

**Türkiye'nin Akdeniz ve Ege Denizi'ndeki Kılıç Balığı
Popülasyonlarının Mitokondriyal DNA (mtDNA) Kullanılarak
İncelenmesi**

Program Kodu: 1002

Proje No: 113Z405

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. İnci TOGAN

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Vedat ONAR

Doç. Dr. Firdevs Saadet KARAKULAK

Doç. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Tuğrul Zahit ALIÇLI

Bursiyer:

Eren YÜNCÜ

EYLÜL 2014
ANKARA

ÖNSÖZ

Final raporu sunulmakta olan bu projede Türkiye'nin Akdeniz ve Ege Denizi'nde yaşayan kılıç balıklarının mitokondriyal DNA kontrol bölgesinin kısmi dizi analizi yapılarak Türkiye'de yaşayan kılıç balıklarının annesel genetik soyları ve çeşitliliği analiz edilmiştir. Türkiye kıyılarında yaşayan kılıç balıkları Akdeniz stoğunun bir parçası olarak kabul edilmektedir ve bu proje ile ilk defa kıyılarımızda yaşayan bu balıklar ile ilgili genetik bir çalışma yapılmıştır.

Türkiye için ekonomik değeri yüksek olan bu balıklar, Akdeniz'de yaşayan diğer kılıç balıkları ile beraber Atlantik Ton Balıklarının Korunması Uluslararası Komisyonu (ICCAT) tarafından koruma altına alınmıştır. ICCAT raporlarına göre Akdeniz kılıç balıkları hem stok yoğunluğundaki azalma hem de balık ölüm artış nedeniyle korunmada öncelikli hale gelmektedir. Bu proje ile hem yerel hem de küresel anlamda ekonomik değere sahip kılıç balıklarının yönetimi için gerekli genetik bilginin bir kısmı üretilmiştir ve bu bilginin kılıç balığı koruma ve yönetim çalışmalarına katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

Proje, TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi ve Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi ile beraber yürütülmüş ve 12 ayda tamamlanmıştır. Bu işbirliği sonucunu ortaya çıkan bu proje kapsamında kısa sürede özgün içerikli bir yayın çıkarmayı umuyoruz. Yine bu proje aracılığı ile başlayan işbirliğinin yeni projelerle devam etmesini planlamaktayız.

Bu proje TUBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı çerçevesinde desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve dikkatli ve yapıcı yönlendirmeleri için hakemlere teşekkür etmek isteriz.

Prof. Dr. İnci Togan

TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı Projesi

Proje Yürütücüsü

EYLÜL 2014

İÇERİK

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kılıç Balığı	1
1.2. Kılıç Balığı Stokları	2
1.2.1. Indo-Pasifik Stoğu	3
1.2.2. Kuzey Atlantik ve Güney Atlantik Stokları	4
1.2.3. Akdeniz Stoğu	5
1.3. Kılıç balığı Mitokondriyal DNA Bölgesi	6
1.4. Kılıç Balığı Koruma ve Yönetimi	8
1.5. Akdeniz Stoğunun Durumu.....	8
1.6. Türkiye'deki Kılıç Balığı Popülasyonları.....	8
1.7. Antik DNA (aDNA) ve Antik Kılıç Balığı Örnekleri	9
2. ÇALIŞMANIN AMAÇLARI	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Örnekleme ve DNA İzolasyonu	12
3.1.1. Modern Örnekler	12
3.1.2. Antik Kılıç Balığı Örnekleri	13
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	15
3.2.1. Modern Örneklerde mtDNA CR Bölgesinin Çoğaltılması	15
3.2.2. Antik Örneklerde mtDNA CR Bölgesinin Çoğaltılması	16
3.3. mtDNA Kontrol Bölgesi Dizi Analizi	17
3.4. Sonuçların İstatistiksel Analizi	18
3.4.1. Nükleotid Değişim Modelinin Belirlenmesi	18
3.4.2. Komşu Birleştirme (Neighbor Joining-NJ) Ağacı	18
3.4.3. Medyan Birleştirme Ağı Analizi (Median Joining-MJ Network)	19
3.4.4. Popülasyonların Soy Frekansı	19
3.4.5. Baz Dizisine Dayalı Olarak Saptanan Soy Çeşitliliği	19
3.4.6. Nötralite Testleri	21
3.4.7. Popülasyon Parametrelerinin Hesaplanması	23
3.4.8. Popülasyonlar/ Popülasyon Grupları Arası Genetik Farklar	24
4. BULGULAR	26

4.1. Modern Örneklerden DNA İzolasyonu ve PZR	26
4.2. Antik Örneklerden DNA İzolasyonu ve PZR	27
4.3. Kontrol Bölgesi (CR) Dizi Analizi	29
4.4. İstatistiksel Analizler	31
4.4.1. Nükleotid Değişim Modelinin Belirlenmesi	31
4.4.2. Komşu Birleştirme (Neighbor Joining-NJ) Ağacı	31
4.4.3. Medyan Birleştirme Ağı.....	34
4.4.4. Antik Örneklerin Soylarının Belirlenmesi	36
4.4.5. Soyların Popülasyonlara Göre Dağılımı	37
4.4.6. Baz Dizisine Dayalı Olarak Saptanan Soy Çeşitliliği	38
4.4.7. Nötralite Testleri	41
4.4.8. Popülasyonların Etkin Dışı Büyüklüğü.....	41
4.4.9 Popülasyonlar Arasındaki Dışı Göç Oranları	42
4.4.10. Popülasyonlar/ Popülasyon Grupları Arası Genetik Farklar	44
5. TARTIŞMA.....	50
5.1. Kılıç Balığı mtDNA Soylarının Analizi	50
5.2. Akdeniz Kılıç Balığı Popülasyonlarının Analizi	51
5.3. Antik DNA Dizileri.....	53
6. SONUÇ	55
KAYNAKLAR	57
EK 1	65
EK 2	69

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1.1. Kılıç balığı görüntüsü.....	1
Şekil 1.2.1. Dört ana kılıç balığı stoğunun yaşadıkları yerleri gösteren harita.....	3
Şekil 1.2.1.1. Pasifik Okyanusu'nda bulunma ihtimali olan 4 ayrı popülasyonun yerlerini gösteren harita.	4
Şekil 1.2.2.1. Atlantik'te bulunan kılıç balığı yumurtlama bölgeleri.....	5
Şekil 1.2.3.1. Akdeniz'de bulunan kılıç balığı yumurtlama bölgeleri	6
Şekil 1.3.1. Kılıç balığı mtDNA soylarının stoklar bazında frekans değerleri.....	7
Şekil 1.6.1. 1958-2010 yılları arasında Türkiye'deki toplam kılıç balığı üretimini gösteren grafik .	9
Şekil 3.1.1.1. Modern kılıç balığı örneklerinin toplandığı bölgeleri gösteren harita.....	12
Şekil 3.1.1.2. Çalışma kapsamında istatistiksel olarak analiz edilen bütün popülasyonların toplandıkları denizler ve birey sayıları.....	13
Şekil 3.1.2.1. Yenikapı kazılarında ortaya çıkarılan antik Theodosius Limanı'nın yeri	14
Şekil 3.1.2.2. Marmaray kazılarından çıkarılan kılıç balığı kemikleri.....	15
Şekil 4.1.1. İzole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.	26
Şekil 4.1.2. mtDNA CR bölgesinin agaroz jel görüntüsü.....	27
Şekil 4.2.1. Antik örneklerde mtDNA CR bölgesinin 5 parçasının agaroz jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.3.1. Modern kılıçbalığı örneklerinden birinin L15998 ve CSBDH primerleri ile çoğaltılan mtDNA CR bölgesinin 450 bç'lik parçasının birleştirilmiş kromotogramının kısmi görüntüsü. ...	29
Şekil 4.3.3. Akdeniz yelken balığının görüntüsü	30
Şekil 4.4.2.1. mtDNA CR bölgesi dizileri ile çizilen komşu birleştirme ağacı.....	33
Şekil 4.4.3.1 Çalışmada incelenen Akdeniz popülasyonları için oluşturulan Medyan Birleştirme Ağı.....	35
Şekil 4.4.5.1 Akdeniz' de yaşayan modern kılıç balığı popülasyonlarının ve Yenikapı Marmaray kazısından çıkarılan kılıç balığı örneklerinin (aDNA) soy dağılımlarının Akdeniz haritası üzerinde gösterimi	37

Şekil 4.4.6.1 Bütün veri ve her popülasyon için ayrı ayrı A) nükleotid çeşitliliği (π), B) haplotip çeşitliliği (Hd) C) bir popülasyondaki ortalama nükleotid farkı sayısı (k) değerlerine göre ölçülmüş mitokondriyal soy varyasyonu..... 39

Şekil 4.4.10.2.1. Akdeniz'in 6 ayrı bölgesi için PCA analizi A) Bütün veri. B) Soy I dizileri için C) Soy II dizileri..... 46

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.2.1.1. Kılıç balığı mtDNA CR bölgesi için PZR karışımının konsantrasyonları	16
Tablo 3.2.1.2. Kılıç balığı mtDNA CR bölgesi için PZR koşulları.	16
Tablo 3.2.2.1. Kılıç balığı aDNA mtDNA CR bölgesini 5 parça halinde çoğaltılması için her bir primer çiftinde kullanılan PZR karışımının konsantrasyonları	17
Tablo 3.2.2.2. aDNA mtDNA CR bölgesini 5 parça halinde çoğaltılması için her bir primer çiftinde kullanılan PZR koşulları.	17
Tablo 3.4.8.3.1. Excoffier vd.,'nin (1992) çalışmasından alınan genel AMOVA tablosu.....	25
Tablo 4.3.1. Soy I ve soy II'yi birbirinden ayıran mutasyon noktalarının dizi üzerindeki yeri ve bu noktalarda bulunan nükleotid değişimlerinin türü.....	31
Tablo 4.4.4.1. Soy I ve soy II'yi birbirinden ayıran mutasyon noktalarının dizi üzerindeki yeri ve bu noktalarda bulunan nükleotid değişimlerinin türü.....	36
Tablo 4.4.6.1 A) Bütün veri B) Soy I C) Soy II için popülasyonlar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı (K) ve popülasyonlar arasındaki her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı (D_{xy}).....	38
Tablo 4.4.6.2 A) Bütün veri B) Soy I C) Soy II için popülasyonlar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı (K) ve popülasyonlar arasındaki her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı (D_{xy}).....	40
Tablo 4.4.7.1. Soylara Arlequin'e (Excoffier, 2006) göre hesaplanan Tajima'nın D ve F_u 'nın F_s testi sonuçları	41
Tablo 4.4.8.1: Bütün popülasyonlar için A) bütün veri B) soy I verisi C) soy II verisi kullanılarak hesaplanan theta (Θ) ve etkin dışı popülasyon büyüklüğü (N_{EF}).	42
Tablo 4.4.9.1: Bütün popülasyonlar arasındaki bütün veri soy I verisi ve soy II verisi kullanılarak hesaplanmış göç oranları (K.Levant=Kuzey Levant).	43
Tablo 4.4.10.1.1. Hesaplanan ikili F_{ST} değerlerinin anlamlı olup olmadığı	44
Tablo 4.4.10.3.1. Bütün veri kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçları.	48
Tablo 4.4.10.3.2. Soy I verisi kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçları.....	48
Tablo 4.4.10.3.3. Soy II verisi kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçları.....	49

ÖZET

Kılıç balığı (*Xiphias gladius*) hem dünya hem de Türkiye için önemli besin kaynaklarından biridir. Çeşitli moleküler belirteçler kullanılarak yapılan genetik çalışmalar, kılıç balıklarının Kuzey Atlantik, Güney Atlantik, Akdeniz ve Hint-Pasifik olmak üzere 4 ana stoktan oluştuğunu göstermektedir. Şu ana kadar tek bir stok olarak kabul edilen Akdeniz için tek bir koruma ve yönetim senaryosu önerilmiştir.

Türkiye'deki kılıç balığı popülasyonları Akdeniz stoğunun bir parçası olarak kabul edilir. Fakat Türkiye'nin Ege ve Akdeniz kıyılarını içeren herhangi bir genetik çalışma yapılmamıştır. Bu projede, Türkiye'nin Akdeniz (Antalya Körfezi civarından) ve Kıbrıs'ın Karşiyaka kıyısından, Kuzey Levant Denizi'ni temsilen, (n= 42) ve Türkiye'nin Ege Denizi kıyısından Gökçeada ve Çanakkale civarından (n=26) kılıç balığı örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden DNA izole edilerek, mtDNA kontrol bölgesinin 450 baz çiftlik (bç) dizi analizi yapılmıştır. Ayrıca Yenikapı kazılarında çıkartılan örneklerden antik DNA (aDNA) izole edilmiş ve 450 bç'lik bölgesi 5 parça halinde analiz edilmiştir. Sonuçlar birbirleri ve literatürdeki dizi örnekleri ile karşılaştırılarak incelendiğinde Akdeniz'de batıdan doğuya gidildikçe genel olarak genetik çeşitliliğin ve etkin popülasyon sayısının düştüğü ve soy I diye tanımlanan soya ait alt soyların frekansları açısından Ege Denizi kılıç balıklarının Kuzey Levant havzasından değil ama diğer Akdeniz örneklerinden düşük anlamlılık ($p < 0.05$) düzeyinde ayrıldığı gözlenmiştir. Gene soy I'e ait sonuçlar Akdeniz'de bulunan iki yumurtlama alanı (Güney İtalya-Sardunya Adası ve Girit Adası-Fethiye civarı) ile örtüşen batı ve doğu popülasyonları arasında kesin bir farklılaşma değil ancak büyük olasılıkla iki grubun Akdeniz'in orta kısımlarında birbiri ile karıştığı yönünde bilgi vermektedir. Antik örneklerin soy frekansları ise günümüz örneklerine benzemektedir.

Türkiye'de kılıç balığının avlanma oranı 1980'lerden bu yana, her geçen yıl artış göstermiştir. Henüz bu artışın ve Karadeniz ile Marmara'dan kılıç balığının kaybolmasının tüm Akdeniz popülasyonunda daralma olarak hissedilmediği gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, kıyılarımız kılıç balıklarının korunması ve yönetimi çalışmalarına katkıda bulunabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kılıç Balığı, Mitokondriyal DNA (mtDNA), Akdeniz, Kuzey Levant Denizi, Ege Denizi, Antik DNA (aDNA), Yenikapı Kazıları

ABSTRACT

Swordfish (*Xiphias gladius*) is a globally and locally important food source. Studies that were conducted using different molecular markers show global swordfish can be differentiated into four distinct stocks named as North Atlantic, South Atlantic, Mediterranean, and Indo-Pacific. So far, only one conservation and management scenario is offered for Mediterranean which is considered as a single stock.

Swordfish populations in Turkey are considered as a part of the Mediterranean stock. So far, no genetic studies have been conducted on the swordfish populations in the Aegean and Mediterranean shores of Turkey. In this project, swordfish samples were collected from Mediterranean (around Antalya Bay) and Karşıyaka-Cyprus, to represent Northern Levantine Sea (n=42) and Aegean shores, around Gökçeada and Çanakkale (n=26) of Turkey. DNA is extracted from these samples and 450 base pair (bp) long mtDNA control region was sequenced. Moreover, ancient DNAs (aDNA) were extracted from samples unearthed from Yenikapı excavation, and 450 bp mtDNA control region were analyzed in 5 overlapping fragments. When these results were evaluated comparatively with the data in literature, it is observed that genetic variation and effective population size generally decreased from east to west in the Mediterranean Sea and based on frequencies of sub clades of the clade I, Aegean Sea populations are differentiated from all populations at the Mediterranean Sea (except from the Northern Levantine Sea population) with low significance level ($p > 0.05$). Again, based on clade I, there is no implicit differentiation between east and west populations that overlap with two spawning areas (around South Italy-Sardinia Island and Crete Island-Fethiye) in the Mediterranean, but it is very likely that these two groups are mixed around the middle of the Mediterranean. The frequencies of the clades observed in ancient samples are similar to modern swordfish populations.

Production of swordfish in Turkey has been increasing every year since 1980s. It is observed that, this increase and disappearance of swordfish from Marmara and Black Sea has not been expressed as a decline in the population size, yet. Data obtained from this study can contribute to conservation and management of swordfish populations inhabiting Turkish coasts.

Keywords: Swordfish, Mitochondrial DNA (mtDNA), Mediterranean Sea, Northern Levantine Sea, Aegean Sea, Ancient DNA (aDNA), Yenikapı Excavations

1. GİRİŞ

1.1. Kılıç Balığı

Kılıç balığı (*Xiphias gladius* Linnaeus, 1758) yüksek hızda göç eden büyük pelajik bir balıktır (Palko vd., 1981). Kılıç şeklinde uzayan üst çene ile (Şekil 1.1.1) tanımlanan bu balık Dünya'da 61°N - 50°S enlem arasında tüm okyanuslarda yaşar. *Xiphiidae* ailesinin tek üyesidir (Palko vd., 1981).



Şekil 1.1.1. Kılıç balığı görüntüsü (21.08.2013 tarihinde sunulan proje için Antalya-Side açıklarında örnek toplama çalışması sırasında Füsun Özer tarafından çekilmiştir).

Kılıç balığı larva, juvenil ve yetişkin olmak üzere 3 yaşam evresinde incelenebilir (Palko vd., 1981). Yetişkin kılıç balıkları yaklaşık olarak 445 cm uzunluğuna ve 540 kg ağırlığa ulaşabilirler. (Nakamura, 1985). Yaklaşık 4-5 yaşında yumurtlamaya başlarlar ve en az 9 yaşına kadar yaşayabildikleri tahmin edilmektedir (Nelson, 1984).

Kılıç balıkları genellikle tropikal, ılıman ve bazen soğuk sularda 18°C ile 22°C sıcaklıkları arasında yaşarlar (Frimodt, 1995). Sıcaklık değişimlerine karşı yüksek tolerans gösterebilirler. Yetişkin bir dişi beslenmek için sıcaklığın 5°C olduğu soğuk derin sulara inebilir (Palko vd., 1981). Kılıç balıkları çoğunlukla yaz aylarında beslenmek için ılıman veya soğuk sulara, son baharda ise yumurtlamak için sıcak sulara göçe ederler ve larvalar genellikle 24°C ve daha yüksek sıcaklıktaki sularda bulunur (Nakamura, 1985). Gündüzleri çoğunlukla 400 metreden daha derin sularda avlanırlar geceleri ise 150–250 metre derinliktedirler (Abascal vd., 2010). Kılıç balıklarının dikey

düzlemdeki hareketleri ay döngüsüne göre de değişebilir. Dolunayda daha derine inerken yeni ayda yüzeye daha yakın yüzerler (Abascal vd., 2010). Ton balığı, iskarmoz balığı gibi diğer pelajik balıklar ile beslenirler (Nakamura, 1985).

Kılıç balıkları yuvaya dönüş (homing) davranışı gösterir (Alvarado-Bremer vd., 2005^a). Yumurtlama ve beslenme bölgeleri kılıç balıklarının ana yaşam alanlarını oluşturur (Mejuto ve Garcia-Cortes, 2003). Yumurtlama bölgeleri, larval evrenin bulunmasına, yumurtlama dönemindeki dişilerin bölgedeki varlığına ve buna bağlı olarak cinsiyet oranında normale göre oluşan farklılığa göre belirlenir. Yumurtlama bölgelerinde larva ve yumurtlama dönemindeki dişiler daha fazla bulunur. Ayrıca yumurtlama bölgelerinde erkek kılıç balıklarına diğer bölgelere göre daha sık rastlanır (Alvarado-Bremer vd., 2005^a).

1.2. Kılıç Balığı Stokları

Kılıç balığı her ne kadar uzun mesafeler boyunca göç edebilen bir balık olsa da, mtDNA dizi analizi (Alvarado-Bremer vd., 1996; Alvarado-Bremer vd., 1999; Chow ve Takeyama, 2000; Alvarado-Bremer vd., 2005^a, Alvarado-Bremer vd., 2005^b; Lu vd., 2006; Garcia vd., 2011), mtDNA kontrol bölgesi restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism-RFLP) analizi (Kotoulas vd., 1995; Chow vd., 1997), calmodulin (CaM) geninin 4. intronunun RFLP, dizi (Chow ve Takeyama, 2000) ve tek nükleotid polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) analizi (Chow vd., 2007; Smith ve Alvarado-Bremer, 2010), Idh-A dizi analizi (Alvarado-Bremer vd., 2006), aldolase geni (Ald-C) ve CaM intron varyasyonu (Greig vd., 1999) ve mikrosatelit analizi (Kotoulas vd., 2003; Kasapidis vd., 2007, Kotoulas vd., 2007; Kasapidis vd., 2008) gibi farklı genetik belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalar kılıç balıklarının aşağıda adları belirtilen 4 farklı stoktan oluştuğunu göstermiştir (Şekil 1.2.1).

- Indo-Pasifik Stoğu
- Kuzey Atlantik Stoğu
- Güney Atlantik Stoğu
- Akdeniz Stoğu

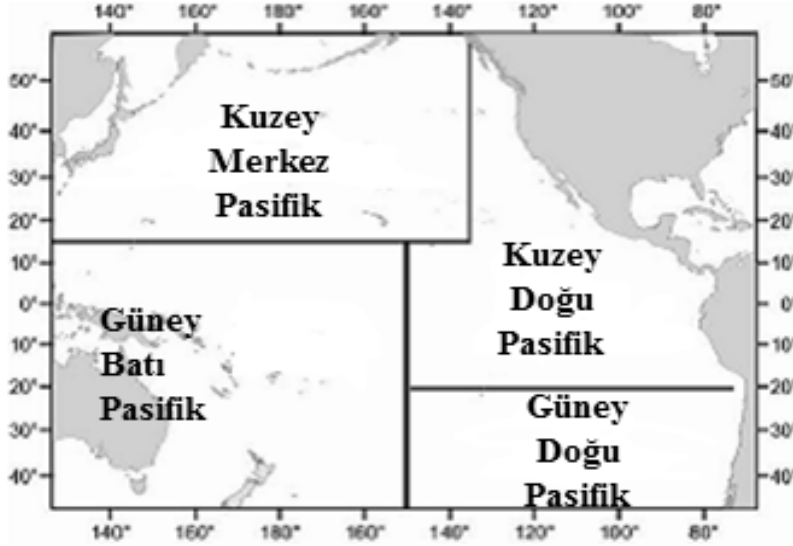


Şekil 1.2.1. Dört ana kılıç balığı stoğunun yaşadıkları yerleri gösteren harita.

Kılıç balıklarında farklı yumurtlama alanlarının bulunması, yuvaya dönme (homing) davranışının olması ve okyanuslarda bulunan akıntı ve anaförler nedeniyle oluşmuş olma olasılığı olan coğrafi bariyerler, göç etme becerisi yüksek olan bu balıklarda farklı stokların oluşmasının nedenleri olarak önerilmektedir (Alvarado-Bremer vd., 1996; Alvarado-Bremer vd., 1998; Chow vd., 2000; Zardoya vd., 2004). Yuvaya dönüş davranışının farklı kılıç balığı stokları oluşturmasına örnek olarak Atlantik'te biri kuzeyde biri güneyde olmak üzere iki farklı yumurtlama alanını ve bun bağlı olarak iki farklı stok bulunmaktadır (Bölüm 1.2.2). İşaretleme yöntemi kullanılarak yapılan farklı çalışmalar bu stokların birbirinden tamamen izole olmadığını ancak stoklar arası geçişin az olduğunu belirtmektedir (Garcia-Cortes vd., 2003; Takahashi vd., 2003, Canese vd., 2008; Abascal vd., 2010).

1.2.1. İndo-Pasifik Stoğu

Yapılan çalışmalar İndo-Pasifik stoğunun kendi içinde heterojen olduğunu göstermektedir. (Alvarado-Bremer vd., 2005^a). Özellikle Pasifik Okyanusu'nda, mtDNA CR bölgesi sekansı (Chow ve Takeyama, 2000; Alvarado-Bremer vd., 2001) ve laktat dehidrogenaz –A (Ldh-A) intron 6 bölgesi dizisi (Alvarado-Bremer vd., 2006) kullanılarak yapılan genetik çalışmalar ile balıkçılık stok analizleri (Hinton, 2003) bu stoğun 4 ayrı bölgesinde Kuzey Merkez Pasifik, Kuzey Doğu Pasifik, Güney Doğu Pasifik ve Güney Batı Pasifik olmak üzere 4 ayrı bölgede farklılaştığını göstermektedir. Bu bölgeler şekil 1.2.1.1'de gösterilmiştir.

