DOĞU, GÜNEYDOĞU ANADOLU, KARADENİZ BÖLGESİ VE İÇ ANADOLU'NUN DOĞUSUNDA DAĞILIŞ GÖSTEREN SU KURBAĞALARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

PROJE NO : TBAG-111T584

DOÇ. DR. C. CAN BİLGİN

ÇİĞDEM AKIN

Ekim 2012

ANKARA

ÖNSÖZ

Bu rapor, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiş olan TBAG-111T584 sayılı projenin yürütülmesi sürecinde elde edilen bilgi ve sonuçları içermektedir. Çalışmamızda, Türkiye'nin Doğu Anadolu, Karadeniz, İç Anadolu'nun doğusu, ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde dağılış gösteren su kurbağası populasyonlarının mtDNA ve nükleer belirteç sistemine dayalı genetik çeşitliliği, bunların bölgere göre dağılımı belirlenmiştir. Son olarak her iki belirteç sistemi birbiri ile karşılaştırılarak ne oranda örtüştükleri ve Anadolu su kurbağalarının taksonomisi ile ilgili problemin çözülebilmesi açısından ne kadar yararlı olup olmayacağı irdelenmiştir.

Raporda verilen araştırmalar, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoçeşitlilik ve Koruma Laboratuvarında yürütülmüş olup Çiğdem Akın'ın doktora tez çalışmasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu çalışmanın bulgularıyla doktora tez projenin geri kalan bölümünden elde edilecek bulguların birleştirilmesi ile oluşturulucak veri seti ile birçok bilimsel makale, ulusal ya da uluslararası bildirinin önümüzdeki 3 yıl içerisinde yayınlanması planlanmaktadır.

Araştırmamıza verilen destekten ötürü, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Temel Bilimler Araştırma Grubu'na şükranlarımızı sunarız.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii
TABLO LİSTESİ iv
ŞEKİL LİSTESİ v
KISALTMALAR vi
ÖZ vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
GELİŞME 9
2.1 MATERYAL VE METOD 9
2.1.1. Çalışma Alanı 9
2.1.2. Moleküler Çalışmalar 10
2.1.2.1. Genomik DNA İzolasyonu 10
2.1.2.2. mtDNA ve Nükleer Belirteç Sistemi Gen Bölgelerinin Çoğaltılması 11
2.1.2.2.1. mtDNA Belirteç Sistemi (ND3 gen bölgesi) 11
2.1.2.2.2. Nükleer Belirteç Sistemi (SAI-1+RanaCR1): 13
2.1.2.3. mtDNA ve Nükleer Belirteç Sistemi Gen Bölgelerinin Dizilenmesi 13
2.1.3. Veri Analizleri 14
2.1.3.1. DNA Dizilerinin Düzenlenmesi 14
2.1.3.2. DNA Dizilerinin Gruplanması 14
2.1.3.3. DNA Dizilerindeki Genetik Çeşitliliğin Tespit Edilmesi 14
2.1.3.4. Filogenetik Analizler 15
BULGULAR VE TARTIŞMA 17
3.1. mtDNA ND3 Belirteç Sistemi 17
3.1.1. mtDNA ND3 Haplotiplerinin Çalışma Alanındaki Bölgelere Göre Dağılımı 17
3.1.2. mtDNA ND3 Haplotiplerinin Genetik Çeşitliliği ve Coğrafi Dağılımları 18
3.1.3. mtDNA Anahaplogruplarının ve Altgrupların Filogenetik İlişkileri 20
3.1.4. mtDNA Anahaplogrupların ve Altgrupların Arasındaki Genetik Farklılaşma ve Ayrılma Zamanları 22
3.2 . Nükleer Belirteç Sistemi (SAI-1+RanaCR1) 23
3.2.1. Nükleer DNA Alellerinin Çalışma Alanındaki Bölgelere Göre Dağılımı 23
3.2.2. Nükleer Belirteç Sistemi Alel Gruplarının Genetik Çeşitliliği ve Coğrafi Dağılımları 25
3.2.3. Nükleer Belirteç Sistemi Alel Gruplarının Filogenetik İlişkileri 29
3.2.4. Nükleer Belirteç Sistemi Alel Gruplarının Arasındaki Genetik Farklılaşma ve Ayrılma Zamanları 32
3.3. mtDNA Haplogrupları ile Nükleer Alel Gruplarının Karşılaştırılması 33
3.4. Mitokondriyal ve Nükleer Genlerin Birleştirilmesine Dayalı Olarak Belirlenen Filogenetik İlişkiler 35
3.5. Araştırmanın Geliştirilmesi Hakkında Öneri 37

DEĞERLENDİRME VE SONUÇ.....38
KAYNAKLAR.....41

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan doku örnek sayılarının bölgelere göre dağılımı.....**9**
Table 2.2. Tampon ve solüsyonların hazırlanması.....**11**

Table 2.3. Çalışmada kullanılacak mtDNA belirteç sistemi (ND3) ve nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1)'nin primer dizileri.....**12**

Tablo 3.1. Proje kapsamında elde edilen mtDNA haplotip dağılım verilerinin bölgelere göre dağılımı..... **17**

Tablo 3.2. mtDNA anahaplogrupları ve altgruplar arasındaki genetik uzaklık ve bu uzaklığa dayalı olarak hesaplanmış ayrılma zamanları.....**23**

Tablo 3.3. Proje kapsamında nükleer belirteç sistemi analizi tamamlanan 550 örneğin taşıdıkları genotip özelliklerinin bölgelere göre dağılımı.....**24**
Tablo 3.4. Nükleer belirteç sistemi alel grupları arasındaki genetik uzaklık ve bu uzaklığa dayalı olarak hesaplanmış ayrılma zamanları.....**32**

Tablo 3.5. Bireylerin taşıdığı mtDNA haplotip grupları ile nükleer belirteç sistemi alel gruplarının karşılaştırılması.....**34**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Anadolu'daki mtDNA anahaplogrupların ve altgrupların dağılımı (Akın ve ark., 2010b).....**5**

Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı lokaliteler.....**9**

Şekil 2.2. Üre ekstraksiyon prosedürü kullanılarak elde edilmiş genomik DNA bantları. Sıra-1: Marker (PstI enzimi ile kesilmiş Lambda DNA), Sıra 2-15: İzole edilmiş genomik DNA bantları.....**10**

Şekil 2.3. mtDNA gen bölgesinin çoğaltılması. Sıra 1: Marker (PstI ile kesilmiş Lambda DNA), Sıra 2: negatif kontrol, Sıra3-15: ND3-F/ND3-R primerleri ile çoğaltılmış 340 baz uzunluğundaki pcr ürünü.....**12**

Şekil 2.4. Nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1) gen bölgesinin çoğaltılması. Sıra 1: Marker (PstI ile kesilmiş Lambda DNA), Sıra 1-7: Ex1-F5 ve Ex2-R2 primerleri ile çoğaltılmış 1143 baz uzunluğundaki pcr ürünü.....**13**

Şekil 3.1. Bu çalışmada elde edilen yeni haplotip verileri ile birlikte daha önce tanımlanmış anahaplogrupların ve altgrupların Türkiye'deki dağılımı.....**18**

Şekil 3.2 (bir önceki sayfada) mtDNA ND3 haplotiplerinin *maximum clade credibility* ağacı. Ağacın dallarındaki değerler *posterior probability* değerlerini göstermektedir. Ağacın en uç kısmında yer alan etiketler farklı haplotip isimlerini, kırmızı renkle işaretlenmiş olanlar ise ilk defa bu çalışmada tanımlanmış yeni haplotipleri göstermektedir.....**21**

Şekil 3.3. Nükleer belirteç sistemi alellerinin bu çalışmanın hedef bölgelerdeki dağılımı.....**25**

Şekil 3.4. Nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1) alellerinin *maximum clade credibility* ağacı. Ağacın dallarındaki değerler *posterior probability* değerlerini göstermektedir. Ağacın en uç kısmında yer alan mavi renkli etiketler bu çalışmada belirlenen alel gruplarını göstermektedir..... **31**

Şekil 3.5. Data partition ile oluşturulmuş mtDNA ND3 + nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1) verilerinin Bayesiyan filogenetik ağacı. Ağacın dallarındaki değerler yüzdelik olarak posterior probability değerlerini göstermektedir. Ağacın en uç kısmında yer alan mavi renkli etiketler bu analiz sonucunda Anadolu'da belirlenen monofiletik grupları göstermektedir.....**36**

KISALTMALAR

SAI-1	: serum albumin intron-1
mtDNA	: mitokondriyal DNA
AHG	: ana haplogrup
AG	: altgrup
ORF	: open reading frame
UTR	: untranscribed terminal repeat
hLTRs	: hierarchical likelihood ratio test
BIC	: bayesian information criteria
TE	: Tris-EDTA

ÖZ

Bu çalışmada Doğu, Güneydoğu Anadolu, Karadeniz ve İç Anadolu'nun doğusundan toplanmış 550 su kurbağası örneğinin mitokondriyal ND3 gen bölgesi ve nükleer serum albumin intron-1+RanaCR1 belirteç sistemi için çoğaltılıp sekansları çıkarılmış, sekans düzenlemesi tamamlandıktan sonra, mtDNA sekansları için haplotip ve bu haplotiplerin ait olduğu mtDNA anahaplogrubun belirlenmiş, nükleer belirteç sistemi sekansları için homozigot ve heterozigotlar gruplanarak, homozigotların taşıdığı aleller belirlenmiştir. Hem mtDNA haplotipleri hem de nükleer marker alelleri ayrı ayrı filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Çalışma kapsamındaki bölgelerde cf.*bedriagae*, Fırat, cf.*caralitanus* ve Kilikya Doğu-Batı olmak üzere dört farklı mtDNA haplogrubun dağılımı tespit edilmiştir. Bu gruplardan cf.*bedriagae*'nin Doğu Anadolu'nun kuzeyine; cf. *caralitanus*'un Kayseri Sultansazlığı'na; Kilikya Doğu ve Batı gruplarının doğuda Adıyaman'a, kuzeyde Kayseri ve Niğde'ye; Fırat grubunun ise Doğu Anadolu'nun kuzeyi ve Doğu Karadeniz bölgesine kadar dağıldığı belirlenmiştir. Elde edilen 32 yeni haplotipin dahil edilmesiyle yapılan filogenetik analizler mtDNA soylarının birbirinden çok iyi şekilde ayrılmış monofiletik gruplar oluşturduğunu göstermiştir.

Aynı bölgelerdeki nükleer belirteç sistemi sonuçları ise lokal ya da geniş yayılışlı alelleri içeren cf.*bedriagae*, Kilikya ve *ridibundus* olmak üzere üç farklı alel grubunun bulunduğunu göstermiştir. Bu gruplardan cf.*bedriagae* alel grubunun İç Anadolu, Karadeniz ve az yoğunluktaki birkaç aleli Güneydoğu Anadolu bölgesi'nde dağılış gösterirken, Kilikya alel grubu yalnızca Ceyhan havzası populasyonlarında, *Ridibundus* alel grubu ise çalışma alanındaki her bölgeye spesifik dört farklı alel şeklinde yayılış göstermektedir. Anadolu'nun dışındaki diğer alel gruplarının dahil edilmesiyle yapılan filogenetik analiz sonuçlarında bu grupların birbirinden çok iyi ayrılmış monofiletik gruplar oluşturduğu belirlenmiştir.

Bireylerin taşıdığı mtDNA grupları ile nükleer belirteç sistemi alel grupları karşılaştırıldığında gen alışverişinin olduğu bölgeler hariç tutulursa bireylerde homozigot ya da heterozigot genotip şeklinde taşınan her bir mtDNA soyu için spesifik nükleer alellerin olduğu tespit edilmiştir. Bu iki belirteç sisteminin genetik farklılaşma ve ayrılma zamanları karşılaştırıldığında ise bazı gruplarda örtüşmenin görülmesine rağmen diğer bazı gruplarda ise çok büyük farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu durum bu iki farklı belirteç sisteminin evrimleşme oranının farklı olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar göstermiştir ki Anadolu su

kurbağaları ile ilgili taksonomik değerlendirme yaparken bu farklı belirteç sistemlerinin karşılaştırılması ve buna göre bir karara varılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: su kurbağaları, mtDNA ND3 geni, nükleer serum albumin intron-1+RanaCR1 geni, Anadolu, *Pelophylax (Rana),* genetik çeşitlilik

ABSTRACT

In this study, the mitochondrial ND3 gene region and the nuclear serum albumin intron-1+RanaCR1 marker of 550 water frog samples collected from East and Southeast Anatolia, Blacksea Region and east of Central Anatolia were amplified and sequenced. Then, each mtDNA haplotype and the respective haplogroup it belongs to were determined, followed by the classification of homozygous and heterozygous sequences of the nuclear marker system. Both types of marker results were separately analyzed phylogenetically. Within the scope of this project, distributions of four mtDNA haplogrups, cf.*bedriagae*, Euphrates, Cilician West-East and cf.*caralitanus* were identified. Haplogroup cf.*bedriagae* ranged to the northern parts of Eastern Anatolia region; haplogroup cf.*caralitanus* expanded up to the Kayseri-Sultansazlığı; Cilician East-West was distributed east to Adıyaman, north to Kayseri and Niğde; haplogroup Euphrates ranged up to the northern parts of Eastern Anatolia and western Black Sea Region. Phylogenetic analysis incorporating 32 new haplotypes from this study showed that such mtDNA haplogroups form well-diverged monophyletic groups.

Within the same geographical regions, nuclear marker system results indicated that three distinct groups of alleles, cf.*bedriagae*, Cilician and *Ridibundus* allele groups, some of which are locally distributed while some of them are widespread, are available. Allele group of cf.*bedriagae* was present in Central Anatolia, Black Sea Region and some of its alleles were present infrequently in southeastern Anatolia. While the Cilician allele group was only found in the Ceyhan plain, allele group of Ridibundus had four distinct alleles each of which were specifically present according to the regions. Phylogenetic analysis by including groups of alleles outside Anatolia indicated that these groups of alleles form well-separated monophyletic groups.

As a result of comparison of mtDNA haplogroups with nuclear marker system, excluding regions where gene flow occurs among distinct groups, each mtDNA haplogroup carries specific nuclear alleles as either homozygotes or heterozygotes genotypes. In addition, when genetic differentiation and divergence time of mtDNA haplogroups were compared with the nuclear marker system, some groups completely overlap while others show extensive differences. This indicates that molecular evolution of these two distinct marker systems are quite different. Consequently, these results indicate that when evaluating the taxonomic situation of the Anatolian water frog complex, these two marker systems must be compared, and any decisions should be taken according this comparison.

Key words: water frogs, mtDNA ND3 gene, nuclear serum albumin intron-1+RanaCR1 gene, Anatolia, Pelophylax (Rana), genetic diversity.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Anadolu su kurbağaları (cins: *Pelophylax (Rana))* yüksek düzeyde genetik, filogenetik ve ekolojik olarak çeşitlilik gösteren henüz tanımlanmamış bir tür kompleksinden oluşmaktadır (Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b). Bu grup geçmişte çok hızlı ve karışık bir şekilde yayılmış, çok farklı düzeylerde moleküler ve organizmal farklılaşma göstermektedir (Plötner, 2005). Morfolojik olarak benzerliklerine rağmen genetik olarak farklılaşma göstermeleri Anadolu'da mevcut olabilecek gizli türlerin varlığına işaret etmektedir (Akın ve ark., 2010b). Nehir, göl, bataklık, havuz gibi çok farklı sucul ekosistemlerde bulunmalarına rağmen (Akın, yayınlanmamış) tatlı su kaynaklarına bağlı oldukları için geçmişte meydana gelmiş olan iklim değişimlerine ve bölgesel düzeydeki dikey yerkabuğu hareketlerinin etkilerine karşı çok hassastırlar. Çünkü bu olaylar bu hayvanların yaşamlarını devam ettirip üremelerini sağlayan doğal yaşam alanlarının ya yok olmasına ya da yeni bir alanın oluşmasına olanak sağlamaktadır. Bu sebeple bu grup geçmişteki jeolojik olayların ve iklim değişikliklerinin türleşme mekanizmalarına ve protein kodlayan ve kodlamayan genlerin moleküler evrimine olan etkisini anlayabilmek için ideal bir gruptur (Beerli ve ark., 1996; Plötner ve ark., 2010b).

Anadolu su kurbağaları bu ilginç ve halen soru işareti olan genetik özellikleri yanında yaşadıkları farklı habitatlarda tarım zararlısı birçok böcekle beslendiği ve birçok omurgalı türüne (kuşlar, memeliler vb.) besin olduğu için ekosistemde besin zincirinin önemli bir halkasını oluşturmaktadır. Su kurbağaları bunun yanısıra kurbağa bacağı ihracatı ile Türkiye ekonomisine önemli bir gelir sağlamaktadır. Yaklaşık 30 yıldır su kurbağası ürünleri (dondurulmuş, taze soğutulmuş kurbağa bacağı yada canlı olarak) başlıca Avrupa ülkeleri olmak üzere birçok ülkeye ihraç edilmektedir (Akın ve Bilgin, 2010). Bu ürünler ya restoranlarda çok pahalı bir spesiyal ürün olarak satılmakta ya da özellikle Avrupa'da yerel halk tarafından bahçe havuzlarında süs hayvanı olarak kullanılmak üzere petshoplarda çok satılan canlı hayvanlar arasında yer almaktadır (Pagano ve ark., 2001; 2003; Holsbeek ve ark., 2008; 2009).

Ülkemizde bu hayvanlar en yoğun şekilde Akdeniz ve Marmara Bölgesi'nde her türlü tatlı su habitatlarından toplanıp firmalara satılmakta, tesislerde işlenip satış için hazır duruma geldikten ve ihracat için gerekli izinler tamamlandıktan sonra yurt dışına ihraç edilmektedirler (Akın ve Bilgin, 2010). Ancak yıllardır devam eden su kurbağa avcılığının bölgesel olarak doğal populasyonları ne ölçüde etkilediği bilinmemektedir. Anadolu su kurbağalarının sistematik durumunun yıllardır devam eden belirsiz durumu ve hangi türün hangi bölgede dağılış gösterdiği ile ilgili verinin yetersiz olmasından dolayı firmalar literatürdeki bu boşluğu kendi menfaatlari doğrultusunda kullanmakta ve bu hayvanların hepsini Türkiye'de bulunmayan Avrupa'da yenilebilen kurbağa *Rana esculenta* adı altında ihraç etmektedirler. Bu sebeplerden dolayı Anadolu su kurbağalarının sistematik durumunun belirginleştirilmesi, mevcut türlerin sayısı ve bölgesel dağılışlarının tespit edilebilmesi lokal olarak dağılış gösteren populasyonların geleceği ve halen devam etmekte olan ihracatın doğadaki populasyonlara zarar vermeden sürdürülabilir şekilde devam etmesi için alınması gereken önlemler ve yasal düzenlemeler açısından oldukça önemlidir.

Tür ya da soy sayısı bakımından Anadolu ve çevresi Orta Avrupa ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir zenginlik göstermektedir. Bu bölgede geçmişte yapılmış genetik çalışmaların bulguları birçok tanımlanmamış türün varlığını ortaya koymaktadır (Plötner ve Ohst, 2001; Plötner ve ark., 2001; Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b). Örneğin uzun yıllar Anadolu'da tek bir türün *Pelophylax (Rana) ridibundus*, Pallas 1771 'un bulunduğu düşünülüyordu (Bodenheimer, 1944; Başoğlu ve Özeti, 1973; Andren ve Nilson, 1976). 1992 yılında Schneider ve ark. biyoakustik verilere dayanarak Türkiye de dahil olmak üzere Asya'nın güneybatısında *Rana levantina*'yı yeni bir tür olarak tanımladılar. Ancak öncelik kuralına göre bu türün *P. bedriagae* Camerano 1882' nin sadece yeni bir sinonimi olduğu ortaya çıkmıştır (Dubois ve Ohler, 1994; Beerli, 1994). Aynı yıllarda biyoakustik ve morfolojik verilere gore *P. bedriagae*'nin Anadolu, İsrail, Suriye (Joermann ve ark., 1988; Schneider ve ark., 1992; Schneider ve Sinsch 1999; Sinsch ve Schneider 1999) ve Kıbrıs'ta (Böhme and Wiedl, 1994) yayılış gösterdiği belirtilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda Suriye ve Ürdün'de bulunan *P. bedriagae*'nin mitokondriyal genomunun Anadolu ve Kıbrıs'taki populasyonlardan önemli derecede faklılık gösterdiğini (Plötner ve Ohst, 2001; Ohst, 2001, Akın, 2007, Akın ve ark., 2010b) ve ne Anadolu'daki, ne de Kıbrıs'ta populasyonların *P. bedriagae*'ye ait olmadığı farklı iki yeni türü temsil ettiği belirtilmiştir (Wiley, 1978; 1981; Plötner ve ark. 2001; 2007; 2009; Akın ve ark., 2010b).

Bunun dışında Beerli ve ark. (1996) ve Jdeidi ve ark. (1999) Anadolu ve Avrupa su kurbağalarının farklı allozim ve biyoakustik parametrelere sahip olduğunu göstermişlerdir. Berger'in çaprazlama deney sonuçlarında (yayınlanmamış) göre *P. bedriagae X P. ridibundus* veya *P. bedriagae X P. kurtmuelleri* çaprazlamalarından elde edilen F1 ve B1 bireylerinin kısır ya da gelişim bozukluklarına sahip olduğu gösterilmiştir. Çok yakın zamanda elde edilen mitokondriyal DNA ve nükleer DNA verileri de Anadolu su kurbağalarının Orta Avrupa'da bulunan *P. ridibundus* ile aynı tür olmadığını göstermektedir (Ohst, 2001; Plötner ve Ohst, 2001; Plötner, 2005; Plötner ve ark., 2007; 2009). Avrupa ve Anadolu su kurbağalarının farklı tür olduğu iki nükleer belirteç sistemi serum albumin intron-1 ve 5'kesilmiş non-LTR retroelementin (SAI-1+RanaCR1) DNA sekansları ile de destektenmiştir (Plötner ve ark., 2009).

Son yıllarda çok sayıda araştırmanın yoğunlaşmış olduğu *P. ridibundus caralitanus* formu ilk olarak karın kısmında turuncu beneklenmenin olmasıyla yeni bir alttür olarak tanımlanmıştır (Arıkan, 1988). Alpagut ve Falakalı (1994; 2006) Anadolu'nun güneybatısında Göller Bölgesi'ndeki populasyonun (*caralitanus* formu) Ege'deki populasyondan (*caralitanus* olmayan form) karyolojik olarak farklı olduğunu göstermiştir. Jdeidi (2000) ve Jdeidi ve ark. (2001) morfolojik, biyoakustik ve allozim bulgularına dayanarak *caralitanus* formunun Türkiye'de dağılış gösteren diğer populasyonlardan farklı olduğunu göstermişlerdir. Plötner ve Ohst (2001) *caralitanus* formuna özgü mtDNA haplotipleri var olduğunu belirtmişlerdir. Plötner ve Ohst (2001) ve Jdeidi ve ark. (2001)'de *caralitanus* formunun alttürden tür düzeyine yükseltilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Morfometrik bulgulara dayanarak Sinsch ve ark. (2002) Anadolu Göller Bölgesi populasyonunun *P. bedriagae caralitanus*'a ait olduğunu öne sürmüştür. Buna karşın çok yakın zamandaki çalışmalarda *caralitanus* grubuna ait mtDNA genetik farklılaşmanın düşük olduğu ve çevresindeki populasyonlar ile yoğun bir gen alışverişi olduğu (karın renklenmesi ve mtDNA sonuçlarına dayanarak) (Akın ve ark., 2010a) bu nedenle türleşmenin çok erken evresinde olduğu belirtilmiştir (Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b). Ancak bu grubun çevredeki populasyonlarla arasındaki ilişkiyi gösteren nükleer DNA verisi bulunmamaktadır.

Anadolu ile çok yakından ilişkili olan diğer bir soy ise *P. cerigensis* ilk olarak sadece Rodos ve Karpatos adalarındaki populasyonlara özgü protein kodlayan alellere dayanılarak yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (Beerli ve ark., 1996). Buna karşın bu genetik soya ait olan haplotipler Anadolu anakarasında da (Antalya ve Muğla arasındaki bölgede) bulunmuştur

(Akın, 2007; Akın ve ark., 2010b). Adalardaki populasyonlarla anakara populasyonları arasındaki mtDNA genetik farklılaşmasının düşük olması *P. cerigensis'in* farklı tür olduğunu desteklememektedir (Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b). Yine de doğru bir değerlendirme yapılabilmesi için bu sonuçların nükleer marker sonuçları ile karşılaştırılması gerekmektedir.

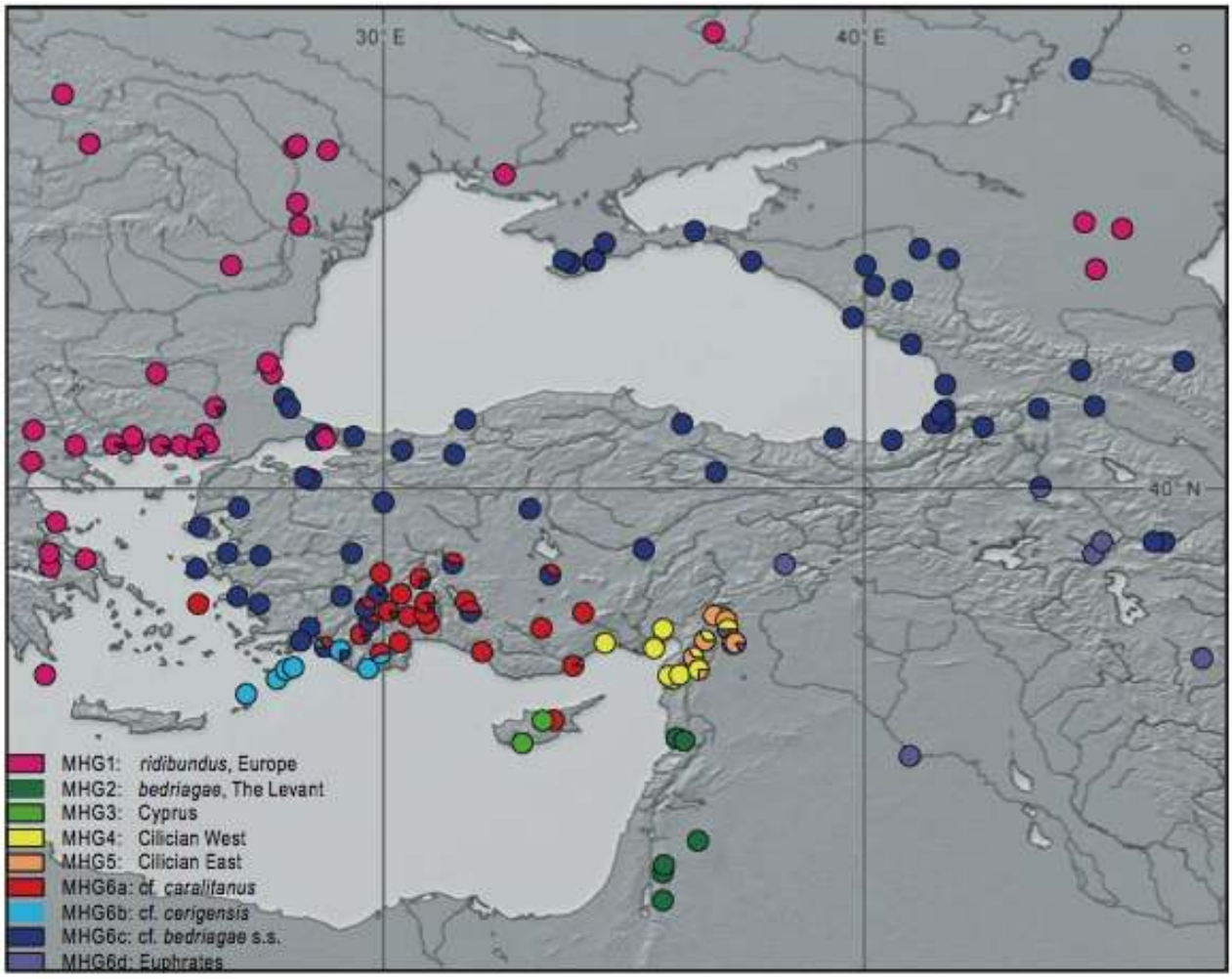
Plötner ve ark. (2001), Plötner (2005) ve Akın (2007) Ceyhan havzasında diğer bir mtDNA soyunun bulunduğunu ve bu formun diğer bir tanımlanmamış tür olduğu öne sürmüşlerdir. Allozim sonuçlarına göre oldukça farklı olan *P. cretensis*'in tür statütüsü mtDNA verileri ile de tutarlılık göstermektedir.

Anadolu barındırdığı çok farklı genetik soylar dışında, bu soylar birbirlerinden kesin çizgilerle ayrılmayıp, farklı derecede birbiri ile karışıp gen akışının gerçekleştiği hibridleşme ya da geçiş bölgelerini bulundurmaktadır. Örneğin, Yunanistan'ın doğusunda iki farklı genetik stok (Kuzey Anadolu soyu ve *P. ridibundus*) arasındaki hibridleşme bölgesi bulunmaktadır (Schneider ve ark., 1993; Beerli, 1994; Beerli ve ark., 1996; yayınlanmamış veri; Plötner, 2005; Plötner ve ark., 2008). Bundan başka güneybatı Anadolu' da (Akın, 2007; Akın ve ark, 2010a; Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b), güneydoğu Anadolu'da (Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b), Kafkaslarda ve Suriye'nin kuzeybatısında da (bir ya da daha fazla Anadolu soyu ile *P. bedriagae* arasında) diğer hibridleşme bölgelerinin olduğu bilinmektedir (Plötner, yayınlanmamış morfometrik veri) fakat tam yayılışı ve genişliği bilinmemektedir. Bu sebeple farklı soylar arasındaki gen akışının düzeyinin ve coğrafi olarak genişliğinin tespit edilebilmesi için nükleer DNA verilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2010 yılında yayınlanmış olan çalışmamızda Anadolu ve çevre bölgelerdeki mtDNA genetik çeşitliliği ve dağılım şekli verilmiştir (Akın ve ark., 2010b). Bu sonuçlara göre bu bölgelerde ve Orta Asya'da 9 anahaplogrup (AHG) ve 4 altgrup (AG) varlığını göstermektedir (Plötner ve ark., 2010; Akın ve ark., 2010b) (Şekil 1). AHG1 Orta ve Güneydoğu Avrupa'da dağılan *P. ridibundus'*a ait populasyonlar ile Balkan Yarımadası'nda bulunan göl kurbağaları *P. kurtmuelleri'*ye ait olan haplotipleri içermektedir. Türkiye'de sadece Trakya'da diğer gruba ait olan haplotiplerle birlikte bulunmuştur. AHG2 Suriye'nin batısı, Ürdün ve Nil Deltasında dağılış gösteren *P. bedriagae*'ye ait olan haplotipleri

içermektedir (Plötner, 2005). AHG3'e ait olan haplotipler yalnızca Kıbrıs adasında bulunmuştur.

AHG4'e ait olan haplotipler Ceyhan havzasında ve Amanos Dağlarının doğusunda bulunurken, AHG5'e ait olan haplotipler yalnızca Amanos Dağları'nın doğusunda Karasu vadisi ve Narlı düzlüğünde bulunmaktadır (Akın ve ark., 2010b). Ancak bu iki grubun kuzey ve güney haplotip sınırlarının tam olarak nereye kadar uzandığı bilinmemektedir.



Şekil 1.1. Anadolu'daki mtDNA anahaplogrupların ve altgrupların dağılımı (Akın ve ark., 2010b).

AHG6'ya ait olan haplotipler Yunanistan'ın kuzeybatısından (Akın ve ark., 2010b; Hotz ve ark., hazırlanmakta) Rusya'nın ortasına kadar dağılmakta ve bu gruba ait olan haplotipler aynı zamanda İran ve Suriye'de de dağılım göstermektedir (Plötner ve ark., 2001; yayınlanmamış veri). AHG6 kendi içinde 4 farklı altgruba (AG) ayrılmaktadır. AG6a'ya (cf.

caralitanus) ait haplotipler Güneybatı ve İç Anadolu'da dağılış göstermektedir. AG6b'ye (cf. *cerigensis*) ait olan haplotipler Karpatos, Rodos adaları ile Güneybatı Anadolu'da (Antalya ve Muğla arasındaki bölge de) bulunmuştur (Ohst, 2001; Akın ve ark., 2010b). AG6c'ye ait olan haplotipler Batı Anadolu'dan Rusya'nın ortasına kadar dağılmakta aynı zamanda Ege adaları Sisam, Midilli, Sakız'da ve *P. ridibundus*'un tip lokalitesinin olduğu Kazakistan'da Atyrau'da Hazar Denizi'nin kuzey kıyılarında da bulunmuştur. AG6d'ye ait haplotipler Fırat ve Dicle nehir havzaları boyunca dağılılım gösterdiği belirtilmiştir (Akın ve ark., 2010b; Plötner ve ark., 2010). Ancak AG6c'nin Karadeniz ve İç Anadolu'nun doğusundaki ve özellikle AG6d'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu haplotip dağılımları sınırlı sayıda lokaliteden elde edilen mtDNA verisi ile temsil edilmektedir. Bu sebeple AG6c'nin Karadeniz ve İç Anadolu'nun doğusundaki ve AG6d'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu haplotip dağılımının şekli ve bu iki grup arasındaki geçiş bölgesinin neresi olduğuna dair mtDNA verisi bulunmamaktadır. Bu sebeple bu bölgeleri daha iyi temsil edebilecek daha fazla mtDNA verisine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anadolu'da dağılış gösteren AHG4, AHG5, AHG6'nın ve 4 altgrubun gerçekten farklı türleri temsil edip etmediği bilinmemektedir. Eldeki mtDNA sonuçlarının nükleer DNA sonuçları ile ne kadar örtüştüğüne ait bilgi de bulunmamaktadır. mtDNA sonuçlarına göre geçiş bölgelerinde aynı habitatlarda farklı haplogruba ait haplotipler bulunmaktadır (Akın ve ark., 2010b) Bu farklı gruba ait haplotipleri taşıyan bireyler arasındaki gen alışverişinin durumu bilinmemektedir. Bu sebeple farklı AHG'a ait olan populasyonlarla ilgili çalışmalar için güvenilir bir nükleer belirteç sistemine dayalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu amaçla kullanılacak olan nükleer belirteç sistemi protein kodlamayan iki belirteçten oluşmaktadır. Bu belirteçler serum albumin intron-1 (SAI-1) ve non-LTR chicken repeat benzeri retrotranspozondur (RanaCR1). Her iki belirteç de hem ana hem de baba tarafından aktarılmakta olup orta hızla evrimleşmektedir (Plötner ve ark., 2009). RanaCR1 belirteci 5' kesilmiş non-LTR chicken benzeri bir retrotranspozondur. Batı Palearktik'teki 7 farklı su kurbağası türünün serum albumin geninin birinci intronunda bulunmuştur. (Plötner ve ark., 2009). Bu marker sisteminin yapısında, muhtemel poly A sinyal bölgesi, muhtemel kırpılma yeri (alıcı ve verici yer), ikilemenin hedef bölgesi, ters tekrar bölgesi, CR-1 benzeri retroelement, ORF2'nin carboksiterminal bölgesi, CTR2'nin stop kodonu, mikrosatellit ve oktamerik repeat bölgesi gibi birçok önemli bölge bulunmaktadır.

