

**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE DENİZLERİNDE YAŞAYAN SCOMBRİDAE
TÜRLERİNİN DNA BARKODLAMASI**

CAN ÖNEL

**Bu tez,
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında
Yüksek Lisans
derecesi için hazırlanmıştır.**

ORDU-2014

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Can ÖNEL tarafından hazırlanan ve Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ danışmanlığında yürütülen “Türkiye Denizlerinde Yaşayan Scombridae Türlerinin DNA Barkodlaması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25/04/2014 tarihinde oy birliği ile Balıkçılık Teknolojisi Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği,
Ordu Üniversitesi

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN
Biyoloji Bölümü, Ordu Üniversitesi

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği,
Ordu Üniversitesi

İmza : 

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ~~09.05.14~~ tarih ve ~~2014/197~~ sayılı kararı ile onaylanmıştır.

09.05/2014


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. M. Fikret BALTA

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, çalıőmanın yűrűtűlmesi ve yazımı esnasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gűsteren danıőman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTCİ'ye en içten teőekkűrlerimi sunarım.

Aynı zamanda, manevi desteklerini her an űzerimde hissettiėim aileme teőekkűrű bir borç bilirim.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Can ÖNEL

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TÜRKİYE DENİZLERİNDE YAŞAYAN SCOMBRIDAE TÜRLERİNİN DNA BARKODLAMASI

Can ÖNEL

Ordu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, 2014

Yüksek Lisans Tezi, 65s.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ

Bu çalışmada, Scombridae ailesine ait ve ülkemiz denizlerinden örneklenen *Auxis rochei*, *Euthynnus alletteratus*, *Sarda sarda*, *Scomber japonicus*, *Scomber scombrus*, *Scomberomorus commerson*, *Thunnus alalunga* türleri incelenmiştir. Türlerin mtDNA üzerinde bulunan Sitokrom b, 12S rRNA ve COI bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleriyle elde edilen veriler kullanılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiş ve türler arası ilişkiler belirlenmiştir.

Çalışmada COI gen bölgesinde 9 haplotip, 12S rRNA ve sitokrom b gen bölgelerinde 7 haplotip belirlenmiştir. COI, 12S rRNA ve Sitokrom b gen bölgeleri için haplotip çeşitliliği ve nükleotit çeşitliliği sırasıyla Hd:0.912, Pi:0.07854; Hd:0.800, Pi:0.03778; Hd:0.964, Pi:0.07230 olarak bulunmuştur. Elde edilen matrikslerde baz kompozisyonları COI gen bölgesi için A:0.2382, C:0.2867, G:0.1874 ve T:0.2878, 12S gen bölgesi için A:0.281, C:0.268, G:0.223 ve T:0.228 ve Sitokrom b gen bölgesi için A:0.2510, C:0.3198, G:0.1527 ve T:0.2764 olarak belirlenmiştir.

Filogenetik analizlerde oluşturulan ağaçlar incelendiğinde *S. sarda* haplotiplerinin bir grup, *A. rochei*, *E. alletteratus* haplotiplerinin bir grup, *S. scomber* ve *S. japonicus* haplotiplerinin ise bir grup oluşturduğu ve ayırım gösterdikleri görülmektedir. *T. alalunga* haplotipinin ise *A. rochei*, *E. alletteratus* haplotiplerine yakın durduğu, *S. sarda* haplotiplerinin ise diğer haplotiplere uzak durduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada, işlenmiş etlerde kullanılan hayvan türlerini belirlemek ve Türkiye pazarlarında ürün etiketleri üzerinde gıda içeriğinin yanlış tanımlanması ile ilgili durumun araştırılabilmesine yardımcı olmak için basit bir DNA testi gösterilmiştir. Ayrıca, bu yöntem son derece esnek: mitokondriyal genom üzerinde gen bölgelerine ait sekans bilgileri gen bankaları üzerinden araştırmacılara ve laboratuvar çalışanlarına açık olup hızla hedef dizilerin seçimi ve gerekli analizlerin yapılması her geçen gün artmaktadır. Bu genom bilgileri hala sınırlı olduğu için deniz ve iç su ürünleri türlerinin ayırımı için özellikle önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Scombridae, Tür ayırımı, DNA Barkodlama, DNA izolasyonu, PZR Analizi, Sitokrom b, COI, 12S rRNA

ABSTRACT

DNA BARCODING OF SCOMBRID FISH SPECIES FROM TURKISH WATERS

Can ÖNEL

University of Ordu

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Fisheries Technology Engineering, 2014

MSc. Thesis, 65p.

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ

In this study, the species belongs to the Scombridae family which sampled from our waters; *Auxis rochei*, *Euthynnus alletteratus*, *Sarda sarda*, *Scomber japonicus*, *Scomber scombrus*, *Scomberomorus commerson* and *Thunnus alalunga* have been examined. Cytochrome b, 12S rRNA and COI gene regions which found on the mtDNA were amplified by PCR and sequence analysis has been performed. The datas that obtained from sequence analysis has been used to get phylogenetic analysis and relationships among species have been identified.

In the study, 9 haplotypes in 12S gene region, 7 haplotypes in cytochrome b and COI gene regions has been identified. Haplotype diversity and nucleotide diversity has been found for the region COI, 12S rRNA and cytochrome b gene, respectively; Hd:0.912, Pi:0.07854; Hd:0.800, Pi:0.03778; Hd:0.964, Pi:0.07230. On the resulting matrices base compositions for the COI gene region A:0.2382, C:0.2867, G:0.1874, T:0.2878, for the 12S gene region A:0.281, C:0.268, G:0.223, T:0.228 and for the cytochrome b gene region: A:0.2510, C:0.3198, G:0.1527, T:0.2764 has been determined.

When the trees has been examined which generated by phylogenetic analyzes, *S. sarda* haplotypes has formed as a group, *A. rochei* and *E. alletteratus* haplotypes has formed as a group, *S. scomber* and *S. japonicus* haplotypes has formed as a group that seen a distinction. *T. alalunga* haplotype close to *A. rochei* and *E. alletteratus* haplotypes and *S. sarda* haplotypes away the other haplotypes has been observed.

In conclusion, in this study to determine the types of animals used in processed meats and Turkey markets erroneous identification of food ingredients on the product labels investigate the situation with a simple DNA test can be shown to help. Also, this method is extremely flexible: the mitochondrial gene regions on the genome sequence of the gene banks of information is open to researchers and laboratory staff and the selection of target sequences quickly made the necessary analysis is increasing with each passing day. The genome information is still limited to the types of products for the marine and inland water is especially important for the separation.

Key Words: Scombridae, Species identification, DNA Barcoding, DNA isolation, PCR Analysis, cytochrome b, COI, 12S rRNA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
TEZ BİLDİRİMİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
EKLER LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Genel Bilgiler.....	4
2.1.1. Taksonomi.....	5
2.1.2. Çalışmada Analiz edilen Türler, Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri.....	5
2.1.2.1. <i>Auxis rochei</i> (Risso, 1810), Gobene Balığı.....	5
2.1.2.2. <i>Euthynnus alletteratus</i> (Rafinesque, 1810), Yazılı Orkinos.....	7
2.1.2.3. <i>Sarda sarda</i> (Bloch, 1793), Palamut.....	8
2.1.2.4. <i>Scomber japonicus</i> (Houttuyn, 1782), Kolyoz.....	9
2.1.2.5. <i>Scomber scombrus</i> (Linnaeus 1758), Uskumru.....	10
2.1.2.6. <i>Scomberomorus commerson</i> (Lacepède, 1800), Palamut Kolyozu.....	11
2.1.2.7. <i>Thunnus alalunga</i> (Bonnaterre, 1788)Uzun Kanat Orkinos.....	13
2.1.3. DNA Barkodlaması.....	14
2.2. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı.....	17
2.3. Scombridae Türleri Üzerine Moleküler Çalışmalar	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	20

3.1.1	Örnekleme Çalışmaları	20
3.1.1.1.	Çalışma Sahası.....	20
3.1.1.2.	Arazi Çalışması.....	20
3.2.	Yöntem.....	21
3.2.1.	Toplam DNA'nın Eldesi.....	21
3.2.2.	COI, Sitokrom b ve 12S rRNA gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması.....	22
3.2.3.	Agaroz Jel Elektforezi ile Çoğaltılan Gen Bölgelerinin Gözlenmesi.....	24
3.2.4.	PZR Ürünlerinin Dizi Reaksiyonu, Dizilerin Elde Edilmesi ve Hizalanması..	25
3.2.5.	Genetik Verilerin Analizi.....	26
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1.	DNA Dizin analizi.....	28
4.1.1.	mtDNA COI Gen Bölgesi	28
4.1.1.1.	COI Geni ve Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri.....	28
4.1.1.2.	COI Geni Filogenetik Özellikleri.....	34
4.1.2.	mtDNA 12S rRNA Gen Bölgesi	37
4.1.2.1.	12s rRNA Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri.....	37
4.1.2.2.	12S rRNA Gen Bölgesi Filogenetik Özellikleri.....	41
4.1.3.	mtDNA Sitokrom b Gen Bölgesi	43
4.1.3.1.	Sitokrom b Geni ve Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri.....	43
4.1.3.2.	Sitokrom b Gen Bölgesi Filogenetik Özellikleri.....	49
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
6.	KAYNAKLAR.....	58
	EKLER.....	62
	ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	<i>Auxis rochei</i> (Risso 1810) coğrafik dağılımı.....	6
Şekil 2.2.	<i>Auxis rochei</i> (Risso 1810), Gobene Balığı (Orijinal)	6
Şekil 2.3.	<i>Euthynnus alletteratus</i> (Rafinesque 1810) coğrafik dağılımı.....	7
Şekil 2.4.	<i>Euthynnus alletteratus</i> (Rafinesque 1810), Yazılı orkinos (orijinal).....	8
Şekil 2.5.	<i>Sarda sarda</i> (Bloch 1793) coğrafik dağılımı.....	8
Şekil 2.6.	<i>Sarda sarda</i> (Bloch 1793), Palamut (Orijinal).....	9
Şekil 2.7.	<i>Scomber japonicus</i> (Houttuyn 1782) coğrafik dağılımı.....	9
Şekil 2.8.	<i>Scomber japonicus</i> (Houttuyn 1782), Kolyoz (Orijinal).....	10
Şekil 2.9.	<i>Scomber scombrus</i> (Linnaeus 1758) coğrafik dağılımı.....	10
Şekil 2.10.	<i>Scomber scombrus</i> (Linnaeus 1758), Uskumru (Orijinal).....	11
Şekil 2.11.	<i>Scomberomorus commerson</i> (Lacepède 1800) coğrafik dağılımı.....	12
Şekil 2.12.	<i>Scomberomorus commerson</i> (Lacepède 1800), Palamut kolyozu (Orijinal)..	12
Şekil 2.13.	<i>Thunnus alalunga</i> (Bonnaterre 1788) coğrafik dağılımı.....	13
Şekil 2.14.	<i>Thunnus alalunga</i> (Bonnaterre 1788), Uzun kanat orkinos (Orijinal).....	14
Şekil 2.15.	BOLD sistemine veri girişi.....	16
Şekil 3.1.	DNA'nın gözle görülmesi.....	21
Şekil 3.2.	12S, COI ve Cyt b gen bölgesi PZR şartları.....	23
Şekil 3.3.	COI, Cyt b ve 12S gen bölgeleri agaroz jel elektroforezi sonucu.....	25
Şekil 3.4.	Forward ve reverse sonuçların doğrulanması.....	26
Şekil 4.1.	COI geni için Network programı ile oluşturulan haplotip ağı.....	32
Şekil 4.2.	COI gen bölgesi PAUP parsimoni ağacı.....	35

Şekil 4.3.	COI Gen bölgesi için PHYML programı üzerinde ML ağacı.....	35
Şekil 4.4	COI gen bölgesi için UPGMA ağacı.....	37
Şekil 4.5.	12s rRNA geni için Network programı ile oluşturulan haplotip ağı.....	39
Şekil 4.6.	12S gen bölgesi PAUP parsimoni ağacı.....	41
Şekil 4.7.	12S Gen bölgesi için PHYML programı üzerinde ML ağacı.....	42
Şekil 4.8.	12S rRNA gen bölgesi NJ ağacı.....	43
Şekil 4.9.	Sitokrom b geni için Network programı ile oluşturulan haplotip ağı.....	45
Şekil 4.10.	Sitokrom b gen bölgesi PAUP parsimoni ağacı.....	50
Şekil 4.11.	Sitokrom b gen bölgesi için PHYML programı üzerinde ML ağacı.....	50

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	Türkiye Scombrid üretimi.....	4
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları.....	22
Çizelge 4.1.	Scombridae familyasına ait 7 türden COI, 12s rRNA ve Sitokrom b genleri için dizin analizi yapılan birey sayısı ve lokaliteleri.....	28
Çizelge 4.2.	mtDNA COI gen bölgesi haplotip bilgileri.....	29
Çizelge 4.3.	mtDNA COI gen bölgesi haplotiplerinin değişken pozisyonları.....	31
Çizelge 4.4.	mtDNA COI gen bölgesi türler arası nükleotit çeşitliliği ve net nükleotit çeşitliliği.....	34
Çizelge 4.5.	COI gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi.....	36
Çizelge 4.6.	COI gen bölgesi için GenBank'tan (NCBI) alınan veriler.....	36
Çizelge 4.7.	12s rRNA gen bölgesi haplotip bilgileri.....	38
Çizelge 4.8.	mtDNA 12s rRNA bölgesi haplotiplerinin değişken pozisyonları.....	40
Çizelge 4.9.	12S rRNA gen bölgesi türler arası nükleotit çeşitliliği ve net nükleotit çeşitliliği.....	40
Çizelge 4.10.	12S Gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi.....	42
Çizelge 4.11.	12S rRNA gen bölgesi için GenBank'tan (NCBI) alınan veriler.....	43
Çizelge 4.12.	Sitokrom b gen bölgesi haplotip bilgileri.....	44
Çizelge 4.13.	mtDNA Sitokrom b geni haplotiplerinin değişken pozisyonları.....	47
Çizelge 4.14.	Sitokrom b gen bölgesi türler arası nükleotit çeşitliliği ve net nükleotit çeşitliliği.....	49
Çizelge 4.15.	Cyt b Gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi.....	51

SİMGELER ve KISALTMALAR

AIC	: Akaike Information Criterion
bç	: Baz çifti
BIC	: Bayesian Information Criterion
BOLD	: The Barcode of Life Database
cm	: santimetre
COI	: Sitokrom Oksidaz I
Cyt b	: Sitokrom b
d _A	: Net nükleotit çeşitliliği
dk	: dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
d _{XY}	: Türler arası nükleotit çeşitliliği
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FASTA	: Metin tabanlı nükleotit dizi formatı
Hd	: Haplotip çeşitliliği
L	: Litre
m	: metre
M	: Molar
mg	: miligram
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
ML	: Maximum Likelihood
mm ³	: milimetreküp
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NCBI	: GenBank (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
NFW	: Nükleazsız su (Nuclease Free Water)
NJ	: Neighbour Joining
pH	: asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
Pi	: Nükleotit çeşitliliği
pmol	: pikomol
ppt	: binde bir (Parts per thousand)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNAaz	: Ribonükleaz
rpm	: Devir/dakika
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
s	: saniye
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBE	: Tris, Borik Asit, EDTA
TE	: Tris, EDTA
TEN	: Tris, EDTA, NaCl
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik asit
UV	: Ultra viyole

EKLER LİSTESİ

<u>Ek No</u>		<u>Sayfa</u>
Ek 1.	Laboratuvar çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar	62

1. GİRİŞ

Son zamanlarda kriptik türler üzerine yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır (Hubert ve ark. 2012). Kriptik türlerin tanımlanması ile ilgili problemlerden biri taksonomik protokollerin çoğunun fenotipik karakterlere bağlı olması ve örneklerin uzun ve ayrıntılı inceleme gerektirmesidir (Costa ve Carvalho 2007). Bu şekildeki organizmaları sınıflandıran ve isimlendiren geleneksel tanımlama metotları büyük ölçüde görünen morfolojiye bağlıdır. Kriptik tür-kompleksi içinde ekonomik açıdan önemli türler üzerine yanlış veri toplanması ve yanlış belirlenmesi potansiyel stoklarının aşırı tüketilmesine neden olabilir (Fox ve ark. 2005). Bu nedenle, ek olarak çeşitlendirmenin potansiyel sürücülerini açıklayan, tür düzeyinde doğru tanımlama, ticari önemi olan balık stoklarının başarılı yönetimini sağlamak için DNA barkod veritabanı önemli bir rol oynayabilir. Türleri tanımlamak için kısa, standart bir gen bölgesinin kullanımı (Hebert ve ark. 2003a), DNA barkod yaklaşımının taksonomik belirsizliklerin çözümünde faydalı olduğunu gösterilmiştir (Ward 2009).

Hebert ve ark. (2003a), DNA dizilerinin türler içinde farklı türler arasındaki dizilerden daha benzer olabileceğini ve bu "barkod farklılığının" türlerin ayırımında kullanılabileceğini önermişlerdir. Günümüze kadar, Sitokrom Oksidaz subunit I (COI) mitokondriyal protein kodlayan geni, hayvanlar aleminin çoğunluğu için pratik ve standart tür düzeyi barkod olarak kabul edilmiştir (Hebert ve ark. 2003b). DNA barkodlamanın temel amacı kriptik ve mikroskobik taksonlar ve morfolojik olarak belirsiz karakterlere sahip organizmalar da dâhil olmak üzere küresel biyolojik çeşitliliğin değerlendirilmesi ve korunması ve potansiyel olarak tanımlanamayan taksonların hızlı bir şekilde tanımlanmasını kolaylaştırmaktır (Hebert ve ark. 2003a). DNA barkodlama ayrıca büyük taksonomik topluluklar için hızlı ve kolay bir tür tanımlama aracı olarak küresel bir barkodlama veritabanı gelişimine odaklanmıştır (Ratnasingham ve Hebert 2007). DNA barkodlama aracılığıyla tanımlama süreci, nispeten kolay ve daha önce belgelenmiş ve arşivlenen örnekler ile bilinmeyen örneklerden COI dizilerinin ölçülebilir uyumuna bağlıdır. Test ve referans numunelerinin COI dizilerinde bulunan işaretli uyumsuzluğun olduğu yerlerde ve ilave olarak taksonomi ile ilgili çalışmalarda yeni

takson keşfetme olasılığını değerlendirmek için yapılmaktadır (Hajibabaei ve ark. 2007). Bugüne kadar, farklı coğrafik bölgelerden çeşitli organizmaları içeren birçok barkodlama projesine bilim insanlarına açık barkod kütüphanesinden, (www.barcodinglife.com) ulaşılabilir (Ratnasingham ve Hebert 2007). Birçok bölgede balık için DNA barkod bilgi zenginliği olmasına rağmen, biyolojik çeşitlilik bakımından çok zengin bir alan olsa da sularımızdan nispeten az veri bulunmaktadır. DNA barkodlama önemli düzeyde biyoçeşitlilik kaybının olduğu bölgede, hızlı biyoçeşitlilik değerlendirmesi için yararlı olabilir (Lohman ve ark. 2011).

Bu çalışmanın konusu kıyılarımızda yaşayan 7 Scombridae türüne ait (*Auxis rochei* (Risso 1810) (Gobene Balığı), *Euthynnus alletteratus* (Rafinesque 1810) (Yazılı Orkinos), *Sarda sarda* (Bloch 1793) (Palamut), *Scomber japonicus* (Houttuyn 1782) (Kolyoz), *Scomber scombrus* (Linnaeus 1758) (Uskumru), *Scomberomorus commerson* (Lacepède 1800) (Palamut Kolyozu), *Thunnus alalunga* (Bonnaterre 1788) (Uzun kanat orkinos)) mitokondriyal COI, 12s rRNA ve sitokrom b (Cyt b) gen bölgelerine ait dizi verilerini elde etmek ve genetik barkodlarının oluşturmaktır. COI ile diğer gen bölgelerinin değişkenliğinin türü tanımlamadaki uygunluğunun değerlendirilmesi için hem tür içi hemde türler arasında karşılaştırılmıştır. COI barkodlarının denenmesi için örnekler analiz edilmiş ve GenBank'ta ve BOLD sisteminden elde edilen diğer coğrafi bölgelerden gelen ek moleküler verilerle karşılaştırılmıştır.

Uluslararası deniz ürünleri pazarında, Scombridae (Thunnidae) familyası üyeleri en fazla tüketilen ürünler olarak önemli ve büyük bir paya sahiptir. Bu familya üyeleri avcılık ve yetiştiricilik yoluyla yapılan dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık %4-5'ini oluşturmaktadır. Dünya balıkçılık üretimindeki bu oranla yapılan üretim miktarı hemen hemen 4 milyon tona yakındır (Aksungur ve Çakmak 2008).

