullus barbatus</i>	175, 182, 184, 189, 190, 191, 192, 193
Karadeniz	<i>Mullus surmuletus</i>	195, 197, 198, 201, 205, 207, 208

4.2.3. Dizi analizi

Dizi analizi öncesindeki saflaştırma (pürifikasyon) aşamasında 2 farklı yöntem denenmiştir. Plate yöntemi ile elde edilen ürün miktarı, kolon yöntemi ile elde edilen ürün miktarından, denenilen tüm örneklerde (n=50), daha fazla olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca plate yönteminin, fazla örnek ile yapılan çalışmalarda, kolon yöntemine göre daha pratik ve hızlı olduğu gözlemlendiğinden, saflaştırma aşamasında plate yöntemi kullanılmıştır.

Plate Yöntemi'ne uygun olarak gerçekleştirilen saflaştırma aşamasının ardından, her tür için en iyi sonuç alınan oniki örnek belirlenerek, dizi analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Dizi analizinde kullanılmak üzere seçilen örnekler.

Bölge	Tür	DNA İndeks No
Akdeniz	<i>Mullus barbatus</i>	2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 18, 19, 21
Akdeniz	<i>Mullus surmuletus</i>	22, 25, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41
Akdeniz	<i>Upeneus pori</i>	46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60
Akdeniz	<i>Upeneus moluccensis</i>	61, 62, 63, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 78, 79
Ege	<i>Mullus barbatus</i>	80, 81, 82, 88, 89, 90, 91, 93, 96, 97, 98, 99
Ege	<i>Mullus surmuletus</i>	100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113
Ege	<i>Mullus surmuletus</i> (2)	116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 131
Marmara	<i>Mullus barbatus</i>	136, 137, 139, 141, 142, 144, 145, 147, 148, 149, 150, 153
Marmara	<i>Mullus surmuletus</i>	154, 155, 157, 158, 161, 162, 163, 168, 170, 171, 172, 173
Karadeniz	<i>Mullus barbatus</i>	174, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 185, 186, 187, 188
Karadeniz	<i>Mullus surmuletus</i>	194, 196, 199, 200, 202, 203, 204, 209, 210, 211, 212, 213
Karadeniz	<i>Mullus barbatus ponticus</i>	214, 215, 216, 217, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 228

Dizi analizine başlamadan önce, dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu için hazırlanan optimizasyon protokolleri denendi. Uygun olarak seçilen protokol Çizelge 4.12.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu için uygulanan protokol.

Bileşen	Hacim
DTCS Premix	4 µl
Primer (1.6 pM/µl)	1 µl
DNA	2 µl
Distile Su	2 µl
Tampon	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

16S rRNA bölgesinden istenilen kalitede sonuç elde edilemedi. Elde edilen sonuçların da tutarsız olması nedeni ile 16S rRNA bölgesi araştırmadan çıkarıldı.

4.2.4. Filogenetik analiz

Dizi analizi sonrasında elde edilen DNA dizileri, Sequencher 4.7 ve MEGA4 programları kullanılarak hizalanmıştır. Ege bölgesinden elde edilen ve morfolojik olarak fark gösteren iki *Mullus surmuletus* varyetesinin, dizi analizi yapılan 3 bölgede de, birbiriyle tamamen aynı DNA dizisine sahip olduğu belirlendiğinden tek bir grup altında birleştirilmiştir. Türlerle ait elde edilen diziler aşağıda verilmiştir:

```

1      TTAGGCCTCT GCCTAGCAAC TCAAATTGTG ACAGGACTCT
41     TCCTGGCAAT GCACTACACC TCTGACATCG CCACAGCCTT
81     CTCTCCGTC GCCCACATTT GCCGCGACGT TAACTATGGA
121    TGATTTATTC GTAACATGCA CGCAAACGGA GCATCCTTCT
161    TCTTTATTTG CATTATATG CACATCGGAC GAGGCCTCTA
201    TTACGGCTCA TACTTATATA AAGAGACATG AAATGTAGGC
241    GTTGTTCCTC TTCTGCTAGT TATGATGACT GCATTTCGTGG
281    GCTACGTCCT TCCTTGAGGA CAAATATCAT TCTGAGGGGC
321    TGCAGT

```

Şekil 4.3. Akdeniz *Mullus barbatus*, CytB bölgesi DNA dizisi.

```

1      CTCTGCTAGG CCTCTGCTTA GCCACTCAAA TTGTAACAGG
41     ACTCTTCCTG GCAATACACT ACACCTCTGA TATCGCCACA
81     GCTTTCTCCT CCGTTGCCCA CATCTGCCGC GACGTTAACT
121    ATGGATGATT TATCCGTAAC ATACATGCAA ACGGAGCATC
161    CTTCTTCTTC ATCTGCATCT ACATGCACAT CGGACGAGGC
201    CTCTACTACG GCTCATATCT ATACAAAGAG ACATGAAACG
241    TCGGCGTTAT TCTCCTCCTC CTAGTTATGA TGA CTGCCTT
281    CGTGGGCTAC GTCCTTCCTT GAGGACAAAT ATCATTCTGA
321    GGGGCTGCAG T

```

Şekil 4.4. Akdeniz *Mullus surmuletus*, CytB bölgesi DNA dizisi.

```

1      TACAGGACTA TTCCTAGCGA TGCACTATAC CTCAGACATT
41     GCCACTGCTT TCTCCTCCGT CGCACACATC TGTCGCGACG
81     TAAACTACGG ATGACTTATC CGTAAACATGC ACGCCAATGG
121    CGCTTCTTTC TTCTTCATCT GCATCTACAT GCACATCGCT
161    CGAGGCCTTT ACTACGGCTC ATATTTATAT AAAGAAACAT
201    GAAATGTCGG AGTAGTACTG CTCCTCCTTG TCATGATGAC
241    CGCCTTCGTG GGCTACGTCC TACCATGAGG ACAAATATCA
281    TTCTGAGGGG CTGCAGT

```

Şekil 4.5. Akdeniz *Upeneus pori*, CytB bölgesi DNA dizisi.

```

1      CCCTACTAGG CCTCTGCCTA GCTACCCAAA TTGTCACAGG
41     ACTATTCCTA GCAATGCACT ACACATCAGA CATTGCCACA
81     GCTTTCTCAT CTGTGGCCCA CATTGCCGT  GATGTAAACT
121    ACGGCTGACT AATCCGTAAT ATGCATGCCA ACGGCGCCTC
161    TTTCTTCTTT ATTTGCATCT ACCTCCACAT TGGCCGAGGA
201    CTTTACTACG GCTCTTACCT GTATAAAGAA ACATGAAATG
241    TGGGAGTTGT GCTTCTACTC CTAGTCATGA TGACTGCCTT
281    CGTCGGCTAC GTCCTCCCT  GAGGACAAAT ATCATTCTGA
321    GGGGCTGCAG T

```

Şekil 4.6. Akdeniz *Upeneus moluccensis*, *CytB* bölgesi DNA dizisi.

```

1      TTAGGCCTCT GCCTAGCAAC TCAAATTGTG ACAGGACTCT
41     TCCTGGCAAT GCACTACACC TCTGACATCG CCACAGCCTT
81     CTCCTCCGTC GCCCACATTT GCCGCGACGT  TAACTATGGA
121    TGATTTATTG GTAACATGCA CGCAAACGGA GCATCCTTCT
161    TCTTTATTTG CATTTATATG CACATCGGAC GAGGCCTCTA
201    TTACGGCTCA TACTTATATA AAGAGACATG AAATGTAGGC
241    GTTATTCTTC TTCTGCTAGT TATGATGACT GCATTTCGTGG
281    GCTACGTCCT TCCTTGAGGA CAAATATCAT TCTGAGGGGC
321    TGCAGT

```

Şekil 4.7. Ege *Mullus barbatus*, *CytB* bölgesi DNA dizisi.

```

1      CTCIGCTAGG CCTCTGCTTA GCCACTCAAA TTGTAACAGG
41     ACTCTTCCTG GCAATACACT ACACCTCTGA TATCGCCACA
81     GCTTTCTCCT CCGTTGCCCA CATCTGCCGC GACGTTAACT
121    ATGGATGATT TATCCGTAAC ATACATGCAA ACGGAGCATC
161    CTTCTTCTTC ATCTGCATCT ACATGCACAT CGGACGAGGC
201    CTCTACTACG GCTCATATCT ATACAAAGAG ACATGAAACG
241    TCGGCGTTAT TCTCCTCCTC CTAGTTATGA TGACTGCCTT
281    CGTGGGCTAC GTCCTTCCCT  GAGGACAAAT ATCATTCTGA
321    GGGGCTGCAG T

```

Şekil 4.8. Ege *Mullus surmuletus*, *CytB* bölgesi DNA dizisi.

```

1      TTAGGCCTCT GCCTAGCAAC TCAAATTGTG ACAGGACTCT
41     TCCTGGCAAT GCACTACACC TCTGACATCG CCACAGCCTT
81     CTCCTCCGTC GCCCACATTT GCCGCGACGT TAACTATGGG
121    TGATTTATTC GTAACATGCA CGCAAACGGA GCATCCTTCT
161    TCTTTATTTG CATTATATG CACATCGGAC GAGGCCTCTA
201    TTACGGCTCA TACTTATATA AAGAGACATG AAATGTAGGC
241    GTTATTCTTC TTCTGCTAGT TATGATGACT GCATTTCGTGG
281    GCTACGTCCT TCCTTGAGGA CAAATATCAT TCTGAGGGGC
321    TGCAGT

```

Şekil 4.9. Marmara *Mullus barbatus*, *CytB* bölgesi DNA dizisi.

```

1      CTCTGCTAGG CCTCTGCTTA GCCACTCAAA TTGTAACAGG
41     ACTCTTCCTG GCAATACACT ACACCTCTGA TATCGCCACA
81     GCTTTCTCCT CCGTTGCCCA CATCTGCCGC GACGTTAACT
121    ATGGATGATT TATCCGTAAC ATACATGCAA ACGGAGCATC
161    CTTCTTCTTC ATCTGCATCT ACATGCACAT CGGACGAGGC
201    CTCTACTACG GCTCATATCT ATACAAAGAG ACATGAAACG
241    TCGGCGTTAT TCTCCTCCTC CTAGTTATGA TGACTGCCTT
281    CGTGGGCTAC GTCCTTCCCT GAGGACAAAT ATCATTCTGA
321    GGGGCTGCAG T

```

Şekil 4.10. Marmara *Mullus surmuletus*, *CytB* bölgesi DNA dizisi.

```

1      TTAGGCCTCT GCCTAGCAAC TCAAATTGTG ACAGGACTCT
41     TCCTGGCAAT GCACTACACC TCTGACATCG CCACAGCCTT
81     CTCCTCCGTC GCCCACATTT GCCGCGACGT TAACTATGGA
121    TGATTTATTC GTAACATGCA CGCAAACGGA GCATCCTTCT
161    TCTTTATTTG CATTATATG CACATCGGAC GAGGCCTCTA
201    TTACGGCTCA TACTTATATA AAGAGACATG AAATGTAGGC
241    GTTATTCTTC TTCTGCTAGT TATGATGACT GCATTTCGTGG
281    GCTACGTCCT TCCTTGAGGA CAAATATCAT TCTGAGGGGC
321    TGCAGT

```

Şekil 4.11. Karadeniz *Mullus barbatus*, *CytB* bölgesi DNA dizisi.

```

1      CTCTGCTAGG CCTCTGCTTA GCCACTCAAA TTGTAACAGG
41     ACTCTTCCTG GCAATACACT ACACCTCTGA TATCGCCACA
81     GCTTTCTCCT CCGTTGCCCA CATCTGCCGC GACGTTAACT
121    ATGGATGATT TATCCGTAAC ATACATGCAA ACGGAGCATC
161    CTTCCTTCTC ATCTGCATCT ACATGCACAT CGGACGAGGC
201    CTCTACTACG GCTCATATCT ATACAAAGAG ACATGAAACG
241    TCGGCGTTAT TCTCCTCCTC CTAGTTATGA TGACTGCCTT
281    CGTGGGCTAC GTCCTTCCCT GAGGACAAAT ATCATTCTGA
321    GGGGCTGCAG T

```

Şekil 4.12. Karadeniz *Mullus surmuletus*, CytB bölgesi DNA dizisi.

```

1      TTAGGCCTCT GCCTAGCAAC TCAAATTGIG ACAGGACTCT
41     TCCITGGCAAT GCACTACACC TCTGACATCG CCACAGCCTT
81     CTCCITCCGTC GCCCACATTT GCCGCGACGT TAACTATGGA
121    TGATTTATTG GTAACATGCA CGCAAACGGA GCATCCTTCT
161    TCTTTATTTG CATTTATATG CACATCGGAC GAGGCCTCTA
201    TTACGGCTCA TACTTATATA AAGAGACATG AAATGTAGGC
241    GTTATTCTTC TTCTGCTAGT TATGATGACT GCATTCTGTTG
281    GCTACGTCCT TCCTTGAGGA CAAATATCAT TCTGAGGGGC
321    TGCAGT

```

Şekil 4.13. Karadeniz *Mullus barbatus ponticus*, CytB bölgesi DNA dizisi.

```

1      ACACCGATAT GATCTTACAA GAATTATCCG CCTGGGGACT
41     ACGAGCATTG GCTTGAAACC CAAAGGACTT GGCGGTGCTT
81     TAGACCCACC TAGGAGGAGC CTGTTTCTAT AACCGATGAC
121    CCCCCTTAAA CCTCACCTT CCGAATATTA GCCTATATAC
161    CGCCGTCGTC AGTTCTTCTT GTGAAGGATC TGTATTGGGC
201    AGGCATGGTA CCACCCGTGA AGACAGGTCG AGGTGTACCA
241    TGTGGAAGGG GAAGAAATTG GCTACATTCG CTGGCTCAGC
281    GAATTACGGA TGGCGCAGTG AAAGCCTGTG CCTGAAGGCG
321    GATTTAAAAG TAAGAGGGGA ATAGAGTGTC CCTCTGAATC
361    AGGCTCTTTA CCGTGACAC ACCGCCGTC ACCCTCTGCA
401    GT

```

Şekil 4.14. Akdeniz *Mullus barbatus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

1	ACACTGATAT	GATCTTACAC	GCATTATCCG	CCTGGGTACT
41	ACGAGCGCTA	GCTTAAAACC	CAAAGGACTT	GGCGGTGCTT
81	TAGACCCACC	TAGGAGGAGC	CTGTTTCTAT	AACCGATAAT
121	CCCCGTTCAA	CCTCACCCCT	CCGTTTATCT	GCCTATATAC
161	CGCCGTCGCC	AGCCCATCCT	GTGAAGGATC	TATAGTGGGC
201	TAGTCTGGTA	CTGCCTCTAA	TGACAGGTCG	AGGTGTAGCA
241	TGTGGAAGGG	GAAGCAATGG	GCTACATTTCG	CTGCCTCAGT
281	GAACTACGAA	CGGCACAGTG	AAAGCCTGTG	CCTGAAGGTG
321	GATTTAGCAG	TAAGGGGGGA	GTAGAGTGCC	CCTCTGAACT
361	TGGCTCTGAA	GTGTGCACAC	ACCGCCCGTC	ACCCTCTGCA
401	GT			

Şekil 4.15. Akdeniz *Mullus surmuletus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

1	TTTGATAAAA	TACCACAAAT	ATTATCCGCC	CGGGTACTAC
41	GAGCACTAGC	TTAAAACCCA	AAGGACTTGG	CGGTGCTTTA
81	GACCCCCCTA	AGAGGAGCCT	GTTTCTAGAA	CCGATAATCC
121	CCGTTCAACC	TCACCCCTCC	CTGTCACTGC	CTATATAACCG
161	CCGTCGCCAG	CCTACCCTGT	GAAGGAACCA	TAGTGGGCTA
201	TACTGGTAAT	ACCCCAAACG	TCAGGTCGAG	GTGTACCATA
241	TGGAGGGGGA	AGCAATGGGC	TACATTCACT	GTGTCAGTGA
281	ATCACAAAAG	GTGCACTGAA	AGACCGCATC	TGAAGGTGGA
321	TTTAGCAGTA	AGGAGGGAGC	AGAGTGCCCC	CCTGAAACCG
361	GCTCTTGAGC	GTGCACACAC	CGCCCGTCAC	CCTCTGCAGT

Şekil 4.16. Akdeniz *Upeneus pori*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

1	TGTTATTATA	CACATTATCC	GCCTGGGTAC	TACGAGCATT
41	ACCTTAAAAC	CCAAAGGACT	TGGCGGTGCT	TTAGACCCCC
81	CTAGGAGGAG	CCTGTTTCTA	GAACCGATGA	TCCCCGTTCA
121	ACCTCACCCCT	TCCCTGTAAC	CGCCTATATA	CCGCCGTCGC
161	CAGCCCACCC	TGTGAAGGAA	CTACAGTGGG	CCACCCCGGT
201	AATACCCCCA	ATGTCAGGTC	GAGGTGTAGC	GTAAGGAAGG
241	GAATGTAATG	GGCTACATTTC	GCTGCCTCAG	CGAACCACGA
281	AAGATACATT	GAAAGACTGT	GTCTGAAGGC	GGATTTAGCA
321	GTAAGGAGAG	AGTAGAGTGC	TCTCCTGAAA	CCGGCTCTTA
361	AGCGTGCACA	CACCGCCCGT	CACCTCTGTC	AGT

Şekil 4.17. Akdeniz *Upeneus moluccensis*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

```

1      ACACCGATAT GATCTTACAA GAATTATCCG CCTGGGGACT
41     ACGAGCATT A GCTTGAAACC CAAAGGACTT GGCGGTGCTT
81     TAGACCCACC TAGGAGGAGC CTGTTTCTAT AACCGATGAC
121    CCCC GTTAAA CCTCACCCCTT CCGAATATTA GCCTATATAC
161    CGCCGTCGTC AGTTCTTCCT GTGAAGGATC TGTATTGGGC
201    AGGCATGGTA CCACCCGTGA AGACAGGTCG AGGTGTAGCA
241    TGTGGAAGGG GAAGAAATTG GCTACATTTCG CTGGCTCAGC
281    GAATTACGGA TGGCGCAGTG AAAGCCTGTG CCTGAAGGCG
321    GATTTAGAAG TAAGAGGGGA ATAGAGTGTC CCTCTGAATC
361    AGGCTCTTTA GCGTGCACAC ACCGCCCGTC ACCCTCTGCA
401    AT

```

Şekil 4.18. Egez *Mullus barbatus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

```

1      ACAC TGATAT GATCTTACAC GCATTATCCG CCTGGGTACT
41     ACGAGCGCTA GCTTAAAACC CAAAGGACTT GGCGGTGCTT
81     TAGACCCACC TAGGAGGAGC CTGTTTCTAT AACCGATAAT
121    CCCC GTTCAA CCTCACCCCTT CCGTTTATCT GCCTATATAC
161    CGCCGTCGCC AGCCCATCCT GTGAAGGATC TATAGTGGGC
201    TAGTCTGGTA CTGCCCTCTAA TGACAGGTCG AGGTGTAGCA
241    TGTGGAAGGG GAAGCAATGG GCTACATTTCG CTGCCTCAGT
281    GAACTACGAA CGGCACAGTG AAAGCCTGTG CCTGAAGGTG
321    GATTTAGCAG TAAGGGGGGA GTAGAGTGCC CCTCTGAACT
361    TGGCTCTGAA GTGTGCACAC ACCGCCCGTC ACCCTCTGCA
401    GT

```

Şekil 4.19. Ege *Mullus surmuletus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

```

1      ACACCGATAT GATCTTACAA GAATTATCCG CCTGGGGACT
41     ACGAGCATT A GCTTGAAACC CAAAGGACTT GGCGGTGCTT
81     TAGACCCACC TAGGAGGAGC CTGTTTCTAT AACCGATGAC
121    CCCC GTTAAA CCTCACCCCTT CCGAATATTA GCCTATATAC
161    CGCCGTCGTC AGTTCTTCCT GTGAAGGATC TGTATTGGGC
201    AGGCATGGTA CCACCCGTGA AGACAGGTCG AGGTGTAGCA
241    TGTGGAAGGG GAAGAAATTG GCTACATTTCG CTGGCTCAAC
281    GAATTACGGA TGGCGCAGTG AAAGCCTGTG CCTGAAGGCG
321    GATTTAAAAG TAAGAGGGGA ATAGAGTGTC CCTCTGAATC
361    AGGCTCTTTA GCGTGCACAC ACCGCCCGTC ACCCTCTGCA
401    GT