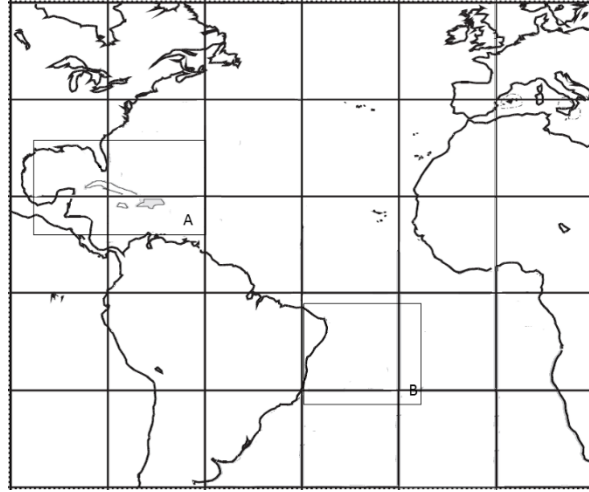


Şekil 1.2.1.1. Pasifik Okyanusu'nda bulunma ihtimali olan 4 ayrı popülasyonun yerlerini gösteren harita (Hinton ve Alvarado-Bremer, 2007).

Indo-Pasifik stoğunda bulunan yumurtlama bölgeleri hakkında bilgi yetersizdir. Fakat yumurtlama döneminin Kuzey Merkez Pasifik'te Mart'tan Temmuz'a kadar Güney Batı Pasifik'te Eylül'den Aralık'a kadar, Kuzey ve Güney Doğu Pasifik'te ise tüm yıl boyunca gerçekleştiği düşünülmektedir (Hinton ve Alvarado-Bremer, 2007).

1.2.2. Kuzey Atlantik ve Güney Atlantik Stokları

Hem Kuzey Atlantik hem de Güney Atlantik stoğu genetik olarak kendi içlerinde iyi tanımlanmıştır. İki stoğun da kendi içinde yok denilebilecek kadar az heterojenlik içerdiği kabul edilmektedir (Alvarado-Bremer vd., 2005^a). Şu ana kadar her stok için en az birer yumurtlama bölgesi tanımlanmıştır. Kuzey Atlantik'teki yumurtlama bölgesi Karayip adalarının yakınında, Güney Atlantik'teki is Brezilya ve Uruguay yakınında bulunmaktadır (Alvarado-Bremer vd., 2005^a). Bu yumurtlama bölgeleri şekil 1.2.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2.2.1. Şekil 1.2.2.1 3 Atlantik'te bulunan kılıç balığı yumurtlama bölgeleri A) Kuzey Atlantik bölgesinde Karayip adaları yakınında B) Güney Atlantik bölgesinde Brezilya ve Uruguay yakınlarında (Alvarado-Bremer vd., 2005^a).

Kuzey Atlantik'te, yumurtlama genelde bütün yıl sürer ancak Aralık ve Şubat arasında en yüksek seviyeye ulaşır. Güney Atlantik'te de aynı şekilde yumurtlama bütün yıl sürer ve Ocak-Mart ile Nisan-Haziran arasında tepe noktasına ulaşır (Arocha, 2007).

1.2.3. Akdeniz Stoğu

Akdeniz'de yaşayan kılıç balıkları ile ilgili bilgiler kesinlik kazanmamıştır. Bilgi eksikliği nedeni ile Akdeniz stoğunun iyi yönetilmemekte olduğu düşünülmektedir (Collete vd., 2011^a). Akdeniz'in doğusunda ve batısında farklı yumurtlama bölgeleri olduğu bilinmektedir (Vinas vd., 2010). Akdeniz'in batısında Sicilya boğazının yakınlarında, Güney İtalya ve Sardunya Adası civarında bir yumurtlama bölgesi olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (Cavallaro vd., 1991). Akdeniz'in doğusunda ise, Levant Denizi'nin (şekil 1.2.3.1'deki mavi ile gösterilen bölge) kuzey batısında, Fethiye ve Rodos adası civarında bir yumurtlama bölgesi olduğu belirlenmiştir (Tserpes vd., 2001). Akdeniz'in batısında ve doğusunda bulunan bu iki yumurtlama bölgesi şekil 1.2.3.1'de gösterilmiştir. Ayrıca, Balearik Adaları, Messina Boğazı, Tiran ve İyon Denizi'nin güneyinde yumurtlamanın arttığı saptanmıştır (Di Natale vd., 2002).

Yumurtlama bahar ve yaz aylarında gerçekleşir genellikle Haziran-Temmuz arasında tepe noktasına ulaşır (Di Natale vd., 2002).



Şekil 1.2.3.1. Akdeniz’de bulunan kılıç balığı yumurtlama bölgeleri A) Batı Akdeniz tarafında Sicilya boğazı yakınlarında, Güney İtalya ve Sardunya Adası civarında (Cavalero vd., 1991) B) Doğu Akdeniz tarafında Levant Denizi’nin (mavi ile gösterilen bölge) kuzeybatısında, Fethiye ve Rodos adası civarında (Tserpes vd., 2001).

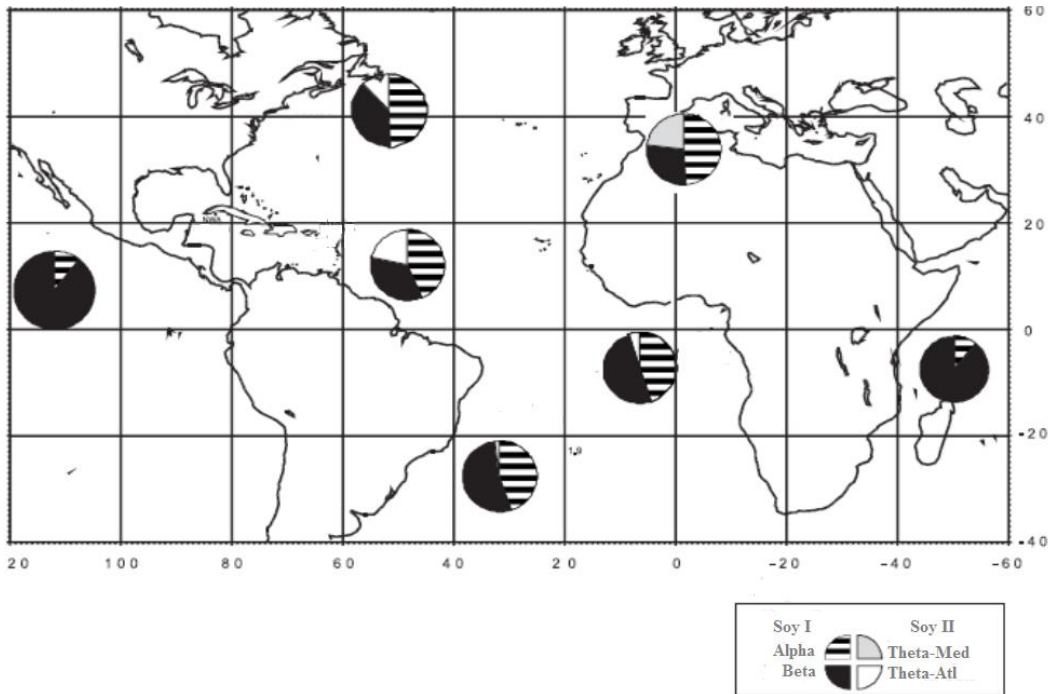
1.3. Kılıç balığı Mitokondriyal DNA Bölgesi

Her ökaryotik hücrenin mitokondrisinde bulunan dairesel bir DNA olan mitokondriyal DNA (mtDNA) popülasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan önemli bir belirteçdir. Yüksek evrimleşme hızına sahip olduğundan yakın zamanda birbirinden ayrılmış türler çalışılabilir. mtDNA dizilerindeki farklar sadece mutasyonlar sonucu ortaya çıkmış olduğu için mtDNA üzerindeki bulunan polimorfizmlerin istatistiksel olarak çalışılması kolaydır ve böylece popülasyonların mtDNA’ya dayalı evrimsel tarihleri incelenebilir. Ancak bu belirteçten elde edilen bilgiler ile genomik DNA’nın çeşitliliği hakkında çok fazla yorum yapılamaz çünkü mtDNA sadece annesel kökenin tarihi hakkında bilgi verebilir ve tek bir gen gibi davrandığı için kendine ait evrimsel dinamikleri bulunur (Bruford vd., 2003; Bruford 2004). mtDNA’nın en hızlı evrimleşen bölgesi olan kontrol bölgesi yer değişim halkasını (displacement loop-D loop) içermektedir. Bu bölge çok hızlı evrimleşme gösterdiği için özellikle memeli hayvanların genetik çeşitlilik ve evrimsel çalışmaları için sıklıkla kullanılır (Bruford vd., 2003). Balıklarda ise bu bölge memelilere göre daha düşük çeşitlilik içerdiğinden özellikle yakın zamanda farklılaşmış popülasyonlar ile yapılan çalışmalarda uygun olmayabilir (Magoulas, 2014). Ancak bu belirteç kılıç balıklarında sıklıkla kullanılmaktadır

ve özellikle Akdeniz kılıç balıkları mtDNA kontrol bölgesi için çok miktarda veri mevcuttur. Bu nedenle sunulan çalışmada bu belirteç kullanılmıştır.

Kılıç balığı mtDNA'sı yaklaşık olarak 16520 baz çifti (bç), CR ise yaklaşık olarak 829 bç uzunluğundadır (Miya vd., 2013). CR'nin L-dizisinin 5' ucunun yakınında 1-3 tane TACA motifli bitişik tekrarlar bulunur (Alvarado-Bremer vd., 2005^b).

Kılıç balığında mtDNA'ya dayalı iki soy (clade) bulunmaktadır. Bunlar soy I ve soy II olarak adlandırılır (Alvarado-Bremer vd., 1996). Daha yüksek haplotip çeşitliliğine sahip olan soy I, bütün okyanuslarda bulunur ve Indo-Pasifik okyanusunda görülebilen tek soydur (Alvarado-Bremer vd., 1996; Chow vd., 1997; Chow ve Takeyama, 2000; Alvarado-Bremer vd., 2005^b). Soy I iki ayrı alt soy içerir. Bu alt soylar alpha (α) ve beta (β) alt soyları olarak adlandırılır. Beta alt soyu Pasifik okyanusunda daha yoğun olarak bulunur (Alvarado-Bremer vd., 2005^b). Soy II ise Akdeniz'de en yüksek frekansa sahiptir (Alvarado-Bremer vd., 2005^b; Vinas vd., 2010). Alvarado-Bremer vd. 'nin (2005^b) çalışmasında soy II'nin salt Akdeniz'de bulunan Theta-Med ve salt Atlantik'de bulunan Theta-Atl olarak adlandırılmış iki ayrı dala ayrıldığı gözlenmiştir. Soy I ve Soy II ile alt soylarının dünya üzerinde dağılımları şekil 1.3.1 üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 1.3.1. Kılıç balığı mtDNA soylarının stoklar bazında frekans değerleri (Alvarado-Bremer vd., 2005^b).

1.4. Kılıç Balığı Koruma ve Yönetimi

Atlantik ve Akdeniz kılıç balığı stokları Uluslararası Atlantik Tuna Koruma Komisyonu (International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna -ICCAT) tarafından, Indo-Pasifik Stoğu ise Uluslararası Inter-Amerikan Tropikal Tuna Koruma Komisyonu (Inter-American Tropical Tuna Commission-IATTC), tarafından korunmakta ve yönetilmektedir. (Collette vd., 2011^a).

Akdeniz kılıç balığı stoğu son 20 yılda dünya çapında %28 azalma göstermiştir. Bu stok iyi yönetilmeyen bir stok olarak değerlendirilmesine rağmen bütün Dünya'daki kılıç balığı popülasyonunun sadece %10'unu kapsadığı için Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (International Union for Conservation of Nature-IUCN), kılıç balığını 'Asgari Kaygı (Least Concern)' olarak sınıflandırmış, popülasyon eğilimini ise "azalmakta" olarak belirlemiştir (Collette vd., 2011^a).

1.5. Akdeniz Stoğunun Durumu

Daha önce de belirtildiği gibi Akdeniz stoğu iyi yönetilmeyen bir stok olarak değerlendirilmektedir (Collette vd., 2011^a). Bu stok hakkında etkili bir koruma programı oluşturmak için yeterli bilgi olmadığı vurgulanmakta bütün Akdeniz ülkelerinin katılımı ile daha çok çalışma yapılması önerilmektedir (Anonymous, 2012).

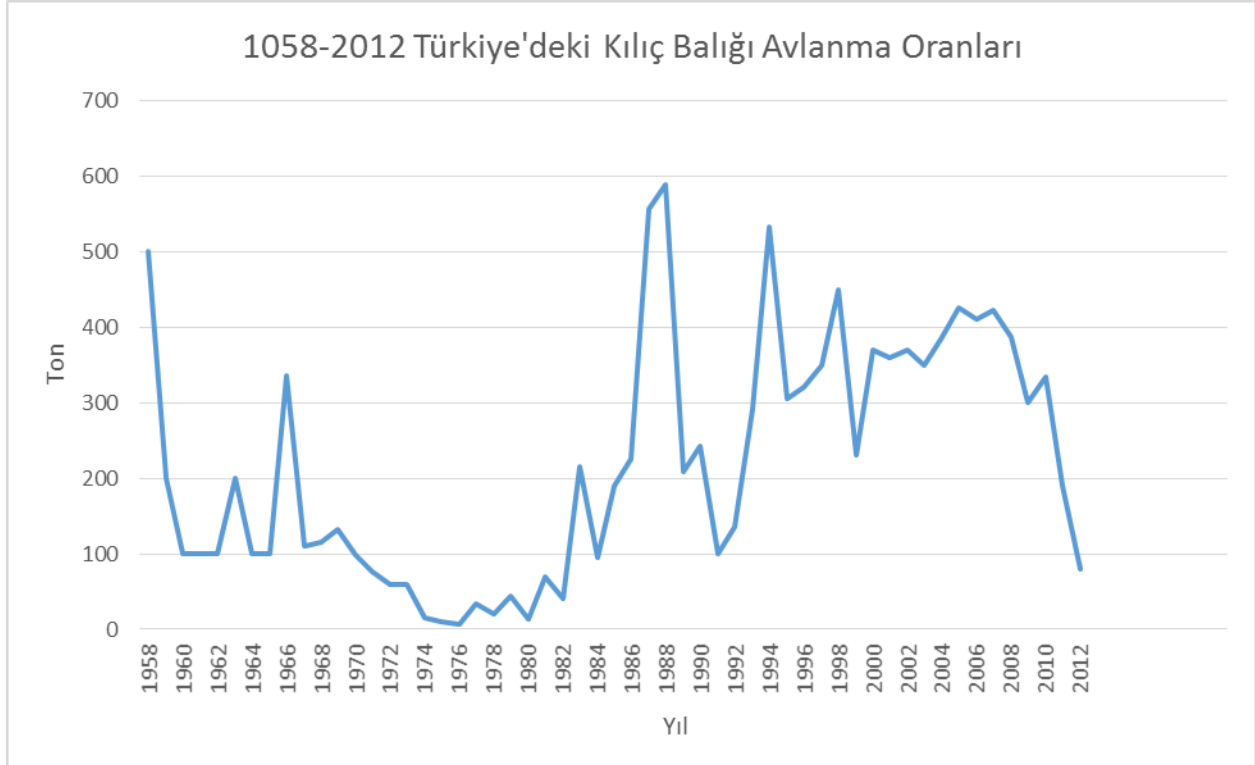
Yüksek bir üretim kapasitesine sahip Akdeniz stoğunun ortalama yıllık avlanma miktarı Kuzey Atlantik stoğu ile yaklaşık olarak aynı olmasına rağmen Kuzey Atlantik stoğunun daha büyük bir popülasyona sahip olduğu bilinmektedir. Bu durum Akdeniz stoğunda aşırı avlanmayı işaret etmektedir (ICCAT, 2014).

Kılıç balıkları yuvaya dönüş davranışı gösterdiği için farklı yumurtlama bölgeleri farklı grupların varlığını işaret ediyor olabilir. Benzer şekilde mtDNA CR bölgesinin 450 bç'lik bir parçasının dizileri kullanılarak yapılan bir çalışma (Vinas vd., 2010), Batı ve Doğu Akdeniz arasında olası bir farklılaşmaya işaret etmektedir. Bu çalışmada Batı Akdeniz'i temsilen Liguria Denizi, Balearik Denizi ve Tunus kıyısından toplanana kılıç balığı örnekleri, Doğu Akdeniz'i temsilen İyon Denizi ve Ege Denizi'nden toplanan örneklerden elde edilen diziler analiz edilmiştir. Bu çalışmada iki soy ayrı ayrı incelendiği zaman Akdeniz stoğunun doğu ve batı ekseninde farklılaştığı gözlemlenmiştir.

1.6. Türkiye'deki Kılıç Balığı Popülasyonları

Günümüzde, Türkiye'de kılıç balığı Akdeniz ve Ege Denizi'nde yaşamaktadır. Literatürde Karadeniz ve Marmara Denizi de kılıç balığı yaşam alanı arasında tanımlansa da yaklaşık 50 yıldır bu bölgelerden çok az kılıç balığı yakalanmıştır (Anonymous, 2007).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO) verilerine göre kılıç balığı avlanma oranları özellikle 1980'lerin ortalarında itibaren artmaya son yıllarda ise düşmeye başlamıştır (Şekil 1.6.1). Dolayısıyla son 30 yılda kılıç balığının ekonomik öneminin arttığı ancak son yıllarda avlanma oranlarının azaldığı söylenebilir.



Şekil 1.6.1. 1958-2010 yılları arasında Türkiye'deki toplam kılıç balığı üretimini gösteren grafik (<http://www.fao.org/fishery/statistics/en> adresinden 2014 yılında alınan veriler kullanılarak hazırlanmıştır).

1.7. Antik DNA (aDNA) ve Antik Kılıç Balığı Örnekleri

Arkeolojik kazılardan elde edilen veya müzelerde bulunan kemik, tohum, fosil kalıntıları, hatta yumurta kabuğu, tüy veya parşömen gibi daha olağan dışı kaynaklardan elde edilen DNA'ya antik DNA (aDNA) denir (Pääbo vd., 2004). Popülasyon genetiği ve moleküler evrim çalışmalarında, antik örneklerden elde edilen DNA kullanılarak, popülasyonların evrimsel tarihi ve genetik çeşitliliklerindeki değişimlerle ilgili modern kaynaklardan elde edilmesi mümkün olmayan bilgiler elde edilir.

Antik kaynaklardan elde edilen DNA (aDNA) Günümüzde yaşayan ve modern olarak tanımlanabilecek kaynaklardan elde edilen DNA'dan çok daha düşük kalitededir. Ölümünden sonra DNA molekülleri hemen parçalanmaya başlar. Ayrıca nükleaz enziminin aktivitesi, hidrolitik

işlemler oksidatif ve mikrobiyal işlemler sonucu aDNA üzerinde ölüm sonrası modifikasyonlar oluşur (Hofreiter vd., 2001). Sıcaklık, ve çevrede bulunan su parçalanmayı hızlandırır ve bir süre sonra aDNA tamamen yok olur (Allendorf vd., 2012). aDNA'nın kontaminasyona açık ve kırılğan yapısı nedeniyle bu çalışmaları sadece antik DNA çalışmalarına adanmış (dedicated), laboratuvarlarda yapılmalıdır (Hofreiter vd., 2001).

İstanbul'da Yenikapı bölgesinde 2004 yılında başlatılan Marmaray-Yenikapı kazısından 6 adet kılıç balığı kemiğın çıkarılmıştır (Onar vd., 2013). Çalışma kapsamında bu örneklerden aDNA izole edilerek, kısmi mtDNA bölgesi analiz edilmiştir.

2. ÇALIŞMANIN AMAÇLARI

Şu ana kadar Akdeniz'in Kuzey Levant bölgesinde ve Ege'nin Anadolu kıyılarında kılıçbalığının genetik yapısını içeren bir çalışma yapılmamıştır. Akdeniz'de bulunan yumurtlama bölgelerinden bir tanesinin Türkiye'de Güney Ege ve Batı Akdeniz kıyılarına yakın olduğu (Tserpes vd., 2001) hatırlanırsa bölgenin çalışılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Gerçekten Doğu ve Batı Akdeniz de genetik farklılaşma varsa bu fark iki yumurtlama alanının varlığı ile ilişkili ise Türkiye sularından yakalanan balıklar genetik açıdan Batı Akdeniz'deki kılıç balıklarından daha farklı olarak ortaya çıkabilir. Bu durum "Doğu stoğunun" var olduğu, izole olduğu ve bu stok için ayrı bir yönetim planının yapılması gerekliliğini ortaya koyabilir. Hatta zayıf bir olasılık da olsa Ege ve Akdeniz de başka yumurtlama alanları ve farklı popülasyonlar olabilir. Gene avlanma baskısı ve yayılım alanı daralmasıyla beraber Bizans döneminde yaşamış olan kılıç balığında mtDNA'ya bağlı genetik çeşitlilik azalmış olabilir.

Sunulan çalışmada, Akdeniz ve Ege kıyılarından günümüzde yaşayan kılıç balığı örnekleri toplanmıştır. Ayrıca erken-geç Bizans olarak tarihlenen antik kılıç balığı örneklerinin (Onar vd., 2013) tamamı da çalışılmak üzere laboratuvarımıza getirilmiştir. Tüm bu örneklerden DNA elde edilerek mtDNA CR bölgesinin 450 bç uzunluğundaki bir kısmı dizilenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler literatürde kullanılan verilerle birlikte analiz edilerek Türkiye sularındaki kılıç balığının bugünkü ve bir oranda geçmişteki genetik yapısını tanımlamak için kullanılmıştır.

Çalışmanın amaçları şu şekilde özetlenebilir:

1. Kuzey Levant Denizi'nin kuzeyi (Türkiye'nin Akdeniz kıyısı ve Kıbrıs'ın kuzey kıyısı; bu çalışmada Kuzey Levant Denizi olarak belirtilmiştir), Ege Denizi ve Akdeniz'in geri kalan bölgelerindeki mtDNA CR yaklaşık 300-450 bç bölgesine dayalı genetik çeşitliliği ve bu coğrafi bölgeler arasındaki olası genetik farklılığı ve göç oranını incelemek.
2. Akdeniz'de bulunan popülasyonların etken popülasyon büyüklüğünü saptamak.
3. Kuzey Levant Denizi ve Ege Denizi arasındaki olası farklılaşmalara bakmak.
4. Antik ve modern örnekleri analiz ederek geçmiş ve şimdiki soy çeşitliliğini karşılaştırmak.
5. Elde edilen verilerle, ICCAT tarafından yürütülen kılıç balığı koruma ve yönetim çalışmalarına katkıda bulunmak.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnekleme ve DNA İzolasyonu

3.1.1. Modern Örnekler

Proje kapsamında Akdeniz'den, 41 tanesi Antalya Körfezi açıklarından ve 1 tanesi Kıbrıs Karşiyaka açıklarından yakalanan toplam 42 balıktan, Ege Denizi'nden ise Çanakkale ve Gökçeada açıklarından yakalanan toplam 26 balıktan doku örneği toplanmıştır. Örneklerin toplandığı yerler Şekil 3.1.1.1'de gösterilmektedir. Toplanan dokulardan DNA izolasyonu GeneJET DNA Safılaştırma Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak ve üretici firmanın tavsiyeleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar jel üzerinde ve nanodrop kullanılarak görüntülenmiş ve miktarları ölçülmüştür.



Şekil 3.1.1.1. Modern kılıç balığı örneklerinin toplandığı bölgeleri gösteren harita.