Böyle büyük bir üretimin ve tüketimin olması ve ayrıca fazla sayıda Scombridae türünün Türkiye sularında dağılım göstermesi bu çalışmanın yapılmasında çıkış noktası olmuştur. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda işlenmiş ürün olarak kullanılan Scombridae türleri birbirlerinden genetik farklılıklarıyla ayrılacak ve istenilen bir numunenin tür teşhisinin yapılmasında bir kaynak oluşturacaktır.

Böylece, ileride işlenmiş balık ürünlerinde tüketiciyi aldatmaya yönelik yapılan uygulamaların teşhisine de bir kaynak oluşturacaktır.

Sonuç olarak, DNA barkodlama çalışmaları hayvan türlerinin hızlı ve hassas bir şekilde tanımlanabilmesini amaçlamaktadır. Bu ve bunun gibi çalışmalar sonunda oluşturulmuş veri tabanı sayesinde morfolojik olarak birbirlerine çok yakın olan türler ya da erişkin morfolojisinden çok farklı karakteristiğe sahip juvenil bireyler DNA barkodlarına bakılarak tanımlanabilir. Farklı bölgelerden alınan örneklerin genetik verilerini karşılaştırarak popülasyonlar arasındaki ilişkiler ve olası doğal bariyerler saptanabilir. DNA barkodları kullanılarak geliştirilmiş olan DNA çipleri sayesinde herhangi bir morfolojik tayin çalışmasına gerek kalmadan balık türleri ve ayrıca türlere ait larva ve yumurtaların kompozisyonu kesin ve hassas bir şekilde çıkarılabilir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Genel Bilgiler

Türkiye kıyılarında dağılım gösteren Scombridae türleri üzerinde uluslararası standartlarda genetik farklılıkları gösteren ve barkodlama çalışmalarına da temel olacak detaylı çalışma henüz yapılmamıştır.

Ülkemizde moleküler düzeyde taksonomik revizyon, türler arası ve türler içi genetik farklılıkları ortaya koyan çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Denizel türleri ve özellikle Scombridae türlerini içeren genetik çalışmaların çok az olduğu söylenebilir. Balıklar üzerine yapılan çalışmalarda genellikle mitokondriyal DNA'nın farklı gen bölgeleri çalışılsa da genetik barkodlama çalışmalarında COI geninin kullanılması üzerinde dünya genelinde bir fikir birliği sağlanmıştır. Bu çalışma çerçevesinde COI geninin yanında Sitokrom b ve 12S rRNA gen bölgeleri de çalışılmış ve kıyılarımızda yaşayan Scombrid türlerinin genetik barkodlaması gerçekleştirilmiştir.

Elde edilmiş verilerin en büyük katma değeri, Türkiye sularında yaygın olarak bulunan, avcılığı yapılan (Çizelge 2.1) ve balık işleme tesislerince yoğun olarak kullanılan Scombridae türlerinin uygun genetik belirteç (sekans dizilimi) kullanılarak genetik yapılanmayı içine alan konuların, farklı lokalitelerdeki aynı türler (gen bank verileri de dâhil) ile karşılaştırılarak ortaya konulmuş olmasıdır.

Çizelge 2.1. Türkiye Scombrid üretimi (Ton) (Anonim 2011)

Türler	2007	2008	2009	2010	2011
<i>Thunnus alalunga</i>	852	208	631	402	1 396
<i>Thunnus thynnus</i>	1 788	1 597	1 891	1 003	628
<i>Sarda sarda</i>	5 965	6 448	7 036	9 401	10 019
<i>Scomber scombrus</i>	1 076	516	505	226	147
<i>Scomber japonicus</i>	2 263	1 818	2 952	2 004	3 127
<i>Auxis rochei</i>	993	836	1 873	2 435	2 552
<i>Euthynnus alletteratus</i>	785	1 074	1 309	1.046	1 437
<i>Xiphias gladius</i>	423	386	301	334	190
Toplam	14 145	12 883	16 498	16 851	19 496

Scombridae ailesine ait türler yalnız ülkemiz sularında değil Akdeniz, Ege ve Karadeniz'e kıyısı bulunan diğer ülkelerde de dağılım göstermektedir.

2.1.1. Taksonomi

Alem	Animalia
Şube	Chordata
Alt şube	Vertebrata
Üst sınıf	Osteichthyes
Sınıf	Actinopterygii
Alt sınıf	Neopterygii
Üst takım	Acanthopterygii
Takım	Perciformes
Alttakım	Scombroidei
Aile	Scombridae
Alt aile	Scombrinae

Kabile	Cins	Tür
Sardini	<i>Sarda</i>	<i>Sarda sarda</i>
Thunnini	<i>Auxis</i>	<i>Auxis rochei</i>
	<i>Euthynnus</i>	<i>Euthynnus alletteratus</i>
	<i>Thunnus</i>	<i>Thunnus alalunga</i>
Scombrini	<i>Scomber</i>	<i>Scomber scombrus</i>
		<i>Scomber japonicus</i>
Scomberomorini	<i>Scomberomorus</i>	<i>Scomberomorus commerson</i>

2.1.2. Çalışmada Analiz edilen Türler, Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri

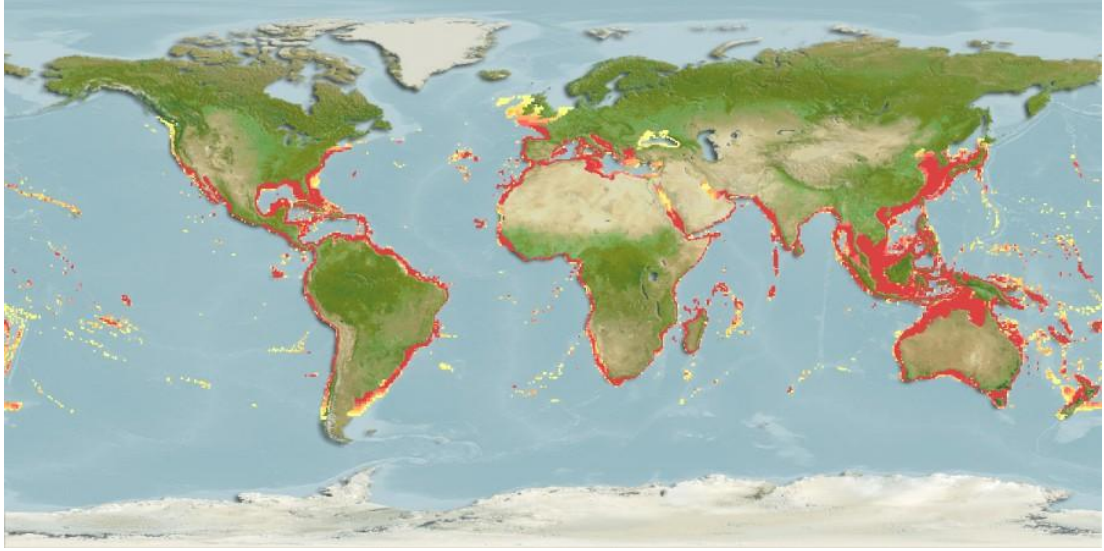
Scombridae familyasına dahil ve Türkiye sularında dağılım gösteren *Auxis rochei* (Gobene balığı), *Euthynnus alletteratus* (Yazılı orkinos), *Sarda sarda* (Palamut), *Scomber japonicus* (Kolyoz), *Scomber scombrus* (Uskumru), *Scomberomorus commerson* (Palamut kolyozu), *Thunnus alalunga* (Uzun kanat orkinos) türleri incelenmiş ve her bir tür için tanı özellikleri, coğrafik dağılımı ve habitat biyolojisi sırasıyla verilmiştir.

2.1.2.1. *Auxis rochei* (Risso 1810), Gobene Balığı

Epipelajik bir türdür. Özellikle hamsi gibi küçük balıklarla, kabuklu hayvanlarla (yengeç ve Stomatopod larvası gibi) ve kalamar ile beslenirler. Yumurta ve

larvaları pelajiktir. 44.2 cm boyundaki bir dişinin yumurta verimi (fekondite) 1.37 milyon yumurta/yıl olarak tahmin edilmektedir (Collette ve Nauen 1983).

Yaygın bir türdür, ılık sularda bulunur (Collette ve Nauen 1983). Atlantik Okyanusu, Akdeniz de dahil olmak üzere Hint ve Pasifik okyanuslarında (şekil 2.1) dağılım gösterir (Anonim 2014).



şekil 2.1. *Auxis rochei* (Risso 1810) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

Pektoral yüzgeçleri kısadır ancak pulsuz alanın ön kenarındaki dikey çizgiye kadar ulaşır. Dorsal dikenler (toplam): 9 - 12; dorsal yumuşak ışınlar (toplam): 10-13; Anal dikenleri yoktur; Anal yumuşak ışınlar: 12 – 14 adettir (Anonim 2014). Lateral çizginin üzerinde pulsuz alanda 15 veya daha fazla, dik konuma yakın bir şekilde eğik, koyu renkli dalgalı çizgiler bulunur (şekil 2.2).

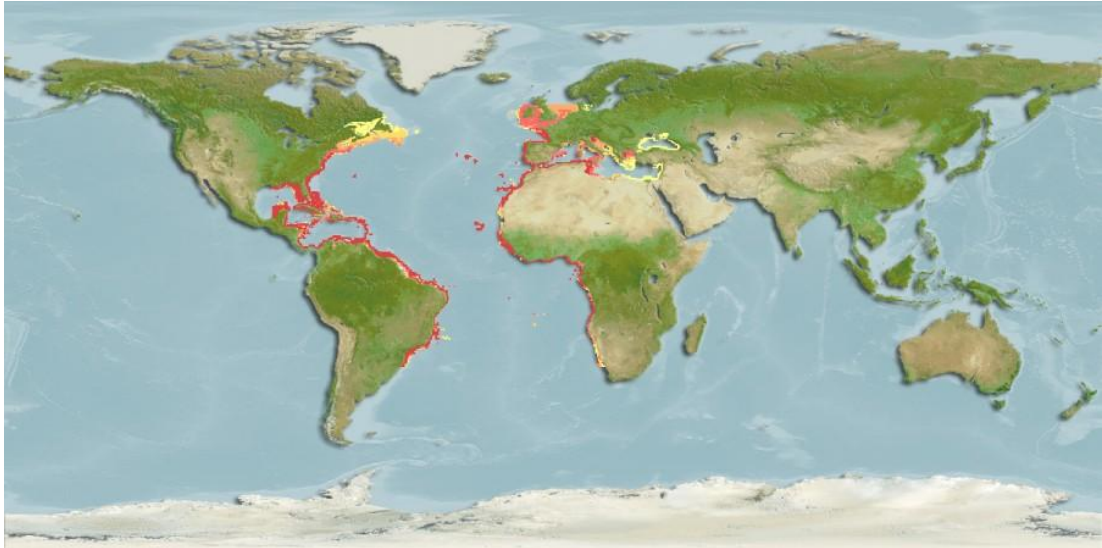


şekil 2.2. *Auxis rochei* (Risso 1810), Gobene Balığı (Orijinal)

2.1.2.2. *Euthynnus alletteratus* (Rafinesque 1810), Yazılı Orkinos

Epipelajik, neritik bir türdür, genelde kıyı denizlerde görülür. Akdeniz’de yumurtlama zamanı bahar sonlarından yaza kadar sürer. Su sıcak olduğunda yumurta çeşitli gruplar halinde dökülür. 75 cm boyunda bir dişinin ortalama 1.75 milyon yumurta döktüğü tahmin edilmektedir. Yumurta ve larvaları pelajiktir. Akdeniz’de rastlanan en büyük birey 100 cm çatal boya sahiptir ve yaklaşık 12 kg ağırlığındadır (Collette ve Nauen 1983).

Akdeniz, Karadeniz, Karayip Denizi ve Meksika Körfezi dahil olmak üzere Atlantik Okyanusu’nun tropikal ve subtropikal sularında dağılım gösterir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *Euthynnus alletteratus* (Rafinesque 1810) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

İlk kemer üzerinde 37’den 45’e solungaç dikenleri bulunur; solungaç dişleri 31 veya 32’dir; vomerin dişleri yoktur. Anal yüzgeç ışınları 11-15 adettir. Dorsal dikenler (toplam): 15 - 16; dorsal yumuşak ışınlar (toplam): 11-13; Anal dikenleri yoktur; anal yumuşak ışınlar: 11 – 15 adettir (Anonim, 2014). Omurga 39 omurdan oluşur. Yeni başlayan çıkıntılar ve kuyruk yanındaki kemik kaudal salmalar 33. ve 34. omurlarda bulunur (Collette ve Nauen 1983). Karın ve göğüs yüzgeçleri arasında 3-7 koyu nokta bulunur. Şekil 2.4’teki gibi dorsal işaretler kırık yatay çizgiler veya çubuklardan oluşur (Collette ve Nauen 1983).

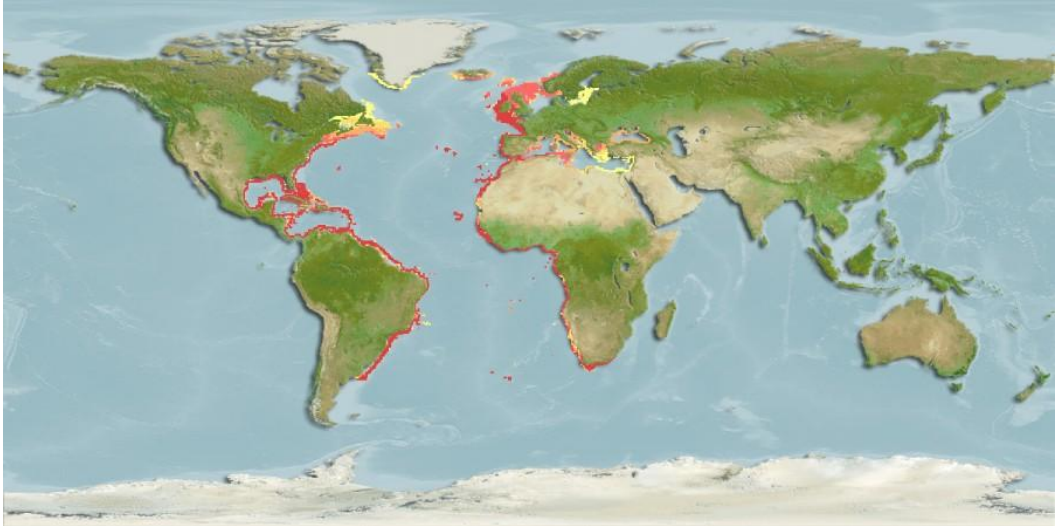


Şekil 2.4. *Euthynnus alletteratus* (Rafinesque 1810), Yazılı Orkinos (Oriijinal)

2.1.2.3. *Sarda sarda* (Bloch 1793), Palamut

Epipelajik, neritik bir türdür sürü oluştururlar ve haliçlere girebilirler. Farklı sıcaklıklara adapte olabilirler, 12-27°C derece sıcaklık ve 14-39 ppt tuzluluk değerlerinde yaşayabilirler. Kendi yavruları da dahil küçük sürü balıklarıyla, kalamar gibi omurgasızlarla ve karideslerle beslenirler. Nispeten büyük avlarını yutabilirler. Yumurtaları ve larvaları pelajiktir (Collette ve Nauen 1983).

Meksika Körfezi, Akdeniz ve Karadeniz de dâhil olmak üzere Atlantik Okyanusu'nun tropik ve ılıman kıyılarında dağılım gösterir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *Sarda sarda* (Bloch 1793) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

Dorsal dikenler (toplam): 20 – 23 ad.; Dorsal yumuşak ışınları (toplam): 15-18 ad.; Anal dikenleri yoktur; Anal yumuşak ışınları: 14 – 17 adettir; Omur sayısı minimum 50 – 55'tir. Ağız orta derecede büyüktür. Üst çene dişleri 16-26; alt çene

dişleri 12-24 adettir. Olfaktori laminaları 21-39'dur. Hava kesesi yoktur. Dalağı büyüktür ve karaciğeri uzun sağ ve sol lob, kısa orta lob şeklindedir. Diğer *Sarda* cinslerine göre daha büyük bir açı ile eğik sırt çizgileri vardır (Şekil 2.6).

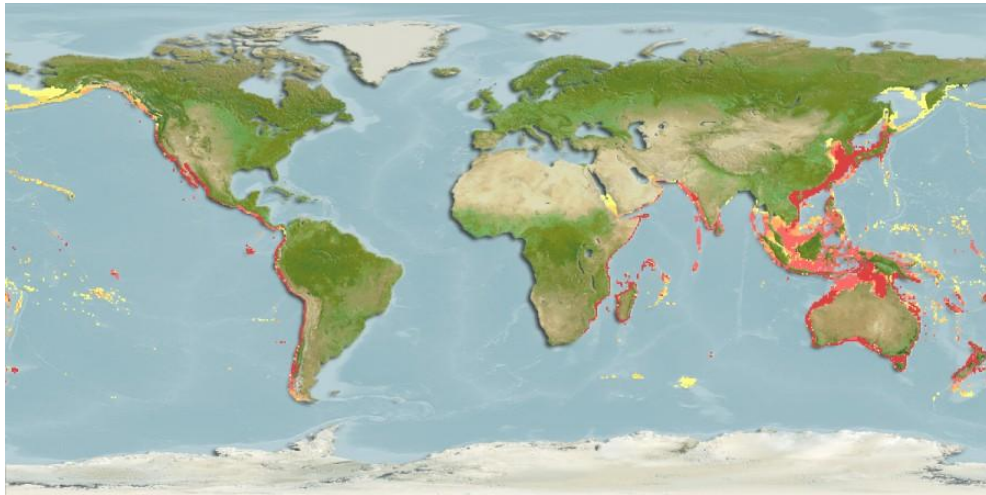


Şekil 2.6. *Sarda sarda* (Bloch 1793), Palamut (Orijinal)

2.1.2.4. *Scomber japonicus* (Houttuyn 1782), Kolyoz

Öncelikle kıyusal pelajik türlerdir. Daha az bir ölçüde epipelajik veya mezopelajik olarak 250-300 m derinliklerde yaşarlar. Mevsimsel göçler yaparlar. Sürü özelliği gelişmiştir, 3cm'den itibaren sürü oluştururlar. 15-20°C'de yumurta bırakırlar. Ortalama bir dişi 100 000-400 000 yumurtayı fasılalar halinde bırakır. Gram ağırlık başına 250-300 yumurta üretimi görülür (Collette ve Nauen 1983).

Yaygın bir türdür. Şekil 2.7'de görüldüğü gibi Atlantik'in sıcak ve ılıman geçiş sularında, Hint Okyanusunda ve komşu denizlerinde dağılım gösterir (Collette ve Nauen 1983).



Şekil 2.7. *Scomber japonicus* (Houttuyn 1782) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

Damak kemiği (ağız çatısında) dardır. Damak dişleri tek veya çift sıra halindedir, çift olduğunda, sıralar yakın ve birbirine karışır. İkinci dorsal yüzgeç birinciden daha küçüktür. İlk dorsal 9-10 ışıklıdır. Omur sayısı 31'dir (Anonim 2014). Sırtı eğik ve zikzaklı çizgilerle kaplıdır. Karın kısmında noktalanma vardır (Şekil 2.8). Alın kısmı saydam özelliktedir, göz *S. scombrus*'a göre daha büyüktür (Collette ve Nauen 1983).

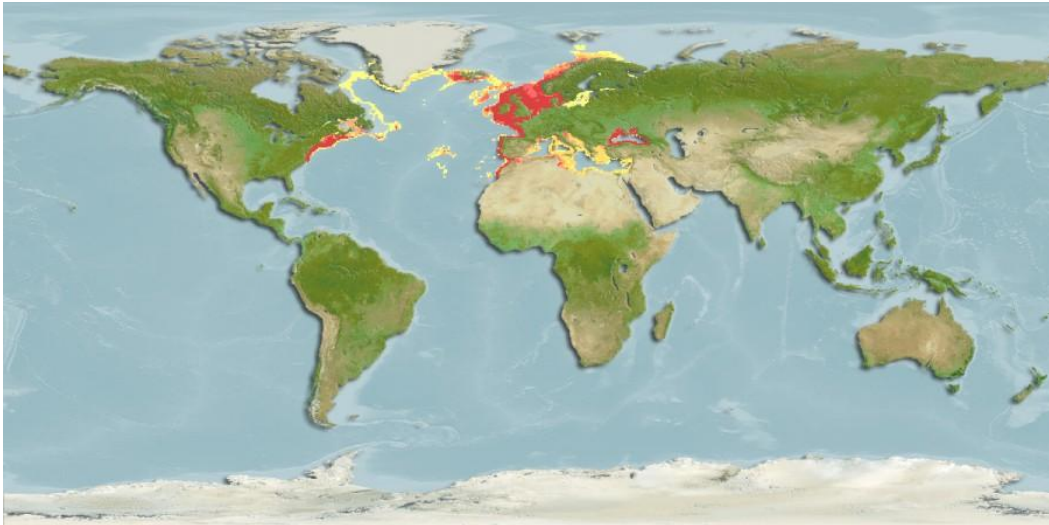


Şekil 2.8. *Scomber japonicus* (Houttuyn 1782), Kolyoz (Orijinal)

2.1.2.5. *Scomber scombrus* (Linnaeus 1758), Uskumru

Çoğunlukla yüzeyde büyük sürüler halinde soğuk ve ılıman sularda bulunur. Kış derinde geçirip baharda sığ sulara gelirler. Zooplankton ve ufak balıklarla beslenirler. Yumurta ve larvaları pelajiktir (Collette ve Nauen 1983).

Kuzey Atlantik'te görülür. Buna ek olarak Akdeniz ve Karadeniz'de de görülür (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. *Scomber scombrus* (Linnaeus 1758) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

İki dorsal yüzgeç birbirinden oldukça ayrıktır. İlki 8-13 dikene sahiptir. İkinci dorsal ve anal yüzgeç 12 ışıklıdır. Anal yüzgeç dikeni oldukça sert ve güçlüdür. Kuyruk kısmında 5 dorsal, 5 anal yalancı yüzgeç (finlet) bulunur. Göğüs yüzgeci kısadır ve 18-21 ışını vardır. Hava kesesi görülebilir. Sırtı çelik-mavi renktedir ve soluk dalgalı çizgilerle kaplıdır, alt taraf ve göbük işaretli gümüşi sarı renktedir (Şekil 2.10).

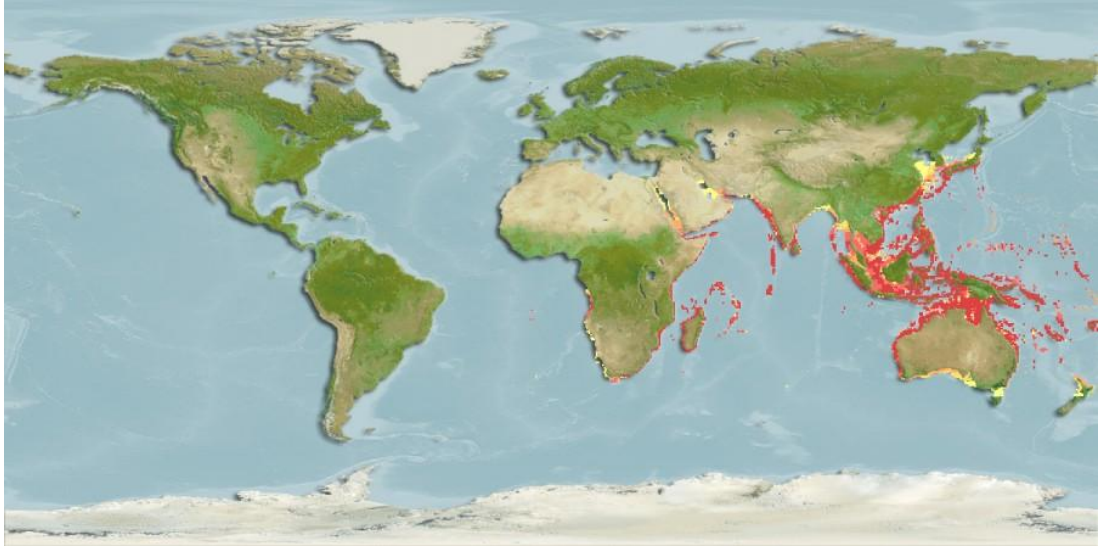


Şekil 2.10. *Scomber scombrus* (Linnaeus 1758), Uskumru (Orijinal)

2.1.2.6. *Scomberomorus commerson* (Lacepède 1800), Palamut Kolyozu

Kıtasal kıyıların sığ sularında sıklıkla düşük tuzluluk ve bulanık sularda bulunurlar. Küçük sürüler oluştururlar, hamsi gibi ufak balıklar ve kalamarlarla beslenirler. Yumurta ve larvaları pelajiktir (Anonim 2014).

Hint-Batı Pasifik'te Kızıl Deniz ve Güney Afrika'dan Güneydoğu Asya'ya, Avustralya'nın kuzeyi ile Çin'in güneyi arasında, Japonya ve Fiji bölgesinde dağılım gösterirler. Süveyş Kanalı yoluyla Doğu Akdeniz'e göçmen tür olarak girmiştir. Güneydoğu Atlantik'te St. Helena bölgesinde dağılım gösterir (Şekil 2.11) (Anonim 2014).



Şekil 2.11. *Scomberomorus commerson* (Lacepède 1800) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

İlk dorsal yüzgeçte 15-18 arasında genelde 16-17 adet diken bulunur. İkinci dorsalde 15-20 arasında, genelde 17-18 yumuşak ışın bulunur. İkinci dorsalle kuyruk arasında 8-10 adet yalancı yüzgeç (finlet) vardır. Anal yüzgeçte 16-21 arasında genelde 18-19 ışın bulunur. Alt kısımda 7-12 yalancı yüzgeç (finlet) vardır. Lateral çizgi ikinci dorsal yüzgecin bitiminden aşağı doğru eğilir. Omurga toplamda 42-46 omurdan oluşur. Balığın yan kısımları gümüş gri dikey dalgalı çizgilerle kaplıdır (Şekil 2.12). Yanaklar ve alt çene gümüşü beyazdır (Collette ve Nauen 1983).

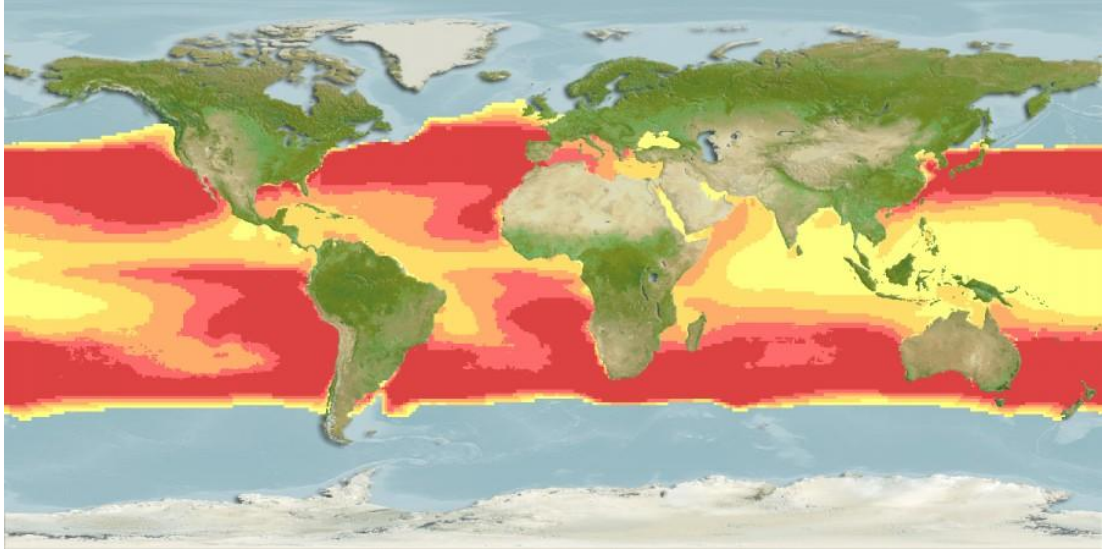


Şekil 2.12. *Scomberomorus commerson* (Lacepède 1800), Palamut Kolyozu (Orijinal)

2.1.2.7. *Thunnus alalunga* (Bonnaterre 1788), Uzun Kanat Orkinos

Epipelajik ve mezopelajik bir türdür. Genellikle 15,6-19,4°C derece aralığında, yüzey sularında görülür. Derin sularda yüzebilir. Kısa süreli olarak 9,5°C derece gibi düşük sıcaklıkları tolere edebilirler. Büyük yayılıma rağmen uzun mesafeli göç eden bir türdür. Akdeniz'e yumurtlama zamanı gelirler. 20kg ağırlığındaki bir dişi bir sezonda ortalama olarak 2-3 milyon yumurta bırakır (Collette ve Nauen 1983).

Yaygın bir türdür (Şekil 2.13). Akdeniz de dahil okyanusların tropikal ve ılıman sularında görülür. Yaklaşık olarak 45-50°K - 30-40°G koordinatları arasında dağılım gösterir (Anonim 2014).



Şekil 2.13. *Thunnus alalunga* (Bonnaterre 1788) coğrafik dağılımı (Anonim 2014)

Çok büyük boylara ulaşabilen bir türdür. İkinci dorsal yüzgeç ilkinde göre açıkça alçaktır. Pektoral yüzgeçler fark edilir derecede uzundur, 50cm ve üzeri bireylerde çatal boyun %30'u kadar uzunluğa sahiptir. Dorsal dikenler (toplam): 11 - 14; dorsal yumuşak ışınlar (toplam): 12-16; Anal yumuşak ışınları: 11 – 16 adettir, anal dikenleri yoktur. Hava kesesi görülür ancak çok ufaktır, 50cm altındaki bireylerde görülemez. Birinci dorsal yüzgeç koyu sarıdır, ikinci dorsal yüzgeç ve anal yüzgeç açık sarıdır (Şekil 2.14) (Collette ve Nauen 1983).



Şekil 2.14. *Thunnus alalunga* (Bonnaterre 1788), Uzun kanat orkinos (Orijinal)

2.1.3. DNA Barkodlaması

Bir canlının diğerlerinden ayrılabilmesi için ilk olarak fenotipik özelliklerine bakılarak bir birlerine yakınlıklarına karar verilebilir. Bu yöntem klasik sistematik ve taksonomi çalışmalarında oldukça geçerli bir yöntem olarak araştırmacılar tarafından uygulanmıştır.

Moleküler biyoloji ve genetik çalışmaların son zamanlarda oldukça gelişmesi ve büyük bir bilgi bankasının oluşmasıyla genotipik analizler bu analizlerin yerini almaya ya da alternatif yöntem olmaya başlamıştır.

Bu yöntemlerde canlılar moleküler düzeyde yakınlıkları incelenir. Materyal olarak genomik ve mitokondriyal DNA ve üzerindeki gen bölgelerinden biri veya bir kaç seçilerek çalışmaya başlanır. DNA dizilimleri belirlenip karşılaştırılarak filogenetik ve popülasyon genetiği üzerine birçok sonuca varılabilir. DNA dizi analizleri bir canlının atasal akrabalıklarını ve evrimsel sürecini anlamada büyük öneme sahip bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır.

Bir canlı her zaman morfolojik karakterlerine bakılarak ayırt edilemez. Bu gibi durumlarda teşhise yönelik olarak barkodlama DNA'nın kısa dizilerini kullanıp o türün tanımlanmasında benzersiz, basit ve hızlı bir yöntem olarak öne çıkar (Sass ve ark. 2007). Örneğin tür teşhisi yapılamayacak kadar küçük olan larva, juvenil balıklar, ısıtılmış işlem görmüş balık ürünleri, mide içeriği gibi örnekler bu yöntemle tanımlanabilmektedir (Paine ve ark. 2007).

DNA barkodlamasının işlem basamaklarını özetlersek ilk önce kısa bir DNA dizisinin eldesiyle başlanır. Genom üzerindeki spesifik bir gen bölgesinin farklılık oluşturabilecek kısa bir dizisine barkod denir. Elde edilen dizi barkod kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılır, uyuşma varsa tanımlama yapılır. Aksi takdirde, yeni kayıt belirli bir tür için yeni çıkmış bir barkod dizisi olarak görülebilir ya da yeni karşılaşılmış bir tür olarak önerilebilir (Hajibabaei ve ark. 2007).

Barkodlama tekniği kapsamlı taksonomi analizlerinin yerini alamaz. Örneğin barkod kütüphanesindeki kayıtlarda yer almayan bilinmeyen bir örnek yakın bir benzeşme göstermezse yeni bir türün belirlenmesinde yeterli olamamaktadır. Bu kütüphane artık geleneksel taksonomik iş akışı ile uyum içinde tasnif ve örneklerin tanımlanmasını hızlandırmak için kullanılır. Yeni tür belirleme ve tanımlama görevi sonuçta kapsamlı taksonomik çalışma ile elde edilmesine rağmen, DNA barkodlama bu süreci önemli ölçüde kolaylaştırır (Hajibabaei ve ark. 2007).

DNA barkodlama, yaşamın büyük topluluklarının türlerinin tanımlanması ve keşfinde yardımcı olmak için kısa, standartlaştırılmış gen bölgelerinde dizi çeşitliliğini kullanır. Genellikle bu bölge COI gen bölgesinin üzerinde 648 baz uzunluğunda bir dizidir. Elde edilen tüm barkodlar BOLD (The Barcode of Life Data System) adı verilen sisteme girilir. Bir araştırmacı elde ettiği sekans verisini tanımlama bölümünden türün ait olduğu kısma (hayvan, bitki veya fungal) göre ya da genel bölümde (BOLD üzerindeki tüm barkodlar) FASTA şeklinde girerek aramasını gerçekleştirebilmektedir. Sonuçlar % benzerlik şeklinde yüksekten aza doğru sıralanmaktadır. BOLD içinde toplam 2.240.132 adet dizi bulunmaktadır ve gün geçtikçe artmaktadır.

Sisteme veri girilirken örneğin bilgileri, görüntüleri, örneklendiği yer (GPS koordinatları) ve geniş taksonomisi girilir (Şekil 2.15). Böylece kaliteli bir bilgi akışı elde edilmiş olur. Sistemden bilgiler yine FASTA formatında ya da türün bilgilerini kimlik numarasını, taksonomisini içeren MS Excel formatında alınabilmektedir (Ratnasingham ve Hebert 2007).

BOLDSYSTEMS | Management & Analysis PRINT

Bats of Southeast Asia [BM]

Specimen Identifiers Edit Specimen

Sample ID :	ROM 101996	Museum ID :	101996
Isolate / Field Num:	F35806	Collection Code :	MAMM
Donated By:	Judith L. Eger	Deposited In :	Royal Ontario Museum

Taxonomy

Identifier :	Mark D. Engstrom
phylum :	Chordata
class :	Mammalia
order :	Chiroptera
family :	Pteropodidae
genus :	Macroglossus
species :	Macroglossus minimus

Specimen Details

Voucher Type :	Skin, Skull, Skeleton
Tissue Type :	Frozen Liver
Extra Info :	F35806 - E Kalimantan
Sex :	Male
Reproduction :	Sexual
Life Stage :	Adult

Collection Data

Collectors :	Mark D. Engstrom
Date Collected :	22-May-1993
Country :	Indonesia
State/Province :	Kalimantan Timur
Region/County :	East Kalimantan
Sector :	60
Exact Site :	
Latitude :	-0.3
Longitude :	117.0
Coord. Source :	
Elevation/Depth :	60

Photographs

Skull lateral (c)2005 Royal Ontario Museum

Skull ventral (c)2005 Royal Ontario Museum

Lower jaw (c)2005 Royal Ontario Museum

Skin ventral (c)2005 Royal Ontario Museum

Şekil 2.15. BOLD sistemine veri girişi. Örneğin bilgileri (1), Taksonomisi (2), Örneklendiği yer (3-4) ve örneğin görüntüleri (5) (Ratnasingham ve Hebert 2007)

2.2. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı

Bu çalışma ile ekonomik olarak hedef türlerden olan Scombridae türlerinin genetik barkodlarının ortaya çıkarılmasına, farklı bölgelerde yaşayan popülasyonların genetik yapılarının birbirleriyle karşılaştırılmasına, diğer denizlerden gelen yabancı türlerin orijinlerinin saptanmasına ve işlenmiş balık ürünlerinde tüketiciyi aldatmaya yönelik yapılan uygulamaların teşhisine olanak sağlayacaktır.

Scombridae türleri geniş bir dağılım gösterdiğinden, bu çalışmanın sonuçları aynı zamanda diğer ülkelerdeki araştırmacılara da kaynak oluşturacak ve ayrıntılı değerlendirmeler yapabileceklerdir.

2.3. Scombridae Türleri Üzerine Moleküler Çalışmalar

Wang ve ark. (2000), çalışmalarında korunmuş bölgeler olan tRNA^{PHE} ve 16S rRNA mitokondriyal gen bölgelerini kullanarak 12SR ve 12SL primerlerini dizayn etmiştir. Bu universal primerler PZR kullanımıyla içinde Scombrid'lerinde yer aldığı çok geniş oranda omurgalının 1300bç DNA parçasının amplifiye edilmesinde kullanılmıştır. Amplifiye edilen mitokondriyal bölgenin içinde yer alan 12S rRNA'nın tamamı filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan gen bölgesi olduğundan bu primerlerin kullanımının uygun olacağı belirtilmiş her bir tür için tanı özellikleri, coğrafik dağılımı ve habitat biyolojisi sırasıyla verilmiştir.

Paine ve ark. (2007), çalışmalarında Mitokondriyal COI genini Batı Atlantik Okyanusunda dağılım gösteren Scombridae familyasına ait 17 tür üzerinde moleküler markır olarak kullanmıştır. Sitokrom Oksidaz I geninin 950 bazlık kısmı her bir türün yaklaşık 20 bireyinde çalışılmış ve morfolojik olarak ayırt edilmesi zor olan türler tanımlanmıştır. Yürütülen bu çalışmada aynı gen bölgesinin 250 bazlık kısmı DNA kalitesi bozuk, kırılmış örneklerde ve tür tanımlama çalışmalarında kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca aynı genin yükseltgenen uzun ve kısa bölgelerinin kullanımıyla büyük farklı balık türlerinin midyesinden çıkarılmış sindirilmiş Scombrid türlerinin tanımlanmasında kullanılabilceği gösterilmiştir.

Paine ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmalarında Hawai adası Kona sahili açıklarından toplamış oldukları balık larvalarının mtDNA COI gen bölgesinin

sekans analizi sonucunda Scombrid türlerini spesifik olarak tanımlamışlardır. Fiziksel kondisyon ve morfolojik benzerlikleri Scombrid larvalarının tanımlanmasında kesin sonuçlar vermemesi ve çoğu zaman Genus düzeyinde tanımlamayla sonuçlanması araştırmacıları moleküler çalışmalara yönlendirmiş ve bu bağlamda balıkların yoğun yumurtlama alanı olan Kona sahili açıklarından 10-14 m derinliklerde akşam vakti yapılan trol çekimi ile yaklaşık 872 Scombrid larvası örneklenmiş ve bu örneklerin ancak %29'u morfolojik olarak ayırt edilebilirken, geri kalan %79'u COI markır'ı kullanılarak tanımlanmıştır.

Catanese ve ark. (2008), yaptıkları bu çalışmada *Auxis thazard* ve *Auxis rochei* türlerinin mtDNA tam dizisini elde etmişlerdir. *Auxis thazard*'ı iki mitotip olarak gözlemlemişlerdir. *A. thazard* Mitotip I, *A. thazard* Mitotip II ve *A. rochei* türlerinin tam baz dizilerinin uzunluklarını sırasıyla 16506, 16501 ve 16503 olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları filogenetik analizlerde iki *Auxis* türlerinin monofiletik kökeninin diğer ton balığı türleriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Botti ve Giuffra (2010), balık işleme tesislerinde yaygın olarak kullanılan Scombridae familyasına ait 17 türün işlenmiş üründen ayırt edilebilmesine yönelik çalışmalarında, hedef gen bölgesinin yükseltgenmesi amacıyla PZR için kokteyl primerler dizayn etmişlerdir. Primerler 5' bölgesinde sabit ve çalışılan herhangi bir türün yükseltgenmesini sağlayacak şekilde 3' bölgesinde değişken olarak oluşturulmuştur. Toplam 148 online sekansın toplanması ve incelenmesi sonrasında, Sitokrom b geninin 226 baz çiftlik (bç) kısmı hedef bölge olarak seçilmiştir. Sonuç olarak, açıklanan yöntemin kırılmış DNA'ya sahip örneklerde çalışılmaya uygun olduğu ve bu nedenle işlenmiş deniz ürünlerinde uygulanabilir olduğu belirlenmiştir. İlave olarak tanımlanan metodun, genom bilgileri sınırlı olan doğal ve kültür türlerinin ayrıştırılmasında önemli olduğu vurgulanmıştır.

Catanese ve ark. (2010), yürütmüş oldukları çalışmalarında, işlenmiş gıda ürünlerinde *Scomber* genus'una dahil uskumru türlerinin doğrulanması için yeni multiplex PZR yöntemi geliştirmişlerdir. Uygulanan metot mitokondriyal DNA kontrol bölgesinin *Scomber japonicus* (104 bç) ve *Scomber australasicus* türleri için yükseltgenmesini içermektedir. Ayrıca çalışma önceden tanımlanmış ve spesifik ürün veren *Scomber colias* için (159 bç) 5S ribosomal DNA, *Scomber*

scombrus (123 bç) için mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 ve pozitif kontrol olarak 12S rRNA (188 bç) geninin küçük bir bölgesinin amplifiye edilmesini de kapsamaktadır. Çalışma, 28 farklı işlenmiş konserve ürün ve 12 işlenmemiş taze balık filetosunu içeren toplam 40 farklı türe uygulanmış ve genel olarak, bu metodun, deniz ürünleri sektöründe *Scomber* genusuna dâhil uskumru türlerinin tanımlanmasında doğrudan uygulanabilecek potansiyel bir moleküler araç olabileceğini ortaya koymuştur.

Tseng ve ark. (2011), çalışmalarında morfolojik olarak birbirine benzeyen 3 mavi yüzgeçli Orkinoz balığının (*Thunnus orientalis*, *T. maccoyii*, ve *T. thynnus*) tür içi ve türler arası genetik farklılıklarını sitokrom b geninin sekans analiz yöntemiyle çalışmışlardır. *T. orientalis* ve *T. thynnus* türleri için tüm sitokrom b geni 1.141 baz olurken *T. maccoyii* türü için bu uzunluk 1.138~1.141 arasında değişim göstermiştir. Ortalama nükleotit çeşitliliği *T. thynnus*'da 0.0019 ± 0.0002 (n=8), *T. orientalis*'da 0.0063 ± 0.0005 (n=22), ve *T. maccoyii*'da 0.0059 ± 0.0007 (n=24) olarak tespit edilmiştir. Ortalama nükleotit farklılık ve nükleotit değişim miktarı ise üç tür için sırasıyla $18,748 \pm 2,879$ ve $0,017 \pm 0,003$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar, sitokrom b geninin sekans analiz yöntemiyle sorunlu türlerin ayrılmasında faydalı olduğunu tespit etmişlerdir.

Haider ve ark. (2012), çalışmalarında ekonomik, dini ve kamu sağlığı açısından et kaynağının doğrulanması için yürüttükleri çalışmalarında, yükseltgenmiş mitokondriyal COI geni farklı kesici enzimlerle (*Hind* II, *Ava* II, *Rsa* I, *Taq* I, *Hpa* II, *Tru* II ve *Xba* I) kesilerek farklı kaynaklardan et örneklerinin orijinal türleri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda yalnız *Hpa* II enzimi ile kesilen COI geninin gösterdiği farklılığın türleri ayırt etmek için yeterli olduğu görülmüştür. Moleküler seviyede et orijininin belirlenmesi için yapılan önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmada geliştirilen metodun çok ucuz ve hızlı olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmanın konusu kıyılarımızda yaşayan Scombrid türlerine ait mitokondriyal COI, Sitokrom b ve 12S rRNA gen bölgelerine ait sekanslar elde edilerek genetik barkodlarının oluşturulmasıdır. Çalışma kapsamında 10 tür ve her türden 5'er örnek ile çalışılması planlanmış olmasıyla birlikte, bazı türlerden bu sayıda örnek bulunamaması durumunda daha az sayıda örnek ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Geniş dağılım gösteren türlere ait bireyler farklı lokalitelerden toplanarak türler arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur.

3.1.1. Örneklem Çalışmaları

Bu çalışmada, ilgili bölümde açıklandığı üzere, 7 türe ait 39 birey analiz edilmiştir, analiz edilen bireylerden sağlıklı sonuç alınanlar çalışmada değerlendirilmeye alınmıştır. Büyük boydaki örnekler sahada tayin edilerek sadece DNA analizi için gerekli miktarda doku alınmıştır. Ancak muhafaza edilebilir boydaki türlere ait örneklerin tür tayinleri Ordu Üniversitesi Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.1. Çalışma Sahası

Çalışma sahası Türkiye karasularını kapsamaktadır. Akdeniz, Ege, Marmara denizleri başta olmak üzere Karadeniz'den de numuneler toplanmıştır.

3.1.1.2. Arazi çalışması

Belirlenen istasyonlardan balık örnekleme Ağustos-Ekim ayları arasında yapılmıştır. Örneklemde, balıkçıların ekipman ve işgücünden yararlanılarak tezgahtan balıklar satın alınmıştır. Balıkçıların ticari amaçlı yakaladıkları balıklardan her türü temsilen 5 adet örnek alınmıştır. Ancak bazı türlerden bu sayıda örnek bulunamadığından daha az sayıda örnekle çalışılmıştır. Tür tespiti yapıldıktan sonra genetik çalışmalarda kullanılmak üzere 2-3 cm²'lik kuyruk yüzgeci makas yardımı ile kesilmiştir. Alınan doku örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifuj tüplerde %98'lik etanol ilave edilerek laboratuvar çalışması yapılana kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Toplam DNA'nın Eldesi

DNA izolasyonu %98'lik etanol'de saklanan Scombrid örneklerinin kaudal yüzgeç dokularından yapılmıştır. Toplam DNA'nın ekstraksiyonunda kaliteli ve optimum DNA elde etmek için yaklaşık olarak 200 mm³ büyüklüğünde 100 mg doku örneği kullanılmıştır. Tartımdan önce kâğıt mendil üzerinde 1-2 dk bekletilerek etanolün uçması sağlanmıştır. Küçük parçalara bölünmüş doku örneği 1,5 ml'lik Eppendorf tüpe konulup, daha sonra Eppendorf tüpe 451 µl TEN (100mM Tris, 10mM EDTA, 250mMNaCl), 25 µl %20'lik SDS, 20 µl proteinaz K (10mg/ml) ve 4µl RNAaz A (100 mg/ml)'dan oluşan toplamda 500 µl lysis solüsyonu ilave edilmiştir. 55°C'de sarsaklı ısıtıcıda bir gece inkübe edilerek homojenizasyon işlemi yapılmıştır. Saatlik aralarla tüpler vortex cihazı ile karıştırılmıştır. Bu tüplere yaklaşık 500 µl (örnek hacmi kadar) fenol ilave edilip hafifçe karışması sağlanmıştır. El ile hafifçe çok sarsmadan alt üst edilerek tabakalar kaybolana kadar karıştırılmıştır. Tüpler 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip pipet yardımıyla üst tabaka dikkatli bir şekilde alınarak yeni tüpe aktarılmıştır. Bu aşamada alt katmana girilmemeye dikkat edilmiştir. Ardından yeni tüplere yaklaşık 500 µl (örnek hacmi kadar) Kloroform:izoamilalkol (24:1) ilave edilmiştir. Bu çözelti kazayla alınan fenölü uzaklaştırmak için yapılmıştır. Aynı zamanda proteinleri de ince bir tabaka halinde ayrıştırıcı etki göstermektedir. Elle hafifçe karıştırıldıktan sonra 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek tabakalaşma sağlanmıştır. Üst kısım, aradaki beyaz zar şeklindeki tabaka alınmadan başka bir tüpe aktarılmıştır. Örnek hacminin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (NaOAc) pH:5.2 eklenmiştir. Hacmin 2 katı kadar yaklaşık olarak 700 µl -20°C derece %95'lik alkol ilave edilip elle hafifçe alt üst edilmiştir. Bu aşamada Şekil 3.1'deki gibi DNA'nın görülmesi beklenir.



Şekil 3.1. DNA'nın gözle görülmesi

Bazı örneklerde anında görülürken bazı örneklerde -80°C’de 10 dk bekletilmek suretiyle görülmüştür. Bu tüpler +4°C derecede 12000 rpm’de 15dk santrifüj edilerek DNA’nın pellet hale gelmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında dikkatli şekilde alkol boşaltılıp tüplerin kuruması için kapakları açık şekilde beklenmiştir.

DNA’nın bulunduğu tüpün kuruluşundan emin olunduktan sonra son olarak 300 µl TE (pH 8,0) tampon çözeltisi ilave edilip bir saat 37°C’de bekletilip DNA’nın çözülmesi sağlanmıştır. Örnekler çalışma boyunca -20°C derecede saklanmıştır.

3.2.2. COI, Sitokrom b ve 12S rRNA gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması

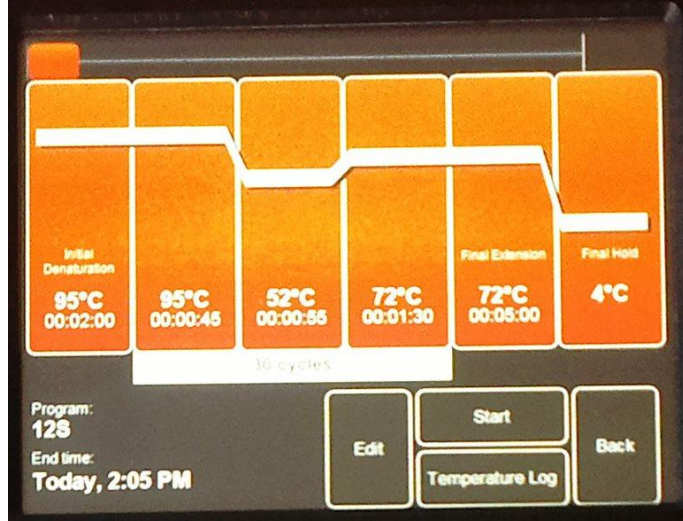
Çalışılan gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması ve dizi analizlerinde kullanılan primerler Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları

mtDNA Gen	Primerler	Kaynak
COI	LCOI 121:5'-CTAAGCCAACCAGGTGCCCTTCT-3' HCOI1199:5'-AATAGTGGGAATCAGTGTACGA-3'	Paine ve ark. 2007
Sitokrom b	F: 5'-ACCAGGACTAATGGCTTG-3' R: 5'-AGGATTTTAAACCTCCGACGTC-3'	Tseng ve ark. 2011
12S rRNA	F: 5'-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3' R: 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'	Kocher ve ark. 1989

DNA içeren çözeltilerin PZR optimizasyonu yapılmış dereceli (gradientli) PZR yardımıyla primerlerin bağlanma sıcaklığı denemeleri yapılmıştır. Toplam 10 µl hacimde hazırlanan PZR reaksiyonunda 12S rRNA, Cyt b ve COI gen bölgeleri için 5 µl 2x Master Mix, 1 µl forward primer (10pmol/µl), 1 µl reverse primer (10pmol/µl), 1 µl NFW (Nuclease Free Water) ve 2 µl DNA örneği kullanılmıştır.

12S rRNA, Cyt b ve COI gen bölgeleri için uygulanan PZR programları Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. 12S, COI ve Cyt b gen bölgesi PZR şartları

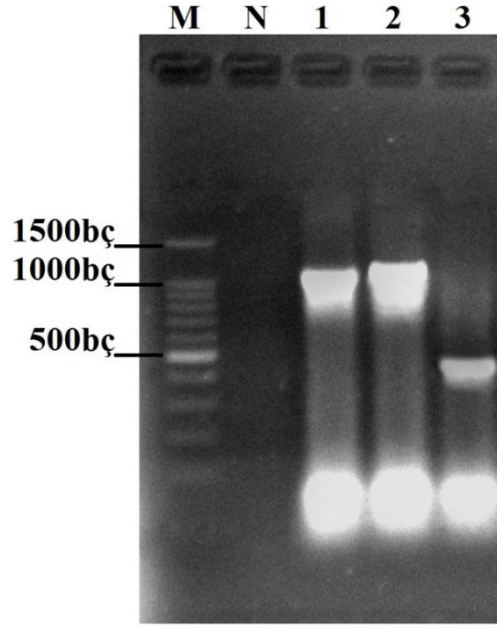
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile çoğaltılan Gen Bölgelerinin Gözlenmesi

Gen bölgelerinin çoğaltılıp oğaltılmadığı Agaroz Jel Elektroforeziyle kontrol edilmiştir.

Agaroz jel hazırlanmasında 1x TBE zeltisi, agaroz ve ethidium bromit (10 mg/ml) kullanılmıştır. DNA parçaları büyüklüklerine göre jel içinde farklı hızla hareket ettiklerinden yürütülecek materyale göre jel konsantrasyonu ayarlanmıştır. PZR rnlerinin istenilen görüntüyü vermesi için jel konsantrasyonu %1.2 olarak belirlenmiştir.

Kullandığımız elektroforezin i hacmi 650 ml'dir. Bu nedenle 10x TBE zeltisinden 65 ml alınıp 650'ye saf suyla tamamlanmış 1x TBE zeltisi elde edilmiştir. 100 ml hacmindeki jel için hassas terazide 0.8 g agaroz tartılıp 100 ml 1x TBE'de zndrlmştr. Mikrodalga ısıtıcıda kademeli olarak ısıtılarak agarozun tamamen zndğ gözlenene kadar kaynatılmıştır. znen jel sıcakken hacmin %0,005'i kadar 5 l ethidium bromit (10 mg/ml) ilave edilmiştir. Jel soğumadan elektroforezin havuzuna dökülmüştür. Uygun taraklar yerleştirilmiş ve jel donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra geriye kalan 1x TBE zeltisinden bir miktar ilave edilip taraklar çıkarılmış ve elektrik akımı yönünde elektroforeze yerleştirilmiş, arda kalan tüm 1x TBE zeltisi elektroforezin maksimum çizgisine kadar dökülerek jel yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

Ardından PZR ürünlerinden 3 l, NFW'den 2 l ve 6x Loading Dye'dan 1 l olarak parafin üzerinde karıştırılmış ve agaroz jelin kuyucuklarına 6 l yükleme yapılmıştır. Tüm yüklemeler bittikten sonra 100V'luk gerilimde 45dk yürütme yapılmıştır. Sonuçlar UV grntleyiciyle bilgisayardan gözlemlenmiş, fotoğraf kaydı alınmıştır (şekil 3.3).



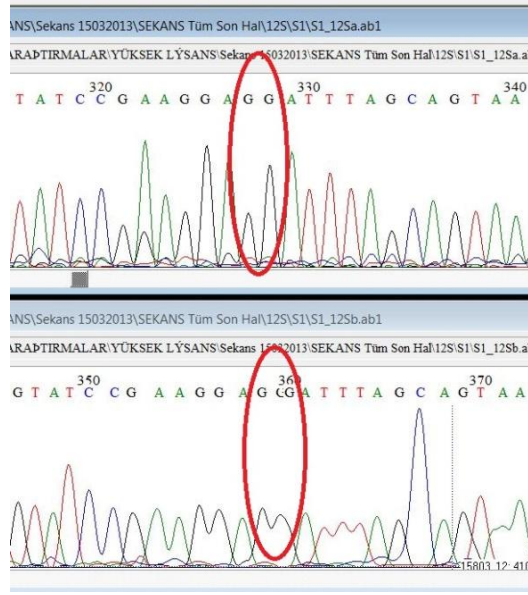
Şekil 3.3. M: 100bç ladder
N: Negatif (Sadece Distile Su)
1: COI mtDNA (1079bç)
2: Cyt b (1141bç)
3: 12S rRNA

3.2.4. PZR Ürünlerinin Dizi Reaksiyonu, Dizilerin Elde Edilmesi ve Hizalanması

PZR ürünleri ve primerler dizi analizi yapılması için düzgünce paketlenerek Güney Kore'deki Macrogen firmasına gönderilmiştir. Ürünün saflaştırılması ve okunması burada yapılmıştır. BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, dizi ürünleri ABI 3730XL kapillar otomatik sekans aletinde yürütülmüş ve elde edilen ham veriler mail yoluyla bize ulaştırılmıştır.

BioEdit (Hall 1999) programı kullanılarak her 3 gen bölgesi için elde edilen ham diziler her bir birey için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her bir birey için Forward ve Reverse okuma grafikleri karşılıklı açılmış (Şekil 3.4) ve en doğru okumalar karşılaştırmalı olarak doğrulanmıştır.

Doğrulama sonucunda her bir birey için consensus verisi elde edilmiş ve çalışmalar bu consensus dizilimi üzerinden yürütülmeye devam edilmiştir.



Şekil 3.4. Forward ve reverse sonuçların doğrulanması

3.2.5. Genetik Verilerin Analizi

Her gen bölgesi kendi içinde ayrı ayrı hizalanmıştır. Bireylere ait dizi dosyaları BioEdit (Hall 1999) programıyla açılmış; 12S rRNA, COI ve Cyt b gen bölgeleri için alınan GenBank verileri eklenmiş ve hizalama işlemi BioEdit (Hall 1999) içindeki ClustalW (Thompson ve ark. 1994) modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 12S gen bölgesi için 439bç, COI gen bölgesi için 1079bç ve Cyt b gen bölgesi için 1141bç uzunluğunda diziler elde edilmiştir.

MtDNA gen bölgelerine ait sekansların ilk mukayesesi BioEdit (Hall 1999) programı yardımıyla daha önceden GenBank veritabanına girilen ilgili sekanslara karşılık yapılmıştır. Baz dizilerinin gerekli formatlara dönüştürülmesi için Clustal X (Thompson ve ark. 1997) ve Clustal W (Thompson ve ark. 1994) programları ve ağaç dosyalarını görüntülemek için TreeView programları kullanılmıştır. Elde edilen 12S rRNA, COI ve Sitokrom b genine ait DNA baz dizileri önce Nexus (Madison ve ark. 1997) formatına dönüştürülmüş, Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) TCS (The Method of Templeton, Crandall and Sing) (Clement ve ark. 2000) programı kullanılarak haplotipler belirlenmiş ve Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programı ile tür içi varyasyonu gösteren bir ağ oluşturulmuştur. Nükleotit içeriği ile ilgili istatistikler DnaSP 3.15 (Rozas ve Rozas

1999) programı kullanılarak belirlenmiştir. Haplotip sayısı, haplotip değişim ve nükleotit değişim değerleri, ve moleküler haplotipler arasındaki mutasyon miktarı ARLEQUIN (Schneider ve ark. 2000) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

12S, COI ve Cyt b gen bölgeleri için hizalanmış dosyalar BioEdit programıyla FASTA olarak kaydedilmiş, DNASP programıyla açılıp NEXUS formatında tekrar kaydedilmiştir. DNASP programıyla haplotipler ve haplotip frekansları belirlenmiş ve kaydedilmiştir. Yine aynı program ile nükleotit çeşitliliği belirlenmiştir. jModeltest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programında kullanılmak üzere veri setleri PHYLIP formatında kaydedilmiştir.

Jmodeltest programında FASTA formatındaki veriler girilerek Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) analizi için 3 gen bölgesi için ayrı ayrı Modeltest uygulanmış, AIC (Akaike 1974) ve BIC sonuçlarına göre en uygun model belirlenmiştir. Belirlenen model PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) programında PHYLIP formatında açılan belge kullanılarak AIC (Akaike 1974) ML ağacı çıkartılmıştır. Aynı veri TCS programında da kullanılmıştır.

DNA dizilerinin analizinde, özellikle filogenetik ağaçların oluşturulmasında ve evrimsel parametrelerin tahmininde baz değişim modelleri sıkça kullanılmaktadır. Doğru modelin seçimi, jModeltest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programıyla sağlanır. Modeltest, PAUP (Swofford 1998) programı tarafından oluşturulan skor değerlerini kullanan bir çalışma prensibine sahiptir (Posada ve ark. 2003). Böylece en uygun baz değişim modeli bulunmuştur. AIC (Akaike 1974)'e göre 12S rRNA gen bölgesi için TIM2ef+G modeli, COI gen bölgesi ve Cyt b gen bölgesi için TIM2+G modeli belirlenmiştir.

Elde edilen baz dizileri, PAUP 4.0b10 (Swofford 1998) paket programı kullanılarak maksimum parsimoni ve maksimum olasılık analizleri yapılmış ve genetik uzaklık matrisleri hesaplanmıştır. Maksimum parsimoni analizi ile buluşsal metoda göre 10000 rastgele ilave tekrarlar oluşturup ve seç bağla testi (Bootstrapping) 1000 tekrar yapılmıştır. Bu analiz için, GenBank veritabanındaki en yakın ilgili sitokrom c oksidaz I geni sekansına sahip cins dış grup olarak kullanılmıştır. Belirlenen haplotipler, Sequin (Sequin Application Version 7.35) programı yardımıyla GenBank veritabanına girilecektir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA Dizin Analizi

Bu çalışmada 5 İl'den temin edilen Scombridae familyasına ait toplam 7 türden COI geninin 1079 bç'lik kısmı, 12S rRNA geninin 439 bazlık kısmı ve Sitokrom b geninin 1141 bazlık tüm sekansı için DNA dizin analizi yapılmıştır. Çalışılan gen bölgeleri için 7 Scombrid türünden dizin analizi yapılan birey sayısı ve lokaliteleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Scombridae familyasına ait 7 türden COI, 12s rRNA ve Sitokrom b genleri için dizin analizi yapılan birey sayısı ve lokaliteleri

Scombridae Türleri	Lokaliteler	COI	12s rRNA	Sitokrom b
<i>Auxis rochei</i>	İzmir	1	3	1
<i>Euthynnus alletteratus</i>	İzmir	1	1	-
<i>Sarda sarda</i>	Ordu	9	10	6
<i>Scomber japonicus</i>	İzmir	-	4	-
<i>Scomber scombrus</i>	İzmir	2	5	-
<i>Scomberomorus commerson</i>	Antalya	-	2	-
<i>Thunnus alalunga</i>	Antalya	1	1	1
TOPLAM		14	26	8

4.1.1. mtDNA COI Gen Bölgesi

mtDNA COI gen bölgesi üzerine gerçekleştirilen analizler iki alt başlık altında toplanarak verilmiştir.

4.1.1.1. COI Geni ve Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri

Scombridae familyasına ait 5 tür arasında mitokondriyal DNA COI geni 1079 bç için türleri kesin olarak ayırabileceğimiz kısmi bir dizin belirlenmiş ve haplotip analizi bu bölge üzerinden gerçekleştirilmiştir. Mukayese edilen COI geni tüm dizini (1079 bç)'nin 820 (%76) pozisyonunun korunmuş ve %50,2'si (130bç) parsimonik bilgi verici olan 259 (%24) nükleotit pozisyonunda değişken olduğu belirlenmiştir. mtDNA COI genini (1079 bç) toplam 14 bireyden yükseltgenmiştir (Çizelge 4.1). Çalışılan tüm örneklerde 652-731 bazları arasında 80 bç uzunluğunda korunmuş bölge tespit edilmiştir

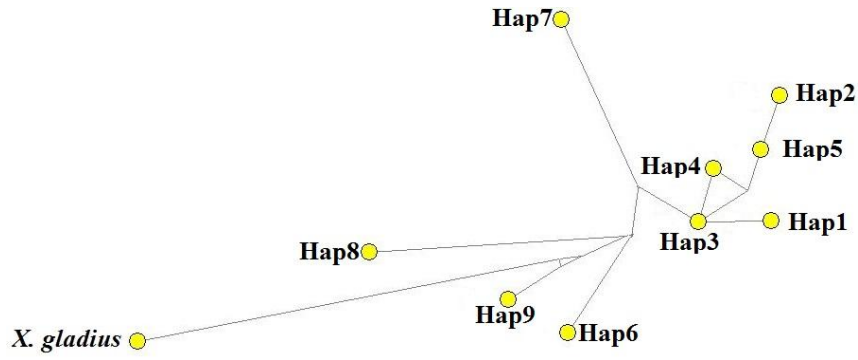
COI geninin dizin analizi, dört farklı lokaliteden (Ordu, İstanbul, İzmir, Antalya) toplamda 9 farklı haplotip ortaya çıkartmıştır. Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programına girilen verilerle bir network oluşturulmuştur. Haplotipler arası ilişkileri gösteren bir sonuç vermiştir (Şekil 4.1). Bu şekilde, 9 *Sarda sarda* bireyinin analizi ile 5 farklı haplotip bulunmuştur. Bunlardan sadece haplotip Hap3, çalışılan tüm lokalitelerde yüksek frekansta (4 bireyde) temsil edildiği görülmüştür. Hap4, farklı lokaliteler de 2 birey ile temsil edilirken geri kalan 3 haplotipin tek bir lokalitede bulunduğu tespit edilmiştir. Hap3 ve Hap4'ün sırasıyla sadece bir ve iki baz değişimi ile Hap1'den' ayrıldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, *S. scombrus* türüne ait Hap8 2 birey tarafından paylaşılırken geri kalan diğer türlere ait haplotipler tek bir lokalitede temsil edilmişlerdir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. mtDNA COI gen bölgesi haplotip bilgileri

Haplotipler	Türler	Örnek sayıları
Hap1	<i>S. sarda</i>	1
Hap2	<i>S. sarda</i>	1
Hap3	<i>S. sarda</i>	4
Hap4	<i>S. sarda</i>	2
Hap5	<i>S. sarda</i>	1
Hap6	<i>A. rochei</i>	1
Hap7	<i>E. alletteratus</i>	1
Hap8	<i>S. scombrus</i>	2
Hap9	<i>T. alalunga</i>	1

COI geni dizini ile elde edilen haplotipler *Sarda sarda* Hap 1 dizini referans olarak alınarak karşılaştırıldığında bu segmentle aynı polimorfizmi gösteren haplotiplerde 185'i transversiyonal 353'ü transisyonal baz değişimi ile farklılaşan toplam 259 değişken nükleotit pozisyonu tanımlanmıştır (Çizelge 4.3). Tür içinde ise, *Sarda sarda* örneklerinde 22 transisyonal değişim meydana gelirken 4 transversiyon görülmüştür. Yalnız 726'ncı nükleotit pozisyonunda hem transiyon hem de transversiyon meydana gelmiştir. *Auxis rochei*'de 70 transisyonal ve 37 transversiyonal, *Euthynnus alletteratus*'da 81 transisyonal ve 42 transversiyonal değişim, *Scomber scombrus*'da 105 transisyonal ve 65 transversiyonal değişim ve

Thunnus alalunga'da 75 transisyonal ve 37 transversiyonal değişim tespit edilmiştir. Sonuç olarak, COI geni için transisyonlar transversiyonlardan daha yaygın olmakla birlikte transisyon/transversiyon oranı 1.9081 olarak gerçekteşmiştir.



Şekil 4.1. Scombridae türlerinin COI geni için Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programı ile oluşturulan haplotip ağı. (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4, Hap5 *S. sarda*, Hap6 *A. rochei*, Hap7 *E. alletteratus*, Hap8 *S. scombrus*, Hap9 *T. alalunga* ve dış grup olarak *X. gladius*)

Kodon eğilimi, 32 sinonim olmayan baz değişiminin 15'i birinci kodon, 6'sı ikinci kodon ve 11'i üçüncü kodon pozisyonunda olduğu tespit edilmiştir. Toplam baz değişiminin 17'si transisyon ve 15'nin transversiyon olarak gerçekleşmiş olup birinci kodon pozisyonunda 9 transisyon 6 transversiyon, ikinci kodon pozisyonunda 5 transversiyon 1 transisyon ve üçüncü kodon pozisyonunda 10 transisyon 1 transversiyon şeklindedir. En fazla baz değişimi 3'üncü kodon pozisyonunda (Amino asit pozisyonları 25, 31, 52, 57, 60, 213, 270) izolösinin metionin amino asidine (75, 93, 156, 171, 180, 639, 810 G/A transisyonu) mutasyon ile gerçekleşmiştir.

Bunun yanında, COI dizin analizi farklı lokalitelerden örneklenen bu türler arasında belirli farklar olduğunu göstermiştir. Scombridae türlerini COI geni ile kesin bir şekilde ayırma yeteneğinde 112 adet nükleotit farklılığı bulunmuştur. *Sarda sarda* türü 141, 186, 537, 687, 720, 937 ve 993'nci nükleotit pozisyonunda timin nükleotidine sahipken diğer türler sitozin nükleotidine sahip olmuşlardır. *Sarda sarda* 4 pozisyonda sitozin nükleotidine sahipken diğer türler 222, 234 ve 399'da timin nükleotidine, 1051'de guanin nükleotidine sahiptir. *Sarda sarda* türünün 639 ve 708. nükleotit pozisyonlarında adenin nükleotiti bulunurken diğer türlerde sırasıyla sitozin ve guanin nükleotiti bulunmaktadır.

A. rochei türü 217, 369, 909, 1008 ve 1017. nükleotit pozisyonunda timin nükleotidine sahipken diğer türler sitozin nükleotidine; 366, 411 ve 843. nükleotit pozisyonlarında sitozin nükleotidine sahipken diğer türler timin nükleotidine sahiptir.

A. rochei 3 pozisyonda adenin nükleotitine sahipken diğer türler 216 ve 921'de sitozine; 852. nükleotit pozisyonunda ise timine sahiptir. *A. rochei* iki pozisyonda guanin nükleotitine sahipken diğer türler 345'te timine; 1005'te sitozin nükleotitine sahiptir.

E. alletteratus türü 285, 645 ve 690. nükleotit pozisyonunda timin nükleotitine sahipken diğer türler sitozin nükleotitine sahiptir. Pozisyon 378, 396, 414, 849, 867 ve 933'de *E. alletteratus* guanin nükleotitine sahipken diğer türler adenin nükleotitine sahiptir. *E. alletteratus* türünün 390, 523, 813 ve 936. nükleotit pozisyonlarında sitozin bulunurken diğer türlerde timin bulunmaktadır.

S. scombrus türü toplam 61 nükleotit pozisyonun 26'sında sitozin nükleotitine sahipken diğer türler sırasıyla 14 pozisyonda timin (24, 45, 78, 99, 205, 255, 321, 492, 546, 621, 681, 822, 831, 1026), 4 pozisyonda guanin (230, 732, 874, 1048), 8 pozisyonda adenin (435, 531, 741, 840, 885, 904, 954, 963) nükleotitine sahiptir. *S. scombrus* 16 pozisyonda timin nükleotitine sahipken diğer türler sırasıyla 8 pozisyonda sitozin (42, 51, 489, 534, 540, 735, 892, 903), 6 pozisyonda adenin (72, 85, 525, 765, 942, 1062), 2 pozisyonda ise guanin (16 ve 220) nükleotitine sahiptir. *S. scombrus*'un toplam 11 pozisyonunda guanin nükleotiti bulunurken diğer türlerde sırasıyla 7 pozisyonda adenin (37, 97, 159, 855, 882, 886, 1074), 2 pozisyonda sitozin (56, 404), 2 pozisyonda timin (15, 54) bulunmaktadır. Ayrıca 8 pozisyonda adenin nükleotitine sahipken diğer türler 36, 70, 75 ve 180. nükleotit pozisyonlarında guanine; 210, 276 ve 891. nükleotit pozisyonlarında timine ve 872. nükleotit pozisyonunda sitozine sahiptir.

T. alalunga türünün 5 nükleotit pozisyonunda adenin (111, 297, 327, 666, 981) bulunurken diğer türlerde pozisyon 111'de guanin; pozisyon 297, 327, 666 ve 981'de sitozin nükleotiti bulunmaktadır. Pozisyon 129, 495 ve 906'da timin nükleotiti bulunurken diğer türlerde sitozin bulunmaktadır. *T. alalunga*'nın 342, 762 ve 879. nükleotit pozisyonunda guanin bulunurken diğer türlerde sırasıyla 342'de timin; 762 ve 879. nükleotit pozisyonunda adenin bulunmaktadır (Çizelge 4.3).

COI haplotiplerine dayalı olarak tahmin edilen haplotip çeşitliliği Hd:0.912 ve nükleotit çeşitliliği Pi: 0.07854 olarak bulunmuştur. Türler arası nükleotit çeşitliliği ve nükleotit farklılıkları (Çizelge 4.4) DNASP programı ile hesaplanmıştır.

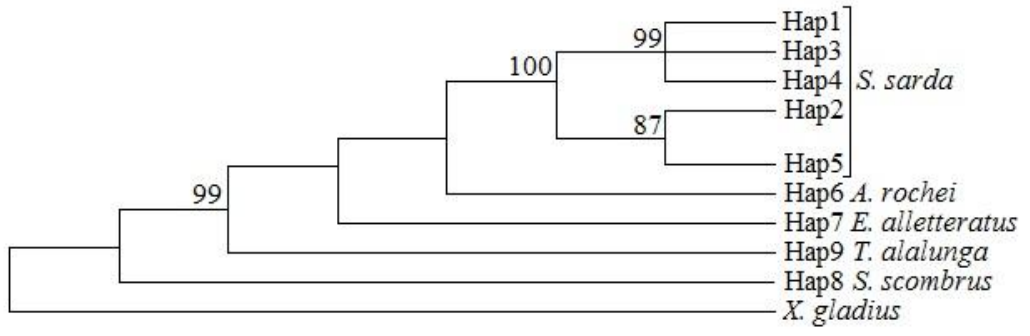
Çizelge 4.4. mtDNA COI gen bölgesi türler arası ortalama nükleotit çeşitliliği ve net nükleotit çeşitliliği (Alt diagonal d_{XY} , Üst diagonal d_A)

	<i>S. sarda</i>	<i>A. rochei</i>	<i>E. alletteratus</i>	<i>S. japonicus</i>	<i>T. alalunga</i>	<i>X. gladius</i>
<i>S. sarda</i>	0	0.09626	0.10851	0.15310	0.09914	0.17369
<i>A. rochei</i>	0.10020	0	0.10195	0.15199	0.09268	0.16867
<i>E. alletteratus</i>	0.11245	0.10195	0	0.15755	0.09824	0.17794
<i>S. scombrus</i>	0.15704	0.15199	0.15755	0	0.14180	0.17980
<i>T. alalunga</i>	0.10308	0.09268	0.09824	0.14180	0	0.16219
<i>X. gladius</i>	0.17369	0.16867	0.17794	0.17980	0.16219	0

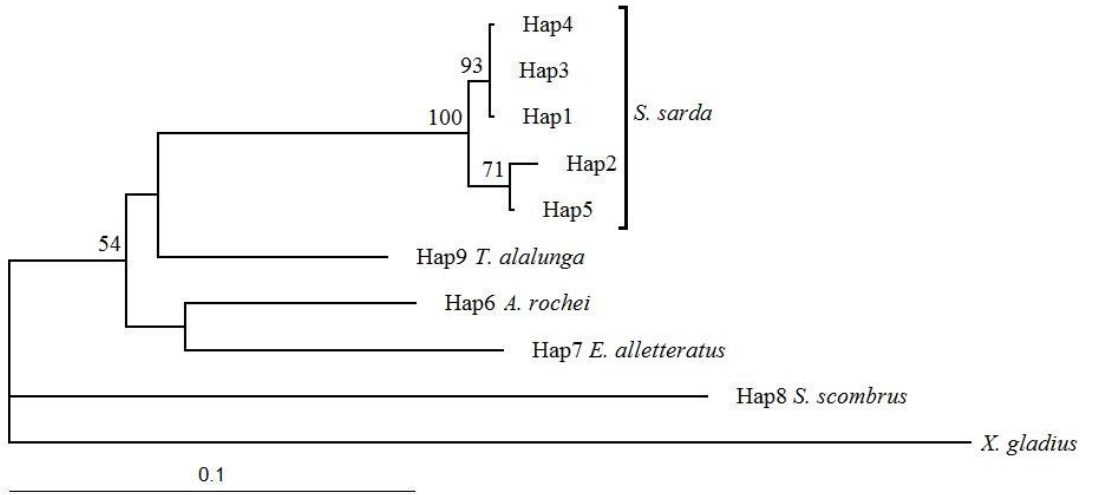
4.1.1.2. COI Geni Filogenetik Özellikleri

COI geni için 9 haplotipin DNA dizileri jModeltest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programında analiz edildiğinde hiyerarşik olasılık oran testlerine göre en uygun baz değişim modelinin AIC (Akaike 1974)'e göre TIM2+G olduğu ($-\ln L = 3202.6787$, $K=23$) ve baz frekanslarının ise $A=0.2382$, $C=0.2867$, $G=0.1874$, ve $T=0.2878$ olduğu bulunmuştur. Ayrıca analiz sonucunda oluşan 'scores' dosyası filogenetik analizler için PAUP (Swofford 1998) programı tarafından kullanılmıştır.

Parsimoni analizinde "Heuristic Search" algoritması kullanılmıştır (Şekil 4.2). Bootstrap değeri 1000 olarak alınmıştır. ML analizinde ise jModeltest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programı kullanılarak en uygun model belirlenmiş ve PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) programında bu model ve baz oranları kullanılarak ML ağacı çıkarılmıştır (Şekil 4.3). Türler arası genetik uzaklık ilişkisi Kimura 2-paremetre modeline (Kimura 1980) göre MEGA 6 (Tamura ve ark. 2013) programında hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). En düşük genetik uzaklık 0.001 ile Hap3 (*S. sarda*) Hap1 (*S. sarda*) ve Hap4 (*S. sarda*) arasında bulunurken en yüksek genetik uzaklık 0.182 ile Hap5 (*S. sarda*) ve Hap8 (*S. scombrus*) arasında olduğu tespit edilmiştir. Tüm türler için ortalama genetik uzaklık 0.099 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. COI gen bölgesi PAUP (Swofford 1998) parsimoni ağacı



Şekil 4.3. COI gen bölgesi için PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) programı üzerinde Maximum Likelihood ağacı

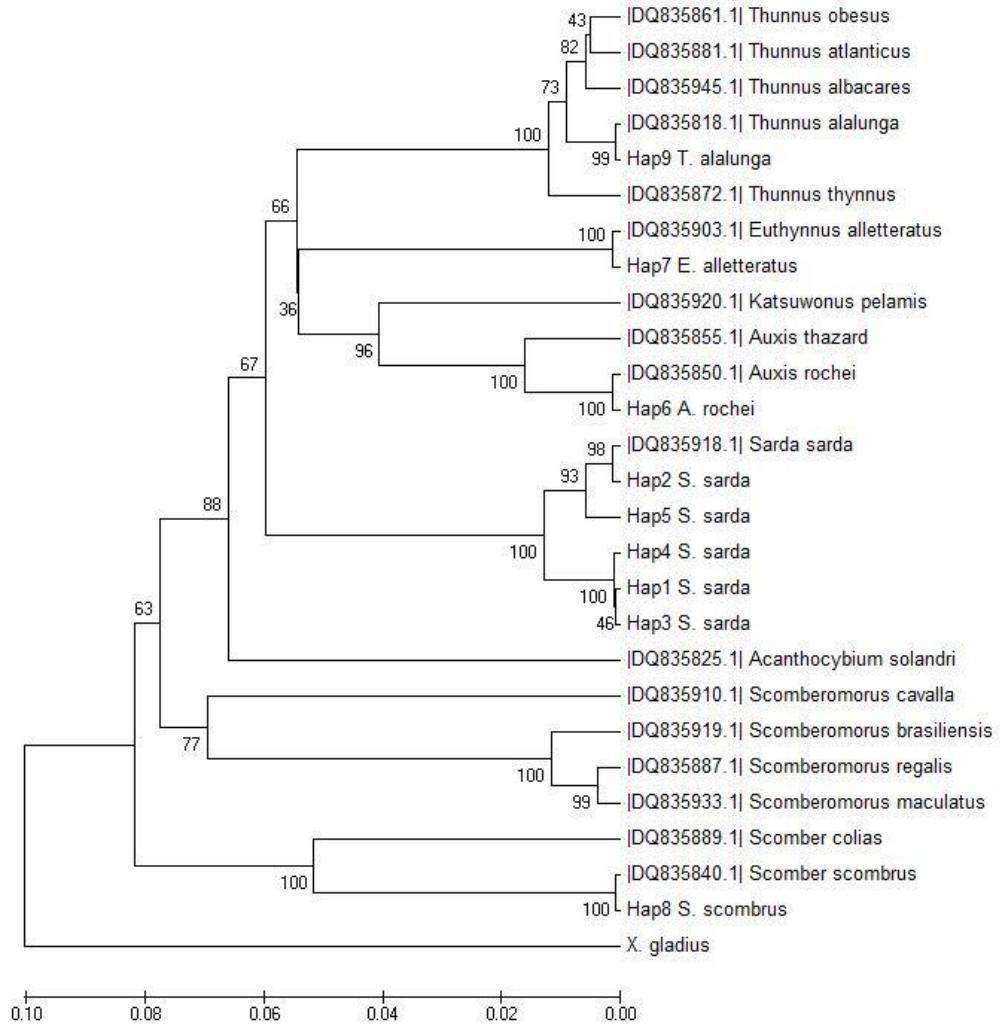
Çizelge 4.5. COI gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4, Hap5 *S. sarda*, Hap6 *A. rochei*, Hap7 *E. alletteratus*, Hap8 *S. scombrus*, Hap9 *T. alalunga* ve dış grup olarak *X. gladius*) (Kimura 1980)

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	<i>X. gladius</i>
Hap1	0									
Hap2	0.023	0								
Hap3	0.001	0.022	0							
Hap4	0.002	0.022	0.001	0						
Hap5	0.017	0.007	0.016	0.016	0					
Hap6	0.107	0.114	0.106	0.107	0.116	0				
Hap7	0.125	0.118	0.124	0.125	0.119	0.112	0			
Hap8	0.179	0.175	0.178	0.179	0.182	0.172	0.179	0		
Hap9	0.113	0.109	0.112	0.113	0.113	0.100	0.106	0.158	0	
<i>X. gladius</i>	0.208	0.209	0.207	0.207	0.213	0.195	0.208	0.208	0.185	0

Gen bankasından alınan örneklerin sekans verileri ile birlikte Türkiye kıyılarından örneklenen türlere ait veriler birlikte değerlendirilmiş, diğer Scombrid türleri ve Türkiye denizlerinde daha önce çalışılmış olan örneklere göre mevcut durum ortaya konulmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.4).

Çizelge 4.6. COI gen bölgesi için GenBank'tan (NCBI) alınan veriler

Tür	Accession No
<i>Thunnus alalunga</i>	DQ835818.1
<i>Acanthocybium solandri</i>	DQ835825.1
<i>Scomber scombrus</i>	DQ835840.1
<i>Auxis rochei</i>	DQ835850.1
<i>Auxis thazard</i>	DQ835855.1
<i>Thunnus obesus</i>	DQ835861.1
<i>Thunnus thynnus</i>	DQ835872.1
<i>Thunnus atlanticus</i>	DQ835881.1
<i>Scomberomorus regalis</i>	DQ835887.1
<i>Scomber colias</i>	DQ835889.1
<i>Euthynnus alletteratus</i>	DQ835903.1
<i>Scomberomorus cavalla</i>	DQ835910.1
<i>Sarda sarda</i>	DQ835918.1
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	DQ835919.1
<i>Katsuwonus pelamis</i>	DQ835920.1
<i>Scomberomorus maculatus</i>	DQ835933.1
<i>Thunnus albacares</i>	DQ835945.1
<i>Xiphias gladius</i>	AP006036



Şekil 4.4. COI gen bölgesi için UPGMA ağacı (Paine ve ark. 2007'den modifiye edilmiştir.)

4.1.2. mtDNA 12s rRNA Gen Bölgesi

mtDNA 12S rRNA gen bölgesi üzerine gerçekleştirilen analizler iki alt başlık altında toplanarak verilmiştir.

4.1.2.1. 12s rRNA Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri

Yedi tür için mtDNA 12s rRNA gen bölgesi (439 bç) toplam 26 bireyden yükseltgenmiştir (Çizelge 4.1). Belirlenen 439 nükleotit pozisyonunun 394'ü (89,7%) sabit, 45 (10,3%) değişkendir. Değişken karakterlerin 24'ü (53,3%) parsimonik bilgi verici karakterdir. Çalışılan tüm örneklerde 94-140 bazları arasında

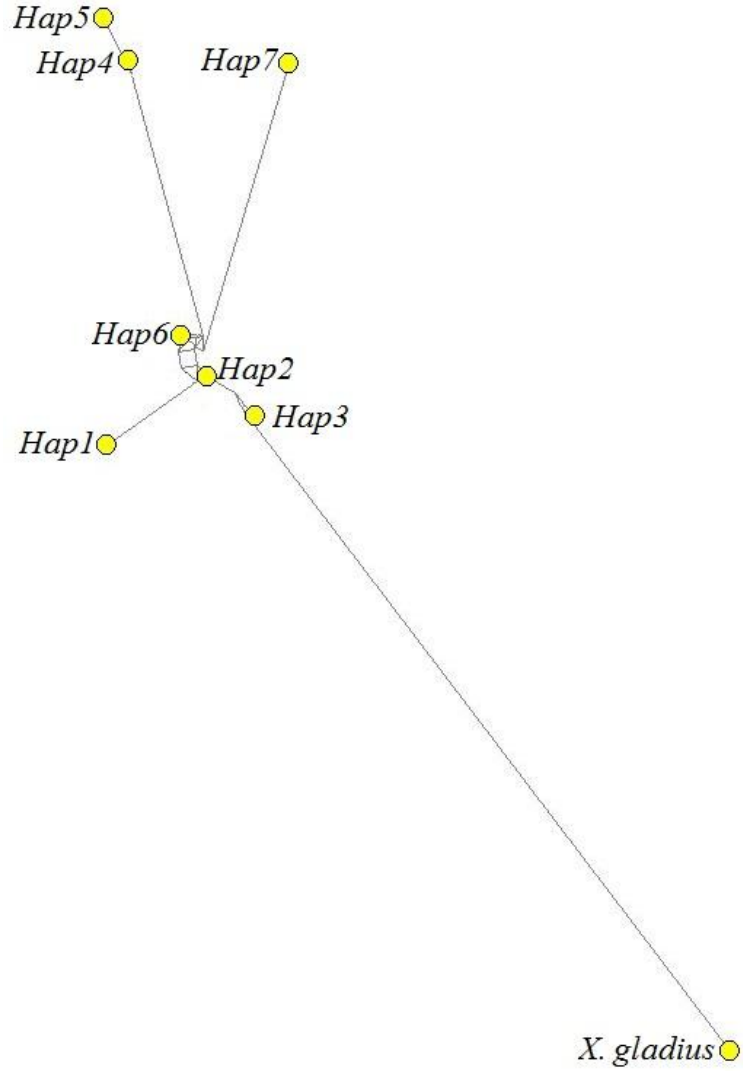
47 bç uzunluğunda korunmuş bölge tespit edilmiştir. Elde edilen matrikste baz kompozisyonları A:%28.1, C:%26.8, G:%22.3 ve T:%22.8 olarak belirlenmiştir.

12s rRNA bölgesinin dizin analizi ile dört farklı lokaliteden (Ordu, İstanbul, İzmir, Antalya) toplam 7 farklı haplotip belirlenmiştir. Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programına girilen verilerle bir network oluşturulmuştur. Haplotipler arası ilişkileri gösteren bir sonuç vermiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5). On adet *Sarda sarda* bireyinin analizi ile yalnız bir haplotip tespit edilmiştir. Benzer şekilde diğer türlerin her biri de çalışılan tüm örnekler için yalnız bir haplotiple temsil edilmişlerdir.

Çizelge 4.7. 12s rRNA gen bölgesi haplotip bilgileri

Haplotipler	Türler	Örnek sayısı
Hap1	<i>S. sarda</i>	10
Hap2	<i>A. rochei</i>	3
Hap3	<i>E. alletteratus</i>	1
Hap4	<i>S. scombrus</i>	5
Hap5	<i>S. japonicus</i>	4
Hap6	<i>T. alalunga</i>	1
Hap7	<i>S. commerson</i>	2

12S geni dizini ile elde edilen haplotipler *Sarda sarda* Hap 1 dizini referans olarak alınarak karşılaştırıldığında bu segmentle aynı polimorfizmi gösteren haplotiplerde 29'u transversiyonal 83'ü transisyonal baz değişimi ile farklılaşan toplam 45 değişken nükleotit pozisyonu tanımlanmıştır (Çizelge 4.7). Türler arasında, *Auxis rochei*'de 6 transisyonal ve 3 transversiyonal, *Euthynnus alletteratus*'da 9 transisyonal ve 3 transversiyonal değişim, *Scomber scombrus*'da 18 transisyonal ve 7 transversiyonal değişim, *Scomber japonicus*'da 22 transisyonal ve 7 transversiyonal değişim, *Thunnus alalunga*'da 8 transisyonal ve 2 transversiyonal değişim ve *Scoboremorus commerson*'da 20 transisyonal ve 7 transversiyonal değişim tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 12S geni için transisyonlar transversiyonlardan daha yaygın olmakla birlikte transisyon/transversiyon oranı 2.862 olarak gerçekleşmiştir.



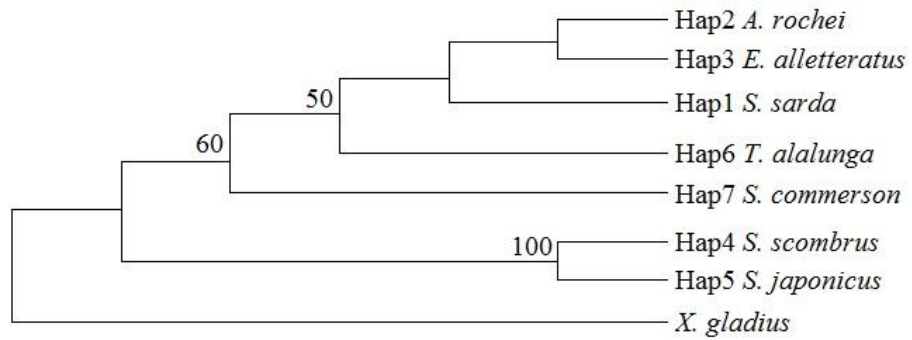
Şekil 4.5. Scombridae türlerinin 12s rRNA geni için Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programı ile oluşturulan haplotip ağı. (Hap1, *S. sarda*, Hap2 *A. rochei*, Hap3 *E. alletteratus*, Hap4 *S. Scombrus*, Hap5 *S. japonicus*, Hap6 *T. Alalunga*, Hap7 *S. commerson* ve dış grup olarak *X. gladius*)

Ayrıca, *A. rochei* ve *T. alalunga* dışında her bir tür için türe özgü nükleotit pozisyonları belirlenmiştir. *Sarda sarda* türünü diğerlerinden ayıran teşhis nükleotit pozisyonları 250(T), 336(A), 350(T), 356(C), 378(C)'dir. *E. alletteratus* için 87(C), *S. scombrus* için 284(G) ve *S. japonicus* için 59(T), 71(C), 357(A)'dir. Son olarak *S. commerson* 10 adet nükleotit pozisyonuna (12(T), 93(A) 142 (C), 209 (A), 279 (A, 280 (T), 295 (G), 331 (C), 403 (C))ve 429(G)) sahiptir (Çizelge 4.8).

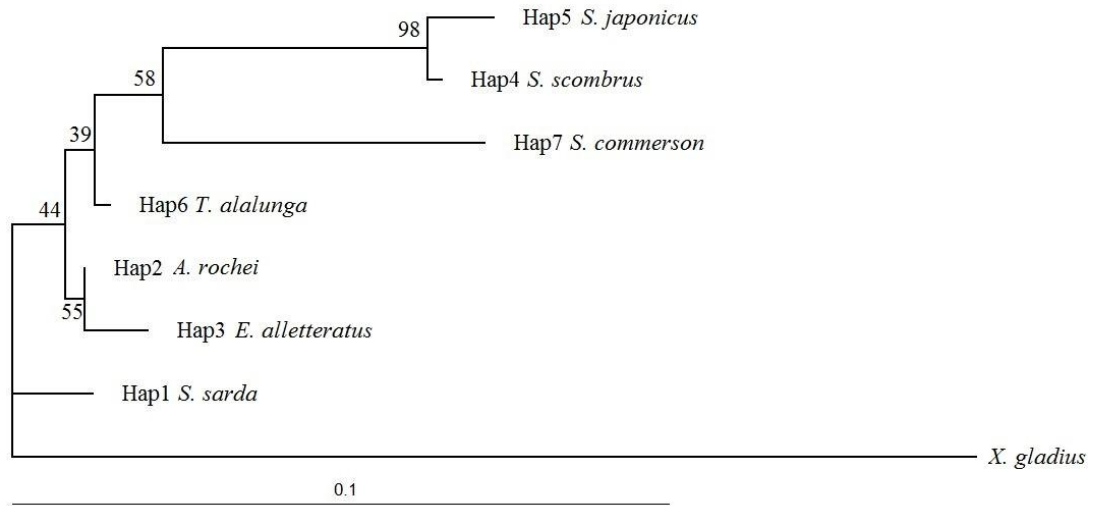
4.1.2.2. 12S rRNA Gen Bölgesi Filogenetik Özellikleri

12S rRNA geni için 7 haplotipin DNA dizileri jModelTest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programında analiz edildiğinde hiyerarşik olasılık oran testlerine göre en uygun baz değişim modelinin AIC (Akaike 1974)'e göre TIM2ef+G olduğu (-lnL=1818.7648, K=16) ve gamma shape değeri 0,0120 olduğu bulunmuştur. Ayrıca analiz sonucunda oluşan 'scores' dosyası filogenetik analizler için PAUP (Swofford 1998) programı tarafından kullanılmıştır.

Parsimoni analizinde "Heuristic Search" algoritması kullanılmıştır (Şekil 4.6). Bootstrap değeri 1000 olarak alınmıştır. ML analizinde ise jModelTest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programı kullanılarak en uygun model belirlenmiş ve PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel, 2003) programında bu model ve baz oranları kullanılarak ML ağacı çıkarılmıştır (Şekil 4.7). Türler arası genetik uzaklık ilişkisi Kimura 2-parametre modeline (Kimura 1980) göre MEGA 6 (Tamura ve ark. 2013) programında hesaplanmıştır (Çizelge 4.10). En düşük genetik uzaklık 0.009 ile Hap2 (*A. rochei*) Hap3 (*E. alletteratus*) ve Hap6 (*T. alalunga*) arasında bulunurken en yüksek genetik uzaklık 0.073 ile Hap5 (*S. japonicus*) ve Hap7 (*S. commerson*) arasında bulunmuştur. Tüm türler için ortalama genetik uzaklık 0.046 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. 12S gen bölgesi PAUP (Swofford 1998) parsimoni ağacı



Şekil 4.7. 12S Gen bölgesi için PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) programı üzerinde Maximum Likelihood ağacı

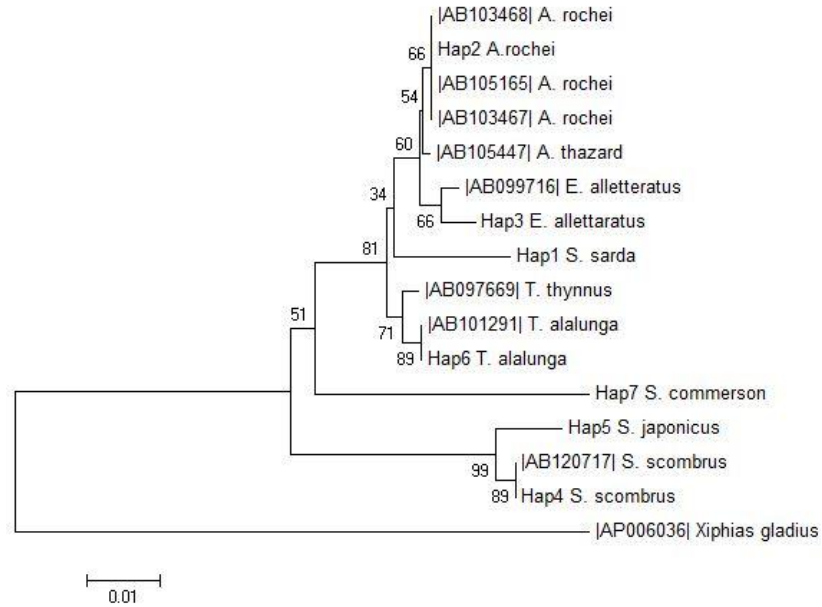
Çizelge 4.10. 12S Gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi (Kimura 1980)

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	<i>X. gladius</i>
Hap1	0							
Hap2	0.021	0						
Hap3	0.028	0.009	0					
Hap4	0.061	0.050	0.055	0				
Hap5	0.071	0.061	0.066	0.014	0			
Hap6	0.024	0.009	0.019	0.048	0.058	0		
Hap7	0.066	0.055	0.050	0.073	0.073	0.050	0	
<i>X. gladius</i>	0.143	0.140	0.137	0.154	0.151	0.140	0.159	0

12S rRNA gen bölgesi için gen bankasından (NCBI) alınan Scombrid örneklerine ait sekans verileri bu çalışmada Türkiye sularından elde edilmiş sekans verileri ile birlikte değerlendirilmiş ve mevcut durum ortaya konulmuştur (Çizelge 4.11, Şekil 4.8).

Çizelge 4.11. 12S rRNA gen bölgesi için GenBank'tan (NCBI) alınan veriler

Tür	Accession No
<i>Auxis rochei</i>	AB105165
<i>Auxis rochei</i>	AB103467
<i>Auxis rochei</i>	AB103468
<i>Auxis thazard</i>	AB105447
<i>Euthynnus alletteratus</i>	AB099716
<i>Thunnus thynnus</i>	AB097669
<i>Thunnus alalunga</i>	AB101291
<i>Scomber scombrus</i>	AB120717
<i>Xiphias gladius</i>	AP006036



Şekil 4.8. 12S rRNA gen bölgesi NJ ağacı (Catanese ve ark. 2008'den modifiye edilmiştir.)

4.1.3. mtDNA Sitokrom b Gen Bölgesi

mtDNA Sitokrom b gen bölgesi üzerine gerçekleştirilen analizler iki alt başlık altında toplanarak verilmiştir.

4.1.3.1. Sitokrom b Geni ve Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri

Scombridae familyasına ait 7 tür arasından yalnız 3 türe ait (*S. Sadra*, *A. rochei* ve *T. alalunga*) mitokondriyal DNA Sitokrom b geni (1141 bç) için türleri kesin olarak ayırabileceğimiz kısmi bir dizin belirlenmiş ve haplotip analizi bu bölge üzerinden

gerçekleştirilmiştir. Mukayese edilen sitokrom b geni tüm dizini (1141 bç)'nin 919 (%80,5) pozisyonunun korunmuş 222 pozisyonunda değişken olduğu belirlenmiştir. Değişken olduğu tespit edilen nükleotit pozisyonlarının 92 (% 41,4)'sinin parsimonik bilgi verici olduğu belirlenmiştir. mtDNA sitokrom b geninin (1141 bç) tüm dizilimi dört farklı lokaliteden (Ordu, İstanbul, İzmir, Antalya) toplanan 28 bireyden yükseltgenmiştir (Çizelge 1). Ayrıca çalışılan tüm örneklerden elde edilen tüm sitokrom b gen bölgesi içinde 1-62, 154-212 ve 295-356 bazları arasında sırasıyla 62, 59 ve 62 bç uzunluğunda korunmuş bölgeler tespit edilmiştir.

Dizin analizi sonucunda, Sitokrom b genine ait toplam 7 farklı haplotip belirlenmiştir. Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programına girilen verilerle bir network oluşturulmuştur. Haplotipler arası ilişkileri gösteren bir sonuç vermiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.9). Toplam 6 adet *Sarda sarda* bireyinin analizi ile 5 farklı haplotip bulunmuştur. Bu haplotiplerden sadece haplotip Hap1 çalışılan tüm lokalitelerde yalnız 2 bireyde temsil edildiği görülmüştür.

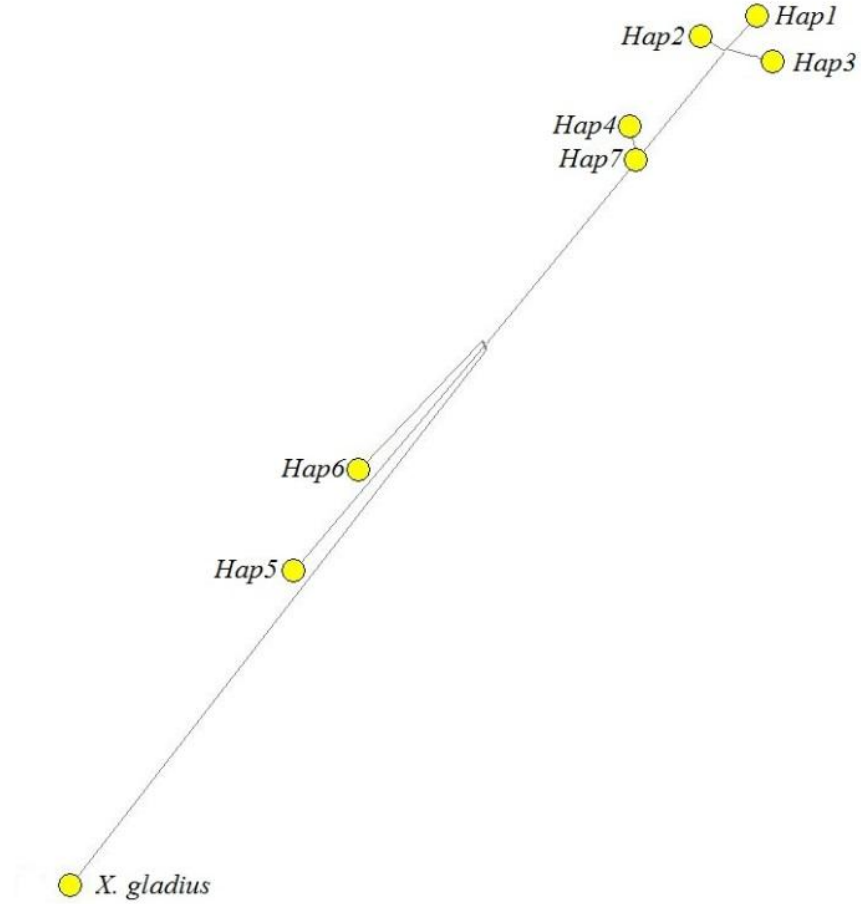
Çizelge 4.12. Sitokrom b gen bölgesi haplotip bilgileri

Haplotipler	Türler	Örnek sayısı
Hap1	<i>S. sarda</i>	2
Hap2	<i>S. sarda</i>	1
Hap3	<i>S. sarda</i>	1
Hap4	<i>S. sarda</i>	1
Hap5	<i>A. rochei</i>	1
Hap6	<i>T. alalunga</i>	1
Hap7	<i>S. sarda</i>	1

Sitokrom b geni dizini ile elde edilen haplotipler *Sarda sarda* Hap 1 dizini referans alınarak karşılaştırıldığında bu segmentle aynı polimorfizmi gösteren haplotiplerde 109'u transversiyonal 240'ı transisyonal baz değişimi ile farklılaşan toplam 222 değişken nükleotit pozisyonu tanımlanmıştır (Çizelge 4.12). Tür içinde ise, *Sarda sarda* örneklerinde 44 transisyonal değişim meydana gelirken 9 transversiyon görülmüştür. *Auxis rochei*'de 103 transisyonal ve 59 transversiyonal değişim ve *Thunnus alalunga*'da 93 transisyonal ve 41 transversiyonal değişim tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Sitokrom b geni için transisyonlar transversiyonlardan daha yaygın olmakla birlikte transisyon/transversiyon oranı 2.2018 olarak gerçekleşmiştir.

Elde edilen matriste baz kompozisyonları A:%24.9, C:%31.6, G:%15.0 ve T:%28.5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Scombridae türlerinin Sitokrom b geni için Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programı ile oluşturulan haplotip ağı. (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4, Hap7 *S. sarda*, Hap5 *A. rochei*, Hap6 *T. alalunga* ve dış grup olarak *X. gladius*)

Kodon eğilimine bakıldığında, gözlenen 11 sinonim olmayan baz değişiminin 3'ü birinci kodon, 3'ü ikinci kodon ve 5'i üçüncü kodon pozisyonundadır. Birinci kodon pozisyonunda; haplotip Hap5 (*A. rochei*) aminoasit pozisyonu 364'de valinin izolösine (1090, G -A transisyonu), haplotip Hap5 (*A. rochei*) aminoasit pozisyonu 368'de lösinin izolösine (1102, C-A transversion) ve haplotip Hap4 (*S. sarda*)

aminoasit pozisyonu 371’de stop kodonundan glisine (1111, T-G transversion) amino asit değişimi belirlenmiştir. İkinci kodon pozisyonunda; haplotip Hap5 (*A. rochei*) aminoasit pozisyonu 96’da fenilalaninin serine (287, T-C transisyonu), haplotip Hap6 (*T. alalunga*)’da aminoasit pozisyonu 233’de alaninin valine (698, C-T transisyonu) ve haplotip Hap2 (*S. Sadra*) aminoasit pozisyonu 375’de izolösinin asparajine (1127, T-A transversion) değişimi ile sonuçlanan üç mutasyon meydana gelirken üçüncü kodon pozisyonunda, sırasıyla haplotip Hap5’de (amino asit pozisyonu 53) izolösin metiyonin amino asidine (159, A-G transisyonu), haplotip Hap3’de (amino-asit pozisyonu 63) fenilalanin lösine (189 C-A transversionu), haplotipler Hap5 ve Hap6 (amino-asit pozisyonu 192 ve 262) izolösin metiyonine (576 ve 786, A-G transisyonu) aminoasit değişimi ile sonuçlanan iki mutasyon meydana geldiği belirlenmiştir. Son olarak, üçüncü kodon pozisyonunda haplotip *S. sarda* (Hap4 ve Hap7) ve *A. rochei* (Hap5 ve Hap6) haplotiplerinde (amino asit pozisyonu 341) izolösin metiyonine (1023, A-G transisyonu) aminoasit değişimi ile sonuçlanan mutasyon belirlenmiştir.

Bunun yanında, sitokrom b dizin analizi farklı lokalitelerden örneklenen bu türler arasında belirli farklar olduğunu göstermiştir. Scombrid türlerini sitokrom b geni ile kesin bir şekilde ayırma yeteneğinde 145 adet nükleotit farklılığı bulunmuştur. *Sarda sarda* türü toplam 43 nükleotit pozisyonunun 29'unda timin nükleotidinde sahipken *A. rochei* ve *T. alalunga* türleri sırasıyla 23 pozisyonda sitozin (31; 72; 96; 162; 222; 294; 345; 364; 564; 569; 654; 678, 687, 702, 730, 744, 777, 801, 879, 891, 1071, 1074, 1110), 5 pozisyonda (507, 666, 708, 795, 855) adenin ve bir pozisyonda (568) guanin nükleotidine sahiptir. Buna ilaveten 4 pozisyonda adenin nükleotidine sahipken *A. rochei* ve *T. alalunga* türleri sırasıyla guanin (576 , 786, 1017) ve sitozin (63) nükleotidine, 8 pozisyonda sitozin nükleotidine sahipken timin (216, 318, 631, 840) ve adenin (450, 552, 837, 873) nükleotidine ve son olarak pozisyon 123 ve 411'de, guanin nükleotidine sahipken *A. rochei* ve *T. alalunga* türleri sırasıyla timin ve adenin nükleotidine sahiptir. *A. rochei* türü toplam 64 pozisyonda *S. sarda* ve *T.alalunga* türlerinden ayrılırken *T. alalunga*; *S. Sadra* ve *A.rochei* türlerinden 38 nükleotit pozisyonuyla ayrılmıştır.

Auxis rochei türü toplam 64 nükleotit pozisyonunun 22'sinde sitozin nükleotidine sahipken *S. sarda* ve *T. alalunga* türleri sırasıyla 18 pozisyonda timin (57, 84, 117, 165, 287, 399, 429, 474, 516, 582, 723, 798, 804, 828, 987, 1002, 1089, 1031), 4 pozisyonda adenin (144, 252, 783 ve 1008) nükleotidine sahiptir. Ek olarak 20 pozisyonda timin nükleotidine sahipken *S. sarda* ve *T. alalunga* türleri sırasıyla 16 pozisyonda sitozin (81, 114, 378, 444, 447, 657, 669, 984, 748, 762, 882, 963, 970, 993, 1041, 1068), 4 pozisyonda (471, 615, 645, 930) adenin nükleotidine sahiptir. Ayrıca 11 pozisyonda adenin nükleotidine sahipken *S. sarda* ve *T. alalunga* türleri sırasıyla 7 pozisyonda sitozin (12, 102, 288, 402, 417, 999, 1102), 3 pozisyonda timin (363, 585, 843) ve 1090. pozisyonda guanin nükleotidine sahiptir. Son olarak *A. rochei*'de 11 pozisyonda guanin nükleotiti bulunurken *S. sarda* ve *T. alalunga* türlerinde sırasıyla 10 pozisyonda adenin ve 888. pozisyonda sitozin nükleotiti bulunur.

Thunnus alalunga türü toplam 38 nükleotit pozisyonunun 22'sinde timin nükleotidine sahipken *S. sarda* ve *A. rochei* türleri sırasıyla 19 pozisyonda sitozin (66, 75, 129, 228, 264, 273, 387, 441, 465, 504, 591, 618, 621, 648, 698, 927, 960, 1047, 1050), 3

pozisyonda adenin (468, 600, 612) nükleotitine sahiptir. Ayrıca 5 pozisyonda sitozin nükleotitine sahipken *S. sarda* ve *A. rochei* türleri sırasıyla 3 pozisyonda timin (567, 765, 789), 2 pozisyonda adenin (234, 459) nükleotitine sahiptir. Ek olarak 6 pozisyonda adenin nükleotiti bulunurken *S. sarda* ve *A. rochei* türlerinde sırasıyla 4 pozisyonda sitozin (198, 354, 540, 900), 2 pozisyonda guanin (705, 807) nükleotiti bulunmaktadır. Son olarak *T. alalunga* türünde 27, 240, 699, 750 ve 936. nükleotit pozisyonlarında guanin nükleotiti bulunurken *S. sarda* ve *A. rochei* türlerinde adenin nükleotiti bulunmaktadır (Çizelge 4.12).

Analizler sonucunda elde edilen haplotipler için haplotip çeşitliliği Hd:0.964 ve nükleotit çeşitliliği Pi:0.07230 olarak bulunmuştur. Türler arası nükleotit farklılıkları (Çizelge 4.13) ve nükleotit çeşitliliği (Çizelge 4.14) DNASP (Rozas ve Rozas 1999) programı ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.14. Cyt b gen bölgesi türler arası nükleotit çeşitliliği ve net nükleotit çeşitliliği (Alt diagonal d_{XY} , Üst diagonal d_A)

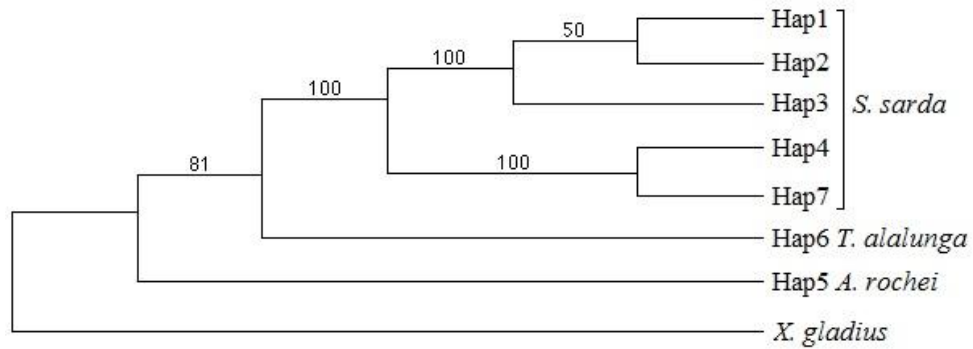
	<i>S. sarda</i>	<i>A. rochei</i>	<i>T. alalunga</i>	<i>X. gladius</i>
<i>S. sarda</i>	0	0.12770	0.10316	0.20292
<i>A. rochei</i>	0.13994	0	0.12533	0.21988
<i>T. alalunga</i>	0.11540	0.12533	0	0.21209
<i>X. gladius</i>	0.21516	0.21998	0.21209	0

4.1.3.2. Sitokrom b Gen Bölgesi Filogenetik Özellikleri

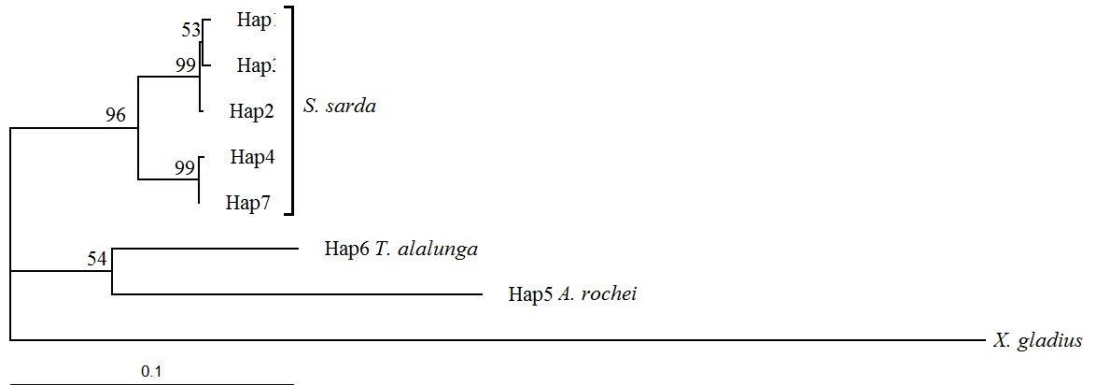
Sitokrom b geni için 7 haplotipin DNA dizileri jModelTest v.0.1 (Guindon ve Gascuel 2003) programında analiz edildiğinde hiyerarşik olasılık oran testlerine göre en uygun baz değişim modelinin AIC (Akaike 1974)'e göre TIM2+G olduğu (-lnL = 2757.8188, K=19) ve baz frekanslarının ise A=0.2510, C=0.3198, G=0.1527,

T=0.2764 olduğu bulunmuştur. Ayrıca analiz sonucunda oluşan ‘scores’ dosyası filogenetik analizler için PAUP (Swofford 1998) programı tarafından kullanılmıştır.

Parsimoni analizinde “Heuristic Search” algoritması kullanılmıştır. Bootstrap değeri 1000 olarak alınmıştır (Şekil 4.10). ML analizinde ise jModelTest v.0.1 (Postada 2008) programı kullanılarak en uygun model belirlenmiş ve PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) programında bu model ve baz oranları kullanılarak ML ağacı çıkarılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Sitokrom b gen bölgesi PAUP (Swofford 1998) parsimoni ağacı



Şekil 4.11. Sitokrom b gen bölgesi için PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) programı üzerinde Maximum Likelihood ağacı

Türler arası genetik uzaklık ilişkisi Kimura 2-paremetre modeline (Kimura 1980) göre MEGA 6 (Tamura ve ark. 2013) programında hesaplanmıştır (Çizelge 4.15). Tüm türler için ortalama genetik uzaklık 0.087 olarak hesaplanmıştır. En düşük genetik uzaklık 0.002 ile *S. sarda*'ya ait Hap4 ve Hap7 arasında bulunurken en yüksek genetik uzaklık 0,159 ile Hap1 (*S. sarda*) ve Hap5 (*A. rochei*) arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.15. Cyt b Gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi (Kimura 1980)

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	<i>X. gladius</i>
Hap1	0							
Hap2	0.004	0						
Hap3	0.005	0.004	0					
Hap4	0.047	0.044	0.045	0				
Hap5	0.159	0.157	0.155	0.155	0			
Hap6	0.130	0.127	0.126	0.125	0.139	0		
Hap7	0.045	0.042	0.043	0.002	0.155	0.124	0	
<i>X. gladius</i>	0.263	0.259	0.260	0.257	0.264	0.256	0.254	0

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Akdeniz, Ege Denizi, Marmara Denizi ve Karadeniz'den elde edilen Scombridae türleri: *Auxis rochei* (Gobene balığı), *Euthynnus alletteratus* (Yazılı orkinos), *Sarda sarda* (Palamut), *Scomber japonicus* (Kolyoz), *Scomber scombrus* (Uskumru), *Scomberomorus commerson* (Palamut kolyozu), *Thunnus alalunga* (Uzun kanat orkinos), morfolojik ayrımlar kullanılarak belirlenmiştir. 12S, mtDNA COI ve Cyt b gen bölgeleri PZR tekniğiyle çoğaltılarak, dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri sonucu elde edilen diziler BioEdit, MEGA, PAUP, DNASP ve Treeview programlarıyla analiz edilmiş ve türler arası genetik yakınlıklar ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmanın konusu olan DNA barkodlamasının ana hedefleri bilinmeyen örnekleri bir tür kategorisine atamak, yeni ve kriptik türlerin açıklanmasına yardımcı olmaktır. DNA barkodlama ayrıca özellikle mikroskobik, farklı yaşam safhasına sahip ve karmaşık ya da anlaşılabilir morfolojisi ile diğer organizmaların belirlenmesini kolaylaştırır (Hebert ve ark. 2003). Bundan başka, bu yaklaşım aynı zamanda morfolojileri çok yakın türleri de ayırt edebilmektedir. Scombridler özellikle küçük boyda olanlar morfolojik olarak bir birlerine çok yakın türlerdir. Yüksek seviyedeki bu benzerlikten dolayı bazen karıştırılmaktadırlar. Ancak DNA barkodlama her durumda yalnız scombrid örneklerini değil diğer balık türlerini de ayırabilmektedir.

Balık Barkod Yaşam projesi veritabanı (www.fishbol.org)'na göre 2014 yılında Scombridae familyasına dahil türlerin % 85'ine yakın kısmı barkodlanmıştır, ancak bazı türler yalnız bir örnekle temsil edilmiştir. Scombridae familyasına dahil 54 türden sadece 46'sı bir veya daha fazla barkoda sahiptir. Bu çalışmada Türkiye'de dağılım gösteren 7 türe ait toplam 68 örneğin COI, 12s rRNA ve Sitokrom b genlerine ait bazı dizilimleri belirlenmiştir. Çalışmada tür seviyesi ayrışmanın sağlanması ticari balıkların tanımlanmasında COI geninin etkili olduğunu göstermektedir. Barkod yaşam projesi veritabanında *Sarda sarda* için günümüze kadar 21 adedi Türkiye'den olmak üzere toplam 24 örnek yüklemesi yapılmıştır. Bu çalışmada COI geninin 1079 bp'lik kısmının dizini belirlenirken, veritabanına girilen Türkiye örnekleri için yalnız 654 bp'lik kısım çalışılmıştır. Ayrıca, BOLD (The Barcode of Life Data Systems) sistemine birer örnek Türkiyeden olmak üzere A.

rochei ve için 28, *E. alletteratus* için 47, *Scomber scombrus* için 98 ve *Thunnus alalunga* için 67 kayıt girişi yapılmış ancak yürütülen bu çalışmadan farklı olarak COI geninin yalnız 515 bç'lik kısmı çalışılmıştır.

COI gen bölgesi için *Sarda sadra* türü içindeki bireylerin ortalama K2P genetik uzaklık değeri %1.3 olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, türdeş türlerden (conspecific) yaklaşık 8 kat daha farklı bulunmuştur. Gözlenen ortalama türler arası K2P genetik uzaklık değeri deniz (%0,24-0,39) (Zhang ve Hanner 2011) ve tatlı su türleri (%0,3-0,45) (Hubert ve ark. 2008) için bildirilen intraspesifik K2P uzaklığına benzer olduğu gözlenmiştir. Familya içi ve türler arası ortalama genetik farklılık %9,9'a yükselmiştir. Bu veriler de artan genetik farklılıkla birlikte değişen taksonomik seviyenin gözlenmesi durumu, tür sınırında ki genetik uzaklıkta gözlenen farklılığı desteklemektedir. Ward ve ark. (2005) COI gen bölgesinin dizin analizi ile ettiği genetik uzaklık değerlerini aynı türler için %0.39, aynı cinsten balıklar için %9.93 ve aynı familyadan balıklar için ise %15.46 olduğu bulunmuş ve bu çalışmadan elde edilen tür içi ve familya içi genetik uzaklık değerlerine yakın olduğu gözlenmiştir.

UPGMA analizi ile türler arasındaki akrabalık ilişkileri açıkça oluşturulmuş (Şekil 4.4) ve aynı türden bireylerin % 98-100 seç-bağla (bootstrap) değeri ile aynı taksonomik kümede gruplandığı tespit edilmiştir.

Genellikle bizim çalışmamızda tek örnekle (*T. alalunga*) temsil edilen *Thunnus* türleri bazı araştırmacılar tarafından ayrı türler olarak sınıflandırılmaktadır. Gibbs ve Collete (1967), yapmış oldukları karşılaştırmalı anatomik çalışmalarına göre alt tür olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Fakat bunun yanında Collete (1999) yapmış olduğu morfolojik ve genetik çalışmaların sonucunda Atlantik ve Pasifik Tunaların tam tür olarak kabul edilmesini önermiştir. Tseng ve ark. (2011) çalışmasında ise *T. thynnus* diğer *Thunnus* türlerinden Sitokrom b geni 132. pozisyondaki (G) nükleotiti ile ayırmakta olduğunu ve bunun ayırt edici olduğunu vurgulamıştır. Yürütülmüş olan bu çalışmada da, *T. alalunga* türü çalışılmış ve Tseng ve ark. (2011)'de belirtildiği gibi 132. nükleotit pozisyonunda G-A transisyonu ile farklılık göstermekle birlikte 27 nükleotit pozisyonunda transisyon gözlenmiş ve toplam 30 nükleotit pozisyonuyla *T. thynnus* türünden ayrılmıştır.

Ayrıca, *Sarda sarda* türü bu çalışmada ve diğer araştırmacılar tarafından gen bankasına girilen Scombridae familyasının diğer bazı türleri (*T. thynnus*, *S. sarda*, *Scomber scombrus*; Cantatore ve ark. 1994) ile karşılaştırıldığında kesin bir şekilde ayırma yeteneğinde 15 adet nükleotit farklılığı bulunmuştur. Bunlardan 10 nükleotit pozisyonu T-C transisyonu şeklinde (nükleotit pozisyonları: 96, 222, 294, 345, 364, 654, 687, 744, 801 ve 1074) gerçekleşirken 3 pozisyon C-A transversiyonu (552, 837 ve 873), bir pozisyon T-A (507) transversiyonu ve bir pozisyonda G-A (411) transisyonu olarak değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı familya içinde ve morfolojileri ile birbirinden ayrılmayan ve dağılım alanları çakışan özellikle *Thunnus* genusuna ait türlerde mtDNA verilerine dayalı elde edilen sonuçlar türler arasında anlamlı farklılaşmaları ortaya çıkarmıştır (Chow ve Kishino 1995). NCBI GenBank'tan alınan Scombridae familyası üyelerine ait farklı Cyt b dizileri ve bu çalışmada elde edilen dizilerle birlikte yapılan analiz sonucunda türlerin ayrıldığı ve gen dizin uzunluklarının 1.138 ~ 1.141 bp arasında değişmekte olduğu (Takehana ve ark. 2004, Tseng ve ark. 2011, Zhao ve ark. 2008) ve bu çalışma ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Cyt b gen bölgesini kullanarak tenekelenmiş balık ürünlerini inceleyen Botti ve Giuffra (2010), ürünlerde ısının yarattığı denatürasyon sebebiyle kısa uzunlukta diziler üzerine çalışmıştır. Çalışmamızdan farklı olarak türe özgü primer yerine üçer çift primerden oluşan karışımları kullanarak PZR reaksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Tespit edilecek türün belirsizliği onları bu seçime götürmüştür. Böylece elde edilen PZR ürününden örneğin türünü belirlemişlerdir. Cyt b gen bölgesinin sadece 226 bp'lık bir kısmı çoğaltılmasına rağmen *Scombridae* ailesine ait 17 türün tespiti sağlanarak benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Farklı habitatlarda dağılım gösteren balıklarda tür içi nükleotit çeşitliliği karşılaştırıldığında, tatlı su balıklarından Salangid 0.0022 (Zhao ve ark. 2008), tropikal demersal balıklardan *Acanthochromis polyacanthus* 0.045 (Planes ve ark. 2001), deniz balıklarından *Albula* sp. 0.0036 (Pfeiler ve ark. 2008) ve göçmen balıklardan *Tunnus orientalis* ve *T. maccoyii* sırasıyla 0.0063 ve 0.0059 (Tseng ve ark. 2011) ve bu çalışma sonucunda *Sarda sarda* 0.027 nükleotit çeşitliliği değerine sahip olmuştur. Tseng ve ark. (2011)'nin elde ettiği sonuçla benzer olarak bu çalışmada da göçmen deniz balıklarının tatlı su balıklarına göre daha yüksek

nükleotit çeşitlilik değerine sahip olduğu görülmektedir. Gen bölgeleri arasında nükleotit çeşitliliği değerlerine bakıldığında çalışılan tüm örnekler için sitokrom b gen bölgesinde 0.07230, 12s rRNA gen bölgesinde 0.03778 ve COI gen bölgesinde 0.07854 olarak hesaplanmış ve en yüksek değer COI gen bölgesine ait olduğu tespit edilmiştir. Tseng ve ark. (2011)'na göre düşük nükleotit çeşitlilik değeri örneklem küçüklüğünü veya aşırı avcılığı ifade etmektedir. Haplotip çeşitlilik değerlerinin çalışılan türler için gen bölgeleri arasındaki dağılımına bakıldığında sitokrom b gen bölgesinde 0.964, 12s rRNA gen bölgesinde 0.800 ve COI gen bölgesinde 0.912 olarak hesaplanmıştır. Rogers and Harpending (1992)'e göre orta düzeyde sekans farklılığı ile birlikte yüksek seviyedeki haplotip çeşitlilik değerleri hızlı büyüyen popülasyonlardaki mutasyon birikimini göstermektedir.

12S rRNA gen bölgesi üzerine yürütülen çalışmalara bakıldığında Catanese ve ark. (2008), *A. thazard* ve *A. rochei* türleri arasında filogenetik ilişkiyi incelemek için yaptıkları ağaçlarla elde edilen sonuçlar benzerdir. Bu nedenle çalışmada elde edilen diziler GenBank'tan indirilip çalışmamızda elde edilen verilerle harmanlanarak yeni bir ağaç çizilmiştir (Şekil 4.8). Catanese ve ark. (2010) gerçekleştirdikleri başka bir çalışmada 4 farklı *Scomber* türünde 12S gen bölgesi için elde ettikleri, *S. japonicus* ve *S. scombrus* türleri arasındaki ilişki çalışmamıza benzer nitelikler taşımaktadır.

12S rRNA gen bölgesi için yapılan bir diğer çalışmada Wang ve ark. (2000) nükleotit kompozisyonları 33.5% (A), 25.5% (C), 19.1% (G) ve 22.0% (T) olarak vermiştir. Bizim çalışmamızda nükleotit kompozisyonları A:%28.1, C:%26.8, G:%22.3 ve T:%22.8 olarak belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında oranların benzer olduğu ve Adenin oranının yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca 12S gen bölgesinin birbirinden genetik olarak uzak sınıfların (Chondrichthyes, Osteichthyes, Amphibia, Reptilia, Aves, Mammalia) ayırımında kullanılmış olması ve çalışmış olduğumuz Scombridae ailesinin ayırımında kullanılması çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

mtDNA COI gen bölgesi için Batı Atlantik Okyanusu Scombridae türleri üzerine yaptığı çalışmada Paine ve ark. (2007) benzer sonuçlar elde etmiştir. Bizim çalışmamızda primer belirlenmesinde kaynak olan bu çalışmada uzun bir dizi (1079bp) elde etmemizi sağlayan LCOI121 ve HCOI1199 primerleri kullanılmıştır.

Paine ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları çalışmadan elde ettikleri bilgilerle 2008 yılında yeni bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Morfolojik olarak tür tayininin gerçekleştirilemediği larvaların mtDNA sekans yöntemiyle tür teşhisini gerçekleştirmişlerdir. Paine ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada topladıkları larvaların sadece %29'unu morfolojik olarak doğru tespit edebilmişlerdir. Geri kalan %71'lik kısım mtDNA COI markır yardımıyla tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada bizim çalışmamızdan farklı metotlar kullanılsa da oluşturulan ağaçta bizim çalışmamızdaki verilere benzer olarak *A. rochei* ve *E. alletteratus* birbirine yakın bulunmuştur. Orkinos türleri olan *T. alalunga*, *T. obesus*, *T. thynnus* ve *T. albacares*'in ise bu türlerden daha uzak durduğu görülmüştür. Gözlenen eşleşmelerde her tür doğru bir şekilde ayrılmış ve farklılaşma olmamıştır.

Haider ve ark. (2012), tarafından et türlerinin teşhisi üzerine bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada inek, tavuk, hindi, koyun, domuz bufalo ve deve eti örnekleriyle çalışılmıştır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak evrensel COI primerleri kullanarak mtDNA COI gen bölgesi üzerinde 710bp'lik bir dizi elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada benzer şekilde PZR ürünü elde ettikten sonra farklı PZR şartları kullanarak (48°C bağlanma sıcaklığı 10s süreyle) PZR ürünü elde etmişlerdir. Ardından elde edilen PZR ürünlerine RFLP yöntemiyle COI gen bölgesinin başarılı sonuçlar verdiğini önermişlerdir.

Sonuç olarak, her üç gen bölgesi için de genetik veriler kullanılarak yapılan analizler sonucu ortaya çıkarılan filogenetik ağaçlar tür ayırımında oldukça başarılı olmuştur. Özellikle juvenil halleri birbirinden ayıramayan yavru bireylerde veya larvalarda morfolojik karakterleri kullanmak tür teşhisi için riskli iken, genetik analizlerin tür ayırımında kesin sonuç verdiği bu çalışmada Scombrid türleri için başarılı bulunmuştur. Hem 12S gibi kısa baz uzunluğuna sahip farklı bir gen bölgesi hem de COI ve Cyt b gibi uzun baz uzunluğuna sahip gen bölgelerinde oluşturulan ağaçlar tür ayırımında kullanışlı bulunmuştur. Scombridae ailesi yüksek ticari değerlere sahip türler içermektedir. Özellikle ton balığı konservesi üretiminde dünya piyasasında hemen her yerde tüketimi yapılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan yöntemlerle, elde edilen numunelerden tür teşhisine gidilerek tüketiciyi aldatmaya yönelik üretimler denetim altına alınabilir. Böylece oluşabilecek ticari kayıpların önlenmesi ve tüketicinin kalite kontrolü sağlanabilir. Ayrıca, Türkiye sularında Scombridae

türlerine ait DNA Barkodlama çalışmasında, özellikle koruma ve yönetim uygulamaları ile ilgili, scombrid COI barkodlama kütüphanesinin kurulması küresel DNA barkodlamasına katkı sağlamaktadır. Biyolojik çeşitlilikle ilgili veri birikimi Türkiye de etkili planlama ve koruma balıkçılık programlarının izlenmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Ülkemiz sularında sınai ve ticari faaliyetlerin artması ile birlikte tehdit ve bozulmaya karşı biyolojik çeşitlilik son derece savunmasız kalmaktadır. Bu nedenle, bu veriler sadece Scombrid populasyon yapılanması üzerine değil aynı zamanda etkin yönetim stratejilerinin oluşturulmasına ve önemli ticari balıkçılık kaynaklarının korunmasına bilimsel bir çerçevede destek sunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Aksungur N. ve Çakmak E. 2008. Pelajik Balık Yetiştiriciliği, SUMAE Yunus Araştırma Bülteni 8:3.
- Anonim, 2011. www.fao.org-(Erişim tarihi:06.04.2014)
- Anonim, 2014. www.fishbase.org-(Erişim tarihi: 06.04.2014)
- Botti, S. ve Giuffra, E. 2010. Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products. *BMC Biotechnology*, 10:60.
- Cantatore,P., Roberti, M., Pesole,G., Ludovico,A., Milella,F., Gadaleta,M.N. ve Saccone,C. 1994. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J. Mol. Evol.* 39 (6): 589-597.
- Catanese, G., Infante, C., ve Manchado, M. 2008. Complete mitochondrial DNA sequences of the frigate tuna *Auxis thazard* and the bullet tuna *Auxis rochei*, *Informa Healthcare, DNA Sequence*, 19(3): 159–166.
- Catanese, G., Manchado, M., Fernández-Trujillo, A. ve Infante C. 2010. A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. *Food Chemistry*, 122: 319–326.
- Chow S. ve Kishino H. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 41:741–748.
- Clement, M., Posada, D. ve Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Collette BB. ve Nauen C.E. 1983. *FAO Species Catalogue Scombrids of the World Vol.2*, United Nations Development Programme Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Rome, ISBN 92-5-101381-0.
- Collette BB. 1999. Mackerels, molecules, and morphology. In: Seret B, Sire J-Y (eds) *Proceedings of the 5th Indo-Pacific Fish Conference*, Noumea 1997. Société Française d’Ichtyologie, Paris, 149–164.
- Costa FO. ve Carvalho GR. 2007. The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of Fish. *Genomics, Society and Policy* 3: 52–56.
- Fox C, Taylor MI., Pereyra R ve Rico C. 2005. Mapping of the spawning grounds of Irish Sea gadoids using genetic identification of planktonic eggs. *Mol Ecol* 14: 879–884.
- Gibbs RH Jr. ve Collette BB. 1967. Comparative anatomy and systematics of the tunas, genus *Thunnus*. *US Fish Wild Serv Fish Bull* 66:65–130.
- Guindon, S. ve Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Haider, N., Nabulsi, I. and Al-Safadi, B. 2012. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science* 90: 490–493.

- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert PDN. ve Hickey D.A., 2007. DNA Barcoding: How It Complements Taxonomy, Molecular Phylogenetics and Population Genetics. *TRENDS in Genetics*, 23 (4): 167-172.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hebert PDN., Cywinska A., Ball SL. ve De Waard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Roy Soc Lond B* 270: 313–321.
- Hebert PDN., Ratnasingham S. ve De Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Roy Soc Lond B* 270: S96–S99.
- Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak NE., Taylor E, ve ark. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE* 3: e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490.
- Hubert N, Meyer CP, Bruggemann HJ, Guerin F, Komeno RJL. ve ark. 2012. Cryptic diversity in Indo-Pacific coral-reef fishes revealed by DNA barcoding provides new support to the Centre-of-Overlap hypothesis. *PLoS ONE* 7: e28987. Doi:10.1371/journal.pone.0028987.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kocher TD. ve ark. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6196–6200.
- Lohman DJ., de Bruyn M., Page T., von Rintelen K., Hall R. ve ark. (2011) Biogeography of the Indo Australian Archipelago. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:205–226.
- Maddison, DR., Swofford DL., ve Maddison WP. 1997. NEXUS: an extensible file format for systematic information. *Syst Biol* Dec; 46(4): 590-621.
- Paine, M. A., . McDowell, J. R. ve Graves, J. E. 2007. Specific identification of western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *BULLETIN OF MARINE SCIENCE*, 80(2): 353–367.
- Paine, M. A., . McDowell, J. R. ve Graves, J. E. 2008. Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. *Ichthyol Res.*, 55: 7–16.
- Pfeiler E., Bitler BG., Ulloa R., Heiden A. M., ve Hastings P. A. 2008. Molecular Identification of the Bonefish *Albula esuncula* (Albuliformes: Albulidae) from the Tropical Eastern Pacific, with Comments on Distribution and Morphology. No. 4, 763-770.
- Planes S, Doherty PJ. ve Bernardi G. 2001. String genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the great barrier reef and the coral sea. *Evolution* 55:2263–2273.

- Posada D. 2003. Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 6, Unit 6.5. doi: 10.1002/0471250953.bi0605s00.
- Ratnasingham S. ve Hebert PDN. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodelife.org). *Mol Ecol Notes* 7: 355–364.
- Rogers AR. ve Harpending H. 1992. Population growth makes waxes in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569.
- Rozas, J. ve Rozas, R. 1999. DNAsp Version 3: An Integrated Program for Molecular Population Genetics and Molecular Evolution Analysis, *Bioinformatics*, 15: 174-175.
- Sass C., Little D.P., Stevenson D.Wm. ve Specht D., 2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *PLoS ONE*, 2 (11) : e1154.
- Schneider, S., Roessli, D. ve Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN, Version 2.0: A Software for population genetic data analysis, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takehana Y, Uchiyama S, Matsuda M, Joen SR. ve Sakaizumi M. 2004. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in wild populations of medaka (*Oryzias latipes*) from Korea and China. *Zool Sci* 21: 483–491.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Thompson J.D., Higgins D.G. ve Gibson T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22: 4637-4680.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Jeanmougin F., Plewniak F. ve Gibson T.J. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools *Nucl. Acids Res.* 25 (24): 4876-4882 doi:10.1093/nar/25.24.4876
- Tseng M. C., Shiao, J.C. ve Hung, Y.H. 2011. Genetic identification of *Thunnus orientalis*, *T. thynnus*, and *T. maccoyii* by a cytochrome b gene analysis. *Environ Biol Fish* 91: 103–115. DOI 10.1007/s10641-010-9764-0.
- Wang H. Y., Tsai M. P., Tu M. C. ve Lee S. C. 2000. Universal Primers for Amplification of the Complete Mitochondrial 12S rRNA Gene in Vertebrates. *Zoological Studies* 39(1) : 61-66
- Ward RD, Zemlak TS., Innes BH., Last PR. ve Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B.* 360: 1847–1857.
- Ward RD. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol Ecol Resour* 9: 1077–1085.

- Zhang J-B. ve Hanner R. 2011. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biochem Syst Ecol.* doi:10.1016/j.bse.2010.12.017.
- Zhao L, Zhang J., Liu Z., Funk SM., Wei F., Xu M. ve Li M., 2008. Complex population genetic and demographic history of the salangid, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome b sequences. *BMC Evol Biol* 8;201. doi:10.1186/1471-21488-201.

EK 1.

1. Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

1.1. 0,5M EDTA (Etilendiamintetraasetikasit) pH:8,0

Molekül ağırlığı 372,2 g/mol olan EDTA'dan 93,05 g alınarak yaklaşık 200-300ml saf suda manyetik karıştırıcı kullanarak çözündürülmüştür. NaOH ile pH 8,0'a getirilmiş ve saf su ile 500ml'ye tamamlanmıştır.

1.2. 10x TBE Tampon Çözeltisi (Tris=0,89M Borik asit=0,89M EDTA=0,01M)

Bu çözelti agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerdir. Hem agaroz jel bu çözeltiyle hazırlanır hem de agaroz jel bu çözelti içinde elektroforez kuvetine konulur. Çözelti 10x olarak hazırlanır ve elektroforez sırasında saf su ile 1x'e seyreltilir.

TBE Tris, Borik asit ve EDTA çözeltilerinin belirli konsantrasyonlarıyla hazırlanır. Bu maddeler oranlarında ilave edilir.

Tris'in molekül ağırlığı $M_a=121,14g$, Borik asit'in molekül ağırlığı $M_a=61,83g$ 'dir. Bir litre 10x TBE için 108g Tris, 55 g Borik asit tartıldı ve yaklaşık 300-400ml saf su ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür. Bu karışım sırasında 20ml 0,5M EDTA eklenmiştir.

1.3. TE Tampon Çözeltisi pH:8,0

Bu çözelti Tris ve EDTA'dan oluşmaktadır. Bu çözelti bazı çözeltilerin hazırlanmasında ve DNA ekstrakte edildikten sonra çözündürülüp muhafaza edilmesi sırasında kullanılmaktadır. Tris ve EDTA'nın oranları 1L için Tris 10mM ve EDTA 0,1mM'dir. 250ml çözelti için $1,21g/4=0,30g$ Tris ve $0,037g/4=0,0092g$ EDTA tartılmış ve yaklaşık 150-200ml saf suda çözündürülmüştür. Yüksek çıkan pH yoğun HCl ile 8,0'a düşürülmüştür.

1.4. TEN Tampon Çözeltisi

Bu çözelti Tris EDTA ve NaCl'den oluşmaktadır, homojenizasyon çözeltisinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Çözelti maddelerinin oranları 1L için 100mM Tris, 10mM EDTA ve 250mM NaCl'dir. Bir litre için 12,11g Tris, 3,722g EDTA ve

14,61g NaCl yeterli bir kap içinde tartılmış ve üzerine yaklaşık 500-600ml saf su ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür. Çözelti bazik olduğundan yoğun HCl ile pH 8,0'a düşürülmüş ve saf suyla 1L'ye tamamlanmıştır.

1.5. Sodyum Asetat Çözeltisi pH:5,2

Bu çözelti DNA ekstraksiyonunda alkol aşamasından önce eklenerek DNA'nın toparlanmasını kolaylaştırır. DNA'nın gözle görülebilmesini, yumak oluşturmasını sağlar. Bu çözeltinin hazırlanmasında sodyum asetat trihidrat kullanılmıştır. 100ml için 40,8g tartılmış ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak yaklaşık 150ml saf suda çözündürülmüştür. Glasiyel asetik asit yardımıyla pH 5,2'ye düşürülüp ayarlanmıştır.

1.6. Fenol

Bu çözelti DNA ekstraksiyonunda ve DNA'nın saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Yabancı maddeleri tutarak santrifuj sonrası alt katman oluşturmaktadır. Fenol çözeltisi özel teneke kutusunda korunaklı bir şekilde temin edilmiştir. Çeker ocak altında açılarak beraberinde gelen tampon çözeltisi içine boşaltılıp karıştırılmış ve Fenol +4°C'de saklanmıştır.

1.7. Kloroform:izoamilalkol (24:1)

Bu çözelti de DNA ekstraksiyonunda ve DNA'nın saflaştırılmasında işlem hatası nedeniyle kalan Fenol'ün uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Çeker ocak altında 192ml Kloroform ile 8ml izoamilalkol'ün 24:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

1.8. Proteinaz K (10mg.ml⁻¹)

Dokuların homojenizasyonunda proteinleri parçalamak için kullanılmaktadır. Kendine özel 100mg'lık şişesinde gelmiş ve bu şişe içine 10ml saf su ilave edilmiştir. Kolay kontamine olduğu için çeker ocakta çalışılmış, bozulmaması için işlem dışında buzda tutulmuştur. Derin dondurucuda -20°C'de saklanmıştır.

1.9. RNAaz A

Bu çözelti dokuların homojenizasyonunda RNA'ları parçalamak için kullanılmaktadır. Özel şişesinde gelmiştir ve içinde 10KU RNAaz A bulunmaktadır.

5ml TE tampon çözeltilisi ilave edilmiştir. 70°C’de su banyosunda ısıtarak çözüldürülmüştür. Kullanım kolaylığı olması ve kolay kontamine olmaması açısından 3’e bölünmüştür. Bu çözeltili -20°C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Can Önel
Doğum Yeri : Rize
Doğum Tarihi : 29.06.1986
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : can_onel@hotmail.com
İletişim Bilgileri : 0536 665 0567-0452 517 3488

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Gıda Mühendisliği	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2008
Y. Lisans	Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği	Ordu Üniversitesi	2014

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Sorumlu Yönetici	Nazlılar Gıda AŞ	2009