```

Şekil 4.20. Marmaraz *Mullus barbatus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

```

1      A C A C T G A T A T   G A T C T T A C A C   G C A T T A T C C G   C C T G G G T A C T
41     A C G A G C G C T A   G C T T A A A A C C   C A A A G G A C T T   G G C G G T G C T T
81     T A G A C C C A C C   T A G G A G G A G C   C T G T T T C T A T   A A C C G A T A A T
121    C C C C G T T C A A   C C T C A C C C T T   C C G T T T A T C T   G C C T A T A T A C
161    C G C C G T C G C C   A G C C C A T C C T   G T G A A G G A T C   T A T A G T G G G C
201    T A G T C T G G T A   C T G C C T C T A A   T G A C A G G T C G   A G G T G T A G C A
241    T G T G G A A G G G   G A A G C A A T G G   G C T A C A T T C G   C T G C C T C A G T
281    G A A C T A C G A A   C G G C A C A G T G   A A A G C C T G T G   C C T G A A G G T G
321    G A T T T A G C A G   T A A G G G G G G A   G T A G A G T G C C   C C T C T G A A C T
361    T G G C T C T G A A   G T G T G C A C A C   A C C G C C C G T C   A C C C T C T G C A
401    G T

```

Şekil 4.21. Marmara *Mullus surmuletus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

```

1      A C A C C G A T A T   G A T C T T A C A A   G A A T T A T C C G   C C T G G G G A C T
41     A C G A G C A T T A   G C T T G A A A C C   C A A A G G A C T T   G G C G G T G C T T
81     T A G A C C C A C C   T A G G A G G A G C   C T G T T T C T A T   A A C C G A T G A C
121    C C C C G T T A A A   C C T C A C C C T T   C C G A A T A T T A   G C C T A T A T A C
161    C G C C G T C G T C   A G T T C T T C C T   G T G A A G G A T C   T G T A T T G G G C
201    A G G C A T G G T A   C C A C C C G T G A   A G A C A G G T C G   A G G T G T A G C A
241    T G T G G A A G G G   G A A A A A A T T G   G C T A C A T T C G   C T G G C T C A A C
281    A A A T T A C G G A   T G G C G C A G T G   A A A C C C T G T G   C C T G A A G G C G
321    G A T T T A A A A G   T A A G A G G G G A   A T A A A G T G T C   C C T C T G A A T C
361    A C G C T C T T T A   G C G T G C A C A C   A C C G C C C G T C   A C C C T C T G C A
401    G T

```

Şekil 4.22. Karadenizdeniz *Mullus barbatus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

```

1      A C A C T G A T A T   G A T C T T A C A C   G C A T T A T C C G   C C T G G G T A C T
41     A C G A G C G C T A   G C T T A A A A C C   C A A A G G A C T T   G G C G G T G C T T
81     T A G A C C C A C C   T A G G A G G A G C   C T G T T T C T A T   A A C C G A T A A T
121    C C C C G T T C A A   C C T C A C C C T T   C C G T T T A T C T   G C C T A T A T A C
161    C G C C G T C G C C   A G C C C A T C C T   G T G A A G G A T C   T A T A G T G G G C
201    T A G T C T G G T A   C T G C C T C T A A   T G A C A G G T C G   A G G T G T A G C A
241    T G T G G A A G G G   G A A G C A A T G G   G C T A C A T T C G   C T G C C T C A G T
281    G A A C T A C G A A   C G G C A C A G T G   A A A G C C T G T G   C C T G A A G G T G
321    G A T T T A G C A G   T A A G G G G G G A   G T A G A G T G C C   C C T C T G A A C T
361    T G G C T C T G A A   G T G T G C A C A C   A C C G C C C G T C   A C C C T C T G C A
401    G T

```

Şekil 4.23. Karadenizdeniz *Mullus surmuletus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

1	ACACCGATAT	GATCTTACAA	GAATTATCCG	CCTGGGGACT
41	ACGAGCATT	GCTTGAAACC	CAAAGGACTT	GGCGGTGCTT
81	TAGACCCACC	TAGGAGGAGC	CTGTTTCTAT	AACCGATGAC
121	CCCCGTTAAA	CCTCACCCCT	CCGAATATTA	GCCTATATAC
161	CGCCGTCGTC	AGTTCTTCCT	GTGAAGGATC	TGTATTGGGC
201	AGGCATGGTA	CCACCCGTGA	AGACAGGTCG	AGGTGTAGCA
241	TGTGGAAGGG	GAAGAAATTG	GCTACATTTC	CTGGCTCAGC
281	GAATTACGGA	TGGCGCAGTG	AAAGCCTGTG	CCTGAAGGCG
321	GATTTAGAAG	TAAGAGGGGA	ATAGAGTGTC	CCTCTGAATC
361	AGGCTCTTTA	CCGTGCACAC	ACCGCCCGTC	ACCTCTGCA
401	GT			

Şekil 4.24. Karadeniz *Mullus barbatus ponticus*, 12S rRNA bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TAACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAGCT	GACTATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGTTAA	CTAATGGCAC
121	ATCCCTCACA	ACTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCCGT
161	AATAGAAGAA	CTCCTTCACT	TCCACGACCA	CGCCCTAATG
201	ATCGTGTTTT	TGATTAGCAC	CTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACGAAG	CTTACAAACA	AATTCCCTCT
281	TGATTCTCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	CGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATGAT	TGCTCTCCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTATCT	AATAGACGAA	ATTAGCAGCC	CCCACCTAAC
401	GATTAAAGCC	GTTGGCCACC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAA
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCCTATATGG
481	TACCAACCCA	AGACCTCACA	CCAGGGCAAT	TCCCATTACT
521	TGAACCCAAC	CATCCGATGG	TGGT	

Şekil 4.25. Akdeniz *Mullus barbatus*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TCACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAACT	GATCATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGCTAA	CCAATGGCAC
121	ACCCCTCACA	ATTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCGTG
161	AATAGAAGAA	CTTCTTCATT	TCCACGACCA	CGCCCTGATG
201	ATCGTGTTTT	TAATTAGCAC	TTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACTAAG	CTTACAAATA	AATTCCCTACT
281	GGACTCCCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	TGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATAAT	TGCTCTTCCC	TCACTACGTA
361	TTCTTTACCT	AATGGATGAA	ATTAGCAGCC	CACACCTAAC
401	AATTAAGGCC	GTCGGCCATC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAG
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCTTATATGG
481	TGCCAACCCA	GGACCTCACA	CCGGGCCAGT	TCCGTTTACT
521	TGAACCCGAT	CATCGAATAG	TATC	

Şekil 4.26. Akdeniz *Mullus surmuletus*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	TCCACATGAC	CACTCTGTCA	CTTTCTTGCA	AGATGCTAGT
41	AAAAC TGATT	ATTACACTGC	TTTGT CAGGG	CAGAATTGCG
81	GGTTT GAGCC	CCGCGCATCT	TGATAAGTAA	TGGCACATCC
121	CTCACAACTA	GGTTTCCAAG	ACGCAGCTTC	CCCCGTAATA
161	GAGGAACTCC	TACATTTCCA	TGACCAIGCC	CTAATGATTG
201	TATTCCTCAT	CAGCACTTTT	GTGCTTTACA	TTATTGTTCG
241	AATGGTTACA	ACAAAAC TCA	CAAATAAATT	CCTGCTTGAT
281	TCCCAAGAAA	TCGAAATTAT	CTGAACGGTA	CTACCAGCGG
321	TAATTCIGAT	TATGATTGCT	CTCCCATCCC	TACGCATTCT
361	CTACCTAATG	GATGAAATTA	ATGACCCCCA	CCTAACCAAT
401	AAAGCAGTTG	GTCACCAGTG	ATACTGAAGC	TATGAGTACA
441	CCGACTACGA	AGACTTAGGT	TTCGATTCC T	ATATGGTACC
481	AACCCAAGAT	CTTACCCCTG	GGCAATTCCG	GCTACTTGAA
521	GCCGACCACC	GAATGGTAAT		

Şekil 4.27. Akdeniz *Upeneus pori*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	TCCACATAAC	CGCTCTGTCA	CTTTCTTATA	AGATGCTAGT
41	AAAATTGATT	ATTACACTGC	CTTGT CAGGG	CAGAATTGTG
81	GGTTTAAGCC	CCGCGCATCT	TGCTAATTAA	TGGCACATCC
121	CTCACAACTA	GGTTTCCAAG	ACGCAGCTTC	CCCCGTGATA
161	GAAGAAC TTC	TTCATTTCCA	TGATCATGCC	CTAATGATTG
201	TAATCTTAAT	TAGCACITTT	GTACTTTACA	TTATTGTAGC
241	GATGGTTACA	ACCAAGCTCA	CAAATAAATT	CCTCCTGGAC
281	TCACAAGAAA	TTGAAATCAT	TTGAACAGTC	CTCCCTGCAG
321	TGATCCTAAT	CATGATTGCC	CTCCCTCAT	TACGAATTCT
361	TTACCTAATG	GACGAAATTA	ATGACCCTCA	CCTAACCAAT
401	AAAGCCGTAG	GCCATCAGTG	ATACTGAAGC	TACGAATATA
441	CAGACTACGA	AGACCTAGGT	TTTGACTCAT	ATATGGTACC
481	TACACAAGAT	CTTACCCCTG	GTCAATTCCG	ACTACTTGAA
521	GCCGACCATC	GAATGGTAAT		

Şekil 4.28. Akdeniz *Upeneus moluccensis*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TAACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAGCT	GACTATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCC GCGC	GTCTTGTTAA	CTAATGGCAC
121	ATCCCTCACA	ACTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCCGT
161	AATAGAAGAA	CTCCTTCACT	TCCACGACCA	CGCCCTAATG
201	ATCGTGT TTT	TGATTAGCAC	CTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACGAAG	CTTACAAACA	AATTCTCTCT
281	TGATTCTCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	CGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATGAT	TGCTCTCCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTATCT	AATAGACGAA	ATTAGCAGCC	CCCACCTAAC
401	GATTAAAGCC	GTTGGCCACC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAA
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCCTATATGG
481	TACCAACCCA	AGACCTCACA	CCAGGGCAAT	TCCCATTACT
521	TGAACCCAAC	CATCCGATGG	TGGT	

Şekil 4.29. Ege *Mullus barbatus*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TCACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAAC	GATCATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGCTAA	CCAATGGCAC
121	ACCCCTCACA	ATTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCTGT
161	AATAGAAGAA	CTTCTTCATT	TCCACGACCA	CGCCCTGATG
201	ATCGTGTTTT	TAATTAGCAC	TTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACCTAAG	CTTACAAATA	AATTCCTACT
281	GGACTCCCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	TGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATAAT	TGCTCTTCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTACCT	AATGGATGAA	ATTAGCAGCC	CACACCTAAC
401	AATTAAGGCC	GTCGGCCATC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAG
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCTTATATGG
481	TGCCAACCCA	GGACCTCACA	CCGGGCCAGT	TCCGTTTACT
521	TGAAGCCGAT	CATCGAATAG	TATC	

Şekil 4.30. Ege Mullus surmuletus, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TAACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAGCT	GACTATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGTTAA	CTAATGGCAC
121	ATCCCTCACA	ACTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCCGT
161	AATAGAAGAA	CTCCTTCACT	TCCACGACCA	CGCCCTAATG
201	ATCGTGTTTT	TGATTAGCAC	CTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACGAAG	CTTACAAACA	AATTCCTCCT
281	TGATTCTCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	CGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATGAT	TGCTCTCCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTATCT	AATAGACGAA	ATTAGCAGCC	CCCACCTAAC
401	GATTAAAGCC	GTTGGCCACC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAA
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCCTATATGG
481	TGCCAACCCA	AGACCTCACA	CCAGGGCAAT	TCCCATTACT
521	TGAACCCAAC	CATCCGATGG	TGGT	

Şekil 4.31. Marmara Mullus barbatus, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TCACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAAC	GATCATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGCTAA	CCAATGGCAC
121	ACCCCTCACA	ATTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCTGT
161	AATAGAAGAA	CTTCTTCATT	TCCACGACCA	CGCCCTGATG
201	ATCGTGTTTT	TAATTAGCAC	TTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACCTAAG	CTTACAAATA	AATTCCTACT
281	GGACTCCCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	TGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATAAT	TGCTCTTCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTACCT	AATGGATGAA	ATTAGCAGCC	CACACCTAAC
401	AATTAAGGCC	GTCGGCCATC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAG
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCTTATATGG
481	TGCCAACCCA	GGACCTCACA	CCGGGCCAGT	TCCGTTTACT
521	TGAAGCCGAT	CATCGAATAG	TATC	

Şekil 4.32. Marmara Mullus surmuletus, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TAACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAGCT	GACTATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGTTAA	CTAATGGCAC
121	ATCCCTCACA	ACTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCCGT
161	AATAGAAGAA	CTCCTTCACT	TCCACGACCA	CGCCCTAATG
201	ATCGTGTTTT	TGATTAGCAC	CTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACGAAG	CTTACAAACA	AATTCCTCCT
281	TGATTCTCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	CGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATGAT	TGCTCTCCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTATCT	AATAGACGAA	ATTAGCAGCC	CCCACCTAAC
401	GATTAAAGCC	GTTGGCCACC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAA
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCCTATATGG
481	TACCAACCCA	AGACCTCACA	CCAAGGCAGT	TCCGATTACT
521	TGAAGCCGAC	CATCGGATGG	TGGT	

Şekil 4.33. Karadeniz *Mullus barbatus*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TCACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAAGCT	GATCATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGCTAA	CCAATGGCAC
121	ACCCCTCACA	ATTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCTGT
161	AATAGAAGAA	CTTCTTCATT	TCCACGACCA	CGCCCTGATG
201	ATCGTGTTTT	TAATTAGCAC	TTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACGAAG	CTTACAAATA	AATTCCTACT
281	GGACTCCCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	TGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATAAT	TGCTCTTCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTACCT	AATGGATGAA	ATTAGCAGCC	CACACCTAAC
401	AATTAAGGCC	GTCGGCCATC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAG
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCTTATATGG
481	TGCCAACCCA	GGACCTCACA	CCGGGCCAGT	TCCGTTTACT
521	TGAAGCCGAT	CATCGAATAG	TATC	

Şekil 4.34. Karadeniz *Mullus surmuletus*, COII bölgesi DNA dizisi.

1	GCCATCCGCA	TAACCGCTCT	GCCACTTTCT	TATAAGACAC
41	TAGTAAAGCT	GACTATTACG	CTGCCTTGTC	GAGGCAGAAT
81	TGTGGGTTTG	AGTCCCGCGC	GTCTTGTTAA	CTAATGGCAC
121	ATCCCTCACA	ACTAGGTTTC	CAAGATGCAG	CTTCCCCCGT
161	AATAGAAGAA	CTCCTTCACT	TCCACGACCA	CGCCCTAATG
201	ATCGTGTTTT	TGATTAGCAC	CTTCGTACTT	TACATTATTG
241	TGGCAATAGT	AACAACGAAG	CTTACAAACA	AATTCCTCCT
281	TGATTCTCAA	GAGATTGAGA	TCATCTGAAC	CGTTCTCCCA
321	GCAGTTATTT	TAATTATGAT	TGCTCTCCCC	TCACTACGCA
361	TTCTTTATCT	AATAGACGAA	ATTAGCAGCC	CCCACCTAAC
401	GATTAAAGCC	GTTGGCCACC	AGTGGTACTG	AAGCTACGAA
441	TATACAGACT	ATGAAGACCT	GGGCTTTGAT	TCCTATATGG
481	TACCAACCCA	AGACCTCACA	CCAAGGCAGT	TCCGATTACT
521	TGAAGCCGAC	CATCGGATGG	TGGT	

Şekil 4.35. Karadeniz *Mullus barbatus ponticus*, COII bölgesi DNA dizisi.

Araştırmada çalışılan türlerin dizilerindeki korunmuş bölgelerin, nükleotit sayısı ve yüzde olarak değerleri, cins içinde (*Mullus* ve *Upeneus*), farklı bölgelere ait örnekler bulunduran türler içinde (*Mullus barbatus* ve *Mullus surmuletus*) Çizelge 4.13.'de verilmiştir. *Mullus barbatus* türüne ait değerler, *Mullus barbatus ponticus*'a ait veriler dahil edilmiş ve edilmemiş olarak, 2 farklı şekilde verilmiştir.

Çizelge 4.13. Korunmuş bölgeler.

Gen	<i>M. barbatus</i> + <i>M.b.</i>					Tüm Gen
	<i>Mullus</i>	<i>Upeneus</i>	<i>M. barbatus</i>	<i>Ponticus</i>	<i>M. surmuletus</i>	
CytB	272/298 (%91.2)	257/298 (%86.2)	296/298 (%99.3)	296/298 (%99.3)	298/298 (%100)	230/298 (%77.1)
12S rRNA	335/395 (%84.8)	343/395 (%86.8)	383/395 (%96.9)	383/395 (%96.9)	393/395 (%99.4)	284/395 (%71.8)
COII	489/540 (%90.5)	472/540 (%87.4)	533/540 (%98.7)	533/540 (%98.7)	538/540 (%99.6)	409/540 (%75.7)

Çeşitli uzunluklarda elde edilen diziler, her bölge için ayrı ayrı, en az dizi uzunluğuna sahip örneğinki ile aynı olacak şekilde düzenlendi. Düzenlemeden sonra örneklerin nükleotit kompozisyonu ve toplam nükleotit sayıları Çizelge 4.14., Çizelge 4.15. ve Çizelge 4.16.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Örneklerin CytB bölgelerinin nükleotit kompozisyonu(%).

	T(U)	C	A	G	Toplam
Akdeniz <i>Mullus barbatus</i>	30.5	25.8	23.2	20.5	298
Ege <i>Mullus barbatus</i>	30.5	25.8	23.5	20.1	298
Marmara <i>Mullus barbatus</i>	30.5	25.8	23.2	20.5	298
Karadeniz <i>Mullus barbatus</i>	30.5	25.8	23.5	20.1	298
Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i>	30.5	25.8	23.5	20.1	298
Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i>	27.9	29.5	23.8	18.8	298
Ege <i>Mullus surmuletus</i>	27.9	29.5	23.8	18.8	298
Marmara <i>Mullus surmuletus</i>	27.9	29.5	23.8	18.8	298
Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i>	27.9	29.5	23.8	18.8	298
Akdeniz <i>Upeneus pori</i>	28.2	28.2	24.2	19.5	298
Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i>	29.2	27.5	23.5	19.8	298
Ortalama	29.2	27.5	23.6	19.6	298

Çizelge 4.15. Örneklerin 12S rRNA bölgelerinin nükleotit kompozisyonu(%).

	T(U)	C	A	G	Toplam
Akdeniz <i>Mullus barbatus</i>	23.4	25.4	24.9	26.2	393
Ege <i>Mullus barbatus</i>	23.4	24.9	24.9	26.7	393
Marmara <i>Mullus barbatus</i>	23.4	24.9	25.2	26.5	393
Karadeniz <i>Mullus barbatus</i>	23.4	25.4	26.0	25.2	393
Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i>	23.4	25.2	24.7	26.7	393
Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i>	23.7	27.2	22.9	26.2	393
Ege <i>Mullus surmuletus</i>	23.7	27.2	22.9	26.2	393
Marmara <i>Mullus surmuletus</i>	23.7	27.2	22.9	26.2	393
Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i>	23.7	27.2	22.9	26.2	393
Akdeniz <i>Upeneus pori</i>	20.1	29.3	26.7	23.9	393
Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i>	21.6	29.0	25.4	23.9	393
Ortalama	23.0	26.6	24.5	25.8	393

Çizelge 4.16. Örneklerin COII bölgelerinin nükleotit kompozisyonu(%).

	T(U)	C	A	G	Toplam
Akdeniz <i>Mullus barbatus</i>	28.0	27.4	27.2	17.4	540
Ege <i>Mullus barbatus</i>	28.0	27.4	27.2	17.4	540
Marmara <i>Mullus barbatus</i>	28.0	27.4	27.0	17.6	540
Karadeniz <i>Mullus barbatus</i>	28.0	26.9	27.0	18.1	540
Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i>	28.0	26.9	27.0	18.1	540
Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i>	29.3	26.1	26.9	17.8	540
Ege <i>Mullus surmuletus</i>	29.1	26.1	26.9	18.0	540
Marmara <i>Mullus surmuletus</i>	29.1	26.1	26.9	18.0	540
Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i>	29.1	26.1	26.9	18.0	540
Akdeniz <i>Upeneus pori</i>	28.0	26.5	28.3	17.2	540
Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i>	29.3	25.2	29.6	15.9	540
Ortalama	28.5	26.5	27.4	17.6	540

Filogenetik ağaçların çizilmesinden önce, “Pairwise Distance” yöntemi kullanılarak, dizi analizi yapılan dört tür, bölgesel varyeteleri ve bir alt türün birbirlerine olan uzaklıkları, CytB bölgesi için Çizelge 4.17.’de, 12S rRNA bölgesi için Çizelge 4.18.’de ve CO II bölgesi için Çizelge 4.19.’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. CytB bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Akdeniz <i>Mullus barbatus</i>											
2. Ege <i>Mullus barbatus</i>	0.003										
3. Marmara <i>Mullus barbatus</i>	0.007	0.003									
4. Karadeniz <i>Mullus barbatus</i>	0.003	0.000	0.003								
5. Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i>	0.003	0.000	0.003	0.000							
6. Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i>	0.093	0.089	0.093	0.089	0.089						
7. Ege <i>Mullus surmuletus</i>	0.093	0.089	0.093	0.089	0.089	0.000					
8. Marmara <i>Mullus surmuletus</i>	0.093	0.089	0.093	0.089	0.089	0.000	0.000				
9. Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i>	0.093	0.089	0.093	0.089	0.089	0.000	0.000	0.000			
10. Akdeniz <i>Upeneus pori</i>	0.193	0.198	0.204	0.198	0.198	0.164	0.164	0.164	0.164		
11. Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i>	0.213	0.219	0.219	0.219	0.219	0.217	0.217	0.217	0.217	0.178	

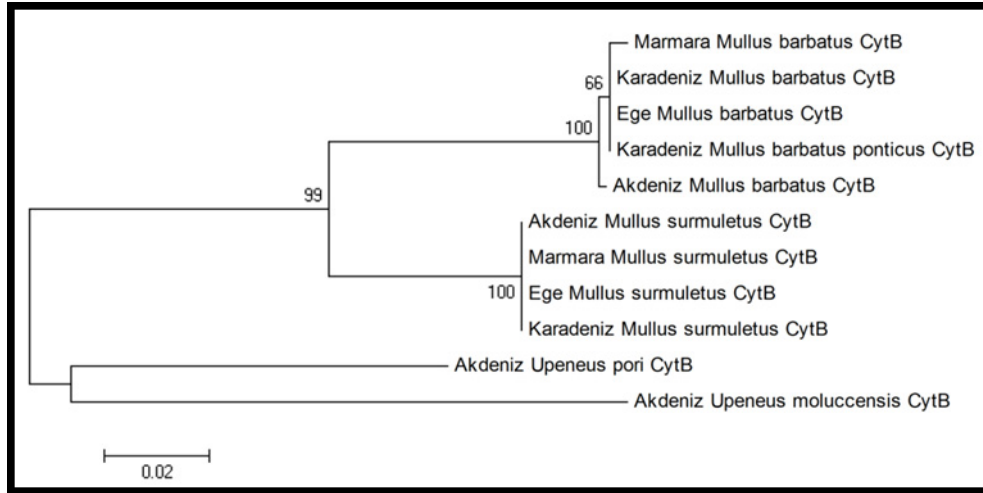
Çizelge 4.18. 12S rRNA bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Akdeniz <i>Mullus barbatus</i>											
2. Ege <i>Mullus barbatus</i>	0.007										
3. Marmara <i>Mullus barbatus</i>	0.006	0.006									
4. Karadeniz <i>Mullus barbatus</i>	0.015	0.015	0.009								
5. Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i>	0.004	0.004	0.006	0.015							
6. Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i>	0.107	0.102	0.104	0.115	0.102						
7. Ege <i>Mullus surmuletus</i>	0.107	0.102	0.104	0.115	0.102	0.000					
8. Marmara <i>Mullus surmuletus</i>	0.107	0.102	0.104	0.115	0.102	0.000	0.000				
9. Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i>	0.107	0.102	0.104	0.115	0.102	0.000	0.000	0.000			
10. Akdeniz <i>Upeneus pori</i>	0.178	0.178	0.181	0.195	0.179	0.120	0.120	0.120	0.120		
11. Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i>	0.163	0.157	0.160	0.173	0.158	0.106	0.106	0.106	0.106	0.102	

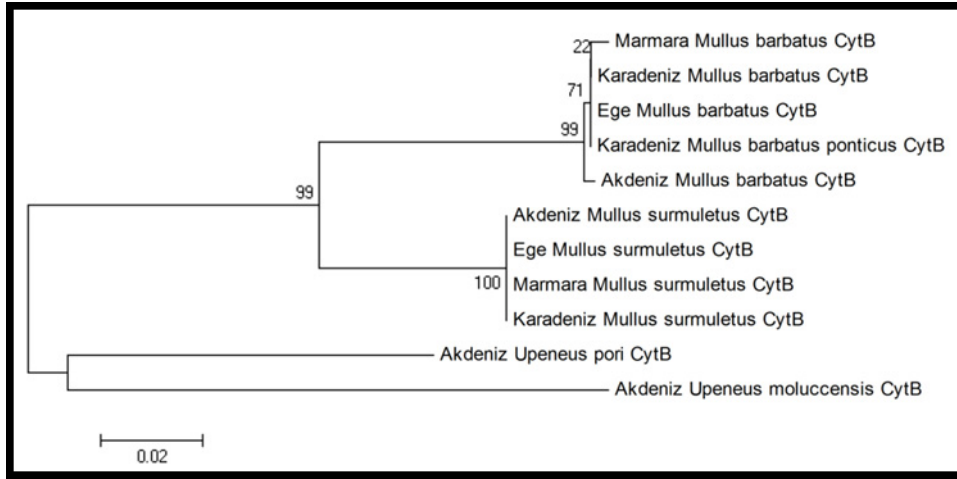
Çizelge 4.19. CO II bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).

Sütun1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Akdeniz <i>Mullus barbatus</i>											
2. Ege <i>Mullus barbatus</i>	0.000										
3. Marmara <i>Mullus barbatus</i>	0.001	0.001									
4. Karadeniz <i>Mullus barbatus</i>	0.007	0.007	0.008								
5. Karadeniz <i>Mullus barbatus ponticus</i>	0.007	0.007	0.008	0.000							
6. Akdeniz <i>Mullus surmuletus</i>	0.064	0.064	0.063	0.061	0.061						
7. Ege <i>Mullus surmuletus</i>	0.064	0.064	0.063	0.058	0.058	0.002					
8. Marmara <i>Mullus surmuletus</i>	0.064	0.064	0.063	0.058	0.058	0.002	0.000				
9. Karadeniz <i>Mullus surmuletus</i>	0.064	0.064	0.063	0.058	0.058	0.002	0.000	0.000			
10. Akdeniz <i>Upeneus pori</i>	0.128	0.128	0.129	0.124	0.124	0.143	0.140	0.140	0.140		
11. Akdeniz <i>Upeneus moluccensis</i>	0.112	0.112	0.114	0.109	0.109	0.114	0.112	0.112	0.112	0.093	

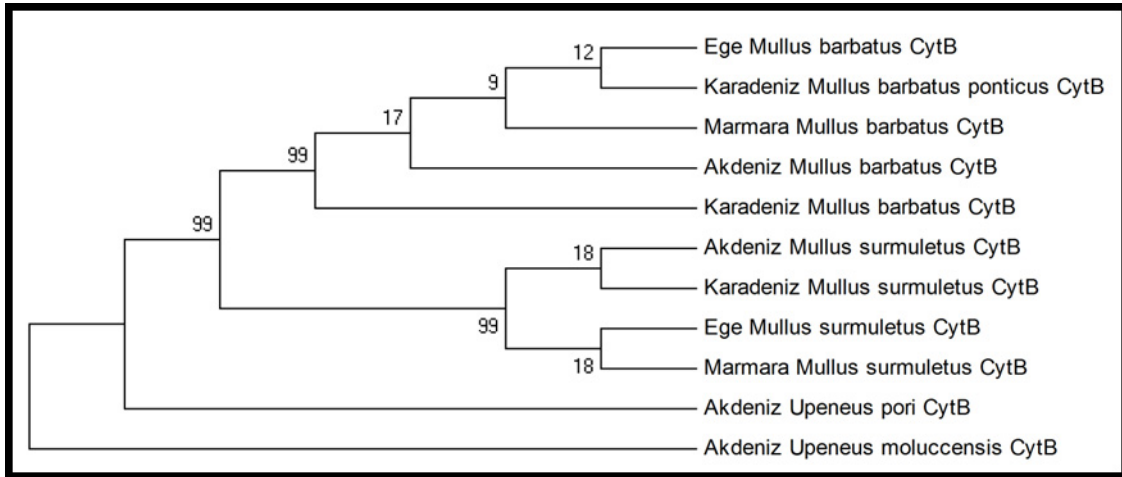
Sıralanan tüm nükleotit dizileri, NJ (Neighbor Joining), ME (Minimum Evolution), MP (Maximum Parsimony) ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) yöntemleri kullanılarak, MEGA4 yazılımı ile analiz edilmiş ve sonuçta her üç gen bölgesi için de dört dendrogram elde edilmiştir (Şekil 4.36. – 4.47.).



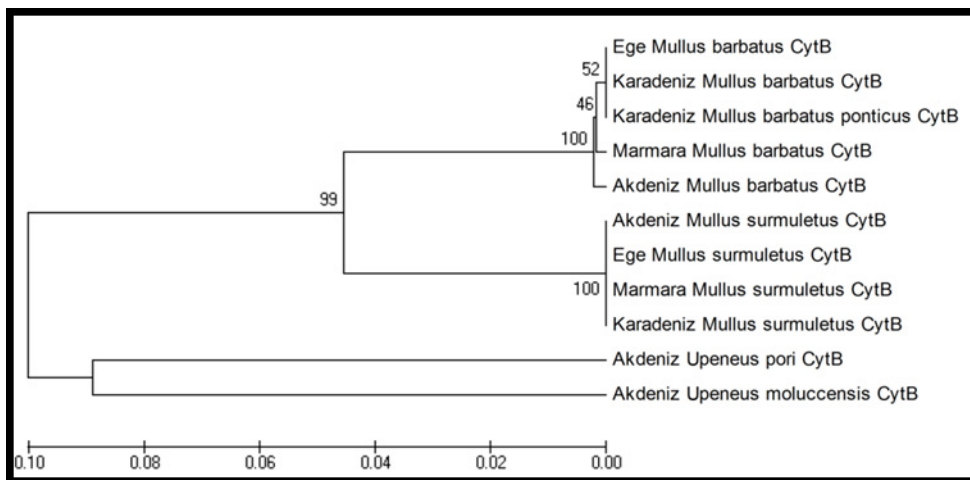
Şekil 4.36. CytB bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı.



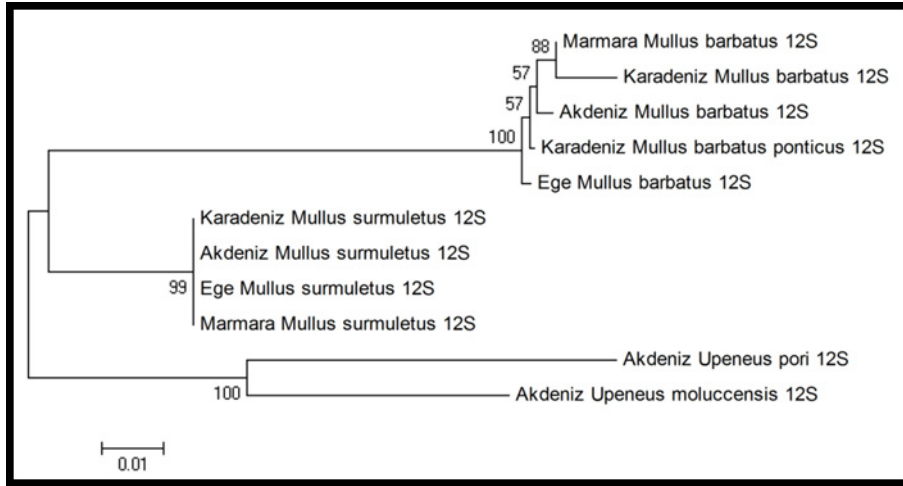
Şekil 4.37. CytB bölgesi için çizilen ME (Minimum Evolution) dendrogramı.



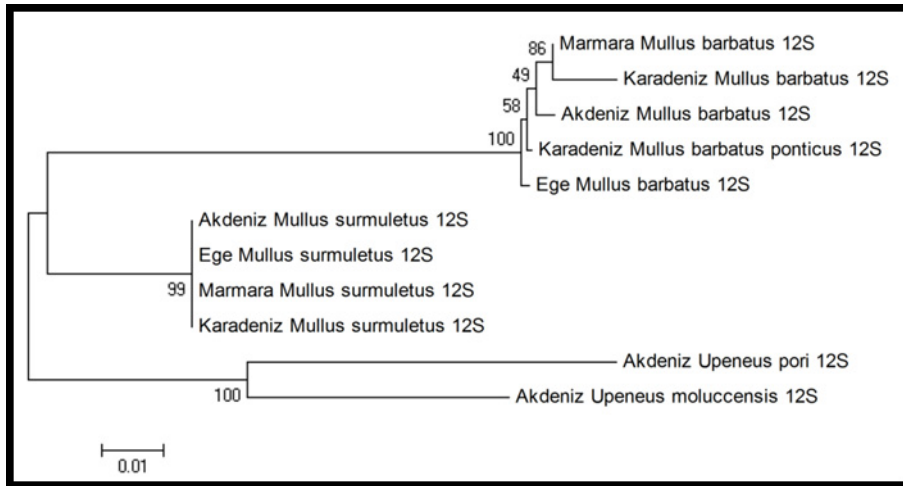
Şekil 4.38. CytB bölgesi için çizilen MP (Maximum Parsimony) dendrogramı.



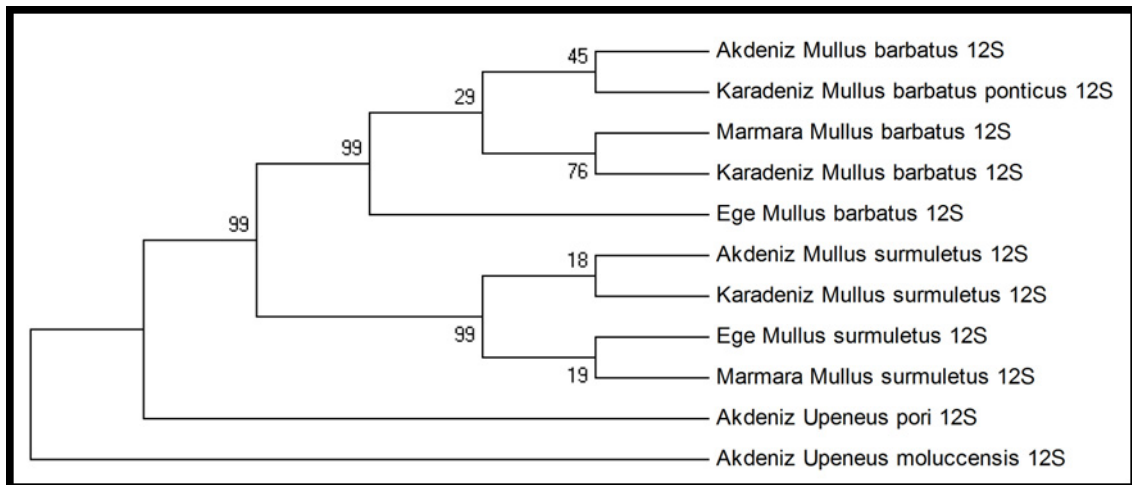
Şekil 4.39. CytB bölgesi için çizilen UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı.



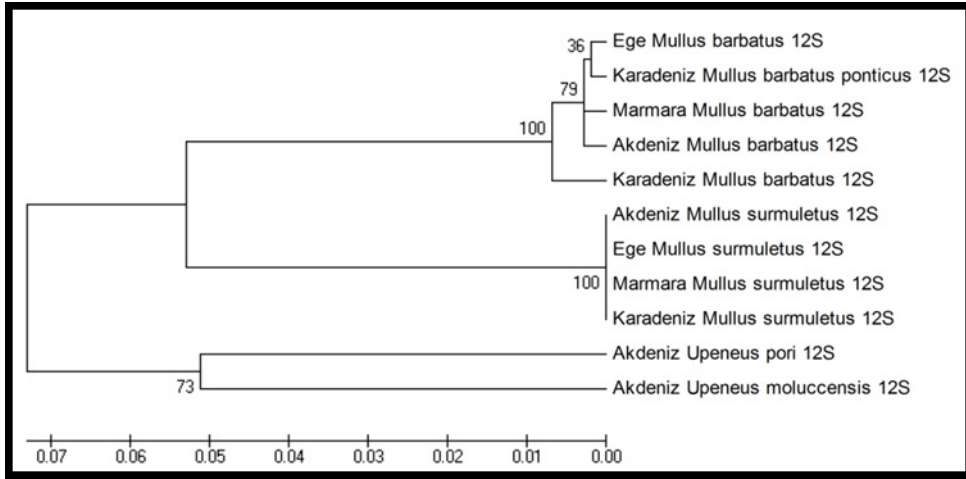
Şekil 4.40. 12S rRNA bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı.



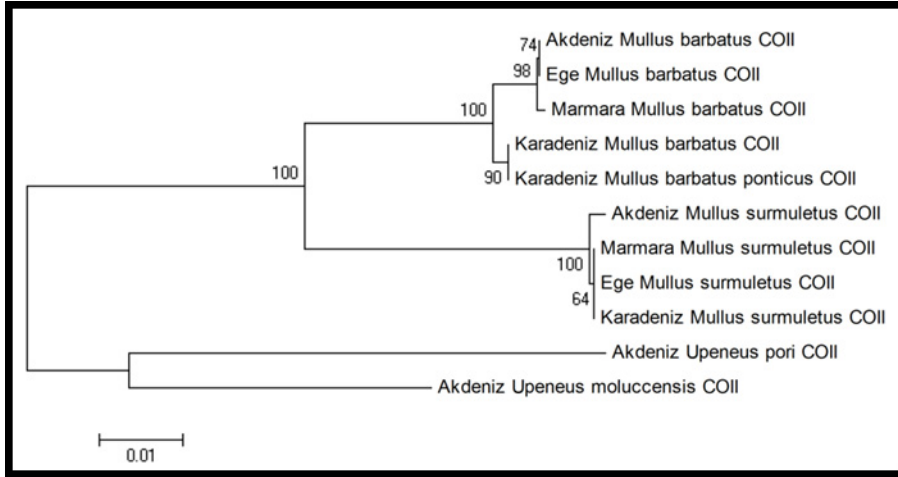
Şekil 4.41. 12S rRNA bölgesi için çizilen ME (Minimum Evolution) dendrogramı.



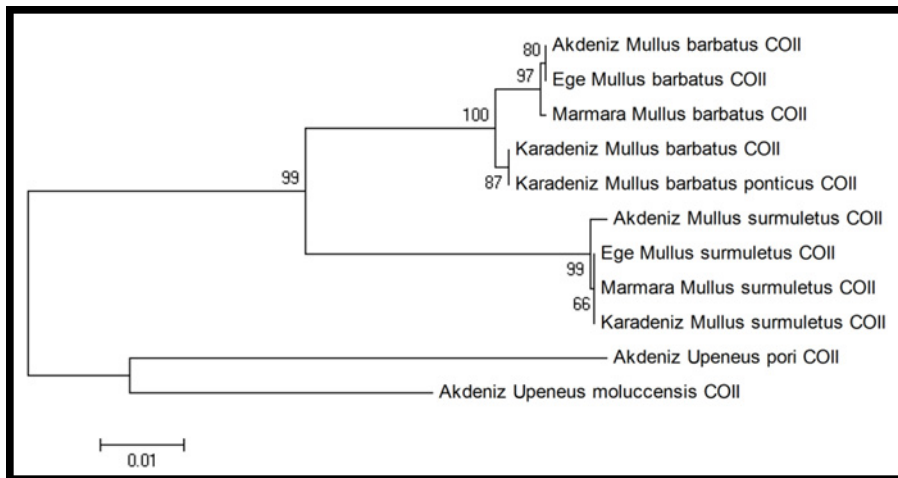
Şekil 4.42. 12S rRNA bölgesi için çizilen MP (Maximum Parsimony) dendrogramı.