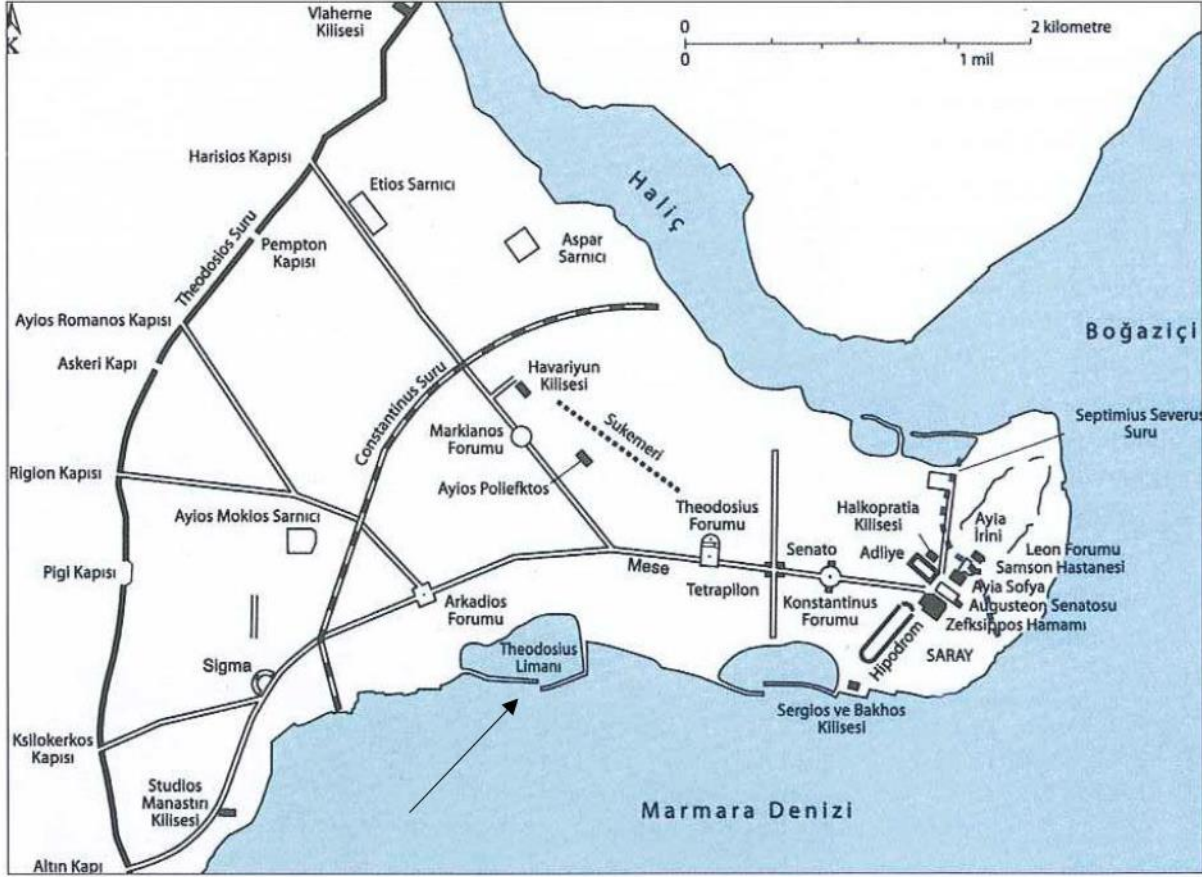
Bu çalışma için toplanan modern örneklerden elde edilen diziler Vinas vd.,'nin (2010) ve Alvarado-Bremer vd.,'nin (2005^b) çalışmalarında elde edilen Akdeniz popülasyonlarına ait 242 adet dizi ile beraber incelenmiştir. GenBank veri tabanından elde edilen bu dizilerin erişim numaraları ve ait olduğu çalışmaların referansları Ek 1'de verilmiştir. Literatürden elde edilen Ege Denizi'ne ait diziler, bu çalışmada elde edilen diziler ile birleştirilmiştir. Çalışma kapsamında istatistiksel olarak analiz edilen bütün popülasyonların toplandığı yerler ve birey sayıları şekil 3.1.1.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1.1.2. Çalışma kapsamında istatistiksel olarak analiz edilen bütün popülasyonların toplandıkları denizler ve birey sayıları (*Bu çalışma kapsamında dizisi elde edilen örnek sayılarını göstermektedir. **Örneklerden birinin kılıç balığına ait olmadığı belirlenmiştir-Bölüm 3.3).

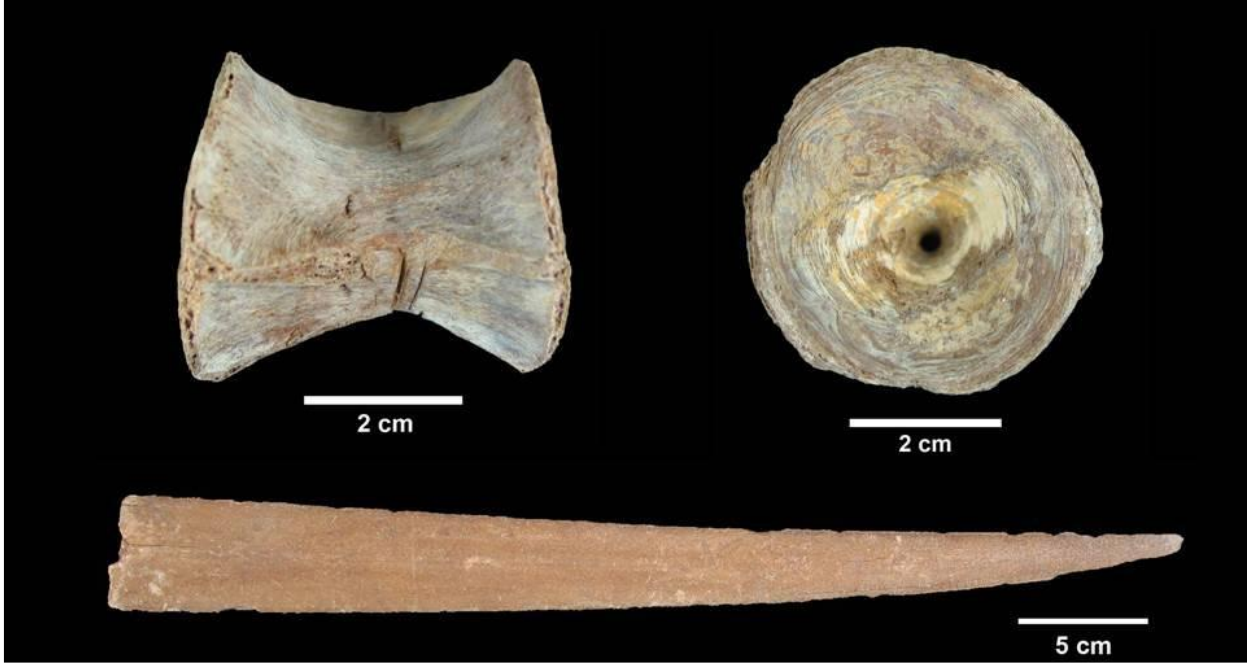
3.1.2. Antik Kılıç Balığı Örnekleri

Marmaray tren hattının Yenikapı istasyonunun inşaatı sırasında çok sayıda gemi enkazı ve havyan iskeleti oraya çıkarılmıştır. Hemen ardından Kültür ve Turizm Bakanlığı ile Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğü tarafından 2004 yılında bölgede arkeolojik kazılar başlatılmıştır. Deniz seviyesinin +3 metre üzerindeki 58.000 m² alanda yapılan bu kazılar sonucu Erken Bizans Dönemi'nin en büyük limanı olan antik Theodosius Limanı ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.1.2.1). Bu liman şekil 3.1.2.1'de görüldüğü gibi Bayrampaşa'da bulunan, günümüzde kurumuş olan, Lykos deresinin ağzındaki doğal koyda bulunmaktadır (Başaran, 2008; Onar vd., 2013)



Şekil 3.1.2.1. Yenikapı kazılarında ortaya çıkarılan antik Theodosius Limanı'nın yeri (Başaran, 2008; Onar vd., 2013).

Yenikapı kazıları sonucunda çok sayıda hayvan kemiği çıkarılmıştır. Bu kemiklerden 6 (5 adet omurga ve 1 adet kılıç şeklinde üst çene kemiği) tanesinin kılıç balığına ait olduğu belirlenmiştir (Onar vd., 2013). Çıkarılan kemiklerin fotoğrafları Şekil 3.1.2.2'de (Onar vd., 2013) gösterilmektedir. Kemikler 4-5 yüzyıl Erken Bizans ve 15. yüzyıl Geç Bizans arasında tarihlendirilmiştir (Onar vd., 2013).



Şekil 3.1.2.2. Marmaray kazılarında çıkarılan kılıç balığı kemikleri (Onar vd., 2013).

Bu kemiklerden DNA elde edilmesi işlemi Orta Doğu Teknik Üniversitesi MODSIMMER binasında, sadece antik DNA çalışmalarına adanmış (dedicated), evrensel standartlara uygun antik DNA (aDNA) laboratuvarında yapılmıştır. Laboratuvara getirilen örneklerden aDNA elde etmek için Rohland vd.,'nin (2010) DNA izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin ayrıntıları Ek 2'de verilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu, genellikle antik örneklerden elde edilen DNA miktarının az olması sebebiyle, DNA kaybını önlemek amacı ile kontrol edilmeden PZR için kullanılmıştır.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.2.1. Modern Örneklerde mtDNA CR Bölgesinin Çoğaltılması

Kılıç balığı mtDNA kontrol bölgesinin yaklaşık 450 bp uzunluğundaki bir parçası Vinas vd.,'nin (2004) çalışmasında belirtilen L15998 ve CSBDH primerleriyle çoğaltılmıştır. Bu primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir.

L15998: 5'-TACCCCAAACCTCCCAAAGCTA-3'
CSBDH: 5'-TGAATTAGGAACCAGATGCCAG-3'

Tablo 3.2.1.1 ve Tablo 3.2.1.2'de mtDNA CR bölgesi için PZR karışımının konsantrasyonları ve PZR koşullarını verilmektedir.

Tablo 3.2.1.1. Kılıç balığı mtDNA CR bölgesi için PZR karışımının konsantrasyonları.

PZR Tamponu	1 X
MgCl ₂	2.0 mM
dNTP	0.4 mM
Primerler	15 pmol
Taq Polimeraz	1 ünite
BSA	5 ng
Toplam Hacim	25 µL

Tablo 3.2.1.2. Kılıç balığı mtDNA CR bölgesi için PZR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95°C	5 dakika	1
Denaturasyon	94°C	45 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	57°C	45 saniye	
Uzama (Extention)	72°C	60 saniye	
Son Uzama (Final Extention)	72°C	15 dakika	1

3.2.2. Antik Örneklerde mtDNA CR Bölgesinin Çoğaltılması

Antik kılıç balığı mtDNA CR bölgesinin modern DNA analizinde de kullanılan yaklaşık 450 bp uzunluğundaki parçası, küçük parçalar halinde olduğu bilindiğinden, Primer Design with Primer 3 (Rozen ve Skaletsky, 2000) programı kullanılarak dizayn edilen 5 primer çifti ile birbirleri ile çakışan 5 parça halinde çoğaltılmıştır. Bu primer çiftlerinin dizileri ve çoğalttıkları bölgelerin uzunluğu aşağıda verilmiştir.

F1: TACCCAAACTCCCAAAGCTA

R1: TGATGTATAAACGTGAATGGTTACAT

Parça Uzunluğu: 177

F2: GCACATAACATGTAATTCGAC

R2: GCTAGGTCTTAAGTTTCTGCTTG

Parça Uzunluğu: 138

F3: AATGTAACCATTACGTTTATACATC

R3: TCGGAATTTGAGTCCTGGTA

Parça Uzunluğu: 150

F4: CAAGCAGAACTTAAGACCTAGCA

R4: ATGCTGGTTGGTGGTCTCTT

Parça Uzunluğu: 111

F5: CCAGGACTCAAATTCGATT

R5: TGAATTAGGAACCAGATGCCAG

Parça Uzunluğu: 150

Tablo 3.2.2.1 ve Tablo 3.2.2.2'de aDNA mtDNA CR bölgesini 5 parça halinde çoğaltılması için her bir primer çiftinde kullanılan PZR karışımının konsantrasyonları ve PZR koşullarını verilmektedir.

Kılıç balığı aDNA örneklerinin PZRu için “AmpliTağ Gold 360” (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) kullanılmıştır.

Tablo 3.2.2.1. Kılıç balığı aDNA mtDNA CR bölgesini 5 parça halinde çoğaltılması için her bir primer çiftinde kullanılan PZR karışımının konsantrasyonları

PZR Tamponu	1 X
MgCl ₂	2.25 mM
dNTP	0.20 mM
Primer	10 pmol
AmpliTağ Polimeraz	3 Ünite
BSA	1 ng
Toplam Hacim	20 µL

Tablo 3.2.2.2. aDNA mtDNA CR bölgesini 5 parça halinde çoğaltılması için her bir primer çiftinde kullanılan PZR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	94°C	15 dakika	1
Denaturasyon	94°C	45 saniye	60
Bağlanma (Annealing)	52°C	45 saniye	
Uzama (Extention)	72°C	60 saniye	
Son Uzama (Final Extention)	72°C	15 dakika	1

3.3. mtDNA Kontrol Bölgesi Dizi Analizi

PZR ile çoğaltılan mtDNA CR bölgesi ürünleri, modern örnekler için %2'lik, antik örnekler için %2.5'lik agaroz jel ile kontrol edilmiştir. GeneJET PZR temizleme kiti (Thermo Scientific) ile temizlenen ürün zincir bitirme yöntemiyle ABI prism 3100 cihazında dizilenmiştir. Dizileme işlemi için PZR ile çoğaltma işleminde kullanılan primerler kullanılarak iki yönlü dizileme yapılmıştır. Dizi verisi ChromasPro v1.5 (<http://www.technelysium.com.au /ChromasPro.html>) programı ile analiz edilmiştir.

Antik örneklerden elde edilen parçalar Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) programı kullanılarak birleştirilmiştir.

aDNA dizileri üzerindeki, canlı öldükten sonra gerçekleşmiş hatalı baz yerleştirmeler olma ihtimali olan nükleotid değişimleri Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) ve ChromasPro v1.5 ile (<http://www.technelysium.com.au /ChromasPro.html>) programları ile belirlenmiştir.

Örneklerden ve veri tabanından elde edilen mtDNA CR dizileri Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) programı ile düzenlemiş ve aynı programın içinde bulunan ClustalW Çoklu Hizalama uygulaması kullanılarak hizalanmıştır.

3.4. Sonuçların İstatistiksel Analizi

3.4.1. Nükleotid Değişim Modelinin Belirlenmesi

Dizi evrim modeli de denilen nükleotid değişim modelinin belirlenmesi genetik ilişkilerin güvenilir bir topolojisini çıkartmak için gereklidir. Analiz edilen diziler için en uygun model Akaike Bilgi Kriteri (Akaike Information Criterion-AIC) (Akaike, 1974) ve Bayesian Bilgi Kriteri (Bayesian Information Criterion-BIC) (Schwarz, 1978)'nin de içinde bulunduğu beş ölçüte göre belirlenmiştir. İlk olarak diziler için maksimum olasılık (maksimum likelihood) değerleri belirlenmiştir. Olabilirlik değerleri, sabit dizi noktası (+I) olması/olmaması, gama dağılımlı heterojenlik oranının (+G) olması/olmaması seçenekleri ve çeşitli parametreler göz önüne alınarak, 6 ana değişim modelini de içeren 88 model için hesaplanır. Bu ana değişim modelleri JC (Jukes ve Cantor, 1969), HKY (Hasegawa, Kishina ve Yano, 1985), TN (Tamura ve Nei, 1993), K81 (Kimura, 1981), TIM (Posada, 2003) ve GTR/REV (Tavaré, 1986) modelleridir. Daha sonra seçme ölçütleri AIC (Formül 3.4.1.1) ve BIC (Formül 3.4.1.2) formüllerine göre değişim modellerine uygulanır.

$$AIC = -2l + 2K \quad (3.4.1.1)$$

$$BIC = -2l + K \log n \quad (3.4.1.2)$$

Bu formüllerde l , modeldeki maksimum olabilirlik değerini, K modeldeki serbest parametrelerin sayısını, n ise örnek sayısını göstermektedir. AIC, moleküler evrimin doğal işleyişini temsilen belirli bir model kullanıldığında yok olan bilginin miktarını gösterir. Bu nedenle en küçük AIC tercih edilir.

Analiz edilen diziler için en uygun nükleotid değişim modeli jModelTest 2 (Guindon ve Gascuel, 2003; Darriba vd., 2012) programı kullanılarak belirlenmiştir.

3.4.2. Komşu Birleştirme (Neighbor Joining-NJ) Ağacı

Popülasyonlar arası genetik benzerliği gözlemlemek için genellikle bir kümeleme algoritması kullanılarak bir dendogram hazırlanır. En yaygın kullanılan kümeleme algoritmalarından biri Saito ve Nei'nin (1987) Komşu Birleştirme (Neighbor Joining-NJ) algoritmasıdır. Bu algoritmanın avantajları şunlardır;

a) Dal uzunlukları ultra-metrik (aynı boyda) değildir. Böylece popülasyonlar arasında ek bilgiye sahip olunmasını sağlar.

b) Çok hızlı bir algoritma olduğu için en geniş veri setleri için bile uygundur. Çöz-bağla uygulaması birden fazla (100-1000) ağacın çizilmesine olanak verir ve örneklerden istatistiksel belirsizlik hesaplanmasını sağlar.

c) Evrimsel hızların farklı olduğunu kabul eder ve farklı takson üzerine etki eden düzensiz evrimsel güçlerin varlığında daha iyi çalışır.

Bu çalışmadan ve veri tabanından elde edilen mtDNA CR bölgesi dizileri için NJ ağacı, 1000 çöz-bağla değeri ile ve jModelTest 2 (Guindon ve Gascuel, 2003; Darriba vd., 2012) sonucunda seçilen modele göre MEGA 6 (Tamura vd., 2013) programıyla çizilmiştir.

3.4.3. Medyan Birleştirme Ağı Analizi (Median Joining-MJ Network)

Medyan Birleştirme (MJ) Ağı analizi (Bandelt vd. 1999) mutasyon sayısına göre en yakın haplotiplerin birbirine bağlandığı bir ağı gösterir. MJ ağı Kruskal'ın (1956) algoritmasının ve Farris'in (1970) Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony-MP) buluşsal (heuristic) algoritmasının özelliklerini birleştirir. Kruskal'ın (1956) algoritması kısa bağlantıları tercih ederek kapsayan en küçük ağaç (minimum spanning) ağacını bulur. Farris'in (1970) MP buluşsal algoritması ise "medyan vektörleri" denilen (bu analizde dizileri ifade eder) yeni köşegen ekler. MP yönteminin aksine MJ yöntemi bağları çözmez, mtDNA gibi rekombinasyondan bağımsız popülasyon verileri kullanır.

Bu çalışmada MJ ağı NETWORK 4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/>) programı kullanılarak oluşturulmuştur. MJ ağı oluşturmak için $\epsilon=0$; bölge ağırlığı=10 olan önceden tanımlanmış değerler değiştirilmeden kullanılmıştır (Vinas vd., 2010).

3.4.4. Popülasyonların Soy Frekansı

Modern örneklerde her popülasyon için soy frekansı formül 3.4.4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$x_i = n_{ix}/n_x \quad (3.4.4.1)$$

Bu formülde x_i , x popülasyonundaki i soyunun frekansını, n_{ix} i soyunun x popülasyondaki görülme sayısını, n_x ise x popülasyonunun toplam birey sayısını göstermektedir.

3.4.5. Baz Dizisine Dayalı Olarak Saptanan Soy Çeşitliliği

3.4.5.1. Nükleotid Çeşitliliği (π)

Diziler üzerindeki her bir nokta için iki dizi arasındaki ortalama nükleotid farkını belirten nükleotid çeşitliliği (π), bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin ölçütlerinden biridir. Bu değer nükleotid

düzeyinde bulunan heterozigotluk olarak da tanımlanabilir (Nei, 1987). Nükleotid çeşitliliği formül 3.4.5.1.1 ile hesaplanabilir (Nei, 1987).

$$\pi = n(\sum x_i x_j \pi_{ij}) / (n - 1) \quad (3.4.5.1.1)$$

Bu formülde n örnek sayısını, x_i ve x_j , x popülasyonundaki i . ve j . dizilerin frekansını ve π_{ij} i . ve j . dizileri arasında her nükleotid yeri için nükleotid farklılıklarının oranını gösterir. π standart sapması π varyansının karesidir. π varyansı ise formül 3.4.5.1.2'ye göre hesaplanmaktadır.

$$V(\pi) = \frac{4}{n(n-1)} \left[(6 - 4n) (\sum x_i x_j \pi_{ij})^2 + (n - 2) \sum x_i x_j x_k \pi_{ij} \pi_{ik} + \sum x_i x_j \pi_{ij}^2 \right] \quad (3.4.5.1.2)$$

Bu formülde n örnek sayısını, x_i , x_j ve x_k , x popülasyonundaki i . j . ve k . dizilerin frekansını, π_{ij} i . ve j . dizileri arasında her nükleotid noktası için nükleotid farklılıklarının oranını, π_{ik} ise i . ve k . dizileri arasında her nükleotid yeri için nükleotid farklılıklarının oranını gösterir.

π değeri oranlar üzerinden hesaplandığı için dizi uzunluğundan bağımsız bir ölçüttür. Bu değeri kullanarak bir DNA üzerinde farklı bölgelerin çeşitliliğini karşılaştırmak mümkündür.

Soyların nükleotid çeşitlilikleri DnaSP v.5 programındaki (Librado ve Rozas, 2009) "Polymorphism" aracı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.5.2. Haplotip Çeşitliliği (Hd)

Haplotip çeşitliliği (Hd) popülasyondan rasgele seçilen iki dizinin farklı haplotiplere sahip olma olasılığını ölçer. Bu ölçüt kullanılarak popülasyondaki heterozigotluk hesaplanabilir. Haplotip çeşitliliği formül 3.3.5.2.1 ve çeşitliliğin varyansı formül 3.3.6.2.2 ile hesaplanır (Nei, 1987). H 'nin standart sapmasını hesaplamak için varyansın karekökü alınır.

$$H = \frac{n}{n-1} (1 - \sum x_i^2) \quad (3.4.5.2.1)$$

$$V(H) = \frac{1}{n(n-1)} \left[2(n-2) \left\{ \sum x_i^3 - (\sum x_i^2)^2 \right\} + \sum x_i^2 - (\sum x_i^2)^2 \right] \quad (3.4.5.2.2)$$

Bu formüllerde x_i , x popülasyonundaki i . haplotip frekansını, n ise örnek sayısını gösterir.

Soyların haplotip çeşitlilikleri DnaSP v.5 programındaki (Librado ve Rozas, 2009) "Polymorphism" aracı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.5.3. Bir Popülasyondaki Ortalama Nükleotid Farkı Sayısı (k)

Bir popülasyondaki ortalama nükleotid farkı sayısı da tıpkı nükleotid çeşitliliği gibi genetik çeşitlilik ölçütlerinden biridir. Bu sayı π 'den farklı olarak oranlar yerine dizilerin arasındaki gerçek farklar

kullanılarak hesaplanır yani k dizi uzunluğuna bağlı bir ölçüttür. Dizi uzunluğu arttıkça daha yüksek değerlere ulaşabilir (Jobling vd., 2004).

Popülasyondaki ortalama nükleotid farkı sayısı formül 3.4.5.3.1 (Tajima, 1983) kullanılarak hesaplanır.

$$k = \sum \sum_{i < j} k_{ij} / \binom{n}{2} \quad (3.4.5.3.1)$$

Bu formülde k_{ij} , i ve j dizileri arasındaki nükleotid farkının sayısını, n örnek sayısını, $(n, 2)$ kombinasyonu ise incelenen setteki ikili karşılaştırmaların sayısını gösterir.

Bir popülasyondaki ortalama nükleotid farkı sayısı DnaSP v.5 programındaki (Librado ve Rozas, 2009) "Polymorphism" aracı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.5.4. Popülasyonlar Arası Her Bölge İçin Ortalama Nükleotid Değişim Sayısı (D_{xy}) ve Popülasyonlar Arasındaki Nükleotid Farklarının Ortalama Sayısı (K)

Popülasyonlar arası her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı (D_{xy}) popülasyon arasındaki DNA farklılaşma (DNA divergence) miktarını hesaplamakta kullanılır (Nei, 1987). D_{xy} formül 3.4.5.4.1 (Nei, 1987) kullanılarak hesaplanır.

$$D_{xy} = \sum_{ij} \hat{x}_i \hat{y}_j d_{ij} \quad (3.4.5.4.1)$$

Bu formülde x_i ve y_j , x ve y popülasyonları için i . ve j . haplotip frekanslarını, d_{ij} ise popülasyon x 'deki i . haplotip ve popülasyon y 'deki j . haplotip arasındaki nükleotid değişimlerin sayısını gösterir.

Popülasyonlar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı (K) ile D_{xy} arasındaki ilişki, k değeri ile π 'nin arasındaki ilişkiye benzer şekildedir. D_{xy} oranlar üzerinden hesaplanırken K ham veri üzerinden hesaplanır.

Soylardaki polimorfik bölgelerin ve mutasyonların sayısı, soyların nükleotid ve haplotip çeşitlilikleri DnaSP v.5 programındaki (Librado ve Rozas, 2009) "Polymorphism" aracı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.6. Nötralite Testleri

Aynı zamanda seçilim testi de denilen nötralite testleri, popülasyonun geçmişini açıklamak için oldukça sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu testler popülasyonlarda ani genleşme ya da küçülme olup olmadığını sınırlar. Genleşme sayısal artışı ve/veya bakılan dizi için pozitif seleksiyonun varlığını belirtir

Bu çalışmada soyların popülasyon tarihini incelemek için Tajima'nın D (Tajima, 1989) ve Fu'nun F_s (Fu, 1997) testleri kullanılmıştır.