Diğer CR1 retroelementlerinde olduğu gibi (Silva ve Burch, 1989) RanaCR1'in 3' bölgesinde tam bir oktamerik repeat bulunmaktadır. Diğer CR1 elementlerinden farklı olarak 3'UTR bölgesinde oktamerik repeatin sonrasında CA mikrosatelit repeati içermektedir. 3'UTR bölgesi CTR be SAI-1 bölgelerine göre oldukça korunmuş bir bölgedir. Bu olayda bu bölgenin Batı Palearktik su kurbağalarında yapısal düzenleyici bir element olarak görev yaptığını ya da türe özgü transkripsiyon ağında bir fonksiyonu olduğunu göstermektedir (Plötner ve ark., 2009). Serum albumin geninin bu ilk intronunun sekans uzunluğundaki varyasyonlar genelde baz dizilerindeki delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu baz delesyonları bazen RanaCR1 retrolementinin 5' ya da 3' uçlarının ötesine gitmektedir. Bu olayın retroelement serum albumin geninin bu ilk intronun içine girerken reverse transkripsiyon olayının tam olmaması ya da birincil transkriptin yapısal ve fonksiyonel değişmezliğinin korunması için oluşan negatif seleksiyondan dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu yeni nükleer belirteç sistemi ile yapılan ilk çalışmalar su kurbağalarının sistematiği açısından önemli sonuçlar vermiştir. Örneğin bu sistem güneybatı Avrupa ve kuzeybatı Afrika'da yayılış gösteren *P. perezi* ve *P. saharicus'*un kardeş grup olduğunu, *P. lessonae* ve Anadolu grubunun iki ayrı monofiletik grup olduğunu desteklemiştir. Bu sistem ile Yunanistan populasyonları Balkan populayonların belirgin bir şekilde ayrılıp iki faklı türü temsil ettiği desteklenmiştir. *P. ridibundus*'un tip lokalitesindeki örneklerin heterozigot oldukları ve bunlardan birinin Avrupa'ya özgü *P. ridibundus* aleline diğerinin ise Anadolu'ya özgü *P. cf. bedriagae* aleline ait olduğu tespit edilmiştir (Plötner ve ark., 2009). Bu nedenle Anadolu su kurbağlarının türleşmesi sürecinde bu belirteç sisteminde çok sayıda baz çıkması ya da baz girmesi veya bazların değişmesi (transition veya transversion) olaylarının olması beklenmektedir. Gen sekansında meydana gelen bu çeşitli genetik varyasyonların, yakın zamanda türleştikleri düşünülen ve bazı gruplarda bu sürecin halen devam ettiğine inanılan Anadolu su kurbağaları için (Akın ve ark., 2010b) oldukça uygun bir sistem olacağı düşünülmektedir. Böylece bu nükleer belirteç sistemi sonuçlarının daha önceki mtDNA sonuçları ile ne ölçüde örtüştüğü, daha önce tanımlanan formlardan kaçının bir türü temsil ettiği, dağılış gösterdiği bölge ve farklı türler arasındaki gen alışverişinin düzeyi ile ilgili önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında Türkiye'de Doğu, Güneydoğu Anadolu, Karadeniz ve İç Anadolu'nun doğusunda toplanmış 550 örneğin mitokondriyal ND3 gen bölgesi ve serum

albumin intron-1 RanaCR1 belirteç sistemi için çoğaltılıp sekansları çıkarılacak, sekans düzenlemesi tamamlandıktan sonra, mtDNA sekansları için haplotip ve bu haplotiplerin ait olduğu mtDNA anahaplogrubun belirlenmesi; nükleer belirteç sistemi sekansları için homozigot ve heterozigotların gruplanarak, homozigotların taşıdığı aleller belirlenecektir. Hem mtDNA haplotipleri hem de nükleer marker alelleri ayrı ayrı filogenetik analizlere tabi tutularak monofiletik gruplar belirlenecek ve grupların arasındaki genetik faklılaşmanın derecesi ve zamanı hesaplanacaktır. Bu şekilde mtDNA ve nükleer marker sonuçlarının ne oranda örtüştüğü tespit edilmiş olacaktır. Bu çalışmadan elde edilecek bulguların ilerde Türkiye'nin geri kalan bölgelerinden elde edilecek genetik verilerle birleştirilerek değerlendirilmesi ile Anadolu su kurbağalarının sistematik durumunun daha anlaşılır bir duruma getirilmesi hedeflenmektedir.

BÖLÜM 2

GELİŞME

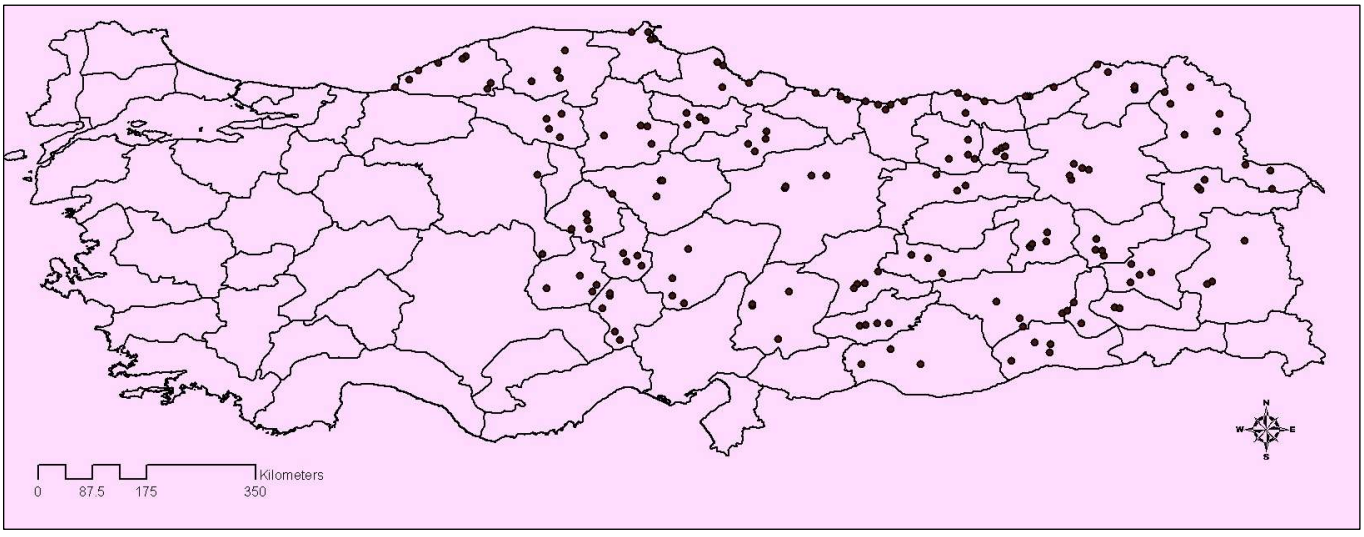
2.1 MATERYAL VE METOD

2.1.1. Çalışma Alanı

Çalışmada kullanılan doku örnekleri doktora tezi kapsamında ilgili bakanlık izni ile Türkiye'nin Doğu Anadolu, Güneydoğu, Karadeniz ve İç Anadolu'nun doğusunda dağılış gösteren populasyonlardan örneklenmiştir. Bölgelere göre örnek sayıları ve örnekleme yapılan lokasyonların dağılımı Tablo 2.1 ve Şekil 2.1'de verilmiştir. Örneklerin hedef bölgelerde toplanması sırasında mevcut nehir havzalarının dağılımı esas alınmıştır.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan doku örnek sayılarının bölgelere göre dağılımı.

Bölge Adı	Örnek Miktarı
Doğu Anadolu Bölgesi	180
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	100
Karadeniz Bölgesi	135
İç Anadolu'nun doğu ve kuzeydoğusu	135
Toplam	550



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı lokaliteler.

2.1.2. Moleküler Çalışmalar

2.1.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Akın ve ark., (2010a) nın yöntemi kullanılmıştır. Yaklaşık 1 cm uzunluğunda hayvanların ayaklarından alınan doku paraçası 750 µL Urea Extraksiyon tamponu (Table 2.2) içine konularak, üzerine 4 µL (20 mg/mL) proteinaz K enzimi eklendikten sonra kuvvetli şekilde vorteklenip 65 ^{o}C'de 4 saat inkübe edilmiş ve dokunun parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra eşit hacimde fenol:kloroform (1:1) solüsyonu eklenerek 13200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek fazlar ayrılmıştır. Organik faz uzaklaştırılmış ve üst faz için fenol:kloroform aşaması tekrarlanmıştır. 300 µL supernatant yeni bir ependorf tüpe konulduktan sonra üzerine 0,7 hacim izoproponol eklenip çok dikkatli bir şekilde karıştırılmış 13.200 rpm'de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Supernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra 1000 µL saf alkol eklenerek pelet dikkatlice yıkanmıştır. Tüpler 10 dakika buzda tutulduktan sonra 13.200 rpm'de 5 dakika santrifuj yapılmıştır. Etanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra pellet oda sıcaklığında 5 dakika kurutulmuştur. Pelet 500 µL TE-Asetat-Rnase solusyonu içinde çözülmüş ve 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Her bir tüpe 2 volüm saf alkol eklendikten sonra bir gün -20'de bekletilmiştir. Bir sonraki gün 13200 rpm'de 10 dakika santrifuj edildikten sonra, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış, peletlerin üzerine 1000 µL 70% etanol eklenmiştir. 5 dakika 13200 rpm'de santrifuj edildikten sonra alkol dikkatlice uzaklaştırılmış ve DNA kurutulduktan sonra 100 µL TE tamponu içinde çözülmüştür ve uzun süreli saklamak amacıyla – 20 ^{o}C'ye kaldırılmıştır. DNA konsantrasyonu hem %0,7 agaroz jel elektroforezinde yürütülerek (Şekil 2.2) hem de Nanodrop'ta A260/A280 ve A260/230 ölçümleri yapılarak kontrol edilmiştir.

Şekil 2.2. Üre ekstraksiyon prosedürü kullanılarak elde edilmiş genomik DNA bantları. Sıra-1: Marker (PstI enzimi ile kesilmiş Lambda DNA), Sıra 2-15: İzole edilmiş genomik DNA bantları.

Table 2.2. Tampon ve solüsyonların hazırlanması.

UEB (üre ekstraksiyon tamponu):
3 M Üre
20 mM EDTA
1% N-Lauryl-sarcosine-Na-salt
50 mM Tris tamponu (pH=8.0)
125 mM Na_2S0_4
1% PVP (10000mw)
TE-Asetat-Rnase Solüsyonu:
50 mM Tris tamponu pH: 8
10 mM EDTA
0.5 NH4Oac (5 M stok)
20 µg/mL RNase A (100 mg/mL stok)
TE Tampanu:
10 mM Tris tampanu
1 mM EDTA
pH=8 ayarlaması yapıldıktan sonra otoklav yapılmalıdır.

2.1.2.2. mtDNA ve Nükleer Belirteç Sistemi Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

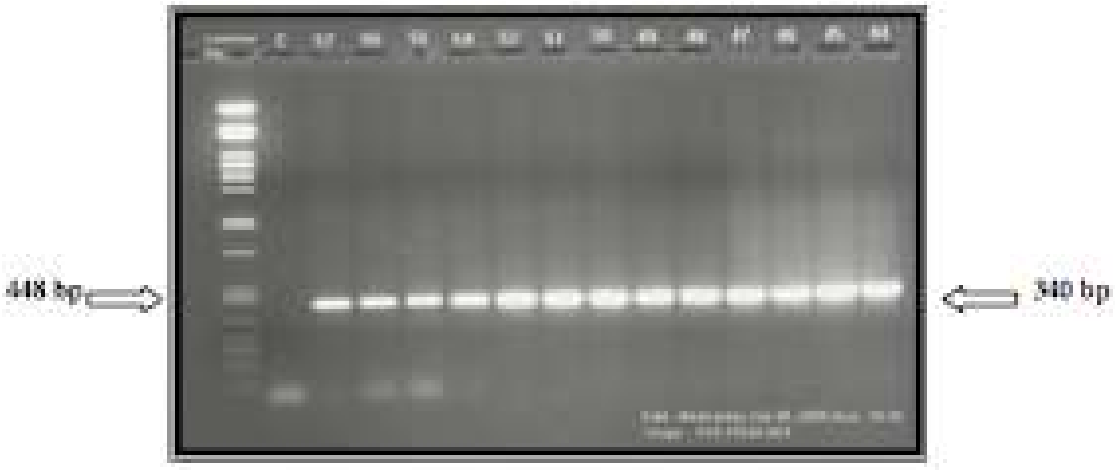
2.1.2.2.1. mtDNA Belirteç Sistemi (ND3 gen bölgesi)

Genomik DNA'sı elde edilen 550 örneğin mtDNA ND3 gen bölgesi ND3-F ve ND3-R primerleri (Table 2.3) kullanılarak çoğaltılmıştır (Plötner ve ark., 2008). 25 µL lik PCR volümü için 2.5 µL 10 x PCR buffer, 2.5 µL 25 mM MgCI2, herbir primer çifti 10 pmols, 1 µL 10 mM dNTP, 0.5 unit Taq DNA polymerase, 0.1 µg genomik DNA olarak kullanılmıştır. ND3 geninin çoğaltılması için PCR reaksiyonu ilk denaturasyon basamağı 94 °C'de 5 dakika, ikinci annealing basamağı 96 °C'de 30 saniye, 50 °C 'de 30 saniye ve 74 °C'de 1.30 saniye (38 cycle) ve son extension basamağı 74 °C'de 10 dakika olarak uygulanmıştır (Plötner ve ark, 2001). PCR ürünü % 1.4'lük agaroz jelde yaklaşık 40 dakika 90 Volt'ta yürütülerek

kontrol edilmiştir (Şekil 2.3). Elde edilen PCR ürünü PCR purifikasyon kiti ile primer ve diğer kimyasallardan temizlenerek DNA sekanslama işlemine hazır hale getirilmiştir.

Table 2.3. Çalışmada kullanılacak mtDNA belirteç sistemi (ND3) ve nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1)'nin primer dizileri.

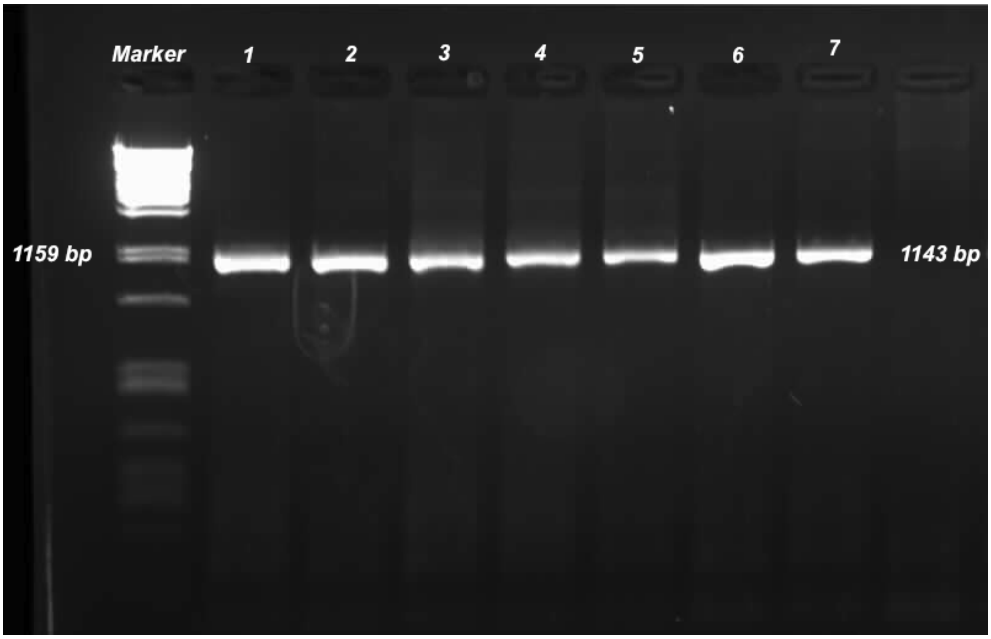
Primer adı	Nükleotid Dizisi	PCR ürünün büyüklüğü (bp)
ND3-F (mtDNA)	5'-AGTACACGTGACTTCCAATC-3'	340
ND3-R (mtDNA)	5'-TTGAGCCGAAATCAACTGTC-3'	340
Ex1-F2 (SAI-1 + *Rana*CR1)	5'-ACTCTGATTTGTCTGTTTATTC-3'	1100
Ex1-F5 (SAI-1 + *Rana*CR1)	5'-ATAACAACGAGTCCAGAGACCAC-3'	1100



Şekil 2.3. mtDNA gen bölgesinin çoğaltılması. Sıra 1: Marker (PstI ile kesilmiş Lambda DNA), Sıra 2: negatif kontrol, Sıra3-15: ND3-F/ND3-R primerleri ile çoğaltılmış 340 baz uzunluğundaki pcr ürünü.