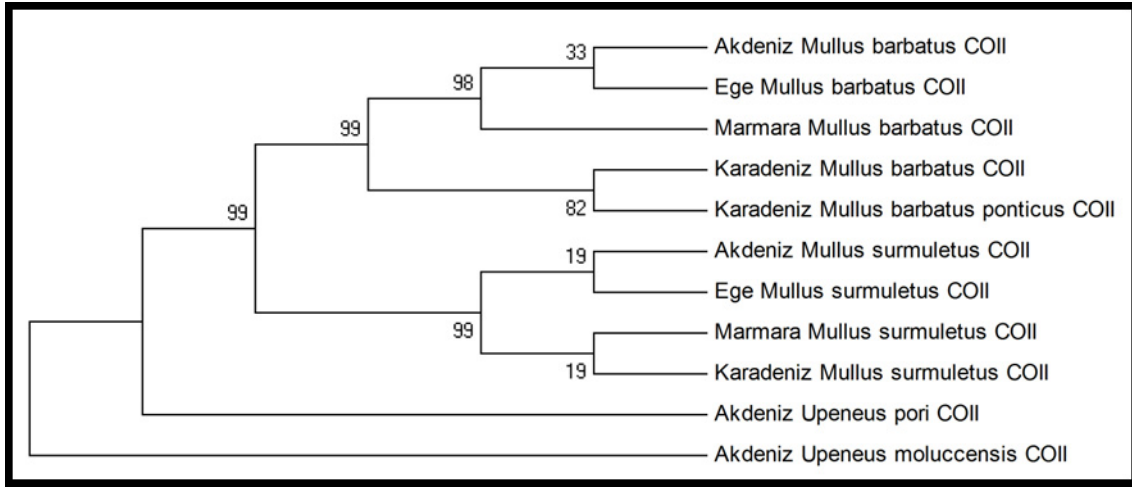
Şekil 4.43. 12S rRNA bölgesi için çizilen UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı.



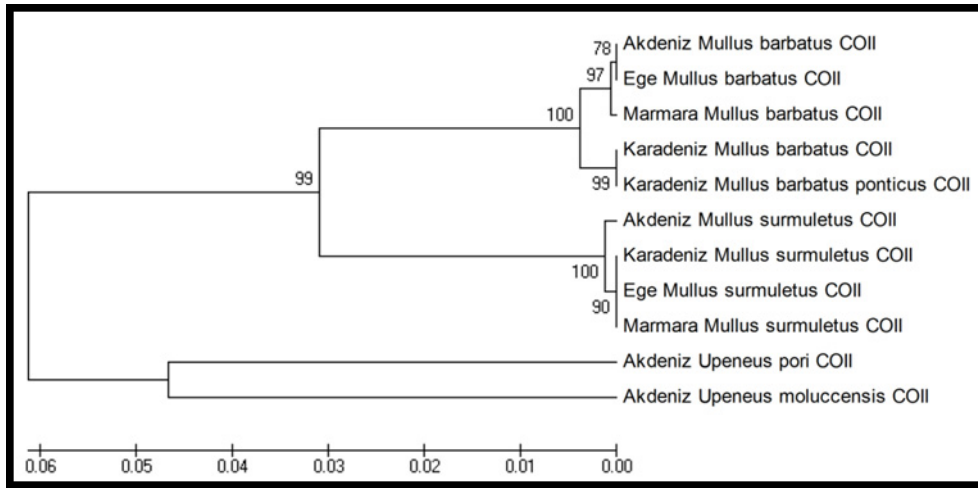
Şekil 4.44. CO II bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı.



Şekil 4.45. CO II bölgesi için çizilen ME (Minimum Evolution) dendrogramı.



Şekil 4.46. CO II bölgesi için çizilen MP (Maximum Parsimony) dendrogramı.



Şekil 4.47. CO II bölgesi için çizilen UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Mullidae ailesine ait türlerin biyolojileri, ekolojik özellikleri ve mevcut popülasyonlarına ait çalışmalar ülkemizde ve dünyada bir çok araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir (Labropoulou ve Eleftheriou 1997, Platell 1998, Martin 1999, Mazzola vd 1999, Çelik ve Torcu 2000, Levi ve Francour 2004, Özbilgin vd 2004, Metin 2005, İşmen 2006). Tüm dünyada çok geniş bir alanda yayılım gösteren ve ülkemizdeki denizlerin tamamında bulunan Mullidae ailesine ait türlerle ilgili bu kadar çok araştırma yapılmasının çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenlerin başında tabi ki yüksek ekonomik değerleri gelmektedir. Akdeniz ihtiyofaunasında bulunan Mullidae ailesine ait türleri ilginç kılan ise Süveyş Kanalı'nın açılmasından sonra, Akdeniz'de doğal olarak bulunmayan türlerin göç yoluyla gelerek, Akdeniz'de popülasyonlar oluşturmaya başlaması ile meydana gelen değişimdir.

Mullidae ailesine ait türlerin sınıflandırmasında, son on yıla kadar, sadece morfolojik analizler sonucu elde edilmiş bilgiler vardı. Özellikle Akdeniz ve Ege Denizi'nde en çok rastlanan iki Mullidae türü olan *Mullus barbatus* ve *Mullus surmuletus*, üzerinde en çok çalışılan Mullidae türleri olarak dikkat çekmektedir.

İşte bu çalışmalardan, *Mullus barbatus* üzerine gerçekleştirilen en kapsamlı morfolojik çalışmalardan biri olan Mamuris vd (1998a)'nde, Yunanistan'ın yedi farklı noktasından elde edilen toplam 275 adet *Mullus barbatus* örneği, morfolojik olarak incelenmiştir. *Mullus barbatus* örneklerinin 15 farklı morfolojik karakteri üzerinden yapılan analizlerde, örneklerin farklı ekolojik bölgelerde farklı morfolojik karakterler gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır. İncelenen örneklerden %80'ini doğru bir şekilde farklı ekolojik bölgelere göre ayırmak mümkün olmuştur. Bu çeşitlilik, her bir coğrafik bölgede üstünlük gösteren popülasyonların genetik yapısı ve çevre koşulları ile birlikte balık göçü ve yumurta/larvaların bir bölgeden diğerine taşınmasıyla açıklanmıştır.

Moleküler genetik alanındaki gelişmelerle birlikte, Mullidae ailesine ait türlerin genetik yapısı ve birbirleri ile olan ilişkilerini incelemede moleküler teknikler ile yapılan çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır.

Mamuris vd (1998b)'nin Akdeniz'den elde ettiği *Mullus barbatus* örnekleri ile yaptığı çalışmada, genetik varyasyonu belirlemede RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniğinden yararlanılmıştır. Sekiz adet örnek üzerinde yirmidokuz farklı primer kullanarak yapılan deneyler sonucunda popülasyonları ayırmakta kullanılabilir bir RAPD belirteç bulunamamıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin coğrafik mesafeleri ile doğru orantılı olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Mamuris vd (1999) *Upeneus moluccensis*, *Pseudupeneus prayensis*, *Mullus barbatus* ve *Mullus surmuletus* türleri arasındaki taksonomik ilişkiyi incelemede 3 farklı yöntemi karşılaştırmıştır. Allozim analizleri *U. moluccensis* ile *P. prayensis* arasındaki genetik uzaklığın *M. barbatus* ile *M. surmuletus* arasındaki genetik uzaklıktan daha az olduğunu gösterirken RAPD tekniği ve mtDNA kullanılarak yapılan analizler bunun tam tersini ortaya koymuştur. RAPD tekniği uygulanarak yapılan analizler allozim analizlerine oranla türler arasında daha az farklılık gösterirken, mtDNA analizleri ile daha tutarlı sonuçlar vermiştir.

Golani ve Ritte (1999) Kızıldeniz ve Akdeniz'den elde ettikleri Mullidae ailesine ait türler üzerinde 21 muhtemel lokus üzerinde elektroforetik incelemede bulunmuşlardır. Çalışmada Kızıldeniz'den yedi tür ve Akdeniz'den 2 tür kullanılmıştır. Kızıldeniz'e ait türlerden 2 tanesi (*Upeneus pori* ve *Upeneus moluccensis*) elektroforetik inceleme sonuçları, morfometrik sonuçlara dayalı taksonomiye destekler nitelikte bulunmuş, ayrıca Mullidae ailesindeki heterozigotluğun diğer bilinen balıklarından daha düşük olduğu sonucu elde edilmiştir.

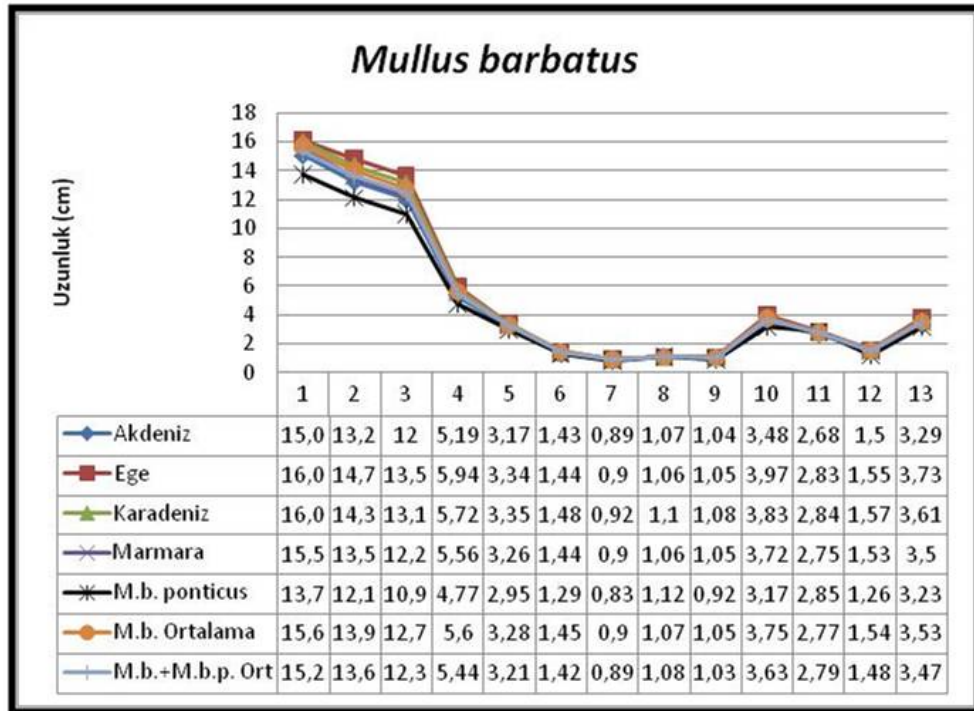
Apostolidis vd (2001) yaptıkları çalışmada dört farklı Mullidae türü arasındaki filogenetik ilişkiyi incelemeye iki farklı mitokondriyal DNA geninden yararlanmışlardır. 16S rRNA ve Sitokrom B genleri çoğaltılarak dizi analizleri yapılmış ve aralarındaki filogenetik ilişki daha önce ortaya konulan taksonomik verileri destekler nitelikte ortaya koyulmuştur.

Garoia vd (2004) *Mullus barbatus*'ların genetik yapılarını incelemek için mikrosatelit belirteçlerden faydalanarak altı polimorfik dinükleotit lokusu optimize etmiştir. Çalışmanın sonunda belirteçlerin genetik farklılıkları belirlemeye uygun olduğu gösterilmiştir.

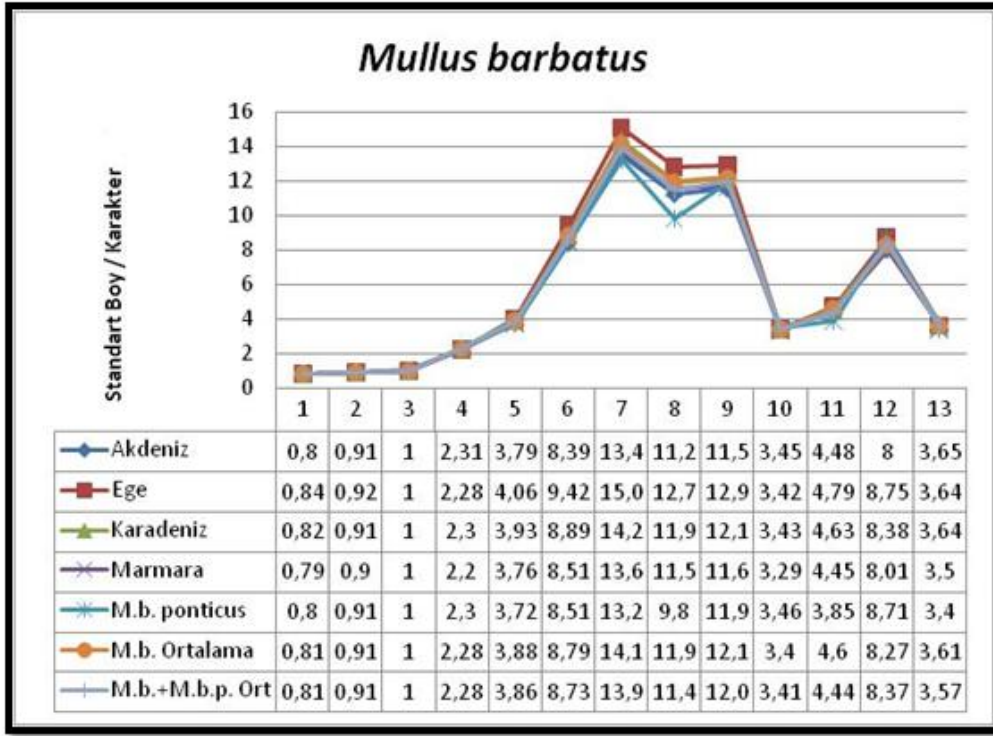
Bu çalışmada Akdeniz, Ege Denizi, Marmara Denizi ve Karadeniz'den elde edilen *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus*, *Upeneus pori*, *Upeneus moluccensis* türleri ile *Mullus barbatus ponticus* alt türü, morfolojik olarak sınıflandırılmış; 16S rRNA, CytB, 12S rRNA ve CO II bölgeleri PCR tekniği ile çoğaltılarak, dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizleri sonucunda 16S rRNA bölgesinden filogenetik olarak anlam taşıyan veri elde edilemediğinden, bu bölge filogenetik analiz aşamasında çalışmadan çıkarılmıştır. CytB, 12S rRNA ve CO II bölgelerinin dizi analizleri sonucu elde edilen veri, MEGA4 programı kullanılarak, farklı metotlarla analiz edilmiş ve bu dört tür ile bir alt tür arasındaki genetik yakınlık ortaya koyulmuştur.

Araştırma sonunda elde edilen veriler, daha önce Mullidae ailesine ait türlerde dizi analizi yapılmamış CO II bölgesinin nükleotit kompozisyonu hakkında detaylı bilgiler vermektedir. Ayrıca alt tür olarak kabul edilen *Mullus barbatus ponticus*'un, farklı denizlerden elde edilen *Mullus barbatus* türleri ile olan genetik yakınlığı, dizi analizi kullanılarak ilk defa bu çalışma ile ortaya koyulmuştur.

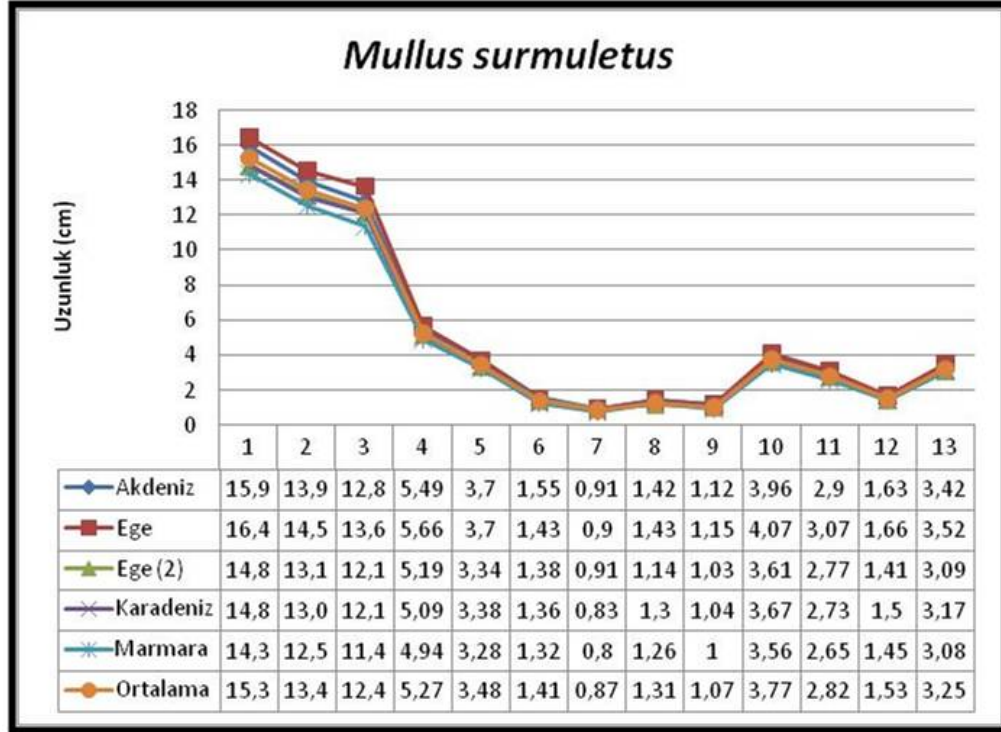
Morfolojik sınıflandırmada tür ayırım anahtarında belirtilen karakterler kontrol edilmiş ve belirgin ayırt edici özelliklerinden dolayı türler birbirinden kolayca ayrılmıştır. Tüm örneklerin Çizelge 4.1.'de belirtilen morfolojik karakterleri ölçüldü ve elde edildikleri bölgelere göre ayrılarak, tür içi ortalamaları (Çizelge 4.2., Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.) ve bu ortalamaların standart boy'a oranları (Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7.) hesaplandı. Elde edilen değerler, türlerin mevcut taksonomik verileriyle uyum sağladı. Morfolojik verilerden elde edilen grafikler aşağıdaki gibidir:



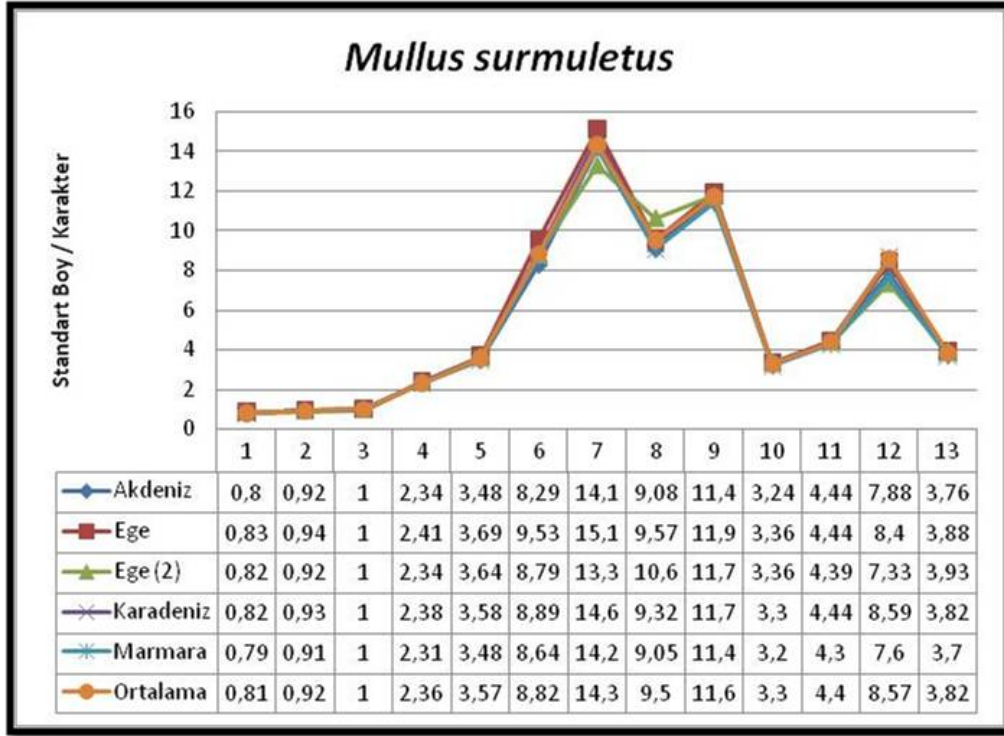
Şekil 5.1. *Mullus barbatus* türlerine ve *Mullus barbatus ponticus* alt türüne ait morfolojik karakter uzunluklarını gösteren grafik.



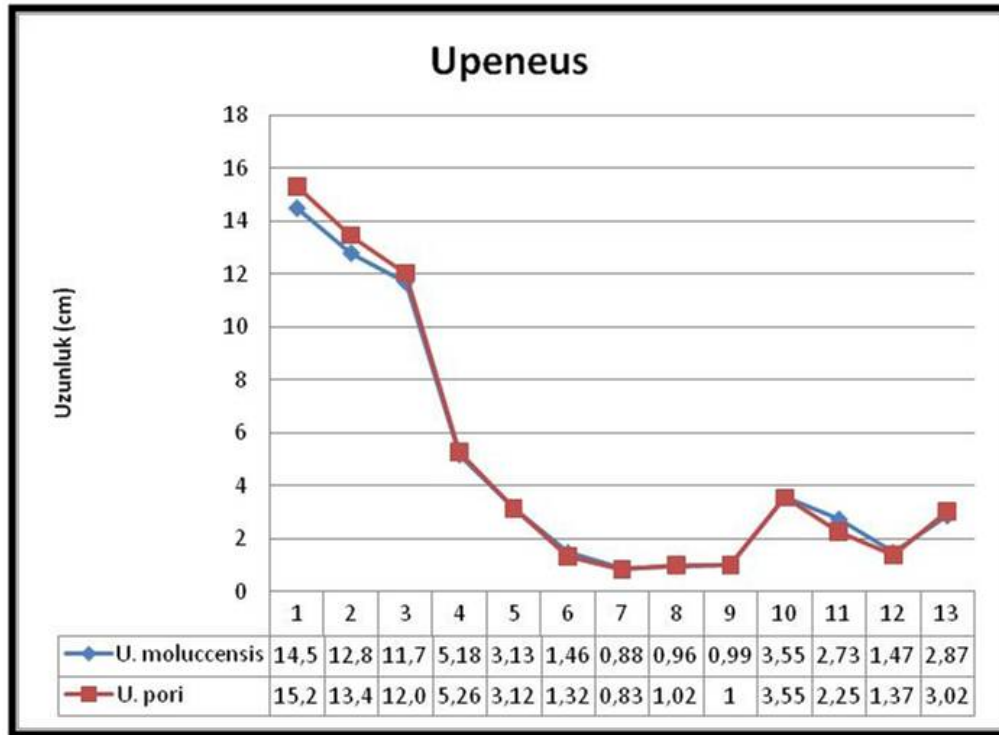
Şekil 5.2. Mullus barbatus türlerine ve Mullus barbatus ponticus alt türüne ait Standart Boy/Morfolojik Karakter değerleri.



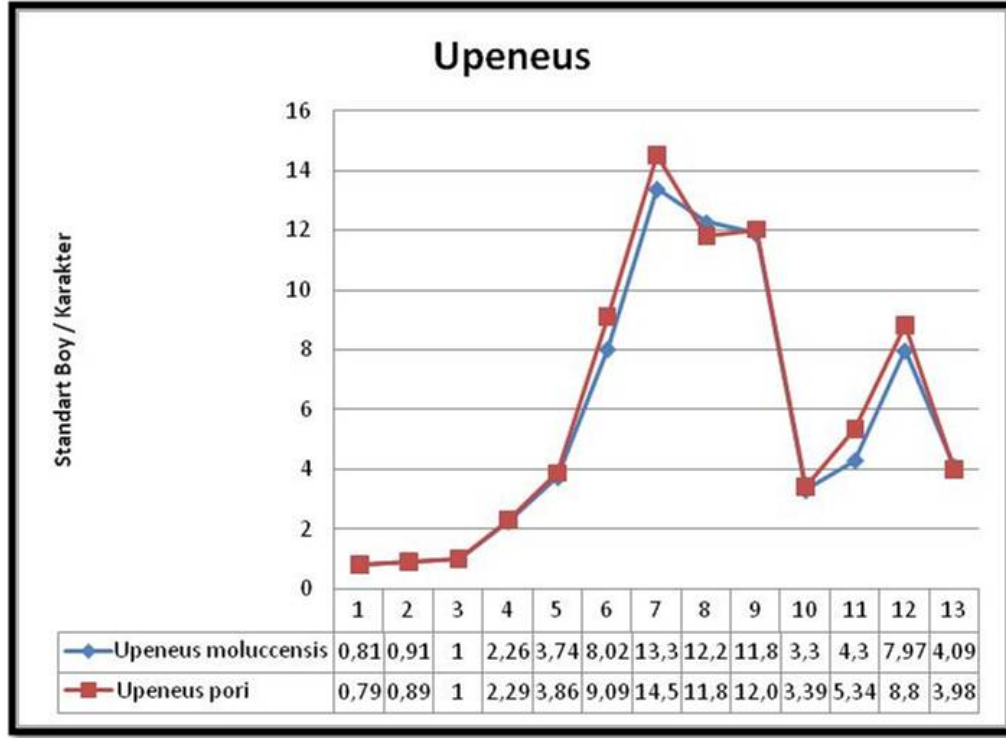
Şekil 5.3. Mullus surmuletus türlerine ait morfolojik karakter uzunluklarını gösteren grafik.



Şekil 5.4. *Mullus surmuletus* türlerine ait Standart Boy/Morfolojik Karakter değerleri.



Şekil 5.5. *Upeneus moluccensis* ve *Upeneus pori* türlerine ait morfolojik karakter uzunluklarını gösteren grafik.



Şekil 5.6. *Upeneus moluccensis* ve *Upeneus pori* türlerine ait Standart Boy/Morfolojik Karakter değerleri.

Şekil 5.1.'deki grafikte de görüldüğü üzere *Mullus barbatus ponticus*, ölçülen karakterlerden toplam boy, çatal boy ve standart boy bakımından ortalamadan sapma göstermiştir. Şekil 5.2.'deki grafiğe baktığımızda ise burun uzunluğu bakımından *Mullus barbatus ponticus*'un, ortalamadan belirgin bir biçimde saptığını görebiliyoruz.

Farklı bölgelerden elde edilen *Mullus barbatus* örnekleri arasında belirgin bir farklılık görülmezken, alt tür olarak sınıflandırılan *Mullus barbatus ponticus*'un, *Mullus barbatus*'dan, bazı morfolojik karakterler bakımından farklılık gösterdiği görülmüştür.

Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.'deki grafiklere baktığımızda ise tür içerisinde göze çarpan ekolojik bir farklılığın olmadığı görülmekte. Burada önemli bir nokta, Ege Denizi'nden elde edilen 2 ayrı popülasyona ait *Mullus surmuletus* örneklerinde, Ege popülasyonuna ait değerlerin hem Ege (2) , hem de diğer popülasyonlardan farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Upeneus moluccensis ve *Upeneus pori* türlerine ait Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.'daki grafiklerde ise, aynı cinsin 2 farklı türü arasında, bazı morfolojik karakterlerde küçük sapmalar olmasına karşın iki farklı tür olduğunu göz önünde bulundurarak, sonuçların mevcut taksonomiye uygun olduğu söylenebilir.

Çalışmanın ikinci ayağını oluşturan filogenetik analizler sonucunda, Türkiye ihtiyofaunasındaki Mullidae ailesine ait türler arasındaki ilişkiye dair çok önemli veriler elde edilmiştir.

Dizi analizi yapılan mitokondriyal genlerdeki korunmuş bölgelerin (Çizelge 4.13.) oranına bakacak olursak CytB bölgesi %77.1 oranı ile, analiz edilen üç bölge içinde, en çok korunan bölge olarak göze çarpmaktadır. 298 baz çifti uzunluğundaki bu bölgenin 230 baz çiftlik kısmı tüm örneklerde hiçbir değişikliğe uğramadan korunmuştur.

Farklı bölgelerden elde edilen *Mullus barbatus* türlerinden oluşan grup ile *Mullus barbatus ponticus* alt türünün de *Mullus barbatus*'lara dahil olduğu grup, üç mitokondriyal gen için de birbiriyle aynı oranda korunmuş bölge içermektedir. Korunmuş bölgelere ilişkin bir önemli nokta da, *Mullus surmuletus* türünün CytB bölgesi bakımından, %100 korunmuş bir diziye sahip olmasıdır.

Türlerin birbirine olan genetik uzaklıklarına baktığımızda ise ilk göze çarpan *Mullus barbatus ponticus*'un, CytB bölgesi bakımından değerlendirildiğinde, Karadeniz ve Ege'den elde edilen *Mullus barbatus* örnekleri ile arasındaki genetik mesafenin 0.000 olduğu, yani aynı oldukları görülmektedir (Çizelge 4.17.). Yine CO II bölgesi bakımından yapılan bir başka değerlendirmede ise *Mullus barbatus ponticus* ile Karadeniz'den elde edilen *Mullus barbatus* arasındaki genetik mesafenin 0.000 olduğunu görmekteyiz (Çizelge 4.19.).

CytB bölgesinden elde edilen veriler kullanılarak, dört farklı yöntemle çizilen ve bootstrap testleri yapılarak doğrulukları kontrol edilen dendrogramların (Şekil 4.36., Şekil 4.37., Şekil 4.38., Şekil 4.39.) hepsinde de aynı durum ortaya çıkmaktadır. Tüm bölgelerden elde edilen *Mullus barbatus* örnekleri bir grup oluştururken, alt tür olarak sınıflandırılan *Mullus barbatus ponticus*, *Mullus barbatus*larla aynı grup içerisinde bulunuyor. *Mullus surmuletus* örnekleri de, bölgesel bir fark gözetmeden, kendi aralarında bir grup oluşturuyorlar. *Upeneus pori* ve *Upeneus moluccensis*'de *Mullus* cinsinden ayrı bir dal altında ikiye ayrılıyor. NJ, ME ve UPGMA yöntemleri kullanılarak çizilen ağaçlar, tür içi bootstrap değerleri dışında birbirinin neredeyse aynısıdır. Tür içindeki dağılımda ise Akdeniz bölgesinden elde edilen *Mullus barbatus* örnekleri, diğer bölgelerden elde edilenlerden farklılık göstermektedir. Tür içindeki diğer bootstrap değerleri ise düşük olduğundan filogenetik olarak çok anlamlı değildir. Ana dallar ise sahip oldukları %99-%100 bootstrap değerleri, çizilen ağaçların doğruluklarını ortaya koymaktadır.

12S rRNA bölgesinden elde edilen veriler kullanılarak elde edilen dendrogramlarda (Şekil 4.40., Şekil 4.41., Şekil 4.42., Şekil 4.43.), CytB bölgesinden elde edilen veriler kullanılarak elde edilen dendrogramlara benzemektedir. Ana dallar yüksek bootstrap değerlerine sahipken düşük bootstrap değerli tür içi dallarda ön plana çıkan bir ayrılma gözlenmemiştir.

CO II bölgesinden elde edilen veriler kullanılarak elde edilen dendrogramlar (Şekil 4.44., Şekil 4.45., Şekil 4.46., Şekil 4.47.) ise genetik ilişkiyi, yaşadıkları ekolojik mesafeyle ilişkilendirmeye uygun olmasıyla, diğer gen bölgelerine oranla daha anlamlı olarak değerlendirildi. Dört farklı yöntemle de çizilen ağaçlarda *Mullus barbatus*'lar ve *Mullus barbatus ponticus* aynı grupta toplanmıştır. Diğer bölgelerde yapılan analizlerde, belirli bir tür içi sınıflandırma gözlenmezken, CO II bölgesinde Karadeniz'den elde edilen *Mullus barbatus* örnekleri *Mullus barbatus ponticus* ile bir grup oluşturarak diğer bölgelere ait *Mullus barbatus* türlerinden ayrılmakta. Diğer *Mullus barbatus* türleri ise kendi aralarında yine iki grup oluşturuyorlar. Akdeniz ve Ege Denizi'nden elde edilen örnekler bir grup olarak ayrılırken, bir iç deniz olan Marmara Denizi'nden elde edilen örnekler hem bu gruptan hem de Karadeniz grubundan tek başına ayrılıyor.

Ekolojik yapısı diğer denizlerimizden çok farklı olan Karadeniz ve dolayısıyla buradan elde edilen örneklerin ayrı bir grup oluşturması, birbirine bağlantılı iki deniz olan Akdeniz ve Ege Denizi'nden elde edilen örneklerin ayrı bir grup oluşturması ve son olarak da diğer denizlerimizle ilişkisi en az olan Marmara Denizi'nin tek başına ayrı bir grup oluşturması, ekolojik uzaklıkla genetik uzaklığın doğru orantılı olması mantığını doğrular bir düşünce uyandırıyor.

Yine CO II bölgesinden elde edilen verilerle oluşturulan dendrogramlarda, Akdeniz'den elde edilen *Mullus surmuletus* örneklerinin, diğer bölgelerimizden elde edilen *Mullus surmuletus* örneklerinden ayrıldığı gözlemlenmektedir. Bu nokta da yine Akdeniz'in, diğer üç denizimizden farklı bir ekolojik yapıya sahip olduğu göz önünde bulundurularak, burada yaşayan türlerin göçlerle gelen diğer türlerle ilişkiye daha açık olması nedeniyle, az da olsa diğer *Mullus surmuletus*'lardan farklılık gösterebileceği ihtimali düşünülmelidir.

Sonuç olarak, morfolojik veriler kullanılarak elde edilen bilgiler ışığında yapılan sınıflandırma ile genetik veriler kullanılarak yapılan analizler sonucu ortaya çıkarılan filogenetik ağaçlar birbirlerini doğrular niteliktedir. Fakat yalnızca morfolojik karakterleri kullanmak, Ege popülasyonlarında olduğu gibi, sınıflandırmada karışıklıklara neden olabilir. Morfolojik olarak birbirinden çok belirgin biçimde ayrılan *Mullus surmuletus* türlerinin genetik analizleri göstermiştir ki, bu iki popülasyon ve diğer *Mullus surmuletus* popülasyonları arasında CytB bölgesi bakımından bir baz bile fark yoktur. Yine aynı şekilde renk, göz altı pul sayısı ve çene uzunluğu gibi morfolojik özelliklerindeki farklılıktan dolayı alt tür olarak sınıflandırılan *Mullus barbatus ponticus*'un, diğer tüm bölgelerde bulunan *Mullus barbatus* örneklerine olan ortalama genetik uzaklığı 0.005 gibi dikkate alınmayacak bir mesafededir. Çünkü farklı bölgelerden elde edilen *Mullus barbatus* türleri arasındaki genetik uzaklık da 0.002 ile 0.010 arasında değişmektedir. Bu durumda *Mullus barbatus ponticus*'u alt tür olarak sınıflandırmak, bu çalışmada elde edilen genetik veriler ışığında, doğru gözükmemektedir.

Mullidae ailesine ait türler, Türkiye ihtiyofaunasının biyoçeşitlilik ve ekonomik anlamda çok değerli bir ailesidir. Bu çalışma daha detaylı bir morfolojik analiz ve daha fazla mitokondriyal gen bölgesine ait filogenetik analiz ile devam ettirildiği takdirde, Mullidae türleri arasındaki ilişkiler de daha kesin olarak ortaya koyulabilecektir.

KAYNAKLAR

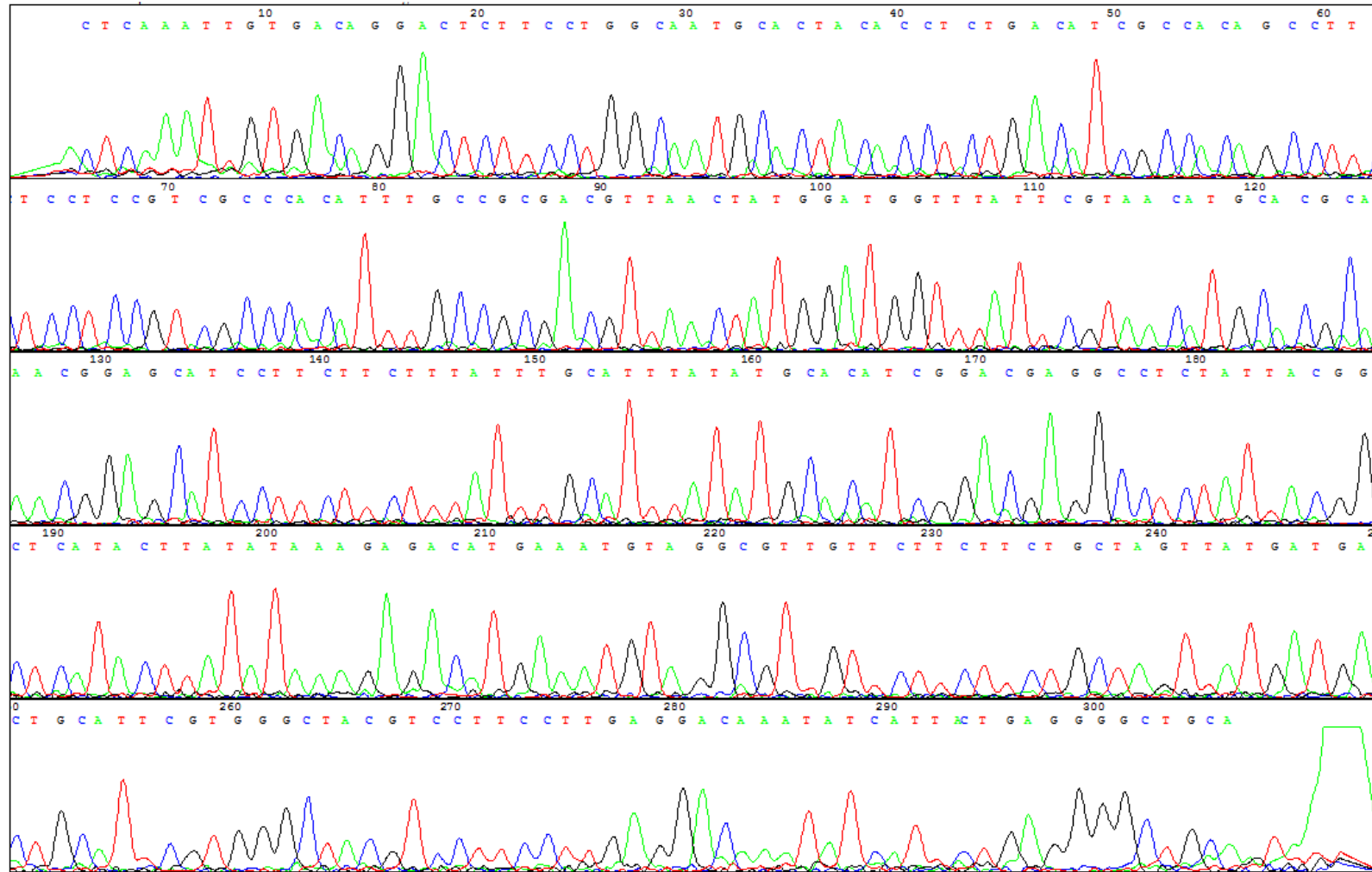
- Akşiray, F. 1987. Türkiye Deniz Balıkları Tayin Anahtarı, 2. Baskı, İstanbul, 1987, İ. Ü Rektörlüğü Yayınları, No: 3490, 811 sayfa.
- Akyol, O., Tosunoğlu, Z., Tokaç, A. 2000. Investigations of the growth and reproduction of red mullet (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758) population in the bay of İzmir (Aegean Sea). *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 1(1): 121- 127.
- Anonim. 2000. Su ürünleri istatistikleri. T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, DİE Matbaası, Yayın No: 2538, 34 s.
- Anonim 2004, Su ürünleri istatistikleri. T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, <http://www.tuik.gov.tr>.
- Anonim 2006a, <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.cfm?ID=790&what=species>.
- Anonim 2006b, <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.cfm?ID=25966&what=species>.
- Anonim 2006c, <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.cfm?ID=1327&what=species>.
- Apostolidis A. P., Mamuris Z., Triantaphyllidis, C. 2001. Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA genes. *Biochem. Syst. Ecol. Vol. 29*, p. 901-909.
- Atay, D., Bekcan, S. 2000. Deniz Balıkları ve Üretim Tekniği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı: 468, Yayın No:1515.Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 396 s.
- Bauchot, M.-L., 1987. Poissons osseux. p. 891-1421. In W. Fischer, M.L. Bauchot and M. Schneider (eds.) Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche. (rev. 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. II. Commission des Communautés Européennes and FAO, Rome.
- Ben-Tuvia, A. 1978. Imigrations of the fishes through the Suez Canal. *Fish. Bull. (Wash)* 76(1): 249-255.
- Bilecenoğlu, M., Taşkavak, E., Mater, S., Kaya, M. 2002. Checklist of the marine fishes of Turkey. *Zootaxa*, 113: 1-194.
- Boudouresque, C.F. 1999. The Red Sea-Mediterranean link: Unwanted effects of canals. pp. 213-228. In: O.T. Sandlund, P.J. Schei & Å. Viken (ed.) *Invasive Species and Biodiversity Management*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Can, A., Bilecenoğlu, M. 2005. Türkiye Denizleri'nin Dip Balıkları Atlası. Arkadaş Yayınevi, Ankara, 224 s.
- Çelik, Ö., Torcu, H. 2000. Ege Denizi, Edremit Körfezi Barbunya Balığı (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758)'nın Biyolojisi Üzerine Araştırmalar. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 24 (2000) 287-295.
- De Bruin, G.H.P., B.C. Russell and A. Bogusch, 1995. FAO species identification field guide for fishery purposes. The marine fishery resources of Sri Lanka. Rome, FAO. 400 p.
- Fischer, W., Bauchot, M.-L., Schneider, M., 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. FAO and EEC, Rome, 761-1530.
- Freeman, S. and Herron, J. C. 1999. Evrimsel Analiz. Çıplak, B., Başbüyük, H. H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ. (eds), Palme Yayıncılık, Ankara, 708 s.
- Galil, B.S. 2000. A sea under siege-alien species in the Mediterranean. *Biol. Inv.* 2: 177-186.
- Garoia, F., Guarniero, I., Piccinetti, C., Tinti, F. 2004. First microsatellite loci of red mullet (*Mullus barbatus*) and their application to genetic structure analysis of Adriatic shared stock. *Mar. Biotechnol.* 6 (5): 446-452.