3.4.6.1. Tajima'nın D Testi

Tajima'nın D testi, rekombinasyonsuz sonsuz bölge modelini temel alır ve kısa DNA dizileri için uygundur. Bu test mutasyon parametresi theta (θ) değerinin (etkin popülasyon büyüklüğü= N olmak üzere; $\theta = 2Mu$, diploid popülasyonlar için $M=2N$, haploid popülasyonlar için $M=N$) iki estimatorünü karşılaştırır. Test istatistiği D değeri formül 3.4.6.1.1 kullanılarak hesaplanır.

$$D = \frac{\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_s}{\sqrt{\text{var}(\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_s)}} \quad (3.4.6.1.1)$$

Bu formülde $\hat{\theta}_\pi = \hat{\pi}$, $\hat{\theta}_s = S / \sum_{i=0}^{n-1} (1/i)$ ve S örnekteki ayrılan (segregating) bölge sayısını gösterir. Farklı örnek sayıları için D değerinin güven aralığının limitleri Tajima'nın (1989) çalışmasındaki Tablo 2 'de verilmektedir.

Bu çalışmada Tajima'nın D testi Arlequin v3.5 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı kullanılarak hesaplanmıştır. D istatistiğinin anlamlılığı, popülasyonun dengede olduğu ve seçilimsel nötralite (selective neutrality)'yi kabul edilerek, ayrıca Hudson'ın (1990) çalışmasından alınan birleşme (coalescent) simülasyon algoritması kullanılarak oluşturulan rasgele örnek grupları ($n=10000$) ile test edilmiştir.

Her ne kadar Tajima'nın D istatistiği seçilimsel nötralite (selective neutrality) ölçütü olsa da anlamlı D değerleri popülasyon büyümesi, daralması, bireyleri arasındaki fark, darboğaz etkisi veya mutasyon oranlarındaki heterojenlik gibi nedenlerle de olabilir (Tajima, 1993; Aris-Brosou ve Excoffier, 1996; Tajima, 1996).

3.4.6.2. Fu'nun F_s Testi

Tıpkı Tajima'nın D (Tajima, 1989) testi gibi, Fu'nun F_s testi (Fu, 1997) de rekombinasyonsuz sonsuz nokta modelini temel alır ve bu nedenle kısa DNA dizilerinin analizi için uygundur. Fu'nun F_s testinde ilk olarak alel sayısı, gözlenen ikili farklılıkların sayısına eşit veya bu değerden daha düşük olan rasgele nötral örnek gözlemlene ihtimali hesaplanarak θ değerinin estimatorü olarak alınır. Bu olasılık değeri formül 3.4.6.2.1 kullanılarak hesaplanır.

$$S' = \Pr(K \geq k_{obs} | \theta = \hat{\theta}_\pi) \quad (3.4.6.2.1)$$

S' değerinin logiti olarak tanımlanan F_s istatistiği ise formül 3.4.6.2.2 kullanılarak hesaplanır.

$$F_S \ln \left(\frac{s'}{1-s'} \right) \quad (3.4.6.2.2)$$

Bu çalışmada F_u 'nun F_S testi Arlequin v3.5 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı kullanılarak hesaplanmıştır. F_S istatistiğinin anlamlılığı, tıpkı D istatistiğinde olduğu gibi, oluşturulan rasgele örnek grupları ($n=10000$) ile test edilmiştir. F_S istatistiğinin p değeri ise gözlenen değere eşit veya bu değerden az olan rasgele F_S değerlerini oranı olarak hesaplanmıştır (Fu, 1997).

3.4.7. Popülasyon Parametrelerinin Hesaplanması

3.4.7.1. Popülasyonların Etkin Dişi Büyüklüğü

Etkin popülasyon büyüklüğü (N_e) seçilimin, mutasyonun veya göçün olmadığı bir popülasyonda, genetik sürüklenme sonucu genetik varyasyonu, gözlenebilen popülasyon büyüklüğü ile aynı hızda yitirecek olan ideal popülasyonun büyüklüğü olarak tanımlanır (Allendorf ve Luikart, 2007).

mtDNA dizisi kullanılarak etkin dişi popülasyon büyüklüğü (N_{EF}) formül 3.4.7.1.1 kullanılarak hesaplanır.

$$\theta = 2N_{EF}\mu \quad (3.4.7.1.1)$$

Bu formülde θ mutasyon-göç-genetik sürüklenme dengesine ulaşmış bir popülasyonda görülmesi beklenen nötral genetik varyasyon miktarı, μ ise mutasyon oranıdır (Kuhner, 2006).

Kılıçbalığı mtDNA D-halkası mutasyon oranı (μ) tutucu bir yaklaşımla 0.049×10^{-6} olarak hesaplanmaktadır (Alvarado Bremer vd., 2005^b).

θ değeri ise maksimum olabilirlik tahmini kullanılarak LAMARC v2.0 (Kuhner, 2006) programı ile kullanılarak hesaplanmıştır. İlk 10 000 gen soyu (geneology) atıldıktan sonra, 10 000 kaydedilmiş soy için 10 kısa zincir ve 100 000 kaydedilmiş soy için 2 uzun zincir, Markov Zincir Monte Carlo (MCM) algoritmaları ile analiz edilmiştir. Hem uzun hem de kısa zincirler için oluşturulan 20 gen soyundan biri örneklenmiştir (Vinas vd., 2010).

3.4.7.2. Popülasyonlar Arasındaki Dişi Göç Oranları (m)

mtDNA dizisi kullanılarak her popülasyon arasındaki dişilerin göç oranları hesaplanırken asimetrik gen akışı ve eşit olmayan popülasyon büyüklükleri modeli kabul edilerek ve F_{ST} sonuçları üzerinden bir göç matrisi oluşturularak hesaplanmıştır.

Popülasyonlar arasındaki dişi göç oranları (m) maksimum olabilirlik tahmini kullanılarak LAMARC v2.0 (Kuhner, 2006) programı ile hesaplanmıştır. İlk 10 000 gen soyu (geneology) atıldıktan sonra, 10 000 kaydedilmiş soy için 10 kısa zincir ve 100 000 kaydedilmiş soy için 2 uzun zincir, Markov

Zincir Monte Carlo (MCM) algoritmaları ile analiz edilmiştir. Hem uzum hem de kısa zincirler için oluşturulan 20 gen soyundan biri örneklenmiştir (Vinas vd., 2010).

3.4.8. Popülasyonlar/ Popülasyon Grupları Arası Genetik Farklar

3.4.8.1. F_{ST} Değerleri

F_{ST} iki popülasyonun arasındaki genetik farklılaşmanın ölçütüdür. Bu ölçüt iki popülasyon arasındaki genetik farklılığı tanımlayan uzaklık ölçütü olarak da kullanılabilir. İkili F_{ST} değerleri formül 3.4.8.1 ile hesaplanabilir.

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \quad (3.4.8.1)$$

Bu formülde H_S bütün alt popülasyonlarda ortalama beklenen heterozigotluk, H_T ise bütün rasgele çiftleşme olayı varsayılarak bütün popülasyondaki beklenen heterozigotluktur. Alt popülasyonları ikili olarak kullanarak bu popülasyonlar arasındaki ikili uzaklıklar hesaplanabilir ve bir uzaklık matrisi oluşturulabilir. F_{ST} değerleri 0 (tamamen aynı alt popülasyonlar) ile 1 (tamamen farklı alt popülasyonlar) arasında değişmektedir (Jobling vd., 2004). Ancak F-istatistikleri örnek sayısını eşit ve sonsuz olarak kabul etmektedir. Weir ve Cockerham (1984), F katsayılarının küçük örnek sayılarına daha uygun olacak şekilde düzeltmişlerdir.

Bu çalışmada mtDNA F_{ST} değerleri Arlequin v3.5 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı ile Weir ve Cockerham (1984) yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.8.2. Temel Koordinatlar Analizi (Principal Coordinates Analysis-PCA)

Temel Koordinat Analizi (PCA) bir veri setindeki kalıpların benzerlik ve farklılıkların göz önüne alınarak temsil edilmesini sağlayan matematiksel bir işlemdir. Gerçek dünyada veriler nadiren kolaylıkla temsil edilir. Verilerin çok boyutluluğu nedeniyle ortaya çıkabilecek sorunların üstesinden gelebilmek için veri setinin kovaryans matrisinin öz değerlerinin dağılımı kullanılır. Varyansın en büyük bölümünü sergileyecek eksen ilk eksen olarak seçilir. Böylece veriler (ırklar arasındaki ilişkiler) fazla bilgi kaybına uğramadan görselleştirilebilir.

Bu çalışmada verileri iki eksen üzerinde betimlemek için GenAlEx 6.5 (Peakall ve Smouse, 2012) programı kullanılmıştır.

3.4.8.3. Moleküler Varyans Analizi (Analysis of Molecular Variance-AMOVA)

Moleküler varyans analizi (AMOVA) hiyerarşik gruplar arasındaki farklılığı analiz etmek için kullanılır. Farklı hiyerarşik aşamalarda genotipe bağlı uzaklıklar arasındaki korelasyonu F

istatistiklerinin analogu olan σ istatistiğini kullanarak inceler (Excoffier vd., 1992). Bu analizde üç bileşen incelenir. Birinci bileşen popülasyonlar kullanılarak oluşturulan gruplar arasındaki genetik çeşitliliğin oranını, ikinci bileşen oluşturulan gruplardaki popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin oranını üçüncü bileşen ise bütün örnekler tek bir popülasyon olarak kabul edildiği zaman ortaya çıkan genetik çeşitlilik oranını ölçer (Excoffier, 1992). Tablo 3.4.8.3.1 AMOVA'da kullanılan örnek tabloyu göstermektedir.

Tablo 3.4.8.3.1. Excoffier vd.,'nin (1992) çalışmasından alınan genel AMOVA tablosu (SS_T: Toplam kareler toplamı (sum of squares), SS_AG: Gruplar arası kareler toplamı. SS_WG: Gruplardaki popülasyonlar arası kareler toplamı, SS_WP: Popülasyonların içindeki kareler toplamı, G: Analizdeki toplam grup sayısı, P: Analizdeki toplam popülasyon sayısı, N: Analizdeki toplam birey sayısı).

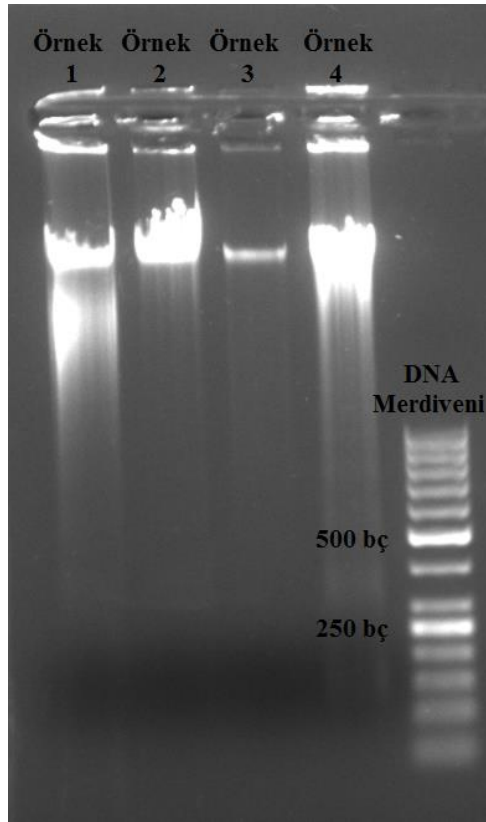
Çeşitlilik Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı (SS)	Kareler Toplamının Ortalaması (MS)	Varyans
Gruplar Arası (AG)	G-1	SS_AG	SS_AG/(G-1)	$n''\sigma_a^2 + n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Gruplardaki Popülasyonlar Arası (WG)	P-G	SS_WG	SS_WG/(P-G)	$n\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Popülasyon İçi (WP)	N-P	SS_WP	SS_WP/(N-P)	σ_c^2
Toplam	N-1	SS_T	SS_T/(N-1)	σ_T^2

Bu çalışmada AMOVA tablosu, PCA sonucu ortaya çıkan gruplar arasında ve bu grupların içinde genetik varyasyonun nasıl dağıldığını gözlemlemek için, Arlequin v3.5 programı (Excoffier ve Lischer, 2010) kullanılarak, oluşturulmuştur. Sonuçların anlamlılık değeri 10000 rasgele permütasyon kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

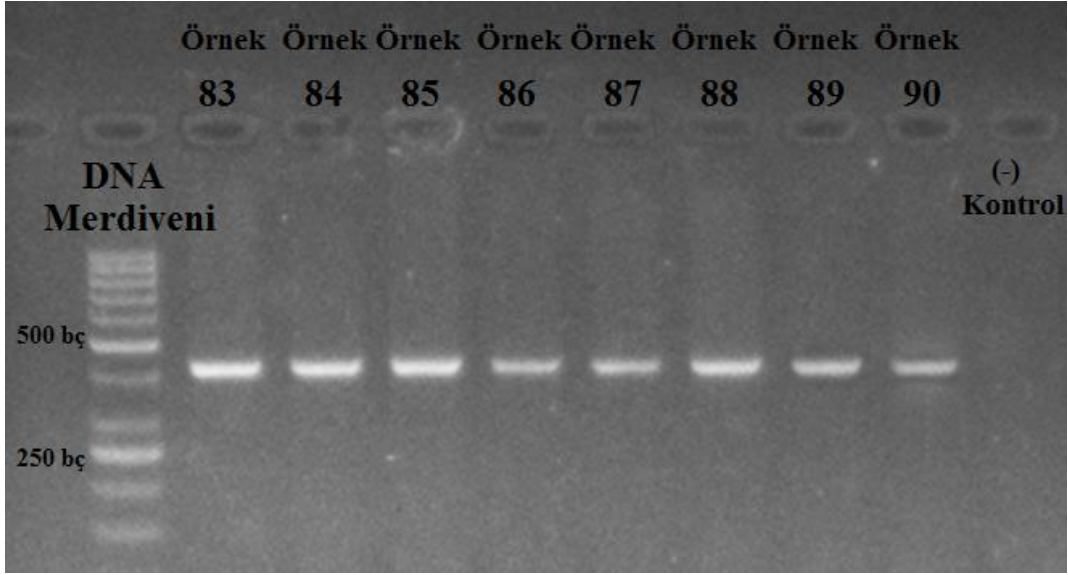
4.1. Modern Örneklerden DNA İzolasyonu ve PZR

Modern kılıç balığı örneklerinden DNA izolasyonu GeneJet DNA Saflaştırma Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır. DNA'ların varlığı ve konsantrasyonları %1'lik agaroz jel ve spektrofotometre (nanodrop) kullanılarak kontrol edilmiştir. İzole edilen DNA'ların agaroz jeldeki örnek görüntüsü şekil 4.1.1'de verilmektedir. Nanodrop sonuçlarına göre 260/280 nm oranı için yaklaşık 1.80 ve 260/230 nm oranı için yaklaşık 2.00 değer veren örnekler kullanılarak PZR'a devam edilmiştir.



Şekil 4.1.1. İzole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü. İlk dört kuyu izole edilen örnekleri, son kuyu ise DNA merdivenini (GeneRuler 50 bç DNA Merdiveni) içermektedir.

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların mtDNA CR bölgelerinin yaklaşık 450 bç uzunluğundaki parçası PZR kullanılarak çoğaltılmıştır. Sonuçlar etidyum bromür (EtBr) içeren %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve Vilber Lourmat görüntüleme cihazında incelenmiştir. Ana karışımda kontaminasyon olup olmadığını anlayabilmek için DNA içermeyen negatif kontroller ve çoğaltılan DNA'ların beklenen uzunluklarda olup olmadığını anlayabilmek için DNA merdivenleri kullanılmıştır. Şekil 4.1.2 modern örnekler için CR bölgesinin PZR sonucunu göstermektedir.



Şekil 4.1.2. mtDNA CR bölgesinin agaroz jel görüntüsü. İlk kuyu DNA merdiveni (GeneRuler 50 bç DNA Merdiveni) sonraki yedi kuyu PCR örneklerinin sonuçlarını kuyu en son kuyu ise negatif kontrolü içermektedir.

4.2. Antik Örneklerden DNA İzolasyonu ve PZR

Toplam 6 antik kılıç balığı kemik örneğinden DNA elde edebilmek için aDNA laboratuvarında Rohland vd.'nin (2010) DNA izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Olası bir kontaminasyonu belirleyebilmek için izolasyona ayrıca B1 ve B2 adı verilen iki adet izolasyon negatif kontrolü eklenmiştir. Bu kontroller toz haline getirilmiş kemik örnekleri dışında izolasyon sırasında kullanılan bütün malzemeleri içermektedir.

Elde edilen DNA örnekleri, genellikle antik örneklerden elde edilen DNA miktarının az olması sebebiyle, ayrıca kontrol edilmeden PZR için kullanılmıştır. PZR sırasındaki olası kontaminasyonu belirleyebilmek için PZR'a 2 adet negatif kontrol eklenmiştir. Bu negatif kontroller DNA dışına bütün PZR malzemelerini içermektedir.

Bu örneklerin mtDNA CR bölgesinin yaklaşık 450 bç uzunluğundaki bölgesi 5 parça olarak çoğaltılmıştır. İlk, 1. parça 177, 2. parça 138, 3. parça 150, 4. parça 111 ve 5. parça 150 uzunluğundadır. PZR sırasındaki olası bir kontaminasyonu belirleyebilmek için B1 ve B2 'nin yanı sıra iki adet DNA içermeyen negatif kontrol kullanılmıştır. Sonuçlar etidyum bromür (EtBr) içeren % 2.5'lik agaroz jelde yürütülmüş ve Vilber Lourmat görüntüleme cihazında incelenmiştir. Çoğaltılan DNA'ların beklenen uzunluklarda olup olmadığını anlayabilmek için DNA merdivenleri de agaroz jelde yürütülmüştür. PZR sonucunda Toplamda 1. örneğin 1., 2., 4. ve 5. parçası; 2.

4.3. Kontrol Bölgesi (CR) Dizi Analizi

Toplam 68 modern mtDNA CR bölgesinin 450 bç'lik kısmı ve 6 antik örneğe ait mtDNA CR bölgesinin 5 parçası (toplam 17 örnek) BigDye kullanılarak dizilenmiş ve REFGEN (www.refgen.com) firması tarafından otomatik Applied Biosystems ABI3100™ DNA analiz cihazında görüntülenmiştir.

Kromotogramlar ChromasPro v1.5 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>) programı kullanılarak gözlemlenmiş ve birleştirilmiştir. Ortaya çıkan birleştirilmiş diziler FASTA formatında kaydedilmiştir. Şekil 4.3.1'de kısmi kromotogram örneği verilmektedir.



Şekil 4.3.1. Modern kılıçbalığı örneklerinden birinin L15998 ve CSBDH primerleri ile çoğaltılan mtDNA CR bölgesinin 450 bç'lik parçasının birleştirilmiş kromotogramının kısmi görüntüsü. En üstte birleştirilmiş dizinin bazları; birleştirilmiş dizinin altında ise ileri ve geri diziler ayrı olarak verilmektedir.

Elde edilen diziler literatürden toplanan diziler ile birlikte analiz edilmiştir. Dizilerin hizalanması Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) programının içinde bulunan ClustalW Çoklu Hizalama uygulaması kullanılarak yapılmıştır. Hizalama sonuçları, yanlış yerleştirilen boşlukların olması ihtimaline karşı gözle kontrol edilmiştir. Ayrıca tüm populasyon içinde sadece tek bir bireyin bir bölgesinde gözlenen mutasyonlar kromotogramlar üzerinden iki kere kontrol edilmiştir. Şekil 4.3.2 hizalanmış dizileri kısmi olarak göstermektedir.

	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
SWO30 AGS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO31 AGS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO32 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO33 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO34 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO35 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO37 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO40 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO41 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO53 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO54 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO62 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO63 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO65 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO66 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO72 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO73 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO74 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO75 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO76 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO83 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO84 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO85 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO86 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO87 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO88 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO89 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO90 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO91 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC
SWO92 NLS	TATTAACACCATA	CACTTATATTA	ACCATATAA	TCCAATGTTT	TAGTACATAA	TATGTAATTC	GACCAATTA	TAAACAAT	TCAACCAAT	TCGTGCTT	ACACCAAC	AGTAAT	TAAGGTAG	ACATAAAC

Şekil 4.3.2. Hizalanmış dizilerin 120 baz çiftlik (bç)'lik bir bölümünü gösteren Bioedit (Hall, 1999) program görüntüsü.

Sonuçlar Bioedit ile kontrol edildiği zaman Kuzey Levant bölgesinden toplanmış örneklerden birinin dizisinin diğerlerinde çok farklı olduğu gözlenmiştir. Bu dizi BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak GenBank veri tabanında kontrol edilmiştir ve % 90-100 sorgulama kapsamı ile yelken balığı (*Tetrapturus angustirostris*, *Tetrapturus belone* ve *Tetrapturus pfluegeri*) olarak bulunmuştur. Olası bu 3 tür yelken balığından sadece *Tetrapturus belone* (Akdeniz yelken balığı) Akdeniz'de yaşamaktadır (Collette vd., 2011^b) ve morfolojik olarak kılıç balığına benzemektedir (Şekil 4.3.3).



Şekil 4.3.3. Akdeniz yelken balığının görüntüsü (Arocha ve Ortiz, 2006).

Bu örnek çıkartıldığı zaman Kuzey Levant bölgesinden toplanan toplam 42 örnek kalmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen modern örneklerle ait diziler, literatürdeki diziler ile birlikte analiz edilebilmeleri için en kısa diziyeye göre baştan ve sondan kesilmiştir. Bu işlemlerden sonra geriye kalan 301 bç (boşluklar da sayıldığında) uzunluğundaki kısım daha sonraki analizler için kullanılmıştır.

aDNA örneklerinde elde edilen kromotogramlar incelendiği zaman ileri ve geri primerler kullanılarak elde edilen kromotogramların bazı noktalarında nükleotid değişimleri gözlenmiştir Aynı şekilde diziler Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) programı kullanılarak incelendiği zaman parçaların birbiri ile çakışan bölgelerinin bazı noktalarında aynı şekilde nükleotid değişimleri bulunmaktadır. Bu nükleotid değişimlerinin özeti tablo 4.3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3.1. Soy I ve soy II’yi birbirinden ayıran mutasyon noktalarının dizi üzerindeki yeri ve bu noktalarda bulunan nükleotid değişimlerinin türü (Örnek 1.4: 1.Örnek/4. Parça; Örnek 1.5: 1.Örnek/5.Parça; Örnek 2.5: 2.Örnek/5. Parça; Örnek 4.3: 4.Örnek/3. Parça; Örnek 4.5; 4.Örnek/5. Parça; Örnek 5.4: 5.Örnek/4. Parça; Örnek 5.5: 5.Örnek/5. Parça).

	Mutasyon Noktalarının Yeri						
	235	300	302	307	345	350	392
Örnek 1.4 parça- Örnek 1.5 parça çakışması		C-A		A-T	G-A		
Örnek 1.5/İleri- Örnek 1.5/Geri							T-G
Örnek 2.5/İleri- Örnek 2.5/Geri						C-T	
Örnek 4.3 parça- Örnek 4.5 parça çakışması	A-T						
Örnek 5.4 parça- Örnek 5.5 parça çakışması			G-A				

Bu nükleotid değişimlerinin olduğu noktalar örneklerin soylarının belirlenmesi için incelenen mutasyon noktalarında (Bölüm 4.4.4) bulunmamaktadır. Bu nedenle antik DNA soylarının belirlenmesine olumsuz bir etkisi olmamıştır.

4.4. İstatistiksel Analizler

4.4.1. Nükleotid Değişim Modelinin Belirlenmesi

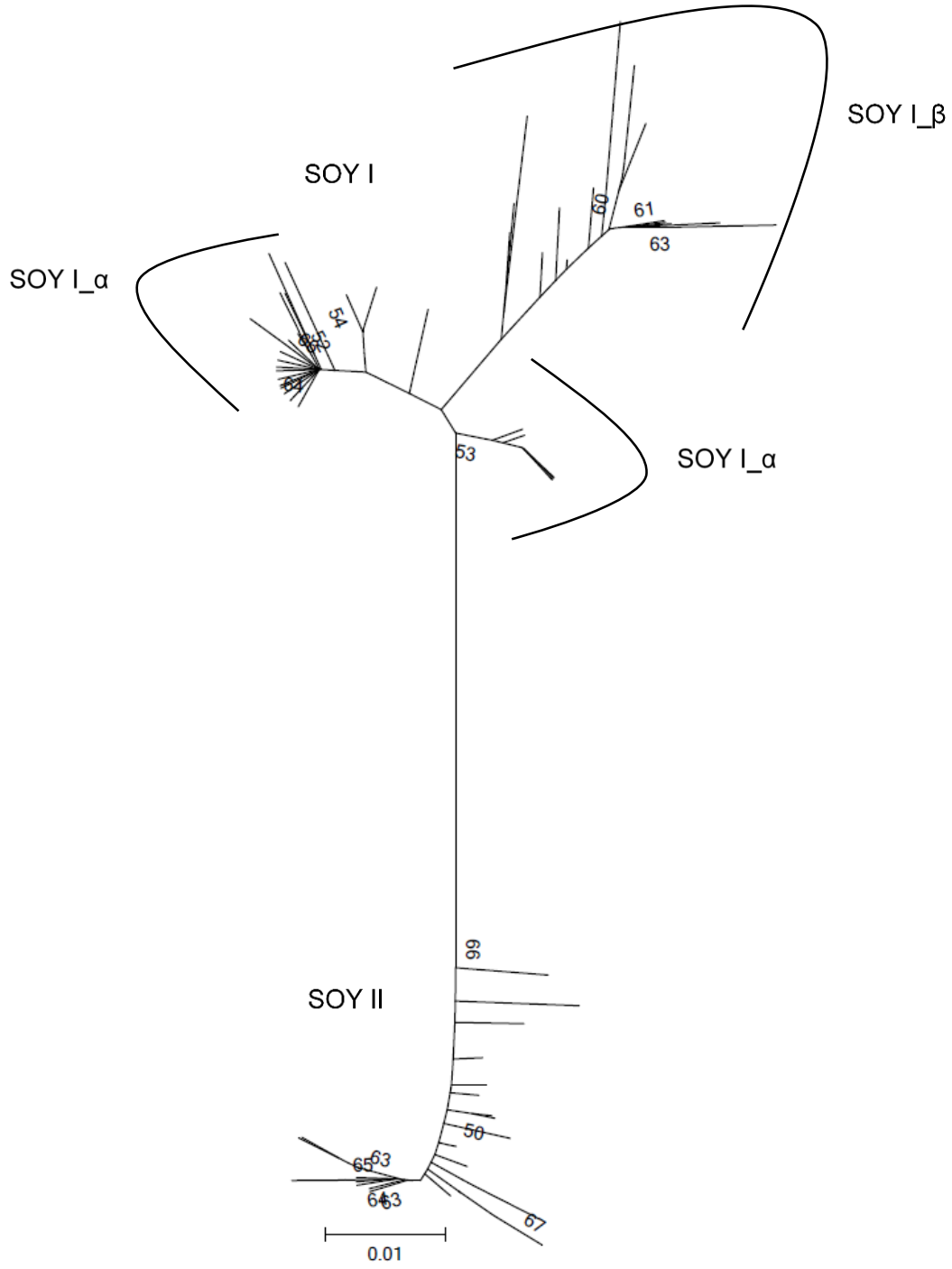
Toplam 309 modern mtDNA CR bölgesi dizisinin nükleotid değişim modeli Bayesian Bilgi Kriterine (Bayesian Information Criterion-BIC; Schwarz, 1978) ve Akaike Bilgi Kriterine (Akaike Information Criterion-AIC; Akaike, 1974) göre jModelTest 2 (Guindon ve Gascuel, 2003; Darriba vd., 2012) ile araştırılmıştır. Bu bölge için gama dağılımlı (G=0.31) Tamura 3 parametre (T92+G) evrimsel modeli bulunmuştur.

4.4.2. Komşu Birleştirme (Neighbor Joining-NJ) Ağacı

Bu çalışma kapsamında elde edilen modern dizilerin soylarını tayin edebilmek amacıyla veri tabanından elde edilmiş ve soy bilgisi olan mtDNA CR bölgesi dizileri ile bu çalışmadan elde edilen

diziler beraber kullanılarak komşu birleştirme ağacı, MEGA 6 programı (Tamura vd., 2013) ile oluşturulmuştur. Elde edilen NJ ağacı şekil 4.4.2.1'de verilmiştir.

Soy I'e ait örneklerin alt soyları, dizilerin 127. noktasındaki *RsaI* kesim bölgesine bakılarak belirlenmiştir. Kesim bölgesi bulunan (G) örnekler soy I_α, bulunmayan (A) örnekler ise soy I_β örnekleridir.



Şekil 4.4.2.1. mtDNA CR bölgesi dizileri ile çizilen komşu birleştirme ağacı. Ana ayrımların çöz-
bağla değerleri dallar üzerinde gösterilmiştir.

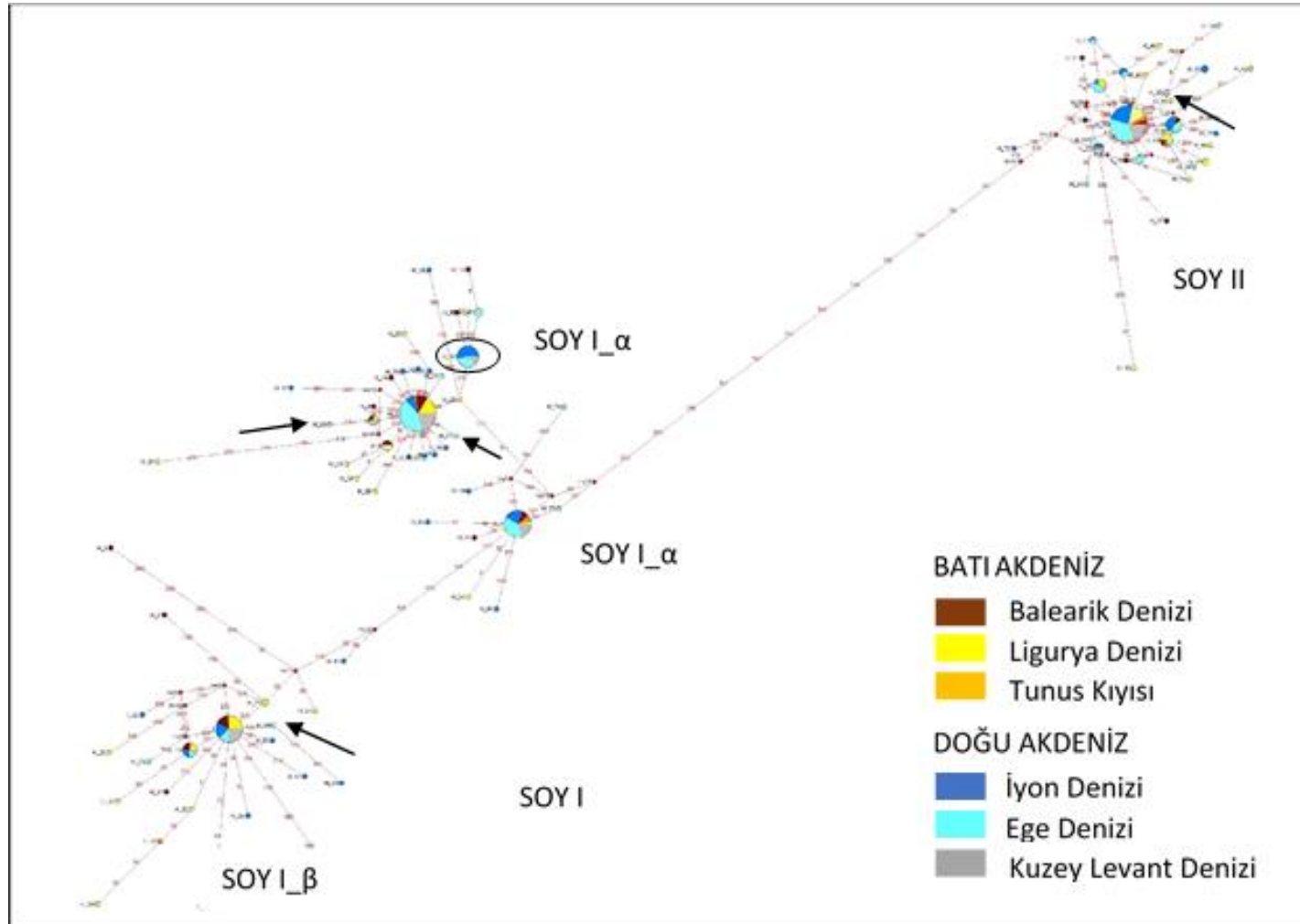
Komşu birleştirme ağacı sonucu soy I ve soy II örnekleri iki ayrı dal halinde kendi içlerinde kümelenmiştir. Ayrıca soy I'e ait örnekler kendi içinde 3 ayrı alt dala ayrılmaktadır. Bu dallardan ikisisoy I_α diğeri ise soy I_β örneklerini içermektedir.

Komşu birleştirme ağacına bakıldığında, bu çalışmanın örneklerinden Kuzey Levant Denizi'ne ait 42 mtDNA CR dizisinin, 20 (%48) tanesi α 8 (%19) tanesi β olmak üzere, 28 (%67) tanesinin soy I'den, 14 (%33) tanesinin ise soy II'den oluştuğu belirlenmiştir. Ege Denizi'ne ait 26 mtDNA CR dizisinin ise, 13 (%50) tanesi α 2 (%8) tanesi β olmak üzere, 15 tanesi soy I'den (%58), 11 (%42) tanesi ise soy II'den oluşmaktadır. Bu çalışma kapsamında toplanan Ege Denizi örneklerinin soy frekansı literatürden elde edilen ve Yunanistan kıyısına ait olan örneklerin soy frekansı (soy I_α:%52; soy_β:%6; soy_{II}:%43) ile çok bezer olduğu için bu iki veri seti birleştirilerek tek bir popülasyon olarak incelenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen diziler incelendiğinde, literatürde belirtildiği gibi (Alvarado-Bremer vd., 1996) bütün soy I dizilerinde 2 adet, bütün soy II dizilerinde ise 1 adet ardışık TACA tekrarı belirlenmiştir. Yüksek mutasyon hızına sahip olması nedeniyle bu tekrarlar dizilerden çıkarılarak yanlış hesaplamaların önüne geçilmiştir.

4.4.3. Medyan Birleştirme Ağı

Soylar arasındaki haplotip varyasyonunu gözlemlemek amacıyla, toplam 309 modern kılıç balığı mtDNA kontrol bölgesi dizisi kullanılarak Medyan Birleştirme (Median Joining-MJ) Ağı (Bantelt vd., 1999), NETWORK 4.6.1.0 (fluxus-engineering.com) programı ile çizilmiştir. Elde edilen MJ ağı Şekil 4.4.3.1'de gösterilmektedir. MJ ağı çalışılan 6 popülasyon için ayrı ayrı renklendirilmiş ve bu popülasyonlar Batı Akdeniz (Balearik Denizi, Ligurya Denizi, Tunus Kıyısı) ve Doğu Akdeniz (İyon Denizi, Ege Denizi ve Kuzey Levant Denizi) olarak iki gruba ayrılmıştır.



Şekil 4.4.3.1 Çalışmada incelenen Akdeniz popülasyonları için oluşturulan Medyan Birleştirme Ağı. Daireler haplotipleri temsil etmektedir ve büyüklükleri örnek sayıları ile doğru orantılıdır. Kahverengi dilimler Balearik Denizi, sarı dilimler Ligurya Denizi, turuncu dilimler Tunus Kıyısı, mavi dilimler İyon Denizi, yeşil dilimler Ege Denizi ve gri dilimler Kuzey Levant Denizi örneklerine aittir. Kırmızı noktalar medyanları göstermektedir, dal uzunlukları ise mutasyon farkları ile doğru orantılıdır. Bu çalışmada bulunan yeni haplotipler oklarla, sadece doğu Akdeniz'de yüksek frekansta gözlenen haplotip ise yuvarlak içinde gösterilmektedir.

MJ ağıında toplam 89 farklı haplotip bulunmaktadır. Soy I, 3 ana düğüm soy II ise 1 ana düğüm ile temsil edilmiştir. Bu düğümler, düşük örnek sayısına sahip Tunus kıyısı popülasyonu (n=8) dışında bütün örnekleri içermektedir. Soy I'de bulunan ana düğümlerden ikisinin α olduğu, gözlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında toplanarak analiz edilen örneklerde, ikisi Kuzey Levant değerli ise Ege Denizi popülasyonunda olmak üzere literatürden alınan örneklerde bulunmayan dört yeni haplotip (ok ile belirtilen) gözlenmiştir. Bu haplotiplerden Kuzey Levant Denizi'ne ait olan haplotiplerden biri iki ayrı bireyde gözlenmiştir ve soy II'ye aittir. Diğeri ise tek bir örnekte gözlenmiştir ve soy I_ α alt soyuna aittir. Ege Denizi'ne ait haplotiplerin ikisi de birer örnekte gözlenmiştir. Biri soy I_ α diğeri soy I_ β olarak belirlenmiştir. Ayrıca soy I_ α 'ya ait görece yüksek frekanslı (17/89) bir haplotip sadece doğu Akdeniz'e ait popülasyonlarda gözlenmektedir.

4.4.4. Antik Örneklerin Soylarının Belirlenmesi

Antik DNA örneklerinden bütün parçalar PZR ile çoğaltılmadığı için tüm bir dizi elde edilememiş ve bu nedenle dizileri örneklerin soyları NJ kullanarak belirlenmemiştir. Bunun yerine soy I ve soy II'yi ayıran mutasyon noktaları MJ ağı üzerinde tespit edilerek bu mutasyonlar elde edilebilen antik DNA dizi parçaları üzerinde BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) programı kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu mutasyonlar tablo 4.4.4.1 'de özetlenmiştir.

Tablo 4.4.4.1. Soy I ve soy II'yi birbirinden ayıran mutasyon noktalarının dizi üzerindeki yeri ve bu noktalarda bulunan nükleotid değişimlerinin türü.

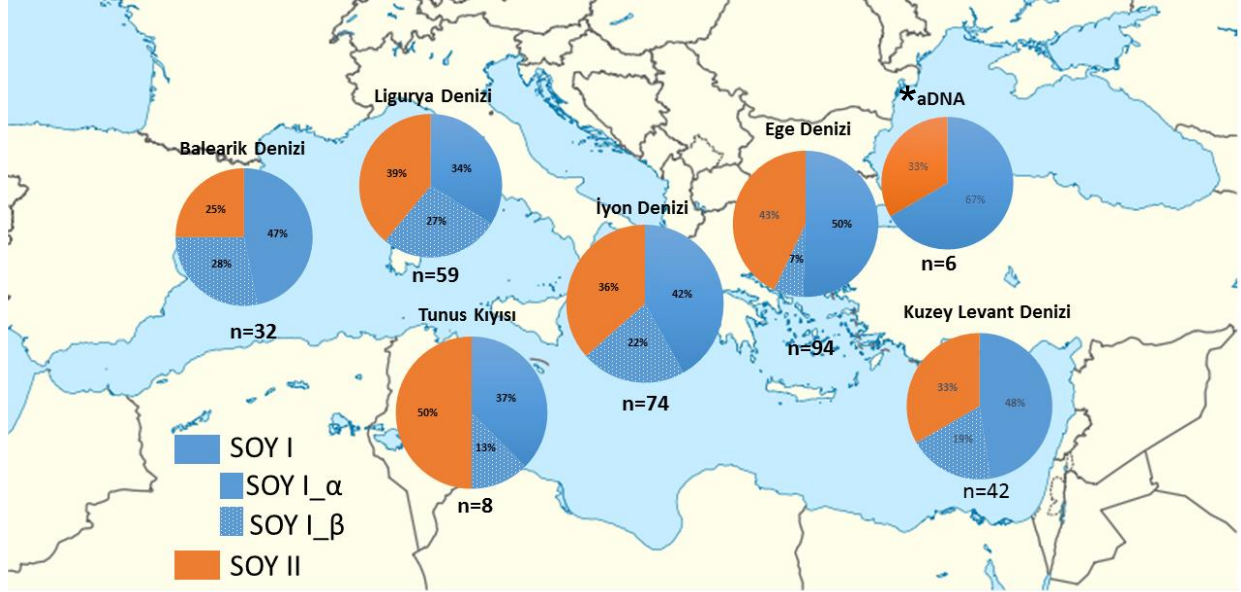
	Mutasyon Noktalarının Yeri								
	46	110	120	122	134	158	160	188	259
Soy I	C	G	A	A	A	A/C	T	-	A
Soy II	T	C/T	G	G	G	G	C	C	G

Bu tabloya göre yüksek ihtimalle aDNA örneklerinin 4 tanesi soy I'e, geri kalan iki tanesi ise soy II'ye aittir. Soy I in alt soylarını ayıran mutasyon noktalarının aDNA örneklerinde PZR ile çoğaltılmayan ve dizi analizi yapılamayan parçalarda bulunması nedeniyle soy I örneklerinin alt soylar belirlenememiştir.

Antik kılıç balığı kemiklerinin farklı bireylere ait olup olmadığını anlayabilmek için farklı örneklere ait aDNA dizi parçaları birbirleri ile karşılaştırıldıkları zaman en az 5 örneğin, 2-7 noktadaki mutasyonlar ile birbirinden ayrıldığı gözlenmiştir. Soy I'e ait olduğu düşünülen iki örnekte ise çoğaltılabilen dizi parçalarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

4.4.5. Soyların Popülasyonlara Göre Dağılımı

Soyların popülasyonlara göre dağılımı daire grafiği ile özetlenerek, ırkların toplandıkları yerlere göre Akdeniz haritası üzerine yerleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3.5.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4.5.1 Akdeniz’ de yaşayan modern kılıç balığı popülasyonlarının ve Yenikapı Marmaray kazısından çıkarılan kılıç balığı örneklerinin (aDNA) soy dağılımlarının Akdeniz haritası üzerinde gösterimi (*Soy I’in alt soyları tanımlanamadığı için sadece soy I frekansı gösterilmiştir).

Bu şekilden kabaca soy frekanslarının popülasyonlar arasında yüksek farklılık göstermediği, dolayısıyla, çalışılan genetik belirteç açısından, Ege ve Kuzey Levant popülasyonlarının Batı Akdeniz popülasyonlarından farklı olmadıkları söylenebilir. Ancak soy I frekansının Balearik Denizi’nde en yüksek Ege Denizi ve Tunus kıyısında en düşük olarak bulunduğu belirlenmiştir. Bunu dışında Kuzey Levant Denizi’ni ve İyon Denizi popülasyonlarının frekans dağılımı açısından birbirlerine en çok benzeyen popülasyonlar olduğu görülmektedir. Soy I’in alt soylarına bakıldığı zaman bütün popülasyonlarda β ’nin daha düşük olduğu ve Ege Denizi ile örnek sayısı az olan Tunus Kıyısı dışında, popülasyonlarda benzer alt soy frekans dağılımı olduğu gözlenmektedir. Ege Denizi’nde ise β frekansı diğer popülasyonlara göre çok daha düşük bulunmuştur.

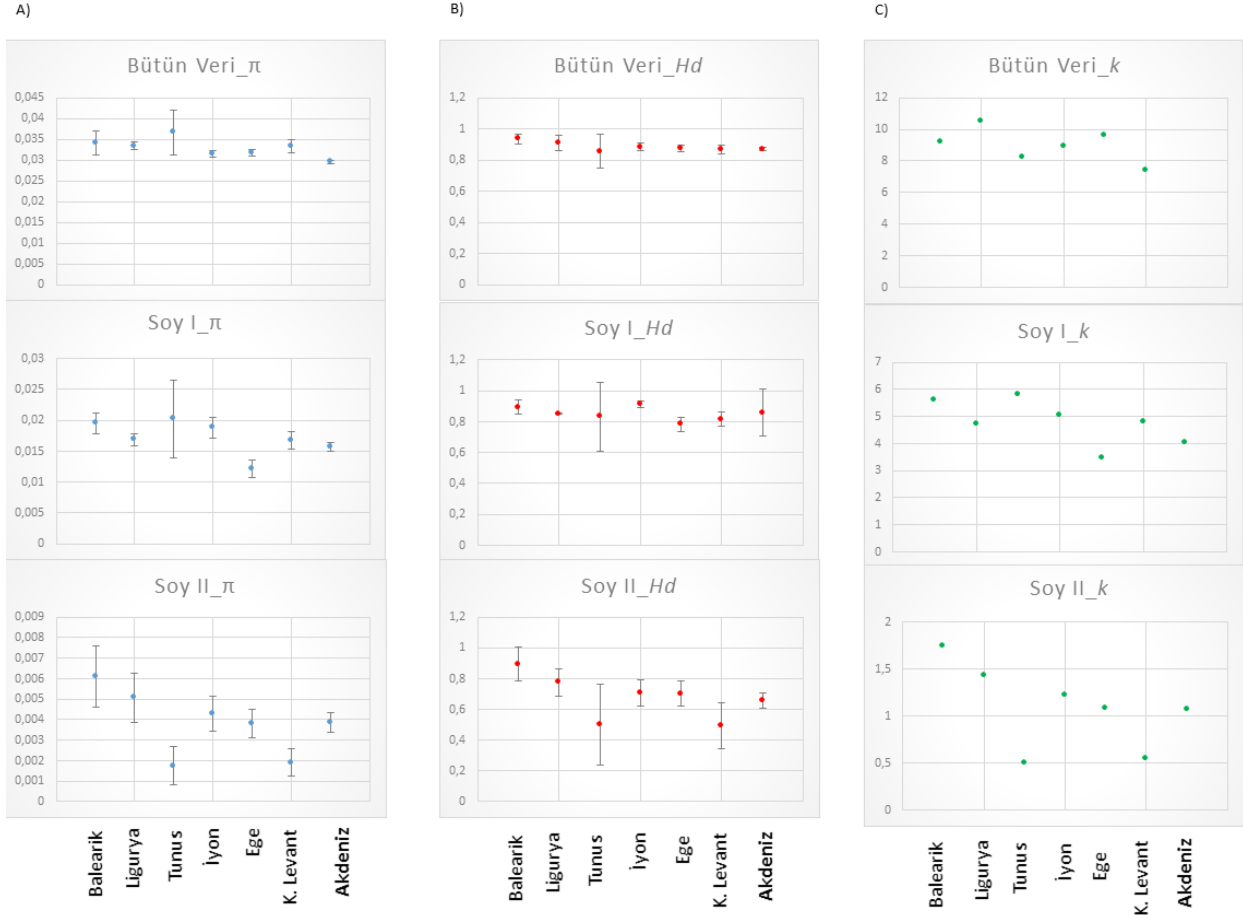
Antik DNA örneklerinde de diğerlerinde olduğu gibi soy I frekansı soy ikiye göre daha yüksek olarak bulunmaktadır.

4.4.6. Baz Dizisine Dayalı Olarak Saptanan Soy Çeşitliliği

Soyların nükleotid çeşitlilikleri (π), haplotip çeşitlilikleri (Hd) ve her popülasyonun ortalama nükleotid farkı sayısı (k) DnaSP v.5 programındaki (Librado ve Rozas, 2009) “Polymorphism” aracı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo 4.4.6.1 ve şekil 4.4.6.1’de verilmektedir.

Tablo 4.4.6.1 A) Bütün veri B) Soy I C) Soy II için popülasyonlar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı (K) ve popülasyonlar arasındaki her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı (D_{xy}). K değeri köşegenin üst tarafında, D_{xy} değeri ise alt tarafında verilmiştir.

A) Tüm Veri	Balearik Denizi (n=32)	Ligurya Denizi (n=59)	Tunus Kıyısı (n=8)	İyon Denizi (n=74)	Ege Denizi (n=94)	K. Levant Denizi (n=42)
Balearik Denizi (n=32)		8,992	10,359	8,146	9,116	9,510
Ligurya Denizi (n=59)	0,03270		9,078	8,146	8,099	8,812
Tunus Kıyısı (n=8)	0,03635	0,03289		8,008	8,832	9,810
İyon Denizi (n=74)	0,03133	0,03133	0,03068		7,555	7,925
Ege Denizi (n=94)	0,03244	0,02978	0,03132	0,02928		8,792
K. Levant Denizi (n=42)	0,03337	0,03193	0,03430	0,03013	0,03118	
B) Soy I	Balearik Denizi (n=24)	Ligurya Denizi (n=36)	Tunus Kıyısı (n=4)	İyon Denizi (n=47)	Ege Denizi (n=54)	K. Levant Denizi (n=28)
Balearik Denizi (n=24)		4,781	5,438	4,806	4,462	5,064
Ligurya Denizi (n=36)	0,01714		5,056	4,502	4,036	4,504
Tunus Kıyısı (n=4)	0,01895	0,01812		4,633	4,245	5,018
İyon Denizi (n=47)	0,01807	0,01738	0,01742		4,306	4,438
Ege Denizi (n=54)	0,01566	0,01457	0,01490	0,01619		3,966
K. Levant Denizi (n=28)	0,01764	0,01614	0,01748	0,01662	0,01387	
C) Soy II	Balearik Denizi (n=8)	Ligurya Denizi (n=23)	Tunus Kıyısı (n=4)	İyon Denizi (n=27)	Ege Denizi (n=40)	K. Levant Denizi (n=14)
Balearik Denizi (n=8)		1,582	1,125	1,477	1,291	1,161
Ligurya Denizi (n=23)	0,00561		0,739	1,361	1,203	0,941
Tunus Kıyısı (n=4)	0,00392	0,00261		0,667	0,804	0,500
İyon Denizi (n=27)	0,00522	0,00484	0,00235		1,131	0,849
Ege Denizi (n=40)	0,00454	0,00428	0,00282	0,00403		0,826
K. Levant Denizi (n=14)	0,00404	0,00333	0,00174	0,00297	0,00290	



Şekil 4.4.6.1 Bütün veri ve her popülasyon için ayrı ayrı A) nükleotid çeşitliliği (π), B) haplotip çeşitliliği (Hd) C) bir popülasyondaki ortalama nükleotid farkı sayısı (k) değerlerine göre ölçülmüş mitokondriyal soy varyasyonu. Dikey çubuklar değerler standart sapmayı göstermektedir.

Nükleotid çeşitliliği bütün popülasyonlarda yaklaşık olarak aynı iken haplotip çeşitliliği batıdan doğuya doğru azalma göstermektedir. En yüksek haplotip çeşitliliği Balearik Denizi'nde, en düşük haplotip çeşitliliği ise Kuzey Levant Denizi'nde görülmektedir. Ortalama nükleotid farkı sayısı en yüksek Tunus kıyısında, ikinci olarak Balearik Denizi'nde, en düşük ise olarak ise İyon Denizi'nde görülmektedir.

Çeşitlilik bütün popülasyonlar ve genel veri için soy I'de soy II'ye göre daha yüksek olarak bulunmaktadır.

Soy I'de en yüksek nükleotid çeşitliliği örnek sayısı düşük Tunus Kıyısı popülasyonunda, ikinci olarak Balearik Denizi'nde, en düşük ise Ege Denizi'nde görülmektedir. En yüksek haplotip çeşitliliği Ligurya ve İyon Denizi'nde en düşük haplotip çeşitliliği ise Ege Denizi'nde bulunmaktadır.

Ortalama nükleotid farkı sayısı en yüksek Balearik Denizi'nde, en düşük ise Ege Denizi'nde görülmektedir.

Soy II'de en yüksek nükleotid çeşitliliği, haplotip çeşitliliği ve ortalama nükleotid farkı sayısı Balearik Denizi'nde, en düşük ise Kuzey Levant Denizi'nde görülmektedir. Tunus kıyısı göz önüne alınmadığında çeşitliliğin batıdan doğuya doğru azalma gösterdiği gözlenmiştir.

Soylar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı (K) ve soylar arası her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı (D_{xy}) DnaSP v.5 programındaki (Librado ve Rozas, 2009) "Polymorphism" aracı kullanılarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 4.4.6.2'de verilmektedir.

Tablo 4.4.6.2 A) Bütün veri B) Soy I C) Soy II için popülasyonlar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı (K) ve popülasyonlar arasındaki her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı (D_{xy}). K değeri köşegenin üst tarafında, D_{xy} değeri ise alt tarafında verilmiştir. Her matris için en yüksek değerler gri ile en düşük değerler ise mavi ile işaretlenmiştir.

D) Tüm Veri	Balearik Denizi (n=32)	Ligurya Denizi (n=59)	Tunus Kıyısı (n=8)	İyon Denizi (n=74)	Ege Denizi (n=94)	K. Levant Denizi (n=42)
Balearik Denizi (n=32)		8.992	10.359	8.146	9.116	9.510
Ligurya Denizi (n=59)	0.03270		9.078	8.146	8.099	8.812
Tunus Kıyısı (n=8)	0.03635	0.03289		8.008	8.832	9.810
İyon Denizi (n=74)	0.03133	0.03133	0.03068		7.555	7.925
Ege Denizi (n=94)	0.03244	0.02978	0.03132	0.02928		8.792
K. Levant Denizi (n=42)	0.03337	0.03193	0.03430	0.03013	0.03118	
E) Soy I	Balearik Denizi (n=24)	Ligurya Denizi (n=36)	Tunus Kıyısı (n=4)	İyon Denizi (n=47)	Ege Denizi (n=54)	K. Levant Denizi (n=28)
Balearik Denizi (n=24)		4.781	5.438	4.806	4.462	5.064
Ligurya Denizi (n=36)	0.01714		5.056	4.502	4.036	4.504
Tunus Kıyısı (n=4)	0.01895	0.01812		4.633	4.245	5.018
İyon Denizi (n=47)	0.01807	0.01738	0.01742		4.306	4.438
Ege Denizi (n=54)	0.01566	0.01457	0.01490	0.01619		3.966
K. Levant Denizi (n=28)	0.01764	0.01614	0.01748	0.01662	0.01387	
F) Soy II	Balearik Denizi (n=8)	Ligurya Denizi (n=23)	Tunus Kıyısı (n=4)	İyon Denizi (n=27)	Ege Denizi (n=40)	K. Levant Denizi (n=14)
Balearik Denizi (n=8)		1.582	1.125	1.477	1.291	1.161
Ligurya Denizi (n=23)	0.00561		0.739	1.361	1.203	0.941
Tunus Kıyısı (n=4)	0.00392	0.00261		0.667	0.804	0.500
İyon Denizi (n=27)	0.00522	0.00484	0.00235		1.131	0.849
Ege Denizi (n=40)	0.00454	0.00428	0.00282	0.00403		0.826
K. Levant Denizi (n=14)	0.00404	0.00333	0.00174	0.00297	0.00290	

Bütün veri incelendiğinde Tunus-Balearik, Tunus-Kuzey Levant ve Kuzey Levant-Balearik arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısının ve her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısının en yüksek, İyon-Ege arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısının ve her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısının ise en düşük olduğu gözlenmiştir.

Soy I dizilerine göre Tunus-Balearik ve Kuzey Levant-Balearik arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı en yüksek değeri vermektedir. Ancak her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı Tunus-Balearik ve İyon-Balearik arasında en yüksek değerdedir. Her iki çeşitlilik ölçümü için en düşük değer Ege- Kuzey Levant arasındadır.

Soy II dizilerine göre en Ligurya-Balearik arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı ve her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı en yüksek, Tunus ile diğer bütün popülasyonlar arasında ise en düşüktür. Tunus kıyısından sonra bu iki çeşitlilik ölçümü için en düşük olduğu değer Ege- Kuzey Levant arasındadır.

Ege ve Kuzey Levant benzerliğinin her iki soy dizileri bazında, nükleotid farkları açısından yüksek olduğu gözlenmiştir.

4.4.7. Nötralite Testleri

Soyların ani bir genişlemeye maruz kalıp kalmadığını anlayabilmek için nötralite testi Arlequin v3.5 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.4.7.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.4.7.1. Soylara Arlequin’e (Excoffier, 2006) göre hesaplanan Tajima’nın *D* ve Fu’nun *F_s* testi sonuçları.

	Tajima’nın D	Fu’nun F _s
Soy I (n=193)	+	***
Soy II (n=116)	***	***

*p<0.05***p<0.001

Nötralite testlerinin sonuçlarına göre her iki soy için de pozitif anlamlı değerler hesaplanmıştır. Bu durum her iki soy için de ani popülasyon daralması modelini işaret etmektedir.

4.4.8. Popülasyonların Etkin Dişi Büyüklüğü

Bütün popülasyonlar ve Akdeniz’in tamamı için etkin dişi popülasyon büyüklüğü bütün veri, soy I verisi ve soy II verisi için ayrı ayrı LAMARC v2.0 (Kuhner, 2006) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo 4.4.8.1’de verilmektedir.

Tablo 4.4.8.1: Bütün popülasyonlar için A) bütün veri B) soy I verisi C) soy II verisi kullanılarak hesaplanan theta (Θ) ve etkin dişi popülasyon büyüklüğü (N_{EF}). En yüksek N_{EF} değerleri gri ile en düşük N_{EF} değerleri ise mavi ile işaretlenmiştir (K. Levant-Kuzey Levant).

A) Bütün Veri	Θ	N_{EF}
Balearik (n=31)	0.073601	751031
Liguriya (n=59)	0.035935	366684
Tunus (n=8)	0.012651	129092
İyon (n=74)	0.034300	350000
Ege (n=94)	0.018784	191673
K. Levant (n=42)	0.014230	145204
B) Soy I	Θ	N_{EF}
Balearik (n=24)	0.056697	578541
Liguriya (n=36)	0.026139	266724
Tunus (n=4)	0.003910	79796
İyon (n=47)	0.127383	1299827
Ege (n=51)	0.007455	76071
K. Levant (n=28)	0.004367	44561
C) Soy II	Θ	N_{EF}
Balearik (n=8)	0.010005	102092
Liguriya (n=59)	0.011020	112449
Tunus (n=4)	0.002676	27306
İyon (n=27)	0.037612	383796
Ege (n=37)	0.010200	104082
K. Levant (n=14)	0.009999	102031

Popülasyonların etkin dişi büyüklüleri birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman, hem bütün veri hem de soy I ve soy II için en düşük değer en doğuda bulunan Kuzey Levant Denizi'nde ve örnek sayısı düşük olan Tunus Denizi'nde, en yüksek değer ise bütün veri için en batıdaki Balearik Denizi'nde, soy I ve soy II için Akdeniz'in ortasında bulunan İyon Denizi'nde görülmektedir.

4.4.9 Popülasyonlar Arasındaki Dişi Göç Oranları

Bütün popülasyonlar için popülasyonlar arasındaki dişi göç oranları bütün veri, soy I verisi ve soy II verisi için ayrı ayrı LAMARC v2.0 (Kuhner, 2006) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar tablo 4.4.9.1'de verilmektedir.

Tablo 4.4.9.1: Bütün popülasyonlar arasındaki bütün veri soy I verisi ve soy II verisi kullanılarak hesaplanmış göç oranları (K.Levant=Kuzey Levant).

Nereden	Nereye	Bütün Veri	Soy I	Soy II
Balearik	Ligurya	194.954	104.19	0.057
	Tunus	10.302	6.4770	0.001
	İyon	547.056	136.923	0.078
	Ege	50.866	18.926	0.009
	K. Levant	0.003	0.003	0.000
Ligurya	Balearik	207.8224	27.273	0.026
	Tunus	447.3019	89.833	0.087
	İyon	521.1112	115.538	0.090
	Ege	0.006876	0.004	0.002
	K. Levant	183.2136	16.887	0.013
Tunus	Balearik	79.92700	53.447	0.009
	Ligurya	56.91495	45.901	0.012
	İyon	332.0870	82.658	0.065
	Ege	60.57003	57.722	0.008
	K. Levant	0.003804	53.447	0.009
İyon	Balearik	239.588	25.937	9.010
	Ligurya	204.299	20.183	4.859
	Tunus	332.087	30.006	10.964
	Ege	207.255	16.731	8.070
	K. Levant	388.835	31.980	12.6697
Ege	Balearik	251.251	46.52216	0.034
	Ligurya	82.603	26.930	0.007
	Tunus	0.000	0.002	0.001
	İyon	200.061	45.340	0.020
	K. Levant	0.004	0.001	0.00
K. Levant	Balearik	149.093	70.815	0.006
	Ligurya	236.472	99.523	0.013
	Tunus	193.348	85.432	0.011
	İyon	245.140	139.006	8.285
	Ege	431.47	236.100	11.730

Sonuçlar incelendiği zaman Soy I'deki göç oranının soy II'ye göre çok daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Her iki soy için de Kuzey Levant Denizi'nden Ege Denizi'nde yüksek miktarda göç olmasına rağmen Ege Denizi'den Kuzey Levant Denizi'ne az miktarda göç olduğu ve Ege Denizi'nden en büyük göçün Balearik Denizi'ne doğru olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Akdeniz'in orta kısmında bulunan İyon Denizi'nde görece olarak yüksek miktarda kılıçbalığının diğer denizlere göç ettiği gözlenmiştir. Doğuda batıya doğru göç etme oranları batıdan doğuya doğru olan göç oranına göre genel olarak daha yüksek bulunmuştur.

4.4.10. Popülasyonlar/ Popülasyon Grupları Arası Genetik Farklar

4.4.10.1. F_{ST} Değerleri

Popülasyonlar arasındaki farklılaşmayı ölçen F_{ST} , Arlequin v3.5 programı (Excoffier ve Lischer, 2010) kullanılarak hem bütün veri için hem de soy I ve soy II için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Elde edilen F_{ST} değerlerinin anlamlı olup olmadığı tablo 4.4.10.1.1’de verilmektedir.

Tablo 4.4.10.1.1. Hesaplanan ikili F_{ST} değerlerinin anlamlı olup olmadığı A) bütün data kullanılarak hesaplanan F_{ST} değerlerinin anlamlı olup olmadığı B) soy I’e ait diziler kullanılarak hesaplanan F_{ST} değerlerinin anlamlı olup olmadığı C) soy II’e ait diziler kullanılarak hesaplanan F_{ST} (K. Levant=Kuzey Levant). “n” popülasyonların örnek sayılarını gösterir. Anlamlı olan sonuçlar ($p<0.05$) gri ile gösterilmiştir.

A) Bütün verinin ikili F_{ST} sonuçları						
	Balearik	Liguriya	Tunus	İyon	Ege	K. Levant
Balearik (n=31)	-					
Liguriya (n=59)	-	-				
Tunus (n=8)	-	-	-			
İyon (n=74)	-	-	-	-		
Ege (n=94)	-	-	-	-	-	
K. Levant (n=42)	-	-	-	-	-	-
B) Soy I’in F_{ST} Sonuçları						
	Balearik	Liguriya	Tunus	İyon	Ege	K. Levant
Balearik (n=24)	-					
Liguriya (n=36)	-	-				
Tunus (n=4)	-	-	-			
İyon (n=47)	-	-	-	-		
Ege (n=51)	+*	+**	-	+*	-	
K. Levant (n=28)	-	-	-	-	-	-
C) Soy II’nin F_{ST} Sonuçları						
	Balearik	Liguriya	Tunus	İyon	Ege	K. Levant
Balearik (n=8)	-					
Liguriya (n=59)	-	-				
Tunus (n=4)	-	-	-			
İyon (n=27)	-	-	-	-		
Ege (n=37)	-	-	-	-	-	
K. Levant (n=14)	-	-	-	-	-	-

* $0,01<p<0,05$ ** $0,001<p<0,01$

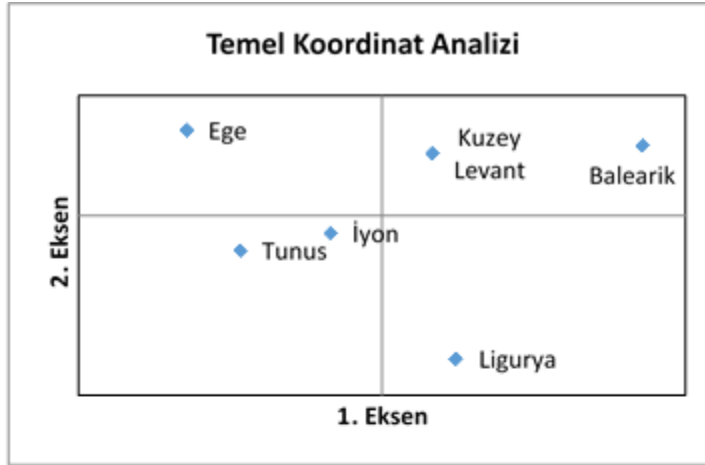
F_{ST} sonuçlarına göre bütün diziler ve sadece CII soyuna ait diziler analiz edildiği zaman popülasyonlar arasında fark görülmemektedir. Ancak CI soyuna ait bireyler incelendiği zaman (bu ölçüt bu haliyle bir yerde soy içi haplotip çeşitliliği ile ilgili olmaktadır), Ege Denizi örneklerinin,

Kuzey Levant ve örnek sayısı düşük Tunus Kıyısı popülasyonlarına ait örnekler hariç diğer popülasyonlardan az bir önemlilik derecesinde ($p < 0.05$) farklı çıktığı gözlenmiştir.

4.4.10.2. Temel Koordinat Analizi (PCA)

Popülasyon bireylerinin genetik değerlerinin ortalaması, popülasyon merkezleri kullanılarak, GenAlEx v6.5 (Peakall ve Smouse, 2012) programı ile PCA yapılmıştır. PCA hem bütün veri için, hem de soy I ve soy II için ayrı ayrı oluşturulmuştur. Sonuçlar Şekil 4.4.10.2.1'de verilmektedir.

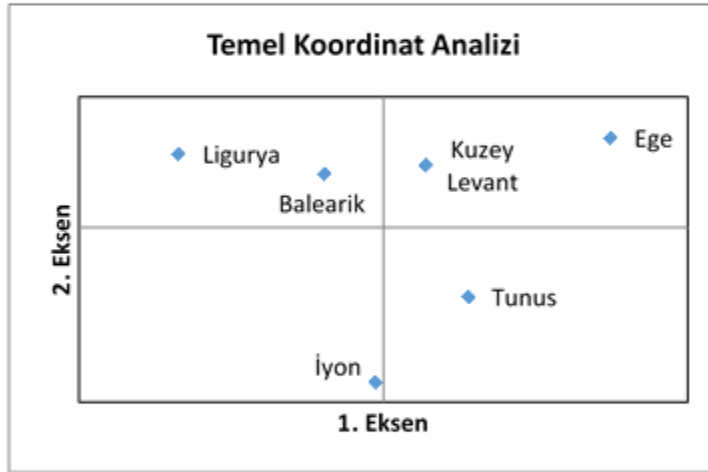
A)



Varyasyon Yüzdesi:

1. Eksen: 77,73
2. Eksen: 22,27

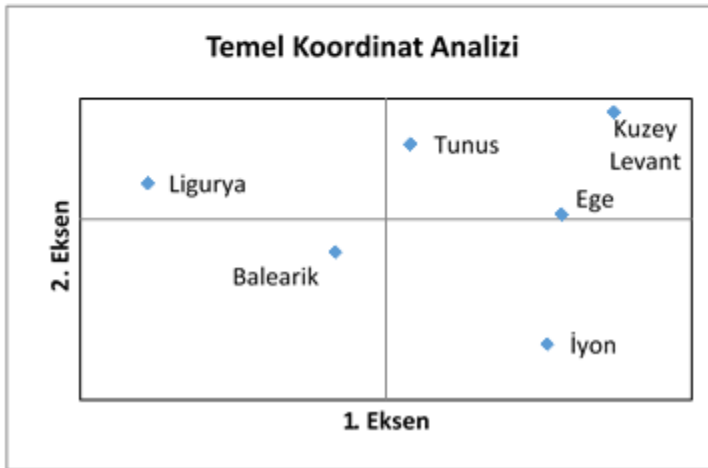
B)



Varyasyon Yüzdesi:

1. Eksen: 81,66
2. Eksen: 18,34

C)



Varyasyon Yüzdesi:

1. Eksen: 86,86
2. Eksen: 12,89

Şekil 4.4.10.2.1. Akdeniz'in 6 ayrı bölgesi için PCA analizi A) Bütün veri. B) Soy I dizileri için C) Soy II dizileri. Her eksen için hesaplanan varyasyon yüzdesi PCA grafiklerinin yanında verilmiştir.

Bütün veri kullanılarak yapılan PCA sonucunda (Şekil 4.4.10.2.1 A) popülasyonlar ilk eksene göre 1.Tunus-İyon-Ege 2. Ligurya- Balearik-Kuzey Levant, ikinci eksene göre 1.Tunus-Ege-Kuzey

Levant 2. Ligurya-Balearik-İyon ve bütün eksenler göz önüne alındığında 1.Tunus-İyon 2.Ligurya 3. Balearik- Kuzey Levant 4. Ege olmak üzere farklı gruplara ayrılabilir. Bu PCA analizinde varyasyon ağırlık toplamı %100 olan ilk iki ekseninde Ege, Ligurya gibi farklı görülmektedir

Sadece soy I verisi kullanılarak yapılan PCA sonucunda (Şekil 4.4.10.2.1 B) popülasyonlar ilk eksene göre 1.Tunus-İyon-Ege 2. Ligurya- Balearik-Kuzey Levant, ikinci eksene göre 1.Balearik-Ege-Kuzey Levant 2. Ligurya-İyon-Tunus ve bütün eksenler göz önüne alındığında 1.Tunus 2. İyon 3. Ege-Kuzey Levant 4. Balearik-Ligurya olmak üzere farklı gruplara ayrılabilir. Gene varyasyon ağırlık toplamı %100 olan iki ekseninde Ege Kuzey Levant yakın iki grup olarak görülmektedir.

Sadece soy II verisi kullanılarak yapılan PCA sonucunda (Şekil 4.4.10.2.1 C) popülasyonlar ilk eksene göre 1. Ligurya- Balearik, 2.Tunus-İyon-Ege-Kuzey Levant, ikinci eksene göre 1.Balearik-İyon 2. Ligurya-Tunus-Ege-Kuzey Levant ve bütün eksenler göz önüne alındığında 1. İyon 2. Balearik 3. Liguria 4. Tunus-Kuzey Levant- Ege olmak üzere farklı gruplara ayrılabilir. Son olarak varyasyon ağırlık toplamı %99,75 olan iki ekseninde Ege Kuzey Levant yakın iki grup olarak görülmektedir.

4.4.10.3. AMOVA

PCA sonuçlarına göre ortaya çıkan gruplarda, Vinas vd.'nin (2010) çalışmasında belirtilen doğu ile batı gruplarında (doğu grubuna Kuzey Levant Denizi örneklerini de katarak) ve özellikle batı popülasyonlarından farklı çıkabilecek Ege Denizi ile batı popülasyonları (Balearik ve Ligurya Denizi) arasındaki genetik varyasyonun grup içi ve gruplar arası nasıl dağıldığını gözlemlemek için AMOVA Arlequin v3.5 programı (Excoffier ve Lischer, 2010) kullanılarak oluşturulmuştur.

Tüm veri için AMOVA analizi için oluşturulan gruplar aşağıda verilmiştir.

Bütün Veri: Doğu-Batı → 1. Grup: Balearik-Ligurya-Tunus
2. Grup: İyon-Ege-Kuzey Levant
PCA1 → 1. Grup: Tunus-İyon-Ege
2. Grup: Ligurya- Balearik-Kuzey Levant
PCA2 → 1. Grup: Tunus-Ege-Kuzey Levant
2. Grup: Ligurya-Balearik-İyon
PCA3 → 1. Grup: Tunus-İyon
2. Grup: Ligurya
3. Grup: Balearik- Kuzey Levant
4. Grup: Ege
Ege-Batı → 1. Grup: Balearik-Ligurya
2. Grup: Ege

Tablo 4.4.10.3.1 bütün veri kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 4.4.10.3.1. Bütün veri kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçları.

Çeşitlilik Kaynağı	Doğu-Batı	PCA1	PCA2	PCA3	Ege-Batı
Gruplar Arası	-	-	-	+	-
Gruplardaki Popülasyonlar Arası	-	-	-	-	-
Popülasyon İçi	-	-	-	-	-

*p<0.05

Soy I verisi için AMOVA analizi için oluşturulan gruplar aşağıda verilmiştir.

Soy I: Doğu-Batı → 1. Grup: Balearik-Ligurya-Tunus
 2. Grup: İyon-Ege-Kuzey Levant
 PCA1 → 1. Grup: Tunus-İyon-Ege
 2. Grup: Ligurya- Balearik-Kuzey Levant
 PCA2 → 1. Grup: Balearik-Ege-Kuzey Levant
 2. Grup: Ligurya-İyon-Tunus
 PCA3 → 1. Grup: Tunus
 2. Grup: İyon
 3. Grup: Ege-Kuzey Levant
 4. Grup: Balearik-Ligurya
 Ege-Batı → 1. Grup: Balearik-Ligurya
 2. Grup: Ege

Tablo 4.4.10.3.2 soy I verisi kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 4.4.10.3.2. Soy I verisi kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçları.

Çeşitlilik Kaynağı	Doğu-Batı	PCA1	PCA2	PCA3	Ege-Batı
Gruplar Arası	-	-	-	-	-
Gruplardaki Popülasyonlar Arası	-	-	-	-	-
Popülasyon İçi	+	+	+	+	+

*p<0.05

Soy II verisi için AMOVA analizi için oluşturulan gruplar aşağıda verilmiştir.

Soy II: Doğu-Batı → 1. Grup: Balearik-Ligurya-Tunus
2. Grup: İyon-Ege-Kuzey Levant
PCA1 → 1. Grup: Ligurya- Balearik
2. Grup: Tunus-İyon-Ege-Kuzey Levant
PCA2 → 1. Grup: Balearik-İyon
2. Grup: Ligurya-Tunus-Ege-Kuzey Levant
PCA3 → 1. Grup: İyon
2. Grup: Balearik
3. Grup: Liguria
4. Grup: Tunus-Kuzey Levant- Ege
Ege-Batı → 1. Grup: Balearik-Ligurya
2. Grup: Ege

Tablo 4.4.10.3.3 soy II verisi kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 4.4.10.3.3. Soy II verisi kullanılarak oluşturulan grupların AMOVA sonuçları.

Çeşitlilik Kaynağı	Doğu-Batı	PCA1	PCA2	PCA3	Ege-Batı
Gruplar Arası	-	-	-	+	-
Gruplardaki Popülasyonlar Arası	-	-	-	-	-
Popülasyon İçi	-	-	-	-	-

*p<0.05

Bütün veri ve soy II kullanılarak yapılan AMOVA sonuçlarına göre bütün popülasyonlar içi çeşitlilik anlamlı değilken her veri grubunu PCA analiz sonucu ortaya çıkan 4 grup birbirinde anlamlı olarak farklıdır. Soy I' de ise popülasyonlar içi çeşitlilik anlamlıyken PCA sonucu ortaya çıkan hiçbir grup arasında anlamlı bir çeşitlilik bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 42 tanesi Akdeniz Levant havzasının kuzey bölgesinde 26 tanesi ise Ege Denizi'nden olmak üzere toplam 68 tane kılıç balığı örneği toplanarak bu örneklerden 450 bç uzunluğunda olan primerlerle tanımlanmış mtDNA CR bölgesine ait bir bölgenin DNA dizisi elde edilmiştir. Bu DNA dizileri literatürde bulunan Akdeniz'e ait diğer diziler (Balearik Denizi, Ligurya Denizi, Tunus Denizi, İyon Denizi ve Ege Denizi) ile karşılaştırılarak Türkiye'de yaşayan kılıç balığı popülasyonları hakkında genetik veriye dayalı bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Akdeniz'de yaşayan kılıçbalığı örneklerinin Doğu Akdeniz ve Batı Akdeniz olarak genetik farklılaşma gösterdiği daha önce belirlenmişti (Vinas vd., 2010). Bu çalışma ile bizim kıyılarımızda yaşayan kılıç balıklarının birbirlerinden ve Akdeniz'in diğer bölgelerindeki kılıç balıklarından farklı olup olmadığı araştırılmış ve Türkiye popülasyonlarının, Akdeniz'de doğu -batı ekseninde var olduğu düşünülen farklılaşmanın bir parçası olup olmadığı analiz edilmiştir.

Ayrıca Marmaray Yenikapı kazılarında çıkan kılıç balığı örneklerinden DNA izole edilerek mtDNA'nın aynı bölgesi çalışılmış, geçmişteki ve şimdiki soy çeşitliliği karşılaştırılmıştır. Böylece kıyılarımızda yaşayan kılıç balıklarının geçmişten bu güne genetik çeşitliliğindeki olası değişimler hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır.

Elde edilen bütün bu bilgiler, Türkiye için ekonomik önemi olan kıyılarımız kılıçbalıklarının ve daha genel olarak Akdeniz Kılıçbalığı popülasyonlarının korunması ve yönetimi çalışmalarına da katkıda bulunabilecektir.

5.1. Kılıç Balığı mtDNA Soylarının Analizi

Bu çalışmadan ve literatürden elde edilen toplam 303 kılıçbalığı mtDNA ile oluşturulan NJ ağacı soy I ve soy II'yi %99 çöz-bağla değeri ile birbirinden ayırmıştır. Ayrıca soy I kendi içinde üç alt dala ayrılmaktadır. Bu dallardaki dizilerin *RsaI* kesim noktası kontrol edildiği zaman dallardan ikisinin α , bir tanesinin ise β alt soyundan olduğu gözlenmiştir. MJ ağacı sonucu ortaya çıkan ayırım bu durumu desteklemektedir. MJ ağacı sonucu soy I'de 3 Soy II'de 1 adet ana düğüm gözlenmektedir. Soy I'deki ana düğümlerden iki tanesi α , bir tanesi ise β alt soyuna aittir. Hem MJ ağacı hem de NJ ağacı incelendiği zaman α alt soyunun iki dala ayrıldığı, β alt soyunun ise bu iki bu daldan birinden köken aldığı belirlenmiştir.

NJ ağacı ve MJ ağacındaki dağılıma göre soy I in Soy II'ye oranla daha çok çeşitlilik içermektedir. Bu durum soyların nükleotid çeşitliliği (π), haplotip çeşitliliği (Hd) ve ortalama nükleotid farkı sayısı (k) karşılaştırıldığı zaman da görülmektedir ($\pi_{Soy I}$: 0,01561, $\pi_{Soy II}$: 0,00386; $Hd_{Soy I}$: 0,858, $Hd_{Soy II}$: 0,659; $k_{Soy I}$: 4,027, $k_{Soy II}$: 1,072).

Nötralite testleri her iki soy için de anlamlı derecede pozitif çıkmıştır. Bu durum her iki soyun da beklenildiği gibi ani popülasyon daralmasına maruz kaldığını göstermektedir.

Kılıçbalığı mtDNA soylarının farklı filogenetik kökenlere sahip olduğu, Pasifik Okyanusu'nda bulunan tek soy olan soy I'in bu okyanusta, soy II'nin ise Atlantik Okyanusu'nda ortaya çıktığı düşünülmektedir (Alvarado-Bremer vd., 2005^b). Buzul çağı (Pleistosen) sırasında Akdeniz'deki faunal yok oluş sırasında yok olan türler arasında büyük bir ihtimalle kılıç balığı da vardı. Buzullar arası (interglacial) döneminde aralarında kılıç balığının da olduğu türler, hem Atlantik'ten hem de Pasifik'ten (Atlantik yolunu kullanarak) gelerek burada tekrar çoğalmaya başlamışlardır (Emig ve Geistdoerfer, 2004). Bu dönem de gerçekleşen kılıç balığı akınlarını buzullaşma (glacial) dönemdeki izolasyonlar izledi (Alvarado-Bremer vd., 2005^b). Her iki kılıçbalığı soyunun da Akdeniz'de gözlenmesi, buzullar arası (interglacial) döneminde Akdeniz'e olan göçün soy II'nin ortaya çıkışında sonra olduğunu göstermektedir. Soy I ve soy II'nin birlikte Atlantik'ten Akdeniz'e geldiğini ve Akdeniz'deki tekrar çoğalma, izolasyon ve popülasyon büyümesi sırasında farklı demografik olgulara maruz kalmış olabileceğini düşünülmektedir (Alvarado-Bremer vd., 2005^b) Bu durumda bu iki soyun ayrı ayrı incelenmesi daha uygundur.

5.2. Akdeniz Kılıç Balığı Popülasyonlarının Analizi

Akdeniz'de yaşayan kılıçbalıklarının soy frekanslarının dağılımı incelendiği zaman diğer batıda bulunan Balearik Denizi popülasyonunun diğer popülasyonlara göre daha düşük soy II yüzdesine sahip olduğu gözlenmiştir (%25). Soy II Kuzey Atlantik'te Akdeniz oranla daha az bulunmaktadır ve Atlantik ile Akdeniz kılıç balıkları her en kadar iki ayrı stok olsa da az miktarda karışma göstermektedir (Alvarado-Bremer vd., 2005^b). Coğrafi olarak Atlantik stoğuna yakın olan Balearik Denizi'ndeki bu durum, ilk bakışta popülasyonun burada karışıyor olması ihtimalini akla getiriyor olsa da soy II'nin Atlantik ve Akdeniz'de farklı alt soylar olarak görülmesi ve Balearik'te sadece Akdeniz'e ait soy II örnekleri bulunması bu ihtimali düşürmektedir. Diğerlerinden daha farklı soy frekans dağılımı gösteren bir diğer popülasyon Tunus kıyısı popülasyonudur. Ancak Tunus kıyısı popülasyonu çok az örnekle temsil edilmektedir (n=8) ve bu nedenle bu popülasyon için sonuçlar istatistiksel olarak kuvvetli olmayabilir. Soy frekanslarının dağılımında dikkat çeken bir diğer önemli nokta Ege Denizi popülasyonundaki soy frekansıdır. Diğer popülasyonlara göre Ege Denizi'nde soy II frekansı nispeten daha yüksek (%43), soy I_β frekansı ise çok düşüktür (%7). Bu durum Ege Denizi popülasyonunun nispeten izole ve küçük bir popülasyon olabileceğini düşündürmektedir. Eğer Ege Denizi gerçekten nispeten izole olmuş bir popülasyon ise soy I_β frekansı genetik sürüklenme sebebiyle artmış olabilir.

MJ ağındaki haplotiplerin popülasyonlara göre dağılımı incelendiği zaman bütün ana düğümlerde, örnek sayısı düşük Tunus hariç, bütün popülasyonlar gözlenmektedir. Ayrıca soy I_α'da sadece doğu popülasyonlarında gözlenen, görece yüksek frekansa sahip bir haplotip (17/89) bulunmaktadır. Bu haplotip doğudaki popülasyonlar için bir belirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca bu çalışmada daha önce gözlenmemiş 4 adet haplotip bulunmuştur. Bir tanesi soy II haplotipidir ve Kuzey Levant örneğine aittir. Diğer 3 haplotip ise soy I_α haplotipleridir. Bu 3 haplotipten 2 tanesi Ege Denizi ve 1 tanesi Kuzey Levant örneğidir.

Baz dizisine göre saptanan soy çeşitliliği her popülasyon için karşılaştırıldığı zaman batıdan doğuya Balearik-Ligurya-Tunus-İyon-Ege-Kuzey Levant ekseninde, örnek sayısı az olan Tunus dışında azalma eğimi göstermektedir. Soy I_α frekansı çok düşük olan Ege Denizi beklenildiği şekilde en düşük haplotip çeşitliliğine sahiptir. İyon Denizi ise soy I için en yüksek haplotip çeşitliliğine sahiptir. Doğu grubuna ait bir popülasyon olmasına rağmen batıya en yakın olan İyon Denizi'nde batı ve doğu popülasyonları birbirine karışıyor olabilir. Soylar arasındaki nükleotid farklarının ortalama sayısı ve popülasyonlar arasındaki her bölge için ortalama nükleotid değişim sayısı incelendiği zaman batı ve doğu gruplarının kendi içlerinde daha genel olarak daha düşük değerlere sahip oldukları ancak batı ve doğu gruplarına ait popülasyonlar birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman genel olarak bu değerlerin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. En düşük değerler Kuzey Levant ve Ege Denizi arasında bulunmaktadır.

Baz dizisine göre saptanan soy çeşitliliği değerleri, Vinas vd.,'nin (2010) çalışmasında da belirtildiği gibi batıdan doğuya gidildikçe her iki soy için de genetik çeşitlilikte genel bir azalma olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuç buzullar arası (interglacial) dönemde Atlantik'ten Akdeniz'e gelen kılıç balıklarının batıdan doğuya doğru ilerlediğini desteklemektedir (Alvarado-Bremer vd., 2005^b).

Batıdan doğuya doğru genetik çeşitliliğin genel olarak azalmasına paralel olarak doğudaki popülasyonların etkin popülasyon büyüklükleri batıdakilere göre genel olarak daha düşük bulunmuştur. Soylar ayrı ayrı incelendiği zaman İyon Denizi'nin etkin popülasyon büyüklüğünün yüksek çıkması bu bölgede karışmayı gösteren bir diğer bulgu olabilir. Vinas vd.'nin (2010) çalışmasında İyon denizi doğu olarak kabul edildiği zaman her iki soy için de kılıç balıklarının batıdan doğuya göç oranının azaldığı gözlenmiştir. Bu çalışmada da bu durum genel olarak gözlenirse de İyon Denizi'nin ne batıya ne doğu daha yakın olduğu düşünülebilir.

Bütün veri ve soy II verisi ile hesaplanan F_{ST} incelendiği zaman popülasyonlar arasında anlamlı farklar bulunmamıştır. Ancak soy I verisi ile hesaplanan F_{ST} sonuçlarına göre ege Denizi popülasyonu kendisine coğrafi olarak en yakın popülasyon olan Kuzey Levant popülasyonu ve

örnek sayısı çok düşük olan Tunus kıyısı popülasyonu hariç diğer bütün popülasyonlardan farklı çıkmıştır. Bu durum Ege Denizi'nde diğerlerine göre farklılık gösteren soy I_α ve soy I_β frekans dağılımı nedeniyle ortaya çıkmış olabilir.

Soy I verisi kullanılarak elde edilen PCA sonucu incelendiğinde, Ege Denizi popülasyonunun diğer bütün popülasyonlardan daha uzakta olduğu, coğrafi olarak kendisine en yakın olan Kuzey Levant Denizi'ne benzer olduğu gözlenmektedir. Hem soy I hem soy II verisinde popülasyonlar batı (Balearik-Ligurya) ve doğu (Kuzey Levant-Ege Denizi) ekseninde ayrılmıştır. İyon Denizi soy I için doğuya, soy II için ise batıya daha yakın olarak bulunmaktadır. Bu sonuç İyon Denizi'nde batı ve doğu popülasyonları birbirine karıştığı ihtimalini desteklemektedir. Tunus ise her iki soy içinde doğuya daha yakın durmaktadır.

Soy I ve soy II verileri doğu (Balearik, Ligurya ve Tunus Denizi) ve batı (İyon, Ege ve Kuzey Levant Denizi) olarak iki grup halinde incelendiği zaman AMOVA sonuçlarına göre bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Soy I verisi anlamlı derece de yüksek grup içi çeşitlilik içermektedir ve PCA sonuçlarına göre ortaya çıkan hiçbir grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Soy I verisi ise PCA sonucu ortaya çıkan 4 grup arasında (1. Grup: Balearik, 2. Grup: Ligurya, 3. Grup: Tunus, Ege ve Kuzey Levant, 4. Grup: İyon) anlamlı bir fark bulmuştur. Bu gruplara göre batıdaki Ligurya ve Balearik diğerlerinden ayrıldığı gibi popülasyonlar arasında en batıda olan Balearik de Ligurya'dan ayrılmıştır. Bu ayrım, örneklemeden daha az olasılıkla da Balearik ve Ligurya arasında kılıçbalığı geçişini zorlaştıran bir deniz akımını işaret ediyor olabilir. Doğu popülasyonları arasında bulunan ve doğu ve batı grubunun arasındaki karışma noktasında bulunan İyon Denizi de diğer doğu popülasyonlarından ayrılmıştır. Tunus ise doğu popülasyonlarına benzemektedir. Ancak düşük örnek sayısına sahip bu popülasyonun gerçekten doğu popülasyonlarına benzeyip benzemediğine karar vermek için analizler daha yüksek örnek sayısı ile tekrarlanmalıdır.

5.3. Antik DNA Dizileri

Antik DNA örneklerinden elde edilen farklı örneklerin dizileri birbirleri ile incelendiği zaman sadece 2 örneğin birbiri ile aynı diziye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durumda antik kemik örneklerinin en az 5 farklı canlıya ait olduğu söylenebilir. aDNA'larda ortaya çıkan nükleotid değişimlerinden en sık görüleni C-T değişimidir. DNA parçacığının kırıkları civarında ise G-A değişimi görülmektedir. Diğer nükleotid değişimleri ve indeller (insertion-deletion) de, çok sık olmamakla beraber, görülebilmektedir (Olivieri vd., 2010; Dağtaş, 2013). Bu çalışmada incelenen aynı örneğe ait ileri ve geri aDNA dizilerinde bulunan ve aynı örneğin farklı dizi parçalarının çakışan kısımlarında, tekrarlarda gözlenen nükleotid farkları, özellikle 350. noktada bulunan C-T

ile 302 ve 345. noktalarda bulunan G-A değişimleri ölümden sonra gözlenen nükleotid değişikliklerine ve bu örneklerin otantik antik DNA örnekleri olduğunu işaret ediyor olabilir.

Bu nükleotid değişimlerinin canlı öldükten sonra gerçekleşen hatalı baz yerleştirmeler sonucu ortaya çıkmadığını belirlemek için izole edilen örnekler en az bir kere daha yükseltgenecektir. Ayrıca örneklerden en az bir kere daha izolasyonu yapılmalı ikinci izolasyon sonucu elde edilen DNA örnekleri de en az iki kere daha PZR ile çoğaltılacaktır. Bu tekrarların proje kapsamında yapılamamasının sebebi kullanılan kimyasal malzemelerin pahalı olması ve proje bütçesinin sadece bir izolasyon ve PZR için yeterli olmasıdır.

Antik DNA örneklerinin soy dağılımına bakıldığı zaman bu örneklerin Akdeniz'deki diğer popülasyonlara benzer şekilde daha yüksek oranda soy I frekansına sahip olduğu belirlenmiştir.

6. SONUÇ

Yuvaya dönüş (homing) davranışı gösteren kılıç balığı farklı yumurtlama alanlarına sahiptir (Alvarado-Bremer vd., 2005^a). Yüksek mesafeleri boyunca göç edebilen bu tür balıklar için genetik farklılaşma nedeni olarak genellikle farklı yumurtlama alanlarının varlığı ve okyanuslardaki akım, anafor gibi hareketlerin larvaların dağılımını kısıtlayabilecek coğrafi bariyerler oluşturması gibi faktörler öne sürülmektedir (Alvarado-Bremer vd., 1996; Alvarado-Bremer vd., 1998; Chow vd., 2000; Zardoya vd., 2004)

Şu ana kadar Akdeniz için batıda (Cavalero vd., 1991) ve doğuda (Tserpes vd., 2001) olmak üzere farklı yumurtlama alanların önerilmiştir. Bu nedenle kılıçbalıklarının batı ve doğuda farklılaşmasını beklenebilir. Vinas vd.,'nin (2010) çalışmasında da popülasyonların kısmi mtDNA bölgesi soy bazında incelendiğinde, Akdeniz stoğunun doğu (Balearik Denizi, Ligurya Denizi, Tunus kıyısı) ve batı (İyon Denizi, Ege Denizi) olarak farklılaştığı ortaya çıkmıştır. Bu çalışma da Vinas vd.,'nin (2010) incelediği popülasyonlara Türkiye kıyılarından örneklenen Ege Denizi ve Akdeniz popülasyonlar eklenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Kılıç balığı mtDNA bölgesine ait iki soyun farklı demografik tarihlere sahip olduğu belirlenmiştir (Vinas vd., 2010). Bu nedenle soyların ayrı ayrı incelenmesi daha uygundur.
2. Akdeniz bölgesinde her iki soy için de genel olarak batı (Ligurya ve Balearik) ve doğu (Ege ve Kuzey Levant) olarak istatistiksel olarak baskın olmayan bir farklılaşma görülmektedir ve batıdan doğuya doğru gidildikçe çeşitlilik genel olarak azalmaktadır. Bu bulguya paralel olarak etkin popülasyon büyüklükleri de doğudaki popülasyonlarda daha düşük bulunmuştur.
3. Akdeniz'in orta kısmında bulunan İyon Denizi soy I'de batıya soy II'de ise doğuya benzemektedir ve soy I için en yüksek çeşitliliğe sahiptir. Bu durum batı ve doğu gruplarının İyon Denizi'nde karıştığını gösteriyor olabilir. Soy II PCA sonucu Ligurya'da ayrılan ve diğer popülasyonlara göre genel olarak daha düşük bir soy II frekansına sahip olan Balearik Denizi bireylerini Akdeniz'in diğer kısımlarına göç kısmen zorlaştıran bir etmen olabilir. Tunus popülasyonunun ise gerçekten doğuya yakın olup olmadığını belirleyebilmek için düşük olan örnek sayısının (n=8) yükseltilmesi gerekmektedir.
4. Sadece doğu popülasyonlarında nispeten yüksek frekansta bulunan (%17) bulunan soy I'e ait bir haplotip doğu popülasyonlarını tanımlamak için belirteç olarak kullanılabilir.
5. Göç genel olarak doğudan batıya daha yoğun olarak gözlenirse de popülasyonların birbiri ile karışma ihtimali olan İyon Denizi'nde göç oranı yüksek bulunmuştur.

6. Popülasyonlar F_{TS} ile karşılaştırıldı zaman sadece soy I 'e göre Ege Denizi popülasyonu batı grubunda bulunan Balearik ve Ligurya'dan ve doğu grubunda batıya en yakın bulunan İyon'dan farklı bulunmuştur. Soyların frekans dağılımı incelendiğinde de bu popülasyonun soy I_β frekansının diğer popülasyonlara göre daha düşük olduğu gözlenebilir Bu durum Ege Denizi'nin küçük ve nispeten izole bir popülasyon olduğunu işaret ediyor olabilir. Bu olası izolasyonun sebebi ise Ege Denizi'nde bulunan henüz belirlenememiş bir yumurtlama bölgesi veya Ege Denizi'ni Akdeniz'de ayırım ve kılıçbalıklarının bu iki bölge arasındaki geçişini zorlaştıran bir akım olabilir.
7. Her ne kadar batıdan doğuya doğru genetik çeşitliliğin azaldığı gözlene de Akdeniz'de iki birbirinden ayrı iki stoğun varlığından kesin olarak söz edilemez.
8. Yapılan bütün analizler Ege Denizi örneklerinin her iki soy içinde Kuzey Levant Denizi'ndeki (Türkiye'nin Akdeniz kıyıları) popülasyonlara benzediğini, bütün veri göz önüne alındığı zaman ise birbirlerine daha uzak olduğunu göstermektedir. Ancak soy I analizlerinde Ege Denizi popülasyonu, soy II analizlerine göre Kuzey Levant'a daha uzak çıkmıştır. Bütün veri ve soy I'deki bu farklılaşmanın nedeni olarak Ege Denizi'ndeki soy I'ni alt soy frekanslarındaki farklılık düşünülebilir. Yine de (F_{ST} sonuçlarına göre) bu iki popülasyon arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.
9. Marmaray-Yenikapı kazısından çıkarılan antik kılıçbalığı kemiklerinden elde edilen aDNA mtDNA dizileri incelendiği zaman bu kemiklerin otantik olduğu ve en az 5 farklı ayrı bireye ait olduğu ve soy frekans dağılımını Ege ve Kuzey Levant soy frekansının dağılımına benzer olduğu belirlenmiştir. Ancak sonuçların güvenilirliğini sağlamak için bu aDNA analizleri en az 3 kere daha tekrar edilmelidir.

Şu anda Akdeniz stokları tek bir popülasyon olarak kabul edilmektedir. Bu varsayım ile yapılan kılıç balığı koruma ve yönetimi aşırı avlanmaya sebep olabilir ve bunu sonucu olarak Akdeniz popülasyonunun göreceli küçük ve izole olması nedeniyle risk altına sokabilir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre Ege Denizi'nde ve Kuzey Levant Denizinde yaşayan kılıç balıklarının göreceli olarak küçük ve nispeten izole olma olasılığı bulunmaktadır ve bu popülasyonlar aşırı avlanma tehlikesi altında olabilir.

KAYNAKLAR

Abascal, F. J., Mejuto, J., Quintans, M., Ramos-Cartelle, A. 2010. "Horizontal and vertical movements of swordfish in the Southeast Pacific" *ICES J. Mar. Sci.*, 67, 466-474.

Akaike, H. 1974. "A new look at the statistical model identification" *IEEE Trans. Auto. Cont.*, 19, 716-723.

Allendorf, F. W., Luikart, G. 2007. *Conservation and The Genetics of Populations* (1. Basım). Oxford: Blackwell Publishing.

Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., Campos, P. F., Samaniego, J. A., Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Zhang, G., Scofield, R. P., Holdaway, R. N., Bunce, M (2012). "The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils" *Proc. R. Soc. B*, 279, 4724-33.

Alvarado Bremer, J. R., Mejuto, J., Greig, T. W., Ely, B. 1996. "Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region" *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 197, 295-310.

Alvarado-Bremer, J. R., Mejuto, J., Gómez-Márquez, J., Viñas, J., Boán, F., Carpintero, P., Rodríguez, J. M., Pla, C., de La Serna, J. M., Ely, B. 1999. "Hierarchical analysis of nucleotide diversity reveals extremely low levels of mitochondrial DNA gene flow between northeast Atlantic and Mediterranean swordfish populations" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 49, 467-475.

^aAlvarado-Bremer, J. R., Mejuto, J., Gómez-Márquez, J., Boán, F., Carpintero, P., Rodríguez, J. M., Viñas, J., vd. 2005. "Hierarchical analyses of genetic variation of samples from breeding and feeding grounds confirm the genetic partitioning of Northwest Atlantic and South Atlantic populations of swordfish (*Xiphias gladius* L.)" *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 327, 167-182.

^bAlvarado-Bremer, J. R., Viñas, J., Mejuto, J., Ely, B., Pla, C. 2005. "Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes" *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36, 169-187.

Alvarado-Bremer, J. R., Hinton, M. G., Greig, H. W. 2006. "Evidence of spatial genetic heterogeneity in Pacific swordfish (*Xiphias gladius*) revealed by the analysis of *Idh-A* sequences" *Bull. Mar. Sci.*, 79, 493-503.

Anonymous. 2011. "Report of the 2010 ICCAT Mediterranean swordfish assessment meeting" Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 66: 1405-1470.

Antoniou, A., Magoulas A. 2014. "Application of Mitochondrial DNA in Stock Identification" Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. Editörler: Cadrin, S.X., Kerr, L. A., Mariani, S. Londra: Elsevier.

Aris-Brosou, S. Excoffier, L., 1996. "The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism" Mol. Biol. Evol., 13, 494-504.

Arocha, F. 2007. "Swordfish reproduction in the Atlantic Ocean: An over-view" Gulf Caribb. Res., 19, 21-36.

Arocha, F., Ortiz, M. 2006. "Mediterranean spearfish" ICCAT 2006-2009 Manual. http://www.iccat.int/Documents/SCRS/Manual/CH2/2_1_8_2_MSP_ENG.pdf. Son erişim tarihi: 20 Ocak 2014.

Bandelt H. J., Forster, P., Röhl, A. 1999. "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies" Mol. Biol. Evol., 16, 37-48.

Başaran, S. 2008. "Demirden Yollar ve Marmara Kıyısında Eski Bir Liman" Yenikapı Batıkları Cilt I: Yenikapı'nın Eski Gemileri. Editörler: Kocabaş, U. İstanbul: Ege Yayınları.

Bruford, M. W., Bradley, D. G., Luikart, G. 2003. "DNA markers reveal the complexity of livestock domestication" Nat. Rev. Genet., 4, 900-910.

Bruford, M.W. 2004. "Conservation Genetics of UK Livestock: From Molecules to Management" Farm Animal Genetic Resources. Editörler: Simm, G., Villanueva, B., Sinclair, K. D., Townsend, S. Nottingham: Nottingham University Press.

Canese, S., Garibaldi, F., Orsi Relini, L., Greco, S. "2008" Swordfish tagging with pop - up satellite tags in the Mediterranean Sea" Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 62, 1052-1057.

Cavallaro, G., Potoschi, A., Cefali, A. 1991. "Fertility gonad-somatic index and catches of eggs and larvae of *Xiphias gladius* L. 1758 in the southern Tyrrhenian Sea" Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 35, 502-507.

Chow, S., Takeyama, H. 2000. "Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish" *J. Fish Biol.*, 56, 1087-1098.

Chow, S., Okamoto, H., Miyabe, N., Hiramatsu, K., Barut, N. 2000. "Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of big eye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa" *Mol. Ecol.*, 9, 221-227.

Chow, S., Clarke, S., Nakadate, M., Okazaki, M. 2007. "Boundary between the north and south Atlantic populations of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by a single nucleotide polymorphism at calmodulin gene intron" *Mar. Biol.*, 152, 87-93.

Chromas Pro version 1.52. 2003-2008. Technelysium Pty Ltd, Tewantin QLD.

^aCollette, B., Acero, A., Amorim, A. F., Bizsel, K., Boustany, A., Canales Ramirez, C., Cardenas, G., Carpenter, K. E., de Oliveira Leite, N., Di Natale, A., Die, D., Fox, W., vd. 2011. "Xiphias gladius" The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <http://www.iucnredlist.org> Son erişim tarihi: 15 Temmuz 2014.

^bCollette, B., Bizsel, K., Boustany, A., Carpenter, K. E., Di Natale, A., Fox, W., Graves, J., Juan Jorda, M., Masuti, E., Nelson, R., Oxenford, H. 2011. "Tetrapturus belone" The IUCN Red List of Threatened Species Version 2014.2. <http://www.iucnredlist.org> Son erişim tarihi: 15 Temmuz 2014.

Dağtaş, N.D. 2013. A Short Fragment of Ancient DNA and its Use in Determination of Sheep Mitochondrial DNA Haplogroups in Southeast Anatolia (Yüksek Lisans Tezi). Ankara. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.

Di Natale, A., de La Serna, J. M., De Metrio, G., Restrepo, V., Srour, A., Tserpes, G. 2002. "On the reduction of juvenile swordfish catches in the Mediterranean" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 54, 1529-1533.

Emig, C. C., Geistdoerfer, P. 2004. "The Mediterranean deep-sea fauna: historical evolution, bathymetric variations and geographical changes" *Notebooks Geol.*, CG2004_A01_CCE-PG.

Excoffier, L., Peter, E., Smouse, P. E., Quattro, J. M. 1992. "Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data" *Genetics*, 131: 479-491.

Excoffier, L., Lischer H. E. L. 2010. "Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows" *Mol. Ecol. Resour.*, 10, 564-567.

Farris, J. S. 1970. "Methods for computing Wagner trees" *Syst. Zool.*, 19, 83-92.

Food and Agricultural Organization "FAO Statistics" <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>, Son erişim tarihi 15 Temmuz 2014.

Frimodt, C., Dore, I. 1995. *Multilingual Illustrated Guide to the World's Commercial Warm Water Fish* (1. Basım). Oxford: Osney Mead.

Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

Garcia-Cortes, B., Mejuto, J., Quintans, M., 2003. "Summary of swordfish (*Xiphias gladius*) recaptures carried out by the Spanish surface longline fleet in the Atlantic Ocean" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 55, 1476-1484.

Guindon, S, Gascuel, O. 2003. "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood" *Syst. Biol.*, 52, 696-704.

Jobling, M. A., Hurles, M. E., Tyler-Smith, C. 2004. *Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples and Disease* (1. Basım). London/New York: Garland Science Publishing.

Hall, T.A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95-98.

Hasegawa, M., Kishino, H, Yano, T. 1985. "Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA" *J. Mol. Evol.*, 22:160-174.

Hinton, M. G., Alvarado Bremer, J. 2007. "Stock structure of swordfish in the Pacific Ocean" IATTC Working Group to Review Stock Assessments, <http://www.iatcc.org/PDFFiles2/StockAssessmentReports/SAR8-SWO-ENG.pdf>. Son erişim tarihi: 25 Ocak 2014.

Hofreiter, M, Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Pääbo, S. 2001. "Ancient DNA" *Nat. Rev. Genet.*, 2, 353-359.

Hudson, R. R. 1990. "Gene genealogies and the coalescent process" *Oxford Surv. Evol. Biol.* 7, 1-44.

International Commission of Conservation of Atlantic Tunas-ICCAT 2014. "Report of the 2014 ICCAT Mediterranean swordfish stock assessment meeting"

http://www.iccat.int/Documents/Meetings/Docs/2014_SWO_MED_ASSESS_rep_final.pdf. Son erişim tarihi: 02 Ağustos 2014.

Jukes, T. H. Cantor, C. R. 1969. *Evolution of Protein Molecules* (1.Basım). New York: Academic Press.

Kasapidis, P., Mejuto, J., Tserpes, G., Antoniou, A., Garcia-Cortes, B., Peristeraki, P., Oikonomaki, K., Kotoulas, G., Magoulas, A. 2007. "Genetic structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) stocks in the Atlantic using microsatellite DNA analysis" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 61, 89-98.

Kasapidis, P, Magoulas, A., Garcia-Cortes, B., Mejuto, J., 2008. "Stock structure of swordfish (*Xiphias gladius*) in the Pacific Ocean using microsatellite DNA markers". *Biology Specialist Working Group Paper 4th Regular Session of the Western and Central Pacific Fisheries Commission*.<http://www.wcpfc.int/system/files/SC4-BI-WP4%20%5BSWO%20stock%20structure%5D>. Son erişim tarihi: 02 Ağustos 2014.

Kimura, M. 1981. "Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 454-8.

Kotoulas, G., Magoulas, A., Tsimenides, N., Zouros, E. 1995. "Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*" *Mol. Ecol.*, 4, 473-481.

Kotoulas, G., Mejuto, J., Tserpes, G., Garcia-Cortes, B., Peristeraki, P., de la Serna, J. M., Magoulas, A. 2003. "DNA microsatellite markers in service of swordfish stock-structure analysis in the Atlantic and Mediterranean" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 55, 1632-1639.

Kotoulas, G., Mejuto, J., Antoniou, A., Kasapidis, P., Tserpes, G., Piccinetti, C., Peristeraki, P., Garcia-Cortes, B., Oikonomaki, K., de la Serna, J. M., Magoulas, A. 2007. "Global genetic structure of swordfish (*Xiphias gladius*) as revealed by microsatellite DNA markers" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 61, 79-88.

Kruskal, J. B. 1956. "On the shortest spanning subtree of a graph and the traveling salesman problem" Proc. Amer. Math. Soc., 7, 48-50.

Kuhner M.K. 2006, "LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters" Bioinformatics, 22, 768-770.

Librado, P., Rozas, J. 2009. "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data" Bioinformatics 25, 1451-1452.

Nakamura, I. 1985. "FAO species catalogue. Vo1.5. Billfishes of the World. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date" FAO Fisheries Synopsis (125) Vo1.5. <http://www.fao.org/3/a-ac480e.pdf>. Son erişim tarihi: 05.12.2012.

Nelson, J.S. 1984. Fishes of the World (1. Basım). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics (1. Basım). New York: Columbia University Press.

NETWORK version 4.6.1.0 "Free Phylogenetic Network Software" <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.html>.

Miya, M., Friedman, M., Satoh, T. P., Takeshima, H., Sado, T., Iwasaki, W., Yamanoue, Y., Nakatani, M., Mabuchi, K., Inoue, J. G., Poulsen, J. Y., Fukunaga, T., Sato, Y., Nishida, M. 2013. "Evolutionary origin of the scombridae (tunas and mackerels): members of a paleogene adaptive radiation with 14 other pelagic fish families" Plos ONE 8 (9), e73535.

Olivieri, C., Ermini, L., Rizzi E., Corti, G., Luciani, S. vd. 2012. "Phylogenetic position of a copper age sheep (*Ovis aries*) mitochondrial DNA" PLoS ONE, 7, e33792.

Onar, V., Alpak, H., Pazvant, G., Armutak, A., Gezer İnce, N., Kızıltan, Z. 2013. "A bridge from Byzantium to modern day İstanbul: an overview of animal skeleton remains found during metro and Marmaray excavations" J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ., 39, 1-8.

Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., vd. 2004. "Genetic analyses from ancient DNA", Annu. Rev. Genet. 38, 645-79.

Palko, B. J., Beardsley G. L., Richards W. J. 1981."Synopsis of the Biology of the Swordfish, *Xiphias gladius* Linnaeus. FAO Fisheries Synopsis, No. 127" <http://www.fao.org/docrep/017/ap932e/ap932e.pdf>. Son erişim tarihi. 05.12.2012.

- Peakall, R., Smouse P. E. 2012. "GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update" *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Posada, D., 2003. "Using MODELTEST and PAUP to Select a Model of Nucleotide Substitution" *Current Protocols in Bioinformatics*. Editörler: Bateman, A., Pearson, W. R., Stein, L. D., Stormo, G. D., Yates, J. R. New York: John Wiley and Sons.
- Rohland, N., Siedel, H., Hofreiter, M. A. 2009. "Rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput" *Mol. Ecol. Resour*, 10, 677-68.
- Rozen, Si., Skaletsky Hi J. 2000. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers" *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Editörler: Krawetz, S. A., Misener, S. Totowa: Humana Press.
- Schwarz, G. 1978. "Estimating the dimension of a model" *Ann. Statist.*, 6, 461-464.
- Smith, B. L., Alvarado-Bremer, J. R. 2010. "Inferring population admixture with multiple nuclear genetic markers and Bayesian genetic clustering in Atlantic swordfish (*Xiphias gladius*)" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 65, 185-190.
- Tajima, F. 1983. "Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations" *Genetics*, 105,437-460.
- Tajima, F. 1989. "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism" *Genetics*, 123, 585-595.
- Tajima, F., 1993. "Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis". *Genetics*, 135, 599-607.
- Takahashi M., Okazaki M., Okamura H., Yokawa K. 2003. "Swimming behaviour and migration of a swordfish recorded by archival tag" *Mar. Freshwater Res.*, 54, 527-534.
- Tamura, K., Nei, M. 1993. "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees" *Mol. Biol. Evol.*, 10, 512-526.
- Tamura, K, Stecher, G, Peterson, D, Filipski, A, Kumar, S. 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0" *Mol. Biol. Evol.*, 30, 2725-2729.

Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures Math. Life Sci.*, 17, 57-86.

Tserpes, G., Peristeraki, P. Somarakis, S. 2001. "On the reproduction of swordfish (*Xiphias gladius* L.) in the Eastern Mediterranean" *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 52, 740-744.

Viñas, J., Alvarado Bremer, J. R., Pla, C. 2004. "Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations" *Mar. Biol.*, 145, 225-232.

Viñas, J., Pérez-Serra, A., Vidal, O., Alvarado Bremer, J. R., Pla, C. 2010. "Genetic differentiation between eastern and western Mediterranean swordfish revealed by phylogeographic analysis of the mitochondrial DNA control region" *ICES J. Mar. Sci.*, 67, 1222-1229.

Weir, B. S., Cockerham C. C. 1984." Estimating F-statistics for the analysis of population structure" *Evolution*, 38, 1358-1370.

Zardoya, R., Castilho, R., Grande, C., Favre-Krey, L., Caetano, S., Marcato, S., Krey, G., vd. 2004. "Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea" *Mol. Ecol.*, 13, 1785-1798.

EK 1

aDNA izolasyon protokolü (Rohland *vd.*, 2010).

Solüsyonların Hazırlanması

İzolasyon Solüsyonu

- 0,5 M EDTA
- 0,25 mg/ml Proteinaz K

1.25 ml proteinaz K (10 mg/ml), 50 ml EDTA (5M) içine eklenir.

Bağlama Solüsyonu

- 5 M GuSCN
- 3 M Sodyum Asetat

29.5 g GuSCN, dH₂O içinde toplam hacim 45 olacak şekilde çözünür. GuSCN çözünene kadar oda sıcaklığında döndürülür. Çözündükten sonra 5 ml sodyum asetat (300 mM) eklenir.

Silika Solüsyonu

4.8 g silika, toplam hacim 40 ml olacak şekilde dH₂O içinde çözünür. 1 saat bekletilir. 39 ml'lik üst faz yeni tüpe alınır. 4 saat bekletilir. 35 ml'lik üst faz atılır. Pelete, 48 µl %30 HCl eklenir. Vorteks ile karıştırılır. Hazırlanan solüsyon 1 ml'lik tüplere bölüştürülerek saklanır ve kullanılır.

Yıkama Solüsyonu (pH: 8.0)

- %50 Etanol
- 125 mM NaCl
- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

1,25 ml NaCl (5M), 500 µl Tris (1M), ve 100 µl EDTA, %50 etanol içinde toplam hacim 50 ml olacak şekilde çözünür.

TE Solüsyonu

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

100 µl Tris (1M) ve 20 µl EDTA (0,5M), dH₂O içinde toplam hacim 10 ml olacak şekilde çözünür. Hazırlanan solüsyon 1 ml'lik tüplere bölüştürülerek saklanır ve kullanılır.

Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

EDTA (0,5 M)

93.05 g EDTA, toplam hacim 500 ml olacak şekilde dH₂O içinde çözünür. 10g NaOH (pH 8.0) eklenir ve solüsyonun pH'ı, pH kağıdı ile ölçülür. Hazırlanan solüsyon 50 ml'lik 1 ml'lik tüplere bölüştürülerek saklanır ve kullanılır.

Proteinase K (10 mg/ml)

100 mg proteinaz K, toplam hacim 10 ml olacak şekilde dH₂O içinde çözünür. Hazırlanan solüsyon 1 ml'lik 1 ml'lik tüplere bölüştürülerek saklanır ve kullanılır.

Tris (1 M)

12.1 g Tris, toplam hacim 70 ml olacak şekilde dH₂O içinde çözünür. 8.7 ml %30 HCl (pH: 8.0) eklenir ve solüsyonun pH'ı, pH kağıdı ile ölçülür. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde ve dH₂O eklenir.

GuSCN (5 M)

29.5 GuSCN, toplam hacim 45 ml olacak şekilde dH₂O içinde çözünür. İki tüp olarak hazırlanır.

NaCl (5M)

29.2 g NaCl, toplam hacim 100 ml olacak şekilde dH₂O içinde çözünür.

- EDTA, NaCl ve Tris solüsyonları kullanılmadan önce 30 dakika UV altına steril edilir.

İzolasyon Öncesi Örneklerin Hazırlanması

1. Çalışma alanı alüminyum folyo ile kaplanır.
2. Örnekleri ölçmek için bir parça alüminyum folyo boşken tartılır.
3. Yaklaşık (230-250 mg kemik parçası kesilerek tartılır.
4. Tartılan kemik parçası havan ile ezilir. Her örnek için farklı havan kullanılır.
5. Kemik parçası tamamen toz haline getirildikten sonra tekrar tartılır.
6. Toz haline gelen örnekler 25 ml'lik boş tüplere geçirilir.

7. Negatif kontrol olmak üzere B1 ve B2 adı verilen iki adet boş tüp hazırlanır. Biri örnek tüplerinin en başına diğeri sonuna yerleştirilir. İzolasyon boyunca hep aynı tüp sırası takip edilmelidir.

İzolasyon Aşaması

1. Toz haline getirilmiş kemik örneklerine ve B1 ile B2 'ye 5 ml izolasyon solüsyonu eklenir.
2. Tüpler parafilm ile sarılır ve bir gece boyunca (16-20 saat) oda sıcaklığında alt üst edilerek döndürülür.
3. Ertesi gün tüpler santrifüj ile 5000 g hızında 2 dakika çevrilir.
4. Yeni boş tüpler hazırlanır ve bu tüplere 2.5 ml bağlama solüsyonu eklenir.
5. Santrifüj ile çevrilen örneklerin üst fazı, içinde bağlama solüsyonu olan yeni tüplere geçirilir. (Alt fazdaki pelet, -20 °C'de saklanır.)
6. Silika 10 saniye vorteks ile karıştırılır ve bütün tüplere 100 µl silika solüsyonu eklenir.
7. Tüpler parafilm ile sarılır ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında alt üst edilerek döndürülür.
8. Üç saatin sonunda tüpler santrifüj ile 5000 g hızında 2 dakika çevrilir.
9. Üst faz atılır.
10. Tüplerin kenarında kalan peletlere 400 µl bağlama solüsyonu eklenerek pelet solüsyonun içinde çözülür.
11. Örnekler 2 ml boyutunda ve üzerinde kolonlar olan yeni tüplere geçirilir.
12. Tüpler santrifüj ile 13.300 g hızında 2 dakika çevrilir.
13. Tüpün içinde biriken sıvı atılır.
14. Örnekler 450 µl yıkama solüsyonu eklenir.
15. Tüpler santrifüj ile 13.300 g hızında 2 dakika çevrilir.
16. Yıkama basamağı tekrar edilir.
17. Tüpün içinde biriken sıvı atıldıktan sonra, yıkama solüsyonun örneklerden tamamen ayrıldığından emin olmak için boş kolonlar santrifüj ile 13.300 g hızında 2 dakika çevrilir.
18. Eğer varsa tüpün içinde biriken sıvı atılır.
19. Örnekler 50 µl TE solüsyonu eklenir.
20. Tüplerin kapakları kapatılarak 10 dakika beklenir.
21. Tüpler santrifüj ile 13.300 g hızında 2 dakika çevrilir.
22. Kolonlar atılır.

23. Örnekler eğer hemen kullanılmayacaksa -20°C 'de, eğer hemen kullanılacaksa $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır.

EK 2

Modern ve antik DNA örneklerinin toplandığı yerler ve mtDNA soyları.

Modern Örnekler		
Örnek No	Toplandığı Yer	Soy
1	Kuzey Levant Denizi	I_α
2	Kuzey Levant Denizi	II
3	Kuzey Levant Denizi	II
4	Kuzey Levant Denizi	I_α
5	Kuzey Levant Denizi	I_α
6	Kuzey Levant Denizi	I_α
9	Kuzey Levant Denizi	II
32	Kuzey Levant Denizi	II
33	Kuzey Levant Denizi	I_α
34	Kuzey Levant Denizi	I_α
35	Kuzey Levant Denizi	I_β
37	Kuzey Levant Denizi	II
40	Kuzey Levant Denizi	I_β
41	Kuzey Levant Denizi	I_α
53	Kuzey Levant Denizi	I_α
54	Kuzey Levant Denizi	II
55	Kuzey Levant Denizi	I_α
56	Kuzey Levant Denizi	II
57	Kuzey Levant Denizi	I_α
58	Kuzey Levant Denizi	I_α
61	Kuzey Levant Denizi	II
62	Kuzey Levant Denizi	I_β
63	Kuzey Levant Denizi	II
64	Kuzey Levant Denizi	II
65	Kuzey Levant Denizi	I_α
66	Kuzey Levant Denizi	II
72	Kuzey Levant Denizi	I_β
73	Kuzey Levant Denizi	I_β
74	Kuzey Levant Denizi	I_β
75	Kuzey Levant Denizi	I_β
76	Kuzey Levant Denizi	I_α
83	Kuzey Levant Denizi	I_α
84	Kuzey Levant Denizi	I_α
85	Kuzey Levant Denizi	II
86	Kuzey Levant Denizi	II
87	Kuzey Levant Denizi	I_α

88	Kuzey Levant Denizi	I_α
89	Kuzey Levant Denizi	II
90	Kuzey Levant Denizi	I_α
91	Kuzey Levant Denizi	I_α
92	Kuzey Levant Denizi	I_β
115	Kuzey Levant Denizi	I_α
7	Ege Denizi	II
8	Ege Denizi	I_α
30	Ege Denizi	II
31	Ege Denizi	I_α
93	Ege Denizi	II
94	Ege Denizi	I_α
95	Ege Denizi	I_α
96	Ege Denizi	I_β
97	Ege Denizi	II
98	Ege Denizi	I_α
99	Ege Denizi	I_α
100	Ege Denizi	I_α
101	Ege Denizi	II
102	Ege Denizi	II
103	Ege Denizi	I_α
104	Ege Denizi	II
105	Ege Denizi	I_α
106	Ege Denizi	I_β
107	Ege Denizi	I_α
108	Ege Denizi	II
109	Ege Denizi	I_α
110	Ege Denizi	I_α
111	Ege Denizi	II
112	Ege Denizi	II
113	Ege Denizi	II
114	Ege Denizi	I_α
Antik Örnekler		
Örnek No	Toplandığı Yer	Soy
YK1	Yenikapı	I
YK2	Yenikapı	I
YK3	Yenikapı	II
YK4	Yenikapı	I
YK5	Yenikapı	II
YK6	Yenikapı	I

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. İNCİ ZEHRA TOĞAN
Proje No:	113Z405
Proje Başlığı:	Türkiye'nin Akdeniz ve Ege Denizindeki Kılıçbalığı Populasyonlarının Mitokondriyal Dna (Mtdna) Kullanılarak İncelenmesi
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	TUĞRUL ZAHİT ALIÇLI, VEDAT ONAR, FİRDES SAADET KARAKULAK, MEHMET GÖKOĞLU
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/07/2013 - 15/07/2014
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	26320.2
Öz:	<p>Kılıç balığı (<i>Xiphias gladius</i>) hem dünya hem de Türkiye için önemli besin kaynaklarından biridir. Çeşitli moleküler belirteçler kullanılarak yapılan genetik çalışmalar, kılıç balıklarının Kuzey Atlantik, Güney Atlantik, Akdeniz ve Hint-Pasifik olmak üzere 4 ana stoktan oluştuğunu göstermektedir. Şu ana kadar tek bir stok olarak kabul edilen Akdeniz için tek bir koruma ve yönetim senaryosu önerilmiştir.</p> <p>Türkiye'deki kılıç balığı populasyonları Akdeniz stoğunun bir parçası olarak kabul edilir. Fakat Türkiye'nin Ege ve Akdeniz kıyılarını içeren herhangi bir genetik çalışma yapılmamıştır. Bu projede, Türkiye'nin Akdeniz (Antalya Körfezi civarından) ve Kıbrıs'ın Karşıyaka kıyısından, Kuzey Levant Denizi'ni temsilen, (n= 42) ve Türkiye'nin Ege Denizi kıyısından Gökçeada ve Çanakkale civarından (n=26) kılıç balığı örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden DNA izole edilerek, mtDNA kontrol bölgesinin 450 baz çiftlik (bç) dizi analizi yapılmıştır. Ayrıca Yenikapı kazılarında çıkartılan örneklerden antik DNA (aDNA) izole edilmiş ve 450 bç'lik bölgesi 5 parça halinde analiz edilmiştir. Sonuçlar birbirleri ve literatürdeki dizi örnekleri ile karşılaştırılarak incelendiğinde Akdeniz'de batıdan doğuya gidildikçe genel olarak genetik çeşitliliğin ve etkin populasyon sayısının düştüğü ve soy l diye tanımlanan soya ait alt soyların frekansları açısından Ege Denizi kılıç balıklarının Kuzey Levant havzasından değil ama diğer Akdeniz örneklerinden düşük anlamlılık düzeyinde ayrıldığı gözlenmiştir. Gene soy l?e ait sonuçlar Akdeniz'de bulunan iki yumurtlama alanı (Güney İtalya-Sardunya Adası ve Girit Adası-Fethiye civarı) ile örtüşen batı ve doğu populasyonları arasında kesin bir farklılaşma değil ancak büyük olasılıkla iki grubun Akdeniz'in orta kısımlarında birbiri ile karıştığı yönünde bilgi vermektedir. Antik örneklerin soy frekansları ise günümüz örneklerine benzemektedir.</p> <p>Türkiye'de kılıç balığının avlanma oranı 1980'lerden bu yana, her geçen yıl artış göstermiştir. Henüz bu artışın ve Karadeniz ile Marmara'dan kılıç balığının kaybolmasının tüm Akdeniz populasyonunda daralma olarak hissedilmediği gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, kıyılarımız kılıç balıklarının korunması ve yönetimi çalışmalarına katkıda bulunabilecektir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Kılıç Balığı, mtDNA, Akdeniz, Kuzey Levant Denizi, Ege Denizi, Antik DNA (aDNA), Yenikapı Kazıları
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır