



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

**DOĞU AKDENİZ'DEKİ *CARANX* (CARANGİDAE) CİNSİNE AİT TÜRLERİN
MOLEKÜLER FİLOGENETİĞİ**

MEVLÜT GÜRLEK

DOKTORA TEZİ

Antakya/HATAY
Eylül-2012

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞU AKDENİZ'DEKİ *CARANX* (CARANGİDAE) CİNSİNE AİT
TÜRLERİN MOLEKÜLER FİLOGENETİĞİ

Mevlüt GÜRLEK

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Prof.Dr. Cemal TURAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 20/09/2012 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof.Dr. Cemal TURAN
Başkan


Doç.Dr. Mehmet GÖKOĞLU
Üye


Doç.Dr. Ahmet BOZKURT
Üye


Doç.Dr. Deniz ERGÜDEN
Üye


Yrd.Doç.Dr. Deniz YAĞLIOĞLU
Üye

Bu tez Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma M.K.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 1004D0101

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5486 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Caranx</i> Cinsinin Biyo-Ekolojik özellikleri	3
1.2. <i>Caranx</i> Cinsine Ait Türlerin Dağılım Alanları.....	3
1.3 Türleşme.....	4
1.4 Filogenetik.....	5
1.5 Filogenetikte Kullanılan Morfolojik Tekniklerin Önemi....	6
1.6 Tür Tespitinde Kullanılan Genetik Teknikler.....	6
1.7 Moleküler Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Genetik Teknikler....	7
1.7.1 Mitokondrial DNA.....	9
1.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	11
1.7. 3 DNA Dizileme Metodu (Sequencing).....	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	14
3. MATERYAL VE METOD.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. <i>Caranx</i> Türlerinin Sistemattikte Yeri.....	17
3.1.2. <i>Caranx</i> Türlerinin Tayin Edilmesi ve Tayin Anahtarı.....	18
3.1.3. <i>Caranx</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	19
3.1.3.1. Türlerin Morfolojik Özellikleri.....	19
3.1.3.1.1. <i>Caranx crysos</i>	19
3.1.3.1.2. <i>Caranx hippos</i>	20
3.1.3.1.3. <i>Caranx rhoncus</i>	20
3.1.4. Örneklerin Toplanması ve Örnekleme Alanları.....	21
3.1.5. Laboratuar İşlemlerinde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	22
3.1.5.1. Morfolojik Ölçümlerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	22
3.1.5.2. Genetik Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler.....	22
3.2. Yöntem.....	23

3.2.1. Örneklerin Muhafazası ve Tespiti.....	23
3.2.2. Kullanılan Meristik Karakterler.....	23
3.2.3. Morfolojik Çalışma Yöntemleri.....	23
3.2.3.1. Truss Network Ölçümleri.....	23
3.2.3.2 Morfolojik Verilerin Çok Değişkenli Analizi.....	24
3.2.4 Morfolojik Verilerin İstatistiki Analizi.....	24
3.2.5. Genetik İnceleme.....	25
3.2.5.1. Uygulanan Genetik Teknikler.....	25
3.2.5.1.1. Mitokondri DNA'nın Ekstrakte Edilmesi.....	25
3.2.5.1. 2. Agaroza Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektrophorezi.....	26
3.2.3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle D loop Genlerinin Çoğaltılması.....	26
3.2.3.1.4. Dizileme Analizi.....	27
3.2.5.1.4.1. Otomatik DNA Dizi Analizi.....	27
3.2.5.1.4.1. 1. Genetik Analizatorü Çalışma Programı.....	28
3.2.5.1.5. Filogenetik Ağaç	29
3.2.5.1.5.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler	30
3.2.5.1.5.1.1 Karakter Temelli Yöntemler.....	30
3.2.5.1.5.1.1.1 MP (Maximum Parsimony) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi.....	30
3.2.5.1.5.1.1.2. ML (Maximum Likelihood) En Yüksek İhtimal Metodu.....	31
3.2.5.1.5.1.1.3. Bayes Metodu.....	31
3.2.5.1.5.1.2. Mesafe Temelli Yöntemler.....	31
3.2.5.1.5.1.2.1. UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu.....	32
3.2.5.1.5.1.2.2. Neighbour Joining Komşu Birleştirme Metodu ...	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Bulgular.....	33
4.1.1. Morfolojik Bulgular.....	33
4.1.2. Genetik Bulgular.....	40
4.1.2.1. Toplam DNA'nın Elde Edilmesi.....	40
4.1.2.2. PZR Elde Edilmesi.....	41
4.1.2.3. D loop Bölgesinin DNA Dizilimlerinin Belirlenmesi.....	41

4.1.2.4 Dizileme ve Dizi Analizi.....	42
4.1.2.5 Filogenetik Analiz.....	42
4.1.2.5.1. <i>Caranx</i> Türleri İle Trachurus Türlerinin İlişkilendirilmesi.	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
TEŞEKKÜR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ÖZET

DOĞU AKDENİZ'DEKİ *CARANX* (CARANGIDAE) CİNSİNE AİT TÜRLERİN MOLEKÜLER FİLOGENETİĞİ

Bu çalışmada Türkiye denizlerinde bulunan ve tral olarak bilinen *Caranx* cinsine ait *Caranx crysos*, *Caranx rhoncus* ve *Caranx hippos* türlerinin morfolojik ve genetik yapısı, türler arasındaki filogenetik ilişkinin şeklinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Moleküler filogenetik analizde mitokondriyal D-loop geninin nükleotid dizi analizi kullanılmış ve DNA dizinlerinin farklılığından elde edilen genetik farklılığın tespitinde Tamura 3 modeli kullanılmıştır. DNA dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid kompozisyonuna göre G-C oranı değerlerinin % 38.1-35.7 arasında değişkenlik gösterdiği saptanmış ve ortalama G-C oranı % 37.2 olarak belirlenmiştir. A-T oranı ise % 63.8 ile % 62 arasında değişkenlik göstermiş iken ortalama A-T oranı % 62.8 olarak bulunmuştur.

Türler arasındaki genetik uzaklık analizinde en yüksek nükleotid farklılığı *C. crysos* ve *C. hippos* arasında 0.461 ile gösterirken, *C. hippos* ve *C. rhoncus* türleri 0.148 ile birbirine daha yakın iki tür olarak gözlenmiştir. Türler arası net ortalama genetik uzaklık değeri 0.244 olarak hesaplanırken tür içi net ortalama genetik uzaklık değeri ise 0.485 olarak hesaplanmıştır. Transisyonel değişim oran analizinde A/G 9,83, T/C 9,83, C/T 16,64 ve G/A 16,64 olarak belirlenmiştir. Maximum likelihood metoduna göre D-loop dizileme analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde 2 ana dala ayrıldığı görülmektedir. Birinci ana dal *C. rhoncus* ve *C. hippos* türlerinden oluşurken, ikinci ana dal *C. crysos* türünden oluşmuştur.

Türler arasındaki morfolojik ilişkinin belirlenmesi amacı ile Truss metodu kullanılarak 36 farklı morfometrik karakter ve 12 meristik karakter kullanılmıştır. Ana bileşen analizi sonucu türlerin ayrımında morfolojik karakterlerin etkinlik derecesine göre, birinci ana bileşende ikinci dorsal yüzgeç uzunluğu, gözler arası mesafe, ikinci dorsal yüzgeç yumuşak ışın sayısı gibi yapıların ayırıcı etkili olduğu gözlemlenirken, ikinci ana bileşende ağırlıkça vücut yüksekliği ölçümleri ve lateral hattaki pul sayısının etkili olduğu dikkat çekmektedir. Türler arasındaki morfolojik ilişkinin Neighbour Joining soyağacı analizinde, *C. rhoncus* türünün *C. crysos* türüne daha yakın olduğu ve *C. hippos* türünün ise her iki türden de uzak olduğu gözlenmiştir.

Caranx cinsine ait 3 tür ile *Trachurus* cinsine ait 5 türün mtDNA D-loop bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik olarak karşılaştırılmaları sonucu her iki cinsin üyelerinin de sadece kendi içlerinde gruplanmalar gösterdiği gözlenmiştir. Bu analizde morfolojik olarak istavrit türleri ile karıştırılabilen *C. rhoncus* türünün *Trachurus* cinsi türlerine diğer *Caranx* türlerine göre daha yakın olduğu ve *T. mediterraneus* türünün *Trachurus* cinsine ait diğer türlerden açık bir şekilde farklı olduğu görülmektedir.

2012, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: Caranx, Filogenetik, DNA Dizileme, Morfoloji, mtDNA, Truss

ABSTRACT

**MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE GENUS *CARANX*
(CARANGIDAE) SPECIES IN THE NORTHEASTERN
MEDITERRANEAN SEA**

In this study, morphological and genetic structure, and phylogenetic relationship of species of *Caranx* genus, *Caranx crysos*, *Caranx hippos* and *Caranx rhoncus* in Turkey's seas were investigated.

Nucleotide sequence analysis of mitochondrial DNA D-loop gene was used for molecular phylogenetic analysis, and Tamura 3-parameter model was used in the determination of genetic differences. As a result of sequencing the nucleotide compositions obtained were varied between 38.1-35.7% for the ratio of G-C, and average ratio of G-C was 37.2%. The ratio of A-T showed variability between 62% to 63.8%, while the average A-T ratio was found to be 62.8%.

Genetic distance analysis showed that the highest nucleotide differences was observed between *C. crysos* and *C. hippos* species with a value of 0.461, and *C. hippos* and *C. rhoncus* species were observed to be closer to each other (0.148). The calculation of the value of average genetic distance between species and within species were calculated as 0.485 and 0.485 respectively. Analysis of the rate of change in transitional is determined as A / G 9.83, T / C 9.83, C / T 16.64 and G / A 16.64. Maximum likelihood sequence analysis of the D-loop created two main phylogenetic branches. The first main branch composed of *C. rhoncus* and *C. hippos*, and the second branch composed of *C. crysos*.

To determine the morphological relationship and differences among species 36 different morphometric character were determined with Truss method, and 12 meristic characters were used. In discriminant function analysis, the most discriminative characters for species identification were found to be as the second dorsal fin length, distance between eyes, and second dorsal fin soft rays in the first discriminant function. In the second discriminant function, body dept measurements and lateral line scale counts were the most discriminative characters for species identification. The morphological relationship between species with Neighbour Joining analysis showed that *C. rhoncus* and *C. crysos* species were closer to each other, and *C. hippos* was distinct and far from *C. rhoncus* and *C. crysos*.

Phylogenetic comparison of the 3 species of the genus *Caranx* and 5 species of the genus *Trachurus* with mtDNA D-loop sequences revealed that each genus was monophyletic. In this analysis *C. rhoncus*, which can easily be mis-identified with *Trachurus* species, was found to be closer to *Trachurus* genus. Moreover *T. mediterraneus* were clearly divergent from the other species of the genus *Trachurus*.

2012, 64 page

Key Word: Caranx, Phylogenetic, DNA Sequence, Morphology, mtDNA, Truss

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

bç	Baz Çifti
kb	kilo baz
g	Gram
mA	Mili Amper
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar

MtDNA	Mitokondrial DNA
D loop	Displacement loop
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TEMED	Tetrametiletildiamin
UPGMA	Tartılı Olmayan Çiftleştirilmiş Grup Metodu Aritmetik Ortalaması
V	Volt

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>Caranx</i> cinsine ait türlerin örnekleme bilgileri.....	21
Çizelge 4.1. Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre morfolojik karakterlerin etkinlik derecesine göre gösterilmesi.....	33
Çizelge 4.2. Türlerin ayrımında kullanılan meristik karakterler ve değerleri (minimum-maksimum/mod).....	35
Çizelge 4.3. Kümeler arası korelasyon analizi değerleri.....	36
Çizelge 4.4. Kümeler arası korelasyon analizi sonuçlarından birisi olan istatistik denetimi.....	36
Çizelge 4.5. Türlerin ayrımında kullanılan morfolojik karakterlerin ortalamaları ve standart sapmaları.....	38
Çizelge 4.6. Türler için nükleotid kompozisyonu (%)......	43
Çizelge 4.7. Nükleotid çifti frekansları	44
Çizelge 4.8. Substitüsyon matrisi.....	44
Çizelge 4.9. Türler içindeki ortalama genetik uzaklık.....	44
Çizelge 4.10. Genetik uzaklık matrisi.....	45
Çizelge 4.11. <i>Caranx</i> ve <i>Trachurus</i> türlerinin genetik uzaklık matrisi.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Balık mitokondrisinde (mtDNA) genlerin dizilimi.....	10
Şekil 3.1. <i>Caranx crysos</i> 'un genel görünüşü.....	19
Şekil 3.2. <i>Caranx hippos</i> 'un genel görünüşü.....	20
Şekil 3.3. <i>Caranx rhoncus</i> 'un genel görünüşü.....	21
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan PZR cihazının görünümü.....	22
Şekil 3.5. Truss Network Sistemine göre <i>Caranx</i> türleri üzerinde 14 noktadan alınan "Truss ölçümleri" ve oluşan ölçüm ağı.....	24
Şekil 4.1. Birinci (AB1) ve ikinci (AB2) korelasyonların grafiklendirilmesi sonucu türlerin morfolojik ilişkisi.....	37
Şekil 4.2. Türler arasındaki morfolojik ilişkinin Neighbour Joining soyağacı ile gösterimi.....	40
Şekil 4.3. Ekstrakte Edilen Total DNA'nın Agoraz Jel Üzerinde Kontrolü....	40
Şekil 4.4. Mt DNA D loop gen bölgesinin çoğaltılması.....	41
Şekil 4.5. DNA dizilim analizi sonucu elde edilen D loop gen bölgesinin fragment kromotografisinden bir örnek.....	41
Şekil 4.6. Maximum Likelihood metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç.....	46
Şekil 4.7. Neighbour Joining metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç.....	48
Şekil 4.8. Maximum Parsimony metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç.....	49
Şekil 4.9. Maximum Parsimony metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan <i>Trachurus</i> ve <i>Caranx</i> türleri için fiologenetik ağaç.....	52
Şekil 4.10. Maximum Likelihood metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan <i>Trachurus</i> ve <i>Caranx</i> türleri için fiologenetik ağaç.....	53
Şekil 4.11. Neighbour Joining metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan <i>Trachurus</i> ve <i>Caranx</i> türleri için fiologenetik ağaç.....	54

1. GİRİŞ

Carangidae familyası üyesi *Caranx* türleri ülkemiz balıkçılığı açısından ekonomik önem taşımaktadır (Akşiray, 1987; Turan ve ark., 2007). *Caranx* cinsine ait türler genellikle 2–3 yaşlarından itibaren olgunluk çağına girerler ve üremek için, beslendikleri bölgelerden daha sıcakça olan bölgelere doğru sürüler halinde toplanarak göç etmektedirler. Bu cinse ait türler genellikle Haziran, Temmuz, Ağustos aylarından Eylül ayı ortalarına kadar üremelerini sürdürmektedirler. *Caranx* türleri genel olarak karnivor olarak beslenmektedirler (Akşiray, 1987). Carangidae familyası üyesi *Caranx* cinsi dünya genelinde onsekiz türe (*Caranx bucculentus* Alleyne & Macleay, 1877, *Caranx caballus* Günther, 1868, *Caranx caninus* Günther, 1867, *Caranx crysos* (Mitchill, 1815), *Caranx fischeri* Smith-Vaniz & Carpenter, 2007, *Caranx heberi* (Bennett, 1830), *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766), *Caranx ignobilis* (Forsskål, 1775), *Caranx latus* Agassiz, 1831, *Caranx lugubris* Poey, 1860, *Caranx melampygus* Cuvier, 1833, *Caranx papuensis* Alleyne & Macleay, 1877, *Caranx rhonchus* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817, *Caranx sansun* (Forsskål, 1775), *Caranx senegallus* Cuvier, 1833, *Caranx sexfasciatus* Quoy & Gaimard, 1825, *Caranx tille* Cuvier, 1833, *Caranx vinctus* Jordan & Gilbert, 1882) temsil etmektedir. Türkiye kıyılarında *Caranx* cinsine ait 3 türün (*Caranx crysos* (Mitchill, 1815), *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766), *Caranx rhonchus* Geoffroy Saint-Hilaire) olduğu bildirilmektedir (Mater ve Meriç, 1996; Mater ve Bilecenoğlu, 1999; Turan ve ark., 2007). *Caranx crysos* türü ülkemizde tral, treyhun, istavrit bozması gibi yerel isimlerle adlandırılırken, *C. hippos* türü kral balığı, sarı treyhun veya sarı tral olarak adlandırılmaktadır. Halk arasında istavrite benzetilen *Caranx rhonchus* türü ise sarı istavrit veya benekli istavrit olarak isimlendirilmektedirler. Ülkemiz sularında bulunan *Caranx* türleri Atlantik kökenlidirler.

Caranx türlerinde büyüme oranı, vücut uzunluğu, ağırlığı, cinsi olgunluk zamanı, cinsi olgunluk yaşı, fekundite, yumurtlama zamanı gibi davranış karakterlerinde çevresel faktörlerin farklılığı veya baskısı sonucu oluşan ve genetik dayanağı olmayan değişim, türlerin fenotipik değişiklik gösterebileceği gerçeğini ortaya koymaktadır (Allendorf ve ark., 1987; Anokhina, 1971; Ricker, 1975; Stearns, 1983; Aneer, 1985; Kapuscinski, ve Lannan, 1986; Robinson ve Wilson, 1995). Bununla birlikte birçok çalışmada, davranış karakterlerinde meydana gelen genetik değişimin çevresel değişim sonucu olduğu rapor edilmiştir (Schaffer ve Elson, 1975; Beacham, 1983;

Templeman, 1987; Reznick ve ark., 1990; Gharrett ve Smoker, 1993; Smith, 1994). *Caranx* türleri farklı avcılık ve çevresel baskılar altında kalabilmektedir. Bunun sonucu olarak türlerde farklılaşma meydana gelebilmekte türe ait devamlılık tehlikeye girebilmektedir. Sadece fenotipe ve davranış karakterlerine dayalı populasyon veya tür idaresi, türlerin ve populasyonların devamlılığını sağlamada etkisiz olmaktadır. Çünkü allel çeşitliliğin kaybolması gibi genetik yapıda meydana gelen değişikliklerin geri dönüşümü mümkün olmayabilir. Bu durum türlerin gelecekteki devamlılığını veya sürdürebilirliğini etkileyebilmektedir (Carvalho ve Nigmatullin, 1998). Doğal olaylar neticesinde allel frekansı değişebilmekte, genetik çeşitlilik azalabilmekte ve buna bağlı olarak türlerin genetik kompozisyonu veya yapısı değişebilmektedir.

Dünyada moleküler sistematik çalışmalar özellikle son 30 yılda şuan da geçerliliğini koruyan dizi analizlerinin kullanılmasıyla ve yeni filogenetik analiz metotlarının geliştirilmesiyle ilerleyebilmiştir (Wen ve ark., 1997; Podoplelova ve Ryzhakov, 2005). Filogenetik bilgi açısından morfolojik karakterlerin yetersiz olduğu durumlarda dizi analizleri filogenetik analizler için çok önem taşımaktadır (Yokoyama ve ark., 2000). Filogenetikçiler genellikle dizilerin filogenisinin organizmaların filogenisine çok yakın olduğunu ifade etmektedirler (Kellogg, 1998). Dizi analizi yöntemleri canlıların coğrafik orijinlerinin bulunmasından, filogenilerini moleküler olarak ispatlamaya kadar birçok alanda kullanılmaktadır (Allan ve ark., 2004; Cohen ve Weydmann, 2005; Ogden ve Whiting, 2005). Genetik çeşitliliğin korunması, türlerin ve doğal populasyonların korunmasında temel unsurdur. Herhangi bir biyolojik kaynağı etkili olarak yönetmek için, mevcut tür ve populasyonların genetik varyasyon düzeyinin mutlaka bilinmesi önemlidir. Balıklarda filogenetik çalışmalarda, genetik tekniklerden uzun süreden beri yararlanılmaktadır (Utter, 1991). Genetik tekniklerin ilk önemli uygulamaları, geniş olarak denizlerde gözlenen davranış ve göç modellerinin araştırılmasıyla ilgilidir. Moleküler genetik çalışmaları ilk olarak uzak balık populasyonları arasında hemoglobin polimorfizminin araştırılmasıyla başlamıştır (Sick, 1961; Ward ve Grewe, 1994). Eldeki genetik belirteçlerin çeşitliliğini sayıca artırabilmek için araştırmacılar 1980'li yılların başında Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'dan yararlanmaya başlamışlardır. Bu alanda yapılan Mitokondrial DNA (mtDNA) odaklı ilk çalışmalarda, RFLP analizi kullanılmıştır (Lansman ve ark., 1981).