- Golani, D., Ritte, U. 1999. Genetic relationship in goatfishes (Mullidae: Perciformes) of the Red Sea and the Mediterranean, with remarks on Suez Canal migrants. *Sci. Mar.* 63(2): 129-135.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P., Cunningham, C. W. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 264: 671-677.
- Huelsenbeck, J. P., Rannala, B. 1997. Phylogenetic methods come of age: Testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* 276: 227-232.
- Huelsenbeck, J. P., Hillis, D. M. 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Systematic Biology* 42: 247-264.
- Hureau, J.C. 1986. Mullidae. In: P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.), *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, pp. 877-882. UNESCO, Paris.
- İşmen, A. 2006. Growth and Reproduction of Por's Goatfish (*Upeneus pori* Ben-Tuvia & Golani, 1989) in İskenderun Bay, the Eastern Mediterranean. *Türk. J. Zool.* 30 (2006) 91-98.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Klug, W.S. and Cummings, R. M. 2003. *Genetik*. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, Ankara, 816 s.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., Wilson, C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Evolution* Vol 86, pp. 6169-6200.
- Labropoulou, M., Eleftheriou, A. 1997. The foraging ecology of two pairs of congeneric demersal fish species: importance of morphological characteristics in prey selection. *Journal of Fish Biology* (1997) 50, 324-340.
- Levi, F., Francour, P. 2004. Behavioural response of *Mullus surmuletus* to habitat modification by the invasive macroalga *Caulerpa taxifolia*. *Journal of Fish Biology* (2004) 64, 55-64.
- Mamuris, Z., Apostolidis, A. P., Panagiotaki, P., Theodorou, A. J., Triantaphyllidis, C. 1998a. Morphological variation between red mullet populations in Greece. *Journal of Fish Biology* 52: 107-117.
- Mamuris Z., Apostolidis, A. P., Theodorou, A. J., Triantaphyllidis, C. 1998b. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Biology* 132: 171-178.
- Mamuris Z., Stamatis, C., Bani, M., Triantaphyllidis, C. 1999. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. *J. Fish Biol.* 55: 572-587.
- Martin, P., Sartor, P., Garcia-Rodriguez, M. 1999. Exploitation patterns of the European hake *Merluccius merluccius*, red mullet *Mullus barbatus* and striped red mullet *Mullus surmuletus* in the western Mediterranean. *J. Appl. Ichthyol.* 15 (1999), 24-28.
- Mater, S., Toğulga, M., Kaya, M. 1995. Lessepsian Balık Türleri'nin Türkiye Denizleri'nde Dağılımı ve Ekonomik Önemi. II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. S. 453-462.
- Mater, S., Çoker, T. 2002. Türkiye denizleri ihtiyoplankton atlası. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 71, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 211s.
- Mater, S., Kaya, M., Bilecenoğlu, M. 2003. Türkiye deniz balıkları atlası. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:68, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 169s.
- Mayden, R. L., Wiley, O. E. 1992. The Fundamentals of phylogenetic systematics. In R. L. Mayden, ed. *Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes*. Stanford, CA: Stanford University Press, 114-185.

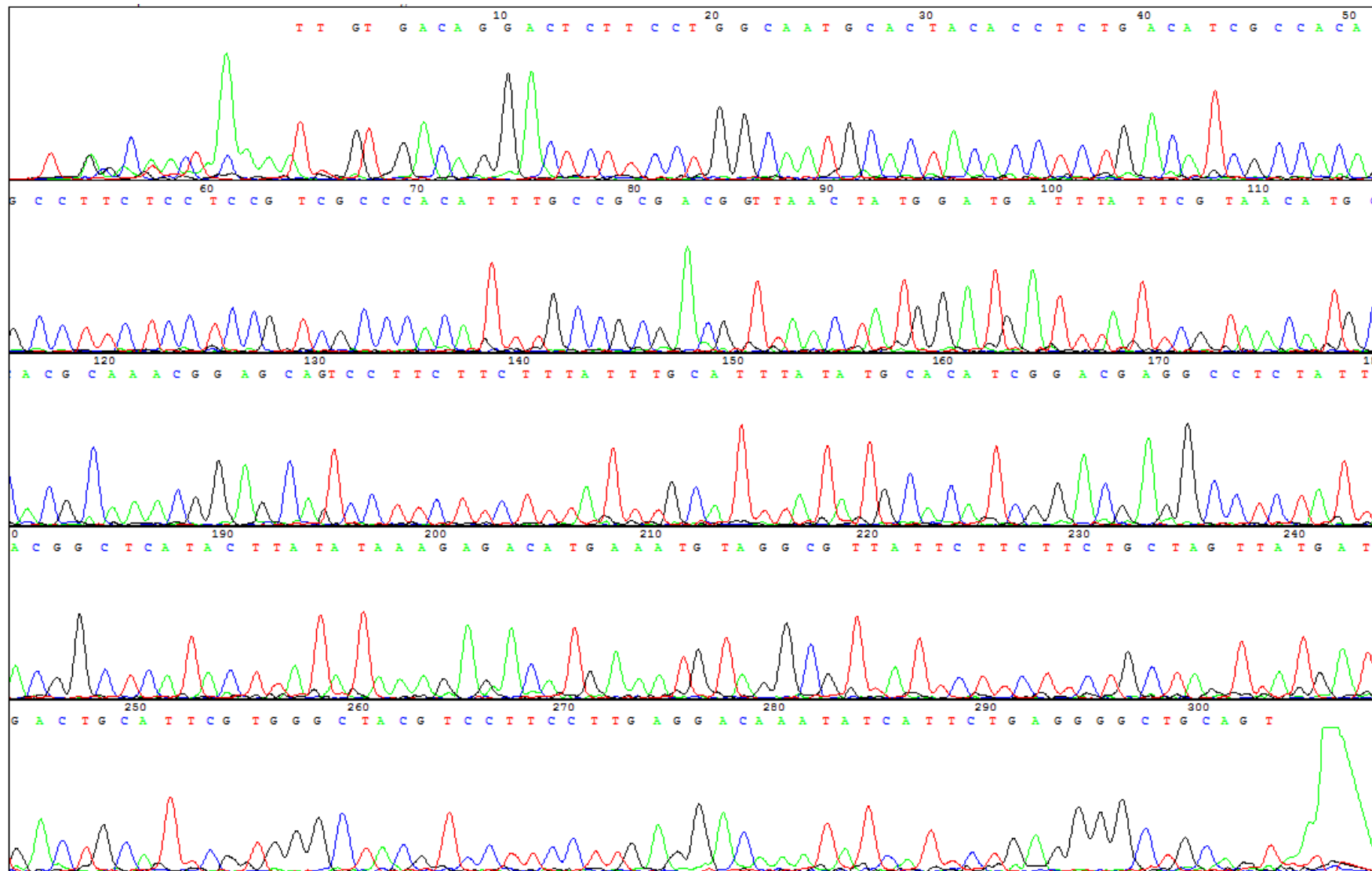
- Mazzola, A., Lopiano, L., La Rosa, T., Sara, G. 1999. Diel feeding habits of juveniles of *Mullus surmuletus* (Linneo, 1758) in the lagoon of the Stagnone di Marsala (Western Sicily, Italy). *J. Appl. Ichthyol.* 15 (1999), 143-148.
- Metin, G. 2005. İzmir Körfezi'nde Barbunya (*Mullus barbatus*, L., 1758) Balığının Üreme Özellikleri. *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi* 2005, Cilt 22, Sayı (1-2): 225-228.
- Meusel, M. S., Moritz, R. F. 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* 24: 539-543.
- Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, T. A. Dewey. 2006. The Animal Diversity Web (online), <http://animaldiversity.org>.
- Normark, B. B., McCune, A. R., Harrison, R. G. 1991. Phylogenetic relationships of Neopterygian Fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8(6): 819-834.
- Özbilgin, H., Tosunoglu, Z., Bilecenoglu, M., Tokaç, A. 2004. Population parameters of *Mullus barbatus* in İzmir Bay (Aegean Sea), using length frequency analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 20 (2004), 231-233.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple Fool's Guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Platell, M. E., Potter, I. C., Clarke, K. R. 1998. Do the habitats, mouth morphology and diets of the mullids *Upeneichthys stotti* and *U. lineatus* in coastal waters of south-western Australia differ?. *Journal of Fish Biology* (1998) 52, 398-418.
- Por, F. D., 1978. Lessepsian Migration. The Influx of Red Sea Biota into the Mediterranean by way of the Suez Canal, *Ecological Studies* 23, Springer Verlag, Berlin. 228 pp.
- Qi, D., Guo, S., Tang, J., Zhao, X., Liu, J. 2007. Mitochondrial DNA phylogeny of two morphologically enigmatic fishes in the subfamily Schizothoracinae (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Journal of Fish Biology* (2007) 70 (Supplement A), 60-74.
- Randall, J.E., 1997. Randall's tank photos. Collection of 10,000 large-format photos (slides) of dead fishes. Unpublished.
- Reist, J. 1985. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data. *Canadian Journal of Zoology* 63, 1429-1439.
- Saitou N., Imanishi, T. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol*; 6: 514-525.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: Freeman.
- Sorenson, M. D. 2003. Avian mtDNA primers. Boston University.
- Svetovidov, A. N., 1964. Handbook of the fauna of the USSR, fishes of the Black Sea. Izdatel'stvo Nauka, Moscow, 550 p.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J., Hillis, D. M. 1996. Phylogenetic Inference. In D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, eds. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer, 407-514.
- Wakely, J. 1996. The excess of transitions among nucleotide substitutions: New methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 158-163.
- Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen, J., Tortonese, E. 1986. *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris, 1473 p.

EKLER

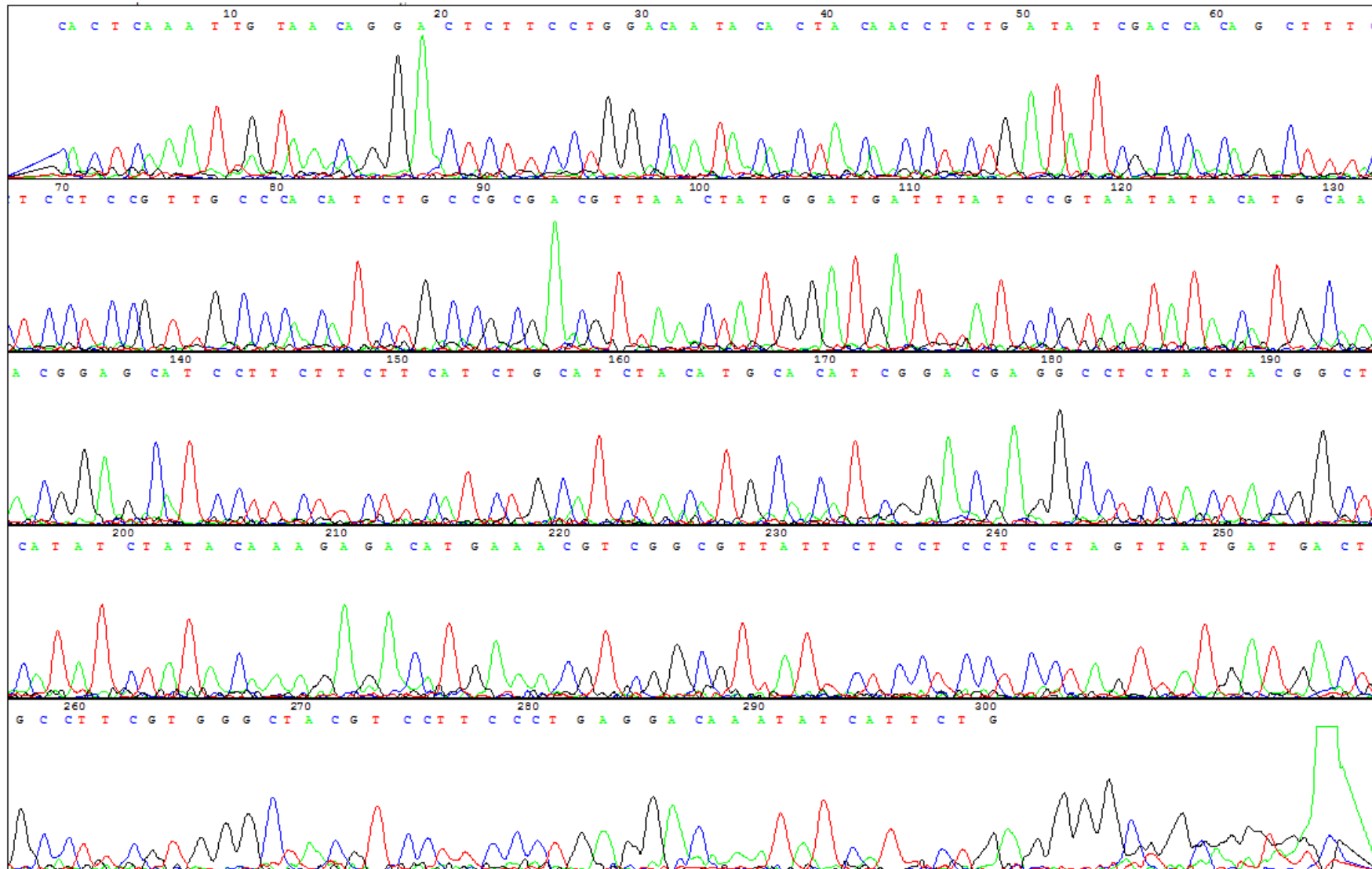
EK 1 – DNA Dizi analizi elektroforegramları



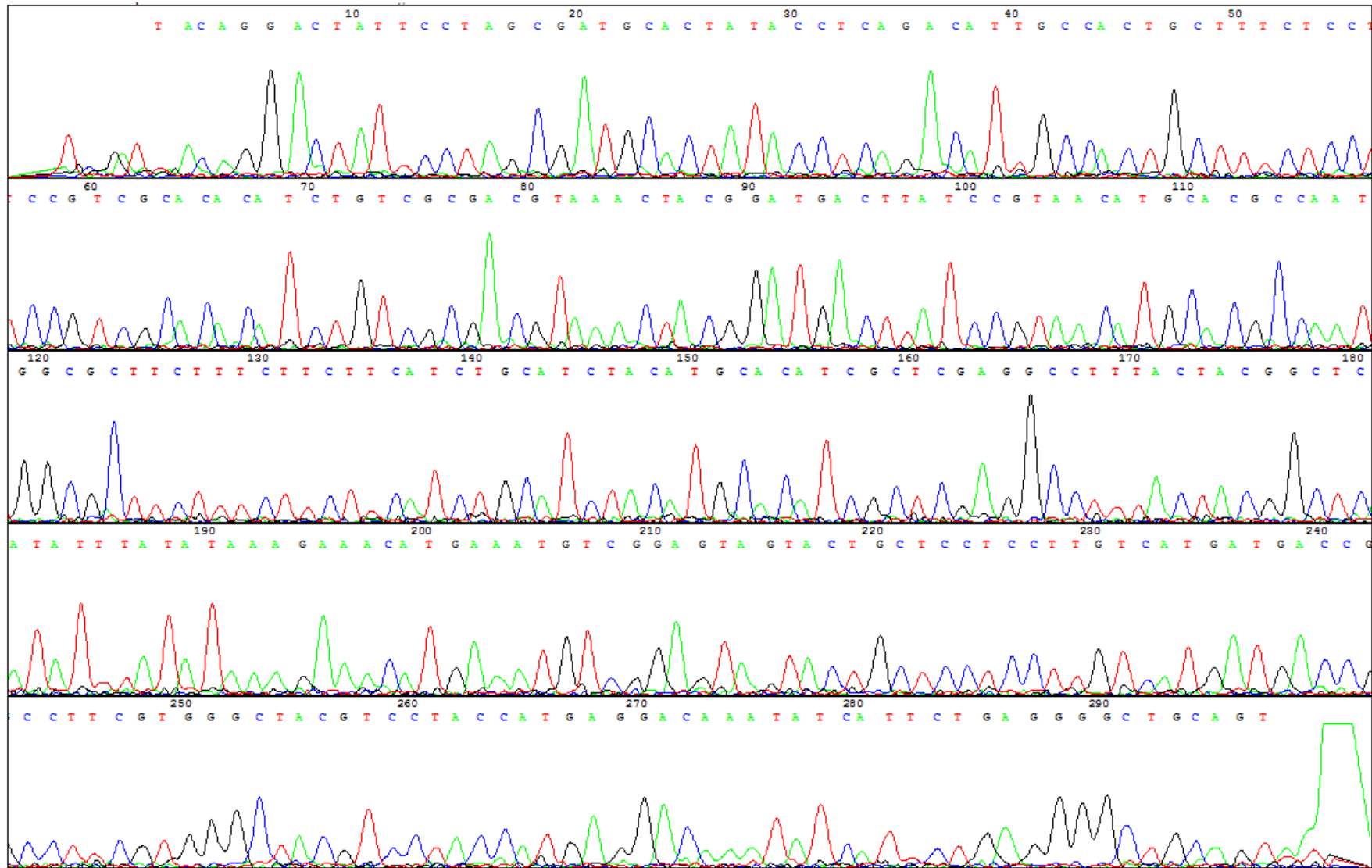
(*Mullus barbatus*, CytB)



