



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TÜRKİYE'DE ENDEMİK
TURCICHONDROSTOMA FAHIRAE
(CYPRINIFORMES: LEUCISCIDAE)'NİN
MOLEKÜLER SİTOGENETİK ÖZELLİKLERİ

Güldane GÖZEN TAVŞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Güldane GÖZEN TAVŞAN tarafından hazırlanan “**Türkiye’de Endemik *Turcichondrostoma fahirae* (Cypriniformes: Leuciscidae)’nin Moleküler Sitogenetik Analizi**” adlı tez çalışması 21/08/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Gökalg Özmen GÜLER

Danışman

Prof. Dr. Atilla ARSLAN

Üye

Prof. Dr. Gökhan ZENGİN

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer Faruk Yüksel
FBE Müdürü

Bu tez çalışması S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 22201041 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Güldane GÖZEN TAVŞAN
21.08.2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’DE ENDEMİK *TURCICHONDROSTOMA FAHIRAE* (CYPRINIFORMES: LEUCISCIDAE)’NİN MOLEKÜLER SİTOGENETİK ÖZELLİKLERİ

Güldane GÖZEN TAVŞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Atilla ARSLAN

2024, 69 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Atilla ARSLAN

Prof. Dr. Gökhan ZENGİN

Prof. Dr. Gökalep Özmen GÜLER

Türkiye tatlı su balıkları bakımından oldukça zengindir. Bunların içindeki bazı türlerin sistematigi son zamanlarda değişmiştir. Bunlarda bir olan *Turcichondrostoma fahirae* daha önceleri farklı cinslerde sınıflandırılmasına rağmen, yapılan hem morfolojik hem de moleküler çalışmanın sonucunda *Turcichondrostoma*’ya aktarılarak bu cins içinde resmileştirilmiştir. Ancak bu zaman içerisinde türün karyolojik özellikleri ile ilgili herhangi bir araştırma mevcut değildi. Bu çalışmada, türün karyotipini incelemek için Giemsa, C-, Ag-NOR ve CMA3 boyamalarını ve çoklu gen ailelerinin (5S ve 18S rDNA, U1 ve U2 snDNA) ve telomerik tekrarların (TTAGGG)n kromozomal haritalamasını kullanıldı. Analiz edilen bireylerde diploid kromozom sayısının (2n) diğer lösisinlerdeki gibi 50 olduğu, heteromorf bir çifti içeren karyotip yapısı, sentromerik ve perisentromerik kurucu heterokromatin, interstisyel telomerik bölgelerin yokluğu, heteromorfik dokuz nolu çiftteki 18S major rDNA yoğunluğunun farklı olduğu ve buna bitişik bir çift ve ayrı iki çift olmak üzere toplam üç çift 5S rDNA lokusları ve tek bir çift üzerinde birlikte lokalize U1/U2 snDNA tandem tekrarları tespit edilmiştir. Ayrıca en büyük akrosentrik çiftin q-kolunun telomer bölgesindeki kurucu heterokromatin bloğun varlığı ve heteromorf dokuz numaralı çiftteki major (Ag-nitrat/CMA3 pozitif) rDNA bölgesi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önce çalışılmış kababurun türlerinin karyotip ve bazı kurucu heterokromatin dağılımı bakımından benzer bulunurken (telomerik C-band hariç), sadece sm bir çift kromozomda plesiomorfik NOR karakterinin olması, major ve minor rDNA sayısı ve dağılımı ile U1/U2 snDNA tandem tekrarları tespit edildiği kromozom morfolojisi açısından farklı bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçların, *Turcichondrostoma* cinsin tanımlanmasını sağlayan moleküler analiz sonuçlarında olduğu gibi *T. fahirae*’nin diğer kababurun balık türlerinden farklı olduğunu gösteren işaretler taşıyabileceğini düşünüyoruz. Bulgularımızın kanıtlanması için Türkiye’deki diğer kababurun balık türleri ile ilgili benzer çalışmaların da yapılmasını öneriyoruz.

Anahtar Kelimeler: FISH, kromozom bantlama, rDNA, Tefenni kababurun balığı, telomerik, U1-U2 snRNA

ABSTRACT

MS THESIS

MOLECULAR CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF ENDEMIC TURCICHONDROSTOMA FAHIRAE (CYPRINIFORMES: LEUCISCIDAE) IN TÜRKİYE

Güldane GÖZEN TAVŞAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Atilla ARSLAN

2024, 69 Pages

Jury

Prof. Dr. Atilla ARSLAN

Prof. Dr. Gökhan ZENGİN

Prof. Dr. Gökalep Özmen GÜLER

Turkey is quite rich in terms of freshwater fish. The systematics of some species among them have changed recently. One of them, *Turcichondrostoma fahirae*, was previously classified in different genera, but as a result of both morphological and molecular studies, it was transferred to *Turcichondrostoma* and formalized in this genus. However, no research on the karyological characteristics of the species was available at that time. In this study, Giemsa, C-, Ag-NOR and CMA3 stains and chromosomal mapping of multiple gene families (5S and 18S rDNA, U1 and U2 snDNA) and telomeric repeats (TTAGGG) were used to examine the karyotype of the species. In the analyzed individuals, the diploid chromosome number (2n) was 50 as in other leucines, the karyotype structure including a heteromorphic pair, centromeric and pericentromeric constitutive heterochromatin, the absence of interstitial telomeric regions, the 18S major rDNA density in the heteromorphic pair number nine was different, and a total of three pairs of 5S rDNA loci, one pair adjacent to it and two separate pairs, and U1/U2 snDNA tandem repeats co-localized on a single pair were detected. In addition, the presence of a constitutive heterochromatin block in the telomere region of the *q*-arm of the largest acrocentric pair and the major (Ag-nitrate/CMA3 positive) rDNA region in the heteromorphic pair number nine were detected. The results obtained were found to be similar to those of previously studied roughneck species in terms of karyotype and some constitutive heterochromatin distribution (except for the telomeric C-band), but were found to be different in terms of chromosome morphology, where only the sm pair had plesiomorphic NOR character, major and minor rDNA number and distribution, and U1/U2 snDNA tandem repeats were detected. We believe that the results we obtained may carry signs indicating that *T. fahirae* is different from other nase fish species, as in the molecular analysis results that allowed the identification of the *Turcichondrostoma* genus. We recommend that similar studies be conducted on other nase fish species in Turkey to prove our findings.

Keywords: FISH, kromozom banding, Tefenni nase, telomeric, rDNA, U1-U2 snRNA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında, her türlü konuda yol gösterici olan, çalışmamda karşılaştığım zorlukları ve isteklerimi her zaman göz önünde bulundurarak tezimin her satırına kafa yoran, samimiyetini her zaman hissettiren, laboratuvar çalışmamda, arazi çalışmamda ve tez yazımda benden desteğini, bilgi birikimini ve tecrübelerini esirgemeyen her zaman öğrencisi olduğum için gurur duyduğum çok kıymetli danışmanım Prof. Dr. Atilla ARSLAN'a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca tez çalışmamda benden desteğini ve laboratuvar imkânlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Emine ARSLAN'a; laboratuvar çalışmamda bana yardımcı olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Büşra ÖZÇAY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda benim bütün sorularımı titizlikle cevaplayan ve tez çalışmamda kullanılan bazı plazmitlerin teminini sağlayan Çek Bilimler Akademisi'nden Dr. Alexander SEMBER'e minnetlerimi belirtirim.

Arazi çalışmamda bana yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Salim Serkan GÜÇLÜ'ye, arkadaşlarım Zafer ALPASLAN ve Ahmed DOORİ'ye teşekkür ederim.

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik çalışanlarına desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Beni maddi manevi daima destekleyen bana olan güvenini hiçbir zaman kaybetmeyen, beni her zaman cesaretlendiren, uzun deney günlerinde beni sabırla bekleyen, varlığıyla sonsuz mutluluk duyduğum sevgili eşim Op. Dr. Kamuran TAVŞAN'a ve beni bugünlere getiren anneciğim Anakız GÖZEN'e teşekkür ederim.

Araştırma ve tez projesi kapsamında maddi katkılarından ve sağlamış olduğu burs desteğinden dolayı S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP) teşekkür ederim.

Güldane GÖZEN TAVŞAN
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Araştırma Konusu Familya, Cins ve Tür Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.1. Leuciscidae familyası	4
2.1.2. <i>Turcichondrostoma fahirae</i> (Ladiges, 1960)	5
2.2. Temel Kavramlar ve Kromozom	8
2.2.1. DNA'nın yapısı ve gen ifadesi.....	8
2.3. DNA-Gen Kromozom İlişkisi ve Kromozomların Yapısı	10
2.3.1. Kromatin	11
2.3.2. Sentromer.....	13
2.3.2. Telomer.....	15
2.3.4. Kromozomların morfolojisi ve sentromer konumuna göre kromozomların sınıflandırılması	15
2.3.5. Karyotip	18
2.4. Kromozom Bantlama Teknikleri	20
2.4.1. Giemsa boyama.....	21
2.4.2. Ag-NOR boyama	22
2.4.3. C-bantlama.....	23
2.4.4. CMA ₃ -DAPI boyama.....	23
2.5. FISH (Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon) Yöntemi.....	24
2.6. Türkiye'de ve Dünya'da Dağılım Gösteren Karyolojisi Çalışılmış Bazı Leuciscidae Türleri	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Araştırma ortamı ve örneklerin elde edilmesi.....	33
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Balık örneklerinden metafaz plaklarının elde edilmesi	35
3.2.2. Karyolojik preparasyon.....	35
3.2.3. Giemsa boyama.....	36
3.2.4. C-bantlama.....	37
3.2.5. AgNOR boyama	37
3.2.6. CMA ₃ /DAPI Boyama	38
3.2.7. FISH Problarının Tasarlanması ve FISH Kurulması	39

3.2.7.1. 5S rDNA bölgesi için problemlerin hazırlanması.....	39
3.2.7.2. 18S rDNA bölgesi için problemlerin hazırlanması.....	40
3.2.7.3. 5S ve 18S rDNA prob karışımının hazırlanması	41
3.2.7.4. Telomerik tekrar bölgeleri için FISH problemlerinin hazırlanması	41
3.2.7.5. FISH analizi	42
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Deneysel Sonuçlar	44
4.1.1. Diploid kromozom sayısı ve karyotip analizi	44
4.1.2. C-bantlama sonuçları	44
4.1.3. AgNOR boyama ve CMA ₃ -DAPI boyama sonuçları	45
4.1.4. Moleküler sitogenetik sonuçları.....	46
4.2. Tartışma	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	58
5.1. Sonuçlar	58
5.2. Öneriler	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

♀ : Dişi

♂ : Erkek

2n : Diploid kromozom sayısı

A : Adenin bazı

a : Akrosentrik

AgNO₃: Gümüş nitrat

Ba(OH)₂ : Baryum hidroksit

C : Sitozin bazı

CsCl: Sezyum Klorür

G : Guanin bazı

HCl : Hidroklorik asit

HPO₄ : Hidrofosfat

KCl : Potasyum klorür

m : Metasentrik

N : Normalite

Na₂HPO₄ : Disodyum fosfat

NF : Temel kromozom kol sayısı

pH : Hidrojen gücü

sm : Submetasentrik

SSC: Sodyum Sitrat Salin

st : Subtelosentrik

t : Telosentrik

T : Timin bazı

Kısaltmalar

µm : Mikrometre

bp : Baz çifti

CENP-A : Sentromer Protein A

CGH : Karşılaştırmalı Genomik İn Situ Hibridizasyon

CI : Sentromer İndeksi

CMA₃ : Kromamisin A₃

COI : Mitokondriyal Sitokrom C Oksidaz

DAPI : 4',6-Diamidino-2-Fenilindol

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

E.coli : *Escherichia coli*

EN : Nesli tehlike altında

FISH : Floresan İn-Situ Hibridizasyon

g : Gram

lncRNA : Kodlamayan Uzun Ribo Nükleik Asit

IUCN : Dünya Doğa Ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği

km : Kilometre

m : Metre

miRNA : Mikro Ribo Nükleik Asit

ml : Mililitre

mRNA : Mesajcı Ribo Nükleik Asit

mtDNA : Mitokondrial Deoksiribo Nükleik Asit

NF: Temel Kromozom Kol Sayısı

nm : Nanometre

NOR : Çekirdekçik Düzenleyici Bölge

rDNA : Ribozomal DNA

RNA : Ribo Nükleik Asit

rRNA : Ribozomal RNA

snRNA : Küçük Nükleer Ribo Nükleik Asit

snRNP : Küçük Nükleer Ribonükleoprotein

T. C. : Türkiye Cumhuriyeti

1. GİRİŞ

Genetik biliminin temelleri 1865 yılında Greoger Mendel'in bezelyeler üstünde yaptığı bir takım deneyler sonucunda atılmıştır (Schacherer, 2016). Mendel bezelyeler üstünde gözlemlenebilir bazı fiziksel özellikleri seçmiştir (tohumun buruşuk veya düz olması gibi) ve bu özellikler üzerinden genetiğin bir takım kurallarını oluşturabilmiştir (Cooper ve ark., 2006). İyi bir mendelci olarak bilinen İngiliz biyolog William Bateson (1861-1926) meslektaşı Adam Sedgwick'e 1905 yılında bir mektup yazmıştır ve bu mektupta ilk defa "genetik" kelimesini kullanmıştır. Bateson, genetik kelimesini kalıtım ve çeşitlilik bilimini tanımlamak amacıyla kullanmıştır. Bateson 1906 yılında Cambridge'de kendisi için ayrılan koltuğa "genetik" yazılmasını teklif etmiştir. Bateson'a ayrılan koltuğa "Biyoloji Makamı" ismi verilmiştir. 1906 yılında gerçekleşen üçüncü uluslararası hibritleşme konferansında Bateson, tekrar Mendel kurallarına dayanan bilimin "Genetik" olarak adlandırılmasını teklif etmiştir ve bu defa teklifi konferans katılımcıları tarafından kabul görmüştür. 1907'de yayınlanan konferans raporuna "Hibritleşme" kelimesi "Genetik" kelimesiyle yer değiştirerek "Üçüncü Uluslararası Genetik Konferansı" olarak geçmiştir. Bu konferanslar hala devam etmektedir (Gayon, 2016). Zaman içerisinde genetik bilimindeki yeni gelişmeler sonucunda insanların da dahil olduğu canlılar alemine ait kalıtım bilimiyle ilgili anlayışımızın en önemli temelleri atılmıştır (Schacherer, 2016).

Mendel yaptığı deneylerde seçmiş olduğu özelliğin taşıyıcısı olduğunu düşündüğü bir çift kalıtsal materyalin (genlerin) varlığını saptamıştır (Cooper ve ark., 2006). Kromozoma ait bilgiler ise İsviçreli bilim insanı Nageli'nin yaptığı deneyler sonucunda gözlemlenebilmiştir. Nageli, bitki hücre çekirdeklerinde ipliksi varlıklar gözlemlemiştir ve bu ipliğimsi varlıkları "geçici sitoblastlar" olarak tanımlamıştır (Kannan ve Zilfalil, 2009). Theodor Boveri 1880'lerde yaptığı bir takım deneylerle kromozomların kalıtım maddesinin taşıyıcısı olduğunu keşfetmiştir ve birçok sitoloji bilimiyle ilgilenen bilim adamına öncü olmuştur. 1902 yılında Sutton ve Boveri birbirlerinden bihaber şekilde kromozom kalıtım teorisini öne sürmüşlerdir (Balajee ve Hande, 2018). Artık 19. yüzyılda genleri taşıyan yapıların kesin olarak kromozomlar olduğu ortaya konmuştur (Cooper ve ark., 2006). "Kromozom" kelimesini ilk kez Waldeyer kullanmıştır. (chromos=Yunan dilinde renkler; soma= gövde, kelimelerinden türetilmiştir) (Kannan ve Zilfalil, 2009). Kromozomlar nükleusun esasıdır. Kromozomlar deoksiriboz nükleik asitten (DNA) ve histon ismi verilen proteinlerden oluşur. DNA, kalıtım materyali olan genleri üzerinde taşır. Ökaryotlarda vücut hücrelerinde bulunan kromozom sayısı farklı

canlılarda değişkenlik göstermektedir ve cinsiyet belirleyici bir çift kromozom bulundurulur. Prokaryotlarda ise durum farklıdır ve hepsi tek bir halkasal kromozom içerir (Balajee ve Hande, 2018).

Genetiğin alt bilim dallarından olan “Sitogenetik” terimi iki farklı bilim dalından türetilmiştir. Sitogenetik biliminin yaratıcısı olarak tanımlanan Walther Flemming 1870’lerde semenderin solungaç ve yüzgeçlerinden elde ettiği hücrelerde kromozomların mitoz bölünme anındaki hareketlerini gözlemlemek amacıyla anilin ile boyama yapmıştır. Kromozomlar bazofilik boyaları tuttuğundan Walther Flemming hücre çekirdeğinde ipliğimsi maddeler incelemiştir ve bu ipliğimsi maddeleri kromatin diye tanımlamıştır (Flemming, 1965). Sitogenetik bilimi, kromozomların genetiğini, fiziksel durumunu ve hücre bölünmesi anındaki devinimini inceler. Sitogenetik biliminin kapsamı içerisinde aynı zamanda kromozomların durumunun organizma üzerinde fiziki özelliklere yansması ve kromozomal çeşitlilikler ve farkların incelenmesi de vardır (Kannan ve Zilfalil, 2009). Boveri ve Sutton’un 1902 yılındaki kromozom kalıtım teorisinden itibaren günümüze kadar pek çok araştırma yapılmıştır ve bu çalışmalar sayesinde sitogenetik bilimde oldukça önemli ivmeler kaydedilmiştir. Günümüzdeki klasik ve moleküler sitogenetik yaklaşımlar tıp alanında hastalıkların tanısında, sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin tespitinde kullanılmaktadır. Sitogenetiğin çalışma alanında sistematik araştırmalar da yer almaktadır (Gold ve Zoch, 1990; Balajee ve Hande, 2018).

Balıklar, omurgalı canlılar arasında en fazla türe sahip canlı grubudur (Ráb ve ark., 2007). Yeryüzündeki omurgalı canlıların yarısından fazlasını balıklar oluşturmaktadır. Yaklaşık 60.000 farklı tür balık olduğu belirtilmiştir. Balıklar 500 milyon yıl önce ortaya çıkmışlardır ve dünyanın her yerine yayılmışlardır. Hem yaşadıkları coğrafya ve fiziksel özellikleri hem de hareketleri bakımından bu yayılışla beraber çok fazla çeşitlilik göstermişlerdir. Bu çeşitlilik balıkların evrimini anlamayı ve sınıflandırılmasını zorlaştırmış olsa bile onların taksonomisinin çalışılmasını hep cazip kılmıştır (Nelson ve ark., 2016).

Balık araştırmalarında kromozomal deneyler her zaman araştırmacılar için merak konusunu olmuştur (Yoshio ve ark., 1966). Ancak bu ilgiye rağmen balık karyolojisi çalışmakta olan bilim insanları deneysel zorluklarla karşılaşmışlardır. Balıkların bazı fizyolojik ve biyolojik yapılarından dolayı metafaz plaklarının elde edilmesi zordur. Bu zorlukların başında balıkların fazla sayıda ve çok minik kromozomlar taşımaları gelmektedir. Ayrıca balıkların mevsimsel olarak hücre bölünmeleri her dönem aynı olmaması nedeniyle bir başka metafaz sorununu meydana getirmektedir. Yine bir başka

zorluk sebebi ise balıkların canlı bir şekilde çalışma yapılacak laboratuvar ortamına transferidir (Ayata ve ark., 2018). Tüm bu sebeplerden dolayı balıklar üzerine çalışma yapan laboratuvarlar ve sitogenetik çalışmalar sınırlıdır (Ráb ve ark., 2007).

Karyolojik çalışmalar, canlıların genetik bilgileri ve evrimsel süreçteki hikayeleri hakkında bize bilgi sağlayabilir. Araştırılan balık türlerinin kromozomlarıyla alakalı bize sayı, büyüklük ve morfolojik özellikleri hakkında temel bilgiler edinmemizi sağlar. Dahası bu çalışmalar türlerin iyileştirilmesinde bir partenogenez biçimi olan jinogenezise ve androgenezeye olanak sağlarken türler arasında veya tür içinde hibritleşme çalışmalarına imkân verir. Tüm bu nedenlerle balıklar üzerine olan kromozomal çalışmalar son yıllarda oldukça önemli bir ivme kazanmıştır (Dai ve Han, 2018). Bugüne kadar tanımlanmış 3425 balık türünün kromozomal analizi yapılmıştır ancak yaşayan balık türlerinin yaklaşık %90'ı kromozomal açıdan değerlendirilmemiştir (Chakrabarty, 2011).

Türkiye tatlısularında yaşayan teyit edilmiş ve 2 sınıf, 20 takım, 37 familya ve 97 cinse ait 427 tür bildirilmiştir. Söz konusu türlerin yaklaşık %50'si (215 tür) endemikdir (Çiçek ve ark., 2023). Endemik türler her ülke için büyük önem arz eder ve bulunduğu ülkenin doğal mirası olarak kabul edilirler. Endemik tür; “bir taksonun dünya üzerinde yalnızca belirli bir habitatta görülmesidir” şeklinde tarif edilebilir (Coad, 2005). Türkiye'deki balık faunasının takım seviyesinde en büyüğünü 297 tür ile Cypriniformes'ler oluştururken familya seviyesinde ise en büyüğünü 126 tür ile Leucisidae oluşturmaktadır (Çiçek ve ark., 2023).

Moleküler sitogenetik, kromozomal yapıyı ve işlevi analiz etmeye yönelik teknikleriyle organizmaların genetik planına ilişkin derin bilgiler sunmaktadır. Şuana kadar Tefenni kababurun balığının değişken taksonomisi esnasında bile herhangi bir karyolojik özelliği mevcut değildir. Bu çalışmada, *Turcichondrostoma fahirae*'deki karyotip organizasyonunu derinlemesine incelemeyi ve geleneksel sitogenetik özellikler (Giemsa-, C-, Ag-NOR ve CMA₃ boyamaları) ile birlikte 5S ve 18S rDNA, U1 ve U2 snDNA ve (TTAGGG)_n tandem tekrarlarının kromozomal haritalamasını ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, diğer endemik türlerde benzer analizler için bir şablon sunarak Anadolu bölgesindeki genetik çeşitliliğin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Araştırma Konusu Familya, Cins ve Tür Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Leuciscidae familyası

Leuciscidae familyası, Cypriniformes takımının en çok çeşitlilik gösteren familyalarından biridir ve oldukça geniş bir alanda dağılım gösterirler (Küçük ve ark., 2023). Fazla sayıdaki araştırmalara rağmen evrimsel süreçleri ve aile içindeki çeşitlilikleri hakkında alternatif hipotezler mevcuttur. Morfolojik olarak 7 adet alt aile, osteolojik olarak 6 adet alt aileye sahiptirler. Alt familyaları; Pogonichthyinae, Leuciscinae, Plagopterinae, Laviniinae, Phoxininae ve Pseudaspininae olarak açıklanmaktadır. Leuciscidae familyasının, moleküler filogenetik sınıflandırmasında 358 taksondan oluştuğu bildirilmiştir (Schönhuth ve ark., 2018; Küçük ve ark., 2023). Leuciscidae familyası için 100 cins ve 699 tür sınıflandırılmıştır (Ron Fricke, 2024). Büyüklükleri farklılık gösterse bile genelde küçük vücutlu balıklardır (Schönhuth ve ark., 2018). Birçok balık araştırmacısı Leuciscidae familyasının geniş bir coğrafyada dağılım gösterdiğini ifade etmiştir. Leuciscidae familyasına dahil türler Kuzey Avrasya tatlı su kaynaklarının önemli boyutta içeriğini oluşturur. Anadolu'da İsfahan ve Kor nehri havzaları, Dicle/Fırat nehir havzaları ve İran'ın Hazar Denizi havzasında yayılım gösterirler. Diğer bir deyişle Anadolu'nun bütününde leuciscidae familyasının üyeleri gözlemlemek mümkündür (Coad, 1991; Esmaili ve ark., 2014; Schönhuth ve ark., 2018; Küçük ve ark., 2023). Farklı habitatlarda ve geniş coğrafyadaki yaşam alanlarından dolayı besin zincirinin her düzeyinde olabilirler (Coad, 1991; Freyhof ve ark., 2006; Page ve Burr, 2011). Leuciscidae familyasının üyeleri acı sulara karşı tolerans sağlayamadıkları için tatlı sulara dağılımları sınırlıdır. Nehir havzalarında jeomorfolojik bir olay (örneğin; deniz gerilmeleri, tektonik bir olay, kapma olayı) olmadığı müddetçe göçler kısıtlanmaktadır. Bu nedenle öncesinde izole olan havzalar arasında yayılım göstermektedirler. Leuciscidae familyasının üyelerinin dağılışı ve yayılımı paleolitik dönemdeki havzalar ile ilgilidir. Zaman içindeki çok değişken jeolojik olaylar göz önünde bulundurulduğunda karmaşık evrimsel süreçleri, rastgele kolonileşmeleri alandaki genişlemeleri veya daralmaları doğrudan veya dolaylı olarak introgresyonun (gen aktarımı) göstergesidir (Hughes ve ark., 2009).

2.1.2. *Turcichondrostoma fahirae* (Ladiges, 1960)

İlk defa 1946 yılında Curt Kosswig'in Başpınar (Kırkpınar) su kaynağından (Tefenni, Güneybatı Anadolu) örnekleme yapmış ve söz konusu türü Ladiges (1960) *Phoxinellus fahirae* olarak isimlendirmiştir. Daha sonra yeniden bir düzenleme yapan Bogutskaya (1992) çalışma sonuçlarına göre *Ph. fahirae*'yi *Pseudophoxinus* cinsi içerisinde değerlendirmiş ve *Ps. fahirae* olarak tanımlama yapmıştır. Bogutskaya (2006) yaptığı çalışmalarda *Ps. fahirae*'nin *Pseudophoxinus* cinsi dışında tutulması gerektiğini rapor ederek *Chondrostoma* cinsi içerisinde değerlendirerek *C. fahirae* olarak isimlendirmiştir. Son yapılan bir çalışma ile Tefenni kababurun balık örneklerinin *C. fahirae*'den morfolojik ve moleküler metodlarla ayrılmış (Bogutskaya, 1992; Bogutskaya ve ark., 2006b; Turan ve ark., 2021) ve *Turcichondrostoma* cinsine alınmıştır. *T. fahirae* IUCN Tehdit Altındaki Türler Kırmızı Listesi içerisinde nesli tehlike altında (EN) olarak değerlendirilmiştir (IUCN, 2020).

Chondrostoma cinslerinin taksonomisiyle alakalı çalışmalar hala devam etmektedir ve henüz sınıflandırılmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. *Chondrostoma* cinsinin 7 alt soydan oluştuğu bildirilmiştir. Daha sonra yapılan bir çalışmada bu 7 soy grubunu 6 cins içerisinde toplanmıştır (Doadrio ve Carmona, 2004; Robalo ve ark., 2007) (Çizelge 2.1, 2.2).

Çizelge 2.1. *Chondrostoma* cinsinin 7 soy grubu ve bulundukları bölge (Doadrio ve Carmona, 2004)

BULUNDUKLARI BÖLGE	SOY GRUPLARININ İSİMLERİ
Avrupa ve Asya	Nasus
	Soetta
	Genei
İber Yarımadası	Taksostoma
	Lemmingi
	Polyleipsis
	Arcai

Çizelge 2.2. Soy gruplarının toplandıkları kababurun balık cinsleri (Robalo ve ark., 2007)

SOY GRUPLARI	TOPLANDIKLARI CİNS
Taksostoma	<i>Parachondrostoma</i>
Lemmingi	<i>İberchondrostoma</i>
Polyleipsis	<i>Pseudochondrostoma</i>
Arcai	<i>Achondrostoma</i>
Genei	<i>Protochondrostoma</i>
Nasus-Soetta	<i>Chondrostoma</i>

Dağılış Alanı: Burdur ili Tefenni ilçesinin 16 km güney tarafında kalan Karamusa köyü yanında Dalaman nehrinin ve Değirmendere çayının kaynağını oluşturan Başpınar (Kırkpınar) su gözü ve Değirmendere çayı ile Burdur'un Karamanlı ilçesinde bulunan Karamanlı Baraj Gölü ve Karataş gölünde sınırlı bir dağılım alanına sahiptir (Şekil 2.1). Ancak uzun süredir Değirmendere çayı ve Karataş gölü arasında su bağlantısı yoktur ve bu sebeple göldeki durum bilinmemektedir (Turan ve ark., 2021).



Şekil 2.1. *T. fahirae*'nin dağılış alanı (IUCN)

Taksonomi; *T. fahirae*'nin orijinal tanımı 1960 yılında Ladiges tarafından *Phoxinellus fahirae* olarak yapılmıştır. Epitet adı Türkiye Cumhuriyetinin ilk kadın zoologu ve ihtiyologu Fahire Battalgazi'ye ithafen verilmiştir. Fahire Battalgazi Türkiye'deki birçok akarsu kaynağından farklı balık faunalarını çalışmış ve isimlendirilmesini yapmıştır. Ayrıca balık koleksiyonlarının oluşturulması açısından yaptığı çalışmalar büyük önem arz etmektedir (Battalgil, 1940; 1944; Gaygusuz ve ark., 2021).

T. fahirae 2021 yılında yapılan ayrıntılı moleküler ve morfolojik bir çalışma ile diğer cinslerden ayrılmıştır. Morfolojik değerlendirmesinde; *T. fahirae* küçük bir balık

olarak değerlendirilmiştir (en çok 135 mm boyutunda). Yapılan bu çalışmaya göre birinci solungaç kemerinde diğer *Chondrostoma* cinslerine göre daha az solungaç tırnığı bulundurduğu ifade edilmiştir. Yine bu çalışmada *Turcichondrostoma*'nın premaksilla ve diş kemiklerinin de diğer *Chondrostoma* türlerinden farklı olduğu belirtilmiştir. Moleküler analizinde ise mtDNA COI ve cybt gen bölgesi dizilerini kullanarak Anadolu'daki bazı *Chondrostoma* türlerinin aynı gen dizileriyle bir karşılaştırma yaparak *Turcichondrostoma*'nın farklı bir cins olduğunu kaydetmişlerdir (Turan ve ark., 2021).



şekil 2.2. *T. fahirae*'nin genel görüntüsü (orijinal)

Regnum : Animalia

Phylum : Chordata

Classis : Actinopterygii

Ordo : Cypriniformes

Familia : Leuciscidae

Genus : *Turcichondrostoma*

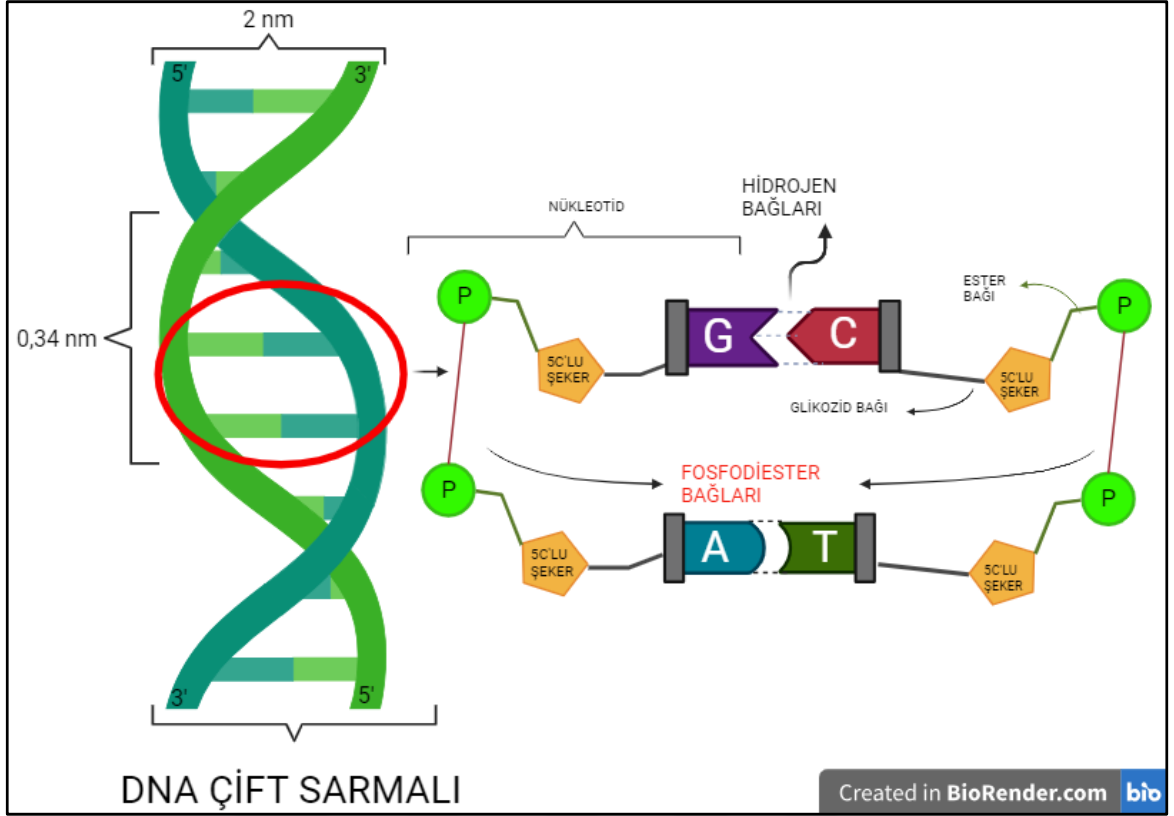
Species : *T. fahirae* Ladiges, 1960

2.2. Temel Kavramlar ve Kromozom

2.2.1. DNA'nın yapısı ve gen ifadesi

Kalıtımın esas birimi olan gen, DNA'daki özel bir amioasit dizisini kodlamaktadır. Gen ile ilgili bilgiler ilk defa 1865'de Genetik biliminin kurucusu olarak kabul edilen Greagor Mendel'in çalışmaları ile gün yüzüne çıkartılmıştır. Mendel yaptığı çalışmalarda farklı karakterdeki bitkileri birbirleri ile çaprazlayarak gözlemlenebilir karakterlerin sonraki soylara aktarımını incelemiştir (Huang ve ark., 1996). DNA'nın üç boyutlu yapısının anlaşılması Mendel'in çalışmalarından çok sonra olmuştur. James D. Watson 1951'de doktora sonrası araştırmacı olarak Cambridge Üniversitesi'nde çalışırken DNA'nın yapısını araştırmıştır. Francis H. C. Crick ise 1953'de yüksek lisans öğrencisiyken DNA'nın çift sarmal yapısını önerecek kimyasal deneyler yürütmüştür. Rosalind Franklin ise 1951'de DNA molekülünün dışında fosfat yapılarının bulunduğunu x ışınları ile göstermiştir. 1958'de Rosalind Franklin DNA'nın yapısının anlaşılmasındaki çalışmalarının önemini öğrenmeden ölmüştür. 1962 Nobel Fizik ve Tıp Ödülünü Watson ve Crick DNA'nın çift sarmal yapısını doğrulayan x ışını çalışmalarını yürüten Maurice Wilkins ile paylaşmışlardır (Levene ve Bass, 1931).

DNA (Deoksiriboz nükleik asit) çekirdekte bulunan ve kalıtım gibi önemli bir sorumluluğu olan materyaldir. Canlının temel bileşenlerinden olan bir nükleik asit türüdür. Nükleik asitler nükleotid denilen birimlerden oluşur. Nükleotidler ise bir fosfat ve bu fosfata ester bağıyla bağlanmış 5 karbonlu bir şeker ve bu 5 karbonlu şekere glikozit bağıyla bağlanmış organik bir bazdan oluşur. Nükleotidler birbirlerine fosfodiester bağlarıyla bağlanır ve bu bağ bir nükleotidin 5' fosfat grubu ile diğer nükleotidin 3'OH grubu arasında gerçekleşir ve bu nükleik asitlerin belli bir yönde sentezlenmesini sağlar. Nükleotidler bu şekilde bağlanarak oligonükleotidler oluşturur. Oligonükleotid yalnızca birkaç nükleotidin bağlanmasıyla ortaya çıkan kısa polimerlerdir. DNA polinükleotid yapıdadır yani binlerce veya milyonlarca nükleotidin fosfodiester bağıyla bağlanıp polimerleşmesiyle meydana gelmiştir. RNA (Ribonükleik asit) tıpkı DNA gibi polineükleotid yapıda bir nükleik asit olup tek bir zincire ve 6 karbonlu bir şekere sahiptir. Organik bazlarından birisi DNA'dan farklıdır ve Timin yerine Urasil içermektedir (Cooper ve ark., 2006).



Şekil 2.3. DNA çift sarmalının yapısı (şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur)

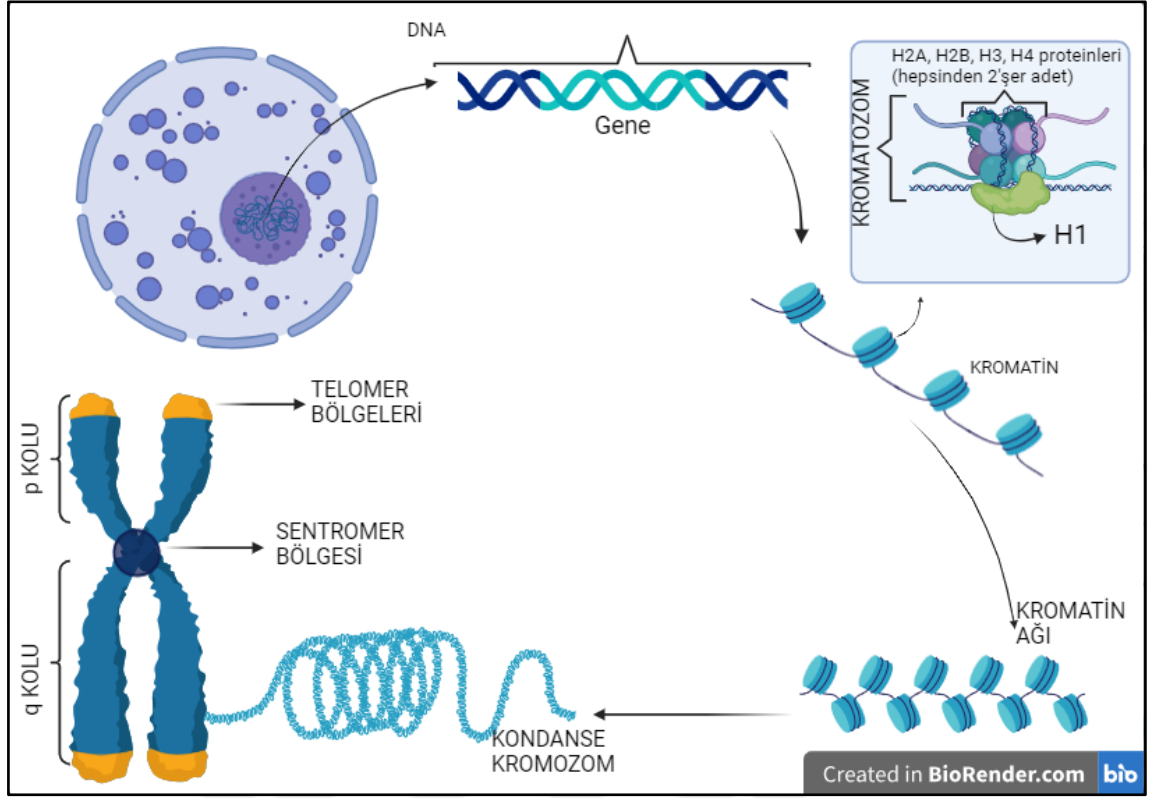
DNA'daki bilgi nükleotid zincirindeki bazların özel dizilimiyle ilgilidir. DNA iki polinükleotid zincirinin zıt yönde dizildiği çift sarmallı bir yapıya sahiptir ve bu iki zincir organik bazlar arasındaki spesifik bir eşleşme ile gerçekleşir. Adenin Timin ile Guanin Sitozin ile eşleşir ve aralarındaki bağlar ise hidrojen bağlarıdır (şekil 2.3). Bu spesifik eşleşmenin sonucu olarak nükleik asitler kendi kendilerini kopyalayabilmektedirler, çünkü tek bir zincir sentezlenecek yeni zincire kalıp görevi görebilmektedir. DNA bu sayede yönetici molekül olarak iş görür, çünkü hücresel olayların bir çoğunu düzenleyen proteinlerin sentezini belirler (Cooper ve ark., 2006). Watson ve Crick, DNA çift sarmalı modelini anlattıklarında spesifik baz eşleşmesinden ötürü DNA'nın tek bir zincirinin DNA replikasyonu için kalıp görevi üstelenebileceğini düşündüklerini de ifade etmişlerdir (Kunkel, 2004). Bu şekilde gerçekleşen DNA eşlenmesi yarı korunumlu replikasyon olarak tanımlanmıştır. 1958 yılında Matthew Meselson ve Frank Stahl yaptıkları başarılı deneyle yarı korunumlu DNA eşleşmesini göstermişlerdir. Deney düzeneğinin mantığı DNA'nın yoğunluğunun değiştirilmesine dayanır. *Escherichia coli*, normal şartlarda azotun hafif izotopu olan ^{14}N kullanırken bu deneyde Meselson ve Stahl *E.coli*'leri azotun ağır izotop formu olan ^{15}N içeren bir yerde üretmişlerdir. DNA yoğunluğu değiştiği için CsCl yoğunluk gradienti ile farklı izotopları içeren ortamlarda üretilen

bakterilerden izole ettikleri DNA'da yoğunluk farkını ölçmüşlerdir. ^{15}N izotoplarını bulunduran ortamda üretilen *E.coli* DNA'ları CsCl çözeltisinde çökerek bir yoğunluk oluştururken ^{14}N izotoplarını bulunduran ortamda üretilen *E.coli*'den izole edilen DNA çözeltiden hafif kalarak yukarıda bir yoğunluk oluşturmuştur. ^{15}N izotopları içeren DNA ile birleştirilip tekrar replikasyon sağlandığında CsCl yoğunluk gradientinde DNA çözelti ile aynı yoğunlukta olduğu gözlemlenmiştir. Yani ağır DNA hafif DNA ile hibrit orta yoğunlukta bir DNA oluşturmuştur. Bu deney sonucunda DNA'nın bir zincirinin diğer zincire kalıp olabileceği gösterilmiştir (Meselson ve Stahl, 1958; Cooper ve ark., 2006).

DNA'daki belirli bir proteini kodlamak için sıralanmış baz dizisi gen olarak tanımlanabilir. Başka bir ifadeyle genler organizmadaki birçok metabolik olayı enzimatik olarak düzenleyen proteinlerin kodlanması için özel dizileri taşıyan DNA parçalarıdır. Genler DNA bazları olan 4 adet bazın spesifik olarak dizilmesiyle meydana gelirken bu dizilere göre ifadelenen proteinler 20 çeşit aminoasitin dizilmesiyle meydana gelir. Gendeki değişimin proteindeki ifadesinin gözlemlenebilir farklılığı 1957'de yapılan bir deneyle ortaya konulmuştur. Genetik olarak kalıtılan bir hastalık olan orak hücreli aneminin bir tek aminoasit farklılığı ile ortaya çıktığı gösterilmiştir ve bu şekilde gen ve protein arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Ökaryotik genler kodlanan ve kodlanmayan bölgeler içerir, kodlanan bölgeler ekzon olarak adlandırılırken kodlanmayan bölgeler intron olarak isimlendirilir ve bu bölgeler transkripsiyondan sonra kesilip çıkarılır, bu olay moleküler biyolojide splicing olarak tanımlanır. Bu bölgelerin bulunmadığı RNA bölgesi olgunlaşmış mRNA'dır ve sadece ekzonları oluşturan bu diziye göre gen ifadesi gerçekleşir (Cooper ve ark., 2006).

2.3. DNA-Gen Kromozom İlişkisi ve Kromozomların Yapısı

Hücresinin merkezi olarak kabul edilen çekirdek bölgesini kalıtım materyali olan DNA oluşturur. Belirli bir proteinin ifadenmesi için spesifik bir sıralamayla dizilmiş olan genler kromozomların üzerinde bulunmaktadır. Kromozomlar hücrede her zaman gözlemlenemez, genelde hücre döngüsü sırasında mitotik evrenin metafaz aşaması kromozomların en iyi gözlemlenebilir olduğu yerdir. Bu aşamada kromozomlar en net şekilde tanımlanıp ayırt edilebilirler. Bu evrede kalıtım materyali kısalıp yoğunlaşır ve kıvrılarak kromozomları meydana getirir (Schulz-Schaeffer, 1980; Cooper ve ark., 2006)

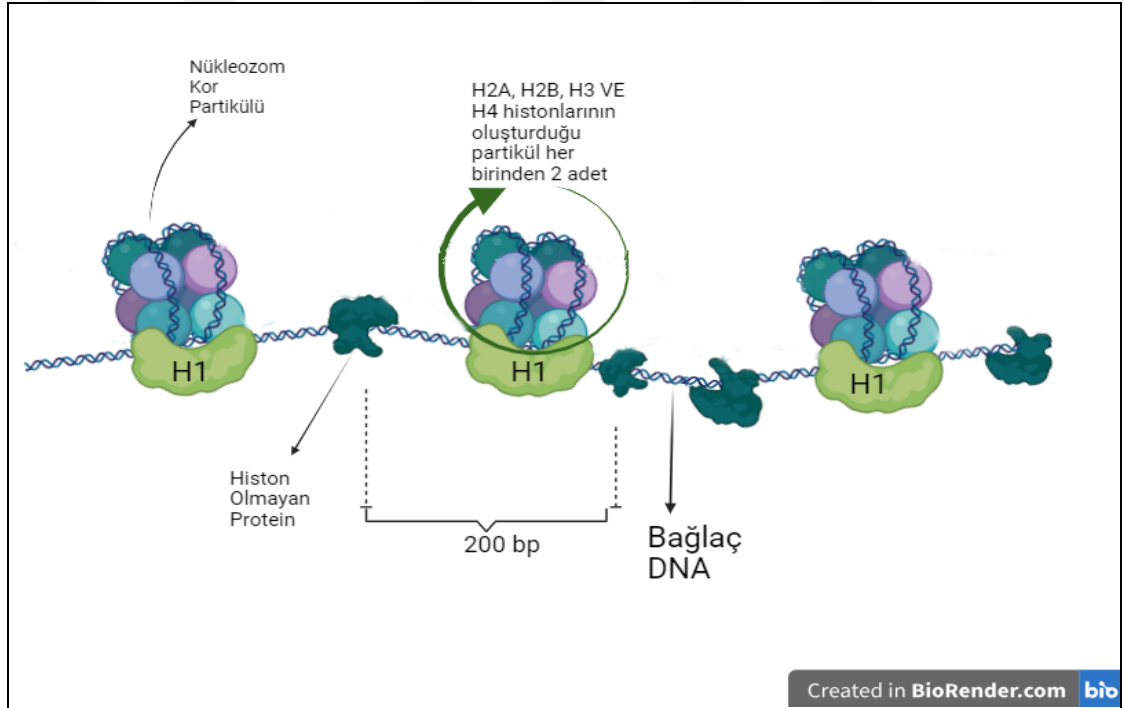


Şekil 2.4. Hücre içerisinde DNA'nın konumu, Kromatinin yapısı ve kromozom (şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur)

2.3.1. Kromatin

Kromozomlar kimyasal olarak DNA ve proteinlerden oluşmaktadır. DNA ipliğinin proteinler üzerine katlanmasıyla oluşan yapıya kromatin ismi verilmektedir. Yani DNA- protein kompleksinden oluşan yapıya kromatin ismi verilir. Bazı istisnai durumlarda kromatinlerin proteinler dışında küçük miktarlarda RNA içerdiği de gözlemlenmiştir. 1959 yılında Zubay ve Doty dana timusundan elde ettikleri dokulardan saflaştırmaya çalıştıkları kromatin yapısını gözlemlemişlerdir. Ancak kromatinin yapı ve işlevinin tam olarak anlaşılması için farklı metot ve teknolojilere ihtiyaç duyulmuştur ve bu ihtiyaçlara X ışınımının kırınımı, elektron mikroskopisi, atom mikroskopisi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi cevap olmuştur ve kromatin ilerleyen yıllarda gelişen bu teknoloji ile tam olarak anlaşılabilmiştir. Bazı çalışmalar ile DNA, protein ve RNA yoğunlukları ölçülebilmıştır, ölçümler sonucunda kromatinin yoğun miktarda DNA daha az miktarda protein ve çok az miktarda RNA içerdiğini ortaya koymuşlardır (Bonner, 1979; Woodcock, 2006). Kromatinin yapısında bulunan ve negatif yüklü DNA molekülüne bağlanmayı sağlayan proteinlere "Histon" adı verilir. Histonlar bazik amino asit (arjinin ve lizin) içerikleriyle DNA molekülüne afinite gösterirler. 5 tip histon

proteini açıklanmıştır ve bunlar H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak isimlendirilmiştir. Ökaryotik canlıların kromatinleri çok fazla histon içermektedir ve genellikle birbirlerine benzerlik göstermektedirler. Kromatinler histon olmayan proteinleri de içerir. Histon olmayan proteinler organizmada gen ekspresyonu ve DNA'nın kopyalanması gibi farklı olaylarda iş görmektedirler. Kromatinin ana ünitesi olarak tanımlanabilen histonların ve DNA'nın oluşturduğu komplekse 'nükleozom' denir. Nükleozomları 1974 yılında yaptığı deneyler ile Amerika'lı bir bilim adamı olan Roger Kornberg keşfetmiştir. Nükleozom yapısında H2A, H2B, H3 ve H4 her biri ikişer adet olacak şekilde 'Nükleozom Kor Partikülü' oluşturur, oluşan bu partikül etrafında DNA katlanarak sarılır ve H1, kompleksi bir toka gibi DNA üzerinden tutturur (Şekil 2.5) (Cooper ve ark., 2006; Woodcock, 2006).



Şekil 2.5. Nükleozom kor partikülü (şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur)

Bu yapı kromatozom olarak isimlendirilirken aynı zamanda kromatinin alt birimini oluşturan bir yapıdır. Bağlaç DNA 50 baz çifti uzunluğundadır. DNA'nın histon proteinleri üzerine katlanması bağlaç DNA'yı da içeren ortalama 10 nm büyüklüğünde kromatin lifini meydana getirir. Elektron mikroskop görüntüsünden yola çıkarak DNA'nın bu şekilde katlanarak paket yapması DNA boyunu 6 kat kısaltır. Bu paketler daha da yoğunlaşıp sarıldığında 30 nm boyundaki liflere dönüşür ve bu şekilde DNA boyundaki kısalma 50 kata ulaşabilir. Kromatin katlanmasının seviyesi yaşam süresinin

farklı evrelerinde değişkenlik gösterebilmektedir. Bu yoğunluk farkı gen ifadesini etkileyebildiğinden hücre için önemlidir. Hücre döngüsü esnasında interfaz durumundaki hücrede kromatin gevşektir kromatinin gevşek olduğı pozisyon ökromatin olarak adlandırılır. Bu pozisyonundaki kromatide DNA eşlenmesi ve transkripsiyon gerçekleşebilmektedir. Ökromatinin tam tersi olarak DNA'nın daha sıkı paketlenildiğı yerler heterokromatin olarak adlandırılır ve transkripsiyonel yönden pasif bölgelerdir, burada gen ifadesi gözlenmez (Cooper ve ark., 2006; Woodcock ve Ghosh, 2010).

Hücre döngüsü sırasındaki metafaz aşamasında kromozomlar kısalıp yoğunlaştığı için yeni oluşacak hücrelere ayrılabilirler. Kromatin mitoz esnasında kromozoma kadar yoğunlaştığı için transkripsiyon gerçekleşemez ve hücrede gen ifadesi yoktur. Metafaz aşamasındaki hücrede kromozomlar ışık mikroskobu ile görüntülenebilir durumdadır. Kromozomların ökromatin ve heterokromatin bölgelerine özgü boya paternleri bulunur ve boyama yapılabilir ya da in situ hibridizasyon yöntemleri ile kromozomlar üzerindeki belirli gen bölgelerinin kromozom üzerindeki lokasyonları veya sayıları floresan özellikteki maddeler ile tespit edilebilir (Cooper ve ark., 2006).

DNA boyaları ile boyama yapılan interfaz çekirdeğinin kromatininde bazı bölgelerinin daha koyu bazı bölgelerinin ise daha açık renkte boyandığı gözlemlenebilir. Daha yoğun ve koyu boyanan bölgeler kromatinin daha sıkı paketlenildiğı kompakt bölgelerdir ve heterokromatin olarak isimlendirilir. Açık boyanan kısımlar ise kromatinin daha az yoğun olduğı bölgelerdir ve ökromatin olarak isimlendirilir (Heitz, 1931).

2.3.2. Sentromer

Kromozom üzerinde farklı lokasyonlarda bulunabilen ve hücre bölünmesinde yeni oluşan yavru hücrelere doğru sayıda kromozom dağıtılmasında görevli olan özel kromozom bölgesine sentromer denir. Klasik sitogenetikçiler tarafından sentromer, kromozom üzerinde bulunan ve kromozomun daraldığı birincil boğum olarak ifade edilmektedir (Henikoff ve ark., 2001; Cooper ve ark., 2006). Moleküler sitogenetik çalışmalar için sentromer bölgesi kromozom üzerindeki heterokromatin bölgeyi ifade etmektedir (Talbert ve ark., 2002).

Hücre döngüsünün interfaz aşamasında DNA replikasyonu gerçekleşir ve DNA iki katı miktara çıkar, bu şekilde her bir kromozom eşlenmiş olur. Hücre döngüsünün interfaz aşaması tamamlandıktan sonra mitoz hazırlanan hücrede kromatin iplik yoğunlaşır ve metafaz aşamasında her bir kromatitten birer kopya bulunur, bunlar

sentromer bölgelerinden birbirlerine tutturulmuş vaziyettedirler. Bu iki kromatit birbirinin tamamen aynısıdır ve “kardeş kromatit” olarak isimlendirilirler. Sentromer bölgesi kromozoma göre daha sıkıştırılmış bir bölge olarak gözlemlenir. Mitoz bölünmenin sonraki aşamalarında sentrozomda bulunan iğ iplikleri mikrotübüllere tutunarak hücrenin karşı kutuplarına kardeş kromatitlerin çekilerek ayrılmasını sağlar. Sentromerlerin bulunduğu yerde bulunan kompleks proteinler “kinetokor” olarak isimlendirilen kromozom yapılarını meydana getirir. Sentromerlere özel proteinler bağlanıp iğ ipliklerinin meydana geldiği yapıya kinetokor denir. Kinetokorlar iğ iplikleri ve mikrotübüllerin tutunmasında aracı olarak görev alır. Kinetokorlar kardeş kromatitlerin ayrışmasında ve yeni oluşan hücrelere bölünmesinde görev alırlar (Cooper ve ark., 2006).

Sentromer dizilerinin görevleri ilk defa hücre bölünmesi sırasındaki plazmidlerin dağılımlarının izlenmesi ile maya hücrelerinde keşfedilmiştir. Fonksiyonel olan sentromer dizileri bulunduran plazmidi taşıyan maya hücresinde plazmidler eşit bir biçimde dağılıp göstermişlerdir. Fonksiyonel sentromer dizileri bulunmayan plazmitler yeni yavru hücrelere eşit aktarılamamışlardır. Bu deneyler ile sentromerin görevi anlaşılmıştır. Bitki ve hayvanlarda sentromer dizileri çoğunlukla tekrar bölgelerinden oluşur ve heterokromatin yapıdadır. Sentromer DNA’sındaki kromatinler normale göre farklıdır. Histon proteinlerinden olan H3 yerine H3 benzeri bir histon olan CENP-A bulunur. Sentromer dizisinde bulunan CENP-A histonunun test edilen bütün canlıların sentromer kromatininde var olduğu kaydedilmiştir. CENP-A varlığıyla kinetokor bağımlı proteinlerin ilişkisi kurulur, bu sbeepile nükleozomlarda CENP-A bulundurulması elzemdir ve bu şekilde CENP-A yeni oluşan yavru hücrelere eşit miktarlarda dağıtılarak sentromerin kendine özgü kromatin yapısı muhafaza edilmiş olur (Cooper ve ark., 2006).

Sentromerlerdeki kendine özgü kromatin doğası yeni oluşan yavru hücrelere aktarılır. DNA replikasyonunun olmadığı durumlarda da bu aktarım gerçekleşir, bu bir tip epigenetik kalıtım örneğidir. Epigenetik kalıtım, DNA’dan bağımsız genetik bilginin histon proteinleri tarafından aktarılmasıdır. Kromozomal DNA eşlenmesiyle nükleozomlar yeni oluşan yavru hücrelere taşınır ve CENP-A içeren nükleozomları taşıyan hücreler sentromerin kromatin yapısını korumuş olurlar (Cooper ve ark., 2006).

2.3.2. Telomer

Ökaryot hücrelerin kromozom uçlarında bulunan tekrar dizileri ‘‘telomer’’ olarak isimlendirilir. Telomer bölgesi heterokromatin yapıda eksprese olmayan özelleşmiş bir DNA dizisidir. Telomer bölgeleri diğer DNA dizilerinden başka bir fonksiyona ve yapısal dizilişe sahiptirler. Telomer özünde çalışması yapılan organizmalarda aynı yapıda fakat farklı tekrar dizilişine sahip olduğu tespit edilmiştir. Omurgalı canlılarda telomer dizisi ‘‘TTAGGG’’ şeklinde iken tek hücreli bir canlı olan *Tetrahymena*’da ‘‘TTGGGG’’ şeklindedir ve bu diziler yüzlerce veya binlerce defa tekrar edilir. Telomer dizileri tek iplikli bir 3’ DNA ucuyla biter. Bir kısım canlının telomerleri kromozom sonlarında ilmek yaparak kromozom sonlarını dejenerasyondan muhafaza eden bir protein bütünü olan shelterinle birleşir. Telomerlerin keşfi yakın bir tarihe dayanmakta olup ilk kez 1970’li yıllarda ciliat kromozomları üzerinde keşfedilmiştir. Biyolojik olarak telomerler kromozomların devamlılığını ve replikasyonunda iş görürler. Aynı zamanda kromozomların birleşmesini ve parçalanmasını önlerler. Kromozomlar için hem fiziksel hemde biyolojik açıdan elzemdirler (Shay ve ark., 1996; Achi ve ark., 2000; Kurtuluş ve Bozcuk, 2002; Wong ve Collins, 2003).

Telomerler lineer DNA parçalarının eşlenmesinde iş görür, DNA polimeraz replike olmakta olan DNA parçasının replikasyonunu devam ettirebilir, fakat lineer bir DNA dizisinin uç kısmından replikasyonu başlatamaz. Lineer kromozom uçlarını DNA polimeraz replike edemez. Bu durumda telomeraz isimli enzimden söz etmek gerekir. Telomeraz enzimi ters transkripsiyon aktivitesi ile bu soruna cevap olmuştur. Telomeraz aktivitesi hücrenin ömründe ve üreme yeteneğini kontrolünde önemlidir. Telomeraz aktivitesi kontrolsüz hücre bölünmesi olarak ifade edebileceğimiz bir hastalık olan kanser hücrelerinde oldukça yüksektir, bu nedenle sayısız bölünmelerine karşın kromozom uçları dejenerasyona uğramaz. Telomer dizileri ve telomeraz enzimi ile ilgili çalışmalar yaşlanma ve kanser hastalığında önem arz etmektedir (Cooper ve ark., 2006).

2.3.4. Kromozomların morfolojisi ve sentromer konumuna göre kromozomların sınıflandırılması

Kromozomların en güzel incelendiği aşama mitoz-metafaz aşamasıdır. Bu aşamada kromozomlar yoğunlaşarak kısalıp kalınlaşırlar ve incelenebildikleri kromozom formlarını alırlar. Özel boyalar ile muamele edilen kromozom preparatları ışık

mikroskobu aracılığıyla incelendiğinde sentromerde bahsedilen primer boğum gözlemlenebilir. Mitozun anafaz safhasında kutuplara çekilmenin gerçekleştiği iğ iplikleri bu bölgedeki kinetokorlara bağlanır. Metafaz aşamasında kromozomlar sentromer bölgelerinden birbirine tutturulmuş iki kardeş kromatit halindedir. Bu durum monosentrik kromozomlar için geçerlidir. Birden fazla sayıda sentromer bölgesi içeren veya hiç sentromer bulundurmeyen neosentrik kromozomlar da vardır (Emiroğlu ve Bürün, 2020)

Her bir homolog kromozomda minimum bir adet sentromer dışında kalan sekonder boğum mevcuttur. Sekonder boğumlar nükleolusun (çekirdekçik) olduğu yerlerdir. Nükleolusu organize eden bölge (nükleolus organizing region) yani kısaca NOR olarak adlandırılır. Sekonder boğum ve kromozom uç kısmı arasındaki bölgeye satellit ismi verilir. Satellitleri Singh kromozom çapına göre mikrosatellit, makrosatellit ve lineer satellit olmak üzere üç gruba ayırmıştır (Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Kromozomların morfolojilerine göre kategorize edilmesinde boyutları, sentromerin kromozom üzerindeki lokalizasyonu ve sekonder boğuma sahip olup olmadıkları birer ölçüttür (Naran, 1997).

Kromozomlarla ilgili çalışmalarda anafaz safhasında sentromer bölgesinden kutuplara çekilen kromatitlerin birbirlerinden farklı şekil almaları sentromer lokalizasyonunun farklılığından olduğunu düşündürmüştür (Emiroğlu ve Bürün, 2020). Kromozom araştırmacılarının ortak bir terminoloji kullanması amacıyla Levan ve arkadaşları 1964 yılında bir isimlendirme yapmışlardır. Bu isimlendirme sentromerin kromozom üzerindeki lokalizasyonuna göre yapılmıştır (Levan ve ark., 1964).

Sentromer, kromozomun konumuna göre kromozomu eşit veya farklı boyutlarda ikiye böler. Bölünen kısımlar kromozom kolları olarak tanımlanır. Uzun kalan kısma uzun kol, kısa kalan kısma kısa kol denilmektedir (Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Karyotiplerin oluşturulmasında sentromer konumu ve kromozom kolları baz alınarak kol oranı (q/p), sentromer indeksi (CI), ve bağıl uzunluk (%) hesaplanabilmektedir. Sentromer indeksi daha nadir kullanılırken, kol oranı karyotiplendirmede daha sık kullanılmaktadır. Bu çalışmalar kromozom boyu hakkında fikir verir. Bağıl uzunluk metafaz plağındaki tüm kromozomların bir diğer kromozom ile olan büyüklük farkıdır (Macgregor, 1988). Karyotip hesaplamalarında kullanılan formüller şu şekilde gösterilebilir;

Kısa kol: p

Uzun kol: q

Toplam kromozom boyu : $p+q=c$

Uzun kolun kısa kola oranı: $q/p=r$

Sentromer indeksi $=p/c=i$

Bağıl uzunluk = $c / \text{haploid kromozomların boyları toplamı} \times 100$

Bazı değerler bilindiğinde kısa kol ve uzun kol hesaplanabilmektedir

c ve r değerlerinden yola çıkarak;

$$q = c.r/r+1$$

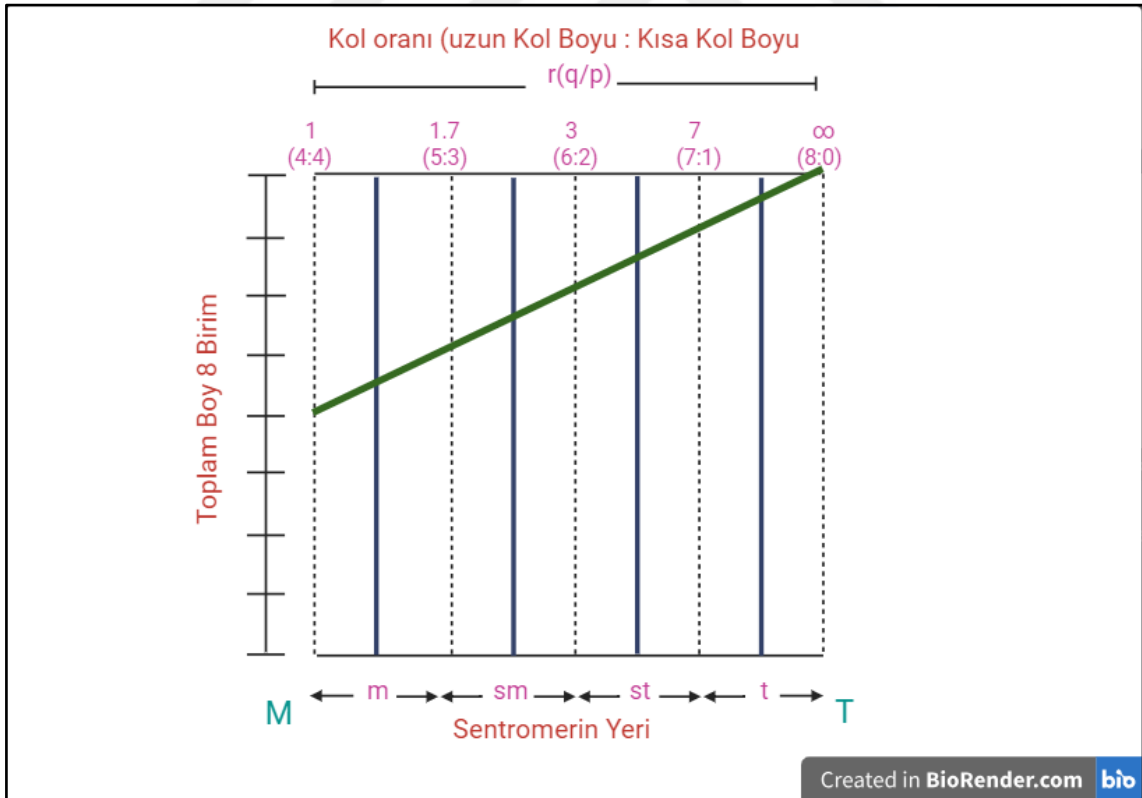
$$p = c/r+1$$

c ve i değerlerinden yola çıkarak;

$$q = c(100-i)/100$$

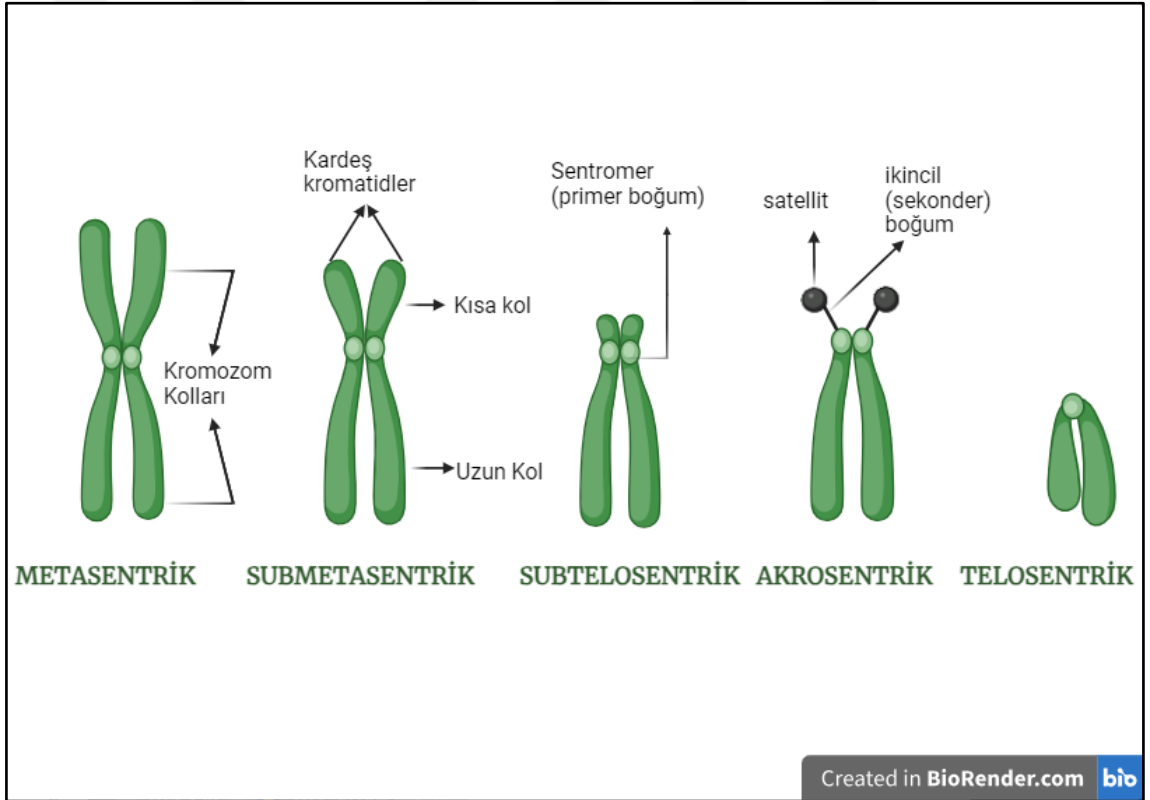
$$p = i.c/100$$

Sentromer bölgesinin kromozom üzerindeki lokalizasyonuna göre kromozomu farklı boyutlarda bölebilir, bu bölünme 4 farklı şekilde sınıflandırılmıştır (Şekil 2.7) (Levan ve ark., 1964).



Şekil:2.6. sentromer pozisyonunun çeşitliliği 4 eşit bölgeye bölünmüştür; metasentrik (m), submetasentrik (sm), subtelosentrik (st) ve telosentrik (t); her bir bölüm tipik bir kromozomu göstermektedir. M; medyan noktayı, T; terminal noktayı göstermektedir (Levan ve ark., 1964)

Sentromerin konumuna göre kromozomların isimlendirilmesi şu şekilde ifade edilebilir; sentromer kromozomun medyan veya medyan bölgeye yakın yerinde ise kromozom metasentriktir, kısa kolun ve uzun kolun birbirine eşit olduğu kromozom formunu temsil eder. Sentromer kromozomun submedyan bölgesinde veya submedyan bölgesine yakın ise subtelosentrik kromozom olarak tanımlanır, kısa kollar ve uzun kollardan bahsedilir, sentromer kromozomda üst bölgeye yakındır ancak kısa kollar çok net bir şekilde görülür (Şekil 2.6). Sentromer kromozomun terminal bölgesinde ise akrosentrik kromozom olarak tanımlanır, kısa kollardan söz etmek mümkün değildir ve kısa kol ayırt edilemez. Sentromer kromozomun tam terminal bölgesinde lokalize ise telosentrik kromozom olarak ifade edilmektedir yine burada da kısa kollar seçilemez (Emiroğlu ve Bürün, 2020).



Şekil 2.7. Kromozom üzerinde Sentromerlerin yerine göre kromozomların isimlendirilmesi (Chowdhury ve ark., 2020)'den yararlanarak yeniden düzenlenmiştir

2.3.5. Karyotip

Karyotip; bir canlıya ait tüm kromozomların sayısal, boyutsal, morfolojik ve diğer belirlenmiş spesifik özelliklerini açıklayan bir sitogenetik terimidir. Kromozomların

belirli bir düzende dizilmesi ve sıralanmasıdır (Altınordu ve ark., 2016; Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Karyotiplendirmede tıpkı kromozomların sayısının belirlendiği hücre döngüsü sırasında aktif bölünen doku ve hücrelerden elde edilen preparatlardan yapılır. Hücreler kromozom eldesi için ön işleme tabii olur. Kromozomlar üzerinde sentromer bölgelerinin ayrımı için de çeşitli işlemlere ihtiyaç duyulabilir. En doğru kromozom sayımı sentromerlerin sayılarak yapıldığı sayım metodudur. Sentromerlerin net olmadığı metafaz plaklarından da kromozom sayımı yapılabilir, fakat bunlar çok güvenilir sonuçlar vermeyebilir. En doğru ve güvenilir karyotip analizi için kaliteli hazırlanmış preparatlardan en seçilebilir metafazlar seçilmelidir (Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Karyotiplendirme yapılarak türlerin evrimleşmesindeki kalıplar veya kromozomal hastalıkların tespiti için kromozom haritalarının oluşturulmasında kullanılabilir. Karyotiplendirme işlemi manuel metotlarla yapılırsa oldukça zahmetli ve zaman alıcı olabilmektedir. Bilgisayar destekli görüntüleme sistemleri ile karyotiplendirme işi hızlandırılarak verim arttırılabilir. Son dönemlerde birçok sitogenetik araç geliştirildi, ancak geliştirilen sitogenetik araçlar daha çok ölçümleri hesaplamak amacıyla geliştirilmiştir. Kromozom hesaplamaları ve karyotiplendirme mikroskopa bağlanan bir bilgisayar ve görüntüyü aktaran kamera yardımı ile yapılmaktadır. Bu ölçümler ile sentromer belirlenmesi, kromozom kollarının boyunun hesabı, bu kol boylarından yararlanarak kromozom kollarının oranı ve toplam kromozom boylarının hesabına ulaşılabilmektedir (Altınordu ve ark., 2016; Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Karyotiplendirme yaparken esas alınan sentromerin pozisyonudur. Sentromer pozisyonuna göre kromozomlar dizilir. İkinci dikkat edilen nokta ise kromozom boyutlarıdır. Karyotiplendirmede sentromer pozisyonu belirlendikten sonra kendi içlerinde boyutları büyükten küçüğe doğru sıralama yapılmaktadır. Eşey kromozomları ayırt edilebiliyorsa sentromer ve boyut dikkate alınmadan karyotip analizinin sonuna dizilmektedir. Karyotip sunumu yapılırken farklı görselleştirmeler kullanılabilir, bunlar için iki sitogenetik terim açıklanabilir;

İdiogram; kromozomların belirli bir ölçüde şematize edilerek sunulmasıdır.

Karyogram; metafaz plaklarından fotoğrafı kromozomların belirli bir düzende gruplandırılarak sunulmasıdır (Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Kromozom asimetrisinde sentromerin pozisyonu önemlidir. Sentromer kromozomun ortasında ise kollar birbirine eşittir ve kromozom simetriktir. Sentromer konumu kromozom ucuna doğru kaydıka asimetri artış gösterir. Tek bir karyotip

analizindeki kromozomların asimetrisi intrakromozomal asimetri olarak isimlendirilir. Karyotip asimetrisinin konusu daha geniş olarak metasentrik ve submetasentrik kromozomların boylarının yakın olduğu karyotipler için simetriktir. Karyotipteki kromozomların birbirlerine göre boyları arttıkça ya da sentromer konumu kromozom ucuna kaydıkça karyotip asimetrikleşir (Emiroğlu ve Bürün, 2020)

Temel kromozom kol sayısı da karyotiplerde hesaplanabilir. Telosentrik ve akrosentrik kromozomlar uygulamada tek kolludur, diğer metasentrik submetasentrik ve subtelosentrik kromozomlar iki kolludur. Genelde karyotip analizlerinde fundamental kol sayısı (NF) hesaplanır, NF bir karyotipteki tüm kromozomların kol sayısını belirtir (Emiroğlu ve Bürün, 2020).

2.4. Kromozom Bantlama Teknikleri

Kromozomlar bazı spesifik boyalar ile boyandıklarında kromatin yapılarından ötürü kendilerine has bir bantlı görüntü oluştururlar. Bu teknik sayesinde sayısal farklılıkların yanında yapısal özellikleri de incelenerek homolog kromozom çiftlerini bulmak da kolaylaşır. Karyotiplendirmeden farklı olarak bantlama için mitozun erken metafazı veya profaz safhasındaki hücrelerin kromozomları daha elverişlidir. Metafaz aşamasındaki kromozomlar bazen çok yoğunlaşıp kısaldığı için bantlar net bir biçimde gözlemlenemeyebilir. Bu şekilde yapılan bantlama tekniğine profaz bantlaması denilmekte ve tıbbi genetikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazen ön işlemler kullanılarak kromozom boylarının kısalması engellenebilmekte ve daha fazla sayıda bant elde etmek mümkün olabilmektedir. Bazı kromozom bantlama teknikleri şu şekilde ifade edilebilir;

Q Bantlama; floresan bir boya kullanarak kromozomlar üzerinde parlak ve mat bantlar elde edilir, mat gözüken bölgeler Q bant olarak tanımlanır ve floresan bir mikroskopta bu bantlar görüntülenebilir. Daha çok insan eşey kromozomu Y için spesifiktir ve polimorfik bölgelerin tespitinde kullanılabilir (Nussbaum ve ark., 2005).

G Bantlama; kromozomlar üzerinde bulunan proteinlerin tripsin enzimi ile denatüre edilerek denatürasyona uğrayan kromozomlar Giemsa ile boyanarak açık ve koyu bantlar oluşturur. Q bantlardaki parlak bölgeler G bantlardaki koyu bölgelere denk gelmektedir. Çok sık kullanılan bir bantlama tekniğidir (Nussbaum ve ark., 2005).

R Bantlama; G bantlamanın tersi olarak koyu bölgeler açık, açık bölgeler ise koyu boyanır. Floresan özellikte bir boya kullanılır, daha sonra sıcaklık ile diğer boyalar uygulanır. Açık renk boyalar R bantlardır ve G-C zengin bölgeyi ifade eder (Moore ve Best, 2001).

T Bantlama; kromozomlarda telomerleri belirtmek için telomer bölgesinin boyanmasıdır (Dutrillaux, 1973; Emiroğlu ve Bürün, 2020).

Yukarıdaki boyamalar dışında sitogenetik alanında yaygın olarak Giemsa boyama, AgNOR boyama ve C- bantlama sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar dışında floresan boyaların kullanıldığı CMA₃-DAPI boyama da klasik sitogenetiğin alanıdır. Moleküler sitogenetik çalışmalarda floresan probler kullanılarak in situ hibridizasyon yöntemlerinden yararlanılarak evrimsel süreçte marker olarak belirlenen 18S-5S rDNA bölgeleri, U1-U2 bölgeleri ve telomerik probler ile telomer bölgelerindeki polimorfizimlerde FISH (Floresan *in situ* Hibridizasyon) teknikleri ile ortaya konulabilmektedir. Bir diğer in situ hibridizasyon yöntemi olan CGH (Karşılaştırmalı Genomik *in situ* Hibridizasyon) ile de sex kromozomlarındaki varyasyonlar ve türler arasındaki genomik farklılaşma ortaya konulabilmektedir (Sember ve ark., 2018a; Sember ve ark., 2020a; Sember ve ark., 2020b; Sember ve ark., 2021; Štundlová ve ark., 2022)

2.4.1. Giemsa boyama

Giemsa boyasını ilk defa Alman bakteriyolog ve kimyager bilim insanı Gustov Giemsa, sıtma parazitiinin histopatolojik olarak ayırt edilmesi için uyarlayarak kullanmıştır (Giemsa, 1907). Fakat kromatinlerin ve nükleer zarın Giemsa ile çok iyi boyanmasıyla histolojide ve sitogenetikte kullanımı yaygınlaşmıştır (Barcia, 2007). Giemsa boyama çok temel bir yöntemdir, sitogenetikte bilimin ilerlemesi ile çok yeni ve güçlü bantlama yöntemleri (in situ hibridizasyon yöntemlerinden olan FISH ve CGH gibi) ile çeşitli ve ayrıntılı analizler yapılmasına olanak sağlanmasına rağmen Giemsa kromozomal çalışma alanındaki önemini korumaktadır (Dolan, 2011).

Sitogenetik çalışma alanında Giemsa boyama çok yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Giemsa histolojide ve parazitoloji alanında da yaygın bir kullanıma sahiptir (Disbrey ve Rack, 1970).

2.4.2. Ag-NOR boyama

Nükleolus yani çekirdekçik, çekirdeğin içinde yer alan dinamik bir bölümdür. Şekli ve büyüklüğü hücre bölünmesinin hızıyla ilişkilidir. Kromozom üzerinde bu bölge sentromerden ayrı olarak sekonder boğum olarak karşımıza çıkmaktadır. Nükleolus'un görevi ribozomal alt birimlerin oluşturulması ve yerleşimidir. Nükleoller ve kromozom arasındaki ilişki ilk defa Heitz tarafından ortaya konmuştur. Bu bölge daha sonra "nükleolus organizing region" NOR (çekirdekçik düzenleyici bölge) olarak belirlenmiştir (Heitz, 1931; McClintock, 1934; Disbrey ve Rack, 1970; Arsham ve ark., 2017).

Bir nükleolus düzenleme bölgesi, kromozomun interfazda nükleolus oluşturan özel bir bölgesidir. Başka bir deyişle NOR, bir kromozoma ait ana r-RNA genlerini (18S ve 28S rDNA) bulunduran bölgesidir. NOR'da bulunan genlerle ortaya çıkan, interfaz evresinde görülebilen bir yapıdır. Dolayısıyla NOR, tanım gereği bir kromozomun parçasıdır. NOR, kromozomda rRNA'ları, bunların öncüllerini ve spesifik ribozomal proteinleri içeren bir kromozom bölgesidir (Warner, 1979).

Kromozom üzerindeki NOR'lar heterokromatin bölgelerdir. AgNOR boyama ile bu bölgeler kromozom preparatlarında gözlemlenebilmektedir. NOR üzerindeki histon olmayan proteinler gümüşe yüksek afinite vererek gümüş iyonlarını indirger ve preparatlar üzerinde siyah lekeler olarak gözlemlenirler. NOR kromozomda çoğunlukla kısa kollarda gözlemlenirken bazen uzun kollarda da NOR gözlemlemek mümkündür. Bunlar sentromere yakın veya sentromer üzerinde bulunabilmektedir (Gold ve Zoch, 1990; Derenzini ve ark., 1998; Pekol, 1999; Gaffaroğlu, 2003; Gaffaroglu ve Yuksel, 2005).

AgNOR boyama yöntemiyle türler arası akrabalık ilişkileri ve tür içindeki kromozomal varyasyonların tespiti yapılabilmektedir (Gold ve Zoch, 1990). Türler arasındaki heteromorfluk değerlendirilirken toplam (aktif-pasif) NOR sayısı ve kromozom üzerinde NOR'un konumu dikkate alınırken; tür içi heteromorfluğun değerlendirilmesinde sadece aktif NOR sayısı ve NOR'un boyutu dikkate alınır (Pekol, 1999). NOR sayısı balık sitotaksonomisinde yaygın olarak kullanılan bir sitotaksonomik karakterdir. AgNOR boyama sadece transkripsiyonel olarak aktif rDNA genlerini yani aktif NOR'ları gösteren bir yöntemdir (Rábová ve ark., 2015).

2.4.3. C-bantlama

C bantlama veya konstitüf heterokromatin, 1928 yılında Heitz tarafından bulunmuştur. Heitz C bantları interfaz aşamasındaki hücre çekirdeğinde görülen koyu yerler olarak belirtmiştir. C bantta koyu gözüken yerler heterokromatin bölgeleridir ve DNA'nın sıkı bir biçimde sarılıp paketlenildiği yerlerdir, ökromatin ise tersi olarak daha açık renkte gözüktür ve DNA'nın daha gevşek bir biçimde sarıldığı yerlerdir (Huisinga ve ark., 2006). Ökaryot canlılarda heterokromatini göstermek amacıyla en çok tercih edilen yöntemlerdendir (Sumner, 1972). Heterokromatin bölge gen ekspresyonu yönünden pasiftir ve tekrar bölgeleri içermektedir. Heterokromatin bölge türe spesifiktir ve yüksek korunmuş dizileri içerir. Heterokromatin bölge kromozomda farklı yerlerde bulunabilmektedir ama çoğunlukla sentromer bölgesinde yer alır (Balıček ve ark., 1977; Varley ve ark., 1980; Sperling ve ark., 1987; Arslan ve Arslan, 2007).

Heterokromatin bölgeler mitozun S fazında diğer bölgelerden daha sonra eşlenmektedirler. Heterokromatin bölgeler Adenin-Timin (A-T) bazlarını daha çok içermektedirler. Heterokromatin bölge yüksek derecede korunmuş olduğu için aynı türün kromozomları üzerinde aynı lokalizasyonda gözlemlenmesi beklenir. Kromozomal çalışmalarda C bantlama tekniği ile kromozal varyasyonlar (duplikasyon, delesyon, inversiyon, translokasyon) tespit edilebilmektedir (Varley ve ark., 1980; Sperling ve ark., 1987).

2.4.4. CMA₃-DAPI boyama

DAPI (4'6 diamidino-2-fenilindol) ilk defa Otto Dann'ın laboratuvarında trypanosoma için sentezlenen çoğu diamidin bileşiğinden birisidir (Dann ve ark., 1971). DAPI hiçbir zaman klinikte tedavi maksadıyla kullanılmadı, ancak 1975 yılında Williamso ve Fenneu DAPI'yi mitekondrial DNA izolasyonu için kullandı (Williamson ve Fennell, 1975). Sonuçta AT yönünden zengin olan mitekondrial DNA'ya iyi bağlanan DAPI'nin bağlanmadan sonra floresan özelliğinin arttığını gözlemlediler. Yapılan deneylerde DAPI'nin DNaz'a duyarlı olduğunu ancak RNaz için duyarsız olduğunu keşfetmişlerdir. Bir çalışmada mikoplazma kontaminasyonunu göstermek için DAPI ile muamele edilen insan HeLa hücrelerine DAPI uygulanmış ve yayınlanan hücre fotoğrafları büyük ilgi uyandırdı. Bu çalışmanın sonuçları nedeniyle DAPI'nin DNA boyası olarak kullanılabilirliği birçok bilim insanı tarafından araştırılmıştır ve bu çalışmalar ile DAPI'nin DNA için bir florokrom olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

(Russell ve ark., 1975; Grossgebauer ve ark., 1976; Hajduk, 1976; Jagielski ve ark., 1976; Schweizer, 1976a; Schweizer ve Nagl, 1976).

Tek başına DAPI ile boyama yapıldığında kesin olarak boyandığı gözlemlenmiştir. Kromomisin, mitramisin veya distamisin ile kombine boyamalar yapıldığında DAPI'nin AT açısından zengin DNA dizilerine daha yüksek afinite verdiği gözlemlenmiştir (Lin ve Alfi, 1976; Schweizer, 1976a; Schweizer, 1976b; Schweizer ve Nagl, 1976; Schweizer ve ark., 1978; Schweizer ve ark., 1979).

Yapılan deneylerde GC (guanin-sitozin) yönünden zengin dizilere daha çok afinite veren kromomisin A3 tercih edilebilmektedir (Van Dilla ve ark., 1983). CMA₃-DAPI boyama AgNOR boyamanın floresan boya ile bir kontrolüdür. CMA₃ pozitif bölgeler NOR'u göstermektedir (Collares-Pereira ve Ráb, 1999). AgNOR boyamada sadece aktif NOR bölgeleri gözlenirken CMA₃-DAPI boyama ile aktif-pasif tüm NOR bölgeleri gözlemlenebilmektedir (Gornung, 2013). Birçok balık araştırmacısı balıklar üzerine hem AgNOR boyama hemde CMA₃-DAPI boyama yapmıştır (Arai, 2011; Gornung, 2013).

2.5. FISH (Floresan *in situ* Hibridizasyon) Yöntemi

İn situ hibridizasyon yöntemlerinden olan Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) 1982'de bilim insanları tarafından geliştirilmiştir (Langer-Safer ve ark., 1982). İn situ hibridizasyon yöntemlerinde radyo işaretli DNA veya RNA problemleri kullanılmaktaydı ancak bu radyo etiketli problemlerin dezavantajlı sayılacak bazı özellikleri vardı (radyolitik bozunma ile beraber kimyasal kararsızlık, personel güvenliği endişesi ve imha problemleri) buna istinadan floresan etiketli problemlerin üretilmesi fikri ortaya çıkmıştır. Birkaç araştırmacı grubu bu prosedürleri geliştirmeyi denemiştir (Cheung ve ark., 1977; Rudkin ve Stollar, 1977; Broker ve ark., 1978; Sodja ve Davidson, 1978; Bauman ve ark., 1980; Bauman ve ark., 1981). FISH yöntemi bir genetik analiz çeşididir ve kromozom haritalandırılmalarında kullanılmaktadır. Moleküler sitogenetikte karşımıza çıkan bu yöntem tek bir slayt üzerinde birden fazla kromozom bölgesinin incelenmesine olanak sağlayarak klasik sitogenetik yöntemlerden avantajlı sayılabilmektedir. FISH yönteminde etiketli DNA dizisi (prob) ve örnek arasında bir hibritleşme gerçekleşmektedir, bu şekilde kromozom haritaları oluşturulmakta ve incelemeler yapılabilmektedir. FISH yöntemi ile aktif olarak hali hazırda bölünmeyen hücrelerde de gerçekleştirilebilmektedir. Klasik sitogenetik yöntemlerde hücre bölünmesi devam eden metafaz hücrelerine ihtiyaç

duyulmaktadır. FISH yöntemi sitogenetik açıdan değerli sonuçlar verse de problemler doğru etiketlenmeli ve uygun filtrelerde sonuçlar analiz edilmelidir. Yanlış etiketli problemler yanlış sonuçlar verebileceği gibi zaman ve emek kaybına neden olabilmektedir (Höltke ve Kessler, 1990; Özdemir ve ark., 2015). 18S rDNA - 5S rDNA gen bölgeleri sıklıkla sitotaksonomide kullanılan FISH temelli taksonomik karakterlerdir (Sember ve ark., 2015; de Oliveira ve ark., 2019; Sember ve ark., 2020a; Sember ve ark., 2020b).

rRNA'ları kodlayan rDNA genleri ökaryot canlılarda majör ve minör olmak üzere iki farklı gen ailesi tarafından düzenlenir. Her iki grup da tandem diziler içeren tek bir transkripsiyon bölümünün farklı kopyalarından oluşmaktadır. Majör ailenin transkripsiyon bölümü ana rRNA genleri olan ve NOR üzerinde lokalizasyon gösteren ve santrifüjdeki çökelme hızlarına göre isimlendirilen 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerini içermektedir. Minör ailenin genleri ise genelde transkripsiyonel olarak aktif olmayan 5S rRNA genlerini içermektedir ve farklı homolog kromozomlar üzerinde bulunmaktadır (Drouin ve De Sa, 1995). Türden türe farklılık gösteren rDNA dizileri, kromozomal açıdan önemli yerlerdir ve kromozom düzeyinde ve moleküler anlamda genom evrimi için kıymetli bilgiler verir (Fontana ve ark., 2003).

Ökaryotlarda üç farklı tip polimeraz bulunur. RNA polimeraz I, üç büyük rRNA olan 18S, 5.8S ve 28S'in sentezlenmesinden sorumludur. Proteine dönüşen genler olan mRNA RNA Polimeraz II tarafından sentezlenir ve aynı zamanda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde iş gören mikroRNA'ların (miRNA) ve "kodlamayan uzun RNA" (lncRNA)'ların transkripsiyonundan sorumludur. RNA polimeraz III, taşıyıcı ve küçük ribozomal RNA (5S rRNA)'yı transkribe etmektedir. Küçük nükleer RNA'lar ve sitoplazmik küçük RNA'lar RNA Polimeraz III tarafından transkribe edilmektedir (Cooper ve ark., 2006). Ayrıca kendisine ait DNA'sı bulunan mitokondri ve kloroplast gibi organellerde bulunan RNA polimeraz bulunduğu organelle ait DNA'nın transkripsiyonundan sorumludur (Cooper ve ark., 2006)

Üç polimeraz türü de 12-17 arasında değişen birbirinden farklı alt ünitelerden meydana gelen enzim kompleksleridir. Farklı promotörler ile çalışmalarına ve farklı genlerin sentezinden sorumlu olmalarına rağmen birbirleriyle ve bakteri RNA polimerazları ile benzeyen yönleri bulunmaktadır. Bilhassa her ökaryotik RNA polimerazda da 9 adet korunmuş alt ünite bulunur ve bu alt ünitelerin bir kısmı bakteri RNA polimerazındaki alt üniteler ile benzerlik göstermektedir. Maya hücrelerindeki RNA polimeraz II, bakteriyel RNA polimeraz ile dikkat çekici bir şekilde benzerdir. Bu benzerliklerden yola çıkarak; bütün RNA polimerazlar özünde korunmuş düzeneği

kullanarak DNA'yı transkribe etmektedir diyebiliriz (Cooper ve ark., 2006).

U1-U2 gen bölgeleri balık karyosistematğinde kullanılan taksonomik bir karakterdir ve FISH yöntemiyle U1-U2 problr kullanılmaktadır (Cabral-de-Mello ve ark., 2012; Sember ve ark., 2018b). Ökaryotik canlılarda proteine dönüşen mRNA'ların intron bölgeleri kesilip çıkarılır ve ekzonlar birbirlerine birleştirilir. Bu kesilip-çıkarma işlemi protein ve RNA'dan oluşan bir kompleks olan splisizom mekanizması tarafından gerçekleştirilir. Splisizom'un RNA kısmını oluşturan küçük nükleer RNA (snRNA) olarak isimlendirilen kısım 5 tip snRNA'dan oluşmaktadır. Bunlar kodlanmayan, metabolik olarak stabil 5 tip U1, U2, U4, U5 ve U6 snRNA'lardır. Genelde 50-200 baz çiftinden oluşan snRNA'lar 6-10 adet protein ile birleşerek splisizom RNA protein kompleksi olan küçük nükleer ribonükleoprotein partikülü (snRNP)'nü meydana getirirler ve bu kompleks mRNA işlenmesinde kesip-ekleme yaparak iş görür. U4 ve U6 snRNA'lar bir tek snRNP molekülü içinde birleşerek bütün halde iş yaparken U1, U2 ve U5 bir molekül snRNP olarak iş yaparlar (Cooper ve ark., 2006).

Splisizom kompleksi oluşurken ilk önce pre-mRNA'nın 5' kesip-ekleme bölgesine U1 bağlanır. Bu eşleşme U1 snRNA dizisi ve 5' kesip ekleme dizisinin tamamlayıcısıdır ve bu şekilde baz eşleşmesiyle bağlanma gerçekleşmiş olur. Daha sonra "branch point" olarak bilinen Türkçe'ye "dallanma noktası" şeklinde çevirebileceğimiz bölgeye komplementer olan U2 bağlanır. U4-U6 bir molekül şeklinde ve U5'e daha önceden birleşmiş vaziyette 2 molekül şeklinde bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin de bağlanmasıyla intron bölgesi kıvrılır, eksonlar birbirine yaklaşır. U1 ve U4 snRNA'lar splisizom kompleksinden ayrılır ve U6 tarafından kesilip ekleme reaksiyonu enzimatik olarak gerçekleştirilir. Çıkarılan intron degrade olur, snRNA'lar tekrar kullanılır (Cooper ve ark., 2006; Cabral-de-Mello ve ark., 2012).

Telomer bölgeleri için tasarlanan telomerik problarda FISH yöntemi ile evrimsel sürecin analizinde kullanılabilmektedir (Sember ve ark., 2020b). Kromozomal yeniden düzenlemelerin analizi için telomerik problr tercih edilmektedir.

2.6. Türkiye'de ve Dünya'da Dağılışı Gösteren Karyolojisi Çalışılmış Bazı Leuciscidae Türleri

Leuciscidae familyasına ait türlerin $2n=50$ diploid kromozom sayısına sahip olmaları, karyotip analizlerinde gözlemlenen iki kollu kromozom sayılarının fazla oluşu, AgNOR boyamada bir çift NOR gözlemlenmesi bu türler için karakteristik birer özelliktir

(Ráb, 1995; Ráb ve ark., 2008; Pereira ve ark., 2009). *Pseudophoxinus alii* ve *Pseudophoxinus elizavetae* Anadolu için endemik balık türleridir. Yapılan sitogenetik analizlerinde $2n=50$ kromozom sayısı tespit edilmiştir. Karyotip analizlerinde *P. alii* için kromozom morfolojisi, 18 adet metasentrik kromozom, 24 adet submetasentrik kromozom ve 8 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom sınıflandırılırken *P. elizavetae* için kromozom morfolojisi, 8 adet metasentrik kromozom, 34 adet submetasentrik kromozom ve 8 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom sınıflandırılmıştır. Her iki tür içinde en büyük homolog kromozom subtelosentrik-akrosentrik sınıftandır. *P. alii* için C-bantlar çoğunda perisentrik bölgede lokalizeyken *P. elizavetae*'de bazı kromozomlarda perisentrik bölgede C-bantların pozitif olduğu saptanmıştır. Her iki türde de çoklu NOR'lar tespit edilmiştir (Gaffaroğlu ve ark., 2022). Bir başka çalışmada CMA₃-DAPI boyama yapılarak *P. elizavetae* için 4 adet CMA₃ pozitif sinyal gözlemlenmiştir (Ayata, 2020). *Pseudophoxinus anatolicus* türü için yapılan karyolojik çalışmada kromozom seti $2n=50$ olarak tespit edilmiştir. Kromozom morfolojisi 24 adet metasentrik, 16 adet submetasentrik, 4 adet subtelosentrik ve 6 adet akrosentrik olarak sınıflandırılmıştır. Karyotipte C- bantlar bazı kromozomların sentromer bölgesinde gözlemlenmiştir. 4 adet kromozomun kısa kolunda NOR'lar tespit edilmiştir ve sonuçların diğer *Pseudophoxinus* türleri ile benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (Doori ve Arslan, 2024).

Pseudophoxinus antalyae için yapılan karyolojik çalışmada kromozom seti $2n=50$ olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmaya göre kromozom morfolojisinin, 16 adet metasentrik kromozom, 14 adet submetasentrik kromozom, 12 adet subtelosentrik kromozom ve 8 adet akrosentrik kromozomdan oluştuğu ve büyük kromozom çiftinin ise submetasentrik olduğu rapor edilmiştir. Bir çift NOR subtelosentrik kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu gözlemlenmiştir (Ergene ve ark., 2010)

Pseudophoxinus battalgilae için yapılan sitogenetik çalışmaya göre kromozom seti $2n=50$ olarak tespit edilmiştir. Kromozom morfolojisi 16 adet metasentrik kromozom, 28 adet submetasentrik kromozom ve 6 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom olarak sınıflandırılmıştır. Birkaç kromozom için sentromer bölgelerinde C-bantlar gözlemlenmiştir. 4 adet submetasentrik kromozomun kısa kolları üzerinde NOR bölgeleri tespit edildiği bildirilmiştir (Ayata ve ark., 2016).

Pseudophoxinus burduricus için kromozom seti $2n=50$ olarak bildirilmiştir. Kromozom morfolojisinin 18 adet metasentrik kromozom, 26 adet submetasentrik kromozom ve 6 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozomdan oluştuğu rapor edilmiştir. Kromozom bantlama tekniklerinde C-bantlar birkaç kromozomun sentromer bölgesinde

pozitif olarak değerlendirilmiş ve AgNOR boyamada 2 adet kromozom üzerinde NOR bulunduğu bildirilmiştir (Ayata ve ark., 2016).

Pseudophoxinus crassus için yapılan sitogenetik bir çalışmada kromozom seti $2n=50$ olarak tanımlanmıştır. Yapılan karyotip analizinde kromozom morfolojisi 12 adet metasentrik kromozom, 30 adet submetasentrik kromozom ve 8 adet submetasentrik-akrosentrik olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmayla kromozom bantlamaları yapılmış ve C-bantlar için birçok kromozomun perisentrik bölgesinde heterokromatin C bantlar gözlemlenmiştir. AgNOR bantlamasında 1 çift submetasentrik kromozomda NOR keşfedilmiştir (Unal ve ark., 2014).

Pseudophoxinus hittitorum'un yapılan karyolojik çalışmasında kromozom seti $2n=50$ olarak belirtilmiştir. Kromozom morfolojisi yapılan karyotip analizinde 14 adet metasentrik kromozom, 26 adet submetasentrik kromozom ve 10 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom olarak belirlenmiştir. Klasik sitogenetik tekniklerden C-Bantlama ve AgNOR bantlama yapılmış ve birçok kromozomun perisentrik bölgesinde C pozitif bantlar tanımlanmıştır. 1 çift submetasentrik kromozom üzerinde sekonder boğuma yakın kısa kol üzerinde NOR bölgesi gözlemlenmiştir (Unal ve ark., 2014). Yapılan bir diğer çalışmada CMA₃-DAPI boyama da 4 adet CMA₃ pozitif sinyal yakalanmıştır (Ayata, 2020).

Pseudophoxinus evliyae kromozom seti diğer *Pseudophoxinus* türlerine benzer olarak $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Karyotip analizinde kromozom morfolojisi 14 adet metasentrik kromozom, 30 adet submetasentrik kromozom ve 6 adet submetasentrik-akrosentrik kromozom olarak belirlenmiştir. Yapılan klasik sitogenetik tekniklerde C-bantlar bazı kromozomların sentromer bölgesinde pozitif olarak değerlendirilmiştir. NOR bölgeleri 2 çift submetasentrik kromozom üzerinde ve telomerde lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada sayı lokalizasyon ve boyut açısından NOR polimorfizmi olduğu belirtilmiştir (Ayata ve ark., 2016). Aynı çalışmada *Pseudophoxinus fahrettini* ve *Pseudophoxinus meandri* türleri için de sitogenetik analizler yapılmıştır. Kromozom seti *P. fahrettini* ve *P. meandri* için $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Karyotip analizlerinde *P. fahrettini* için kromozom morfolojisi 16 adet metasentrik kromozom, 26 adet submetasentrik kromozom ve 8 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom olarak açıklanmıştır. *P. meandri* kromozom morfolojisi 10 adet metasentrik kromozom, 32 adet submetasentrik kromozom ve 8 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom olarak rapor edilmiştir. Yapılan kromozom bantlamalarında her iki tür için de bazı kromozomların sentromer bölgesinde C bantlar gözlemlenmiştir. *P. fahrettini* için yapılan AgNOR

boyamada 1 çift kromozomda NOR tespit edilirken *P. meandri* için yapılan AgNOR boyamada 2 çift kromozomda NOR tespit edilmiştir (Ayata ve ark., 2016).

Pseudophoxinus firati için yapılan karyolojik çalışmada kromozom seti $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Kromozom morfolojisi 38 adet metasentrik-submetasentrik kromozom ve 12 adet subtelosentrik, kromozom olarak açıklanmıştır. Yapılan C bantlama çalışmasında 6 adet kromozom üzerinde C pozitif heterokromatin tespit edilmiştir. AgNOR boyamasında 4 adet kromozom üzerinde NOR gözlemlenmiştir (Karasu, 2009). CMA₃-DAPI boyamada 2 adet submetasentrik kromozomun kısa kollarının tamamında CMA₃ pozitif sinyal gözlemlendiği açıklanmıştır (Ayata, 2020).

Pseudophoxinus zekayi'nin yapılan karyolojik çalışmasında kromozom seti $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Karyotip analizinde kromozom morfolojisinin 16 adet metasentrik kromozom, 26 adet submetasentrik kromozom ve 8 adet subtelosentrik kromozomdan oluştuğu açıklanmıştır. Kromozom bantlama yöntemlerinden AgNOR boyama yapılan örneklerde NOR'un sayısal polimorfizminin gözlemlendiği ifade edilmiştir ve NOR sayısı 1 çift kromozom ile 2 çift kromozom arasında değişkenlik göstermiştir. Analiz edilen metafaz plaklarından en sık gözlemlenen NOR sayısı 1 çift olarak belirtilmiştir. C bantların bazı kromozomlarda uzun kollarında tespit edildiği ve sentromer bölgesindeki C bantların perisentrik ve parasentrik lokalizasyonda olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 2.3) (Unal ve Gaffaroğlu, 2016).

Çizelge 2.3. Karyolojisi çalışılmış *Pseudophoxinus* türleri

TÜR İSMİ	DİPLOİD KROMOZOM SAYISI	KARYOTİP FORMÜLÜ	NF DEĞERİ	KAYNAK
<i>P. firati</i>	$2n=50$	38M, 12St	88	(Karasu, 2009)
<i>P. antalyae</i>	$2n=50$	16M, 14Sm, 12St, 8A	92	(Ergene ve ark., 2010)
<i>P. crassus</i>	$2n=50$	12M, 30Sm, 8St-A	92	(Unal ve ark., 2014)
<i>P. hittitorum</i>	$2n=50$	14M, 26Sm, 10St-A	90	(Unal ve ark., 2014)
<i>P. battalgilae</i>	$2n=50$	16M, 28Sm, 6St-A	94	(Ayata ve ark., 2016)
<i>P. burduricus</i>	$2n=50$	16M, 28Sm, 6St-A	94	
<i>P. evliyae</i>	$2n=50$	14M, 30Sm, 6St-A	94	
<i>P. fahrettini</i>	$2n=50$	16M, 26Sm, 8St-A	92	
<i>P. meandri</i>	$2n=50$	10M, 32Sm, 8St-A	92	
<i>P. zekayi</i>	$2n=50$	16M, 26Sm, 8St	92	(Unal ve Gaffaroğlu, 2016)
<i>P. alii</i>	$2n=50$	18M, 24Sm, 8St-A	92	(Gaffaroğlu ve ark., 2022)
<i>P. elizavetae</i>	$2n=50$	8M, 34Sm, 8St-A	92	
<i>P. anatolicus</i>	$2n=50$	24M, 16Sm, 4St, 6A	94	(Doori ve Arslan, 2024)

Parachondrostoma arrigonis'in yapılan karyolojik çalışmasında diploid kromozom sayısı $2n=50$ olup karyotip analizinde kromozom morfolojisi 16 adet

metasentrik kromozom, 28 adet submetasentrik-subtelosentrik kromozom ve 6 adet subtelosentrik-akrosentrik olarak açıklanmıştır. Kromozom setinin en büyük kromozom çifti karakteristik olarak subtelosentrik-akrosentrik olarak bildirilmiştir. Erkek bireye ait metafazlara uygulanan Ag-NOR boyama ve CMA₃-DAPI boyamada iki orta boy kromozomun kısa kolunun telomer bölgesinde NOR tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada CMA₃ pozitif sinyallerin AgNOR pozitif bölgeye karşılık geldiği gözlemlenmiştir. Dişi bireyde yapılan AgNOR boyamada 2 çifti homolog kromozom olmak üzere toplam 8 adet kromozomun kısa kollarının telomer bölgesinde NOR tespit edilmiştir. CMA₃-DAPI boyamada ise Ag-NOR boyamadaki NOR'lar üzerinde CMA₃ pozitif sinyal vermiş, ayrıca bir başka kromozom çiftinin sadece birinde uzun kolda CMA₃ pozitif sinyal gözlemlenmiştir (Kalous ve ark., 2008).

Avrupa'da 9 chondromisin türü için karşılaştırmalı sitogenetik bir çalışma yapılmıştır. *Achondrostoma arcasii* (Steindachner, 1866), *A. occidentale* (Robalo, Almada, Sousa-Santos, Moreira ve Doadrio, 2005), *A. oligolepis* (Robalo, Doadrio, Almada ve Kottelat, 2005), *Iberochondrostoma almaçai* (Coelho, Mesquita ve Collares-Pereira, 2005), *I. lemmingii* (Steindachner, 1866), *I. lusitanicum* (Collares-Pereira, 1980), *Pseudochondrostoma duriense* (Coelho, 1985), *P. polylepis* (Steindachner, 1864) ve *P. willkommii* (Steindachner, 1866) çalışmada yer alan balık türleridir. Tüm türler için diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Kromozom morfolojileri 12-14 adet metasentrik kromozom, 30-32 adet submetasentrik kromozom ve 6-8 adet subtelosentrik-akrosentrik kromozom olarak lösisin karyotip formülüyle uyum gösterdiği ifade edilmiştir. Kromozom setinin en büyük kromozomu lösisin ile uyumlu olarak subtelosentrik-akrosentrik olarak belirtilmiştir. FISH yöntemi ile özellikle *Achondrostoma* ve *Iberchondrostoma* cinslerinde 5S rDNA probunun subtelosentrik-akrosentrik kromozomların terminalinde 4 ile 8 arasında değişen sayıda sinyal verdiği tespit edilmiş ve çalışmada bildirilmiştir. 45S rDNA probu submetasentrik kromozomlarda 3 ile 6 sinyal tespit edildiği rapor edilmiştir (Pereira ve ark., 2012).

Chondrostoma nasus için yapılan sitogenetik bir çalışmada türün kromozom seti $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Kromozom morfolojileri 12 adet metasentrik kromozom, 32 adet submetasentrik kromozom ve 6 akrosentrik kromozom olarak ifade edilmiştir. Ayrıca toplamda 20 bireyden 14'ünde değişen boyutlarda submetasentrik olarak değerlendirilen B kromozomu varlığı rapor edilmiş, bu 14 birey içinde 7 tanesi 1 adet B kromozomu bulundurup kromozom seti $2n=51$ iken diğer 7 bireyde 2 adet B kromozomu varlığı tespit edilmiş olup kromozom seti $2n=52$ olarak açıklanmıştır. Kromozom

bantlama yöntemiyle elde edilen sonuçlarda AgNOR boyama 2 çift kromozom üzerinde NOR gözlemlenmiştir. CMA₃ pozitif alanlar NOR'lara karşılık geldiği ifade edilmiştir. FISH yöntemi ile elde edilen sonuçlarda, 28S rDNA problemleri 4 adet kromozomun kısa kolları üzerinde sinyal verirken, 5S rDNA problemleri 2 adet submetasentrik kromozomun kısa kolları üzerinde lokalize olduğu rapor edilmiştir (Boroń ve ark., 2020).

Chondrostoma beysehirense için yapılan karyolojik çalışmada diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Kromozom morfolojisi karyotiplemede 10 adet metasentrik kromozom, 32 adet submetasentrik-subtelosentrik kromozom ve 8 adet akrosentrik kromozom olarak analiz edilmiştir. Aynı çalışmada yapılan klasik sitogenetik yöntemler ile C bantlar bazı kromozomların sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde olduğu bildirilmiştir. AgNOR boyamada bir çift NOR submetasentrik kromozomun kısa kolunda gözlemlenmiştir. Submetasentrik bir kromozom çiftinde sekonder boğum gözlemlendiği rapor edilmiştir (Arslan ve Gündoğdu, 2016).

Chondrostoma regium için yapılan sitogenetik bir çalışmada *C.regium*'un diploid kromozom sayısı $2n=52$ olarak hesaplanmıştır. Karyotip analizinde kromozom morfolojisi 42 adet submetasentrik kromozom ve 10 adet subtelosentrik kromozom olarak rapor edilmiştir (Esmaili ve ark., 2010). Yapılan bir başka karyolojik çalışmada *C.regium* için diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Kromozom morfolojisi 18 adet metasentrik kromozom, 14 adet submetasentrik kromozom 2 adet subtelosentrik kromozom ve 16 adet telosentrik kromozom olarak bildirilmiştir (Yamaç ve Şişman, 2023). *C.regium* için kromozom bantlama teknikleri henüz literatürde yoktur.

Chondrostoma soetta için ayrıntılı bir sitogenetik analiz bulunmamakla beraber diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak bildirilmiştir (Çizelge 2.4) (Cataudella ve ark., 1977).

Çizelge 2.4. Karyolojisi çalışılmış *Chondrostoma*, *Achondrostoma*, *Iberchondrostoma*, *Pseudochondrostoma* ve *Parachondrostoma* türleri

TÜR İSMİ	2n	KARYOTİP FORMÜLÜ	NF	KAYNAK
<i>C. phoxinus</i>	2n=50	36M/SM+14ST/T	86	(Berberović ve ark., 1970)
<i>C. soetta</i>	2n=50	-	-	(Cataudella ve ark., 1977)
<i>C. regium</i>	2n=52	42Sm, 10St	94	(Esmaili ve ark., 2010)
<i>C. beysehirense</i>	2n=50	10M, 32Sm - St, 8A	92	(Arslan ve Gündoğdu, 2016)
<i>C. nasus</i>	2n=50	12M, 32Sm, 6 St -A	94	(Boroń ve ark., 2020)
<i>A. arcasii</i>	2n=50	16M, 30Sm, 2St -A	94	(Pereira ve ark., 2012)
<i>A. occidentale</i>	2n=50	12M, 32Sm, 6St -A	94	
<i>A. oligolepis</i>	2n=50	12M, 32Sm, 6St -A	94	
<i>I. almacai</i>	2n=50	14M, 30Sm, 6St -A	94	
<i>I. lemmingii</i>	2n=50	12M, 30Sm, 8St -A	92	
<i>I. lusitanicum</i>	2n=50	14M, 30Sm, 6St -A	94	
<i>Ps. duriense</i>	2n=50	14M, 30Sm, 6St -A	94	
<i>Ps. polylepis</i>	2n=50	14M, 30Sm, 6St -A	94	
<i>Ps. willkommii</i>	2n=50	14M, 30Sm, 6St -A	94	
<i>P. arrigonis</i>	2n=50	16M, 28Sm-St, 6St-A	-	(Kalous ve ark., 2008)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma ortamı ve örneklerin elde edilmesi

Balık örneklerinin elde edilmesi T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan alınan E-21264211-288.04-4787989 sayılı izin dahilinde belirtilen lokaliteden belirtilen tarihte (20.05.2022) yapılmıştır (Şekil 3.2). Balık örnekleme akarsuyun sığ olduğu yerlerden çevreye, ortamdaki diğer canlılara ve hedef balık türüne zarar verilmeden elektroşok (samus 2000) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen balık örnekleri su bidonlarında bir miktar suyla beraber pilli hava moturu kullanılarak ortamdaki çözünmüş oksijen desteklenerek çalışma ortamına getirilmiştir. Çalışma ortamına ulaşan balık örnekleri iyi havalandırılmış ve dinlendirilmiş cam akvaryum içine alınmış ve ortam şartlarına adapte olmaları için çalışma öncesi 2-3 gün dinlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Balık örneklerinin elektroşok ile yakalanması (A). Balık örneklerinin su bidonlarına alınması ve laboratuvar ortamına getirilmesi (B). Laboratuvar ortamına getirilen *T. fahirae* örnekleri (C). (orijinal)

Balık örnekleme Burdur ili Tefenni ilçesi sınırlarında yer alan Karamusa köyü Başpınar su gözünden yapılmıştır. *T. fahirae*'nin lokal endemik bir tür olması ve neslinin tehlike altında olması nedeniyle araştırma izninde de belirtildiği gibi 6 adet balık örneği alınmıştır. Kırkpınar (Başpınar) su gözü Değirmendere çayı ve Dalaman çayının kaynağını oluşturmaktadır. Dalaman çayı Güneybatı Anadolu'nun en uzun çayıdır ve yaklaşık 185 km uzunluğundadır. Çay; Burdur, Denizli ve Muğla il sınırlarında yer almaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Balık örneklerinden metafaz plaklarının elde edilmesi

Balıklar için mitotik kromozomların elde edilmesinde doğrudan preparat hazırlanmasından uzun vadeli hücre kültürü yöntemlerine kadar birçok metod geliştirilmiştir (Denton, 1973; Ojima, 1983; Alvarez ve ark., 1991). Geliştirilen bu sitogenetik metodlar arasında en kullanışlı olanı in vivo protokoller olmuştur (**Egozcue, 1971; Gold, 1974; Rivlin ve ark., 1985**). Kromozomlar balıklarda çeşitli dokulardan elde edilebilmektedir. Hücre kültürü yoluyla elde edilen çalışmalarda canlının öldürülmesine gerek kalmaz ancak hücre kültürü ve malzemeler sterilizasyon istediği için dezavantajlı sayılabilecek bir yöntem olarak kabul edilebilir. Böbrek, dalak ve karaciğer dokusundan elde edilecek kromozom preparatları için canlıya ön işlem olarak kolşisin enjeksiyonu gereklidir. Bu işlemden sonra canlı disekte edilir. Balıklarda homoeotik görevi üstlenen doku böbrektir, bu sebeple balık sitogenetik çalışmaları genelde böbrek dokusundan elde edilen kromozomlarla yapılmaktadır.

3.2.2. Karyolojik preparasyon

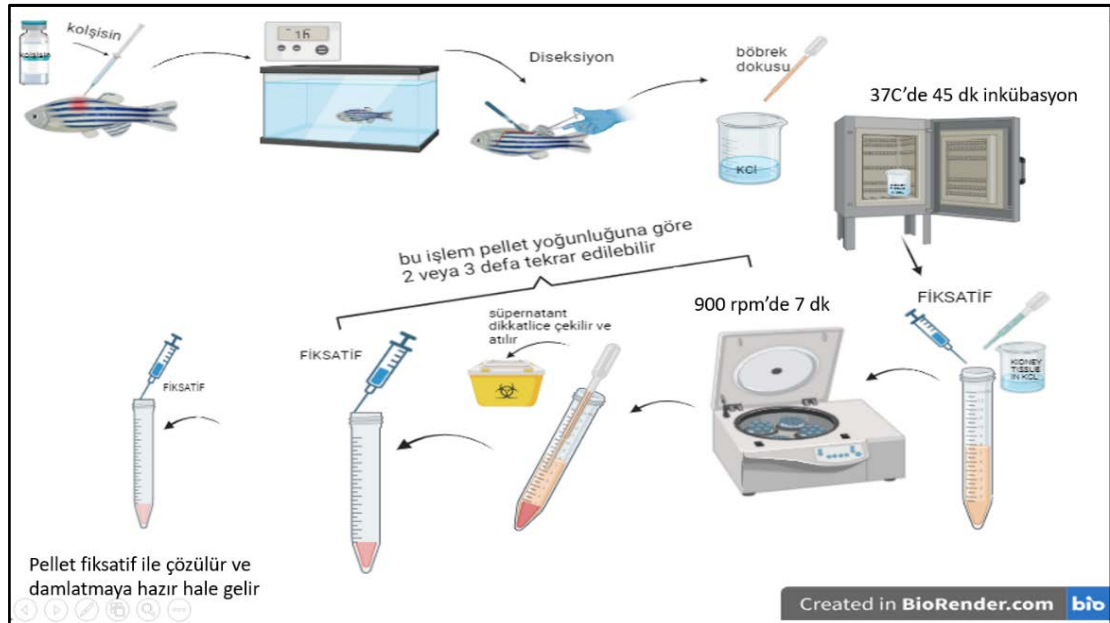
Arazi çalışması tamamlanan ve laboratuvar ortamına adapte edilen *T. fahirae* örnekleri için karyolojik preparasyon Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Omurgalı Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Karyolojik preparasyon Collares-Pereira'nın havada kurutma protokolüne göre yapılmıştır (Collares-Pereira, 1992). Balıklardan her biri tartılarak kolşisin miktarı hesaplanmıştır. Bireylerin vücut ağırlığının 1 gr'ı için 0.0006 gr kolşisin balık örneklerinin dorsalinden insülin enjektörü aracılığıyla enjekte edilmiştir. Kolşisinin etki etmesi için 1-1.5 saat balıklar akvaryuma alınarak canlı olarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda balık örnekleri disekte edilmiştir. Böbrek dokusu dikkatli bir şekilde bistürü ile disekte edilerek pastör pipeti yardımıyla içinde KCl (%0.5) bulunan behere aktarılmıştır ve 45 dk 37 °C'deki etüvde inkübe edilerek hücrelerin şişmesi sağlanmıştır. Süre sonunda şişen hücrelerin bulunduğu solüsyon falkon tüplere alınmıştır ve 900 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant pellete dokunulmadan dikkatli bir şekilde çekilerek atılmıştır. Soğuk metanol ve oda ısısındaki asetik asit ile sırasıyla 3:1 oranda fiksatif hazırlanmıştır ve pelletin üzerine 5 ml olacak şekilde eklenmiştir. Pellet pastör pipeti ile hava verilerek çözündürülmüş ve solüsyon homojen hale gelene kadar bu

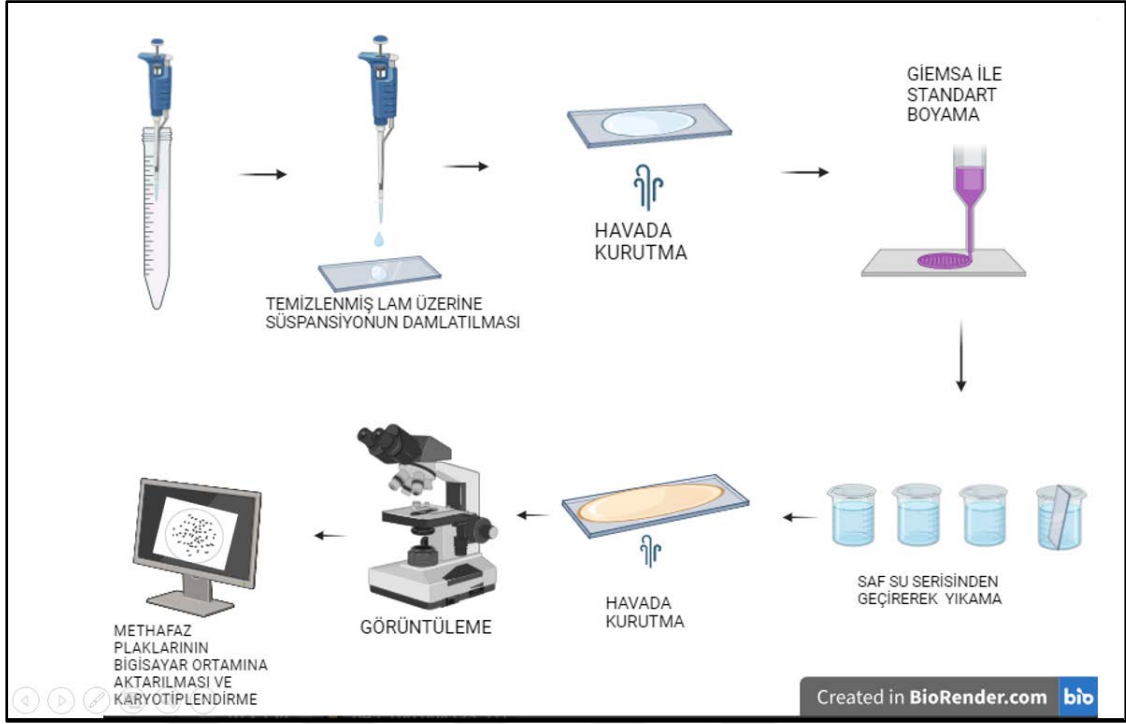
işleme devam edilmiştir. Homojen hale gelen solüsyon 900 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem pellet yoğunluğuna göre 2 veya 3 defa tekrar edilmiştir. Pellet yoğunluğu böbrek dokusunun miktarına bağlı değişkenlik gösterebilmektedir. Son santrifüj sonunda tüpün dip kısmında 2-3 ml bırakılarak süpernatant atılmıştır. Pellet pastör pipeti ile çözülmüştür ve hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Damlatma işlemi için lamalar temizlenmiş, fiksasyon için temizlenen lamalar 10-15 sn süreyle -20 °C'de bekletilmiştir. Pastör pipeti ile bir miktar yukarıdan hücre süspansiyonu slayt başına 2-3 damla olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Giemsa boyama

Hücre süspansiyonu damlatılan slaytlar tamamen kuruduktan sonra boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. %10 Giemsa ile boyama yapılmıştır. 10 ml Giemsa 90 ml sorenasan olarak boya hazırlanmıştır. Boya küvetinin üzerine alınan slaytlar pastör pipeti yardımıyla slayt üzerinde açık alan kalmayacak şekilde her slayt için yaklaşık 3 ml boya olacak şekilde 10 dk boyama yapılmıştır. Süre sonunda 6 adet saf su beherinden slaytlar geçirilerek yıkama yapılmış ve slaytlar oda ısısında kurumaya bırakılmıştır (Reddy ve ark., 1987).



Şekil 3.4. Karyolojik preparasyon (şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur)



Şekil 3.5. Hücre süspansiyonunun damlatılması ve giemsa boyama (şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur)

3.2.4. C-bantlama

Damlatma yapılan preparatlar damlatma gününden 7-10 gün sonra C bantlama yapılmıştır. C bantlama (Sumner, 1972)'a göre yapılmıştır. Slaytlar 1 saat oda ısısındaki 0.2N HCl içerisinde inkübe edilmiştir. Süre sonunda slaytlar 6 adet saf sudan geçirilip dik bir biçimde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan slaytlar 65 °C'ye ısıtılan %5'lik Ba(OH)₂ içerisine alınarak 15 dk 65 °C'deki etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda jar ters çevrilerek slaytların düşmesine izin verilmeden Ba(OH)₂ boşaltılmıştır. Daha sonra 3 adet saf su 1 adet 2XSSC+saf su, 2 adet 2XSSC içeren beherden slaytlar geçirilmiştir. Slaytlar daha önceden 65 °C'ye ısıtılan 2XSSC'ye alınıp 3 saat 65 °C'deki etüvde inkübe edilmiştir. Süre sonunda slaytlar 6 adet saf su serisinden geçirilmiştir. Daha sonra sırasıyla %70, %90'lık etanol serisinden geçirilen slaytlar %5 Giemsa ile 45 dk boyanmıştır (Sumner, 1972).

3.2.5. AgNOR boyama

AgNOR boyama işlemi damlatma gününden sonraki 15. günde yapılmıştır ve AgNOR boyama (Howell ve Black, 1980)'a göre gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce AgNO_3 (Gümüş Nitrat) gün ışığından etkilendiği için erlen alimünyum folya ile kaplanmış ve çalışma ortamı gün ışığından muhafaza edilmiştir. %50 AgNO_3 çözeltisi hazırlanmıştır (25 ml saf su için 12,5 gr AgNO_3 tartılıp çözülmüştür).

Bu çözelti 45 dk 57,5 °C'deki etüvde inkübe edilmiştir ve sonrasında bir beher üzerinde filtre kağıdı huni biçiminde katlanarak koyulmuştur ve %2'lik jelatin (25 ml saf su + 0.5gr jelatin+250 µl formik asit) bu filtre kağıdından beher içerisine süzümüştür.

Çözünmesi tamamlanan AgNO_3 çözeltisi filtre kağıdından geçirilerek bir behere süzülmüştür. Süzüntü üzerine %2'lik jelatin+formik asit içeren çözeltiden 12,5 ml eklenmiştir. Bu çözelti gün ışığından muhafaza edilerek coplin jara aktarılmıştır ve slaytlar coplin jara dikkatli bir biçimde yerleştirilmiştir. Coplin jar 65 °C'deki etüvde 25 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda preparatlar coplin jardan çıkarılarak 6 adet saf su serisinden geçirilerek yıkanmıştır. Slaytların arka tarafı bir peçete yardımıyla temizlenmiş ve slaytlar kurumaya bırakılmıştır (Howell ve Black, 1980).

3.2.6. CMA₃/DAPI Boyama

Kromomisin A3 (CMA₃) (Abcam) ve florokrom DAPI (Abcam) boyama (Mayr ve ark., 1985) ve (Sola ve ark., 1992) takip edilerek yapılmıştır. Gerekli solüsyonlar çalışma gününden bir gün önce hazırlanmıştır.

Mcllvain Buffer için:

A: 60,87 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 850 ml distile suda çözülmüştür.

B: 3,84 gr $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ tartılarak 200 ml distile suda çözülmüştür.

Mcllvain için 823,5 ml A solüsyonundan, 176,5 ml B solüsyonundan alınarak uygun bir şişede birleştirilmiştir.

C: 500 ml Mcllvain tamponuna 2,17 gr $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak C solüsyonu hazırlanmıştır.

D: 35 mg Metil Green tartılarak 100 ml Mcllvain içerisinde çözülmüştür.

CMA₃/DAPI boyama yapılacak preparatlar sırasıyla 2'şer dakika olacak şekilde %70-%80-%100 etanol serilerinden geçirilmiştir.

Etanol serisinden geçirilen preparatlar 37 °C'deki etüvde bir gece yaşlandırılmıştır.

C solüsyonu bir coplin jara aktarılmıştır ve yaşlandırılması tamamlanan preparatlar 10 dk bu solüsyonun içerisinde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda slaytlar hibridizasyon kutusuna alınarak üzerlerine 150 µl CMA₃ eklenerek lamel ile kapatılmıştır ve ışıktan korunarak 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda lameller uzaklaştırılarak preparatlar McIlvain içeren jara alınarak yıkama yapılmıştır.

Yıkaması tamamlanan preparatlar içerisinde D solüsyonu bulunan coplin jara alınarak oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda C solüsyonunda preparatlar için yıkama 2 defa yapılmıştır.

Yıkama sonrasında 1 ml McIlvain tamponu içerisinde 5 ul DAPI seyreltilerek preparatların üstü kapanacak şekilde muamele edilmiştir ve lamel ile preparat kapatılıp kenarları tırnak cilası ile sabitlenmiştir.

Preparatlar 20 dk -20 °C’de inkübe edildikten sonra mikroskopta uygun filtrelerde görüntüleme yapılmıştır.

3.2.7. FISH Problarının Tasarlanması ve FISH Kurulması

3.2.7.1. 5S rDNA bölgesi için problemlerin hazırlanması

Tez çalışması için kullanılan 5S rDNA, 18SrDNA, U1 ve U2 snDNA dizilerini içeren plazmitler Çek Bilimler Akademisi Balık Genetiği Laboratuvarı’ndan temin edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan primer dizileri (Sember ve ark., 2020b) ‘da yayımlanan diziler referans alınarak temin edilmiştir. 5S rDNA bölgesi için problemler PCR reaksiyonu ile etiketlenmiştir. 5S rDNA problemlerinin etiketlenmesi için kullanılan PCR reaksiyonu Çizelge 3.1 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. 5S rDNA problemlerinin etiketlenmesi için kullanılan PCR reaksiyonu

PCR BİLEŞENLERİ	PCR KOŞULLARI	
1 µl 5S rDNA Plazmit	95 °C’de 1’	
2 µl İleri primer	95 °C’de 30’’	X30
2 µl Geri primer	TM °C’de 30’’	
2 µl MgCl ₂	72 °C’de 1’	
5 µl Fluoromix (Dig-dUTP)	72 °C’de 5’	
5 µl 10x Taq Buffer	4 °C’de ∞	
0,5 µl Taq DNA polimeraz	95 °C’de 1’	
x µl ddH ₂ O		
Total Reaksiyon: 50 µl		

PCR reaksiyonu sonrasında PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntüsü ile doğrulanan dizilerin pürifikasyonu DNA temizleme kiti kullanılarak kit prosedürü takip edilerek yapılmıştır. Her 100 µl PCR ürünü için 200 µl DNA bağlama tamponu eklenerek karışım kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzölmüştür. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkanmıştır. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildikten sonra DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için, kolonların üzerlerine 30 µl 10 mM Tris-HCl eklenerek 13000×g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Temizlenen PCR ürünlerinin Nanodrop ile miktar tayini gerçekleştirilmiş ve elde edilen problemler 18S rDNA problemleri hazırlanana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.7.2. 18S rDNA bölgesi için problemlerin hazırlanması

18S rDNA bölgesi yaklaşık 1800 bp'lık bir bölge olmasından dolayı prob etiketlemesi "Nick Translasyon" reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Nick translasyon reaksiyonunda kalıp olarak kullanılacak 18S rDNA DNA parçalarının elde edilmesi için kullanılan PCR reaksiyonu Çizelge 3.2 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. 18S rDNA problemlerinin etiketlenmesi için kullanılan PCR reaksiyonu

PCR BİLEŞENLERİ	PCR KOŞULLARI	
1 µl 18S rDNA Plazmit	95 °C'de 1'	
2 µl İleri primer	95 °C'de 30''	X30
2 µl Geri primer	TM °C'de 30''	
2 µl MgCl ₂	72 °C'de 1'	
5 µl dNTP	72 °C'de 5'	
5 µl 10x Taq Buffer	4 °C'de ∞	
0,5 µl Taq DNA polimeraz		
X µl ddH ₂ O		
Total Reaksiyon: 50 µl		

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüsü ile doğrulama gerçekleştirilmiştir. Doğrulan ve nanodropta miktar tayini gerçekleştirilen diziler Nick Translasyon reaksiyonuna dahil edilmiştir. Reaksiyon 15 °C'de 1.5 saat boyunca inkübe edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. 18s rDNA problemlerinin etiketlenmesi için kullanılan Nick Translasyon bileşenleri

Nick Translasyon Bileşenleri
4 µl PCR ürünü
5 µl Fluoromix (Bio-dUTP)
5 µl NT Buffer
10 µl Enzim mix
X µl dH ₂ O
Total Hacim: 50 µl

3.2.7.3. 5S ve 18S rDNA prob karışımının hazırlanması

Etiketlenmesi tamamlanan 18S ve 5S rDNA problemlerinin her birinden 100 ng/slayt olacak şekilde hazırlanan prob karışımına 25 µg salmon sperm DNA'sı eklendikten sonra etanol presipitasyonu ile temizlenmiştir. Bu amaç için prob karışımının toplam hacmine oranla 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim etanol eklendikten sonra gece boyu -20 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 14.000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp %70 etanol ile yıkama yapılarak tekrar 13.000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj yapılarak ve pellet hibridizasyon tamponu içerisinde çözölmüştür.

3.2.7.4. Telomerik tekrar bölgeleri için FISH problemlerinin hazırlanması

Telomer tekrarlarına yönelik problemler (TTAGGG)₅ ve (CCCTAA)₅ primerleri kullanılarak kurulan PCR reaksiyonu sonucu elde edilen PCR ürünlerinin nick translasyon reaksiyonuna dahil edilerek etiketlenmesi ile elde edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Telomerik Problemlerin etiketlenmesi için kullanılan PCR reaksiyonu

PCR BİLEŞENLERİ	PCR KOŞULLARI
1 µl İleri primer	95 °C'de 1'
1 µl Geri primer	95 °C'de 30''
2 µl MgCl ₂	TM °C'de 30''
5 µl dNTP	72 °C'de 1'
5 µl 10x Taq Buffer	72 °C'de 5'
0,5 µl Taq DNA polimeraz	4 °C'de ∞
33,5 µl ddH ₂ O	
Total Reaksiyon: 50 µl	

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek dizilerin doğrulaması yapılmıştır. Doğrulaması tamamlanan dizilerin

Nanodropta miktar tayini yapıldıktan sonra PCR ürünleri Nick Translasyona dahil edilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Telomerik Probların etiketlenmesi için kullanılan Nick Translasyon bileşenleri

Nick Translasyon Bileşenleri
5 µl PCR ürünü
10 µl Fluoromix
5 µl 10x Buffer
10 µl Enzim mix
X µl dH ₂ O
Total Hacim: 50 µl

Reaksiyon 15 °C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından 5 µl stop buffer eklenerek reaksiyon inhibe edilmiştir. Tasarlanan telomer probundan 100 ng/slayt olacak şekilde alınarak üzerine 25 µg salmon sperm DNA’sı eklendikten sonra etanol presipitasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için prob karışımının toplam hacmine oranla 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim etanol eklendikten sonra gece boyu -20 °C’de inkübe edilmiştir. Inkübasyon tamamlandıktan sonra 13.000 rpm’de 4 °C’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp %70 etanol ile yıkama yapılarak tekrar 13.000 rpm’de 4 °C’de 30 dakika santrifüj yapılarak ve pellet hibridizasyon tamponu içerisinde çözülmüştür.

3.2.7.5. FISH analizi

Kromozom preparatları termal olarak yaşlandırılmıştır (37 °C’de 2 saat inkübasyon ve ardından 60 °C’de 1 saat), ardından RNase A ile ortamda bulunan RNA’lar uzaklaştırılmıştır (2x SSC’de 200 µg/mL, 80 dakika, 37 °C). RNase A muamelesinin ardından slaytlara pepsin ile muamele edilmiştir (10 mM HCl’de 50 µg/mL, 4 dakika, 37 °C) ve son olarak slaytlar 72 °C’de 3 dakika boyunca %75 formamid/2x SSC’de denatüre edilmiştir. Hazırlanan problemler ise 86 °C’de 6 dakika süreyle denatüre edilerek hibridizasyon için hazır hale getirilmiştir. Slaytların üzerine problemlerin muamelesinden sonra hibridizasyon ise nemli bir ortamda 37 °C’de gece boyunca gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon sonrası yıkama ise iki kez %50 formamid/2x SSC’de (42 °C, 10 dakika) ve üç kez 1x SSC’de (42 °C, 7 dakika) gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrası antikorların spesifik olmayan bağlanmasını engellemek için ise slaytlara %0,01 Tween 20/4x SSC içindeki %3 sığır serum albümini (BSA) ile muamele edilmiştir. Hibridizasyon sinyalleri,

Anti-Digoxigenin-FITC ve Streptavidin-Cy3 antikorları kullanılarak görselleştirilmiştir. Son olarak, tüm FISH slaytlarına 1,5 µg/ml DAPI ile muamele edilmiştir.

Telomer bölgelerinin FISH analizi için ise hibridizasyonun ardından spesifik olmayan hibridizasyon sinyallerini ortadan kaldırmak için slaytlar, 65 °C'de (her biri 5 dakika) 1 x SSC ile iki kez ve ardından oda sıcaklığında 4 x SSC/Tween (5 dakika) ve 1 x PBS (1 dakika) ile yıkanmıştır. Son olarak, 1,5 µg/ml DAPI ile muamele edilmiştir. Slaytlar hazırlandıktan sonra metafaz görüntüleri alınarak sinyaller analiz edilmiştir. Her bir slayt için en az 10 metafaz analiz edilmiştir.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

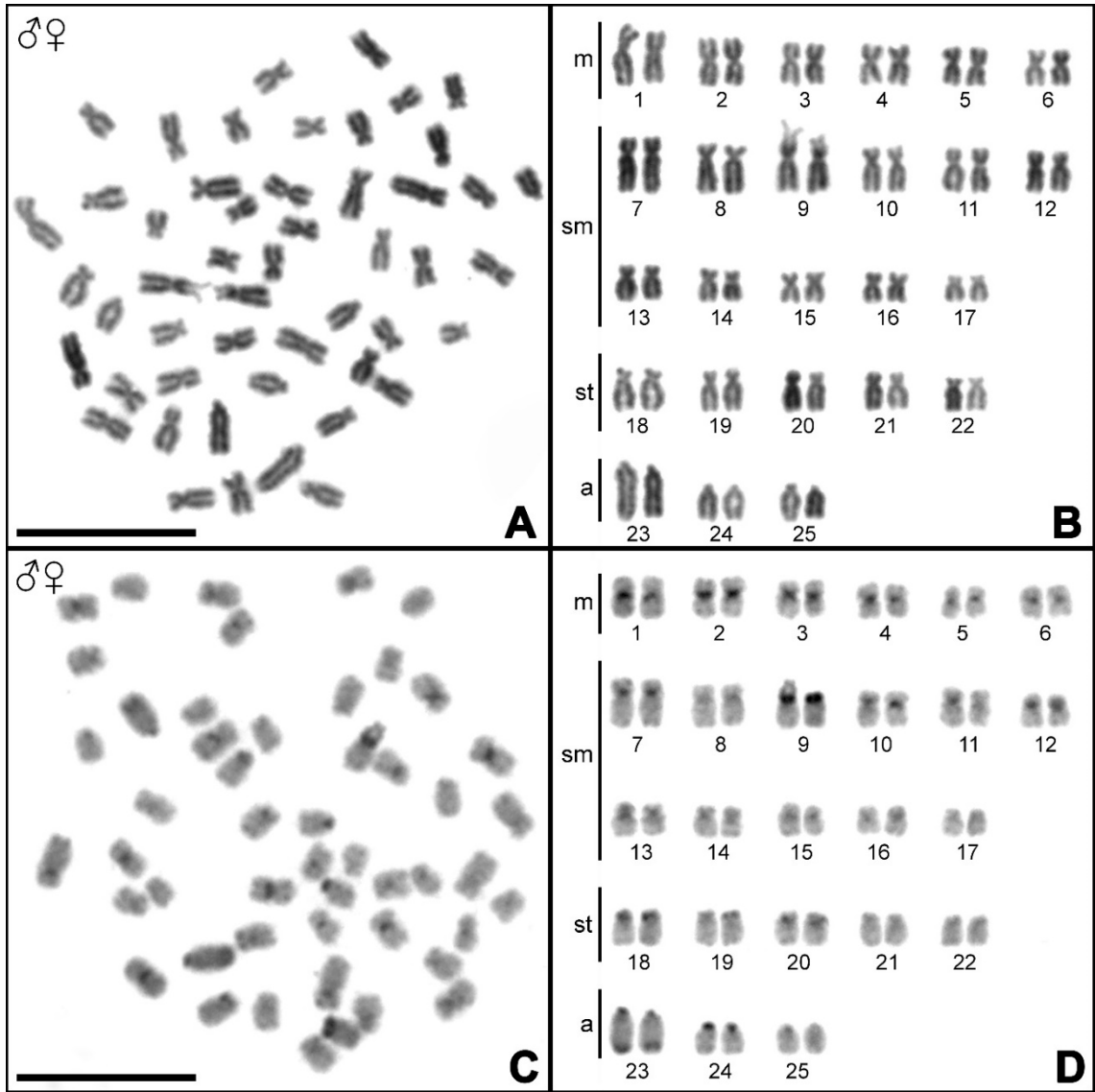
4.1. Deneysel Sonuçlar

4.1.1. Diploid kromozom sayısı ve karyotip analizi

Leuciscidae ailesine ait diğer cins ve türlerde olduğu gibi *T. fahirae* için diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak hesaplanmıştır. Karyotip analizinde kromozom morfolojisi 12 adet metasentrik kromozom, 32 adet submetasentrik-subtelosentrik kromozom ve 6 adet telosentrik-akrosentrik kromozom olarak gözlemlenmiştir (NF=94). Çalışılan dişi ve erkek bireylerde diploid kromozom sayısı eşittir. Sex kromozomu tayini yapılamamıştır (Şekil 4.1).

4.1.2. C-bantlama sonuçları

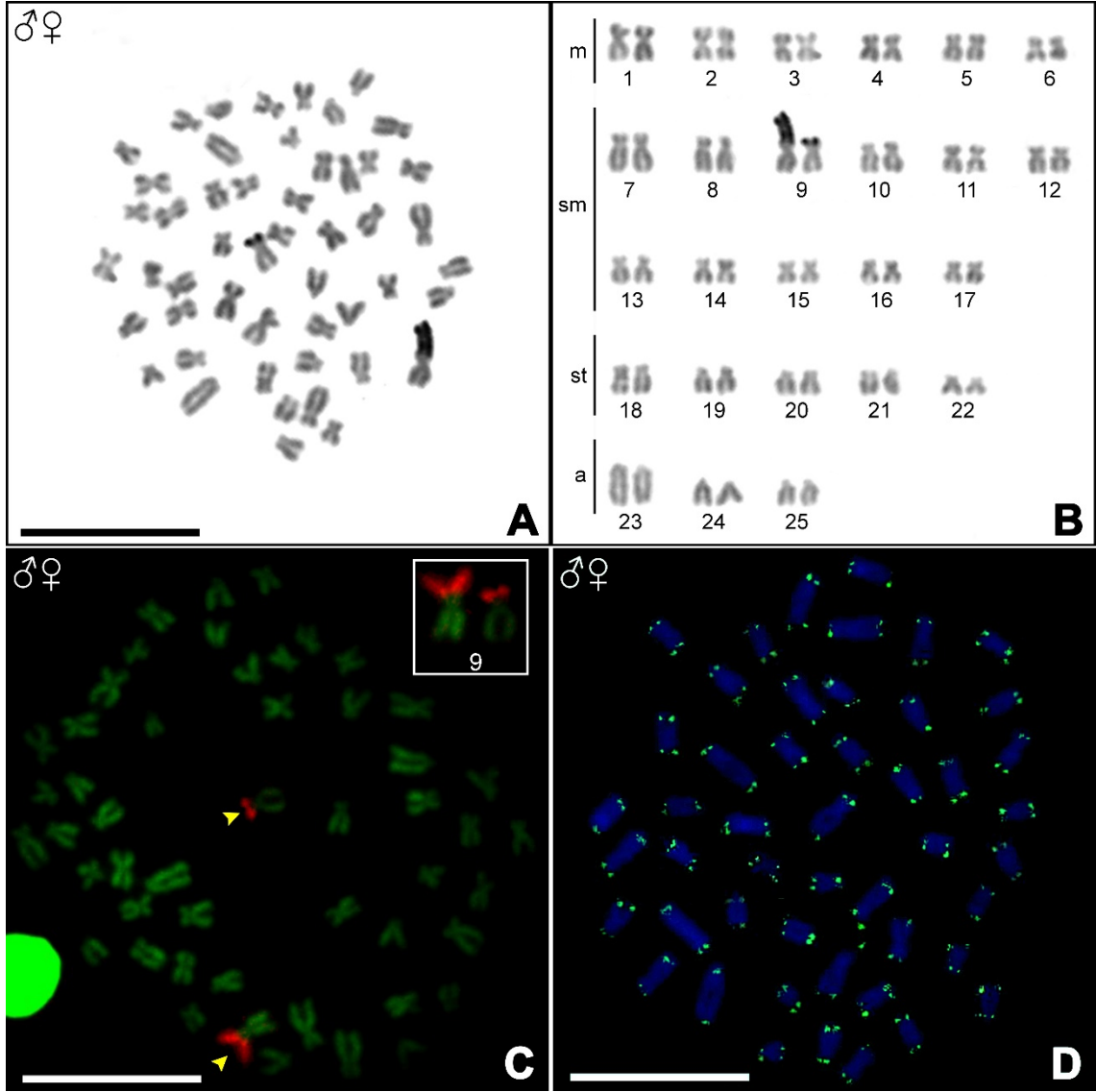
Dokuz numaralı submetasentrik kromozom çiftini meydana getiren kromozomlardan bir tanesinin kısa kolunda dikkat çekici uzunlukta sekonder boğum gözlemlenirken diğer kromozomun uzun kolunda daha kısa bir sekonder boğum gözlemlenmiştir. Yapılan C bantlama sonucunda yapısal heterokromatin lokusları karyotipteki çoğu kromozomun sentromerik ve perisentromerik bölgesinde olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 23 nolu akrosentrik kromozomun uzun kolunun telomer bölgesinde dikkat çeken bir hafif C-heterokromatin lokus yer almıştır. 9 numaralı kromozomun sekonder boğumunun başlangıcından sentromerik bölgeye kadar olan perisentromerik bölgenin bütününde heterokromatin gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *T. fahrae*'nin Giemsa boyama ve C-bantlama sonrası mitotik metafazlar ve onlardan düzenlenmiş karyotipleri. (A,B) Giemsa boyama, (C,D) C-bantlama. Hem Giemsa boyama hem de C-bantlama sonrası tespit edilen polimorfik (heteromorf) dokuz numaralı çiftin *p*-kısa kolundaki ikincil boğuma kurucu heterokromatin bloğuna dikkat edin (B, D). Ayrıca 23 numaralı çiftin uzun-kolunun telomer bölgesindeki kurucu heterokromatin blokta oldukça dikkat çekicidir (D). Ölçek çubuğu = 10 µm.

4.1.3. AgNOR boyama ve CMA₃-DAPI boyama sonuçları

Yapılan AgNOR boyama ile 1 çift yani 2 submetasentrik kromozom üzerinde aktif NOR bölgesi yer aldığı gözlemlenmiştir. CMA₃ boyama ile bu bölgeler doğrulanarak aynı kromozom çiftinin aktif NOR bölgelerinde CMA₃ pozitif sinyal varlığı izlenmiştir. Bu sinyallerin 9 numaralı submetasentrik kromozom çiftindeki sekonder boğum üzerinde yer aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



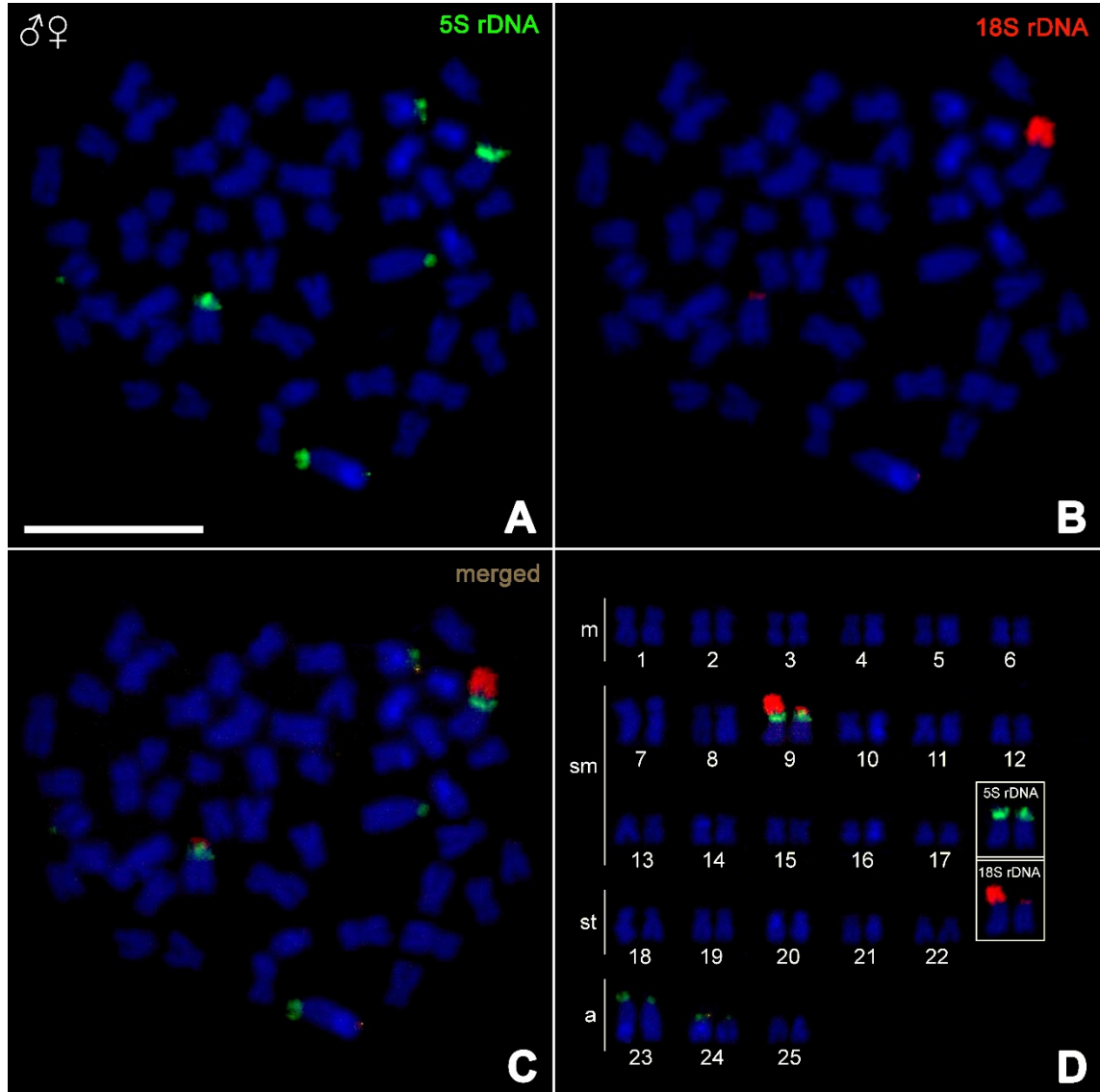
Şekil 4.2. *T. fahirae*'nin (A) Ag-NOR boyaması, (B) ondan düzenlenmiş karyotipi, (C) CMA₃/DAPI boyamasından sonraki mitotik metafaz ve (D) Telomerik problu PNA FISH. Ag-nitrat boyama sonrası dokuz numaralı çiftteki polimorfik Ag-NOR'a dikkat edin. CMA₃/DAPI boyamasında daha iyi kontrast için görüntüler kırmızı (CMA₃ için) ve yeşil (DAPI için) renklerle psödokolorize edilmiştir. Ayrıca telomerik FISH'de daha iyi kontrast için resimler yeşil (telomerik tekrar probu) ve mavi (DAPI) ile psödokolorize edilmiştir. Ölçek çubuğu = 10 µm.

4.1.4. Moleküler sitogenetik sonuçları

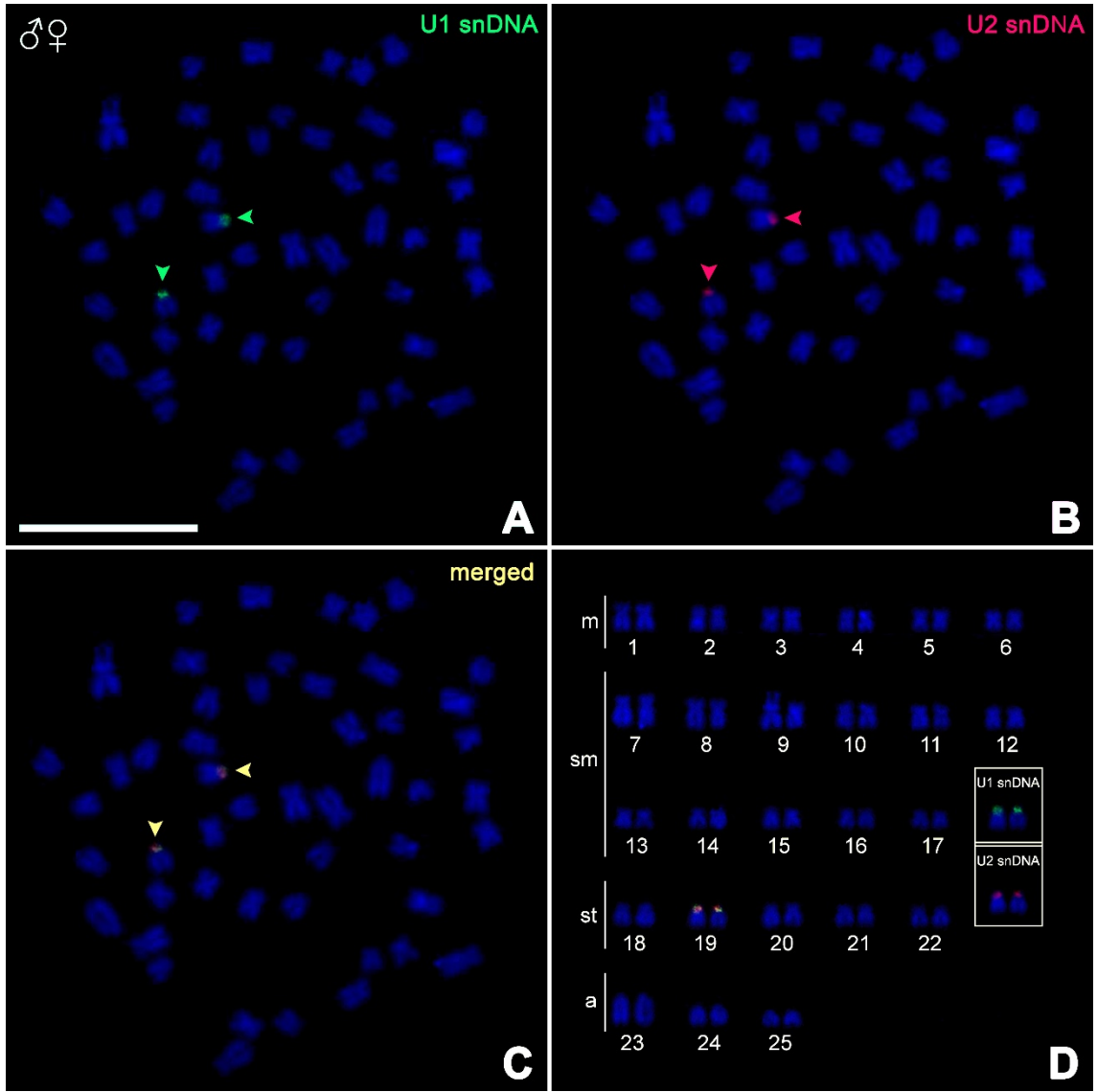
18S rDNA-5SrDNA bölgeleri; yapılan moleküler sitogenetik çalışmalarda FISH yöntemi ile 18S rDNA probları kullanılarak 9 numaralı submetasentrik kromozom çiftinde bulunan sekonder boğumlarda 2 adet 18S rDNA pozitif sinyaller gözlemlenmiştir. 5s rDNA probları ile yapılan FISH sonuçlarında ise 3 çift kromozom üzerinde toplamda 6 adet 5s rDNA pozitif sinyal gözlemlenirken 2 adet 5s rDNA sinyali 18s rDNA sinyali ile ko-lokalize durumdadır (Şekil 4.3).

U1-U2 Bölgeleri; FISH tekniği kullanılarak U1-U2 problelerinden 2 adet sinyal tek bir kromozom üzerinde ko-lokalize durumda izlenmiştir (Şekil 4.4).

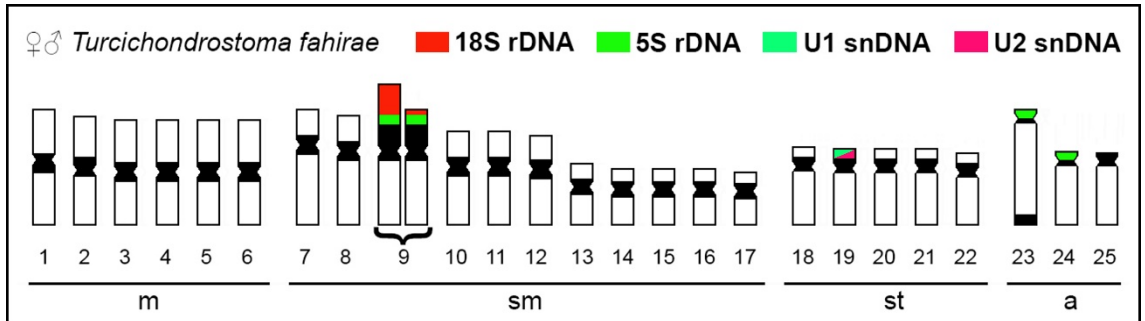
Telomer Bölgeleri; moleküler sitogenetik tekniklerle telomere özel tasarlanan problemler her kromozom için kromozomun telomer bölgesinde izlenmiştir ve sonuç olarak herhangi bir kromozomal yeniden düzenlenme gözlenmemiştir. Herhangi bir cinsiyet kromozomu tayin edilememiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.3. *T. fahirae*'nin 5S/18S rDNA sonrası metafazları ve düzenlenmiş karyotipi. (A) 5S rDNA (yeşil), (B) 18S rDNA (kırmızı) problemleri, (C) hem problemlerin hem de DAPI karşı boyamasının birleştirilmiş (merged) görüntüsü ve (D) karyotipi. Dokuz numaralı heteromorf çiftin üzerinde hem 5S hem de 18S rDNA sinyallerinin birlikte bulunmasına dikkat edin. Ayrıca bu kromozomun homologlarındaki 18S rDNA sinyal büyüklüğü Ag-NOR'da olduğu gibi farklı büyüklüktedir. Kromozomlar DAPI (mavi) ile karşı boyanmıştır. Ölçek çubuğu = 10 µm.



Şekil 4.4. *T. fahirae*'nin U1/U2 snDNA FISH sonrası metafazları ve düzenlenmiş karyotipi. (A) U1 snDNA (yeşil), (B) U2 snDNA (kırmızı) problemleri, (C) hem problemlerin hem de DAPI karşı boyamasının birleştirilmiş (merged) görüntüsü ve (D) karyotipi. Hem U1 snDNA hem de U2 snDNA sinyallerinin 19 numaralı çiftte birlikte bulunmasına dikkat edin. Kromozomlar DAPI (mavi) ile karşı boyanmıştır. Ölçek çubuğu = 10 µm.



Şekil 4.5. *T. fahirae*'nin analiz edilen multigen ailelerinin dağılımını vurgulayan temsili idiogramı. Türün kromozomları üzerindeki 5S (yeşil) ve 18S (kırmızı) rDNA bölgeleri ile U1 (koyu yeşil) ve U2 (pembe) snDNA bölgeleri temsil etmektedir. 9 numaralı kromozom çifti üzerindeki 5S ve 18S rDNA bölgelerinin bitişik düzenine ve 19 numaralı çiftin üzerindeki snDNA bölgelerinin birlikte lokalizasyonu vurgulanmaktadır. Siyah alanlarla sentromerik ve perisentromerik C bandların yerleri gösterilmektedir.

4.2. Tartışma

Bu çalışmada *T. fahirae*'nin karyolojik özellikleri ortaya konmaya çalışılmıştır. *T. fahirae*'yi Ladiges (1960) *Phoxinellus fahirae* olarak tanımlamıştır. 1992'de Bogutskaya bazı cinsleri *pseudophoxinus* cinsi içerisinde değerlendirmiştir ve söz konusu tür *Pseudophoxinus* cinsi içerisinde rapor edilmiştir (Bogutskaya, 1992). 2006 yılında yapılan bir çalışmaya göre söz konusu tür *Pseudophoxinus* cinsi dışında tutulması gerektiği bildirilerek *Chondrostoma* cinsi içerisinde değerlendirmeye alınmıştır ve *Chondrostoma fahirae* olarak isimlendirilmiştir (Bogutskaya ve ark., 2006a). 2021'de yapılan son morfolojik ve moleküler çalışmaya göre *T. fahirae*, *Chondrostoma* ve *Pseudophoxinus* cinslerinden ayrılarak yeni bir cins ve tür olarak tanımlaması yapılmıştır (Turan ve ark., 2021). Bu çalışmayla *T. fahirae*'nin hem moleküler hem de klasik metotlarla sitogenetik özellikleri ilk defa ortaya konmaya çalışılmıştır.

T. fahirae, sistematik tarihçesinde daha önceden *Pseudophoxinus* ve *Chondrostoma* cinsleri içerisinde değerlendirildiği için bu çalışmada elde edilen sonuçlar söz konusu cinslerden karyolojisi çalışılmış olan türlerle karşılaştırılmıştır. Ayrıca morfolojik ve moleküler olarak karşılaştırıldığı *Pseudophoxinus* ve *Chondrostoma* cinsleriyle (Berberović ve ark., 1970; Cataudella ve ark., 1977; Kalous ve ark., 2008; Karasu, 2009; Ergene ve ark., 2010; Esmaili ve ark., 2010; Unal ve ark., 2014; Arslan ve Gündoğdu, 2016; Ayata ve ark., 2016; Boroń ve ark., 2020; Gaffaroğlu ve ark., 2022; Doori ve Arslan, 2024) karşılatırmalı olarak tartışılmıştır. Ayrıca moleküler olarak tartışılan *Achondrostoma*, *Pseudochondrostoma* ve *Iberchondrostoma* türleri (Pereira ve ark., 2012) ile tartışılmıştır. Sonuçlarımız benzerlikler farklılıklar göstermektedir.

Pseudophoxinus cinsleri için yapılan karyolojik çalışmalarda türler için diploid kromozom sayısı Leuciscidae familyasının diploid kromozom sayısı ile örtüşerek $2n=50$ olarak hesaplanmıştır (Karasu ve ark., 2011; Ayata ve ark., 2016).

Pseudophoxinus türleri için yapılan AgNOR boyama çalışmalarında 6 tür için 1 çift 2 kromozom üzerinde aktif NOR, 7 tür için 2 çift toplamda 4 adet kromozom üzerinde NOR bulundukları belirtilmiştir. *P. firatı* için yapılan AgNOR boyamada 2 çift yani 4 adet subtelosentrik kromozom üzerinde NOR gözlemlendiği belirtilmiştir. CMA₃ boyamada 2 adet CMA₃ pozitif sinyalin bir polimorfizm olduğu rapor edilmiştir (Karasu ve ark., 2011; Ayata, 2020). *P. elizavatea* için *P. firatı*'ye benzer şekilde 2 çift NOR gözlemlenmiş 4 adet submetasentrik kromozom üzerinde bulundukları rapor edilmiştir. Yapılan CMA₃ boyamada AgNOR fenotipleri doğrulanmıştır (Gaffaroğlu ve ark., 2014).

P. hitittorum için AgNOR boyamada 1 çift yani 2 adet submetasentrik kromozom üzerinde NOR gözlemlenmiştir. Ancak yapılan CMA₃ boyamada 2 adet daha sinyal tespit edilmiştir ve bu polimorfizmin rDNA gen bölgelerinin translokasyonundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Ayata, 2020). Sonuç olarak *P. firati*, *P. elizavetae* ve *P. hitittorum* için majör rDNA genlerinin submetasentrik kromozomlar üzerinde olduğu belirtilmiştir (Ayata, 2020). *P. zekayi* için yapılan sitogenetik çalışmada AgNOR boyamada gözlemlenen NOR bölgeleri için polimorfizmler olduğu belirtilmiştir. NOR sayısı bireyler arasında 2-4 arasında değiştiği ifade edilmiştir. %61 oranla en sık gözlemlenen NOR sayısının 2 olduğu tespit edilmiştir (Unal ve Gaffaroğlu, 2016).

P. zekayi için yapılan C bantlama'da *P. fahrettini* ve *P. antalyae*'den farklı olarak parasentromerik C bantlar olduğu bildirilmiştir (Ergene ve ark., 2010; Ayata ve ark., 2016; Unal ve Gaffaroğlu, 2016). *P. antalyae* için yapılan sitogenetik çalışmada 1 çift 2 adet subtelosentrik kromozom üzerinde NOR gözlemlenmiştir. Yapılan C bantlamada çoğunlukla sentromer bölgesinde C bantların tespit edildiği bildirilmiştir (Ergene ve ark., 2010). *P. crassus* için yapılan sitogenetik çalışmalar sonucunda AgNOR boyama ile elde edilen sonuçlara göre 1 çift 2 adet submetasentrik kromozom üzerinde NOR gözlemlendiği rapor edilmiştir. C bantların sentromerik bölgede lokalize olduğu çalışmada bildirilmiştir. *P. battalgilae*, *P. burduricus*, *P. fahrettini*, *P. evliya* ve *P. meandri* için yapılan sitogenetik çalışmayla NOR fenotipleri ve C bantlara yönelik sonuçlar ortaya konmuştur. AgNOR boyama ile *P. battalgilae*, *P. evliya* ve *P. meandri* türleri için 2 çift 4 adet orta büyüklükteki submetasentrik kromozomun kısa kolu üzerinde NOR tespit edildiği ifade edilmiştir. *P. burduricus* ve *P. fahrettini* 1 çift 2 adet submetasentrik kromozom üzerinde NOR gözlemlendiği bildirilmiştir. *P. battalgilae*, *P. burduricus*, *P. fahrettini*, *P. evliya* ve *P. meandri* için yapılan C bantlamada birkaç kromozomun sentromer bölgesinde heterokromatin bloklar olduğu ayrıca *P. fahrettini*'deki bazı kromozomlarda perisentromerik bölgede C bantların varlığından söz edilmiştir (Ayata ve ark., 2016).

P. alii ve *P. elizavetae* için yapılan sitogenetik çalışmada NOR sayıları değişken olmakla beraber çoğunlukla 4 adet NOR gözlemlendiği bildirilmiştir. *P. alii* için yapılan C bantlamada kromozomlarının çoğunda perisentromerik bölgede C bantlar gözlemlendiği; *P. elizavetae* için ise bazı kromozomların perisentromerik bölgesinde heterokromatin bloklar gözlemlendiği bildirilmiştir (Gaffaroğlu ve ark., 2022).

Parachondrostoma arrigonis için yapılan sitogenetik çalışmada AgNOR boyama ile erkek bireyde 1 çift yani 2 adet subtelosentrik kromozom üzerinde NOR bölgesi

belirlenmiş ve CMA₃ ile doğrulanmıştır. Dişi birey için yapılan AgNOR boyama ile karakteristik olan subtelosentrik-akrosentrik kromzom çifti de dahil olmak üzere en az 7 NOR bölgesinin belirlendiği ve CMA₃ boyamada bir kromozomun bütün kollarının pozitif sinyal verdiği bildirilmiştir (Kalous ve ark., 2008).

Chondrostoma türleri için yapılan sitogenetik çalışmalarda (*C. regium* için 2n=52) diploid kromozom sayısı 2n=50 olarak bildirilmiştir. Bu sayı leuciscidae familyası için karakteristiktir. AgNOR boyama ile elde edilen sonuçlarda 2-4 arasında değişen NOR bölgeleri bildirilmiştir. Çalışmalarda karyotipin en büyük kromozom çifti subtelosentrik-akrosentrik olarak bildirilmiştir (Esmaili ve ark., 2010).

C. regium için yapılan sitogenetik çalışmada AgNOR boyama sonucunda 1 çift yani 2 adet telosentrik kromozom üzerinde NOR gözlemlendiği bildirilmiştir. C bantlama yapılan methafazlarda 2 çift kromozomun telomer bölgesinde yapısal heterokromatin bloklar gözlemlendiği ve 2 çift kromozomunda uzun kolların telomer bölgesinde yapısal heterokromatin bloklar gözlemlendiği bildirilmiştir (Yamaç ve Şişman, 2023).

Sitogenetik bir çalışmayla 9 İber kondrostomin (*Achondrostoma arcasii*, *A. occidentale*, *A. oligolepis*, *Iberochondrostoma almaçai*, *I. lemmingii*, *I. lusitanicum*, *Pseudochondrostoma duriense*, *P. polylepis* ve *P. willkommii*) türüne ait rDNA lokusları, 5S rDNA ve 45S rDNA problemleri kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Tüm türler için diploid kromozom sayısı 2n=50 olarak belirlenmiş ve karyotip formülü 6-7 metasentrik (m), 15-16 submetasentrik (sm) ve 3-4 subtelo-akrosentrik (st/a) kromozom çiftleriyle karakteristik lōsisin karyotip formülüyle uyum gösterdiği bildirilmiştir. 5S rDNA lokusları tüm türler için terminal bölgede subtelosentrik-akrosentrik kromozomlar üzerinde 4-8 arasında değişen sayıda olduğu rapor edilmiştir. 45S rDNA problemleri ile tespit edilen NOR bölgeleri 3-6 arasında değişen sayıda submetasentrik kromozomlar üzerinde gözlemlendiği tespit edilmiştir (Pereira ve ark., 2012)

Çizelge 4.1. Bazı kondrostomin cinsi balıklara ait 45s ve 5s rDNA sinyal sayıları

Tür İsmi	5S rDNA Sinyal Sayısı	45S rDNA Sinyal Sayısı	Kaynak
<i>Achondrostoma arcasii</i>	8		(Pereira ve ark., 2012)
<i>Achondrostoma occidentale</i>	7		
<i>Achondrostoma oligolepis</i>	6-8	6	
<i>Iberochondrostoma almaçai</i>		4	
<i>Iberochondrostoma lemmingii</i>	4-6	3	
<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>	4	3-4	
<i>Pseudochondrostoma duriense</i>	4	3	
<i>Pseudochondrostoma polylepis</i>	4	4	
<i>Pseudochondrostoma willkommii</i>	4	3	

C. beysehirense için yapılan sitogenetik çalışmada C bantlama ile elde edilen sonuçlarda bazı kromozomlarda sentromerik veya perisentromerik bölgelerde C pozitif bantlar gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca bir çift submetasentrik kromozomun kısa kolunun tamamında C pozitif bantlar gözlemlendiği belirtilmiştir. Yapılan AgNOR boyama ile 1 çift submetasentrik kromozom üzerinde NOR bölgesi gözlemlendiği ve bu NOR bölgesinin büyük bir C heterokromatin bölge ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Arslan ve Gündoğdu, 2016).

C. nasus için hem klasik sitogenetik yöntemleri hemde moleküler sitogenetik yöntemleri içeren bir çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmada 1-2 değişen sayıda ve boyutta fazladan B kromozomları gözlemlendiği bildirilmiştir. Fazladan B kromozomları evrimsel süreç hakkında bilgi edinmek için kullanılabilir oldukları düşünülmektedir. 20 bireye ait metafazların büyük çoğunluğunda diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak bildirilmiştir ancak 20 bireyin 14'ünde B kromozomları gözlemlendiği öne sürülmüştür. AgNOR boyama ile metafazların %10'u için 2 çift submetasentrik kromozomun kısa kolları üzerinde telomer bölgesinde NOR gözlemlendiği; popülasyon içi NOR fenotipinin varyasyon gösterdiği ve 1-4 arasında değişen sayıda NOR pozitif sinyal görüldüğü bildirilmiştir. Metafazların %70'inde NOR bölgesine denk gelen CMA₃ pozitif sinyal gözlemlendiği ayrıca diğer metafazlarda NOR bölgesi dışında kalan 4 adet daha CMA₃ pozitif sinyal gözlemlendiği rapor edilmiştir (Boroń ve ark., 2020).

Yapısal heterokromatin bölgeler büyük çoğunlukla sentromer bölgesinde gözlemlenirken bazı kromozomlarda perisentromerik bölgede lokalize olduğu bildirilmiştir (Boroń ve ark., 2020).

C. nasus için yapılan moleküler sitogenetik çalışmalarda 28S rDNA problemleri ve 5S rDNA problemleri kullanılmıştır. 28S rDNA bölgeleri metafazların %85'inde 4 submetasentrik kromozomun kısa kolları üzerinde sinyal vermiştir. 28S rDNA problemlerinin sinyal verdiği yerler AgNOR ve CMA₃ pozitif yerlere karşılık geldiği rapor edilmiştir. 5S rDNA problemleri 2-4 sinyal verdiği; metafazların %90'ından fazlasının 4 sinyal verdiği ve sinyallerin bir çift submetasentrik kromozomda ve bir çift en büyük akrosentrik kromozom üzerinde gözlemlendiği ifade edilmiştir (Boroń ve ark., 2020).

C. nasus metafazlarında 28S rDNA ve 5S rDNA için 2'si sentenik olmak üzere 4 adet sinyal ile karakterize edilmiştir (Boroń ve ark., 2020).

Yapılan sitogenetik çalışmalarda *T. fahirae*'ye ait hem dişi bireylerde hem de erkek bireylerde diploid kromozom sayısı diğer Leuciscidae familyasının üyelerinde olduğu gibi $2n=50$ olarak hesaplanmıştır, bu sayı Leuciscidae familyasındaki balıklar için

karakteristiktir ve çoğu türde değişmezdir. Karyotip formülü diğer chondrosmisin türleriyle tutarlı olarak 12 metasentrik, 22 submetasentrik, 10 subtelosentrik ve 6 adet akrosentrik olarak ortaya konmuştur. Temel kromozom kol sayısı (NF) =94 olarak gözlemlenmiştir ve diğer Leuciscidae ailesinin üyeleriyle bu sayı tutarlılık göstermektedir (Cataudella ve ark., 1977; Bogutskaya, 1992; Bogutskaya ve ark., 2006b; Pereira ve ark., 2009; Turan ve ark., 2021). Leuciscidae familyasının üyelerine ait en büyük kromozom çifti karakteristik olarak subtelosentrik-akrosentrik kromozom gözlemlenmektedir ve bu sitotaksonomik bir marker olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir.

Balık sitotaksonomisinde NOR sayısı ve kromozom üzerindeki pozisyonu sitotaksonomik marker olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Rábová ve ark., 2015). Sitogenetik markerlardan olan NOR fenotipleri, yani kromozom üzerindeki majör rDNA genlerinin pozisyonu ve sayısı balıkların karşılaştırmalı sitotaksonomisinde önemlidir. Türe ait NOR sayısı ve kromozom üzerindeki konumu temel olarak AgNO₃ (gümüş nitrat) boyama ve CMA₃ kullanılarak çalışılmıştır (Gornung, 2013; Rábová ve ark., 2015). Heteromorf submetasentrik kromozom üzerindeki heterokromatin bölgeyle ilişkili 1 çift NOR gözlemlenmiştir. Bütün metafazlarda bu NOR kararlılık göstermiştir. Ayrıca 9 numaralı heteromorfik çiftte gözlenen NOR CMA₃ boyama ile de doğrulanmıştır. Örneklerimize ait karyotip analizlerinde metasentrik ve submetasentrik kromozom sayıları Türkiye'deki *Pseudophoxinus* türlerindeki sayıyla hemen hemen uyum göstermektedir (Doori ve Arslan, 2024). Ancak örneklerimize ait karyotip analizinde de görüldüğü gibi akrosentrik kromozom sayısı bakımından *T. fahirae* *Pseudophoxinus* cinslerinden farklıdır ve kromozom setindeki akrosentrik kromozom sayısı daha fazladır.

T. fahirae'nin karyotip formülü iberian cinsi (*Achondrostoma arcasii*, *A. occidentale*, *A. oligolepis*, *Iberochondrostoma almakai*, *I. lemmingii*, *I. lusitanicum*, *Pseudochondrostoma duriense*, *P. polylepis* ve *P. willkommii*) kondrostomin türleri ile bazı farklılıklar gösterse de genel hatlarıyla çok benzerdir (Pereira ve ark., 2012). Yine aynı şekilde örneklerimizin karyotip formülü diğer lōsisin türlerinininkiyle de uyumluluk göstermektedir.

Diğer lōsisin türleriyle örneklerimiz arasındaki küçük farklılıkların sebebinin kromozomal yeniden düzenlemelerden kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. Türkiye'deki *chondrostoma* cinslerinden yalnızca ikisinin (*C.regium* ve *C.beysehirense*) sitogenetik çalışması şuanda mevcuttur. Fakat *C. regium* için yapılan sitogenetik analizden C bantların ve AgNOR boyamayla yapılan analizler için sunulan görsellerden heterokromatin ve NOR fenotipleri anlaşılamamaktadır (Arslan ve Gündoğdu, 2016;

Yamaç ve Şişman, 2023). *T. fahirae* ile *Pseudophoxinus* ve *Chondrostoma* türlerinin arasındaki karyotip farklılığının bir diğer nedeni de (Sember ve ark., 2020b)'nin savunduğu sebeplerden olan karyotipi doğru bir biçimde belirlemeyi neredeyse imkansız yapan oldukça yoğun yapıdaki kromozomlar olabilir.

C bantlama tekniği yurtdışında veya ülkemizde yapılan sitogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. C-bantlama ile kromozomlar üzerindeki yapısal heterokromatinler ortaya koyulmakta ve yakın akraba türler arasındaki akrabalık ilişkileri heterokromatinin konumu ve boyutu açısından karşılaştırılabilmektedir (Arslan ve Arslan, 2007). *T. fahirae* için yapılan C bantlama sonuçlarındaki perisentromerik ve sentromerik C-bantların pozisyonu Türkiye'deki *Pseudophoxinus* türleriyle (*P. antalyae*, *P. battalgilae*, *P. burduricus* ve *P. evliya*, *P. anatolicus*) (Ayata ve ark., 2016; Unal ve Gaffaroğlu, 2016; Doorı ve Arslan, 2024) ve *C. beysehirense*'nin (Arslan ve Gündoğdu, 2016) C bantlamalarının konumlarıyla benzerlik göstermesine rağmen, *T. fahirae* akrosentrik kromozomların terminal bölgesinde bulunan C-heterokromatin bölgeyle diğerlerinden ayrılmaktadır.

Kromozomların terminalinde lokalize olan C-heterokromatinler ile benzer bir sonuç *Hypophthalmichthys nobilis* için yapılan sitogenetik analizlerde de gözlemlenmiştir (Sember ve ark., 2020b). Onlar bu durumun kromozomal bir yeniden düzenleme olabileceğini ifade etmektedirler. Kromozom üzerindeki ek kurucu heterokromatinin sebebini kromozoma ait genel morfolojiyi etkilemeyen fakat heterokromatin bloğun bir bölümünü kısa koldan uzun kolun proksimal bölgesine taşıyan perisentromerik bir inversiyon olarak açıklamaktadırlar (Sember ve ark., 2020b). *T. fahirae*'ye ait akrosentrik kromozomların terminalinde lokalize olan C-heterokromatinlerin sebebini Sember ve ark. (2020) açıkladığı sebeplerden olabileceğini düşünmekteyiz.

C. beysehirense için yapılan AgNOR ile ilişkili *T. fahirae*'nin sonuçlarına benzer olarak sekonder boğum içeren bir submetasentrik kromozom çifti bulunmaktadır. Ancak *C. beysehirense*'de bulunan submetsentrik kromozom çifti homomorfiktir ve karyotip içindeki en büyük kromozom çiftidir. *T. fahirae*'nin kromozom seti içinde bulunan 9 numaralı submetsentrik kromozom çifti hem heteromorf hem de orta büyüklüktedir. Bu kromozomlardaki heteromorfizmin sebebi rDNA bölgelerinin eşit olmayan çaprazlanma ve ekspresyonunun bir sonucu olabilir (Pereira ve ark., 2012). NOR içeren heteromorfik kromozomlar Avrupa'daki *Chondrostoma regium* ve *Chondrostoma lusitanicum* türlerinde de gözlemlenmiştir (Rodrigues ve Collares-Pereira, 1996; Boroń ve ark., 2020).

Türkiye'deki *Pseudophoxinus* türlerindeki 18s rDNA bölgeleriyle ilişkili aktif NOR lokuslarının 2 çift kromozom üzerinde ya da daha fazla kromozom üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Doori ve Arslan, 2024). Bu sonuçlara benzer olarak Türkiye'deki *C. beysehirense*'de ve Avrupa'daki *C. nasus* ile *C. lusitanicum*'da da NOR sayısı 2 veya daha fazla sayıda olduğu gözlemlenmiştir (Rodrigues ve Collares-Pereira, 1996; Arslan ve Gündoğdu, 2016; Boroń ve ark., 2020). *T. fahirae* kromozom setinde 1 çift NOR bulundurması sebebiyle Avrupa'daki *Chondrostoma* türlerinden ayrılırken NOR bölgelerinin heteromorfik olması sebebiyle de *C. beysehirense*'den ayrılmaktadır. Kababurun balıklarının karyotipindeki bir çift subtelosentrik kromozomun kısa kollarındaki ortak NOR lokusları plesimorfik bir durumun temsilcisidir. Diğer kromozomlar üzerinde bulunan NOR'lar ise türetilmiş bir durumu yani Teleostei için apomorfik bir durumun temsilcileridir. Leuciscidae familyasının üyeleri için kromozom setindeki tek bir küçük submetasentrik kromozom çifti üzerindeki NOR fenotipi karakteristiktir (Boron ve ark., 2009; Boroń ve ark., 2020). *T. fahirae*'nin kromozom setinde bulunan ve plesimorfik olarak kabul edilen bir çift NOR'un orta büyüklükte bir submetasentrik kromozom üzerinde bulunuyor olması önemli bir fark olabilir. Bunun yanı sıra bazı Leuciscus türleri apomorfik olan çoklu NOR fenotipleri ile karakterize edilmişlerdir (Boron ve ark., 2009; Kirtiklis ve ark., 2010; Boroń ve ark., 2020). Fakat bizim örneklerimiz için bu durum söz konusu değildir.

Majör NOR oluşturan 45s rDNA bölgeleri ve minör NOR oluşturmayan 5s rDNA bölgeleri balıklar için en sık kullanılan sitotaksonomik bir karakterdir (Cioffi ve Bertollo, 2012; Sochorová ve ark., 2018; Sember ve ark., 2020b). Majör rDNA bölgeleri genelde 18s rDNA problemleriyle veya 28s rDNA problemleriyle görselleştirilmektedirler. Yapılan farklı çalışmalarda majör rDNA lokuslarının sayıca farklılıkları ve lokalizasyon bakımından farklılıkları gösterilmiştir (Singh ve ark., 2009; Traldi ve ark., 2016). Bunların tür komplekslerinin ya da kriptik türlerin varlığının açıklanmasında önemli olabileceği ifade edilmiştir (Sember ve ark., 2020b). Yakın akraba türlerdeki rDNA bölgelerinin sayısının farklı olabileceği yapılan birçok çalışmayla ortaya konmuştur (Symonová ve ark., 2013; Sember ve ark., 2015). Balık türleri arasındaki 5s rDNA lokuslarının sayısındaki farklılık yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Hatta pozitif sinyallerin sayı ve lokalizasyon farklılıkları dışında 45s rDNA bölgeleri ve 5s rDNA bölgeleri arasındaki ilişki ya da diğer çoklu gen aileleri arasındaki bağlantı da önemli bir sitotaksonomik karakter olarak kullanılabilir (Mazzei ve ark., 2004; Ziemniczak ve ark., 2012). Yapılan bazı moleküler sitogenetik çalışmalarda 5s rDNA lokusu ve 18s rDNA lokusu arasında sayıca ve

lokalizasyon açısından önemli ölçüde farklılık olabildiği rapor edilmiştir (Libertini ve ark., 2008; Pereira ve ark., 2012; Rossi ve ark., 2012). *Hypophthalmichthys* türü için yapılan moleküler sitogenetik çalışmada tek bir kromozom çifti üzerinde 5S rDNA ile 18S rDNA lokusları birbirlerine bitişik olarak bulunmuştur. Minör ve majör rDNA lokuslarının birbirlerine sintenik durumlarının bazı siprinid türleri için sitotaksonomik bir belirteç olabileceği ifade edilirken (Kirtiklis ve ark., 2010; Rossi ve ark., 2012) *H. molitrix* ve *H. nobilis* türleri için sitotaksonomik bir karakter olamayacağı gösterilmiştir (Sember ve ark., 2020b). *T. fahirae* için çalışılan tüm bireylerde 5s rDNA probu 3 çift kromozom üzerinde sinyal vermesinin hem sayı hem de lokalizasyon açısından kendine özgü bir modeli yansıttığı olabileceğini düşünmekteyiz.

Moleküler akrabalıklar yönünden karşılaştırılan türler arasında bulunan (Turan ve ark., 2021) *Iberochoondrostoma lusitanicum* ve *C. nasus* türleri arasında farklılık gösteren 28s rDNA prob sinyali 4'e kadar çıkabilmektedir. Ayrıca *C. nasus* için 5s rDNA probu 4 çift subtelo-akrosentrik kromozomların terminal bölgesinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerden birisi 18s rDNA bölgesi ile sintenik olduğu rapor edilmiştir (Pereira ve ark., 2012; Boroń ve ark., 2020). *T. fahirae*'nin majör rDNA bölgesinin bir çift heteromorfik submetasentrik kromozom üzerinde lokalize oluşu diğer kababurun balıklarından farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5s rDNA lokuslarının sayıca az olması da bu durumu desteklemektedir. *T. fahirae*'deki bir çift submetasentrik kromozom üzerindeki 5s rDNA lokusu ve 18s rDNA lokusunun sintenik durumunun da milyonlarca yıl önceki evrimsel sürecin hikayesi hakkında kanıt sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Bu kanıt bizim çalışmamızdan önce yapılan moleküler çalışmayla da ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre *T. fahirae*'ye için yapılan moleküler (mtDNA COI + Cytb) filogenetik çalışma sonucunda diğer kababurun gruplarının yüksek genetik uzaklık ile ayrıldığını göstermiştir (Turan ve ark., 2021).

Moleküler teknikler balık sitotaksonomisinin aydınlatılması için oldukça önem arz etmektedir. Moleküler yöntemler ile türe özgü markerların elde edilmesinde kullanılabilirler. Klasik sitogenetik yöntemlerin ve moleküler tekniklerin kapsamlı kullanımı ile balık taksonomisindeki sonuçlarda kesinlik seviyesi artmaktadır (Kirtiklis ve ark., 2010; Gornung, 2013).

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda majör rDNA (45s) ve minör rDNA (5s) lokuslarının dışında bunlara benzer küçük nükleer RNA (snRNA) genlerinin de sitotaksonomik bir belirteç olarak U2 snDNA problemlerinin de kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca şuan U1 snDNA probu spriniform olmayan bazı balık türlerinin kromozomları

üzerinde haritalanmıştır (Sember ve ark., 2020b). Sipriniformlar içerisinde yer alan Botiidae familyasının bazı türlerinde U2 snDNA lokuslarını görselleştiren tek bir çalışma mevcuttur (Sember ve ark., 2018b). U1 snDNA probu kullanılarak yapılan ilk çalışma *H. molitrix* ve *H. nobilis* türleri için yapılmıştır. Bu çalışmaya göre U1 snDNA lokusu ve U2 snDNA lokusu aynı kromozom üzerinde birbirlerine bitişik olarak gözlemlenmiştir (Sember ve ark., 2020b). *T. fahirae* için ilk defa bu çalışmada görselleştirilen U1 snDNA lokusu ve U2 snDNA lokusu *Hypophthalmichthys* türlerinden farklı olarak kromozom seti içerisindeki en büyük subtelosentrik kromozoma yakın ikinci en büyük subtelosentrik kromozomun *p*-kolu üzerinde birbirlerine bitişik olarak gözlemlenmiştir. Hem *Hypophthalmichthys* türlerinde (Sember ve ark., 2020b) hem de Botiid’lerde tek bir U2 snDNA sinyali (Sember ve ark., 2018b) benzer veya aynı model olarak kabul edilmektedir. *T. fahirae*’deki U1 snDNA lokusu ve U2 snDNA lokusu kababurun balıkları için yapılacak çalışmalarda benzerlik veya farklılığı rehber niteliğindeki bu çalışmamız referans alınarak yapılacak diğer çalışmalarla ortaya konacaktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmadaki sonuçlar şu şekilde özetlenebilir.

T. fahirae lokal endemik bir türdür. *T. fahirae*'nin hem moleküler sitogenetik özellikleri hem de klasik sitogenetik özellikleri ilk defa bu çalışmayla ortaya konmuştur. Leuciscidae familyasının diğer türlerinde olduğu gibi *T. fahirae* için de diploid kromozom sayısı $2n=50$ olarak bulunmuştur. Kromozom setindeki iki kollu kromozomlar sayıca fazlalık göstermiştir. Bir çift submetasentrik kromozomun homologunu oluşturan kromozomlardan birisi uzun bir sekonder boğuma sahipken homologu oluşturan diğer kromozom daha kısa bir ikincil boğuma sahip olduğu gözlemlenmiştir. C bantlar kromozomların sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde lokalize olduğu izlenmiştir. Bir çift akrosentrik kromozomun telomer bölgesinde C-heterokromatin bölge gözlemlenmiştir. İkincil boğuma sahip submetasentrik kromozomda C-heterokromatinin ikincil boğumdan başlayarak sentromer arasında kalan perisentromerik alanın bütününde varlığı gözlenmiştir. AgNOR boyama ile 1 çift submetasentrik kromozom üzerinde NOR tespit edilmiştir. NOR'lar sekonder boğuma sahip kromozom çiftinde gözlemlenirken aynı lokalizasyonda CMA₃ boyama ile pozitif sinyal alınmıştır. Moleküler sitogenetik sonuçlarında ise sekonder boğuma sahip kromozom çiftindeki NOR bölgesiyle ilişkili 18S rDNA prob sinyali izlenmiştir. 5S rDNA prob sinyalleri 3 çift kromozom üzerinde gözlemlenirken 1 çiftin 18 rDNA prob sinyali ile sentenik olduğu tespit edilmiştir. U1-U2 snDNA prob sinyalleri tek bir kromozom üzerinde ko-lokalize biçimde gözlemlenmiştir. Telomer problemleriyle izlenen metafazlarda yeniden bir kromozomal düzenleme ile karşılaşılmayarak telomer problemleri tüm kromozomların telomer bölgelerinde gözlenmiştir.

5.2. Öneriler

T. fahirae tek cinsin tek türü olması sebebiyle moleküler filogenetik analizlerinin karşılaştırıldığı cinslerle sitogenetik sonuçların karşılaştırılması sağlıklı olacaktır. Ancak literatür araştırma verileri dikkate alındığında *Chondrostoma* türleriyle alakalı sitogenetik çalışmaların kısıtlılığı söz konusudur. Hem klasik sitogenetik yöntemlerle hem de moleküler sitogenetik yöntemlerle kromozom haritalarının oluşturulması balık

karyosistematiki için faydalı olacaktır. Özellikle lkemizde balıklar için yapılan moleküler sitogenetik çalışmalar güncel literatürde mevcut değildir. Bu alışma ülkemizde balıklar için yapılan ilk moleküler sitogenetik çalışma olması sebebiyle yakın akraba balıklar için rehber niteliğindedir. Ancak Dünya’da da bazı taksonomik karakter sayılabilecek bölgeler için moleküler problemlerin kullanımı balıklarda yapılan çalışmalarda sınırlıdır. Ayrıntılı sitogenetik çalışmalar söz konusu cinsler için literatüre kazandırıldığında daha iyi bir karşılaştırma yapılabilecektir. *T. fahirae* için cinsiyet kromozomlarının tayini yapılamamıştır. Moleküler sitogenetik yöntemlerden olan CGH tekniği ile cinsiyet kromozomları tayin edilerek literatüre kazandırılabilir.



KAYNAKLAR

- Achi, M. V., Ravindranath, N. ve Dym, M., 2000, Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity, *Biology of reproduction*, 63 (2), 591-598.
- Altınordu, F., Peruzzi, L., Yu, Y. ve He, X., 2016, A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType, *Taxon*, 65 (3), 586-592.
- Alvarez, M., Otis, J., Amores, A. ve Guise, K., 1991, Short -term cell culture for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish, *Journal of Fish Biology*, 39 (6), 817-824.
- Arai, R., 2011, Fish karyotypes: a check list, Springer Science & Business Media, p.
- Arsham, M. S., Barch, M. J. ve Lawce, H. J., 2017, The AGT cytogenetics laboratory manual, John Wiley & Sons, p.
- Arslan, A. ve Arslan, E., 2007, Karyosistematik de C-bantlama (Konstitütif heterokromatin)'nin önemi, *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 2 (29), 121-126.
- Arslan, A. ve Gündoğdu, H., 2016, Cytogenetic studies on the endemic Beyşehir nase, *Chondrostoma beysehirense* (Bogutskaya, 1997) in Turkey, *Caryologia*, 69 (2), 116-120.
- Ayata, M. K., Yüksel, E. ve Gaffaroğlu, M., 2016, Cytogenetic studies on six species of the leuciscine genus *Pseudophoxinus* Bleeker, 1860 (Teleostei, Cyprinidae), *Caryologia*, 69 (3), 215-222.
- Ayata, M. K., Unal, S. ve Gaffaroglu, M., 2018, Chromosomal analysis of *Oxyinoemacheilus atili* Erkakan, 2012 (Teleostei, Nemacheilidae), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18 (8), 991-994.
- Ayata, M. K., 2020, Chromomycin A3 and DAPI staining of chromosomes of three endemic *Pseudophoxinus* Bleeker, 1860 (Teleostei: Leuciscidae) species from Anatolia, *Acta Aquatica Turcica*, 16 (2), 283-289.
- Balajee, A. S. ve Hande, M. P., 2018, History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 836 (Pt A), 3-12.
- Baliček, P., Žižka, J. ve Skalská, H., 1977, Length of human constitutive heterochromatin in relation to chromosomal contraction, *Human genetics*, 38, 189-193.
- Barcia, J. J., 2007, The Giemsa stain: its history and applications, *International journal of surgical pathology*, 15 (3), 292-296.
- Battalgil, F., 1940, Yeni bir Cyprinid nev'i, *İstanbul Üniv. Fen Fak. Mec., Serie B*, 5, 74-77.
- Battalgil, F., 1944, Türkiye'de yeni tatlı su balıkları, *İÜ Fen Fak. Mec*, 9, 126-133.
- Bauman, J., Wiegant, J., Borst, P. ve Van Duijn, P., 1980, A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA, *Experimental cell research*, 128 (2), 485-490.
- Bauman, J., Wiegant, J. ve Van Duijn, P., 1981, Cytochemical hybridization with fluorochrome-labeled RNA. II. Applications, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29 (2), 238-246.
- Berberović, L., Hadžiselimović, R. ve Sofradžija, A., 1970, Hromosomske garniture podbale *Chondrostoma phoxinus* Heck. i plotice (*Rutilus rubilio* Bon), *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 25 (2), 40-42.

- Bogutskaya, N., 1992, A revision of species of the genus *Pseudophoxinus* (Leuciscinae, Cyprinidae) from Asia Minor, *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*, 89, 261-290.
- Bogutskaya, N., Küçük, F. ve Atalay, M., 2006a, A description of three new species of the genus *Pseudophoxinus* from Turkey (Teleostei: Cyprinidae: Leuciscinae).
- Bogutskaya, N., Küçük, F. ve Atalay, M., 2006b, A description of three new species of the genus *Pseudophoxinus* from Turkey (Teleostei: Cyprinidae: Leuciscinae), *Zoosystematica Rossica*, 15 (2), 335-341.
- Bonner, J., 1979, Properties and composition of isolated chromatin, In: *Chromatin Structure and Function: Molecular and Cellular Biophysical Methods*, Eds: Springer, p. 3-13.
- Boron, A., Porycka, K., Ito, D., Abe, S. ve Kirtiklis, L., 2009, Comparative molecular cytogenetic analysis of three *Leuciscus* species (Pisces, Cyprinidae) using chromosome banding and FISH with rDNA, *Genetica*, 135, 199-207.
- Boroń, A., Grabowska, A., Spóz, A. ve Przybył, A., 2020, B chromosomes and cytogenetic characteristics of the common nase *Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758), *Genes*, 11 (11), 1317.
- Broker, T. R., Angerer, L. M., Yen, P. H., Hershey, N. D. ve Davidson, N., 1978, Electron microscopic visualization of tRNA genes with ferritin-avidin: biotin labels, *Nucleic acids research*, 5 (2), 363-384.
- Cabral-de-Mello, D. C., Valente, G., Nakajima, R. ve Martins, C., 2012, Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*, *Chromosome research*, 20, 279-292.
- Cataudella, S., Sola, L., Accame Muratori, R. ve Capanna, E., 1977, The chromosomes of 11 species of Cyprinidae and one Cobitidae from Italy, with some remarks on the problem of polyploidy in the Cypriniformes, *Genetica*, 47 (3), 161-171.
- Chakrabarty, P., 2011, Fish Karyotypes: A Checklist, *Ichthyology & Herpetology* (4), 613.
- Cheung, S. W., Tishler, P. V., Atkins, L., Sengupta, S. K., Modest, E. J. ve Forget, B. G., 1977, Gene mapping by fluorescent in situ hybridization, *Cell Biology International Reports*, 1 (3), 255-262.
- Chowdhury, M. R., Singh, A. ve Dubey, S., 2020, Role of cytogenetics and molecular genetics in human health and medicine, In: *Animal biotechnology*, Eds: Elsevier, p. 481-501.
- Cioffi, M. d. B. ve Bertollo, L., 2012, Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish, *Repetitive DNA*, 7, 197-221.
- Coad, B., 2005, Endemicity in the freshwater fishes of Iran, *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 1 (1), 1-13.
- Coad, P. B. B. W., 1991, Cyprinids of Eurasia, *Cyprinid Fishes Systematics, biology and exploitation*, 127-118.
- Collares-Pereira, M., 1992, In vivo direct chromosome preparation (protocol for air drying technique), *First International Workshop on Fish Cytogenetic Techniques*, 14-24.
- Collares-Pereira, M. J. ve Ráb, P., 1999, NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae)—re-examination by FISH, *Genetica*, 105, 301-303.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E., Sakızlı, M. ve Atabey, N., 2006, Hücre: moleküler yaklaşım, İzmir Tıp Kitabevi, p.

- Çiçek, E., Sungur, S., Fricke, R. ve Seçer, B., 2023, Freshwater lampreys and fishes of Türkiye; an annotated checklist, 2023, *Turkish Journal of Zoology*, 47 (6), 324-468.
- Dai, Y. ve Han, H., 2018, Karyological analysis of two species in the subfamily Schizothoracinae (Cypriniformes: Cyprinidae) from China, with notes on karyotype evolution in Schizothoracinae, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18 (1), 175-186.
- Dann, O., Bergen, G., Demant, E. ve Volz, G., 1971, Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-Indazoles, *Annalen der Chemie*, 749 (1), 68-89.
- de Oliveira, E. A., Bertollo, L. A. C., Rab, P., Ezaz, T., Yano, C. F., Hatanaka, T., Jegede, O. I., Tanomtong, A., Liehr, T. ve Sember, A., 2019, Cytogenetics, genomics and biodiversity of the South American and African Arapaimidae fish family (Teleostei, Osteoglossiformes), *PLoS One*, 14 (3), e0214225.
- Denton, T. E., 1973, Fish chromosome methodology, (No Title).
- Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Montanaro, L., Sirri, V. ve Ochs, R. L., 1998, Nucleolar function and size in cancer cells, *The American journal of pathology*, 152 (5), 1291.
- Disbrey, B. D. ve Rack, J. H., 1970, Histological laboratory methods, (No Title).
- Doadrio, I. ve Carmona, J. A., 2004, Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences, *Molecular phylogenetics and evolution*, 33 (3), 802-815.
- Dolan, M., 2011, The role of the Giemsa stain in cytogenetics, *Biotechnic & Histochemistry*, 86 (2), 94-97.
- Doori, A. S. J. ve Arslan, A., 2024, Karyological analysis of endemic *Pseudophoxinus anatolicus* (Hankó 1925) in Türkiye, *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41 (1), 26-29.
- Drouin, G. ve De Sa, M. M., 1995, The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families, *Molecular Biology and Evolution*, 12 (3), 481-493.
- Dutrillaux, B., 1973, Application to the normal karyotype of R-band and G-band techniques involving proteolytic digestion, *Nobel Symp*, 38-42.
- Egozcue, J., 1971, Técnicas en citogenética, Editorial Espaxs, p.
- Emiroğlu, Ü. ve Bürün, B., 2020, Kromozomlar: temel kavramlar ve mekanizmalar, Hiperlink, p.
- Ergene, S., Karahan, A. ve Kuru, M., 2010, Cytogenetic analysis of *Pseudophoxinus antalyae*, Boguskaya, 1992 (Pisces: Cyprinidae) from the eastern Mediterranean river basin, Turkey, *Turkish Journal of Zoology*, 34 (1), 111-117.
- Esmaili, H. R., Zareian, H., Gholamhosseini, A., Ebrahimi, M., Gholami, Z., Teimori, A. ve Ansari, T. H., 2010, Karyotype Analysis of the King Nase Fish, *Chondrostoma regium* (Heckel, 1843)(Actinopterygii: Cyprinidae) from Iran, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10 (4).
- Esmaili, H. R., Brian, W. C., MEHRABAN, H. R., Masoudi, M., KHAEFI, R., ABBASI, K., MOSTAFAVI, H. ve VATANDOUST, S., 2014, An updated checklist of fishes of the Caspian Sea basin of Iran with a note on their zoogeography, *Iranian journal of Ichthyology*, 1 (3), 152-184.
- Flemming, W., 1965, Contributions To The Knowledge Of The Cell And Its Vital Processes, *J Cell Biol*, 25 (1), 3-69.
- Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Chicca, M. ve Rossi, R., 2003, Chromosomal mapping of 18S 28S and 5S rRNA genes by two-colour

- fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species, *Genome*, 46 (3), 473-477.
- Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Bogutskaya, N. G., Pitra, C. ve Ludwig, A., 2006, Phylogenetic position of the Dalmatian genus *Phoxinellus* and description of the newly proposed genus *Delminichthys* (Teleostei: Cyprinidae), *Molecular phylogenetics and evolution*, 38 (2), 416-425.
- Gaffaroğlu, M. ve Yuksel, E., 2005, *Chalcalburnus mossulensis* Hekel, 1843 (Pisces: Cyprinidae)'in karyotipi, *Fýrat Üniv Fen ve Müh Bil Derg*, 17 (1), 144-120.
- Gaffaroğlu, M., 2003, Karakaya baraj gölünde yaşayan Cyprinidae familyasına ait bazı türlerin karyolojik analizleri.
- Gaffaroğlu, M., Ayata, M., Ünal, S. ve Yüksel, E., 2014, Chromosomal analysis of *Pseudophoxinus elizavetae* Bogutskaya, Kucuk and Atalay, 2007 (Teleostei, Cyprinidae) from Anatolia, *FABA2014: International Symposium on Fisheries and Aquatic Science*, 25-27.
- Gaffaroğlu, M., Ayata, M. K. ve Karakuş, S. Ü., 2022, Cytogenetic Characteristics of Two Species of the Genus *Pseudophoxinus* Bleeker, 1860 (Cypriniformes: Leuciscidae) from Anatolia, Turkey, *Acta Zoologica Bulgarica*, 74 (3).
- Gaygusuz, Ö., Özuluğ, M., Gaygusuz, Ç. G., Dorak, Z., Gülşah, S. ve SEREZLİ, E. E., 2021, In memory of Fahire Battalgazi; bringing back a fish collection to life, *Turkish Journal of Bioscience and Collections*, 5 (1), 12-21.
- Gayon, J., 2016, From Mendel to epigenetics: History of genetics, *C R Biol*, 339 (7-8), 225-230.
- Giemsa, G., 1907, Beitrag zur Färbung der Spirochäte pallida (Schaudinn) in Ausstrichpräparaten, *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 33 (17), 676-679.
- Gold, J. R., 1974, A fast and easy method for chromosome karyotyping in adult teleosts, *The progressive fish-culturist*, 36 (3), 169-171.
- Gold, J. R. ve Zoch, P. K., 1990, Intraspecific variation in chromosomal nucleolus organizer regions in *Notropis chrysocephalus* (Pisces: Cyprinidae), *The Southwestern Naturalist*, 35 (2), 211-215.
- Gornung, E., 2013, Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research, *Cytogenetic and Genome Research*, 141 (2-3), 90-102.
- Grossgebauer, K., Kegel, M. ve Dann, O., 1976, New fluorescent microscopical technique in diagnostic microbiology (author's transl), *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 101 (29), 1098-1099.
- Gülle, İ., Küçük, F., İnnal, D. ve Güçlü, S. S., 2016, Burdur İli Balıkları: Biyoçeşitlilik Envanteri, Popülasyon ve Habitat Durumları, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (Ek (Suppl.) 1), 232-239.
- Hajduk, S., 1976, Demonstration of kinetoplast DNA in dyskinetoplastic strains of, *Trypanosoma equiperdum*.
- Heitz, E., 1931, Die ursache der gesetzmässigen zahl, lage, form und grösse pflanzlicher nukleolen, *Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie. Abteilung E. Planta*, 12 (4), 775-844.
- Henikoff, S., Ahmad, K. ve Malik, H. S., 2001, The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA, *Science*, 293 (5532), 1098-1102.
- Howell, W. t. ve Black, D., 1980, Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method, *experientia*, 36 (8), 1014-1015.

- Höltke, H.-J. ve Kessler, C., 1990, Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection, *Nucleic acids research*, 18 (19), 5843-5851.
- Huang, Z., Petty, J. T., O'Quinn, B., Longmire, J. L., Brown, N. C., Jett, J. H. ve Keller, R. A., 1996, Large DNA fragment sizing by flow cytometry: application to the characterization of P1 artificial chromosome (PAC) clones, *Nucleic acids research*, 24 (21), 4202-4209.
- Hughes, J. M., Schmidt, D. J. ve Finn, D. S., 2009, Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat, *BioScience*, 59 (7), 573-583.
- Huisinga, K. L., Brower-Toland, B. ve Elgin, S. C., 2006, The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing, *Chromosoma*, 115, 110-122.
- IUCN, S., 2020, The IUCN red list of threatened species.
- Jagielski, M., Zaleska, M., Kaluzewski, S. ve Polna, I., 1976, Applicability of DAPI for the detection of Mycoplasmas in cell cultures, *Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia*, 28 (2), 161-173.
- Kalous, L., DoaDrlo, I., Rabova, M. ve Rab, P., 2008, Note on the karyotype and NOR phenotype of the cyprinid fish *Parachondrostoma arrigonis*, *Cybum*, 32 (3), 211-215.
- Kannan, T. P. ve Zilfalil, B. A., 2009, Cytogenetics: past, present and future, *Malays J Med Sci*, 16 (2), 4-9.
- Karasu, M., 2009, *Pseudophoxinus firati* (Pisces: Cyprinidae)'nin karyotip özellikleri, *Yüksek Lisans Tezi*. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
- Karasu, M., Yüksel, E. ve Gaffaroğlu, M., 2011, Karyotype, NORs, and C-banding analysis of *Pseudophoxinus firati* Bogutskaya, Küçük & Atalay, 2007 (Actinopterygii, Cyprinidae) in the Euphrates River, Turkey, *Turkish Journal of Zoology*, 35 (6), 865-868.
- Kirtiklis, L., Porycka, K., Boroń, A., Coutanceau, J.-P. ve Dettai, A., 2010, Use of the chromosomal co-location of the minor 5S and the major 28S rDNA as a cytogenetic marker within the genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae), *Folia biologica (Kraków)*, 58 (3-4), 245-249.
- Kunkel, T. A., 2004, DNA replication fidelity, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (17), 16895-16898.
- Kurtuluş, A. ve Bozcuk, A. N., 2002, Telomer ve Hücresel Yaşlanma, *Turkish Journal Of Geriatrics. Geriatri*, 5 (3), 111-114.
- Küçük, F. n., Çiftçi, Y., Güçlü, S. m. S., Mutlu, A. G. ve Turan, D., 2023, Taxonomic review of the *Chondrostoma* (Teleostei, Leuciscidae) species from inland waters of Turkey: an integrative approach, *Zoosystematics and Evolution*, 99 (1), 1-13.
- Langer-Safer, P. R., Levine, M. ve Ward, D. C., 1982, Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (14), 4381-4385.
- Levan, A., Fredga, K. ve Sandberg, A. A., 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes.
- Levene, P. A. ve Bass, L. W., 1931, Nucleic acids, Chemical Catalog Company New York, p.
- Libertini, A., Sola, L., Rampin, M., Rossi, A. R., Iijima, K. ve Ueda, T., 2008, Classical and molecular cytogenetic characterization of allochthonous European bitterling *Rhodeus amarus* (Cyprinidae, Acheilognathinae) from Northern Italy, *Genes & genetic systems*, 83 (5), 417-422.

- Lin, M. ve Alfi, O., 1976, Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence, *Chromosoma*, 57 (3), 219-225.
- Macgregor, H. C., 1988, Working with animal chromosomes, (*No Title*).
- Mayr, B., Ráb, P. ve Kalat, M., 1985, Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae), *Genetica*, 67, 51-56.
- Mazzei, F., Ghigliotti, L., Bonillo, C., Coutanceau, J., Ozouf-Costaz, C. ve Pisano, E., 2004, Chromosomal patterns of major and 5S ribosomal DNA in six icefish species (Perciformes, Notothenioidei, Channichthyidae), *Polar Biology*, 28, 47-55.
- McClintock, B., 1934, The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 21, 294-326.
- Meselson, M. ve Stahl, F. W., 1958, The replication of DNA, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 9-12.
- Moore, C. M. ve Best, R. G., 2001, Chromosome preparation and banding, *e LS*.
- Naran, D., 1997, Cytogenetic studies of *Pseudobarbus* and selected *Barbus* (Pisces: Cyprinidae) of southern Africa.
- Nelson, J. S., Grande, T. C. ve Wilson, M. V. H., 2016, Fishes of the World, 1-2.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F. ve Tunçbilek, E., 2005, Thompson & Thompson tıbbi genetik, Güneş Kitabevi, p.
- Ojima, Y., 1983, Methods in fish cytogenetics.
- Özdemir, K., Muranlı, F. G. ve Kanev, M., 2015, In situ Hibridizasyon Yöntemleri, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3 (2), 613-621.
- Page, L. M. ve Burr, B. M., 2011, Peterson field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico, Houghton Mifflin Harcourt, p.
- Pekol, S., 1999, Comparative NORs and karyotype analysis of *Cyprinus carpio* (L., 1758) and *Leuciscus cephalus* (L., 1758) populations from Kastamonu Beyler and Germeçtepe Dam Lake, *PhD, University of Gazi, Ankara, Turkey*.
- Pereira, C., Neto, A. ve Collares-Pereira, M. J., 2009, Cytogenetic survey of species of two distinct genera of Iberian nases (Cyprinidae, Leuciscinae) that hybridize extensively in nature. I. Evidence of a similar and conserved chromosome pattern with some few species-specific markers at macro-structural level, *Genetica*, 137, 285-291.
- Pereira, C. S. A., Ráb, P. ve Collares-Pereira, M. J., 2012, Chromosomes of European cyprinid fishes: comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNAs in nine Iberian chondrostomine species (Leuciscinae), *Genetica*, 140, 485-495.
- Ráb, P., 1995, Chromosomes of European cyprinid fishes (Cyprinidae, Cypriniformes): a review, *Folia Zoologica*, 44, 193-214.
- Ráb, P., Jörg, B., Marie, R., Martin, F. ve Kalous, L., 2007, Fish Cytogenetics, 26-27.
- Ráb, P., Rábová, M., Pereira, C. S., Collares-Pereira, M. J. ve Pelikánová, Š., 2008, Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker—the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting, *Chromosome research*, 16, 863-873.
- Rábová, M., Völker, M., Pelikánová, Š. ve Ráb, P., 2015, Sequential chromosome banding in fishes, *Fish cytogenetic techniques, ray-fin fishes and chondrichthyans*, CRC Press, USA, 92-102.
- Reddy, P., John, G. ve Tiews, K., 1987, A method to increase mitotic metaphase spreads in permanent chromosome preparations for karyotype studies of fishes.

- Rivlin, K., Rachlin, J. ve Dale, G., 1985, A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding, *Journal of Fish Biology*, 26 (3), 267-272.
- Robalo, J. I., Almada, V. C., Levy, A. ve Doadrio, I., 2007, Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera, *Molecular phylogenetics and evolution*, 42 (2), 362-372.
- Rodrigues, E. ve Collares-Pereira, M. J., 1996, NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae), *Genetica*, 98, 59-63.
- Ron Fricke, W. E., Jon David Fong, 2024, Eschmeyer's Catalog of Fishes, *California Academy Of Sciences*.
- Rossi, A. R., Milana, V., Hett, A. K. ve Tancioni, L., 2012, Molecular cytogenetic analysis of the Appenine endemic cyprinid fish *Squalius lucumonis* and three other Italian leuciscines using chromosome banding and FISH with rDNA probes, *Genetica*, 140, 469-476.
- Rudkin, G. T. ve Stollar, B., 1977, High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence, *Nature*, 265 (5593), 472-473.
- Russell, W., Newman, C. ve Williamson, D., 1975, A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses, *Nature*, 253 (5491), 461-462.
- Schacherer, J., 2016, Beyond the simplicity of Mendelian inheritance, *C R Biol*, 339 (7-8), 284-288.
- Schönhuth, S., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L. ve Mayden, R. L., 2018, Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei), *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, 781-799.
- Schulz-Schaeffer, J., 1980, Gross Morphology of Chromosomes, *Cytogenetics: Plants, Animals, Humans*, 32-51.
- Schweizer, D., 1976a, DAPI fluorescence of plant chromosomes prestained with actinomycin D, *Experimental cell research*, 102 (2), 408-413.
- Schweizer, D., 1976b, Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI, *Chromosoma*, 58 (4), 307-324.
- Schweizer, D. ve Nagl, W., 1976, Heterochromatin diversity in *Cymbidium*, and its relationship to differential DNA replication, *Experimental cell research*, 98 (2), 411-423.
- Schweizer, D., Ambros, P. ve Andrlé, M., 1978, Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, distamycin A, *Experimental cell research*, 111 (2), 327-332.
- Schweizer, D., Ambros, P., Andrlé, M., Rett, A. ve Fiedler, W., 1979, Demonstration of specific heterochromatic segments in the orangutan (*Pongo pygmaeus*) by a distamycin/DAPI double staining technique, *Cytogenetic and Genome Research*, 24 (1), 7-14.
- Sember, A., Bohlen, J., Šlechtová, V., Altmanova, M., Symonova, R. ve Rab, P., 2015, Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation, *BMC Evolutionary Biology*, 15, 1-22.
- Sember, A., Bertollo, L. A., Ráb, P., Yano, C. F., Hatanaka, T., De Oliveira, E. A. ve Cioffi, M. d. B., 2018a, Sex chromosome evolution and genomic divergence in

- the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae), *Frontiers in genetics*, 9, 71.
- Sember, A., Bohlen, J., Šlechtová, V., Altmanová, M., Pelikánová, Š. ve Rab, P., 2018b, Dynamics of tandemly repeated DNA sequences during evolution of diploid and tetraploid botiid loaches (Teleostei: Cobitoidea: Botiidae), *PLoS One*, 13 (3), e0195054.
- Sember, A., de Oliveira, E. A., Ráb, P., Bertollo, L. A. C., de Freitas, N. L., Viana, P. F., Yano, C. F., Hatanaka, T., Marinho, M. M. F. ve de Moraes, R. L. R., 2020a, Centric fusions behind the karyotype evolution of neotropical *nannostomus pencilfishes* (characiforme, lebiasinidae): First insights from a molecular cytogenetic perspective, *Genes*, 11 (1), 91.
- Sember, A., Pelikánová, Š., de Bello Cioffi, M., Šlechtová, V., Hatanaka, T., Do Doan, H., Knytl, M. ve Ráb, P., 2020b, Taxonomic diversity not associated with gross karyotype differentiation: The case of bighead carps, Genus *Hypophthalmichthys* (Teleostei, Cypriniformes, Xenocyprididae), *Genes*, 11 (5), 479.
- Sember, A., Nguyen, P., Perez, M. F., Altmanová, M., Ráb, P. ve Cioffi, M. d. B., 2021, Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376 (1833), 20200098.
- Shay, J., Werbin, H. ve Wright, W., 1996, Telomeres and telomerase in human leukemias, *Leukemia*, 10 (8), 1255-1261.
- Singh, M., Kumar, R., Nagpure, N., Kushwaha, B., Gond, I. ve Lakra, W., 2009, Chromosomal localization of 18S and 5S rDNA using FISH in the genus *Tor* (Pisces, Cyprinidae), *Genetica*, 137, 245-252.
- Sochorová, J., Garcia, S., Gálvez, F., Symonová, R. ve Kovařík, A., 2018, Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database, *Chromosoma*, 127, 141-150.
- Sodja, A. ve Davidson, N., 1978, Gene mapping and gene enrichment by the avidin-biotin interaction: use of cytochrome-c as a polyamine bridge, *Nucleic acids research*, 5 (2), 385-401.
- Sola, L., Rossi, A. R., Iaselli, V., Rasch, E. ve Monaco, P., 1992, Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*: II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining, *Cytogenetic and Genome Research*, 60 (3-4), 229-235.
- Sperling, K., Kalscheuer, V. ve Neitzel, H., 1987, Transcriptional activity of constitutive heterochromatin in the mammal *Microtus agrestis* (Rodentia, Cricetidae), *Experimental cell research*, 173 (2), 463-472.
- Štundlová, J., Hospodářská, M., Lukšíková, K., Voleníková, A., Pavlica, T., Altmanová, M., Richter, A., Reichard, M., Dalíková, M. ve Pelikánová, Š., 2022, Sex chromosome differentiation via changes in the Y chromosome repeat landscape in African annual killifishes *Nothobranchius furzeri* and *N. kadlecii*, *Chromosome research*, 30 (4), 309-333.
- Sumner, A., 1972, A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin, *Experimental cell research*, 75 (1), 304-306.
- Symonová, R., Majtánová, Z., Sember, A., Staaks, G. B., Bohlen, J., Freyhof, J., Rábová, M. ve Ráb, P., 2013, Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated

- retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications, *BMC Evolutionary Biology*, 13, 1-11.
- Talbert, P. B., Masuelli, R., Tyagi, A. P., Comai, L. ve Henikoff, S., 2002, Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant, *The Plant Cell*, 14 (5), 1053-1066.
- Traldi, J. B., Vicari, M. R., Martinez, J. d. F., Blanco, D. R., Lui, R. L. ve Moreira-Filho, O., 2016, Chromosome analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisii* (Characiformes, Parodontidae): an extensive chromosomal polymorphism of 45S and 5S ribosomal DNAs, *Zebrafish*, 13 (1), 19-25.
- Turan, D., Küçük, F., Güçlü, S. S. ve Aksu, I., 2021, *Turcichondrostoma*, a new genus for the Leuciscidae (Teleostei: Cypriniformes) from Southwestern Anatolia, *Journal of Fish Biology*, 99 (6), 1968-1977.
- Unal, S., Gaffaroğlu, M., Ayata, M. K. ve Yüksel, E., 2014, Karyotype, C-banding and AgNORs of two endemic leuciscine fish, *Pseudophoxinus crassus* (Ladiges, 1960) and *P. hittitorum* Freyhof & Özulug, 2010 (Teleostei, Cyprinidae), *Comparative Cytogenetics*, 8 (4), 249.
- Unal, S. ve Gaffaroğlu, M., 2016, Karyology of six cyprinid fishes from Seyhan and Ceyhan rivers in Anatolia, *Caryologia*, 69 (4), 362-369.
- Van Dilla, M., Langlois, R., Pinkel, D., Yajko, D. ve Hadley, W., 1983, Bacterial characterization by flow cytometry, *Science*, 220 (4597), 620-622.
- Varley, J. M., Macgregor, H. C., Nardi, I., Andrews, C. ve Erba, H. P., 1980, Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus* carnifex, *Chromosoma*, 80, 289-307.
- Warner, J. R., 1979, Distribution of newly formed ribosomal proteins in HeLa cell fractions, *The Journal of cell biology*, 80 (3), 767-772.
- Williamson, D. ve Fennell, D., 1975, The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA, In: *Methods in cell biology*, Eds: Elsevier, p. 335-351.
- Wong, J. M. ve Collins, K., 2003, Telomere maintenance and disease, *The Lancet*, 362 (9388), 983-988.
- Woodcock, C. L., 2006, Chromatin architecture, *Current opinion in structural biology*, 16 (2), 213-220.
- Woodcock, C. L. ve Ghosh, R. P., 2010, Chromatin higher-order structure and dynamics, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2 (5), a000596.
- Yamaç, B. ve Şişman, T., 2023, Karyotypic analysis of *Chondrostoma regium* (Teleostei: Leuciscidae) distributed in the Karasu River (Erzurum), *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40 (1), 62-68.
- Yoshio, O., Shinya, H. ve Sajiro, M., 1966, Cytogenetic Studies in Lower Vertebrates. I, 42 (1), 62-66.
- Ziemniczak, K., Barros, A., Rosa, K., Nogaroto, V., Almeida, M., Cestari, M., Moreira-Filho, O., Artoni, R. ve Vicari, M., 2012, Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae, *Italian Journal of Zoology*, 79 (4), 492-501.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Güldane GÖZEN TAVŞAN
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

EĞİTİM

Derece		Bitirme Yılı
Lise	: Açık Öğretim Lisesi / KONYA	2016
Üniversite	: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm / BİLECİK	2021
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2024