Sonraki araştırmalar ise genetik materyale ait belirli bölgelerin dizi analizi üzerine odaklanmıştır (Bernartchez ve ark., 1992).

Caranx türleri farklı avcılık ve çevresel baskılar altında kalabilmektedir. Bunun sonucu olarak türlerde genetik ve morfolojik farklılaşma meydana gelebilmekte türlere ait devamlılık tehlikeye girebilmektedir. *Caranx* cinsine ait üç türün (*Caranx crysos*, *Caranx hippos*, *Caranx rhoncus*) filogenetik ilişkisinin tespitine dair ulusal çalışmaların bulunmaması ve uluslararası kapsamlı çalışmaların da yetersiz olması sebebiyle konudaki literatür açığının kapatılması oldukça önem taşımaktadır.

Bu noktadan hareketle ülkemiz denizlerinde bulunan *Caranx* türlerinin morfolojik ve genetik kompozisyonunun tespiti ve filogenetik yönden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. *Caranx* Cinsinin Biyo-Ekolojik Özellikleri

Özellikle ülkemiz Akdeniz ve Ege Denizi'nde yaygın olarak dağılım gösteren Carangidae familyası üyesi *Caranx* cinsi yüksek ekonomik değerinin yanı sıra ekolojik öneme de sahiptir (Akşıray, 1987; Turan ve ark, 2007). Karnivor özellik gösteren bu cinsin üyelerinin besin gruplarını genellikle yengeç karides, istakoz, deniz anası kopepodlar ve diğer küçük kabuklular oluşturmaktadır. Larval ve genç dönemlerinde zooplankton ağırlıklı beslenirler. *Caranx* cinsine ait türler genellikle 2–3 yaşlarından itibaren olgunluk çağına girerler ve üremek için, beslendikleri bölgelerden daha sıcak olan bölgelere doğru sürüler halinde toplanarak göç etmektedirler. Bu cinse ait türler genellikle Haziran, Temmuz, Ağustos aylarından Eylül ayı ortalarına kadar üremelerini sürdürmektedirler (Akşıray, 1987).

1.2. *Caranx* Cinsine Ait Türlerin Dağılım Alanları

Caranx cinsine ait türler Atlantik, Pasifik ve Hint Okyanusunda tropikal ve subtropikal sularda dağılım göstermektedir. Çoğu türü kıta sahanlığından öteye dağılım göstermezken, okyanus akıntılarının da etkisi ile derin sularda bulunabilirler. Genellikle koylar, lagünler, kumlu çamurlu alanlar, resifler, adalar ve nehir ağızları gibi bölgelerde bulunurlar. Türlerin büyük kısmı demarsal özellik gösterirken, bazı türler pelajik özellik gösterip sürü oluştururlar.

Caranx crysos türü Atlantik Okyanusu sularında Doğu Amerika sahil şeridi ve Batı Afrika ve Avrupa sahillerinde dağılım gösterirler. Batı Atlantik'te, Güney Meksika, Brezilya, Orta Amerika kıyılarında, Karayipler ve birçok takımadalarında, ABD sahilleri boyunca kuzeye uzanır ve Kanada da dahil olmak üzere geniş bir dağılım gösterirler. Doğu Atlantik'de Angola gibi Afrika kıyılarında yaygın dağılan bu tür hemen hemen tüm Akdeniz'de bulunmaktadır. *C. crysos* türü ülkemizde Akdeniz ve Ege'de dağılım göstermektedir. *C. hippos* Atlantik Okyanusu'nun Amerika'dan Afrika ve Avrupa Sahillerine kadar, Uruguay ve orta Amerika boyunca Karayipler takım adalarını da içine alan bir dağılım göstermektedir. Doğu Atlantik de Afrika kıyı şeridi boyunca kuzeye doğru dağılım gösterirken Akdeniz'de Libya, Türkiye hattı, Yunanistan, İtalya, İspanya gibi ülkelerde dağılım göstermektedir. *C. hippos* (Linnaeus, 1766) türü ülkemizde Akdeniz ve Ege denizlerinde dağılım gösterirler. *C. rhoncus* Atlantik Okyanusunun tropik ve ılıman doğu sularında Namibya, Angola'dan kuzeye doğru İspanya'ya uzanan bir bölgede dağılım gösterirken, Akdeniz'de Türkiye, Mısır, İsrail, İtalya, Yunanistan hatlarında dağılım göstermektedirler. *C. rhoncus* türünün ülkemizdeki dağılımı Akdeniz, Ege ve Marmara Denizi'dir.

1.3. Türleşme

Tür; yapısal özellikleriyle genetik karakterleri birbirine benzeyen ve yine aynı genetik karakterde yeni kuşaklar (jenerasyon) verebilen bireylerin tümü şeklinde biyolojik genetik bir bütün olarak tanımlanmaktadır (Kühn, 1964; Hadorn ve Wehner, 1974). Diğer bir taraftan “Yapısal ve işlevsel özellikleri yönünden birbirine benzeyen ve aynı çevresel koşullara benzer tepki gösteren, doğal koşullarda serbest olarak birbirleriyle çiftleşip verimli yavrular oluşturabilen bireyler topluluğu” şeklinde de türün tanımı yapılmaktadır. Taksonomik sistem taksonları hiyerarşik bir düzen içinde sıralar. Her ne kadar türün altında alt tür ve ırk gibi daha küçük birimler bulunursa da hiyerarşik sıralamada en küçük kategori tür olarak kabul edilir. Tür, dinamik bir varlıktır ve yeni döller oluşturarak varlığını devam ettirir. Yeni döllerin oluşumu sürecinde, gen havuzu içeriğinde değişimler oluşabilmekte, farklı ya da aynı alanlarda olan değişimler, türleri kendi içerisinde bir alt birimleşmeye götürebilmekte ve alt birimleşmenin tamamlanmasıyla yeni türler oluşabilmektedir.

Türler genellikle kendi içerisinde fenotipik ve genetik olarak farklılaşmış gruplara veya popülasyonlara bölünmüştür. Türü meydana getiren popülasyondaki bireyler birbirinin aynısı değil benzeri olurlar. Yani, anatomik, fizyolojik özellikleri, protein yapısı ve davranışları bakımından belirli değişimler (varyasyonlar) gösterirler. Değişim faktörü türlerin temel özelliklerinden birini oluşturur. Ancak, aynı türe ait bireyler arasındaki değişimler, farklı türlere ait bireyler arasındaki değişimlere göre çok daha azdır. Başka bir ifadeyle iki farklı tür arasında gen akışı tamamen kesilmiş, yani eşeysel yalıtım (izolasyon) sağlanmış durumdadır. Bunun yanında istisnai bir durum olarak ikiz türler ve hatta bazen birbirine oldukça uzak akraba olan türler arasında karşılıklı döllenme ve yavru meydana getirme görülebilir. Fakat gen ve kromozom dağılımındaki dengesizliklerden dolayı bu yavrular verimli olmazlar (Demirsoy, 1998; Kocataş, 2003).

1.4. Filogenetik

Organizmaların evrimsel akrabalık ilişkisi filogeni olarak tanımlanmaktadır. Filogenetik ise türler arası genetik bağları ve ilişkileri araştıran bilim dalıdır. Filogenetik terimi Yunanca kökenlidir, "kabile, ırk" anlamına gelen file veya filon ve doğumla ilişkili anlamındaki genetikos terimlerinden türetilmiştir. Organizmaların sınıflandırması ve adlandırması olan taksonomi, filogenetikten büyük miktarda etkilenmiştir fakat filogenetikten temel olarak farklılıklar göstermektedir. Belirli karakterleri (morfolojik ve/veya genetik) inceler ve benzer karakterleri taşıyan organizmaların genetik olarak birbirine yakın oldukları varsayımından yola çıkmaktadır. Moleküler filogenetik kavramı ise günümüzde DNA ve protein dizilerini de içeren moleküler veriler türler arası ilişkileri analiz etmek için kullanılır. Genomlar, mutasyonların birikmesi ile evrimleşir ve farklı organizmaların genomları arasındaki nükleotid dizisi farkı iki genomun birbirinden ayrılma zamanlamasını yansıtabilir. Farklı genomları karşılaştırarak aralarındaki evrimsel ilişkileri ortaya çıkarmak mümkündür (Tez, 2011).

Organizmaların evrimsel tarihinin saptanmasında moleküler veriler kullanılırken bazı varsayımların varlığı söz konusudur ki bu varsayımları sıralarsak;

- 1.** Kullanılan moleküler diziler homologdurlar. Yani ortak bir kaynakları vardır ve zaman içerisinde farklılaşmışlardır.

2. Filogenetik farklılaşmanın iki kola ayrılarak gerçekleştiği varsayılır. Filogenetik ağaçtaki bir dal belirli bir noktada iki kola ayrılır.
3. Bir dizideki her bir pozisyon birbirinden bağımsız olarak evrim geçirmiştir. Diziler arasındaki çeşitlilik kesin filogenetik ağaçların inşası için yeterli bilgi sağlamaktadır.

1.5. Filogenetikte Kullanılan Morfolojik Tekniklerin Önemi

Balıklarda bulunan morfolojik karakterler çeşitli sınıflara ayrılmış gruplar arasındaki ilişki ve farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Farklı türlerin tanımlanması ve stoklar arasındaki ilişki ve farklılıkların belirlenmesinde, balıkların teşhisinde ayırt edici morfolojik özelliklerinden biri olan meristik karakterler de yaygın olarak kullanılmaktadır (Casselman ve ark., 1981; Ihssen ve ark., 1981; Bookstein, 1982; Bird ve ark., 1986; Friedland ve Reddin, 1994; Turan, 2000). Bu alanda stok ve tür farklılığını belirlemek üzere yapılmış birçok çalışmaya rastlanılmaktadır (Corti ve ark., 1988; Shepperd, 1991; Avşar, 1994; Haddon ve Willis, 1995; Bembo ve ark., 1996; Turan, 1997).

Türler içinde meydana gelen fenotipik değişim sadece genetik kontrol altında olmayıp, aynı zamanda çevresel faktörlerin de etkisi altındadır. Bununla birlikte balıklarda görülen fenotipik esneklik, onların davranış ve fizyolojilerinde meydana gelen modifikasyonlar sayesinde çevresel değişimlere adapte olmalarını sağlamaktadır. Bu modifikasyonlar, çevresel değişimin etkilerini azaltarak, balıkların morfoloji, üreme ve yaşam sürelerinde değişimlere de yol açmaktadır (Stearns, 1983; Meyer, 1987).

Genetik tekniklerin kullanımından önce, morfolojik farklılığın, tamamıyla genetik farklılaşmadan kaynaklandığı sanılmakta ve stokların tespiti genellikle morfolojik özellikler kullanarak yapılmaktaydı (Marr, 1957). Fakat, fenotipik tekniklerin kullanımı, bir türe ait populasyonların tespitinde fenotipik değişimin direk olarak genetik kontrolün etkisi altında olmayışı ve çevresel faktörlerin değişiminden etkilenmesinden dolayı sınırlı hale gelmiştir (Allendorf ve ark., 1987). Çünkü; genetik tekniklerin balıkçılıkta kullanımı ile daha önce fenotipik olarak farklı olan birçok populasyon veya türün genetik olarak farklı olmadığı ortaya çıkmıştır.

1.6. Tür Tespitinde Genetik Tekniklerin Önemi

Genetik tekniklerin sistematikte çeşitli amaçlar için kullanımı mümkündür (Turan, 2000; Bardakçı ve Karataş, 2005).

Belirgin ya da güvenilir morfolojik farklılıkları olmayan türlerin ayırt edilmesi. Çok uzun zaman önce farklılaşmış olan türlerin sınıflandırılmasında kullanılabilecek morfolojik homolojileri saptamak güç olduğundan, moleküler teknikler bu durumda yararlı karakterler olarak kullanılabilir.

Morfolojik özelliklerine göre pek çok türün teşhisi için oldukça deneyim sahibi olmak gerekir. Özellikle teşhisi zor olan türlere özgü teknikler geliştirilerek, teşhislerinin daha kesin olarak yapılabilmesi olanağını sağlar. Belki de yakın gelecekte türlerin teşhisinde kullanılabilecek belirteçlerle tür teşhis anahtarlarının geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Genetik verilerin diğer en önemli özelliklerden birisi de, moleküler saat kullanarak türlerin ayrılma zamanlarının tahmin edilmesine olanak vermesidir. Belli bir türün ya da taksonun genomu (mitokondri ya da çekirdek genomu) veya genomunun belli bölgeleri için mutasyon oranlarına ait bilgiler varsa, karşılaştırılan taksonlar arasındaki nükleotid farklılıklarını (divergens) hesaplayarak ne kadar zaman önce farklılaştıklarını tahmin etmek mümkün dür. Bu yolla oluşturulan filogenetik ağaçların dal uzunluklarını hesaplamak ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerini zamansal olarak da tahmin etmeye olanak sağlar.

Son olarak, populasyon genetikçileri moleküler teknikler kullanarak türleşme ve türleşmeye neden olan evrimsel güçler ve işleyişi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadırlar.

1.7. Moleküler Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Genetik Teknikler

Türlerin farklılıkların tespitinde fenotipik tekniklerin yanında moleküler genetik teknikler de kullanılmaktadır. Tek başına kullanılan fenotipik tekniklerin (ekoloji, markalama, parazitler, fizyoloji, morfometrik, meristik, kalker yapısı) genotipik dayanağı olmadığından ve fenotipik özelliklerin çevresel etkilere göre değişiklik göstermesinden kaynaklı yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle moleküler genetik tekniklere ihtiyaç duyulmuş ve bu amaçla birçok genetik teknik geliştirilmiştir. (Turan, 2002).

Filogenetik çalışmalarında günümüzde yaygın olarak kullanılan teknikler; Protein elektroforez, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Sınırlama Parçalarının Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), DNA Dizileme Metodu, DNA Parmak izi Metodu, Mikrosatellite ve Polimorfik DNA'nın Rastgele Çoğaltılması (RAPD) teknikleridir.

Moleküler sistematikte kullanılan ilk teknik protein elektroforezidir. Proteinle ilgili ilk çalışmalar hemoglobin ve transferin gibi proteinlerle başlamış ve sonraki birçok çalışmada enzim proteinleri kullanılmıştır. Her bir lokus proteini, aminoasit yüküne bağlı olarak elektriksel alanda farklı hareket etmektedir. Eğer bir proteini kodlayan lokusta birden fazla allel varsa, her bir allel tarafından kodlanan polipeptitler farklı aminoasit içeriklerinden dolayı farklı elektriksel yüke ya da büyüklüğe sahip olacaklardır. Elektroforez bu gibi allelik farklılıkları ortaya çıkarmaktadır.

DNA zincirleme metodunda DNA zincirinde istenilen bölgenin nükleotid diziliminin ortaya çıkarılması ile zincir üzerinde meydana gelen değişimler tespit edilebilmektedir. Bu teknik çok fazla maliyet gerektirdiğinden kullanımı sınırlıdır. Bu teknikte, bir adet primer hedeflenen DNA zincirinin ucuna bağlanmaktadır. Deoksiniükleotid trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) ve DNA polimeraz kalıp DNA'ya eklenmekte ve böylece DNA sentezi olmaktadır. Sentez üretimi sonrasında oluşan DNA parçaları poliakrilamit jel üzerinde elektroforez ile büyüklüğe uygun olarak ayrılmaktadır. Jel üzerinde görünen bantlar lazer tarayıcı veya bilgisayar ile okunabilmektedir (Turan, 2000).

DNA Parmak izi metodunda ise farklı DNA zincirlerine sahip canlı organizmalar birbirinden farklı görünmekte veya farklı karakteristik özelliklere sahip olmaktadır. Herhangi iki canlının DNA zincirleri DNA parmak izi metodu ile çok hızlı bir şekilde karşılaştırılmakta, populasyonların genotipleri ve DNA'larındaki farklılıklar tespit edilmektedir. DNA parmak izi metodu, polimorfik olan büyük bir lokus sınıfını ortaya çıkarmakta ve varyasyon tespit edici bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır.

Tür ayrımı çalışmalarında sık kullanılmayan mikrosatellit, uzunluk olarak 1'den 6'ya kadar baz çiftine kadar olan basit bir kor nükleotid zincir ünitesinden oluşmaktadır. Bu kısa zincir ünitesi, bir lokus içerisinde (G T)_n veya (A T)_n şeklinde arka arkaya 100 defaya kadar tekrarlanmaktadır. Mikrosatellitler, genom üzerinde çok bol miktarda dağılmış olarak görülmektedir (Royle ve ark., 1988; Jeffreys ve ark., 1991). Bir lokusta

bulunan allel çiftinin her biri, kor zincir ünitesinin (mikrosatellite) tekrar sayısının farklılığıyla birbirinden ayrılırlar. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Metoduyla her bir lokustaki alleller çoğaltılabilmektedir. Bu alleller, jel elektroforez metoduyla görüntülenir ve böylece her bir balığın genotipi kolayca tespit edilir. Bu teknik ile türlerin ve populasyonların allel frekansı, nükleotid farklılığı ve ayrılığı tespit edilebilmektedir.

RAPD tekniği de, diğer tekniklerde olduğu gibi populasyonlar ve türler arası farklılığın tespiti için geliştirilmiş bir tekniktir. Bu teknik sayesinde moleküler farklılıklar genetik haritalarda saptanabilmektedir. Farklı uzunluktaki DNA'nın rastgele çoğaltılmasında genin tamamı rastgele taranmakta, primer genom üzerinde gelişigüzel olarak tanıdığı bölgelere hibritleşmekte ve PZR tekniği ile bu bölgelere değişik uzunlukta kopyalanmaktadır. Bu parçaların daha sonra elektroforezde agaroz jeli üzerinde görünmesi sağlanmaktadır (Turan, 2000). Bu görünen bantlar, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) olarak isimlendirilmektedir. RAPD belirteçleri, genleri ayıran kromozom hareketleri için başlama noktaları olarak yardım edebilmeye yarayan genleri birleştirir. Bu tekniğin kullanımı, jel üzerinde okumalar sırasında olumsuzluklar yaşanması nedeniyle pek yaygın değildir.

1.7.1. Mitokondrial DNA

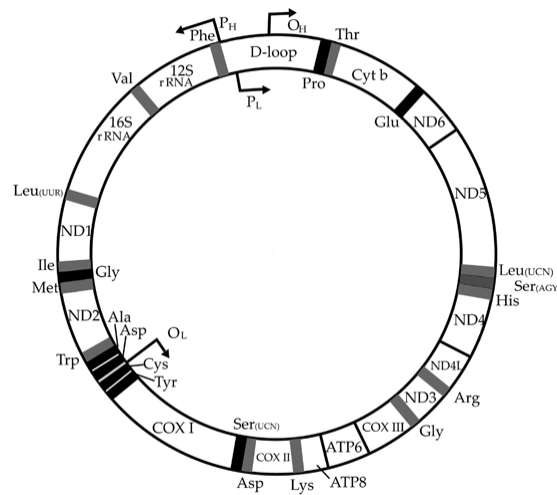
Evrin çalışmalarında genomun en çok çalışılan kısımlarından biri mtDNA'dır (Wilson, ve ark., 1985). MtDNA nispeten yüksek evrimleşme hızından dolayı, yakın akraba türler ve bir türün populasyonlarını karşılaştırmada son derece yararlı olmuştur (Harrison, 1989). Çekirdek DNA'sı ile karşılaştırıldığında, efektif büyüklüğü dörtte biri kadar olduğundan genetik populasyonların kolayca farklılaşmasına neden olur. Genetik sürüklenme çekirdek DNA'sına göre mitokondriyal genom üzerinde daha etkili mekanizma olarak işlediğinden, populasyonlara özgü mtDNA belirteçleri geliştirmek daha olasıdır. Tür üstü sistematik birimleri karşılaştırılmasında ise mtDNA genlerinin düzeni, belli sistematik birimleri birbirlerinden ayırmak için güçlü belirteçlerdir.

Mitokondri genomu, filogenetik çalışmalar için yararlı olan pek çok özelliklere sahiptir (Avice, 1994). En önemli özelliği klonal kalıtımıdır. Balık mitokondri genomu haployittir, yani her bir organizma sadece bir çeşit mtDNA içermektedir. Bununla birlikte, birkaç çalışmada heteroplazmi (bir fertte birden fazla mtDNA çeşidinin

bulunuşu) olduğu rapor edilmiştir (Moritz ve ark., 1987; Bentzen ve ark., 1988; Moritz, 1991). Heteroplazmi, tırsı balığı (Bermingham, ve ark., 1986), Atlantik ringası (Bentzen ve ark., 1988) ve hamsi (Magoulas ve Zouros, 1993) olmak üzere birkaç balık türünde görülmüştür. İkinci olarak, mtDNA pek çok çekirdek genlerinden daha hızlı evrimleşmiştir. Bu özelliğinden dolayı, yakın akraba tür ve populasyonların filogenetik ilişkilerini çalışmak için uygundur. MtDNA'nın anasal olarak kalıtımlanıyor olması, filogenetik analizler için avantaj olarak kabul edilir.

Hayvan mtDNA'sı 15-20 kb uzunluğunda. 22 tRNA, 2 rRNA, 13 elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan ve 13 mRNA'yı kodlayan toplam 37 genden oluşan kapalı halkasal bir moleküldür (Wallace, 1986); (Şekil 1.1). Yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan kontrol bölgesi replikasyonun başladığı bölgedir. MtDNA'da genlerin düzeni genellikle sabittir; ancak gen organizasyonu bazı hayvan taksonlarını ayırabilir (Desjardins ve Morais, 1990).

Özellikle mtDNA'nın replikasyonunda kontrol bölgesi veya D-loop mitokondriyal gen bölgesi, hayli değişken bölge olduğundan, populasyon seviyelerinin ortaya çıkarılmasında ve aynı zamanda yakın türler arasındaki filogenetik akrabalık ilişkilerinin araştırılmasında markır seçiminde başvurulmuş en önemli gen bölgesi olmaktadır. Bu bölge, hazır bulunan oldukça yüksek koruma bloklarıyla birlikte muhtemelen işlevi, mtDNA'yı kopyalamayı ve çoğaltmayı kontrol eden bölge olarak tanımlanır. Bu koruma blokları arasına kodlanmamış DNA'nın geniş kısmı parçacıkları serpiştirildiğinde bu bölgede değişim olur ve böylece bu kısım birçok yüksek polimorfik bölge içerir (Bermingham ve ark., 1997; Lydeard ve Roe, 1997).



Şekil 1.1. Balık mitokondrisinde (mtDNA) genlerin dizilimi (Meyer, 1993)

MtDNA analizi, son zamanlarda yaygın olarak kullanılan DNA dizi analizi dışında, Sınırlama (Resktriksiyon) Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Metodu ile yapılmıştır. Bunun için çalışılan sistematik birimlerin filogenisi için uygun olan mtDNA bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılır ve daha sonra bir sınırlama enzimi ile kesilir. Elde edilen kesim ürünleri ya agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılarak, etidyum bromid ya da gümüş boyama ile görüntülenir. Bu yöntem genel olarak PZR-RFLP olarak bilinir. PZR ile özgül amplifikasyon gerçekleştirildiğinden, Southern blotting ve DNA hibritleme yöntemi artık fazla kullanılmamaktadır. Mitokondri DNA'sı kapalı halkasal bir molekül olduğu için, oluşan parçacıkların sayısı ile sınırlama enzimlerinin kesim yerlerinin sayısı eşittir. Jel üzerinde oluşan bantların kalıbı karşılaştırılarak sınırlama kesim yerleri ya da sınırlama parçası verileri elde edilebilir. Bir popülasyona ait her bireyin belli bir enzimle ilgili mtDNA bölgesinin kesim sonucu oluşan bant kalıbına bir harf verilir. PZR-RFLP için kullanılan tüm sınırlama enzimlerin kalıpları, bu şekilde kullanılan enzim kadar harften oluşan bireyin kompozit genotipi belirlenmiş olur. Bunların her biri bir mtDNA haplotipidirler. Bu şekilde çalışılan popülasyon ya da taksondaki haplotipler ve sıklıkları ve de buradan hesaplanan nükleotid farklılıkları (divergence) karşılaştırılabilir. Mitokondri DNA sadece anasal olarak kalıtıldığından, haplotiplerin de nükleotid çeşitliliği (diversity) ve farklılığı (divergens) karşılaştırılarak, haplotiplerin filogenetik ilişkileri ilgili popülasyonun filogenetiği ve filocoğrafyası hakkında önemli bilgiler verir (Bardakçı ve Karataş, 2005).

1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), dizisi bilinen miktarda bir DNA bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan ve milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte ilk basamakta, yüksek sıcaklığın etkisiyle (92-95°C) çift sarmallı DNA'nın sarmalları birbirinden ayrılır. İkinci basamakta ise, primerler kopyalanmak istenen zincir bölgesine iki taraftan bağlanırlar. Son olarak bir DNA polimeraz olan *Taq* (*Thermus aquaticus*) adlı enzim sentez gerçekleştirir. Normal olarak bu kopyalama 30 kez gerçekleşmektedir (Turan, 2000). Reaksiyonun verimliliğinin %100 olması için 10^9 kat kopyalama gerekmektedir. Kopyalama sonrası özel yöntemlerle çoğaltılan DNA (Agar Jel Elektroforezi,

Poliakrilamid Jel Elektroforezi) boyanma işlemini takiben gözlenir. Primerlerin sınırladığı sekansın uzunluğu bilindiğinden, çoğaltılan ürünün hangi uzunlukta (bç) band oluşturduğu DNA büyüklük standardı ile karşılaştırarak belirlenir.

1.7.3. DNA Dizileme Metodu (Sequencing)

Zincirleme metodu, DNA düzeyinde değişim tespit etmede kullanılan en hassas tekniktir. DNA üzerinde ilgi duyulan bir bölgenin veya genin zincirleme metodu ile nükleotid dizilerin ortaya çıkarılması, bu bölgede mevcut olan polimorfizimi, azami düzeyde tespit etme imkanı sağlamaktadır. Aynı zamanda, transition ve translation arasındaki oran, mutasyonun tarihi değişimi hakkında bilgi elde edilmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, amino asit zincir değişikliğine sebep olmayan üçüncü kodon mutasyonları, amino asit değişikliğine sebep olan mutasyonlardan ayrı bir şekilde analiz edilebilir. Bu teknikte çok az bir DNA parçası (200-500 bp) incelenmektedir ve incelenen örnek sayısı da kısıtlıdır. Sonuç olarak, yüksek laboratuvar bilgisine ihtiyaç duyulması ve maliyetinin çok yüksek olması, çok örnek sayısına ihtiyaç duyulan populasyon çalışmalarında bu tekniğin kullanımını sınırlamaktadır.

Fakat türler arasındaki moleküler ayrılığı tespit etmede veya tür tespiti çalışmalarında az sayıdaki örnek yeterli olduğundan, bu tekniğin kullanımı yaygındır. Halbuki, son yıllarda otomatik zincirleme makinasının gelişmesi, manuel zincirleme metoduna kıyasla birçok örneğin kısa zamanda incelenmesine imkan vermektedir.

DNA zincirinin test edilmesinde en yaygın metot, dideoxy-termination metodudur. Bu metotta bir primer (kor DNA), çift sarmallı DNA'nın bir sarmalının sentezlenmesini başlatmak için kullanılmaktadır. Bu teknikte, bir primer kullanılmakta ve DNA sarmalının sadece biri sentezlenmektedir. DNA sentez reaksiyonlarında kullanılan normal nükleotidlere (dNTP) ek olarak, modifiye (dideoxy) nükleotidler (ddNTP) zincirleme reaksiyonuna eklenmektedir. Bu nükleotidlerin modifikasyonu, fosfat bandlarının formasyonuna engel olmaktadır. Sentez, modifiye nükleotidlerin eklenmesiyle sonlanmaktadır (dideoxy-termination). Zincir reaksiyonu, birbiriyle aynı olan dört reaksiyondan oluşmakta ve her bir reaksiyon farklı tüpler içerisinde gerçekleşmektedir. Her bir tüp içerisinde, normal nükleotidler (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ve çok düşük oranda reaksiyonu tamamlayıcı modifiye nükleotidler (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) bulunmaktadır. Örnek olarak, dideoxy-C nükleotidinin

(ddCTP) olduğu reaksiyonu düşünelim; Primer (GTC), DNA'nın yeni bir sarmalını sentezlemek için şablon DNA'ya kaynaklanmakta ve polimeraz reaksiyonu ile normal nükleotidler şablon DNA üzerine eklenerek sentez yapılmaktadır. Reaksiyonda, nükleotidler eklenirken tesadüfi olarak hem normal nükleotid (dCTP), hem de modifiye nükleotid (ddCTP) kullanılmaktadır. Normal dCTP nükleotidi kullanıldığı zaman, reaksiyon devam etmekte ve ddCTP nükleotidlerinin kullanıldığı her durumda ise, polimeraz sonlanmakta ve farklı uzunlukta parçaların oluşmasına neden olmaktadır. Bu parçaların her biri, ddC nükleotidlerinin primerden olan uzaklığını ifade eder. Bu parçalar, radyoaktif veya floresan metotlarıyla boyanmaktadır. Her bir tüp içerisinde bulunan bu parçalar, elektroforez jel'i üzerinde yan yana farklı hatlarda dizilmektedir. Elektroforez sonucu, parçalar büyüklüklerine göre jel içerisinde yerlerini almaktadır. Jel üzerinde her bir band sağ tarafta verilen ilgili parçayı ifade eder ve jel üzerinde okuma yapılarak, reaksiyona sokulan DNA sarmalının tamamının nükleotid zinciri tespit edilmiş olur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Türkiye denizlerinde bulunan *Caranx* cinsine ait *Caranx crysos*, *Caranx rhoncus* ve *Caranx hippos* türlerinin morfolojik ve genetik yapısı, türler arasındaki filogenetik ilişkinin derecesi ve şeklinin belirlenmesi amacı ile ulusal ve uluslar arası düzeyde doğrudan çalışma bulunmamaktadır. Türkiye denizlerinde bu türler ve birkaçı üzerine yapılan çalışmaları Akkiran (1985), Bektaş ve ark., (2009) oluşturmaktadır.

Akkiran (1985), Carangidae familyasında *C. rhoncus* ve *C. crysos* türlerinde otolit morfolojisi ve otolit yapısı ile türlerin ayırt edici özelliğini ortaya koymaya çalışmış; otolit boyu, otolit eni, otolit derinliği gibi özelliklerin yanı sıra balık boyunu da ölçümlere dahil etmiş, sonuç olarak da özellikle *Caranx* cinsi üyelerinin otolit yapılarının kendine has olduğunu belirtmiştir.

Turan (1999), yaptığı çalışmada çeşitli taksonomik kategoriler arasındaki ilişkileri saptamak amacıyla, morfolojik karakterler belirlemiş ve birçok morfolojik çalışmada yaygın olarak kullanılan Truss Network yöntemini analiz etmiştir

Turan (2004), Karadeniz, Marmara, Ege ve Akdeniz'den Carangidae familyasına ait istavrit (*Trachurus mediterraneus*), stokları arasındaki morfolojik farklılığın derecesini, morfometrik ve meristik karakterler kullanılarak araştırmış, morfometrik ve meristik karakterin analizi sonucu komşu denizler arasındaki istavrit göçünün kısıtlı olduğunu belirtmiştir.

Turan ve ark., (2004), Truss Network Sistemi ile morfometrik karakterler kullanarak Türkiye karasularında bulunan hamsi populasyonlarının durumu incelemişlerdir. Kümeler arası korelasyon analizinde, birinci ve ikinci varyasyonların kümeleştirilmesi sonucu gruplar arasındaki varyasyonun %93'ü kullanıldığında örnekler arasında yüksek derecede farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. Buna göre her bir denizdeki hamsi populasyonları arasında morfometrik yapılaşmanın varlığını, çok değişkenli varyans analizi ile toplam 25 morfometrik karakterin 16'sı arasında istatistiksel olarak analiz ederek önemli fark bulmuşlar ve ana bileşenler analizi sonucu populasyonlar arasında meydana gelen farklılıkların genelde baş bölgesi ölçümlerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Cardenas ve ark., (2005), Pasifik ve Atlantik Okyanusu örnekleri ile yapmış olduğu çalışmada Cyt b ve D-loop gibi iki mitokondrial moleküler markır kullanılarak yaptıkları dizileme analizi sonucu, 11 istavrit türünün filogenetik ilişkilerini ortaya koyarak aynı zamanda türlerin köken ve tarihçeleri üzerine değerlendirmelerde

bulunmuşlardır. Elde ettikleri sonuçların Tetis Denizi kapandığında bu cinsin kökeninin meydana geldiğini belirten raporun fosil kalıntıları ile uyuştuğunu bildirmişlerdir.

Francisco ve ark., (2006) Portekiz çevresindeki atherina türlerine (*Atherina presbyter*, *Atherina boyeri*) ait deniz ve nehir populasyonlarının genetik yapılarını, mtDNA üzerindeki L-pro1 (50-ACTCT CACCCCTAGC TCCCA AAG-30) ve H-DL1 (50-CCTGA AGTAGGAACC AGATG CCAG-30) genlerinin sekans analizi ile ortaya koyarak karşılaştırmışlardır. *Atherina presbyter*'in 50 bireyinde toplam 36 haplotip, *Atherina boyeri*'nin 50 bireyinde 13 haplotip tespit etmişlerdir

Gürlek ve Turan (2006), Çalışmada *Tilapia* türlerinin yayılım alanlarını içeren Çukurova ve Hatay Bölgeleri'ndeki nehir, göl ve su ürünleri yetiştiricilik istasyonlarından dört tilapia türü (*Oreochromis aureus*, *Oreochromis niloticus*, *Tilapia zillii* ve *Tilapia rendalli*) üzerine yaptığı çalışmada, tilapiaların morfolojik ayrımında morfometrik ve meristik karakterleri incelemiştir. Morfometrik karakterlerin kümelerarası korelasyon analizinde sadece Çukurova Üniversitesi *O. aureus* örneği belirgin bir şekilde ayrılık gösterdiğini diğer türlerin ise birbiri üzerine kümelendiğini belirtmiştir. Meristik karakterler bakımından ise genel olarak türler ve türlere ait populasyonların belirgin bir ayrılık gösterdiğin, fakat *T. rendalli*, *O. niloticus* ve *O. aureus* ÇÜ örnekleri birbiri üzerine kümeleşerek bir farklılık göstermediğini belirtmiştir.

Doiuchi ve Nakabo (2007) yaptıkları çalışmada, Doğu Asya'da bulunan üç *Sphyaena* türünün (*Sphyaena iburiensis*, *Sphyaena obtusata*, *Sphyaena pinguis*) genetik farklılıklarını mitokondrial cytochrome *b* geni sekans analizi yöntemiyle ortaya koymuşlardır. Çalışmada Genetik olarak *S. pinguis*'in *S. iburiensis*'e *S. obtusata*'dan daha yakın olduğunu ortaya koymuş ve daha önce morfolojik olarak farklı tür olduğunu ortaya koydukları *S. iburiensis*'in farklılığını genetik olarak da ortaya koymuş oldular.

Murakami ve ark., (2007), Havai'de *Caranx* cinsine ait *Caranx ignobilis*, *C. sexfasciatus*'un *C. melampygus* türlerinin 16S ribosomal DNA ve sitokrom oksidaz (COI) genleri kullanılarak dizileme analizi yanı sıra morfolojik olarak ve renk analizleri yapmışlardır. Sonuç olarak türler arasında hibritleşme tespit etmişler ve 2 hibrid türün meydana geldiğini (*Caranx*, *C. ignobilis* x *C. melampygus* ve *C. melampygus* x *C. sexfasciatus*) ortaya koymuşlardır. 16S ribosomal DNA ve sitokrom oksidaz (COI)

genleri ile yapılan dizileme analizinde türlerin ayırımında başarılı olduklarını belirtmişlerdir.

Çakmak (2008) yapmış olduğu çalışmada, dikenli yılan balığının (*Mastacembelus mastacembelus*) morfolojik ve moleküler yapısını incelemiş, moleküler incelemede mtDNA üzerindeki 12S ve 16S genleri PCR ile çoğaltılarak sekans analizi ile genlerin uzunlukları 12S bölgesi için 947 bp., 16S bölgesi için ise 1758 bp. olarak tespit edilmiştir.

Cardenas ve ark., (2009), Güney Batı Pasifik’de *Trachurus murphei* türünün populasyon yapılarını incelerken dizileme analizleri için tRNA-Pro ve tRNA-Phe primerleri dizayn etmiş ve dizileme analizi sonucu populasyonlar arasında önemli bir farklılık göstermezken ve 4 mikrosatelit losi ile çalışılan nükleer DNA çalışmışların da benzer sonuçları gösterdiği bildirilmiştir.

Bektaş ve ark., (2009), *Caranx rhoncus*’un populasyonlarının analizi ve *Trachurus* cinsinin Türkiye türlerinden ayırt etmek için çift DNA yaklaşımı geliştirilmiştir MtDNA sitokrom b (Cyt b) geninin, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasını ve ek olarak, çok kopyalı nükleer 5S rRNA geni, *Caranx rhoncus*’un teşhisi için alternatif bir aday olarak belirlendiği bildirilmiştir. mtDNA Cyt b geni ile RFLP tekniği kullanılmış, 5S rRNA genleri ile de dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak da 12S rRNA geninin *Caranx* cinsi ile *Trachurus* cinsinin ayırımında kullanılabileceği fakat trachurus türünün kendi arasındaki ayırımında etkili olmadığını belirtmişler ve mtDNA cytb geninin de türleri ayırt edici özelliğini belirtmişlerdir.

Turan ve ark., (2009), Scorpaeniformes familyasına ait Akdeniz’de bulunan iki cins ve altı türün (*Helicolenus dactylopterus*, *Scorpaena maderensis*, *S. porcus*, *S. elongata*, *S. scrofa*, *S. notata*) 16S rDNA dizilim analizi ile genetik ve morfolojik yapılarıyla filogenetik ilişkilerininini incelemişler. İnceleme sonucu nükleotid çeşitliliğin 0,0792 olduğunu tespit etmişlerdir. Türler arası kıyaslamalar için, en düşük genetik sapma (% 0.7) *S. porcus* ve *S. notata* arasında gözlenmiştir ve en yüksek sapma ise (% 10.8) *S. maderensis* ve *S. notata* arasında tespit etmişler. İki filogenetik metot (NJ ve MP) ile iki büyük soy belirlemişler. Neighbour-Joining ağacında *S. elongata* ve *S. scrofa* için kardeş grup oluşturduğunu, ve *S. maderensis* bu grupların daha fazla farklı olduğunu belirtirken, başka bir soy ağacı olan Maximum Parsimony da *S. porcus* ve *S. notata*’nın benzer türler olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak morfolojik

farklılaşmanın desen ve derecesinin genetik farklılaşma ile uyumlu olmadığını bildirmişlerdir.

Scot ve ark., (2011), Hawaii’de ekonomik öneme sahip *Caranx ignobilis* ve *C. melampygus* türlerinin populasyonlarının genetik yapılarını ve türlerin filogenetiği üzerine yapmış oldukları çalışmada mitokondriyal DNA ATPase6 ve ATPase8 geni dizi analizi kullanmışlar. Çalışma sonucunda 20 farklı haplotip (*C. ignobilis* 8; *C. melampygus* 12) tespit etmişler ve populasyonlar arasında önemli farklılık bulunmazken incelenen *C. ignobilis*’in % 6’sının *C. ignobilis* ile *C. melampygus* hibridleri olduğunu belirtmişler ve sebep olarak da *C. melampygus*’a özgü mitokondriyal haplotipleri barındırmakta olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERİYAL VE METOD

Araştırma Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balıkçılık Genetiği ve Moleküler Ekoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Caranx Türlerinin Sistematikteki Yeri

Çalışmada kullanılan türlerin sistematik sınıflandırması Nelson (2006) ve Turan ve ark., (2007)'ye göre aşağıda verilmiştir.

ALEM	: Animalia
ŞUBE	: Chordata
ALT ŞUBE	: Vertebrata
ÜST SINIF	: Osteichthyes
SINIF	: <u>Actinopterygii</u>
ALT SINIF	: Neopterygii
İNFA SINIF	: Teleostei
AİLE	: <u>Carangidae</u>
CİNS	: <i>Caranx</i>
TÜR	: <i>Caranx crysos</i> (Mitchill, 1815) <i>Caranx hippos</i> (Linnaeus, 1766) <i>Caranx rhoncus</i> Geoffroy Saint-Hilarie, 1817

3.1.2. Caranx Türlerinin Tayin Edilmesi ve Tayin Anahtarı

Yapılan bu çalışmada avlanan tirsî türlerinin tayin edilmesinde Nelson (2006) ve Turan ve ark., (2007) baz alınarak, türlerin tayin anahtarı aşağıda verilmiştir.

Üst çenedeki dişlerde, dış sırada köpek dişi, iç sırada küçük konik dişler bulunur.....*Caranx*

a. Dorsal ve anal yüzgeç ışınları tamamen birleşiktir..... *Caranx crysos*

- b. Birinci solungaç kemerinin üst kısmında 3-6, alt kısmında 15-17 adet solungaç diki bulunur..... *Caranx hippos*
- c. Dorsal ve anal yüzgeçlerin son ışınları temelde ışın arası bir zarla birleşik olup, yüzgeçlerden bir parça ayrılmıştır..... *Caranx rhoncus*

3.1.3. Caranx Türlerinin Genel Özellikleri

3.1.3.1. Türlerin Morfolojik Özellikleri

3.1.3.1.1. *Caranx crysos* (Mitchill, 1815)

Vücutta üst taraf, açık zeytini yeşilden koyu mavimsi yeşile kadar, alt kısım ise gümüşü griden altın sarısına kadar değişir. Boyları 70 cm'dir.



Şekil 3.1. *Caranx crysos*'un Genel Görünüşü

Ayırt Edici Morfolojik Özellikler

D1: IX

D2: I 23-25

A: III 19-21

Yanal Çizgi pulları: 45-46

3.1.3.1.2. *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766)

Renk parlak gümüşi, sırt yüzgeci yeşilimsi mavi solungaç kapağında siyah bir benek bulunur, kuyruk yüzgeci sarımtırak renkte ve maksimum uzunluk 124 cm'dir.



Şekil 3.2. *Caranx hippos*'un Genel Görünüşü

Ayırt Edici Morfolojik Özellikler

D1: IX

D2: 19-21

A: III 15-17

Yanal Çizgi Pulları : 65-74

3.1.3.1.3. *Caranx rhoncus* Geoffroy Saint-Hilarie, 1817

Vücut üst kısım kahverengimsiden zeytini yeşile, alt kısım açık zeytin yeşilinden beyaza kadar değişir. Dorsal yüzgecin yumuşak ışınlarında siyah bir leke vardır. Boyları maksimum 60 cm'dir.



Şekil 3.3. *Caranx rhoncus*'un Genel Görünüşü

Ayırt Edici Morfolojik Özellikler

D1: VIII

D2: I 28-32

A: II-I 25-28

Yanal Çizgi Pulları : 65-71

3.1.4. Örneklerin Toplanması ve Örnekleme Alanları

Örnekler İskenderun Körfezi'nden gırgır tekneleri ile denize açılarak her bir tür için 40'ar örnek temin edilmiştir. Türlerin örnekleme bölgelerine ait bilgiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Caranx* cinsine ait türlerin örnekleme bilgileri

Avlanılan Bölge	Tür	Bulunduğu Bölge	Örnek Sayısı	Avlanma Metodu
İskenderun Körfezi	<i>Caranx rhoncus</i>	Akdeniz	40	Gırgır operasyonu
İskenderun Körfezi	<i>Caranx crysos</i>	Akdeniz	40	Gırgır operasyonu
İskenderun Körfezi	<i>Caranx hippos</i>	Akdeniz	40	Gırgır operasyonu

3.1.5. Laboratuvar İşlemlerinde Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.5.1. Morfolojik Ölçümlerde Kullanılan Araç ve Gereçler

Araştırmada kullanılan tırsi türlerinin morfolojik ölçümlerinin yapılmasında, binoküler mikroskop, milimetrik cetvel, 0.01 mm hassasiyetli kumpas ve diseksiyon iğnesi kullanılmıştır.

3.1.5.2. Genetik Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Genetik çalışmada DNA elektroforezi tankı, güç kaynağı, UV transilluminator, Vorteks, İnkübatör, Mikrosantrifüj, Hassas terazi, PZR ve dikey elektoroforez kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan PZR cihazı Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan PZR cihazının görünümü

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Muhafazası ve Tespiti

Toplanan balık örnekleri örnekleme alanlarından yapılarının bozulmaması için ayrı ayrı etiketlenmiş polietilen torbalara yerleştirilip, teknede dondurucuya veya buza konulmuş, kıyıya geldikten sonra ise laboratuara ulaşınca kadar soğuk taşıma kabında (buzda) veya derin dondurucuda muhafaza edilerek laboratuara getirilmiş ve derin donduruculara yerleştirilmiştir. Türlerin tanısı ve sistematik ayrımı, Nelson (2006) ve Turan ve ark., (2007)'ye göre yapılmıştır.

Laboratuara getirilen örneklerin tür tayini yapıldıktan sonra genetik analiz için doku örnekleri alınmış ve %95'lik etilalkolde eppendorf tüpler içerisinde muhafaza edilmiştir. Doku örnekleri alınan örnekler ayrıca morfometrik ve meristik yönden incelenmiştir.

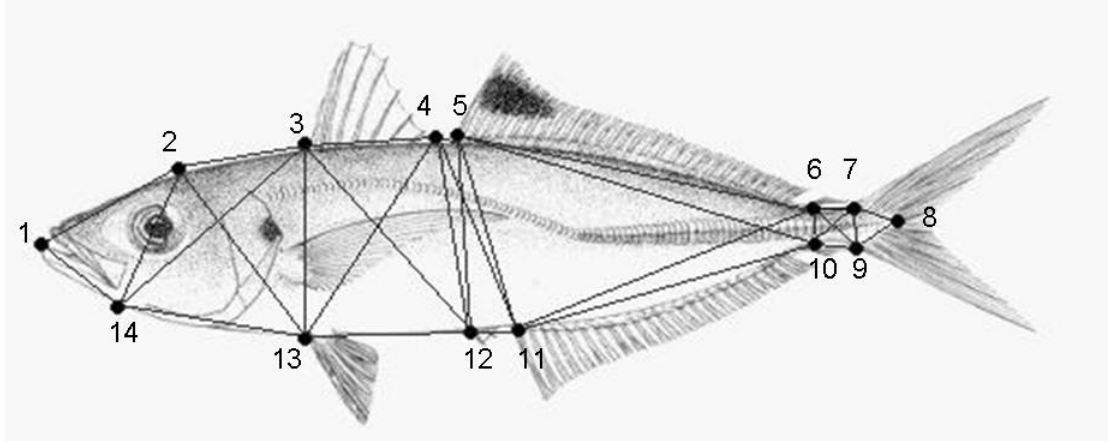
3.2.2. Kullanılan Meristik Karakterler

Meristik karakterlerden dorsal yüzgeç (D), pektoral yüzgeç (P), Ventral yüzgeç (V) ve anal yüzgeç (A) ışın sayıları, Yanal çizgi sayıları (L.L), omur sayıları (OS) ile tür teşhisinde genellikle önemli olan, solungaç dikenleri (SDS) sayılmıştır.

3.2.3. Morfolojik Çalışma Yöntemleri

3.2.3.1. Truss Network Ölçümleri

Araştırmada kullanılan *Caranx* türleri arasındaki morfolojik karşılaştırmanın derecesi “Truss Network Sistemi” (Strauss ve Bookstein, 1982; Turan, 1999, Turan, 2004) ile incelenmiştir. Balık materyali önceden hazırlanan 2 cm kalınlığındaki straforun üzerine sol lateralden ölçüm yapılabilecek bir şekilde yüzgeç ışınları ile vücut pozisyonu uygun bir vaziyette yerleştirilmiş ve balığın ağız ucu noktası ile kuyruk yüzgecinin ön kısmından diseksiyon iğnesi ile sabitlenmiştir. Balık üzerinde belirlenen noktalardan “Truss Network Sistemine” göre 14 noktadan alınan truss ölçümleri ve oluşan ölçüm ağı Şekil 3.5’de gösterilmiştir. Bu bilgilere ek olarak göz çapı ve baş genişliği ölçümleri de ilaveten truss verilerine eklenmiştir.



Şekil 3.5. Truss Network Sistemine göre *Caranx* türleri üzerinde 14 noktadan alınan “Truss ölçümleri” ve oluşan ölçüm ağı

1) Burunun en uç noktası. 2) Neurocranium’dan sonra gelen kısım (ense ölçümünün başlangıcı). 3) 1. sırt yüzgecin başlangıcı. 4) 1. sırt yüzgecin sonu 5) 2. sırt yüzgecin başlangıcı. sonu. 6) 2. sırt yüzgecin sonu. 7) Kuyruk yüzgecinin sırt bölümüne ait ön kısmı. 8) omurga kemiğinin son kısmı. 9) Kuyruk yüzgecinin karın bölümüne ait ön kısmı. 10) Anal yüzgecin sonu. 11) Anal yüzgecin başlangıcı. 12) Anal yüzgeç önü sert ışın başlangıcı 13) Ventral yüzgecin başlangıcı. 14) Çene kemiğinin en son bitim noktası.

3.2.2.2 Morfolojik Verilerin Çok Değişkenli Analizi

Analizler her bir balık örneğinden 36 farklı morfometrik karakter ve 12 meristik karakter üzerinde yapılmıştır. Türler arasındaki taksonomik ilişkinin şeklini ve derecesini bulmada kümeler arası korelasyon analizi ve ana bileşenler analizi kullanılmıştır. Ana bileşenler Analizi (ABA) türler arasındaki farklılık oluşturan morfometrik karakterleri tespit etmede kullanılmaktadır. (Somers, 1986). Kümeler arası korelasyon analizi (KAKA) ise, türleri sahip oldukları morfolojik farklılıklara göre ayırt etmektedir. KAKA sonucu oluşan denklemler türler arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerin eldesinde kullanılmıştır. Analizlerde allometrik boyut faktörü analizlerden dışlanmıştır.

3.2.4 Morfolojik Verilerin İstatistikî Analizi

Ölçümü yapılan türlerin çok değişkenli analizlerinde, ana bileşenler analizi, kümeler arası korelasyon analizi ve tek değişkenli varyans analizi kullanılmıştır. İlgili

hesaplamalar “SPSS, Statistica for Windows V 15.0” ve Excel Windows 2007 paket programları ile yapılmıştır.

3.2.5. Genetik İnceleme

3.2.5.1. Uygulanan Genetik Teknikler

3.2.5.1.1. Mitokondrial DNA’nın Ekstrakte Edilmesi

MtDNA’nın elde edilmesinde Sambrook ve ark. (1989) tarafından verilen standart yöntem uygulanmıştır. Balık örneklerinin sırt kaidesindeki kas dokusundan alınan ve %95’lik etil alkolde muhafaza edilen doku örneklerden yaklaşık 50 mg doku, otoklavlanan her bir eppendorf tüpü içerisine (1,5 ml) üzerlerine sırasıyla 300 µl C-tab (20 g/l CTAB; 1.4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA) buffer solüsyonu ve 50 µl Proteinase K ilave edilip cam çubuk aracılığıyla ezilmiştir. Daha sonra örnekler önceden 55 °C’ye ayarlanan etüvde 2 saat bekletilmiştir. Örnekler her saat başı 20 dakika vorteks de karıştırıldıktan sonra üzerlerine 350µl fenol kloroform isoamil alkol (25:24:1) ilave edilip 15 dakika ters düz edilmek suretiyle karıştırılmıştır. Daha sonra 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin üst tabakaları farklı tüplere alınarak üzerlerine 350µl kloroform isoamil alkol (24:1) ilave edilerek tekrar 15 dakika ters düz edilmek suretiyle karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek üst tabakalar yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bu işlemten sonra örneklerin üzerlerine, derin dondurucuda muhafaza edilen %100 lük etanol den 1 ml eklenip derin dondurucuda 2 saat bekletilmiştir. Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek içlerindeki sıvı dikkatle boşaltılarak yine derin dondurucuda muhafaza edilen bu sefer %70’lik etanol den 1 ml eklenip 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra dikkatlice tüplerdeki sıvı boşaltılarak tüpler peletlerin kuruması için desikatörde bir süre vakumlanmıştır. Daha sonra kuruyan peletlerin üzerine 100 µl TE buffer eklenerek mitokondrial DNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır.

3.2.5.1.2. Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Elektroforez İlemleri

DNA ekstraksiyonu için % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 0,50 gr agaroz, 50 ml saf su ile karıştırılıp mikrodalga fırında köpürüp saydamlaşana kadar bekletilmiştir. Saydamlaşan jel üzerine 1 ml seyreltilmiş 1x TBE Buffer ve 3 µl Ethidium Bromide eklenerek 60 °C' ye kadar soğutulan jel 15x6x9 cm ebatlarındaki elektroforez küveti içerisine dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra, içerisinde seyreltilmiş 1x TBE Buffer bulunan elektroforezis tankına koyulmuş ve 3 µl DNA örnekleri 6 µl'lik loading buffer'la (yükleme çözeltisi) karıştırılarak sırasıyla jeldeki küçük haznelere yerleştirilmiştir. Elektrik akımının gerçekleşmesi için, güç kaynağı 30 dk süre ile 25 mA ve 50 V'a ayarlanmıştır.

Elektroforez tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatılarak jel elektroforez tankından uzaklaştırılmış ve UV transilluminatör cihazında, UV koruyucu maske ile örneklerin DNA yapıları gözlenmiştir.

3.2.5.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile D loop Genlerinin Çoğaltılması

Türler arasındaki genetik farklılığın derecesini belirlemek amacıyla mitokondrial DNA (mtDNA) D loop gen bölgesi kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra, universal primerler kullanarak PZR Metodu ile mtDNA D loop genleri çoğaltılmıştır (Saiki ve ark., 1988). MtDNA D loop genlerinin PZR ile uygulamasında; ilk önce 94 °C'de 4 dakika denatürasyon (35 döngü) ve bunu takiben 94°C'de 30 saniye strand DNA denatürasyonu, 52 °C'de 30 saniye Tm (tavlama) sıcaklığı, 72 °C'de 1,5 dakika ilk uzama ve 72 °C'de 7 dakika son uzama safhası izlenmiştir.

Bunun için aşağıda dizinleri verilen universal primerlerden yararlanılmıştır. Primerler İONTEK (İstanbul) firmasından sağlanmıştır.

D loop mtDNA gen bölgesi primerleri

F: 5'-TAC CCC AAA CTC CCA AAG CTA-3'

R: 5'-GCG GAG GCT TGC ATG TGTA-3'

3.2.5.1.4. Dizileme Analizi

DNA dizi analizleri ya da sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti yada rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır. Ayrıca gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, konsensus dizileri, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir.

3.2.5.1.4.1. Otomatik DNA Dizi Analizi

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi cihazları ve radyoaktif izotop yerine floresan boyalar kullanılır. Bu işlemde dört dideoksinükleotid analoglarında her biri farklı floresan boya ile işaretlenmiştir. Örneğin Adenozin ile sonlanan zincirler, bir renkte iken, Sitozin ile sonlanan zincirler baska bir renktedir ve bu şekilde dört ayrı renk bulunur. Tüm işaretli dideoksinükleotidler tek bir tüpe ilave edilir ve primerler DNA polimerazla uzadıktan sonra, reaksiyon ürünleri jelin tek bir kuyucuguna yüklenir. Jel lazer ışık kaynağı ile taranarak her bandın farklı renkte ısıma vermesi sağlanır. Dizi makinesine bağlı bir dedektör her bandın rengini okur ve A, T, C ve G'den hangisinin olduğunu saptar. Cihazın yazıcısından her biri bir nükleotide karşılık gelen renkli pikler elde edilir

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilir (Sambrook ve ark., 1989).

Genetik Analizatör kapiler sistem içine doldurulan polimer jelmatriks sistemi içerir. Bu polimer jelmatriks çapı nanometre ölçütlerinde olan cam borular içerisine doldurulur. Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır.

Kontrol sistemi tipik bir masa üstü bilgisayar sistemidir. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir.

Elektroforez ünitesi hazırlanan örneğin yüklendiği ve elektroforezin gerçekleştiği kısımdır ve örnek yükleme ünitesi, dedektör ve jel blok ünitesi olmak üzere üç üniteden oluşur. Örnek yükleme ünitesi, örnek yükleme tepsisi ile tepside bağımsız 3 kuyucuk vardır. Bu üç kuyucuktan birincisine içinde yürütme tamponu bulunan tüp yerleştirilir. Bu çözelti elektroforez sırasında uygun akımın oluşmasını sağlar. İkinci ve üçüncü kuyucukta distile su bulunur. Bu kuyucuklarda kapiler sistemin örneklerle temas eden kısımlarının temizliği otomatik olarak yapılır. Dedektör ünitesi ise, kapilerin (cam boru) bir ucu platin bir çubuğun yanındadır. Platin çubuk katot görevi görür. Platin çubuktan polimer bloğa kadar olan bölüm lazer ünitesi hariç, ısıtıcı ile sabit sıcaklıkta tutulan bir zemin üzerindedir (ısı ünitesi). Bundan sonra gelen lazer okuyucu ünitesi özel kapaklı bir kutucuk içerisindedir (dedektör ünitesi). Bu ünite sonunda kapiler, polimer blok içerisinde sabitlenir. Jel blok ünitesi üzerinde şırınga takmak için uygun bir delik bulunur. Buraya takılan şırınga içinde kapilere doldurulacak olan stok polimer bulunur. Şırınga üzerinde bulunan bir piston ile kontrol edilir (şırınga pistonu). Polimer bloğun son kısmı ise bir kapakla yürütme çözeltisi ve anodun bulunduğu bölüme açılır.

3.2.5.1.4.1. 1. Genetik Analizatörü Çalışma Programı

Örnek hazırlandıktan sonra cihazda bulunan örnek tepsisine yerleştirilir ve cihaza başlama komutu verilir. Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır.

- 1-Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 50 °C' ye çıkarır.
- 2-Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin platin çubuğa bağlı serbest ucu örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.
- 3- Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler ucu örnek tepsisi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.
- 4-Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratılır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler ucu distile su içerisine döner.
- 5-Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.
- 6-Kapiler serbest ucu temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır. 7-Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V' ye varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest ucundan kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yaydıkları floresan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder.

3.2.5.1.5. Filogenetik Ağaç

Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir (Saitou ve Ğmanishi 1989). Evrimsel ilişkileri görsel olarak ortaya koymak için en uygun araç filogenetik ağaçlardır. Dizileme çalışmaları ile elde edilen bilginin özetlenmesini ve görsel olarak anlaşılabilmesini sağlarlar.

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını

kaydeder. Filogenetik ağaçta, ağaç düğüm ve dallardan oluşur. Dallar, türlerin zaman içerisindeki durumlarını gösterirken, düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türeye ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman ve Herron 1999). Ağaçtaki öncesi olmayan düğüm kökü ifade etmektedir ve kök ortak bir atayı temsil eder ve ağacın herhangi bir yerinde olabilir. Köksüz bir ağaçta ise ortak ata gösterilmeden sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır (Mount, 2001). Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırtedilirler. Ağaç dallarının şekil topoloji olarak adlandırılır ve dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını belirler (Mount, 2001). Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler istenirse referans dizi denilen daha önce saptanmış ve üzerinde uzlaşılarak doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir.

3.2.5.1.5.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Günümüzde kullanılmakta olan yöntemler temel olarak iki ana başlık altında incelenir: Karakter temelli yöntemler; Maximum parsimony, Maximum likelihood, Mr. Bayes olarak tanımlanırken; mesafe temelli yöntemler ise Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), Neighbour joining, Minimum evrim metodu, En az kareler metodu olmak üzere dörde ayrılır (Şahin, 2011; Tez, 2011).

3.2.5.1.5.1.1 Karakter Temelli Yöntemler

Üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter hangi taksonun hangisiyle yakın akraba olduğu konusunda bize yardım eder. Bu karakterler; DNA dizisi, belli iskelet elementleri, embriyonik veya larval gelişmenin şekli gibi özellikler olabilir (Şahin, 2011; Tez, 2011)).

3.2.5.1.5.1.1.1 MP (Maximum Parsimony) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi

Parsimoni metodu, olası birçok filogenetik ağaçlar arasından hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yol göstericidir

(Şahin, 2011). Parsimoniye göre olması en muhtemel ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. Yani en az farklı olan birimler, birbirine çok yakın ve en çok benzeyen birimlerdir. Bu nedenle; Parsimoni (MP), Minimum Evrimsel Metod (parsimoni = tutumluluk) olarak tanımlanabilir.