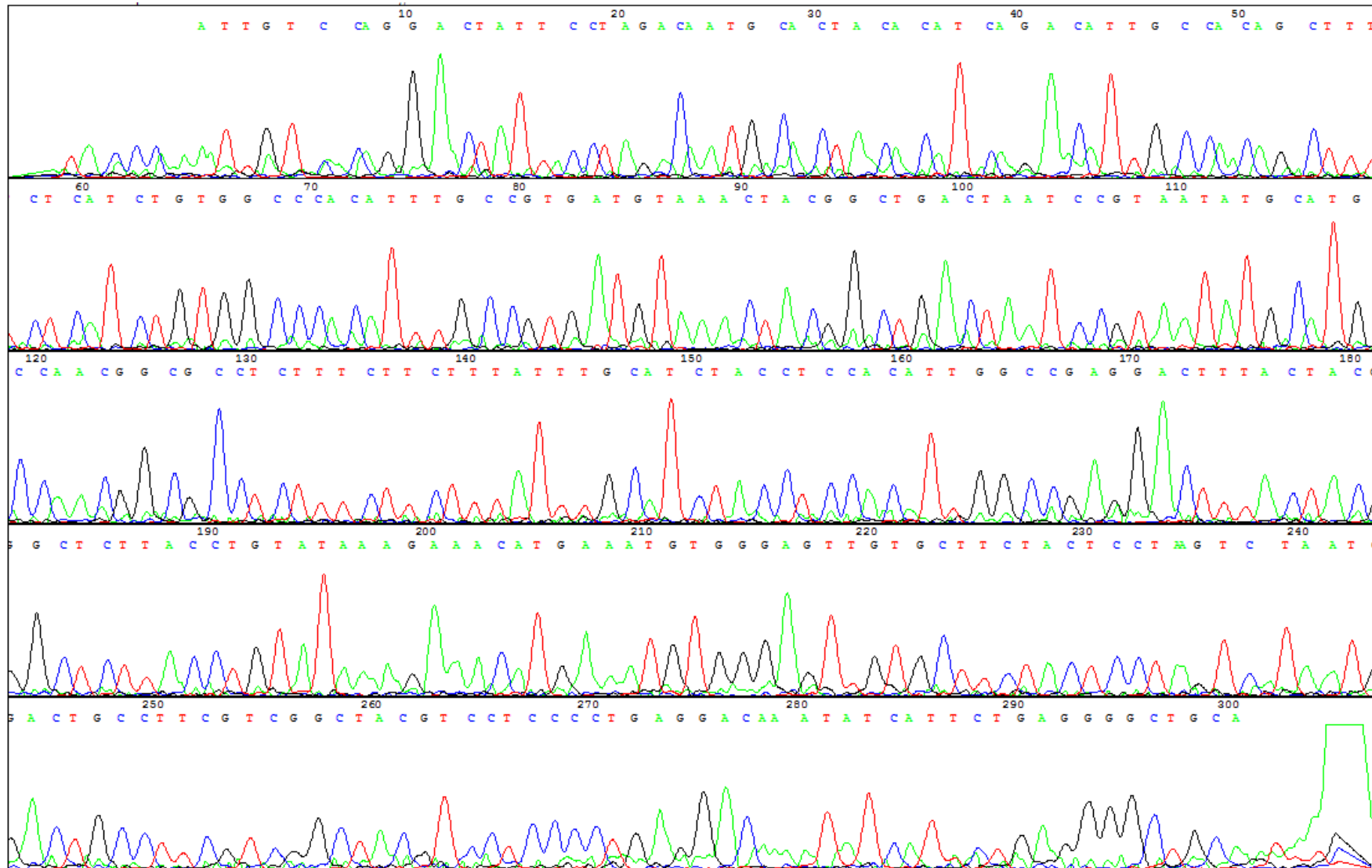
(*Mullus barbatus ponticus*, CytB)



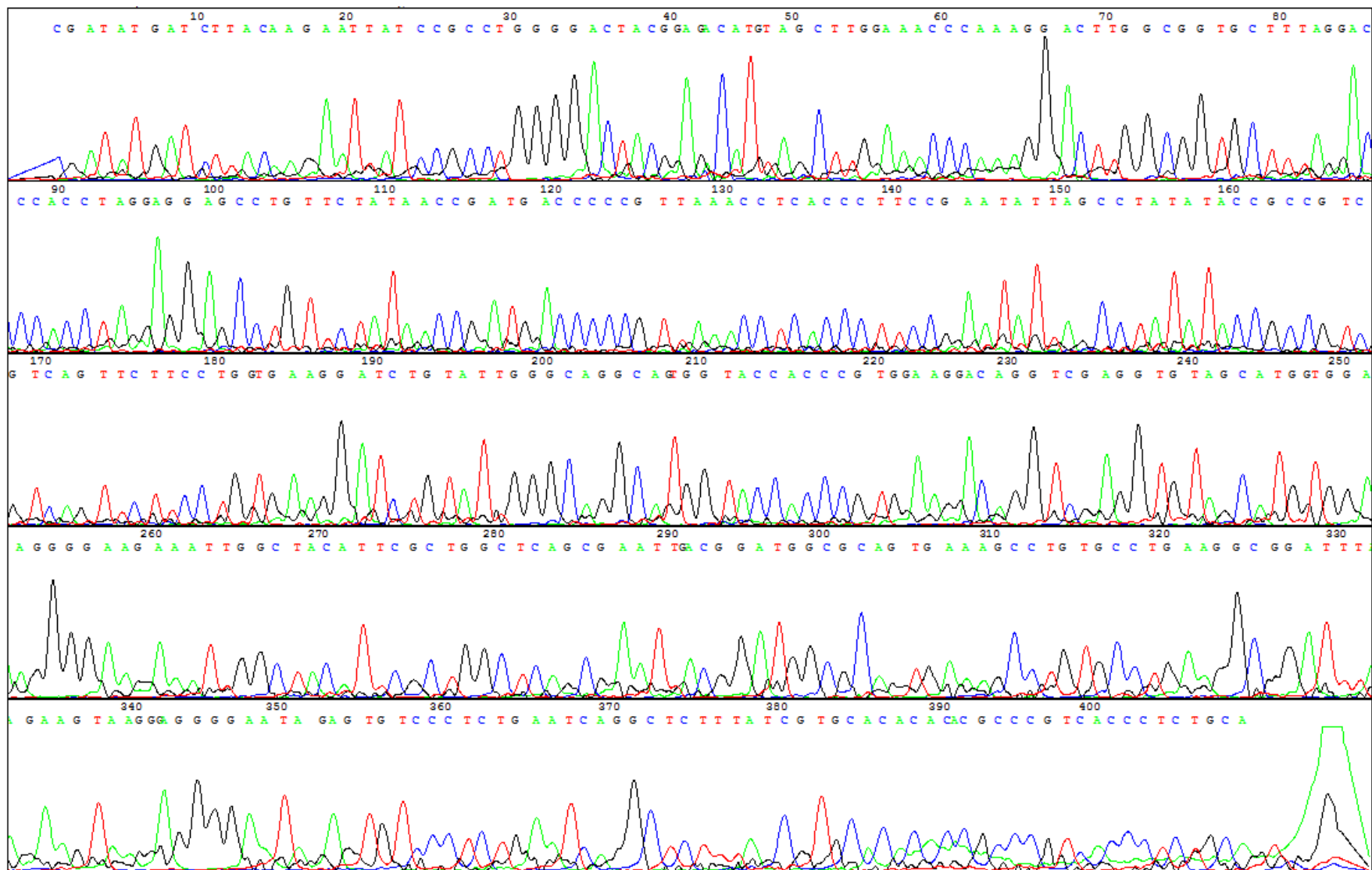
(*Mullus surmuletus*, CytB)



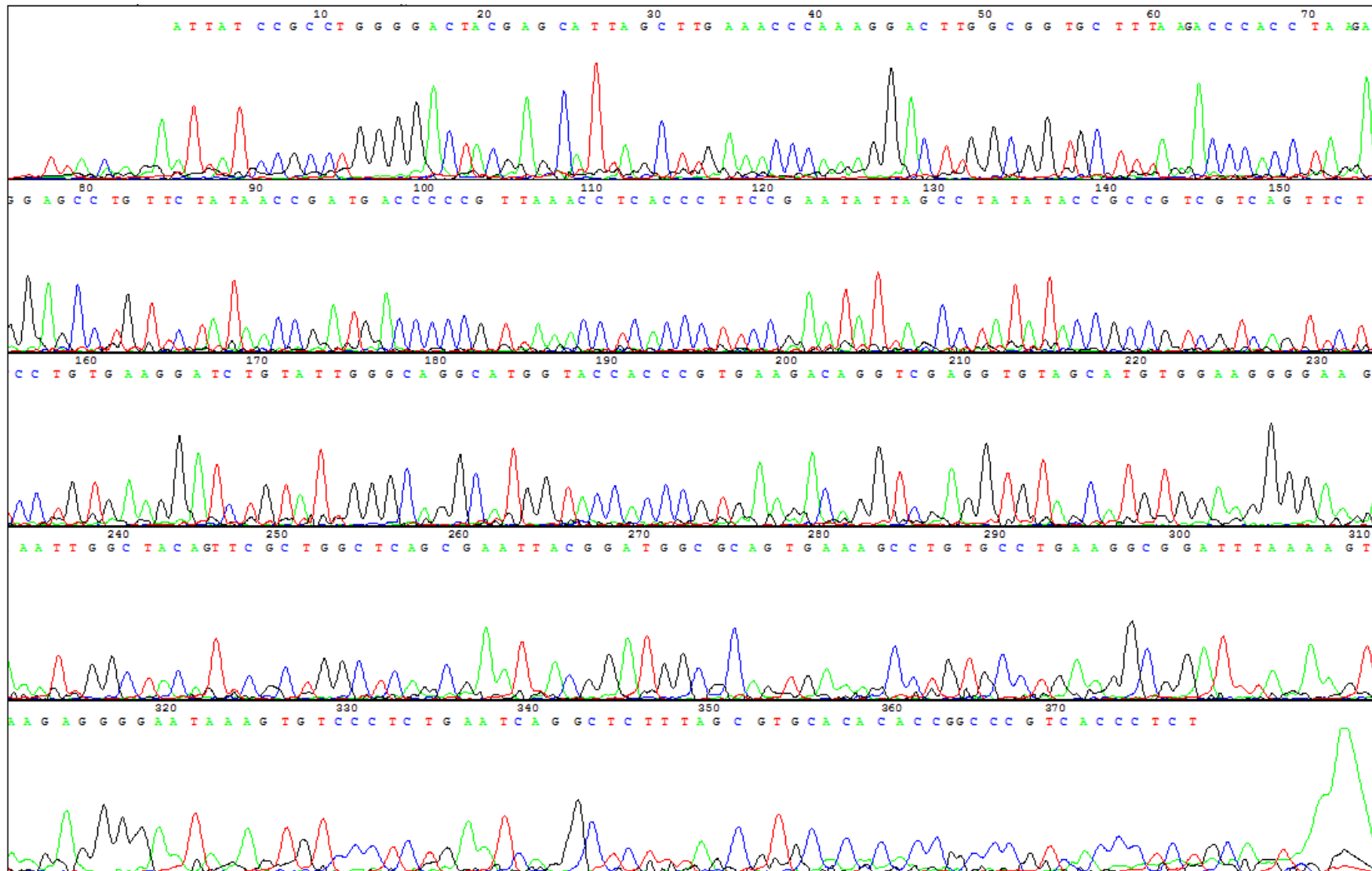
(*Upeneus pori*, CytB)



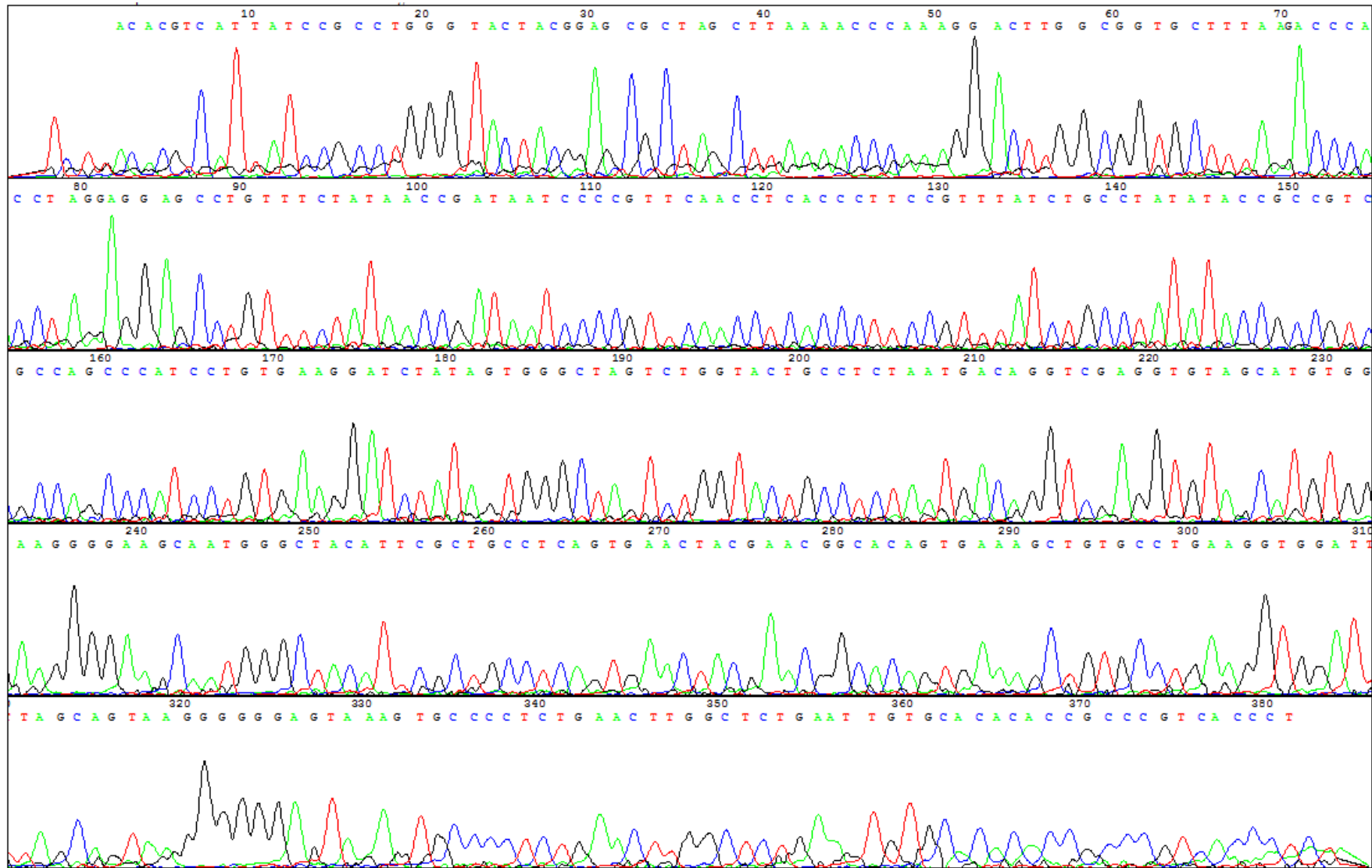
(*Upeneus moluccensis*, CytB)



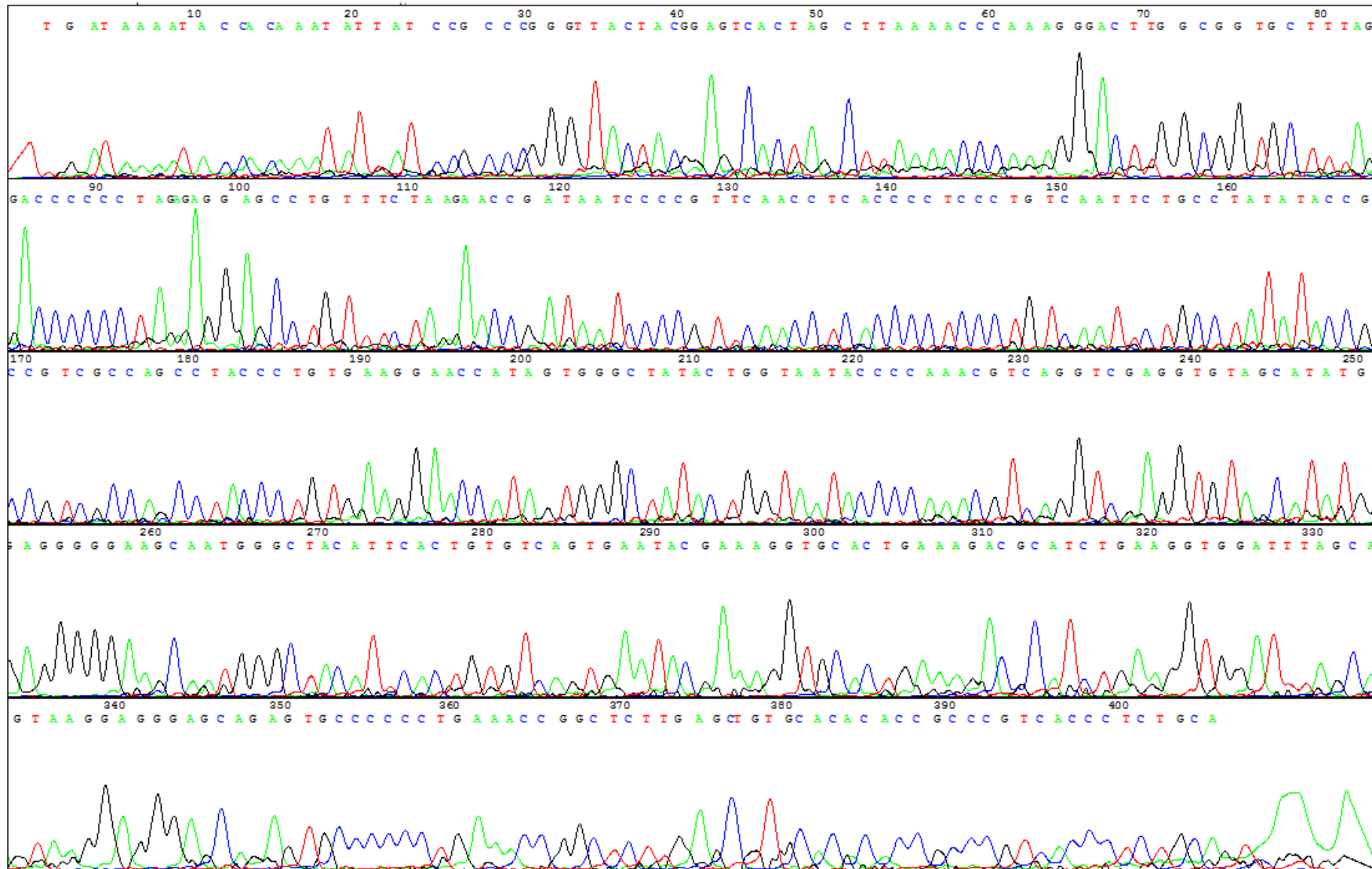
(*Mullus barbatus*, 12S rRNA)



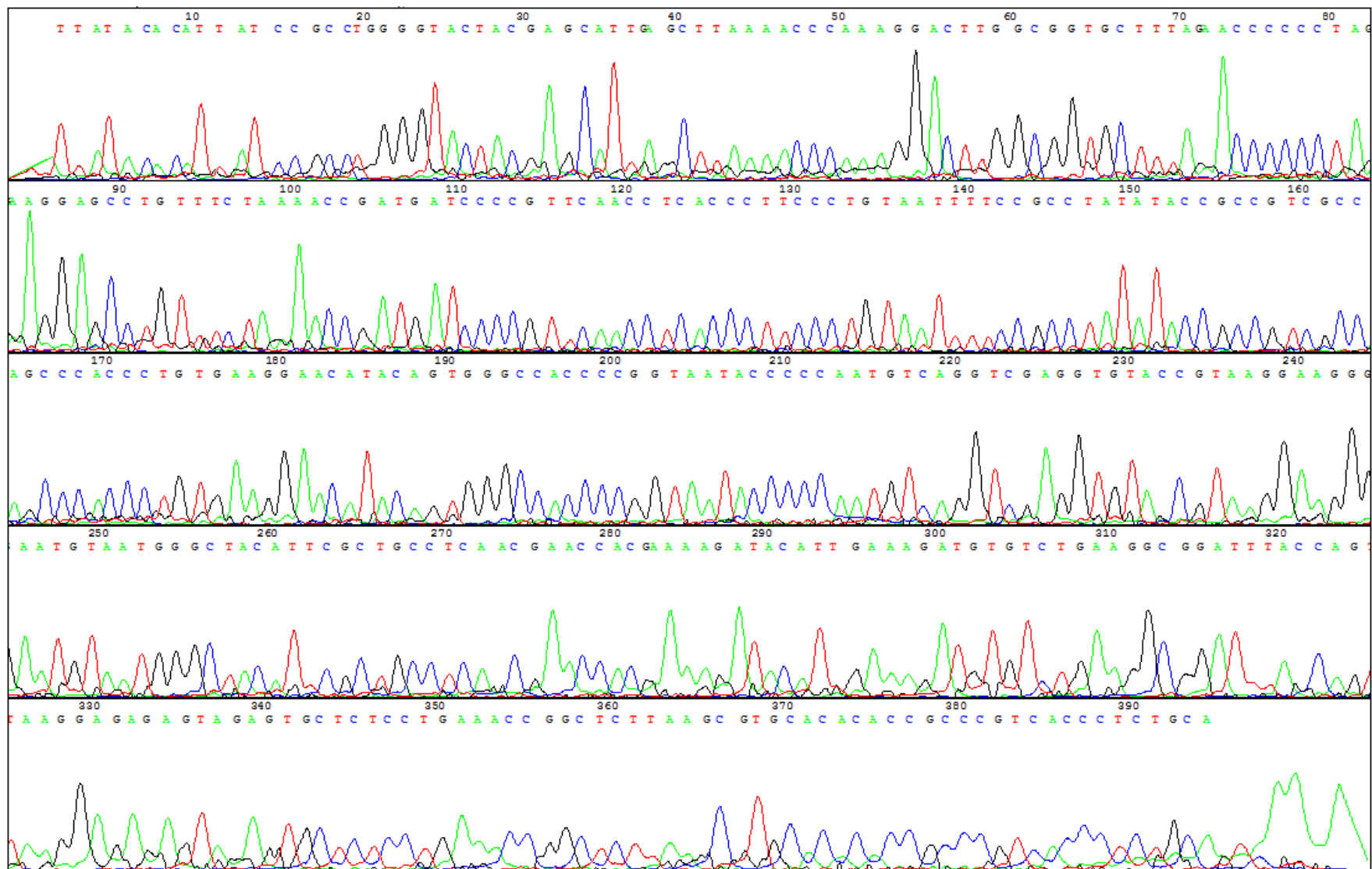
(*Mullus barbatus ponticus*, 12S rRNA)