2.1.2.2.2. Nükleer Belirteç Sistemi (SAI-1+RanaCR1):

Yine aynı bireylerin (550 örnek) nükleer belirteç sistemi Ex1-F5 ve Ex2-R2 primerleri (Table 2.3) (Plötner ve ark., 2009) kullanılarak çoğaltılmıştır. 25 µL lik PCR volümü için 2.5 µL 10 x PCR buffer, 2.5 µL 25 mM MgCI2, her bir primer çifti 10 pmols, 1 µL 10 mM dNTP, 0.5 unit Taq DNA polymerase, 0.2 µg genomik DNA olarak kullanılmıştır. Nükleer belirteç sisteminin çoğatılması için PCR reaksiyonu ilk denaturasyon basamağı 96 °C'de 3 dakika, ikinci annealing basamağı 94 °C'de 60 saniye, 50-55 °C 'de 60 saniye ve 72 °C'de 60 saniye (35 cycle) ve son extension basamağı 72 °C'de 5 dakika olarak uygulanmıştır (Plötner ve ark, 2009). PCR ürünü % 1.4'lük agaroz jelde yaklaşık 40 dakika 90 Volt'ta yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 2.4). Elde edilen PCR ürünü PCR purifikasyon kiti ile primer ve diğer kimyasallardan temizlenerek DNA sekanslama işlemine hazır hale getirilmiştir.



Şekil 2.4. Nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1) gen bölgesinin çoğaltılması. Sıra 1: Marker (PstI ile kesilmiş Lambda DNA), Sıra 1-7: Ex1-F5 ve Ex2-R2 primerleri ile çoğaltılmış 1143 baz uzunluğundaki pcr ürünü.

2.1.2.3. mtDNA ve Nükleer Belirteç Sistemi Gen Bölgelerinin Dizilenmesi

Her iki gen bölgesi için de, DNA dizileme reaksiyonu Mclab (California, USA) laboratuvarında ABI terminator 3.1. kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. mtDNA gen bölgesi için dizilerinin doğruluğunu güvenilir

durumu getirmek amacıyla ve nükleer belirteç sisteminin tüm dizisini elde etmek için pcr ürünü hem forward and hem de reverse yönünde dizilenmiştir. Elektroforez ve fluorescent boyalarla işaretlenmiş nükleotidler otomatik DNA sequencer (ABI 3730x1 genetic analyzer, Applied Biosystems) cihazı kullanarak yapılmıştır.

2.1.3. Veri Analizleri

2.1.3.1. DNA Dizilerinin Düzenlenmesi

DNA dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen chromotogram dosyaları öncelikle DNA dizilerinin düzenlenmesi işlemine tabii tutulmuştur. mtDNA belirteç sistemi için her bir örnek için hem forward dizideki hem de reverse dizideki bazların hepsi kontrol edilerek, okumada hata varsa düzeltilmiştir. Nükleer belirteç sistemi için ise her bir örnekte hem forward hem de reverse DNA dizisi birleştirilerek tek bir dizi haline getirilmiştir. Bu işlem diğer tüm örnekler içinde uygulandıktan sonra nükleer belirteç sistemi için farklı örnekler arasındaki dizi uzunluğundaki farklılıkların ortadan kaldırılması için bazların eksik olduğu örneklere boşluk eklenerek tüm örneklerin DNA dizi uzunluklarının aynı olması sağlanmıştır. Bu işlemler sırasında MEGA 5.1. programının CLUSTAL W algoritması kullanılmıştır (Tamura ve ark., 2011).

2.1.3.2. DNA Dizilerinin Gruplanması

Tüm dizilerin kontrol edilme işlemi bittikten sonra mtDNA belirteç sistemi için DNA dizilerinin hangi haplotip olduğu ve bu haplotipin hangi anahaplogruba ait olduğu gen bankasında daha önce tanımlanmış dizilerle (Akın ve ark., 2010 a;b) karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Nükleer belirteç sistemi için ise DNA diziler öncelikle heterozigot ve homozigot olarak ayrılmış, her coğrafi bölgede dağılım gösteren homozigot aleller tespit edilmiştir. Bu alellere dayalı olarak heterozigot bireylerin taşıdığı alel kompozisyonu tespit edilmiştir. Son olarak her mtDNA anahaplogruba özgü nükleer alellerin olup olmadığı belirlenmiştir.

2.1.3.3. DNA Dizilerindeki Genetik Çeşitliliğin Tespit Edilmesi

mtDNA belirteç sistemi ve nükleer belirteç sisteminden elde edilmiş DNA dizi setlerinin içerdiği genetik çeşitliliğinin düzeyini ölçebilmek amacıyla haplotip, gen ve

nükleotid çeşitliliği parametreleri Arlequin programı 3.5 versiyonu (Excoffier ve ark., 2011) kullanılarak hesaplanmıştır.

2.1.3.4. Filogenetik Analizler

Filogenetik analizlerin doğru şekilde yapılabilmesi öncelikle kullanılacak DNA dizi veri seti uygun nükleotit evimleşme modelinin seçilmesine dayalıdır. Bu amaçla hem mtDNA dizi veri seti hem de nükleer DNA dizi veri seti için uygun moleküler evrimleşme modeli jmodeltest programı (Posada, 2008) kullanarak belirlenmiştir. Hierarsik olasılık oran testi (hLTRs) ve Bayesian bilgi kriterine dayalı olarak (BIC) mevcut evrimleşme modelleri arasından uygun model seçilmiştir. mtDNA ND3 dizi seti için en uygun modelin gamma dağılımlı Tamura-Nei modeli olduğu (Tamura ve Nei, 1993), site mutasyon oranının (shape parametresi= 0.2650) olduğu tespit edilmiştir. Nükleer belirteç sistemi dizi seti için ise en uygun modelin gamma dağılımlı TPM1uf modeli olduğu (Posada, 2008) ve site mutasyon oranının (shape parametresi= 0.3470) olduğu belirlenmiştir.

Farklı mtDNA haplotipleri ve nükleer aleller arasındaki filogenetik ilişkiler ve monofiletik grupların belirlenebilmesi için Beast programı 1.6.2 versiyonu kullanarak Bayesian yaklaşımı uygulanmıştır (Drummond ve Rambaut, 2007). mtDNA veri seti için Bayesian analizi GTR+G sekans modeli, uncorrelated log-normal relaxed clock model ve sabit populasyon büyüklüğü öngörülerek gerçekleştirilmiştir. Nükleer belirteç sistemi veri seti için ise Bayesian analizi TN93+G sekans modeli, uncorrelated log-normal strict clock model ve sabit populasyon büyüklüğü öngörülerek gerçekleştirilmiştir. Her iki belirteç sistemi içinde filogenetik ağaçların posterior probability değerleri Markov Chain Monte Carlo (MCMC) prosedürü (Drummond ve ark., 2002) 10000000 iterasyon kullanarak hesaplanmıştır. Her 1000'lik tekrarda oluşan filogenetik ağaçlardan örnek alınmış, ilk 1000 adet kaydedilmiş ağaç atılmış ve geriye kalan kaydedilmiş 9000 ağaç analiz edilmiştir.

Farklı genlere dayalı olarak ayrı ayrı elde edilen filogenetik ilişkiler ve monofiletik gruplar ayrıca (anonim bir hakemin önerisi üzerine) bu iki farklı gen bölgesinin data partition dosyası hazırlanarak birleştirilmesi ile analiz edilmiştir. Data partition dosyası protein kodlayan 340 baz uzunluğundaki mtDNA ND3 gen bölgesi ve 1143 baz uzunluğundaki nükleer protein kodlamayan serum albumin intron-1 +RanaCR1 gen bölgesini içeren bir batch dosyası hazırlanarak oluşturulmuştur. Hazırlanan data partition dosyasında mtDNA ND3 gen

bölgesi için GTR+G moleküler evrimleşme modeli, nükleer belirteç sistemi için GTR modeli kullanılarak gruplar arasındaki filogenetik ilişkiler Bayesiyan yaklaşımı uygulanarak MrBayes ver. 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Bu filogenetik analizler sırasında *P. saharicus* (kuzey-batı Africa), *P. perezi* (İspanya), *P. lessonae* (Orta Avrupa), *P. bergeri* (İtalya), *P. shqipericus* (Balkan yarımadasının batı kıyıları), *P. epeiroticus* (Balkan yarımadasının güneybatı kıyıları), *P. cretensis* (Girit), *P. ridibundus* (Orta Avrupa), and *P. kurtmuelleri* (Balkanlar) türleri dışgrup (outgroup) olarak kullanılmıştır.

Filogenetik analizler sonucunda elde edilen monofiletik gruplar arasındaki genetik farklılaşma derecesi hem mtDNA dizi seti için hem de nükleer belirteç sistemi için karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla TrN+G kullanarak hesaplanmıştır. Yine bu gruplar arasındaki ayrılma zamanlarının hesaplanmasında mtDNA veri seti Kıbrıs'ın Anadolu'dan ayrılma zamanı olan 5.3 veya 5.5 milyon yıl ve Akın ve ark (2010b) çalışmasındaki kalibrasyon değerleri temel alınarak hesaplanmıştır.

BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. mtDNA ND3 Belirteç Sistemi

3.1.1. mtDNA ND3 Haplotiplerinin Çalışma Alanındaki Bölgelere Göre Dağılımı

Proje kapsamında mtDNA ND3 belirteç sistemi için analizi yapılması hedeflenen 550 örneğin haplotip sonuçlarının bölgelere göre dağılımı Tablo 3.1'de verilmiştir. Bu çalışma sonuçları özelikle Doğu Anadolu ve Karadeniz Bölgesi mtDNA haplotip dağılımı ve çeşitliliğine önemli katkılar sağlamıştır. Örneğin Fırat grubuna 13 yeni (bilinenlerin %56'sı) ve cf.*bedriagae* altgrubuna 17 yeni (bilinenlerin %36'sı) haplotip kazandırmıştır. Yeni haplotipler özellikle bir türün farklı populasyonları düzeyindeki evrimsel ilişkilerin anlaşılabilmesi yönünden oldukça önemlidir.

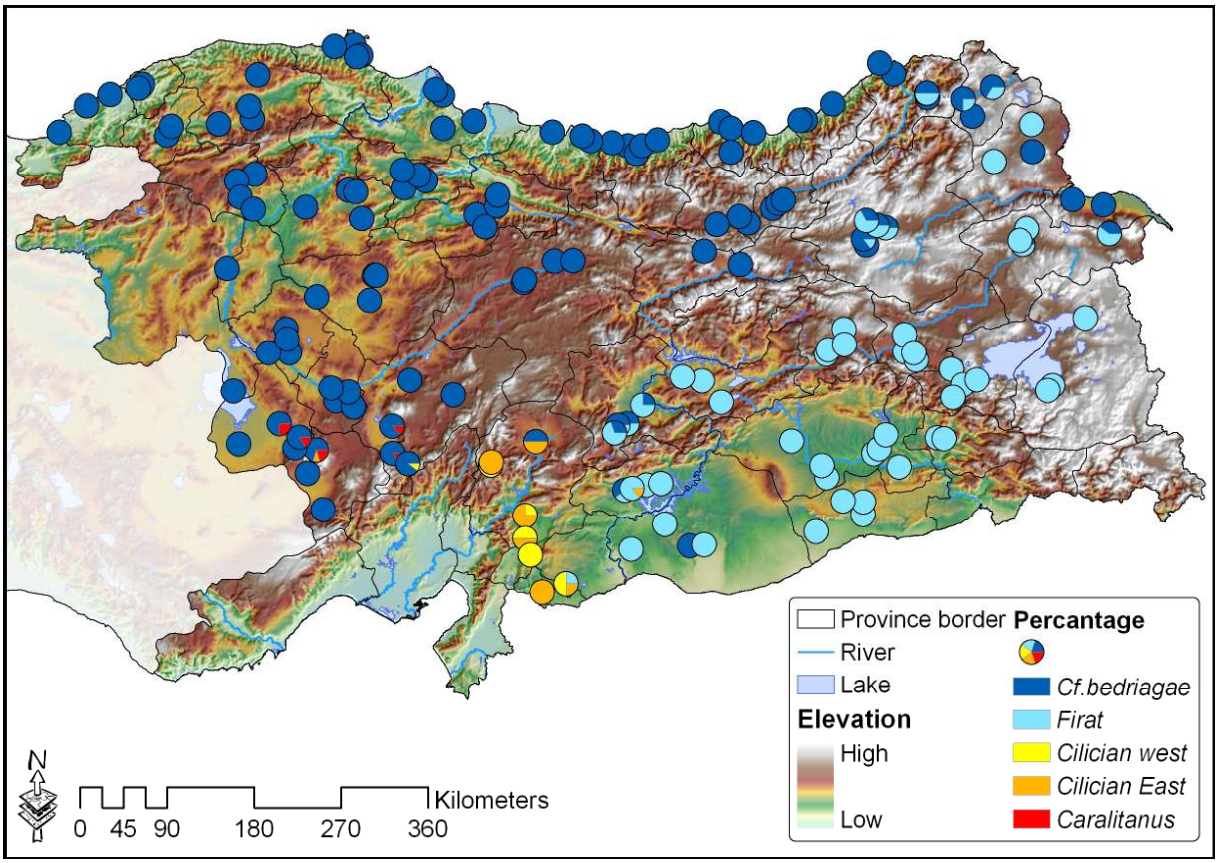
Tablo 3.1. Proje kapsamında elde edilen mtDNA haplotip dağılım verilerinin bölgelere göre dağılımı.

Bölgeler	Toplam	*cf. bedriagae Anahaplogrup*			*Kilikya Batı Anahaplogrubu*	*Kilikya Doğu Anahaplogrubu*
		Fırat Altgrubu	*cf.bedriagae Altgrubu*	*cf.caralitanus Altgrubu*		
Doğu Anadolu	*180*	*110*	*60*	*0*	*3*	*7*
Güneydoğu Anadolu	*100*	*75*	*3*	*0*	*5*	*17*
Karadeniz Bölgesi	*135*	*1*	*134*	*0*	*0*	*0*
İç Anadolu'nun Doğusu	*135*	*0*	*127*	*6*	*1*	*1*
Toplam	*550*	*186*	*324*	*6*	*9*	*25*
Farklı haplotipler	*50*	*15*	*25*	*1*	*5*	*4*
Yeni Haplotipler	*32*	*12*	*17*	*0*	*1*	*2*

3.1.2. mtDNA ND3 Haplotiplerinin Genetik Çeşitliliği ve Coğrafi Dağılımları

Analizi tamamlanan mtDNA ND3 belirteç sistemine ait 550 adet 340 baz uzunluğundaki DNA dizisinin ve bu veri setine dahil edilmiş olan daha önceki çalışmadan yayınlanmış 100 adet haplotip dizisinin (Akın ve ark., 2010b) oluşturduğu dizi setlerinde 109 (% 32.1) değişken bölge, 34 (% 10) singleton bölge ve 75 (% 22.1) parsimoni açısından önemli bölge tespit edilmiştir.

550 örneğin haplotip çeşitliliği 0.7339 (± 0.0137) ve nükleotid çeşitliliği 0.0135 (± 0.0073) olarak hesaplanmıştır. Hedef bölgelerdeki haplotiplerin cf. *bedriagae* altgrubu, cf. *caralitanus* altgrubu, Fırat altgrubu, Kilikya Batı anahaplogrubu ve Kilikya Doğu anahaplogrubu olmak üzere beş farklı gruba ait olduğu tespit edilmiştir. Bu beş farklı gruba ait olan haplotiplerin dağılımı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bu çalışmada elde edilen yeni haplotip verileri ile birlikte daha önce tanımlanmış anahaplogrupların ve altgrupların Türkiye'deki dağılımı.

cf. *bedriagae* Altgrubu: Son mtDNA haplotip dağılım bulgularına göre gruba dahil olan haplotiplerin tüm Karadeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu'nun kuzeyinde yer alan Kızılırmak, Yeşilırmak, Kura ve bu bölgelerde yer alan diğer akarsu sistemlerinde yoğun şekilde dağılış gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 3.1). Bu yeni verilerin ortaya koyduğu en önemli bulgu bu bölgelerde daha önce olduğu düşünülen ancak veri olmadığı için kesinliği bilinmeyen farklı soylar arasındaki geçiş bölgeleri veya gen alışverişinin olduğu bir çok coğrafi bölgenin ortaya çıkarılmasıdır. Örneğin Doğu Anadolu'nun kuzey ve batısında (Erzurum, Kars, Ağrı, Iğdır, Ardahan ve Malatya) cf. *bedriagae* ve Fırat altgrupları arasında yoğun ve geniş bir alanda gen alışverişinin olduğu tespit edilmiştir. Toplam 17 yeni haplotip bu gruba dahil edilmiştir. Bu grubun içinde birçok farklı haplotipin çok dar alanda yayılış göstermesi tek bir grup içindeki haplotiplerin bile bölgesel olarak adaptasyon gösterdiklerinin en önemli göstergesidir. Bu sonuçlar özellikle daha önce çok sınırlı sayıda lokaliteden farklı mtDNA gen bölgesi verilerine göre elde edilmiş (ND3, ND2, cytb, 16S rRNA, 12S rRNA) Karadeniz bölgesi ve Doğu Anadolu populasyonları için yapılmış coğrafi dağılım değerlendirmelerinin (Akın ve ark., 2010b, Bülbül ve ark., 2011) doğruluğunu tespit etmek, ve bu bölgelerdeki mtDNA soyların dağılımının son şeklini vermek açısından oldukça önemlidir.

Fırat Altgrubu: Sonuçlar bu gruba ait haplotiplerin Doğu Anadolu'nun güneyinde ve tüm Güneydoğu Anadolu bölgesinde yer alan Fırat, Dicle havzaları bunları yukarıdan besleyen nehir kollarında yoğun şekilde dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yeni veriler 12 yeni haplotipi bu gruba dahil etmiş olup bu haplotiplerin daha çok geçiş bölgelerinde olduğu tespit edilmiştir. Yeni veriler bu grubun Kilikya Doğu ve Batı anahaplogrupları ile Güneydoğu Anadolu'nun batısında (Gaziantep ve Adıyaman) gen alışverişi olduğunu göstermiştir. Yine bu grupla ilgili yapılmış çalışmalar (Akın ve ark, 2010b; Bülbül ve ark., 2011) sadece birkaç lokaliteden gelen verilerle sınırlı olduğu için gerek haplotip dağılımı, gerekse grubun diğer farklı soylarla olan ilişkisi oldukça belirsizdi. Dolayısıyla bu çalıışmada elde edilen yeni bulgular bu durumu artık kesin ve doğru hale getirmiştir.

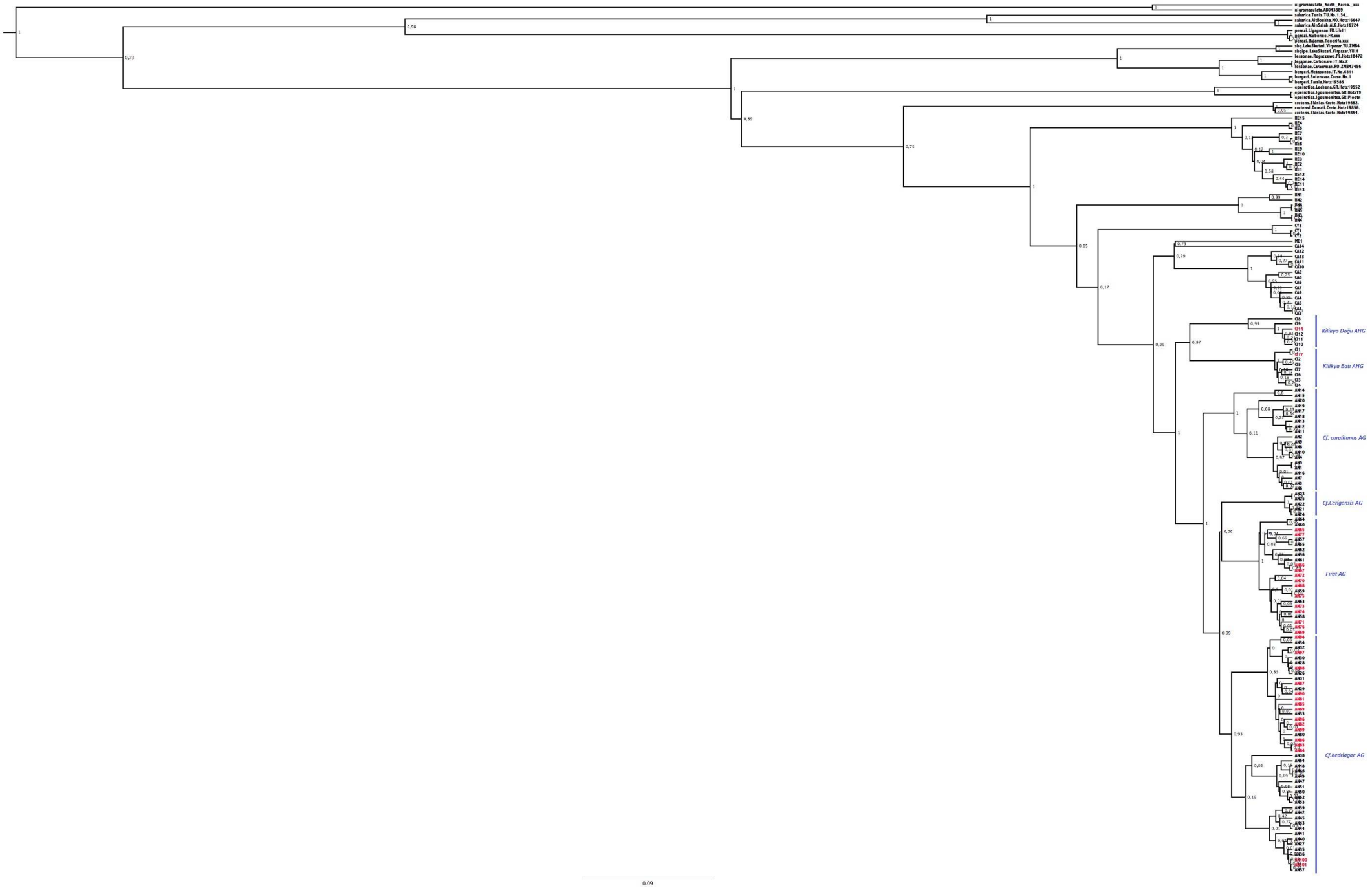
Kilikya Doğu ve Batı Anahaplogrupları: Daha önceki çalışmada (Akın ve ark., 2010b) sadece Ceyhan havzasında Amanos dağlarının doğusu ve batısında dağılış gösterdiği bilinen bu grubun bu son verilerle birlikte çok daha geniş bir bölgede yayıldığı anlaşılmıştır. Buna göre bu gruplara ait olan haplotiplerin doğuda Adıyaman'a kadar uzandığı, kuzeyde ise Konya havzasının doğusunda Niğde ve Kayseri'de Ceyhan havza sistemine bağlı nehirler

üzerinde dağılış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu grubun belki de dağılımı ile ilgili en ilginç sonuç bu gruplara ait haplotiplerin Ceyhan havzasından oldukça uzaktaki Erzincan'da bulunmalarıdır. Proje kapsamında yer alan bölgelerde bu grubun sadece en dıştaki sınır populasyonları ihtiva etmesinden dolayı bu gruba ait çok az sayıda haplotip örneklenebilmiştir.

cf. *caralitanus* Altgrubu: Bu grupta diğer Kilikya gruplarında olduğu gibi dağılışının en sınırdaki doğu populasyonlarından örneklenmiş olup çok az sayıda haplotipe rastlanmıştır. Ancak bu grupla ilgili daha önceki Akın ve ark. (2010a; b) dağılış alanında populasyonların dağılımı ve genetik çeşitliliği detaylı olarak çalışılmıştır. Bu çalışmada bu kadar az haplotip olmasına rağmen bu grubun bilinmeyen doğu sınırlarının belirginleşmesi için yeterli olmuştur. Buna göre bu soyun doğudaki son sınırları Niğde ve Kayseri illeri olarak belirlenmiştir. Bunun dışında bu grubun bu sınır bölgedeki populasyonları içinde cf. *bedriagae* grubuna ait soyla, Kilikya doğu ve batı anahaplogruplarına ait soylarla gen alışverişi içerisinde olduğu ve bu bölgenin bir geçiş bölgesi olduğu anlaşılmaktadır.

3.1.3. mtDNA Anahaplogruplarının ve Altgrupların Filogenetik İlişkileri

mtDNA haplotiplerinin oluşturduğu Bayesian ağacının topolojisi Şekil 3.2'de gösterildiği gibi oluşmuştur. Filogenetik ağaç oluşturulurken bu proje kapsamında olmayan ve daha önceki çalışmada yayınlanmış olan haplotipler de dahil edilerek, yeni haplotiplerin eski ağacın topolojisini nasıl etkilediği tespit edilmiştir. Bu duruma göre daha önceki çalışmalarda örneğin Akın ve ark. (2010b) 1378 baz (ND2+ND3) ve Bülbül ve ark. (2011) 2897 baz (cytb, 16S rRNA, 12S rRNA) mtDNA'nın çok daha uzun bölgesi çoğaltılarak elde edilmiş monofiletik gruplar bu çalışmada çok kısa 340 baz uzunluğundaki ancak çok sayıda haplotip içeren ağaç topolojisinde de görülmektedir. Bu monofiletik gruplar birbirinden çok yüksek *posterior probability* değerleri ile ayrılmaktadır. Örneğin, Kilikya doğu ve batı anahaplogrupları Anadolu'nun diğer cf. *bedriagae* anahaplogrubundan 1.00 *posterior probability* değeri ile, bir sonraki cf. *caralitanus* altgrubunun diğer üç altgruptan ayrılması yine 1.00 *posterior probability* değeri gibi en yüksek değerle desteklenmektedir. Son olarak diğer üç altgrup (Fırat, cf.*cerigensis* ve cf. *bedriagae* altgrupları) birbirinden 0.99 değeri ile ayrılmıştır. Bu sebeple bu çalışmadaki hedef bölgelerden elde edilen yeni haplotipler filogenetik ağaçtaki topolojinin, ayrıca anahaplogrup ve altgruplar arasındaki ilişkilerin daha güvenilir şekilde yorumlanabilmesine çok büyük bir katkı sağlamıştır.


Kilikya Doğu AHG
Kilikya Batı AHG
Cf. caralitanus AG
Cf.Cerigensis AG
Fırat AG
Cf.bedriagae AG
0.09

Şekil 3.2 (bir önceki sayfada) mtDNA ND3 haplotiplerinin *maximum clade credibility* ağacı. Ağacın dallarındaki değerler *posterior probability* değerlerini göstermektedir. Ağacın en uç kısmında yer alan etiketler farklı haplotip isimlerini, kırmızı renkle işaretlenmiş olanlar ise ilk defa bu çalışmada tanımlanmış yeni haplotipleri göstermektedir.

3.1.4. mtDNA Anahaplogrupların ve Altgrupların Arasındaki Genetik Farklılaşma ve Ayrılma Zamanları

Bu proje kapsamında elde edilen yeni haplotipler dahil edilerek hesaplanan gruplar arasındaki genetik uzaklık değerleri altgruplar arasında 0.022-0.044 arasında, anahaplogruplar arasında ise 0.046-0.058 arasında değişkenlik göstermektedir (Tablo 3.2). Bu değerler daha önceki çalışmadaki verilere göre (Akın ve ark., 2010b) % 0.5- % 2 arasında bir artış göstermiş olup bu durum özellikle çok sayıda yeni haplotip eklenmiş olan cf. *bedriagae* ve Fırat altgruplarında belirgin şekilde görülmektedir. Bunun en önemli sebebi daha önceki çalışmada her ne kadar iki farklı mtDNA gen bölgesi (ND2+ND3) kullanılmış olsa da her grubu temsil eden çok az sayıda haplotip olmasından dolayı bu gruplar arasındaki genetik farklılaşmalar daha düşük düzeyde çıkmıştır.

Yine daha önceki çalışmadaki kalibrasyon noktaları (Akın ve ark., 2010b) temel alınarak bu çalışmadaki yeni haplotipleri içeren gruplar için yapılan hesaplamalarda altgruplar arasındaki ayrılma zamanları 1.3-2.7 milyon yıl, anahaplogruplar arasında ise 2.7-3.6 milyon yıl arasında değişkenlik göstermektedir. Yine bu değerler daha önceki çalışmada (Akın ve ark., 2010b) aynı gruplar arasında yapılan hesaplamalara göre daha yüksek gözükmektedir. Bu durum yine yukarıda belirtildiği gibi az sayıda haplotipe dayalı olarak yapılan genetik farklılaşma ve ayrılma zamanları hesaplandığında elde edilen sonuçların çok dar bir tahmini zaman dilimini kapsadığı görülmektedir. Bu sebeple türler arasında ya da bir türün kendi populasyonları içerisindeki genetik farklılaşma ve bu grupların ayrılma zamanlarının hesaplaması yapılırken mümkün olabildiğince çok sayıda haplotip kullanılmaya çalışılmalıdır. Bu şekildeki bir yaklaşım aynı zamanda bu kalibrasyonlar yapılırken elde edilen hata payı değerlerininde çok daha düşmesine sebep olacak ve grupların geçmişteki ayrılma zamanları ile ilgili daha doğru bir çıkarım yapılmasına yardımcı olacaktır.

Tablo 3.2. mtDNA anahaplogrupları ve altgruplar arasındaki genetik uzaklık ve bu uzaklığa dayalı olarak hesaplanmış ayrılma zamanları.

Grup 1	Grup 2	Genetik Uzaklık	Standart Hata	Ayrılma Zamanları milyonyıl (kalibrasyon: 5.5 my - 5.3 my)	Standart Hata
Kilikya AHGs	Fırat AG	0,058	0,014	3.4 -3.6	0.83-0.87
Kilikya AHGs	cf.*bedriagae* AG	0,048	0,012	2.8-3.0	0.71-0.74
Kilikya AHGs	cf.*caralitanus* AG	0,055	0,013	3.2-3.4	0.77-0.81
Kilikya AHGs	cf.*cerigensis* AG	0,046	0,012	2.7-2.9	0.71-0.74
Fırat AG	cf.*bedriagae* AG	0,026	0,007	1.5-1.6	0.41-0.43
Fırat AG	cf.*caralitanus* AG	0,044	0,011	2.6-2.7	0.65-0.68
Fırat AG	cf.*cerigensis* AG	0,031	0,009	1.8-1.9	0.53-0.56
cf.*bedriagae* AG	cf.*caralitanus* AG	0,036	0,010	2.1-2.2	0.59-0.62
cf.*bedriagae* AG	cf.*cerigensis* AG	0,022	0,007	1.3-1.4	0.41-0.43
cf.*caralitanus* AG	cf.*cerigensis* AG	0,040	0,011	2.4-2.5	0.65-0.68

3.2 . Nükleer Belirteç Sistemi (SAI-1+RanaCR1)

3.2.1. Nükleer DNA Alellerinin Çalışma Alanındaki Bölgelere Göre Dağılımı

Proje kapsamında analizi tamamlanması hedeflenen 550 örneğin nükleer belirteç sistemine ait olan alellerinin bölgelere göre dağılımı Tablo 3.3'te verilmiştir. Bu proje kapsamında tespit edilen 17 farklı alelin tamamı ilk defa bu çalışmada tanımlanmış olup daha önce herhangi bir çalışmada yayınlanmamıştır. Bu alellerden bazıları sadece lokal olarak dağılım gösterirken bazı alleler ise neredeyse tüm bölgelerde yaygın olarak dağıldığı saptanmıştır. Hedef coğrafi bölgelerdeki bireylerin yaklaşık % 35'i bu nükleer belirteç sistemi için homozigot genotip taşırken, geri kalan kısmı ise alellerin bölgelere göre dağılımına dayalı olarak değişkenlik gösteren kombinasyonlarda heterozigot genotipler taşıdığı belirlenmiştir. Bazı heterozigotların taşıdığı aleller ise tespit edilememiştir.

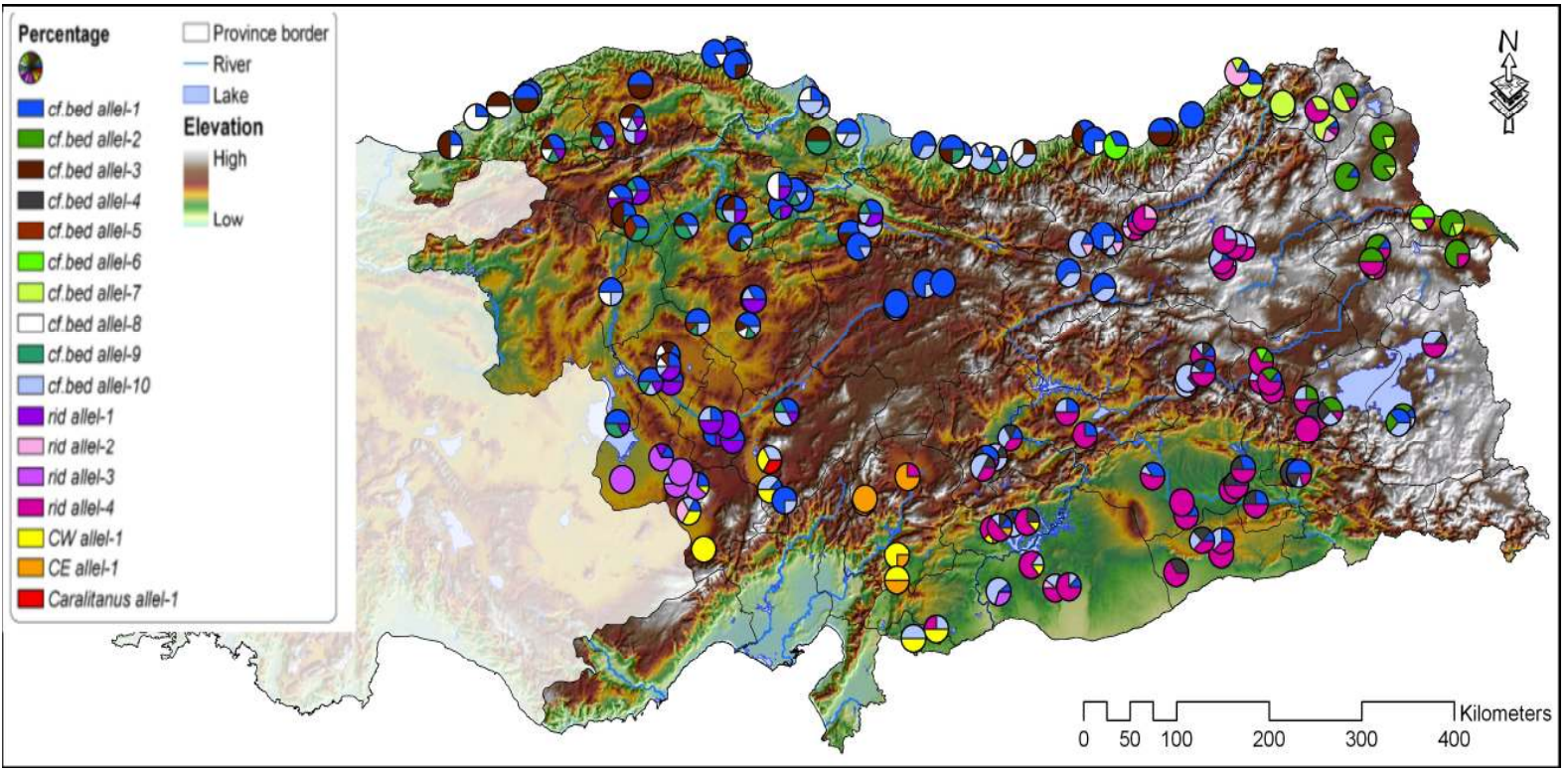
Tablo 3.3. Proje kapsamında nükleer belirteç sistemi analizi tamamlanan 550 örneğin taşıdıkları genotip özelliklerinin bölgelere göre dağılımı.

Homozigot Genotipler	*Doğu Anadolu*	*Güneydoğu Anadolu*	*Karadeniz Bölgesi*	*İç Anadolu'nun Doğusu*
cf.bed alel-1	**5**	**4**	**16**	**25**
cf.bed alel-2	**22**	**0**	**0**	**0**
cf.bed alel-3	**0**	**0**	**5**	**0**
cf.bed alel-4	**1**	**6**	**0**	**0**
cf.bed alel-5	**0**	**0**	**0**	**1**
cf.bed alel-6	**1**	**0**	**1**	**0**
cf.bed alel-7	**11**	**0**	**0**	**0**
cf.bed alel-8	**0**	**0**	**2**	**0**
cf.bed alel-9	**0**	**0**	**1**	**1**
cf.bed alel-10	**14**	**3**	**4**	**2**
rid alel-1	**0**	**0**	**0**	**2**
rid alel-2	**3**	**0**	**0**	**0**
rid alel-3	**0**	**0**	**0**	**10**
rid alel-4	**24**	**19**	**1**	**0**
CW alel-1	**1**	**3**	**0**	**0**
CE alel-1	**2**	**3**	**0**	**1**
cf.caralitanus alel-1	**0**	**0**	**0**	**1**
Heterozigot Genotipler	**96**	**62**	**105**	**91**
Toplam	**180**	**100**	**135**	**135**

3.2.2. Nükleer Belirteç Sistemi Alel Gruplarının Genetik Çeşitliliği ve Coğrafi Dağılımları

550 örneğin 1143 baz uzunluğundaki nükleer belirteç sisteminin dizi analizleri sonucunda tespit edilen 196 homozigot genotipine dayalı olarak oluşturulan veri setinde 77 (6 %) değişken bölge, 71 (6 %) parsimoni açısından önemli bölge, 6 singleton bölge tespit edilmiştir.

550 örneğin beklenen heterozigot çeşitliliği 0.8608 (± 0.0059) ve nükleotid çeşitliliği 0.02765 (± 0.013211) olarak hesaplanmıştır. Hedef bölgelerdeki bireylerin taşıdığı alellerin cf. *bedriagae,* Kilikya, *ridibundus* olmak üzere üç farklı gruba ait olduğu tespit edilmiştir. Bireyler bu alelleri ya sadece homozigot olarak ya da aynı veya farklı gruba ait alellerle kombinasyon oluşturarak heterozigot durumda taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu üç farklı gruba ait olan nükleer belirteç sistemi alellerinin dağılımı Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Nükleer belirteç sistemi alellerinin bu çalışmanın hedef bölgelerdeki dağılımı.

1. cf. *bedriagae* Alel Grubu: Bu gruba ait olan 11 farklı alel tespit edilmiştir. Bu gruptaki populasyonlarda yer alan bireylerin bu alelleri İç Anadolu'da Kızılırmak, Karadeniz'de Kızılırmak ve Yeşilırmak, Doğu Anadolu'da Aras ve Kura ve Güneydoğu bölgesinde Fırat ve Dicle nehir havzaları boyunca dağılış göstererek homozigot ya da heterozigot durumda taşıdıkları belirlenmiştir. Bu alellerden bazıları yalnızca çok dar coğrafi bölgede dağılım gösterirken birkaç alel neredeyse hedef bölgelerin tamamında dağılış göstermektedir. Bu gruba ait olan alellerin en temel özelliği nükleer belirteç sistemi gen dizisinde 3 ya da 4 adet G tekrarı (515-518) ve 5 adet CA mikrosatellit (723-733) bulunmasıdır.

Cf.bed alel-1: Bu gruptaki en yaygın olarak dağılış gösteren alellerden biri olup hedef bölgelerde İç Anadolu'dan Güneydoğu Anadolu'ya kadar dağılmaktadır. Ancak çok yoğun ve homozigot durumda İç Anadolu ve Karadeniz Bölgesi'nde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alel içinde bulunduğu gruptaki alellerde dahil olmak üzere diğer dört gruptaki alellerin birçoğu ile birlikte heterozigot kombinasyonlar oluşturmaktadır.

Cf.bed alel-2: Bu gruptaki lokal olarak dağılış gösteren bu alel yalnızca Doğu Anadolu Bölgesi'nin doğu ve kuzeydoğusunda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alelin bu bölgedeki populasyonlarda homozigot şeklinde taşınması yanında cf.bed alel-1, 4, 7, 10 ve rid alel-4 ile heterozigot genotip şeklinde de taşındığı tespit edilmiştir.

Cf.bed alel-3: Bu lokal yayılışlı alelin tüm Karadeniz boyunca ve İç Anadolu'nun kuzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alelin bu bölgelerdeki homozigot formları dışında cf.bed alel-1, 8, 9, 10 ve rid alel-1 and 2 ile heterozigot kombinasyonda taşındığı tespit edilmiştir.

Cf.bed alel-4: Bu lokal alelin yalnızca Doğu Anadolu'nun güneyindeki Fırat nehir kolları ile ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde Fırat ve Dicle nehir havzaları boyunca dağılış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bölgelerde bu alelin homozigot şeklinde taşınması yanında cf.bed alel-1, 2, 10, CW alel-1, CE alel-1 ve rid alel-4 ile heterozigot genotip formlarında bulunduğu belirlenmiştir.

Cf.bed alel-5: Bu çalışmada bu alel her nekadar tek bir noktadan tespit edilse de muhtemelen Batı Anadolu'ya özgü olup bu bölgede de aynı analizlerin devam etmesi gerekmektedir.

Cf.bed alel-6: Bu lokal alel sadece Doğu Anadolu Bölgesi'nin doğusunda kaydedilmiştir. Bu alel cf.bed alel-1, 7 ve rid alel-4 ile heterozigot kombinasyonlar şeklinde bu bölge populasyonlarındaki bireylerde taşındığı tespit edilmiştir.

Cf.bed alel-7: Diğer bir Doğu Anadolu'nun doğu ve kuzeydoğu bölgesindeki populasyonlarda lokal olarak dağılış gösteren bir aleldir. Bu alel homozigot genotip şeklinde taşınması yanında cf.bed alel-1, 2, rid alel-2 and rid alel-4 ile heterozigot genotipler şeklinde bu bölgedeki populasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Cf.bed alel-8: Alelin tüm Karadeniz ve İç Anadolu boyunca dağılış gösterdiği ancak batıya doğru gittikçe daha yoğun şekilde populasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alelin homozigot olarak taşınması yanısıra cf.bed alel-1, 9, 10 ve rid alel-1 ile heterozigot formlar şeklinde bu bölgedeki populasyonlarda dağıldığı tespit edilmiştir. Bu alelin en tipik özelliği 920-927 arasında 8 bazlık bir delesyon içermesidir.

Cf.bed alel-9: Bu alel tüm Karadeniz ve İç Anadolu boyunca dağılmakta ve batıya doğru yoğunluğu artmaktadır. Populasyonlarda homozigot durumda çok az tespit edilmesine rağmen heterozigot olarak yukarıda belirtilen aleller dışında cf.bed alel-10 ve rid alel-1 ile heterozigot olarak populasyonlarda çok sık olarak taşındığı tespit edilmiştir. Bu alelin en tipik özelliği gen dizisinde 4 adet G tekrarı (515-518) olmasıdır.

Cf.bed alel-10: En yaygın alellerden biri olup hedef bölgelerin hespinde dağıldığı tespit edilmiştir. Bu alelin hem homozigot genotip şeklinde hem de yukarıda belirtilen aleller yanında CW alel-1, rid alel-1, 3 ve 4 ile heterozigot genotip oluşturup çok yoğun şekilde populasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alelin en tipik özelliği gen dizisinde 4 adet G tekrarı (515-518) olmasıdır.

Cf.*caralitanus* alel-1: Bu nadir alel sadece hedef bölgelerden biri olan İç Anadolu'da Kayseri Sultansazlığı'nda tespit edilmiştir. Çalışma alanında başka bir alel ile olan heterozigot formu bulunmamıştır. Bu alelin en tipik özelliği gen dizisinde 4 adet G tekrarı (515-518) olmasıdır. Bu grupla ile ilgili durumun aydınlatılabilmesi için mutlaka nükleer DNA belirteç sistemi ile ilgili çalışmaların Batı Anadolu bölgesinde de sürdürülmesi buna göre değerlendirilme yapılması gerekmektedir.

2. *Ridibundus* Alel Grubu: Çalışma kapsamındaki bölgelerde bu gruba özgü dört farklı alel tespit edilmiş olup alellerin herbiri lokal olarak farklı bölgelerde dağılım göstermektedir. Bölge populasyonlarındaki bireylerde aleller homozigot olarak taşınması yanısıra cf.*bedriagae* alel grubu ve Kilikya alel grubundaki alellerle farklı heterozigot genotip kombinasyonları şeklinde de taşındığı belirlenmiştir. Bu gruptaki alellerin en önemli özelliği nükleer belirteç sistemi DNA dizisinde 3 yada 4 adet G tekrarı (515-518) ve 6 veya 8 adet CA mikrosatellit (723-740) tekrarı olması ve gen dizisinin birçok bölgesinde spesifik transition/transversion gibi bu gruba özgü baz değişimlerinin olmasıdır.

Rid alel-1: Bu alelin İç Anadolu ve Orta Karadeniz bölgesindeki populasyonlarda dağıldığı tespit edilmiştir. Homozigot olarak çok nadiren tespit edilmesine rağmen cf.*bedriagae* grubuna dahil olan birçok alelin heterozigot olarak bu bögedeki populasyonlarda yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir. Bu alelin en belirgin özelliği DNA dizisinde 3 adet G tekrarı (515-518) ve 6 adet CA mikrosatellit (723-736) tekrarı bulunmasıdır.

Rid alel-2: Bu lokal alel yalnızca Doğu Anadolu Bölgesi'nin kuzeyi ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde tespit edilmiştir. Alel homozigot genotip olarak çok az sayıda bireyde belirlenmiş olsada yukarıda belirtilen cf.*bebriagae* alel grubundan olan aleller ile heterozigot durumda daha yoğun şekilde bulunduğu görülmüştür. Bu dar yayılışlı alelin muhtemelen dağılımı Gürcistan ve Ermenistan'a kadar uzandığı düşünülmektedir. Bu sebeple bu bölgelerde de bu çalışmanın devam etmesi gerekmektedir. Bu alelin en belirgin özelliği DNA dizisinde 3 adet G tekrarı (515-518) ve 6 adet CA mikrosatellit (723-736) tekrarı bulunmasıdır.

Rid alel-3: En dar yayılışlı alel olup sadece Tuz Gölü ve çevresinde kaydedilmiştir. Ancak batıya doğru ne kadar yayıldığının belirlenebilmesi için çalışmanın bu bölgede de devam etmesi gerekmektedir. Bu bölgede populasyonlarda hem homozigot hem de cf.*bedriagae* alel grubundaki aleller ile heterozigot formlarda yoğun şekilde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alelin en önemli özelliği DNA dizisinde 3 adet G tekrarı (515-518) ve 8 adet CA mikrosatellit (723-740) tekrarı bulunmasıdır.

Rid alel-4: Diğer lokal yayılışlı alel olan bu alel tüm Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde hem homozigot hemde cf.*bedriagae* alel grubundan aleller ile, geçiş bölgelerinde ise rid-2 (Doğu Anadolu'nun kuzeyi), CW alel-1, CE alel-1 (Ceyhan havzasının doğusu) heterozigot formlarda yoğun şekilde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alelin ise en önemli

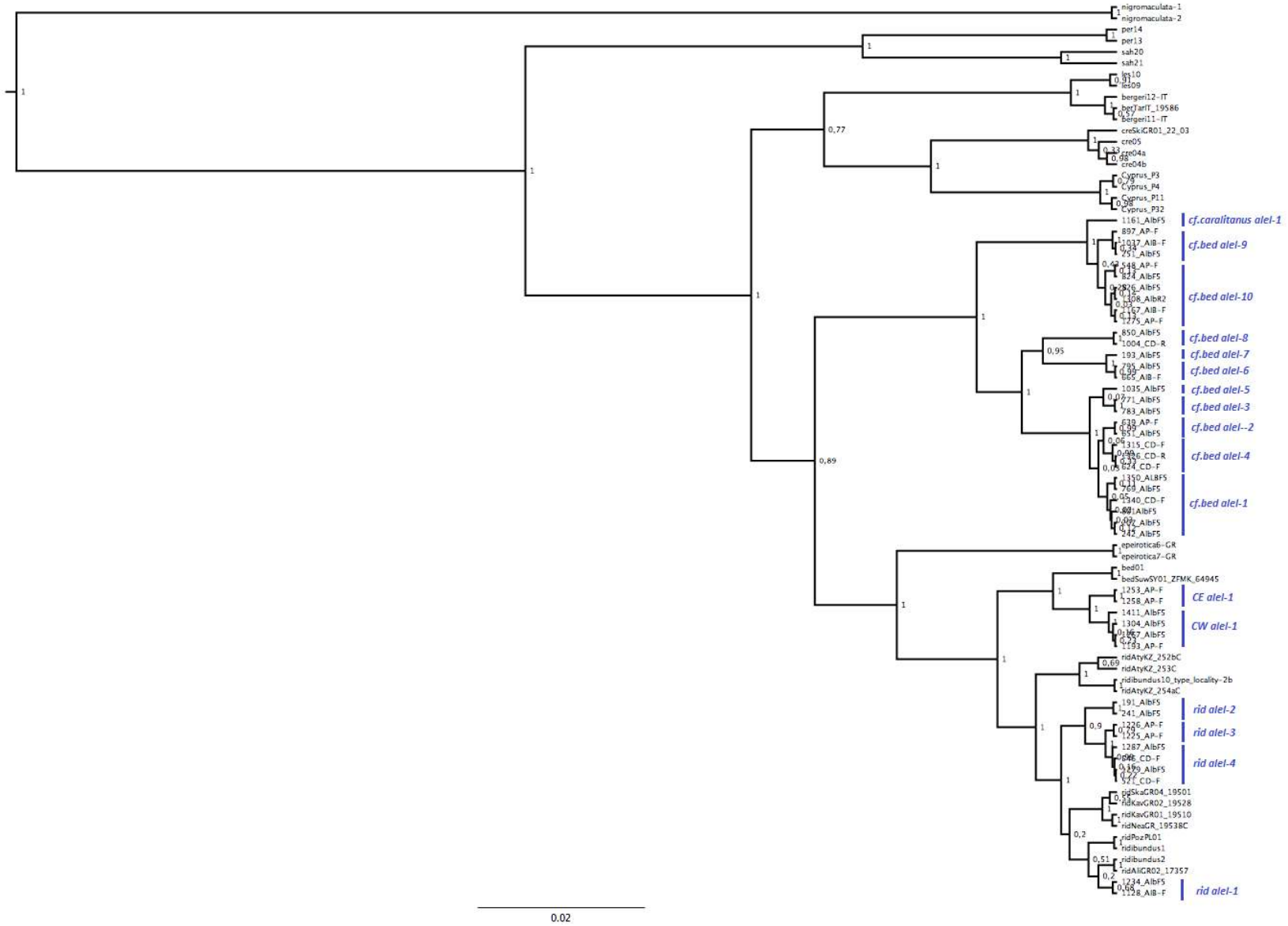
özelliği DNA dizisinde 4 adet G tekrarı (515-518) ve 8 adet CA mikrosatellit (723-740) tekrarı bulunmasıdır.

3. Kilikya Alel Grubu: Proje kapsamındaki bölge Kilikya grubunun en uçtaki populasyonlarını içerdiği için bu gruba ait CW alel-1 ve CE alel-1 olmak üzere iki farklı alel tespit edilmiştir. Bu sebeple bu bölgelerde homozigot genotip yanında bulunduğu bölgeye bağlı olarak yoğun şekilde cf.*bedriagae* alel grubu ve *ridibundus* alel grubundan aleller ile heterozigot formlar şeklinde de bulunmaktadır. Bu gruba ait olan alellerin en tipik özelliği gen sekansında 25 bazlık bir delesyon olması (1033-1057), 3 adet G tekrarı (515-517), 6 adet CA mikrosatellit tekrarı (723-736), çok sayıda bu gruba özgü baz değişimlerinin bulunmasıdır. Ancak bu grup çok sınırlı sayıda sınır populasyonda çalışıldığı için, bu grubun içerdiği allellerin bu iki alelle sınırlı kalmayacağı düşünülmekte ve nükleer belirteç sistemine dayalı olan coğrafi dağılımın batıda nereye kadar uzandığı bilinmemektedir. Bu sebeple bu grubun nükleer belirteç sistemine dayalı genetik çeşitliliğinin düzeyi ve tam dağılış sınırlarının tespit edilebilmesi için bu bölgedeki populasyonlarda nükleer belirteç sistemi çalışmalarının tamamlanması gerekmektedir.

3.2.3. Nükleer Belirteç Sistemi Alel Gruplarının Filogenetik İlişkileri

Nükleer belirteç sistemi alellerinin oluşturduğu Bayesian ağacının topolojisi Şekil 3.4'de gösterildiği gibi oluşmuştur. Yukarıda belirtilen üç alel grubu birbirinden genetik olarak farklılaşarak çok iyi şekilde ayrılmış monofiletik grupları oluşturmuşlardır. Bu monofiletik grupların ayrılması 1.00 gibi en yüksek *posterior probability* değeri ile desteklenmektedir. Filogenetik ağaçta cf.*bedriagae* alel grubunun tek başına büyük bir monofiletik grup oluşturduğu ve bu gruptaki bazı alellerin diğerlerinden çok belirgin bir şekilde ayrıldığı görülmüştür. Diğer bir monofiletik grup olan Kilikya alel grubunun ise Suriye'deki *Pelophylax bedriagae* grubundan alellerle çok yakın grup oluştururken, Rid alel grubu ise Avrupa'daki *P.ridibundus* ve Balkanlar'da dağılış gösteren *P. kurtmuelleri* türlerine ait alellerle çok yakın grup oluşturduğunu göstermektedir. Ancak bu üç grubun gerek birbiri ile olan gerekse diğer gruplarla olan ilişkilerini tam anlamıyla ve doğru bir şekilde değerlendirmek için çalışma alanının geri kalan kısmında cf.*bedriagae* alel grubu için Batı Anadolu, cf. *caralitanus* ve cf.*cerigensis* alel grupları için güneybatı Anadolu ve Kilikya alel grubu için ise Ceyhan havzası boyunca aynı genetik çalışmaların tamamlanması

gerekmektedir. Bu çalışmadan sonra tüm gruplara ait olan aleller tespit edildikten sonra analizlerin tekrar edilerek değerlendirmenin buna göre yapılması gerekmektedir.



Şekil 3.4. Nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1) alellerinin *maximum clade credibility* ağacı. Ağacın dallarındaki değerler *posterior probability* değerlerini göstermektedir. Ağacın en uç kısmında yer alan mavi renkli etiketler bu çalışmada belirlenen alel gruplarını göstermektedir.

3.2.4. Nükleer Belirteç Sistemi Alel Gruplarının Arasındaki Genetik Farklılaşma ve Ayrılma Zamanları

mtDNA haplotiplerine göre nükleer belirteç sistemine dayalı olarak tanımlanan alel grupları arasındaki farklılaşma ve dolayısıyla grupların ayrılma zamanları özellikle Kilikya Alel Grubu ve *Ridibundus* Alel Grubu ve *Ridibundus* alel grubu ile cf. *bedriagae* alel grupları arasında büyük farklar olduğu tespit edilmiştir. Bu grupların nükleer belirteç sistemi alel gruplarının ayrılma zamanları mtDNA haplotipleri için hesaplanan ayrılma zamanları ile karşılaştırıldığında (Akın ve ark. 2010b) çok yakın zamanda ayrıldıklarını göstermektedir. Ancak cf.*bedriagae* alel grubu ile Kilikya alel grubu arasında farklılaşma ve ayrılma zamanları tamamen her iki mtDNA ve nükleer belirteç sistemleri için örtüşmektedir. Bu bulgularda her iki belirteç sistemlerinin moleküler evrimleşme derecelerinin hem gen düzeyinde hem de farklı soylar arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. mtDNA ND3+ND2 belirteç sisteminin farklı soylar arasında farklı derecelerde evrimleşme gösterdiği daha önceki çalışmamızda (Akın ve ark., 2010b) hesaplanıp yayınlanmıştır.

Tablo 3.4. Nükleer belirteç sistemi alel grupları arasındaki arasındaki genetik uzaklık ve bu uzaklığa dayalı olarak hesaplanmış ayrılma zamanları.

Grup 1	Grup 2	Genetik Uzaklık	Standart Hata	Ayrılma Zamanları milyonyıl (kalibrasyon: 5.5 my - 5.3 my)	Standart Hata
Kilikya Alel Grubu	Ridibundus Alel Grubu	0,012	0,003	0.86- 0.90	0.216-0.225
Kilikya Alel Grubu	cf.*bedriagae Alel Grubu*	0,041	0,007	2.95-3.08	0.504-0.525
Ridibundus Alel Grubu	cf.*bedriagae Alel Grubu*	0,042	0,007	3.02-3.15	0.504 -0.525

3.3. mtDNA Haplogrupları ile Nükleer Alel Gruplarının Karşılaştırılması

Anadolu su kurbağaları *Pelophylax* sp. grubu ile ilgili olarak yaklaşık 50 yıldır çalışma yapılmasına rağmen bu grubun sistematik durumu ile ilgili (kaç türün ve hangi coğrafyada dağıldığı konusundaki) belirsizlik halen devam etmektedir. Bu durumun en önemli sebeplerinden biri morfolojik olarak ayırt edilememeleri (Plötner, 2005) ve dolasıyla klasik taksonomik çalışmaların yetersiz kalmasıdır. Bu durum, özellikle bu tür grubu gibi gizli türlerin bulunduğu gruplarının durumunu açığa kavuşturmak için moleküler çalışmaların önemini ortaya koymaktadır. Son yıllarda mtDNA'nın farklı gen bölgeleri temel alınarak yapılan çalışmalar (Plötner, 2005; Plötner ve ark., 2001, Akın ve ark., 2010a;b, Bülbül ve ark., 2011) Anadolu'da çok sayıda farklı mtDNA soyunun varlığını sürdürdüğünü ortaya koymuştur. Ancak herhangi bir tür grubu ile ilgili olarak doğru bir taksonomik değerlendirme yapabilmek için birden fazla moleküler belirteç sisteminin populasyonlardaki bireylerde nasıl dağıldığının karşılaştırılması yapılarak karar verilmesi gerekmektedir. Sadece ana tarafından aktarılan ve evrimleşme süreci farklı olan mtDNA haplotip bilgileri moleküler sistematik çalışmaların başlangıcı için güzel bir temel oluştururken grubun taksonomik durumu ile ilgili kararın verilmesinde yetersiz ve hatta yanıltıcı olabilir. Bu sebeple mutlaka bu tür çalışmaların çift yönlü aktarılan iyi bir nükleer belirteç sistemi ile desteklenmesi gerekmektedir.

Bu proje kapsamında yapılması hedeflenen farklı mtDNA gruplarının nükleer belirteç sistemine dayalı olarak tanımlanan alel grupları ile ne oranda örtüştükleri Tablo 3.5'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre iki farklı moleküler belirteç sistemlerinin geçiş (hibridleşme) bölgeleri dışında büyük oranda örtüştüğü gözlenmiştir. Örneğin İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Karadeniz Bölgesi'nde cf.*bedriagae* haplotipi taşıyan bireylerin %70'ten fazlasının homozigot ya da heterozigot olarak cf.*bedriagae* alel grubundan aleller taşıdığı belirlenmiştir. Yine mtDNA sonuçlarına göre Kilikya gruplarına ait haplotipleri (Kilikya Doğu veya Batı) taşıyan bireylerin büyük kısmının Kilikya alel gruplarına ait alelleri taşıdığı tespit edilmiştir. Bu veriler yalnızca Kilikya gruplarının en sınırdaki populasyonlarından elde edilmiş sonuçlardır. Doğru bir karşılaştırma ve değerlendirme için Kilikya gruplarının daha önce mtDNA haplotiplerine dayalı olarak belirlenen coğrafi dağılımlarının nükleer belirteç sistemi ile analiz edilmesi gerekmektedir.

Bu yüksek oranda iki belirteç sistemindeki örtüşmelerin yanında Doğu Anadolu'da ve Güneydoğu Anadolu'da Fırat grubuna ait haplotip taşıyan bireylerin sırasıyla % 61 ve % 48

gibi oranlarda homozigot ya da heterozigot durumda cf.*bedriagae* alel grubundan aleller taşıdığı tespit edilmiştir. Ancak ilginç bir şekilde geriye kalan Fırat grubu haplotip taşıyan bireyler ise homozigot veya heterozigot durumda lokal alel olan rid-4 alelini taşıdığı belirlenmiştir. Bu durumdaki lokal rid alelleri daha çok heterozigot halde İç Anadolu ve kuzeyi ve Doğu Anadolu'nun kuzeyinde de gözlenmiştir. Bu durum rid-4 alelinin Fırat grubuna özgü olduğunu, diğer bölgelerde de bölgesel adaptasyonlar olduğunu göstermektedir.

Bu karşılaştırmanın en önemli bulgularından biri, geçiş/hibridleşme bölgelerinin beklenin aksine bazen çok geniş bir coğrafyada yayılmış ve genetik olarak farklı monofiletik gruplar arasında olduğunun gözlenmesidir. Bu bulgular Anadolu su kurbağaları ile ilgili taksonomik bir değerlendirme yapılırken bu durumun göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

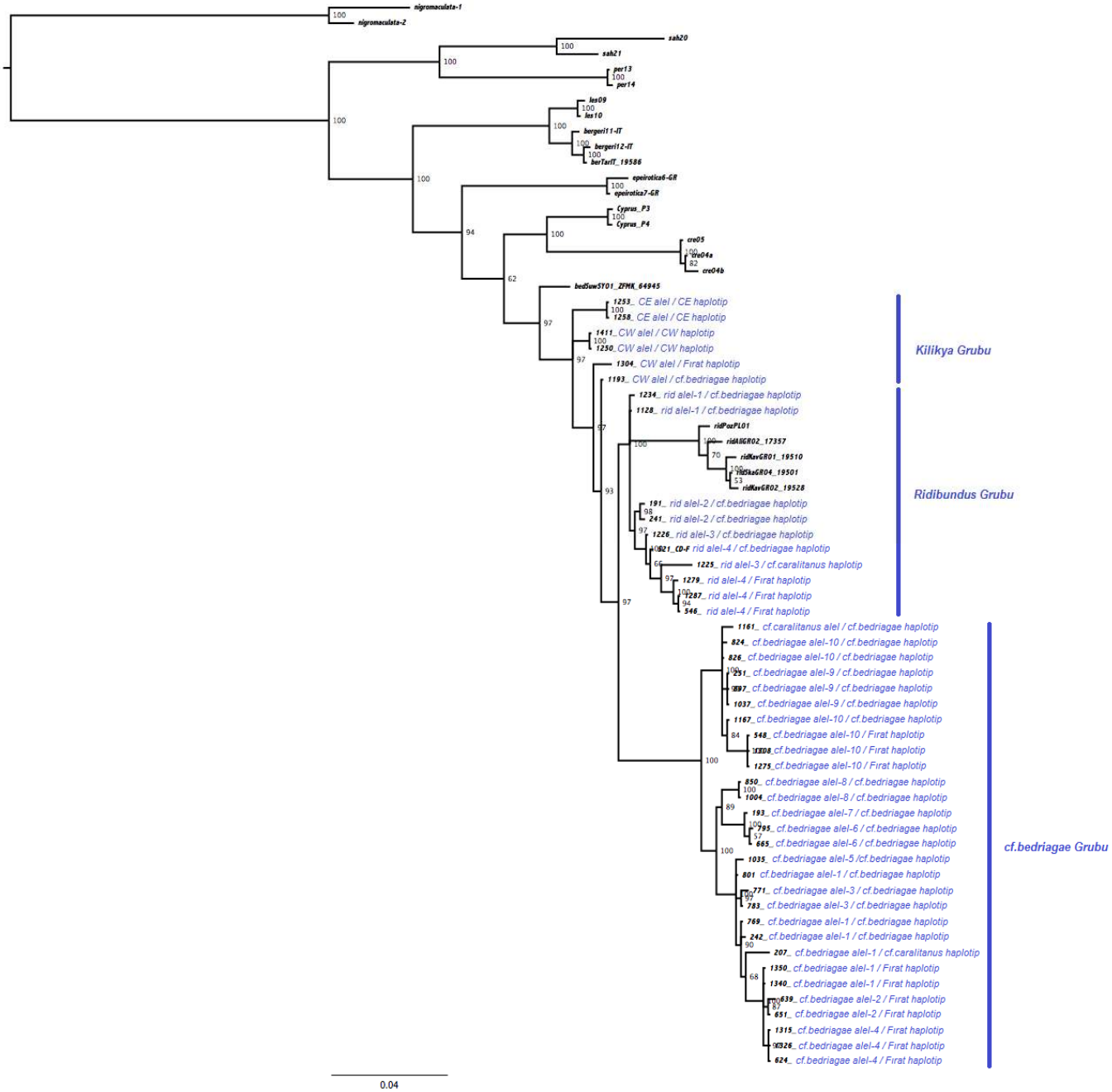
Tablo 3.5. Bireylerin taşıdığı mtDNA haplotip grupları ile nükleer belirteç sistemi alel gruplarının karşılaştırılması.

mtDNA AHG/AG	Doğu Anadolu Bölgesi			Karadeniz Bölgesi		
	cf.bedriage Alel Grubu	*Ridibundus Alel Grubu*	*Kilikya Alel Grubu*	*cf.bedriage Alel Grubu*	*Ridibundus Alel Grubu*	*Kilikya Alel Grubu*
cf.bedriagae AG	%71	%28	%2	%92	%8	0
Fırat AG	%61	%29	0	0	0	0
cf.caralitanus AG	0	0	0	0	0	0
Kilikya Doğu AHG	0	%21	%79	0	0	0
Kilikya Batı AHG	%23	0	%67	0	0	0
mtDNA AHG/AG	İç Anadolu'nun Doğusu			Güneydoğu Anadolu Bölgesi		
	cf.bedriage Alel Grubu	*Ridibundus Alel Grubu*	*Kilikya Alel Grubu*	*cf.bedriage Alel Grubu*	*Ridibundus Alel Grubu*	*Kilikya Alel Grubu*
cf.bedriagae AG	%70	%24	%1	0	%50	%50
Fırat AG	0	0	0	%47	%49	%4
cf.caralitanus AG	%24	%52	%24	0	0	0
Kilikya Doğu AHG	0	0	100	%25	12.5%	62.5%
Kilikya Batı AHG	100	0	0	%50	0	%50

3.4. Mitokondriyal ve Nükleer Genlerin Birleştirilmesine Dayalı Olarak Belirlenen Filogenetik İlişkiler

Bu iki farklı genin birleştirilmesi ile yapılan bu analizler yalnızca her iki genin sekansının elde edildiği ve bu proje kapsamındaki bölgelerin yer aldığı populasyonlardaki bireyler için yapılmıştır. Bu nedenle bu proje kapsamında olmayan bölgelerdeki cf. *caralitanus* grubu, cf. *cerigensis*, Kilikya ve Batı Anadolu'daki cf.*bedriagae* gruplarına ait nükleer sekans sonuçları olmadığı için (mtDNA sekans sonuçları mevcut olsa da) bu analiz zorunlu olarak proje kapsamındaki bölgelerde tespit edilen nükleer aleller ile sınırlandırılmıştır.

Bayesiyan analiz sonuçlarına göre (Şekil 3.5) Anadolu'ya ait örneklerin 90%'dan büyük posterior probability değerleri ile birbirinden çok iyi ayrılmış üç farklı monofiletik grup oluşturduğunu göstermektedir. Bunlardan en fazla farklılaşmış ve çeşitlilik gösteren cf.*bedriagae* monofiletik grubu 97% posterior probability değeri ile diğer gruplardan çok belirgin şekilde ayrılmıştır. Diğer bir monofiletik grup olan *ridibundus* grubu da %93 posterior probability değeri ile diğer gruplardan ayrılmıştır. Ancak bu analiz sonucunda, daha önce yalnızca nükleer belirteç sistemine dayalı elde edilmiş filogenetik ağaçta çok belirgin şekilde ayrılmış olan 4 farklı *ridibundus* alel grubunun farklı grupları arasındaki ilişkilerin daha belirsizleştiği ve çözünürlüğünün düştüğü gözlenmiştir. Aynı şekilde Kilikya grubunda da daha önce nükleer ve mtDNA belirteçlerinde çok belirgin şekilde ayrılmış olan monofiletik grupların (Kilikya doğu ve batı), birleştirilmiş analiz sonucunda bu filogenetik ilişkilerin daha belirsiz duruma geldiği gözlenmiştir. Bu belirsizliğinin en önemli nedeni bireylerin farklı gruplara ait olan mtDNA haplotipini ve nükleer alelleri taşımaları ve bu bireylerin özellikle geçiş bölgelerindeki populasyonlardan gelmiş olmasıdır. Bunun yanında bu iki farklı gen için her ne kadar analizler data partition dosyasında spesifik moleküler evrimleşme modeline dayalı olarak yapılmış olsa da, bu iki sistemin nesiller arası genetik aktarım şeklinin farklı olması ve bu süreç boyunca genomda farklı seleksiyona maruz kalmaları filogenetik ağaçtaki çözünürlüğünün düşmesine neden olan diğer bir önemli etkendir.



Şekil 3.5. Data partition ile oluşturulmuş mtDNA ND3 + nükleer belirteç sistemi (SAI-1+RanaCR1) verilerinin Bayesiyan filogenetik ağacı. Ağacın dallarındaki değerler yüzdelik olarak *posterior probability* değerlerini göstermektedir. Ağacın en uç kısmında yer alan mavi renkli etiketler bu analiz sonucunda Anadolu'da belirlenen monofiletik grupları göstermektedir.

3.5. Araştırmanın Geliştirilmesi Hakkında Öneriler

Anadolu su kurbağaları ile ilgili doğru taksonomik değerlendirmenin yapılabilmesi için bu çalışma kapsamında olmayan, ancak daha önce mtDNA belirteç sistemine dayalı olarak haplogrup sınırları belirlenen Kilikya grupları (Doğu ve Batı), cf. *caralitanus* grubu, cf.*cerigensis* grubu ve cf.*bedriagae*'nin Batı Anadolu ve Trakya populasyonları üzerinde nükleer belirteç sistemi analizlerinin tamamlanması gerekmektedir. Bu analizler bitince bu bölgelerde belirlenen alel grupları, bu çalışmadan elde edilen alel gruplarına dahil edilerek filogenetik analizler ve ayrılma zamanları ile ilgili analizler tekrarlanmalı ve mtDNA grupları ile karşılaştırılmalı ve bu sonuçlar ışığında değerlendirme yapılmalıdır.

BÖLÜM 5

DEĞERLENDİRME ve SONUÇ

- Bu çalışma kapsamındaki bölgelerde tamamlanan mtDNA analiz sonuçları kabaca Türkiye'nin doğu yarısında cf.*bedriagae* AG, Fırat AG, cf.*caralitanus* AG, Kilikya Doğu ve Batı AHG'na ait haplotiplerin dağıldığını göstermektedir.

- Son verilerle cf. *bedriagae* haplotiplerinin Doğu Anadolu'nun kuzeyine, cf. *caralitanus* haplotiplerinin İç Anadolu'nun doğusunda Kayseri Sultansazlığı'na, Kilikya Doğu ve Batı gruplarının haplotiplerinin doğuda Adıyaman'a kuzeyde ise Kayseri ve Niğde'ye, Fırat grubu haplotiplerinin ise Doğu Anadolu'nun kuzeyi ve Doğu Karadeniz bölgesine kadar dağıldığını göstermektedir.

- Bu araştırma sonucunda elde edilen 32 yeni haplotip dahil edilerek yapılan filogenetik analizlerde, Anadolu'da dağılış gösteren mtDNA soyları birbirinden çok iyi şekilde ayrılmış monofiletik gruplar oluşturmuştur.

- Çok sayıda haplotipe dayalı olarak yapılan genetik farklılaşma ve ayrılma zamanları daha doğru sonuçlar vermekte ve standart hata payını azaltmakta, bir türün populasyonları ve türlerin geçmişteki jeolojik durumları ile ilgili daha gerçeğe yakın değerlendirilmelerin yapılmasına olanak sağlamaktadır.

- Nükleer belirteç sistemi sonuçları cf. *bedriagae*, Kilikya ve *ridibundus* olmak üzere çalışma alanında üç farklı alel grubunun varlığını desteklemektedir. Bu alel grupları içinde bazı aleller sadece lokal olarak dağılış gösterirken diğer aleller ise çok geniş alanda dağılış göstermektedir.

- cf. *bedriagae* alel grubu İç Anadolu, Karadeniz ve az yoğunluktaki birkaç aleli Güneydoğu Anadolu bölgesi'nde dağılış gösterirken, Kilikya alel grubu yalnızca

Ceyhan havzası sınırlarına yakın populasyonlarda, *Ridibundus* alel grubu ise çalışma alanındaki her bölgeye spesifik dört farklı alel ile dağılış göstermektedir.

- Bu üç farklı alel grubunun daha önce Anadolu dışındaki bölgelerden elde edilmiş farklı türlere özgü alel gruplarının dahil edilmesiyle yapılan filogenetik analizlerde bu grupların birbirinden iyi şekilde ayrılmış monofiletik öbekler oluşturduğu ve Kilikya alel grubunun Suriye'deki *Pelophylax bedriagae* türünün alellerine, *Ridibundus* alel grubunun ise Avrupa'daki *P. ridibundus ve P. kurtmuelleri* türlerinin alellerine çok yakın olduğu belirlenmiştir.

- Nükleer belirteç sistemi alel grupları arasındaki genetik farklılaşma ve ayrılma zamanları mtDNA sonuçlarına göre bazı gruplarda örneğin *Ridibundus*-Kilikya alel grupları ve Cf.*bedriagae-Ridibundus* alel grupları arasında çok yakın zamanda görülürken (sırasıyla 0.9 milyon yıl ve 3.0 milyon yıl), diğer gruplar örneğin Cf.*bedriagae*-Kilikya alel grupları arasındaki farklılaşma ve ayrılma (yaklaşık 3.0 milyon yıl) mtDNA sonuçları ile örtüşmektedir.

- Bu iki belirteç sisteminin genetik farklılaşma ve ayrılma zamanları arasındaki farklılıklar, bu gen bölgelerinin moleküler evrimleşme oranlarının farklı olmasının yanısıra bu evrimleşme oranının soylar arasında değişkenlik göstermesinden kaynaklanmaktadır.

- mtDNA grupları ile nükleer belirteç sistemi alel grupları karşılaştırıldığında, gen alışverişinin olduğu bölgeler hariç tutulursa bireylerde homozigot ya da heterozigot genotip şeklinde taşınan her bir mtDNA soyu için spesifik nükleer alellerin olduğu tespit edilmiştir.

- cf. *bedriagae* haplogrubunun İç Anadolu, Karadeniz ve Doğu Anadolu'nun kuzeyinde lokal ya da geniş alanda dağılış gösteren cf. *bedriagae* alel gruplarına ait alelleri taşıdığı belirlenmiştir. Ancak aynı bölgelerde bölgelere spesifik olarak değişkenlik gösteren *ridibundus* allelerini homozigot ya da heterozigot durumda taşıdığı tespit edilmiştir.

- Doğu Anadolu'nun güneyi ve doğusu, Güneybatı'da dağılış gösteren Fırat haplogrubunun ise Fırat ve Dicle nehirlerinin güneydoğudaki alt kollarına doğru daha yoğun olmak üzere rid alel-4'ü heterozigot ve homozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir.

- Kilikya haplogruplarının yoğun şekilde heterozigot ya da homozigot durumda Kilikya alellerini taşıdıkları tespit edilmiştir.

- Sonuç olarak proje kapsamındaki hedef bölgelerdeki hem mtDNA soylarının, hem de nükleer belirteç sistemine dayalı alel gruplarının genetik çeşitliliğin oldukça yüksek ve coğrafi dağılım desenlerinin oldukça ilginç olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple Anadolu su kurbağaları ile ilgili doğru bir taksanomik değerlendirme yapabilmek için mutlaka mtDNA ve nükleer belirteç sistemlarinin karşılaştırılması ve buna göre değerlendirme yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Akın, Ç. Detection of species boundaries in the Rana ridibunda complex of south-western Turkey using mitochondrial ND3 marker. Master Thesis, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 135 pp., (2007).

Akın, Ç. ve Bilgin, C.C. Türkiye'de Su Kurbağalarının Toplanması, İşlenmesi ve İhracatına İlişkin Ön Rapor (KKGM'ye sunulmuştur) ODTÜ, Ankara, 10 s. (2010).

Akın, Ç., Bilgin, M., Bilgin, C.C. Discordance between ventral colour and mtDNA haplotype in the water frog *Rana* (*ridibunda*) *caralitana*, 1988 Arikan. Amphibia-Reptilia 31: 9-20, (2010a).

Akın, Ç., Bilgin, C.C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Uzzell, T., Bilgin, M., Hotz, H., Gues, G.-D., Plötner, J. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes ans climate change in the Late Cenozoic. J Biogeogr, 37: 2111-2124, (2010b).

Alpagut, N., Falakalı, B. Karyotype analysis of two *Rana ridibunda* (Ranidae; Anura) populations in Turkey. Isr. J. Zool. 14: 523-531, (1994).

Alpagut Keskin, N., Falakalı Mutaf, B. Rod-shaped bivalents indicate assemblage among Anatolian water frog populations. Amphibia-Reptilia 27: 47-53, (2006).

Arıkan, H. On a new form *Rana ridibunda (Anura:Ranidae)* from Turkey. İst Üniv Fen Fak Mec 53:81-87. (In Turkish), (1988).

Andren, C., Nilson, G. Observations on the Herpetofauna of Turkey in 1968 – 1973. British J of Herpetology 5: 575-584, (1976).

Başoğlu,U. M. & Özeti, N. Türkiye Amfibileri. Ege Üniv Fen Fak Kitapları Ser No:50, Bornova – İzmir. (In Turkish) pp. 95-100, (1973).

Beerli, P. Genetic isolation and calibration of an average protein clock in Western Palearctic water frogs of the Aegean region. Dissertation Univeristat Zürich, (1994).

Beerli, P., Hotz, H., Uzzell, T. Geological dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. Evolution 50**:** 1676-1687, (1996).

Bodenheimer, F. S. Introduction into the knowledge of the *Amphibia* and Reptilia of Turkey. Rev Fac Sci Univ Istanbul 9 (1): pp.12-13, (1944).

Böhme, W. & Wiedl, H. Status and zoogeography of the herpetofauna of Cyprus, with taxonomic and natural history notes on selected species (genera Rana, Coluber, Natrix, Vipera). Zool. Middle East 10: 31-52, (1994).

Bülbül, U., Matsui, M., Kutrup, B., Eto, K. Taxonomic relationships among Turkish water frogs as revealed by phylogenetic analyes using mtDNA gene sequences. Zoological Science 28(12): 930-936, (2011).

Drummond, A.J., & Rambaut, A. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214, (2007).

Drummond, A.J., Nicholls, G.K., Rodrigo, A.G., & Solomon, W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simutaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* **161**, 1307-1320. (2002).

Dubois, A., Ohler, A. Frogs of the subgenus *Pelophylax (Amphibia*, *Anura, Genus Rana)*: a catalogue of available and valid scientific names, with comments on name-bearing types, complete sysnonymies, proposed common names and maps showing all type localities. Zoologica Polonica 39: 139-204, (1994).

Excoffier, L. and Lischer, H.E. L., Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567, (2010).

Holsbeek, G., Mergeay, J., Hotz, H., Plötner, J., Volckaert, F.A.M., de Meester L.A. Cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. Mol Ecol 17: 5023-5035, (2008).

Holsbeek, G., Mergeay, J., Volckaert, F.A.M., de Meester, L. Genetic detection of multiple exotic water frog species in Belgium illustrates the need for monitoring and immediate action. Biological Invasions, doi 10.1007/s10530-009-9570-9, (2009).

Jdeidi, T., Bilgin, C. C., Kence, M. Geographic variation and taxonomy of water frogs in Turkey. III. International Symposium on Genetics, Systematics and Ecology of Western Palearctic Water Frogs, Abstracts, (1999).

Jdeidi, T. Enzyme polymorphism, morphometric and bioacoustic studies in water frog complex in Turkey. Ph. D. Middle East Technical University, Ankara,Turkey, (2000).

Jdeidi, T., Bilgin, C.C & Kence, M. New localities extend the range of *Rana bedriagae caralitana* Arıkan, 1988 *(*Anura: Ranidae*)* further west and suggest specific status. *Turkish Journal of Zoology,* 25: 153-158 (2001).

Joermann, G., Baran, I., Scheneider, H. The mating call of *Rana ridibunda (Amhibia: Anura)* in Western Turkey: bioacoustic analysis and taxonomic consequences. Zool Anz 220: 225-232, (1988).

Ohst, T. Untersuchungen zur stammesgeschichtlichen Entwicklung des westpaläarktischen Wasserfroschkomplexes (Anura, Ranidae) auf der Grundlage von DNA-Sequenzen des mitochondrialen ND2- und ND3-Gens. Diploma thesis, Humboldt-Universität Berlin, 94 pp, (2001).

Pagano, A., Crochet, P. A., Graf, J.-D., Joly, P., Lodé, T. Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. Global Ecology & Biogeography 10: 433-441, (2001b).

Pagano, A., Dubois, A., Lesbarrères, D., Lodé, T. Frog alien species: a way for genetic invasion. C R Biologies 326: 85-92, (2003).

Plötner, J. Die westpaläarktischen Wasserfrösche. Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Z f Feldherpetologie, Beiheft 9, Laurenti, Bielefeld, (2005).

Plötner, J., Ohst. T. New hypothesis of the western Palearctic water frog complex (Anura: Ranidae). Mitt. Mus. Nat. kd. Zool. Reihe 77: 5-21, (2001).

Plötner, J., Ohst, T., Böhme, W., Schreiber, R. Divergence in mitochondrial DNA of Near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of Cypriot and Anatolian populations *(Anura, Ranidae)*. Amphibia – Reptilia 22: 397-412, (2001).

Plötner, J., Köhler, F., Uzzell, T. & Beerli, P. *Molecular Systematics of Amphibians*. In: Heatwole, H. [ed]: *Amphibian Biology*, Band 7: *Phylogeny and Systematics*. Surrey Beatty & Sons, (2007).

Plötner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Spolsky, C., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Guex, G.-D., Reyer, H.-U. & Hotz, H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology,* **21**, 668-681, (2008).

Plötner, J., Köhler, F., Uzzell, T., Beerli, P., Hotz, H., Schreiber, R. & Guex, G.-D. Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53: 784-791, (2009).

Plötner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Akın, Ç., Bilgin, C.C., Haefeli, C., Ohst, T., Köhler, F., Schreiber, R., Guex, G.D., Litvinchuk, A.N., Westaway, R., Pruvost, N., Reyer, H.U., Hotz, H. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. In: Glaubrecht M (Ed), Evolution in action. Case studies in Adaptive Radiation, Speciation and the Origin of Biodiversity. Special volume from the SPP 1127 "Radiations – Genesis of Biological diversity" of the DFG. Springer, Heidelberg, Berlin, (2010), pp. 373-403.

Posada, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution 25: 1253-1256, (2008).

Schneider, H., Sinsch, U. Mating call variation in lake frogs referred to as *Rana ridibunda* Pallas, 1771: taxonomic implications. Z F Zool Syst Evolut Forsch 30: 297-315, (1992).

Schneider, H., Sinsch, U. Taxonomic reassesment of Middle Eastern water frogs: Bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda, Rana bedriagae* or *Rana levantina*. J Zool Syst Evol Research 37: 57-65, (1999).

Silva, R., Burch, J.B.E. Evidence that chicken CR-1 elements represent a novel family of retroposons. Mol. Cell. Biol. 9: 3563–3566, (1989).

Sinsch, U., Schneider, H. Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: morphological variation among populations considered as Rana ridibunda, R. bedriagae or R. levantina. J. Zool. Syst. Evol. Res. 37: 67-73, (1999).

Sinsch, U., Schneider, H., Kaya, U., Arıkan, H. The water frogs *(Anura: Ranidae)* of Turkey: a morphometric view on systematics. Herpetological Journal 12: 141-153 (2002).

Tamura, K., & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526, (1993).

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. - Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, (2011).

Wiley, E. O. The evolutionary species concept reconsidered. Syst. Zool. 27: 17-26, (1978).

Wiley, E. O. Phylogenetics: the Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. J. Wiley & Sons, New York, (1981).