3.2.5.1.5.1.1.2. ML (Maximum Likelihood) En Yüksek İhtimal Metodu

En yüksek ihtimal metodunda, tüm ağaç topolojileri değerlendirilir. Neticede, yarışan ağaç topolojilerinden en yüksek gerçekleşme olasılığı olan ağaç seçilir. Maximum likelihood yöntemini mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olanıdır. Karakter ve oran analizlerinde kullanılabilirler. Sönmüş (hipotetik) ataların sekanslarını tahmin etmede kullanılabilir. Nükleotid, aminoasit sekansları ve diğer data tiplerine uygulanabilir (Şahin, 2011; Tez, 2011).

3.2.5.1.5.1.1.3. Bayes Metodu

Bayes metodu, temelde maximum likelihood metoduna benzemektedir, ancak sonraki (posterior) olasılık kullanımı nedeniyle bu yöntemden ayrılır. Mevcut gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir durum hakkında sonuç çıkarma prensibine dayanır. Bu metotta baz alınan “önceki olasılık” kavramı analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılığı ifade eder. Bu metod günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Şahin, 2011; Tez, 2011).

3.2.5.1.5.1.2. Mesafe Temelli Yöntemler

Dizi hizalanması sonucu elde edilen hesaplanmış evrimsel mesafeler, her bir takson çifti arasındaki mesafelerin bir matrisinin oluşturulmasında kullanılabilirler. Matristeki bu çiftlerli mesafe skorlarına dayanarak tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulabilir. Bu yöntemde kullanılan algoritmalar, kümelenme temelli veya en iyi durum (optimum durum) temelli olarak iki kola ayrılırlar. Kümelenme temelli algoritmalar, en benzer dizi çiftlerinden başlayan bir mesafe matrisine dayanarak filogenetik ağacı hesap ederler. Bu algoritmalar, aritmetik ortalamayı kullanarak ağırlıklı olmayan çift grup yöntemini (UPGMA-unweighted pair group method algorithm) ve komşu birleştirme yöntemini içerirler. En iyi durum temelli algoritmalar,

pek çok farklı ağaç topolojisini (pek çok noktadan ve dallardan oluşan bir ağ yapısı) karşılaştırılır ve ağaçtaki önceden tahmin edilen mesafeler ile gerçek evrimsel mesafeler arasındaki en iyi uyumu göstereni seçerler (Şahin, 2011; Tez, 2011).

3.2.5.1.5.1.2.1. UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu

Bir takson için uzaklık matrisi gözden geçirilirken, en küçük uzaklık matrisi baz alınır. Hızlı bir yöntemdir ve geniş data setlerini çabukca analiz edebilir fakat karakter analizinde kullanılamazlar. Bir atanın iki yavrusunun aynı miktarda değişime uğradığını (dalların eşit uzunlukta olduğunu) savunması gerçekçi değildir (Şahin, 2011; Tez, 2011).

3.2.5.1.5.1.2.2. Neighbour Joining Komşu Birleştirme Metodu

Bu metod içerik olarak “cluster” analizle alakalıdır. Ancak, dallar boyunca moleküler değişikliklerin eşit olmayan oranları için metot izin verir. Analizin her adımında uzaklık matrisi, düğümlerin her çifti arasında ayarlanan dal uzunluklarının net etkisine sahiptir. Bunun anlamı; tüm diğer düğümlerden farklılıktır. Bu yöntemde bir tane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilmez (Şahin, 2011; Tez, 2011).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Morfolojik Bulgular

Yapılan Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre; 36 ana bileşen üretilmiştir. Bu ana bileşenler sahip oldukları varyasyon yüzdeleri ile tespit edilmiştir. Türlerin ayrımında morfolojik karakterlerin etkinlik derecesine göre ABA unsurlarına göre sıralanışı Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir. Çizelge 4.1.'e göre; birinci ana bileşene göre morfolojik karakterlerden ağırlıklı olarak ikinci dorsal yüzgeç uzunluğu, gözler arası mesafe, ikinci dorsal yüzgeç yumuşak ışıın sayısı gibi yapıların ayrımında etkili olduğu gözlemlenirken, ikinci ana bileşen için ağırlıkça vücut yüksekliği ölçümleri ve lateral hattaki pul sayısının etkili olduğu dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.1. Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre morfolojik karakterlerin etkinlik derecesine göre gösterilmesi

Morfolojik karakterler	Fonksiyon	
	1	2
5-6	0,131(*)	-0,055
GAM	0,130(*)	0,128
D2YIS	0,124(*)	-0,123
10-11	0,115(*)	-0,038
3-4	0,115(*)	0,073
5-10	0,110(*)	-0,005
GC	0,107(*)	0,028
6-11	0,097(*)	-0,027
12-13	0,095(*)	0,085
2-3	0,092(*)	0,066
14-1	0,090(*)	0,019
13-14	0,087(*)	0,041
7-9	0,083(*)	-0,067
7-8	0,082(*)	-0,045

*Herhangi bir ayırt edici özellik ve her bir değişken arasındaki mutlak korelasyon

Çizelge 4.1. (Devam) Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre morfolojik karakterlerin etkinlik derecesine göre gösterilmesi

Morfolojik karakterler	Fonksiyon	
	1	2
8-9	0,078(*)	-0,050
AYIS	0,077(*)	-0,031
7-10	0,061(*)	0,016
9-10	0,052(*)	-0,022
3-13	0,070	0,246(*)
2-14	0,056	0,242(*)
4-12	0,067	0,217(*)
5-12	0,066	0,216(*)
4-11	0,071	0,211(*)
4-13	0,086	0,207(*)
LPS2	-0,030	0,203(*)
3-14	0,099	0,195(*)
5-11	0,061	0,186(*)
2-13	0,092	0,153(*)
3-12	0,088	0,153(*)
1-2	0,055	0,152(*)
SDS	0,050	-0,131(*)
BG	0,086	0,128(*)
DİSIS	0,011	0,125(*)
PYIS	0,004	0,123(*)
6-7	0,014	0,108(*)
LPS1	0,064	0,108(*)
11-12	0,015	0,105(*)
6-10	0,050	0,075(*)
4-5	0,027	0,064(*)
6-9	0,038	0,061(*)
OS	-0,018	0,048(*)

* Her bir değişken arasındaki mutlak korelasyon ve ayırt edici özellik

Türlerin meristik karakterleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Türlerin ayırımında kullanılan meristik karakterler ve değerleri (minimum-maksimum/mod)

Tür	D1SIS	D2SIS	D2YIS	AYSIS	AYIS	PSIS	PYIS	VSIS	VYIS	SDS	OS	YPS1	YPS2
<i>C. hippos</i>	7-8/8	1	20-24/20	3	17-19/17	1	18-20/19	1	5	29-39/34	25	36-40/38	36-44/42
<i>C. crysos</i>	7-8/8	1	23-26/24	3	20-24/20	1	18-22-22	1	5	31-37/35	25	42-47-42	44-50/47
<i>C. rhoncus</i>	7-8/7	1	29-31/30	3	23-25/24	1	18-22/19	1	5	38-50/41	25	40-47/44	34-44/38

D1SIS: Birinci dorsal yüzgeç sert ışın sayısı D2SIS: İkinci dorsal yüzgeç sert ışın sayısı D2YIS: İkinci dorsal yüzgeç yumuşak ışın sayısı AYIS: Anal yüzgeç sert ışın sayısı AYIS: Anal yüzgeç yumuşak ışın sayısı PSIS: Pektoral yüzgeç sert ışın sayısı PYIS: Pektoral yüzgeç Yumuşak ışın sayısı VSIS: Ventral yüzgeç sert ışın sayısı VYIS: Ventral yüzgeç yumuşak ışın sayısı SDS: Solungaç diken sayısı OS: omur sayısı YPS1: Yan hat alt bölge pul sayısı YPS2: Yan hat üst bölge pul sayısı

Kümeler arası korelasyon analizi değerleri Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Kümeler arası korelasyon analizi değerleri

Korelasyonlar	Eigen Değişkeni	Varyans %	Toplam %	Korelasyon
1	308,567	89,1	89,1	0,998
2	37,661	10,9	100,0	0,987

Mevcut ayırma fonksiyonlarından, 1. ayırma fonksiyonu toplam varyasyonun % 89’unu, 2. ayırma fonksiyonu %10,9’unu açıklamaktadır

Yapılan kümeler arası korelasyon analizi sonuçlarından birisi olan istatistik denetimi Çizelge 4.4’de verilmiştir.

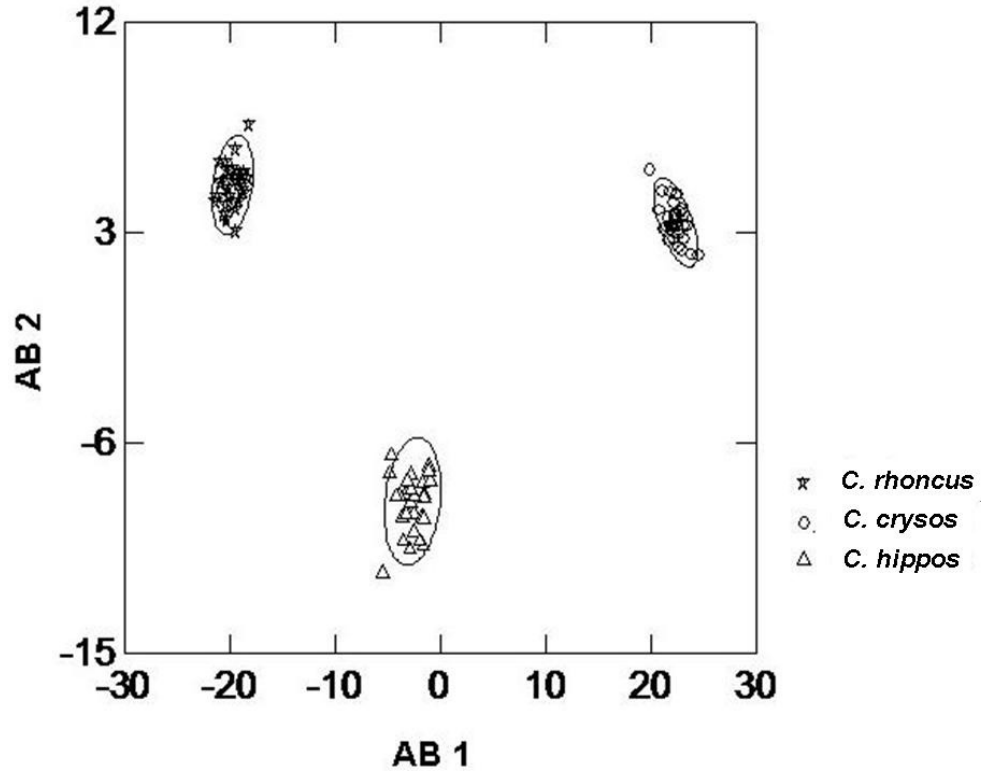
Çizelge 4.4. Kümeler arası korelasyon analizi sonuçlarından birisi olan istatistik denetimi

Fonksiyon testi	Wilks' Lambda	Khi- Kare	Serbestlik Derecesi	Önem Düzeyi
1’in 2.ci fonksiyona olan değeri	0,000	619,741	86	0,000
2	0,026	241,219	42	0,000

Buna göre, ayırma analizinde 2 adet ayırma fonksiyonu elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Wilks’ Lamda değeri ve Khi-Kare değeri, ayrışım modelinin gücünü belirlemek için kullanılmıştır. Wilks’ Lamda, gruplar içindeki homojenliğin ölçülmesinde kullanılmıştır. Lamda, 0 ile 1 arasında değer almaktadır. 0 değeri, grup ortalamalarının farklılaştığı, 1 değeri ise, tüm grup ortalamalarının aynı olduğu anlamına gelmektedir. Wilks’ Lamda değeri tabloda da görüldüğü gibi çok düşük ve 619 gibi büyük bir Khi-Kare ve 0 önemlilik değerine sahiptir. Düşük bir Wilks’ Lamda değeri ve önemlilik p

değeri ile büyük bir Khi-kare değeri, ayrışım modelinin etkili bir ayrıştırma gücüne sahip olduğunu gösterir (Yap ve ark., 2010).

Türlerin birbirleri ile olan morfolojik ilişkisini göstermek amacı ile birinci (AB1) ve ikinci (AB2) korelasyon grafiklendirilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Birinci (AB1) ve ikinci (AB2) korelasyonların grafiklendirilmesi sonucu türlerin morfolojik ilişkisi

Şekil 4.1.'e göre birinci ana bileşende *C. hippos* türünün ayrı gruplandığı gözlemlenirken, ikinci ana bileşende ise *C. rhoncus* ve *C. crysos* türlerinin ayrıldığı gözlenmiştir. Morfolojik olarak da dış bakıdan değerlendirildiğinde vücut formlarının da *C. rhoncus* ve *C. crysos* türlerinde benzerliği dikkat çekerken *C. hippos* türü daha farklı olduğu görülmektedir.

Caranx hippos, *C. crysos*, *C. rhoncus* türünün ayrımında kullanılan morfolojik karakterlerin ortalamaları ve standart sapmaları Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

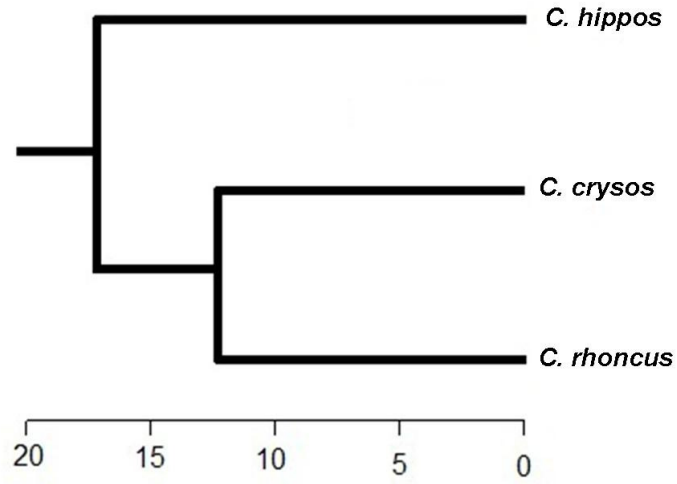
Çizelge 4.5. Türlerin ayırımında kullanılan morfolojik karakterlerin ortalamaları ve standart sapmaları

Morfolojik karakterler	<i>C. hippos</i>		<i>C. crysos</i>		<i>C. rhoncus</i>	
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma
1-2	25,527	3,173	35,751	3,273	32,129	3,169
2-3	24,341	3,175	37,960	4,496	40,881	5,247
3-4	19,157	2,44	29,645	3,350	32,343	2,484
4-5	3,990	0,967	5,577	1,260	5,133	1,032
5-6	55,460	5,202	70,498	5,493	87,368	6,381
6-7	7,944	1,44	10,573	1,978	8,603	1,317
7-8	7,310	1,459	10,068	1,698	13,689	2,185
8-9	6,507	1,306	8,747	1,595	12,0377	1,983
9-10	7,854	1,481	10,071	2,089	12,567	2,604
10-11	48,562	4,659	60,612	4,279	72,731	5,704
11-12	7,405	1,864	10,532	2,087	8,308	1,759
12-13	30,960	3,840	45,275	4,477	47,203	4,304
13-14	25,618	2,918	35,851	3,607	39,381	4,755
14-1	17,739	2,616	25,092	2,875	28,833	3,342
2-14	28,507	3,050	40,419	2,892	33,944	2,331
2-13	40,0678	3,301	56,290	4,002	54,268	4,378
3-14	45,699	3,625	65,356	4,458	61,378	4,1354
3-13	43,1569	3,154	58,545	3,702	51,468	2,984
3-12	50,596	4,614	71,011	5,229	68,0473	5,343
4-13	50,261	3,798	69,889	4,736	64,209	4,137
4-12	44,898	4,174	61,856	3,913	54,710	3,785
4-11	45,636	4,055	62,977	4,260	56,320	3,783
5-12	44,771	3,980	61,033	3,944	54,059	3,607
5-11	45,546	4,908	61,427	4,343	55,150	3,247
5-10	57,824	6,291	75,193	5,363	87,553	7,409
6-11	50,239	9,582	65,313	4,004	79,526	6,537
6-10	7,7412	1,641	10,801	1,335	10,577	1,254
6-9	11,046	1,638	14,352	2,257	13,983	2,015
7-10	9,805	1,612	13,309	2,107	14,951	2,308

Çizelge 4.5. (Devam) Türlerin ayrımında kullanılan morfolojik karakterlerin ortalamaları ve standart sapmaları

	<i>C. hippos</i>		<i>C. crysos</i>		<i>C. rhoncus</i>	
Morfolojik karakterler	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma
7-9	6,441	0,611	7,697	0,753	9,976	1,407
1-8	133,398	10,160	182,967	12,360	210,749	12,276
GC	9,133	0,899	11,733	0,739	12,966	0,927
GAM	12,7833	1,291	19,900	1,213	20,600	1,868
BG	18,816	2,187	29,900	2,171	29,066	4,217
D1SIS	7,266	0,449	7,966	0,182	7,366	0,490
D2SIS	1	0,000	1	0,000	1	0,000
D2YIS	22,500	1,432	24,666	1,604	29,566	0,678
AYSIS	3	0,000	3	0,000	3	0,000
AYIS	19,433	1,406	21,900	2,040	24,600	1,162
PSIS	1	0,000	1	0,000	1	0,000
PYIS	19,133	0,899	21,300	2,002	19,100	0,959
VSIS	1	0,000	1	0,000	1	0,000
VYIS	5	0,000	5	0,000	5	0,000
SDS	35,366	2,858	34,400	2,206	42,833	4,227
OS	24,966	0,182	25	0,000	24,733	0,449
CB	14,306	0,990	194,700	11,606	218,800	12,279
LPS1	35,166	2,134	44,366	4,421	43,200	2,469
LPS2	40,900	2,981	46,800	3,336	35,300	4,186

Türler arasındaki morfolojik ilişkinin şekli Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Şekil 4.2’ye göre *C. rhoncus* türünün *C. crysos* türüne daha yakın olduğu ve *C. hippos* türünde her iki türden de uzak olduğu gözlemlenmiştir.

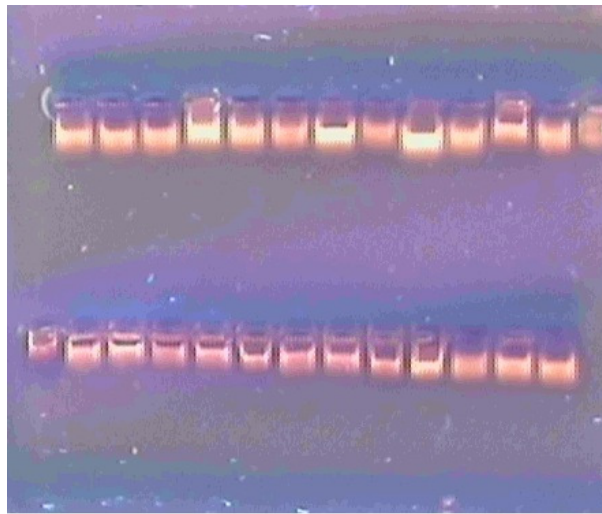


Şekil 4.2. Türler arasındaki morfolojik ilişkinin Neighbour Joining soyağacı ile gösterimi

4.1.2. Genetik Bulgular

4.1.2.1. Toplam DNA'nın Elde Edilmesi

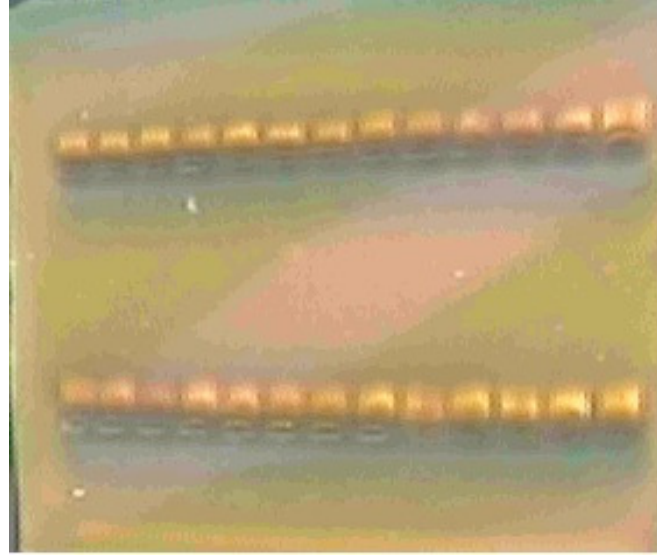
Türkiye denizlerinde bulunan *C. rhoncus*, *C. crysos* ve *C. hippos* türlerinden 20'şer örnek sağlanarak toplam 60 örnek ile türler arasındaki genetik ilişkinin şekli ve derecesi belirlenmeye çalışılmıştır. İzolasyon sonunda total DNA *Caranx* türlerinden başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Ekstrakte Edilen Total DNA'nın Agoraz Jel Üzerinde Kontrolü

4.1.2.2. PZR Elde Edilmesi

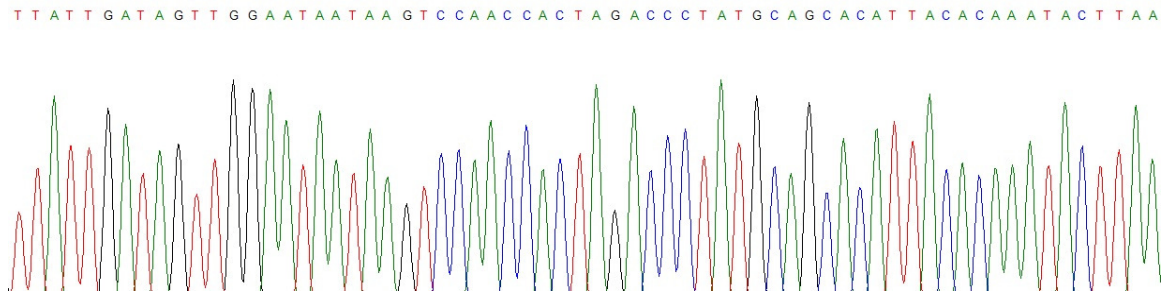
Türkiye denizlerinde bulunan *C. rhoncus*, *C. crysos* ve *C. hippos* türlerinden 20'şer örnek sağlanarak toplam 60 total DNA, PZR işlemine tabi tutulmuştur. Uygulama sonunda MtDNA D loop gen bölgesinin başarılı bir şekilde çoğaltıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Mt DNA D loop gen bölgesinin çoğaltılması

4.1.2.3. D loop Gen Bölgesinin DNA Dizilimlerinin Belirlenmesi

DNA dizilerinin belirlenmesi amacıyla PZR ürünlerine DNA dizileme analizi uygulanmıştır. Analiz sonucu elde edilen DNA dizilimlerinde düzeltme işlemi uygulanmış ve DNA dizileri belirlenmiştir. DNA dizileme analizi sonucunda elde edilen DNA dizilimlerinin kromatografisinin bir örneği Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. DNA dizilim analizi sonucu elde edilen D loop gen bölgesinin parça kromatografisinden bir örnek

4.1.2.4 Dizileme ve Dizi Analizi

Çoğaltılan mtDNA D loop bölgelerinin DNA dizileme reaksiyonlarının yapılması için PZR ürünleri Refgen laboratuvarına gönderilmiştir. DNA dizilerinin görsel olarak gözden geçirilmesi için BioEdit (Hall, 1999) programı kullanıldı. DNA dizilerinin kirlilik düzeyine bakılarak istenilen saflık düzeyinde olan dizilerde gerekli analiz işlemleri yapılarak diziler işlendi. Dizi hizalaması için ClustalW programı kullanıldı. Kopyalanan diziler Clustal W (Thompson ve ark.,1994) programına yapıştırılarak dizi hizalaması gerçekleştirildi.

4.1.2.5. Filogenetik Analiz

Dizileri hizalanan *Caranx* cinsine ait türlerin akrabalık derecelerini öğrenebilmek için filogenetik ağaç oluşturmada mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olan karakter temelli yöntemlerden Maximum Likelihood (ML En Yüksek İhtimal Metodu) ve neighbor joining (NJ) kullanılarak kladistik bir yaklaşım gösterilmiştir (Saitou ve NEI 1987). Analiz edilen mtDNA D loop bölgesinin uzunluğu 610 baz çifti (pb) olduğu tespit edilmiştir.

Dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid kompozisyonu Çizelge 4.6'da verilmiştir. G-C oranlarına bakıldığında (Çizelge 4.6) değerlerin % 38.1-35.7 arasında değişkenlik gösterdiği saptanmış ve ortalama G-C oranı % 37.2 olarak belirlenmiştir. A-T oranı ise % 63.8 ile % 62 arasında değişkenlik göstermiş iken ortalama A-T oranı % 62.8 olarak bulunmuştur.

Cardenas ve ark., (2011)'de *Trachurus* türleri üzerine D loop gen bölgesini dizilediklerinde T ve A hemen hemen eşit miktarlarda olduğunu ve sırası ile %31,1 ile % 30.2 iken C %2.2 ve G %16.5 olarak tespit etmişler. Bizim çalışmamızda T % 30,6, A %32,2 iken C %21,5 ve G %15,7 olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Türler için nükleotid kompozisyonu (%)

	T	C	A	G	G-C	A-T	Toplam
<i>C. crysos</i> 1	30,8	21,8	31,8	15,6	37,4	62,6	610,0
<i>C. crysos</i> 2	30,8	21,8	31,6	15,7	37,5	62,4	610,0
<i>C. crysos</i> 3	31,0	21,5	31,6	15,9	37,4	62,6	610,0
<i>C. crysos</i> 4	31,0	21,5	31,6	15,9	37,4	62,6	610,0
<i>C. crysos</i> 5	30,7	22,0	31,3	16,1	38,1	62	610,0
<i>C. crysos</i> 6	30,8	21,6	31,6	15,9	37,5	62,4	610,0
<i>C. crysos</i> 7	31,0	21,5	31,5	16,1	37,6	62,5	610,0
<i>C. crysos</i> 8	31,0	21,5	31,3	16,2	37,7	62,3	610,0
<i>C. crysos</i> 9	31,0	21,6	31,5	15,9	37,5	62,5	610,0
<i>C. crysos</i> 10	30,5	22,6	31,5	15,4	38	62	610,0
<i>C. hippos</i> 1	29,7	21,8	33,4	15,1	36,9	63,1	610,0
<i>C. hippos</i> 2	30,2	21,1	33,6	15,1	36,2	63,8	610,0
<i>C. hippos</i> 3	29,7	21,6	33,4	15,2	36,8	63,1	610,0
<i>C. rhonus</i> 1	30,8	20,5	33,4	15,2	35,7	64,2	610,0
<i>C. rhonus</i> 2	30,7	20,7	33,1	15,6	36,3	63,8	610,0
<i>C. rhonus</i> 3	30,7	20,7	33,1	15,6	36,3	63,8	610,0
Ortalama	30,6	21,5	32,2	15,7	37,2	62,8	610,0

Transisyon/transversiyon oranı (R), tekrar bölgeleri ve parsimoni anlamlı bölgeler Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Nükleotid çifti frekansları

Korunmuş Bölge	365/610
Değişken Bölge	245/610
Parsimoni Anlamlı Bölge	228/610
Tekrar Bölgeleri	17/610
R (si/sv)	1.03

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanılmıştır (Çizelge 4.8). Substitüsyon oranları bir bazdan diğerine substitüsyon geçiş ihtimalini temsil etmektedir. Transisyonel substitüsyon oranları A/G 9,83, T/C 9,83, C/T 16,64 ve G/A 16,64 olarak bulunmuştur. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A %31,43, T %31,43, C %18,57 ve G %18,57'dir.

Çizelge 4.8. Substitüsyon matrisi*

	A	T	C	G
A	-	7.39	4.37	9.83
U	7.39	-	9.83	4.37
C	7.39	16.64	-	4.37
G	16.64	7.39	4.37	-

*Her sayı bir bazdan (sıra) diğerine (sütun) substitüsyon ihtimalini göstermektedir. Transisyonel substitüsyonlar koyu renkte, transversiyonel substitüsyonları ise italik olarak gösterilmiştir.

Tamura 3-parametresine göre türler içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Türler içindeki ortalama genetik uzaklık

Türler	Ortalama Uzaklık	Standart Hata
<i>C. crysos</i>	0.011	0.002
<i>C. rhoncus</i>	0.021	0.003
<i>C. hippos</i>	0.009	0.005

Türler içerisindeki ortalama genetik uzaklık değeri sonuçlarına göre en fazla *C. rhoncus* türünün kendi içerisinde farklılık gösterdiği gözlenirken, *C. hippos* türü de 0.009 gibi bir değeri ile türler içerisindeki farklılığı göstermiştir.

Pairwise genetik uzaklık matrisi Tamura 3 parametre modeline göre oluşturulmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Genetik uzaklık matrisi

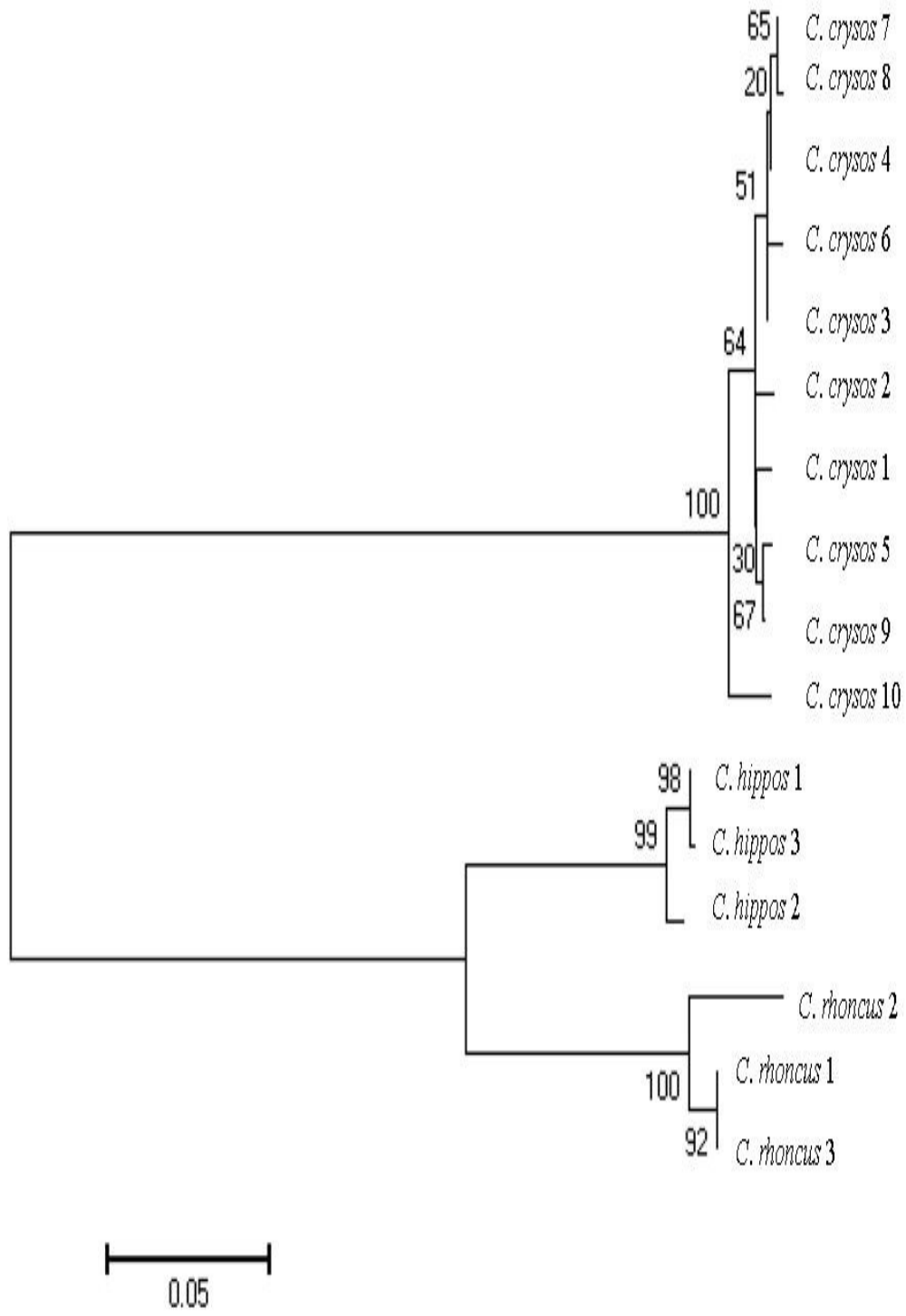
	<i>C. crysos</i>	<i>C. rhoncus</i>	<i>C. hippos</i>
<i>C. crysos</i>	—		
<i>C. rhoncus</i>	0.450	—	
<i>C. hippos</i>	0.461	0.148	—

ML modelini kullanarak metninde açıklanan uzaklık (T92+I)

Elde edilen sonuçlar ile türler arasında en yüksek nükleotid farklılığı *C. crysos* ve *C. hippos* arasında 0.461 ile gösterirken en düşük genetik farklılık ise *C. hippos* ve *C. rhoncus* türleri arasında gözlenmiştir. Türler arası net ortalama genetik uzaklık değeri 0.244 olarak hesaplanırken tür içi net ortalama genetik uzaklık değeri ise 0.485 olarak hesaplanmıştır. *Trachurus* türlerinin D loop dizilimleri üzerine yapılan çalışmada ML için (TRN + I) model kullanarak türler arasındaki yüksek oranda (0,12-10 arası) nükleotid farklılığına rastlamışlar (Cardenas ve ark., 2011). Faria ve ark., (2006) mtDNA cytochrome b ve ND1 bölgelerinin dizileme analizi sonucu *Alosa* türleri için 0,009 ile 0,034 arasında değiştiğini bildirmişler.

Türler arası genetik uzaklıkların belirlenmesinde ise Kimura 2-parametre yönteminden yararlanılmıştır. Evrimsel geçmiş analizlerinde tüm örneklerin nükleotid veri setlerinden yararlanılmıştır. Maximum Likelihood metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Diziler arasındaki genel genetik mesafe (d) değeri 0.485 olarak hesaplanmıştır.

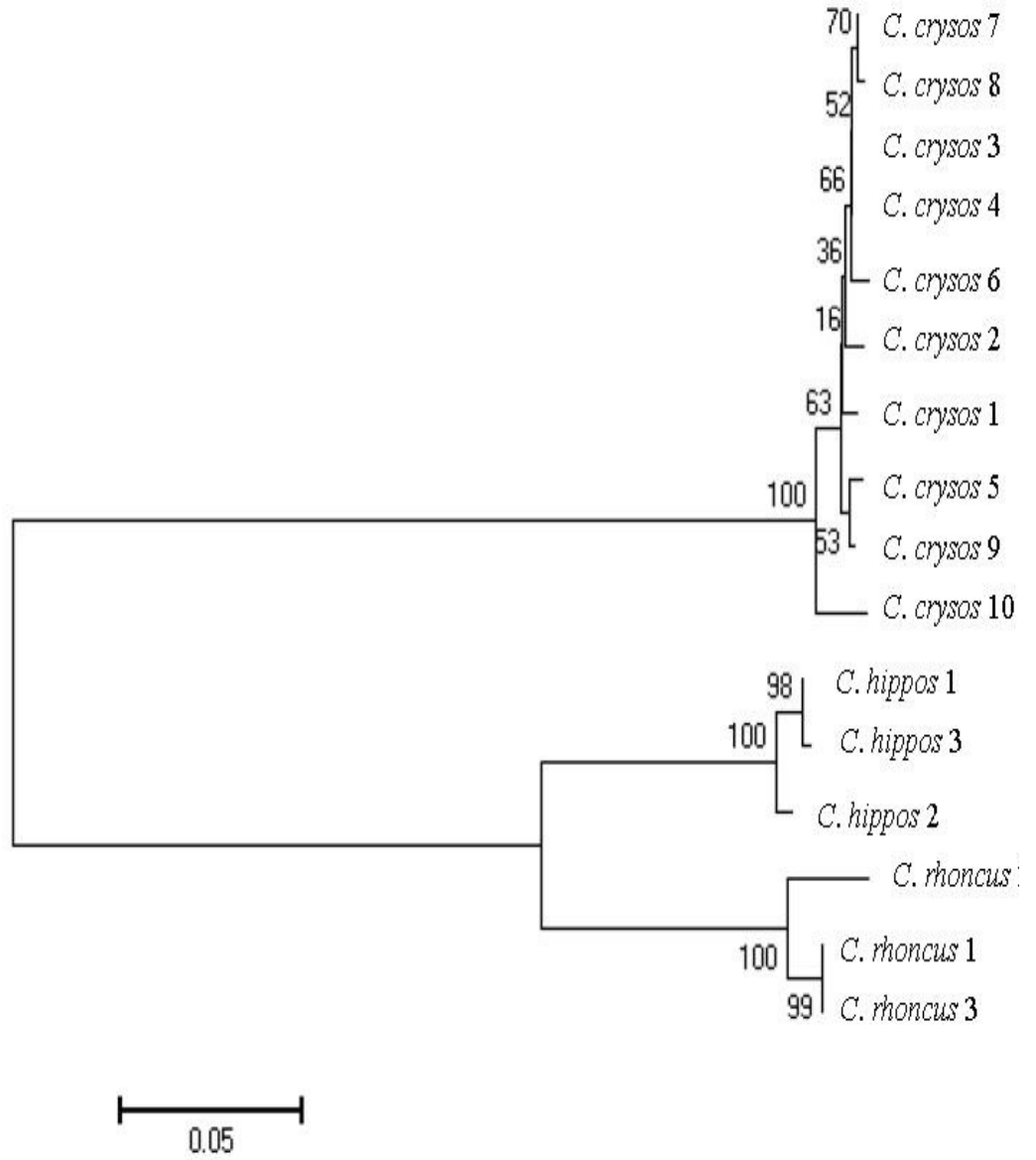


Şekil 4.6. Maximum Likelihood metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan fiologenetik ağaç

Bootstrap yöntemiyle köksüz ağaçlar elde edilmiştir. Her bir dalın yüzdelik oranı o dalın hangi oranda desteklendiğini göstermektedir. Dalın güvenilirlik oranı %50'nin altında ise bu dal çok zayıf olarak değerlendirilir ve o dal çökertilir, çöken dal sonucunda oluşan boş dallanma ise politomi olarak isimlendirilir. Şekil 4.6'da oluşturulan bootstrap ağacı, maksimum ağaç sayısı 1000 seçilerek elde edilmiştir.

Filogenetik ağaç incelendiğinde 2 ana dala ayrıldığı görülmektedir. İkinci ana dalda genetik uzaklık analizleriyle uyumlu bir şekilde *C. crysos* türünün *C. rhoncus* ve *C. hippos* türünden ayrıldığı gözlemlenirken, birinci ana dal kendi içinde 2 dala ayrılmaktadır ve *C. rhoncus* ve *C. hippos* türlerinin daha yakın türler olduğu görülmektedir. Evrimsel geçmiş analizlerinde Neighbour joining metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Bootstrap analizi sonucunda iki ana dala bağlı üç grup oluşmuştur ve üç grubun da desteklenmesi %100'dür. Şekil 4.7'de Maximum Likelihood metoduna paralel olarak *C. crysos* türünün *C. rhoncus* ve *C. hippos* türünden ayrıldığı gözlenilmektedir.

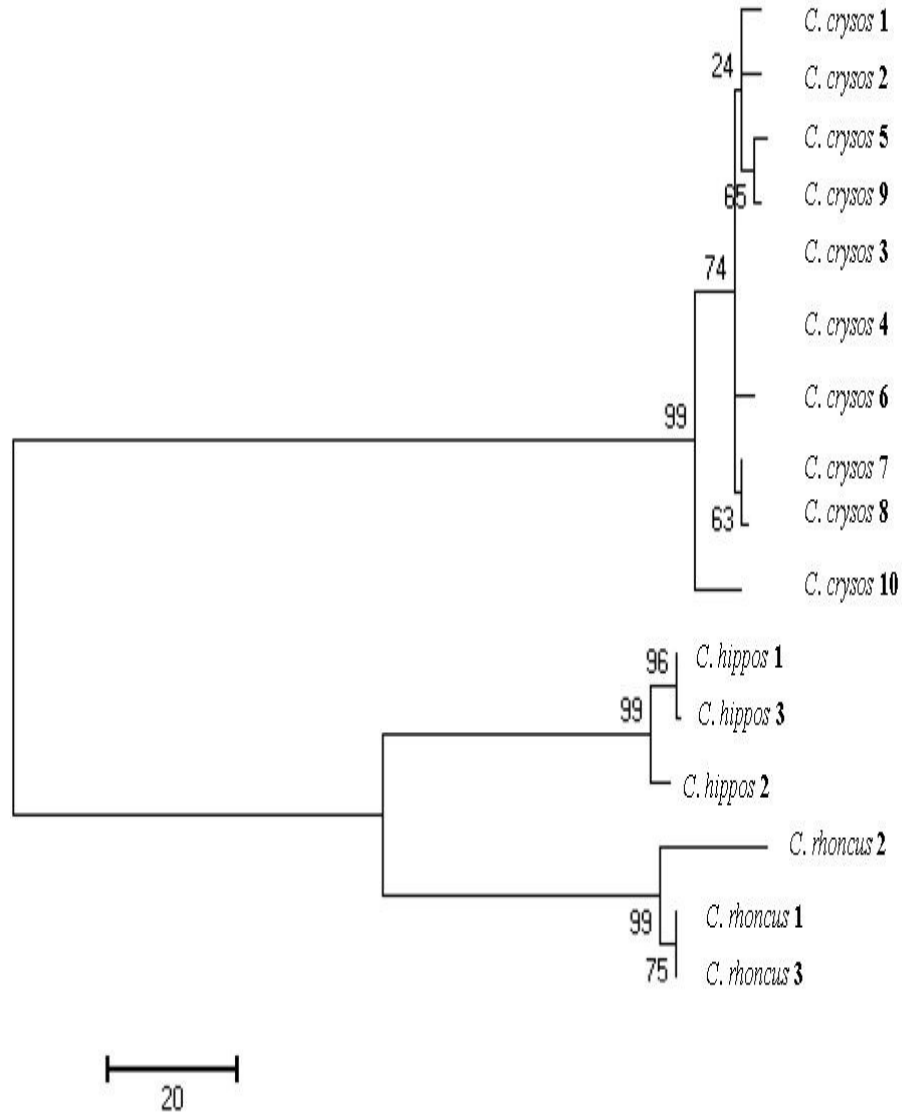
D loop geninin 610 baz çiftlik bu bölgesinin *Caranx* türlerinin filogenetik farklılıklarını tespit etmede başarılı bir moleküler belirteç olduğunun bir başka göstergesi de nükleotid çifti frekansı analizi sonrasında tespit edilen %40.16'lık değişken bölge oranıdır.



Şekil 4.7. Neighbour Joining metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan fiologenetik ağaç

Maximum parsimony metoduna göre oluşturulan fiologenetik ağaç Şekil 4.8’de gösterilmiştir. bootstrap analizinde *Caranx* cinsleri kendi içinde %99 desteklenmiştir.

Maximum parsimony analizi maximum likelihood ve neighbour joining analizlerine paralellik göstererek *C. crysos* türünün diğer türlerden uzak olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8. Maximum parsimony metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç

4.1.2.5.1. *Caranx* Türleri İle *Trachurus* Türlerinin İlişkilendirilmesi

Caranx türleri için elde edilen mtDNA D loop bölgesinin dizilimleri ile Genbank’da mevcut olan *Trachurus* cinsine ait mtDNA D loop bölgesinin dizilimlerinin ilişkilendirilmesi sonucu oluşturulan genetik uzaklık matrisi Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Genbank’tan alınan dizilimlerin türleri ve genbank nosu sırası ile *Trachurus trachurus* (AY533482, AY533483), *Trachurus capensis* (AY533480, AY533481), *Trachurus picturatus* (AY533478, AY533477), *Trachurus mediterraneus*, *Trachurus murphyi* (AY532709, AY532708)’dir.

Çizelge 4.11. *Caranx* ve *Trachurus* türlerinin genetik uzaklık matrisi

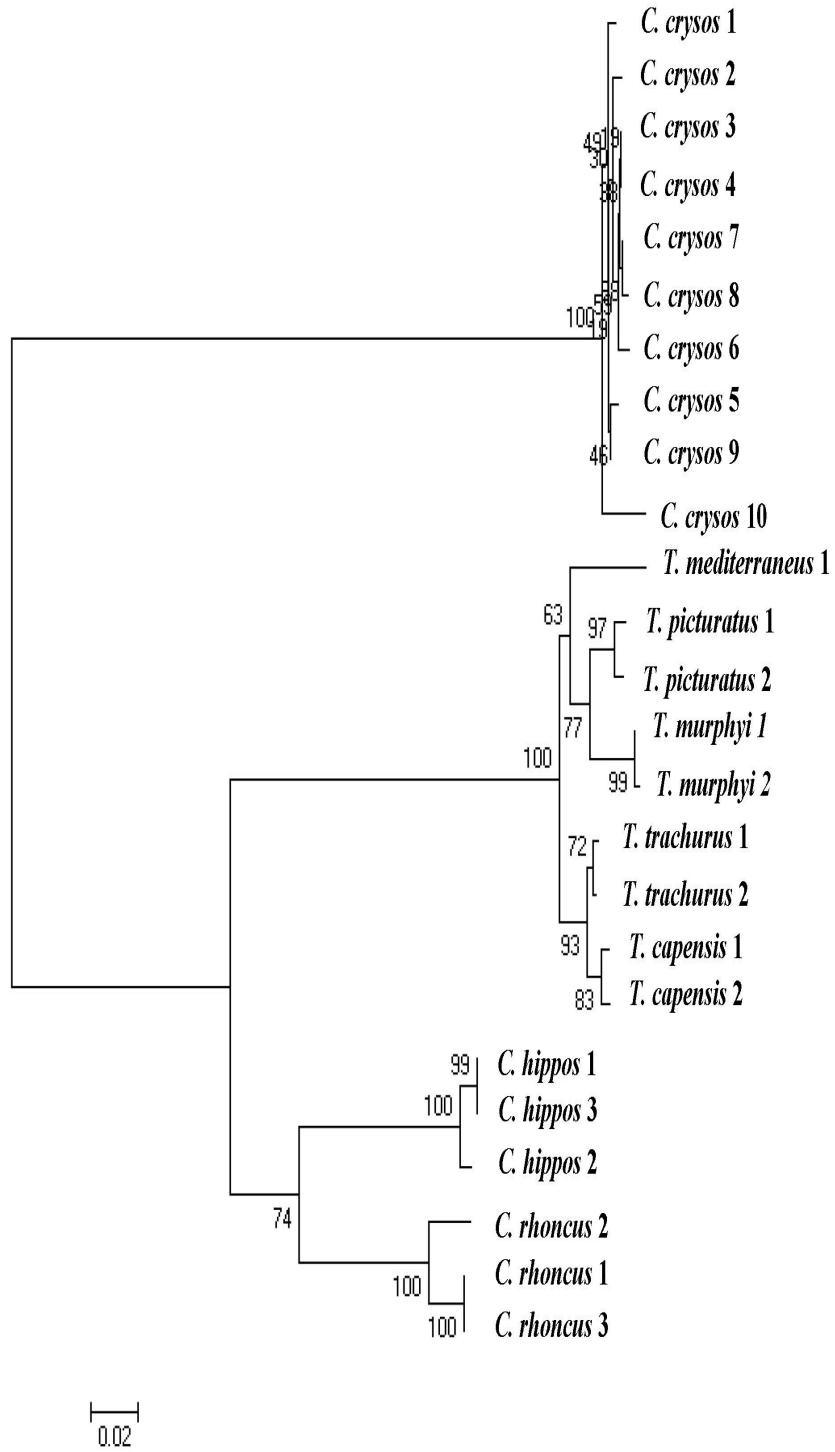
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>C. crysos</i>	—							
2 <i>C. hippos</i>	0.444	—						
3 <i>C. rhoncus</i>	0.468	0.146	—					
4 <i>T. trachurus</i>	0.507	0.278	0.243	—				
5 <i>T. picturatus</i>	0.523	0.284	0.250	0.048	—			
6 <i>T. murphyi</i>	0.528	0.295	0.257	0.050	0.035	—		
7 <i>T. capensis</i>	0.513	0.290	0.252	0.014	0.047	0.046	—	
8 <i>T. mediterraneus</i>	0.538	0.276	0.253	0.060	0.057	0.059	0.060	—

Elde edilen sonuçlar ışığında her iki cins üyelerinin kendi aralarında gruplandığı gözlenirken *C. rhoncus* türünün *Trachurus* cinsi üyelerine diğer *Caranx* türlerine göre daha yakın olduğu ortaya çıkmaktadır. Bektaş ve Beldüz 2009'da *C. rhoncus* ve *Trachurus* türlerinin karşılaştırılmasında PZR tabanlı mtDNA RFLP ve dizileme tekniği ile her iki türün ayrımını gözlemlemişler ve benzer sonuç elde edilmiştir.

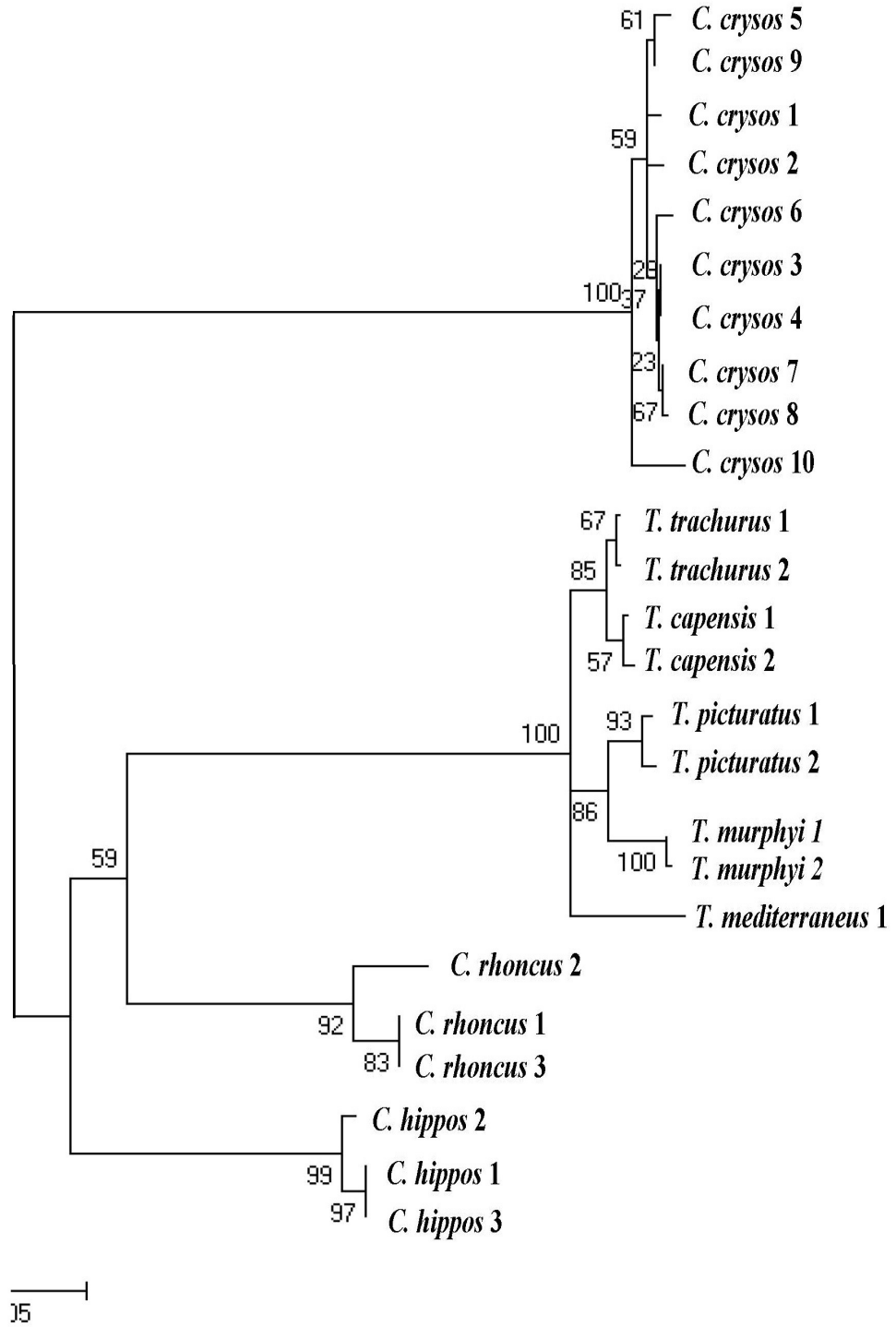
Caranx türleri için elde edilen mtDNA D loop bölgesinin dizilimleri ile Genbank'da mevcut olan *Trachurus* cinsine ait mtDNA D loop bölgesinin dizilimlerinin ilişkilendirilmesi sonucu maximum parsimony metoduna göre elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.9 ve maximum likelihood metoduna göre elde edilen filogenetik Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *Trachurus* türlerinin *Caranx* türlerine uzak olduğu ve her iki cinsin üyelerinin de kendi aralarında dallanmalar gösterdiği gözlenmiştir. Dikkat çeken durum ise *C. crysos* türünün tek bir dal da ayrıldığı, ikinci dalda ise *C. hippos* ve *C. rhoncus* türünün *Trachurus* türlerinden ayrıldığı gözlenirken *C. rhocus* türü *Trachurus* türlerine en yakın olan *Caranx* türü olduğu gözlemlenmiştir. *Trachurus trachurus* türünün *T. capensis* türü ile yakın bir genetik mesafe de olurken *T. picturatus* türünün de *T. murphyi* türüne yakınlığı dikkat çekmektedir. Değerlendirilme yapılan beş türün içerisinde *Trachurus mediterraneus* ayrı bir dal oluşturmuştur, bu dalın bootstrap analizinde %57 desteklendiği gözlemlenmiştir ve diğer dört *Trachurus* türünden de farklı olduğu gözlenmiştir.

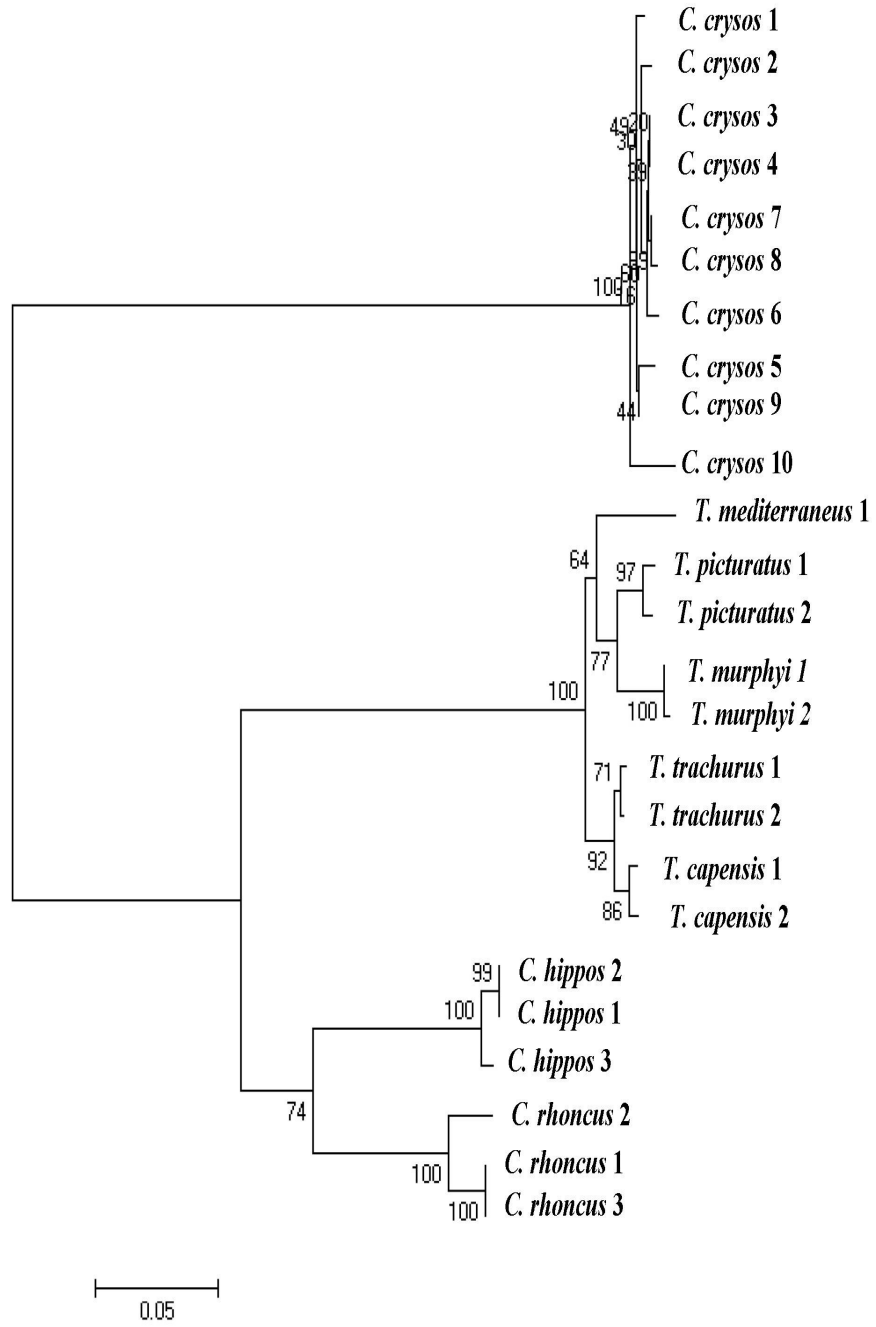
Caranx türleri için elde edilen mtDNA D loop bölgesinin dizilimleri ile Genbank'da mevcut olan *Trachurus* cinsine ait mtDNA D loop bölgesinin dizilimlerinin ilişkilendirilmesi sonucu neighbour joining metoduna göre elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Neighbour joining metodun da maximum parsimony ve maximum likelihood metodu ile benzer sonuçlar çıkardığı dikkat çekmektedir.



Şekil 4.9. Maximum Parsimony metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan *Trachurus* ve *Caranx* türleri için fiolojenetik ağaç



Şekil 4.10. Maximum Likelihood metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan *Trachurus* ve *Caranx* türlerinin filogenetik ilişkisi



Şekil 4.11. Neighbour Joining metoduna göre D loop dizileme analizi sonucu oluşturulan *Trachurus* ve *Caranx* türleri için fiyogenetik ağaç

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Caranx* cinsinin taksonlarının akrabalık ilişkilerini ortaya koymak amacıyla mtDNA’nın D loop gen bölgesi çalışılmıştır. Önceki çalışmalara göre ülkemizde *Caranx* cinsinin türlerine ait daha önce yapılmış böyle bir filogenetik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk olarak *Caranx* türlerinden DNA’lar izole edilmiş, daha sonra mtDNA’nın D loop gen bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çalışma sonucunda *Caranx* türlerinin mtDNA D loop bölgelerinin DNA dizi analizleri ve filogenetik analizler yapılarak ilk kez DNA dizilerine dayalı akrabalık dereceleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hem genetik olarak değerlendirilmesinde ilk kez D loop gen bölgesi kullanılması bakımından, hem de ülkemiz için ekonomik türler olan kral balıklarının moleküler ayırımına yönelik ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır.

Morfolojik analizler sonucu ikinci dorsal yüzgeç uzunluğu, gözler arası mesafe, ikinci dorsal yüzgeç yumuşak ışın sayısı gibi yapıların ayırırda etkili olduğu gözlemlenirken, ikinci ana bileşen için ağırlıkça vücut yüksekliği ölçümleri ve lateral hattaki pul sayısının etkili olduğu dikkat çekmektedir. Ana bileşenler analizi sonucu *C. hippos* türünün diğer türler göre farklı olarak gruplandığı görülmektedir. Morfolojik olarak dış bakıda da değerlendirme yapıldığında *C. hippos* türünün diğerlerinden daha farklı olduğu görülmektedir. Türler arasındaki ilişkinin soy ağacı ile değerlendirilmesi sonucu da oluşan iki ana daldan birinci dalda oluşan çatallaşmada *C. crysos* ve *C. rhoncus* türlerinin daha yakın olduğu gözlemlenirken, *C. hippos* türünün ikinci dalda diğer iki türe göre farklı olduğu gözlenmiştir. Birinci (AB1) ve ikinci (AB2) korelasyonların grafiklendirilmesi sonucu türlerin morfolojik ilişkisi incelendiğinde birinci ana bileşende *C. hippos* türünün ayrı gruplandığı gözlemlenirken, ikinci ana bileşende ise *C. rhoncus* ve *C. crysos* türlerinin ayrıldığı gözlenmiştir.

Genetik uzaklık matrisi değerlendirildiğinde *C. hippos* ve *C. rhoncus* türleri birbirine yakın iki tür olarak gözlenirken, *C. crysos* türünün bu iki türe daha uzak mesafede olduğu görülmektedir. Morfolojik farklılaşma derecesinin genetik farklılaşma ile uyumlu olmadığı belirlenmiştir. Genetik teknikler kullanılmadan önce, morfolojik farklılığın tamamı ile genetik farklılaşmadan kaynaklandığı farz edilmekteydi ve tür ayırımında sadece morfolojik özellikler kullanılmaktaydı (Marr, 1957). Genetik tekniklerin türlerin durumlarını aydınlatmak için yaygın bir şekilde kullanılabileceği

belirtilmiştir (Shaklee ve ark.,1982). Turan ve ark., (2009) Scorpaeniformes familyasına ait Akdeniz’de bulunan iki cins ve altı türün filogenetik ve morfolojik ilişkilerini değerlendirmelerinde morfolojik değerlendirmeler ile genetik değerlendirmelerin örtüşmediğini bildirmişler bu da çalışmamızın sonucuna uygunluk göstermiştir.

Maksimum ağaç sayısı 1000 seçilerek elde edilen bootstrap ağacı, değerlendirildiğinde ise genetik uzaklık analizleriyle uyumlu bir şekilde *C. crysos* türünün *C. rhoncus* ve *C. hippos* türünden ayrıldığı gözlenmiştir. Neighbour joining, maximum likelihood, maximum parsimony metodlarına göre oluşturulan filogenetik ağaçlar benzer sonuçları yansıttıkları görülmektedir.

Filogenetik çalışmalarda morfolojik yöntemlerin moleküler çalışmalarla desteklenerek kullanılması çalışmaların güvenilirliği ve daha dayanıklı taksonomik pozisyon oluşturmak amacıyla önerilmektedir.

Caranx türleri için elde edilen mtDNA D loop gen bölgesinin dizilimleri ile Genbank’da mevcut olan *T. trachurus*, *T. capensis*, *T. picturatus*, *T. murphyi*, *T. mediterraneus* türlerine ait mtDNA D loop bölgesinin dizilimlerinin ilişkilendirilmesi sonucu *Trachurus* türlerinin *Caranx* türlerine cins düzeyinde farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Morfolojik olarak istavrit türleri ile karıştırılabilen *C. rhoncus* türünün *Trachurus* cinsi üyelerine diğer *Caranx* türlerine göre daha yakın olduğu ortaya çıkmaktadır. Beş *Trachurus* türünün analizinde ise *T. mediterraneus* türünün diğer türlerden açık bir şekilde farklı olduğu görülmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, mitokondriyal D loop geninin amino asit dizilerinin *Caranx* türleri arasındaki filogenetik sinyali tespit etmede başarılı olduğunu göstermektedir. Çalışmada elde edilen sonuçların değerlendirildiğinde, *C. crysos* türünün diğer türlerden uzak olduğu gözlenmiştir. Mitokondriyal D loop geninin dizileme analizi yanı sıra farklı genlerin ve farklı genetik tekniklerin kullanılması ile bu farklılığın derecesin tespit edilme gerekliliği vardır.

KAYNAKLAR

- Akkiran, N., 1985. A Systematic study on Carangidae (Pisces) Employing the otolith characters in the Eastern Mediterranean. **Bilješke-Notes**, 63: 1-9.
- Akşiray, F., 1987. Türkiye Deniz Balıkları ve Tayin Anahtarı. **İ.Ü. Rektörlüğü Yayınları**. 2. Baskı. No: 3490, İstanbul, 811 s.
- Allan, G.J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E.A., 2004. Molecular Phylogenetic Evidence for the Geographic Origin and Classification of Canary Island Lotus (Fabaceae: Loteae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 32/1, 123.
- Allendorf, F.W., Ryman, N. and Utter, F., 1987. **Genetics and fishery fanagement: Past, pesent and Future in population genetic fisheries management** (Ryman N. and Uttter F., eds.), University of Washington Press, Seattle and London, 1-20.
- Aneer, G., 1985. Some speculations about the Baltic herring (*Clupea harengus membras*) in connection with the eutrophication of the Baltic Sea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 42 (Suppl 1): 83–90.
- Anokhina, L. E., 1971. Maturation of Baltic and White Sea herring with special reference to variations in fecundity and egg diameter. **Rapports et Process-Verbaux des Reunions**, 160: 12–17.
- Avissee, J.C., 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman and Hall, New York, USA, 511.
- Avşar, D., 1994. A Stock differantiation study of the sprat (*Sprattus sprattus phalericus* Risso) off the Southern Coast of the Black Sea. **Fisheries Research**, 19: 363-378.
- Bardakçı F. ve Karataş, M., 2005. **Moleküler belirteçler ve sistematiikte kullanım alanları**. [In: Ed: Karataş, M.] Bölüm 15, 425-434.
- Beacham, T. D., 1983. Variability in median size and age at sexual maturity of Atlantic cod, *Gadus morhua*, on the Scotian shelf in the Northwest Atlantic Ocean. **Fishery Bulletin** 81: 303–321.
- Bektas, Y. ve Belduz, A. O., 2009. PCR based identification and discrimination of Caranx rhonchus (Pisces, Carangidae) based on nuclear and mtDNA sequences. **Journal Animal and Veterinary Advances**, 8(3): 518-525.
- Bembo, D. G., Carvalho, G. R., Cingolani, N., Arneri, E., Glanetti, G. and Pitcher, T. J., 1996. Allozymic and morphometrics evidence for two stock of the european anchovies, *Engraulis encrasicolus* in Adriatic Waters. **Marine Biology**, 126: 529 p.
- Bentzen, P., Legget, W. C. and Brown, G. G., 1988. Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). **Genetics**, 118: 509-518.
- Bermingham, E., Lamb, T. and Avise, J. C., 1986. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. **Journal of Heredity**, 77: 249-252.
- Bermingham, E., Mccafferty, S. S. and Martin, J. C. 1997. **Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the panamanian isthmus. in molecuar systematics of fishes** (T.D. Kocher and C.A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego.

- Bernartchez, L., Guyomard, R. and Bonhomme, F., 1992. DNA Sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote european brown trout. *Salmo trutta* Populations. **Molecular Ecology**, 1: 161-173.
- Bird, L. J., Eppler, D. T. and Checkly, D. M., 1986. Comparison of herring otoliths using series shape analysis. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 43: 1228-1234.
- Bookstein, F. L., 1982. Foundation of Morphometrics, **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 13: 451-470.
- Cardenas, L., Cristian E. H., Poulin, E., Agoulas, A., Kornweld, I. and Ojeda, F. P., 2005. Origin, diversification, and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 35:496-507.
- Cardenas, L., Silva, A. X., Magoulas, A., Cabezas, J., Poulin, E. and Ojeda, F. P., 2009. Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South-eastern Pacific Ocean. **Fisheries Research**, 100:109-115.
- Carvalho, G. R. and Nigmatullin, C. H., 1998. **Stock structure analysis and species identity in the genus, Illex. In Illex Recruitment Dynamics** (PG Rodhouse and R O'Dor, eds.). FAO, Rome, pp. 199-231.
- Casselman, J. M., Collins, J. J., Crossman, P. E., Ihssen, P. E, and Spangler, G. R., 1981. Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) Stock of the Ontario Waters of Lake Huron. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 38: 1775-1789.
- Cohen, B. L. and Weydmann, A., 2005. Molecular evidence that phoronids are a subtaxon of brachiopods (Brachiopoda: Phoronata) and that genetic divergence of metazoan phyla began long before the early cambrian. **Organisms Diversity and Evolution**, 5/4, 253.
- Corti, M., Thorpe, R. S., Sola, L., Sbordon, V. and Cataudella, S., 1988. Multivariate Morphometrics in Aquaculture: a Case Study of Six Stocks of the Common Carp (*Cyprinus carpio*) from Italy. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 45: 1548-1554.
- Çakmak, E., 2008. **Dikenli Yılan Balığı (*Mastacembelus mastacembelus*)'nın morfolojik ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi**. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 50s, Kahramanmaraş.
- Demirsoy, A., 1996. **Genel ve Türkiye zoocoğrafyası (Hayvan Zoocoğrafyası)**. Meteksan yayınları, Ankara, 630 s.
- Demirsoy, A., 1998. **Yaşamın temel kuralları**. Cilt 3, Kısım 1, Ankara, 684 s.
- Desjardins, P. and Morais, R., 1990. Sequence and gene organization of chicken mitochondrial genome. **Jornal of Molecular Biology**, 212: 599-634.
- Doiuchi, R. and Nakabo. T., 2007. Molecular evidence for the taxonomic status of three species of the *Sphyræna obtusata* group (Perciformes: Sphyrænidae) from East Asia, **Ichthyological Research**, 54 (3): 313-316.
- Faria R. Weiss S. and Alexandrino, P., 2006, A Molecular Phylogenetic Perspective on the Evolutionary History of *Alosa spp.* (Clupeidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 40: 298-304.
- Francisco, S. M., Cabral, H., Vieira, M. N. and Almada, V. C., 2006. Contrasts in genetic structure and historical demography of marine and riverine populations

- of *Atherina* at similar geographical scales, **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 69: 655-661.
- Freeman S. and Herron, J. C., 1999. **Evrimsel analiz**, Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytug, S., and Gündüz, G., Palme Yayıncılık
- Friedland, K. D. and Reddin, D. G., 1994. Use of otolith morphology in stock discrimination of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 51: 91-98.
- Gharrett, A. J. and Smoker, W. W., 1993. Genetic components in life history traits contribute to population structure. In Cloud J.G. Thorogaard G.H. (eds). **Genetic conservation of salmonid fishes**. Plenum Press, London, pp 197-202.
- Gürlek, M. ve Turan, C., 2006. Çukurova ve Hatay bölgelerinde bulunan *Tilapia* (*Chiclidae*) türlerinin morfolojik farklılıkları. **Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi**, 23:227-231.
- Haddon, M. and Willis, T.J., 1995. Morphometric and meristic comparison of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*, Trachichthidae) from the puysegur bank and lord-howe-rise, New Zealand, and its implications for stock structure. **Marine Biology**, 123: 19-27.
- Hadorn, E. and Wehner, R., 1974. **Allgemeine Zoologie**. Georg Thime Verlg. Stuttgart, 533 p.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Ser. 41:95-98.
- Ihssen, P. E, Booke, H. E., Casselman, J. M., Mcglade, J. M., Payne, N. R. and Utter,, F. M., 1981. Stock identification: materials and methods. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**, 38: 1838-1855.
- Jeffreys, A. J., Macleod, A., Tamaki, K., Neil, D. L. and Monckton, D. G., 1991. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. **Nature**, 354. p
- Kapuscinski, A. R. D., Lannan, J. E., 1986. A conceptual genetic fitness model for fisheries management. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 43: 1606-1616.
- Kellogg, E. A., 1998. Who's related to whom? Recent results from molecular systematic studies". **Current Opinion in Plant Biology**, 1/2, 149.
- Kocataş, A., 2003. **Ekoloji ve Çevre Biyolojisi**. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları, No: 51, Bornova, İzmir, 597 s.
- Kuru, M., 1999. **Omurgalı hayvanlar**. Palme Yayıncılık, Ankara, 702 s.
- Kühn, A., 1964. **Grundrib der allgemeinen zoologie**. Georg Thieme Vrlg. 15, Aufl., Stuttgart, 309 p.
- Lansman, R. A., Shade, R. O., Shapiro, J. F. and Avise, J. C., 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial dna sequence relatedness in natural populations. techniques and potential applications. **Journal of Molecular Evolution**, 17: 214-226.
- Lydeard, C. and Roe, K. J., 1997. **The phylogenetic utility of the mitochondrial Cytochrome b Gene for inferring relationship among actinopterygian fishes**. In Molecular Systematics of Fishes (T.D. Kocher and C.A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego.
- Magoulas, A. and Zouros, E., 1993. Restriction site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. **Molecular Biology Evolution**, 10: 319-325.

- Marr, J. C., 1957. The problem of defining and recognising subpopulations of fishes. **U.S. Fish and Wildlife Service Spec. Sci. Rep.**, 208: 1-6.
- Mater, S. ve Bilecenoğlu, M., 1999. **Türkiye Deniz Balıkları**. (A. Demirsoy, Ed.), Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası, Meteksan Matbaası, Ankara, 794 s.
- Mater, S., Kaya, M. ve Bilecenoğlu, M., 2000. [Eds.]: **Check-list of Marine fishes of Turkey -Part II** (Classis Osteichthyes). Bornova/İzmir, 13 p.
- Mater, S. ve Meriç, N., 1996. Deniz balıkları [Marine fishes]. In: Kence, A., Bilgin, C.C. (Eds), **Türkiye Omurgalılar Tür Listesi**, Nurol Matbaacılık A.S., Ankara, 129-172.
- Meyer, A., 1987. Phenotypic Plasticity and Heterohrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, Cichlidae) and their Implication for Speciation in Chclid Fishes. **Evolution**, 41: 1357-1369.
- Meyer, A., 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in Fishes. In Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2 (Hochaka & Mommsen, eds.). **Elsevier Science Publiishers**, 1-38.
- Moritz, C., 1991. Evolutionary dynamics of mitochondrial DNA duplications in parthenogenetic geckos, *Heteronotia binoei*. **Genetics**, 129: 221-230.
- Moritz, C., Dowling, T. E. and Brown, W. M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 269-292.
- Mount, D., 2001. **Bioinformatics**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapter 7, Phylogenetic prediction, 281.
- Murakami, K., James, S. A., Randall, J.E. and Suzumoto, A.Y., 2007. Two hybrids of carangid fishes of the genus *Caranx*, *C. ignobilis* – *C. melampygus* and *C. melampygus* – *C. sexfasciatus*, from the Hawaiian Islands. **Zoological Studies**, 46:186–193.
- Nelson, J. S., 2006. **Fishes of the world**. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4th edition. 601 pp.
- Ogden, T. H. and Whiting, M. F., 2005. Phylogeny of Ephemeroptera (Mayflies) based on molecular evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 37/3, 625.
- Podoplelova, Y. and Ryzhakov, G., 2005. Phylogenetic analysis of the order nymphaeales based on the nucleotide sequences of the chloroplast Its2-4 Region. **Plant Science**, 169/3, 606.
- Reznick, D. A., Bryga, H. and Endler, J. A., 1990. Experimentally induced life history evolution in a natural population. **Nature**, 346: 357–359.
- Ricker, W. E., 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**. 191:1-382.
- Robinson, B. W. and Wilson, D. S., 1995. Experimentally induced morphological diversity in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). **Copeia**, 2: 294–305.
- Royle, N. J., Clarkson, R. E., Wong, Z. and Jeffreys, A. J., 1988. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal region of human autosomes. **Genomics**, 3: 352-360.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. J. and Beddington, J. R., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239, 487-491.

- Saitou, N. and Gmanishi, T., 1989. "Relative efficiens of the fith-margoliash, maximum parsimony, maximum-Likelihood, minimum-evolution and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree" **Molecular Biology Evoluotion**, 6, 514.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, Second ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Scott, R. S, Xiang, Y. and Annette, W., 2011. Population structure and comparative phylogeography of jack species (*Caranx ignobilis* and *Caranx. melampygus*) in the High Hawaiian Islands TAGAWA. **Journal of Heredity**, 102 (1):47–54.
- Schaffer W. M. and Elson P. F., 1975. The adaptive significance of variations in life history among local populations of Atlantic salmon in North America. **Ecology**, 56, 577–590.
- Shepherd, G., 1991. Meristic and morphometric variation in Black Sea Bass North Cape Hatteras, North Carolina. **American Journal Fisheries Management**, 11: 139-149.
- Smith, T. D., 1994. **Scaling fisheries: the science of measuring the effects of fishing**, 1855-1955 Cambridge University Press, Cambridge.
- Sick, K., 1961. Haemoglobin polymorphism in fishes. **Nature**, 192: 894-896.
- Somers, K. M., 1986. Multivariate allometry and removal of size with principal components analysis. **Systematic Zoology**, 35, 359-368.
- Stearns, S. C., 1983. A Natural experiment in life-history evolution: field data on the introduction of Mosquitofish (*Gambusia affinis*) to Hawaii. **Evolution**, 37: 601-617.
- Strauss, R. E. and Bookstein, F. L., 1982. The truss body form reconstructions in morphometrics. **Systematic Zoology**, 31: 113-135.
- Şahin, N., 2011. **Türkiye’de yetişen *Serratula l. (asteraceae)* cinsine ait taksonların its nrDNA ve trnl-f cpDNA dizileriyle moleküler sistematik analizi. Yüksek Lisans Tezi** (Basılmamış). Balıkesir Üniversitesi , 72 s, Balıkesir.
- Templeman, W., 1987. Differences in sexual maturity and related characteristics between populations of thorny skate (*Raja radiata*) in the northwest Atlantic. **Journal of Northwest Atlantic Fisheries Society**, 7: 155–167.
- Tez, C., 2011. **Türkiye’de yayılış gösteren *Sideritis l. (lamiaceae)* cinsinin *Empedochla* seksiyonuna ait taksonların its çekirdek ribozomal DNA dizilerine dayalı filogenetik analizi. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir Üniversitesi, 113 s, Balıkesir.**
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Reserach**, 22, 4673–4680.
- Turan, C. 1999. A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: The Truss System. **Turkish Journal of Zoology**, 23:259-263.
-, C., 2004. Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. **ICES Journal of Marine Science**, 61: 774-781.
-, C., 1997. **Population structure of Atlantic herring, *Clupea harengus* L., in the Northeast Atlantic using phenotypic and molecular approaches**. Ph.D. Thesis, University of Hull, U.K., 298 p.

-, C., 2000. Stok ve tür tespitinde kullanılan moleküler genetik teknikler. **IV. Su Ürünleri Sempozyumu, Erzurum**, 151-152.
-, C., 2002. **Genetik**. Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı, Yayın No: 2, Hatay, 169 s.
- Turan, C., Ergüden, D., Gürlek, M., Başusta, N., Turan F. 2004. Morphometric structuring of the Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) Black Sea, Aegean Sea and Northeastern Mediterranean Sea. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, 28:865-871.
- Turan, C., Öztürk, B., Ergüden, D., Gürlek, M., Yağlıoğlu, D., Uygur, N., 2007. Türkiye Kemikli Deniz Balıkları Atlası ve Sistematığı. (C. Turan, Editör) In: **Türkiye Kemikli Deniz Balıkları Atlası**. Nobel Yayınevi, 4: 80–485, Adana.
- Turan, C., Gündüz, I., Gürlek, M., Yağlıoğlu, D., Ergüden, D., 2009. Systematics of Scorpaeniformes Species in the Mediterranean Sea Inferred from Mitochondrial 16S rDNA Sequence and Morphological Data. **Folia Biologica (Kraków)**, 3-4 (57): 219-226
- Utter, F. M., 1991. Biochemical Genetics and Fishery Management: An Historical Perspective. **Journal of Fish Biology**, 39 (Suppl. A): 1-20
- Wallace, D. C., 1986. Mitochondrial Genes and Diseases. **Hospital practice**, 21: 77-92.
- Ward, R. D. and Grewe, P., 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4: 300-325.
- Wen, J., Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O. and Breiteneder, H., 1997. The potential of betv1 homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 8/3, 317.
- Yap, B. C., Yong, D. G and Poon, W. C., 2010. “How Well do financial ratios and multiple discriminant analysis predict company failures in Malaysia”. **International Research Journal of Finance and Economics**, 54: 166-175.
- Yokoyama, J., Suzuki, M., Iwatsuki, K. and Hasebe, M., 2000. Molecular phylogeny of coriaria, with special emphasis on the disjunct distribution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 14/1, 11.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle değerli deneyim ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof Dr. Cemal TURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteğini aldığım sevgili eşim, Su Ürünleri Yüksek Mühendisi Özlem GÜNER GÜRLEK'e, tez çalışmamın yürütülmesi sırasında katkılarda bulunan, Yüksek lisans öğrencisi Burcu ÖZBALCILAR ve Dilruba SEYHAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İskenderun’da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini İskenderun’da tamamladı. Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden 2000 yılında Su Ürünleri Mühendisi ünvanı ile mezun oldu.

2001 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2004 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans’ını tamamladı. Halen Mustafa Kemal Üniversitesi’nde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.