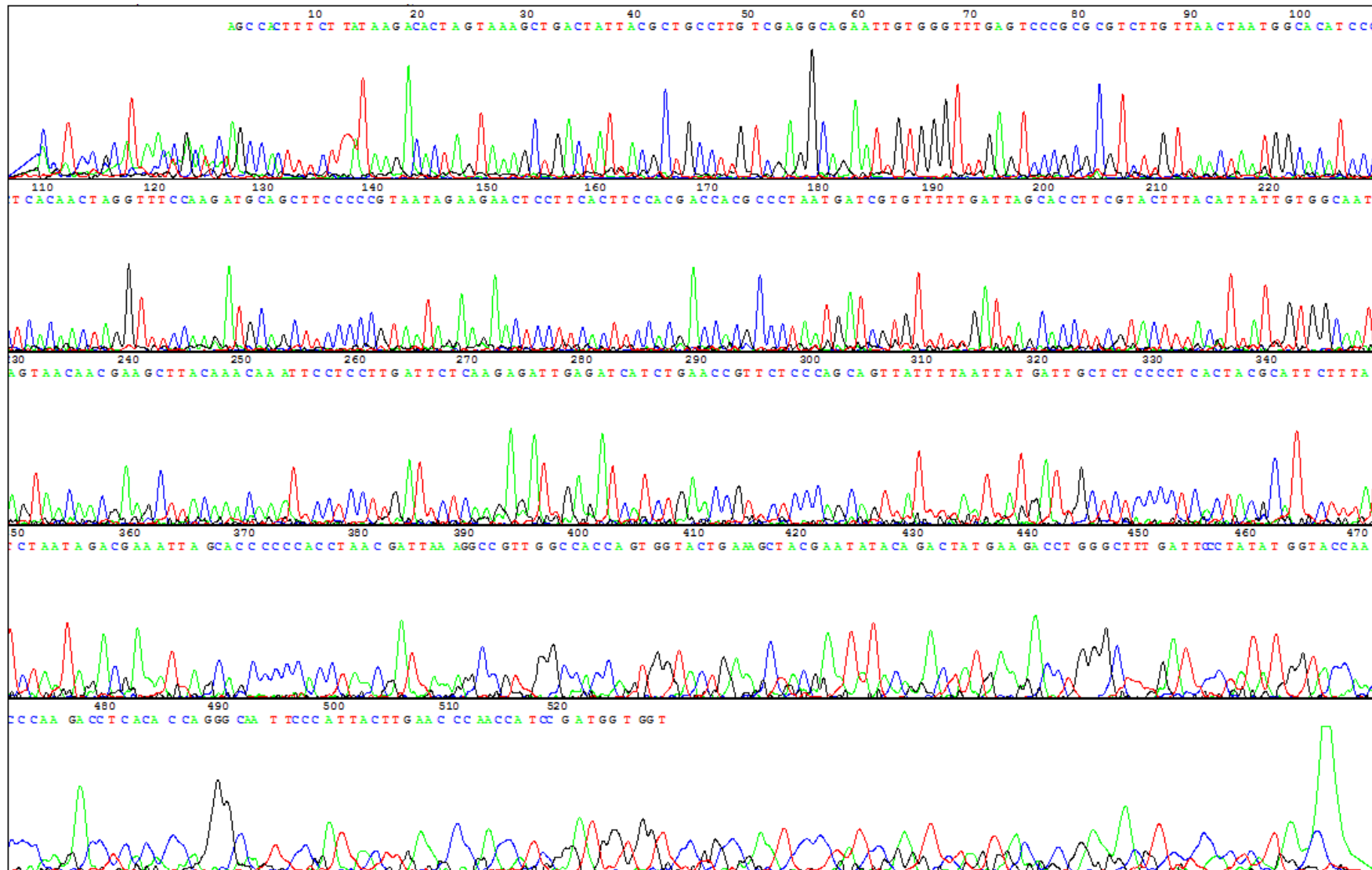
(*Mullus surmuletus*, 12S rRNA)



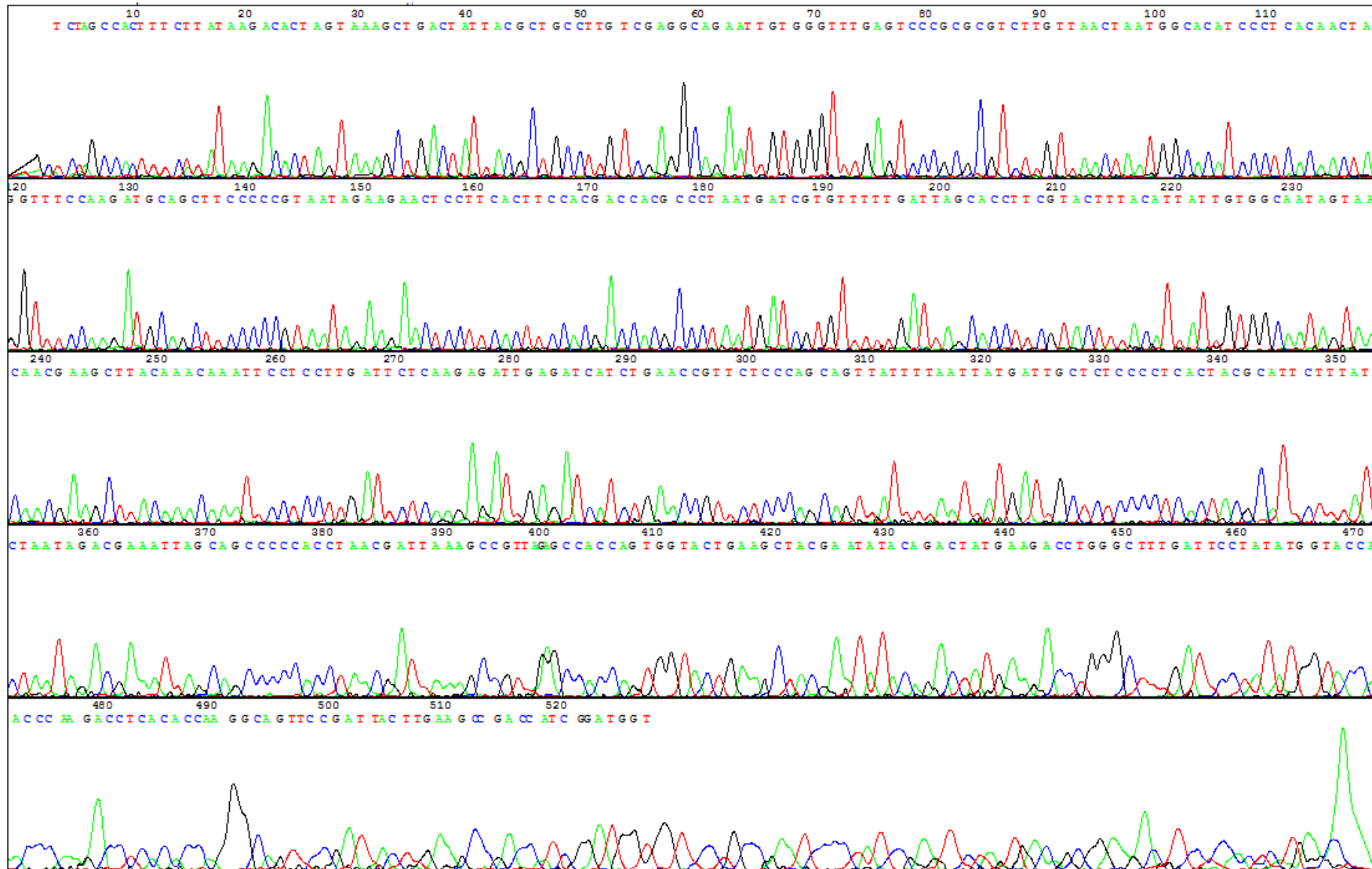
(*Upeneus pori*, 12S rRNA)



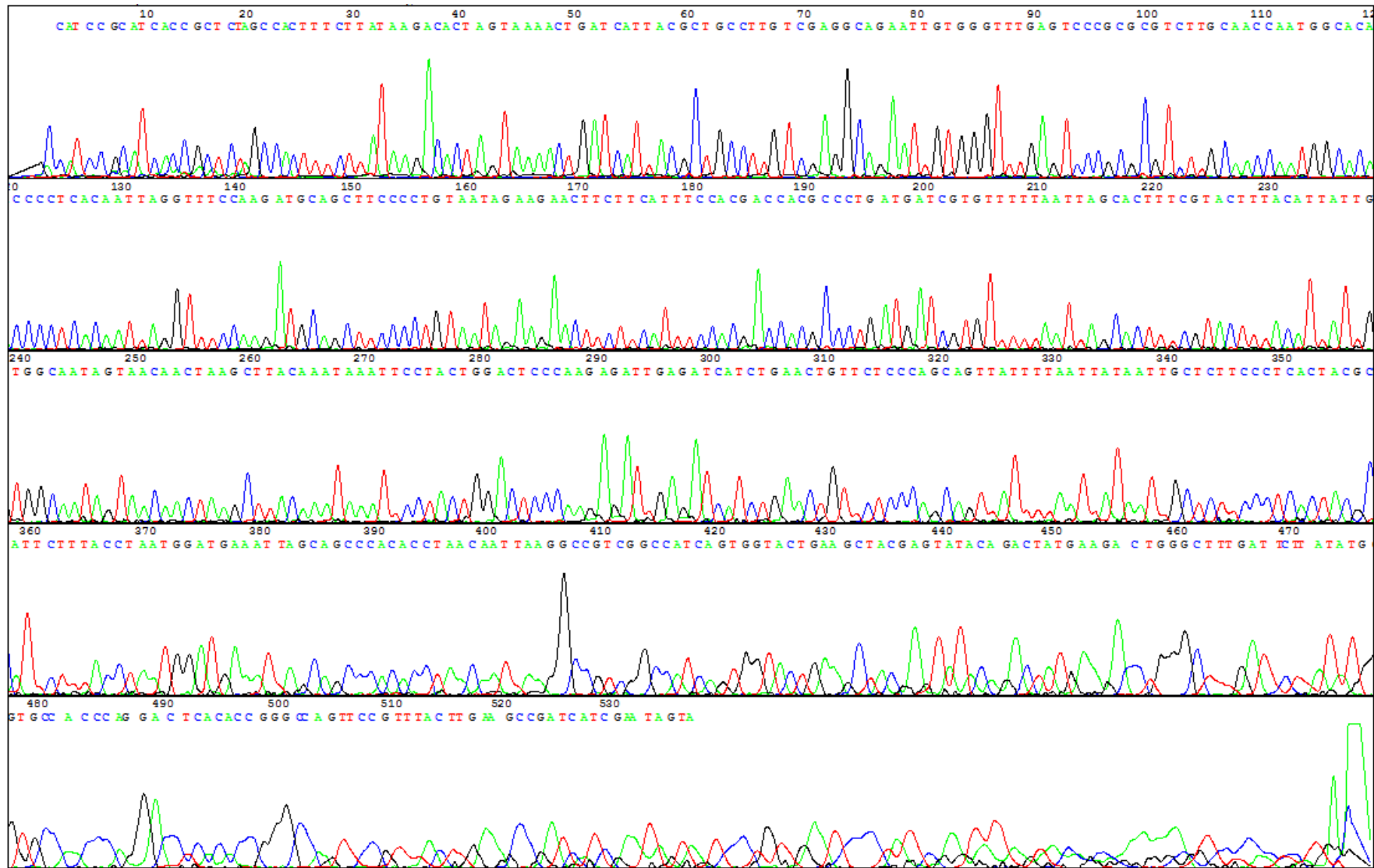
(*Upeneus moluccensis*, 12S rRNA)



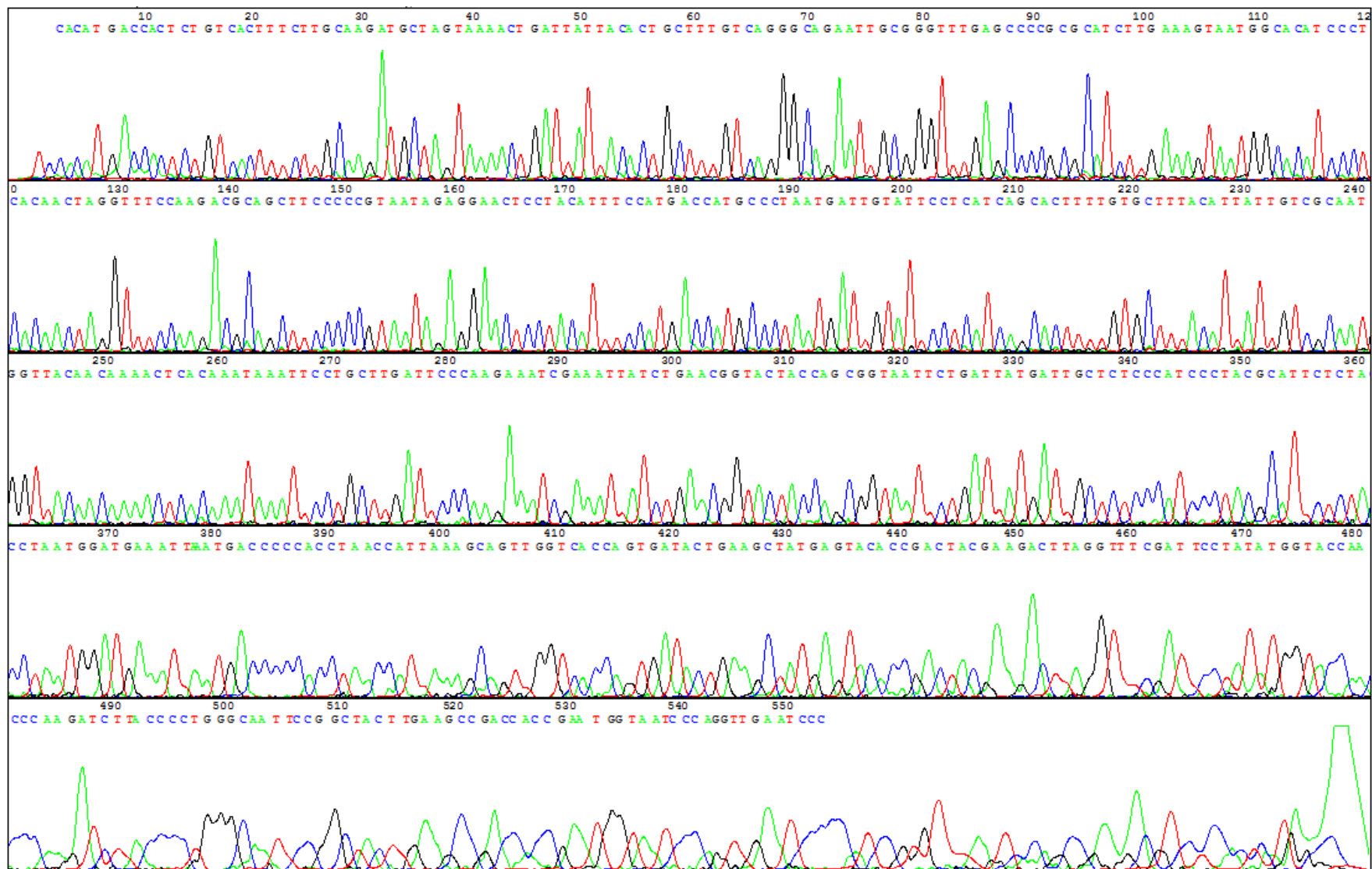
(*Mullus barbatus*, CO II)



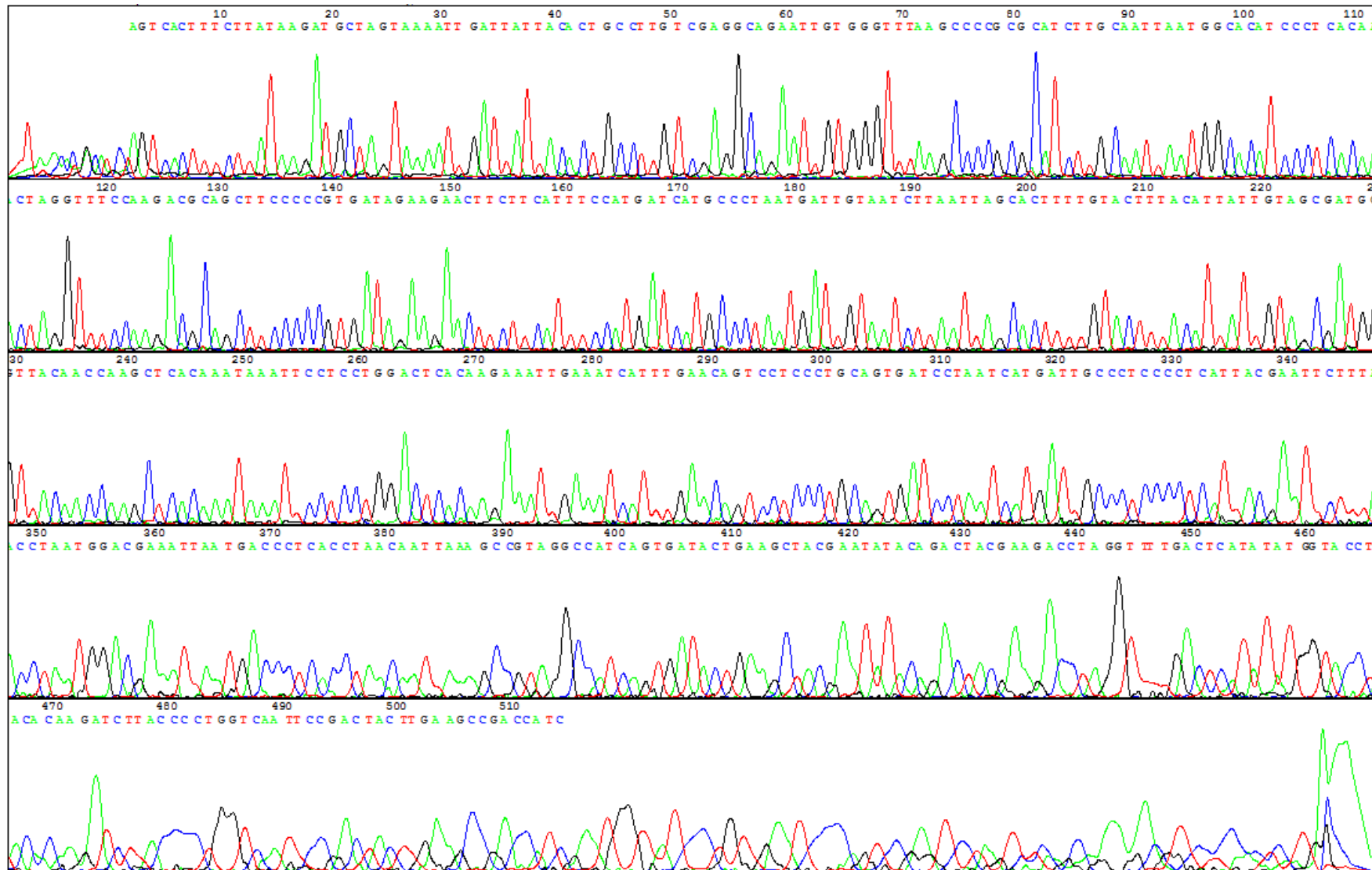
(*Mullus barbatus ponticus*, CO II)



(*Mullus surmuletus*, CO II)



(Upeneus pori, CO II)



Upeneus moluccensis, CO II)

ÖZGEÇMİŞ

Ankara'da 1981 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini T.E.D. Ankara Koleji'nde tamamladı. 1999 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvansal Üretim Bölümü'nden 2005 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2005 – 2007 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Ana Dalı'nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı.