

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-DR-2011-0001**

**TÜRKİYE'DEKİ *Testudo* KOMPLEKSİNİN MİTOKONDİRİ DNA
VARYASYONU**

Ferhat KİREMİT

**Tez Danışmanları:
Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN
Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ferhat Kiremit tarafından hazırlanan Türkiye’deki *Testudo* Kompleksinin Mitokondri DNA Varyasyonu başlıklı tez, 8 Şubat 2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :
Üye :
Üye :
Üye :
Üye :

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla (tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Ünvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../200...

Ferhat Kiremit

ÖZET**TÜRKİYE’DEKİ *Testudo* KOMPLEKSİNİN MİTOKONDİRİ DNA VARYASYONU**

Ferhat KİREMİT

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN
Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI
2011, 78 sayfa

Kara kaplumbağası, *Testudo graeca*, son zamanlarda bir tür kompleksi haline getirilmiştir. Bu grup ticaretinin yapılması ve habitatların tahribi nedeniyle koruma altında olduğu için, koruma stratejilerine rehberlik etmek açısından bu takson içindeki evrimsel soyhatlarının doğru bir şekilde anlaşılması önemlidir. Bu çalışmada, Türkiye’de morfolojik olarak tanımlanmış taksonları temsil eden 100 farklı lokaliteden 205 örneğin hızlı evrimleşen iki mitokondrial belirteci (*ND4* ve *Cyt b*) kullanılmıştır. Buna ilaveten Türkiye’deki *Testudo*’yu daha geniş bir filogenetik temele yerleştirmek için daha önceki çalışmalardaki diziler GenBank’tan alınarak çalışmaya eklenmiştir. Veri setimiz daha önceki çalışmaları destekler nitelikte morfolojik ve moleküler gruplamalar arasında tutarsızlıklar olduğunu göstermektedir. Altı ana klad (A-F) tanımlanmış ve bunların dört tanesi (*ibera*, *terrestris*, *buxtoni* ve *armeniaca*) Türkiye’de tespit edilmiştir. Son yıllarda tanımlanan iki takson olan *Testudo graeca anamurensis* ve *Testudo antakyensis* genetik olarak *Testudo graeca terrestris*’e benzer bulunmuştur. Türkiye’de *buxtoni* kladının varlığı ilk defa kaydedilmiştir. Ayrıca kladlar arasındaki olası temas noktaları da belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Chelonia, Testudinidae, *Testudo*, Filogeni, Türkiye

ABSTRACT**MITOCHONDRIAL DNA VARIATION OF TURKISH *Testudo* COMPLEX**

Ferhat KİREMİT

Ph.D. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN

Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

2011, 78 pages

The spur-thighed tortoise, *Testudo graeca*, has recently been split into a complex of species. Since this group is conservation concern due to trade and habitat destruction accurate understanding of evolutionary lineages in this taxon is important for guiding conservation strategies. We have sequenced rapidly evolving two mitochondrial markers (*ND4* and *Cyt b*) for 205 specimens from 100 different localities representing morphologically defined taxa in Turkey. Furthermore, we have added GenBank sequences of previous studies to place the Turkish *Testudo* into a broader regional phylogenetic framework. Our data showed inconsistencies between morphological and molecular groupings and supported the previous results. Six major clades (A-F) were identified four of which were from Turkey (*ibera*, *terrestris*, *buxtoni* and *armeniaca*). Recently described taxa *Testudo graeca anamurensis* and *Testudo antakyensis* were found genetically identical to *Testudo graeca terrestris*. The existences of *buxtoni* clade in Turkey was reported for the first time. Furthermore, possible contact zones of clades were also identified.

Key words: Chelonia, Testudinidae, *Testudo*, Phylogeny, Turkey

ÖNSÖZ

Morfolojik ve morfometrik çalışmalar ile sistematik durumu netlik kazanmayan *Testudo* kompleksinin mtDNA haplotip sınırlarının iyi örnekleme ile net bir şekilde çizilmesi üzerine kurulu bu çalışma TÜBİTAK tarafından (106T242) desteklenmiştir.

Tez çalışması boyunca desteklerini esirgemeyen sabırlı danışmanlarım Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN ve Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI'ya, tez izleme komitesinde yer alan değerli hocalarım Prof.Dr. Kurtuluş OLGUN ve Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ'e, sabırla moleküler teknikler üzerine bizi yetiştirmeye çalışan ve her sorumuza cevap veren Doç. Dr. Celal ÜLGAR'e, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK'e, emeği geçen arkadaşlarıma, çok sevdiğim aileme ve Fen Bilimleri Enstitüsüne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	8
2.1 Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	8
2.2 Ülkemizde Yayılış Gösteren Morfolojik Olarak Tanımlanmış <i>Testudo</i> Taksonları.....	14
2.3 Kullanılan Çözelti ve Tamponlar.....	19
2.4 Total DNA Eldesi.....	20
2.4.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi.....	20
2.4.2 E.Z.N.A.™ Tissue DNA Isolation Kit Kullanarak DNA Eldesi.....	21
2.5. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	22
2.6 DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi.....	22
2.7 DNA'nın Konsantrasyonunun Ayarlanması.....	23
2.8 Mitokondrial <i>ND4</i> ve <i>Cyt b</i> Gen Bölgelerinin PCR Yöntemi İle Çoğaltılması.....	23
2.8.1 Primerler.....	23
2.8.2 PCR Reaksiyonları.....	24
2.8.3 PCR Programları.....	25
2.8.4 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	26
2.8.5 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	26
2.9 DNA Dizi Analizi Reaksiyonu.....	27
2.10 Dizilerin Okunması.....	27
2.11 Dizilerin Hizalanması.....	27
2.12 Analizde Kullanılacak Veri Setlerinin Hazırlanması.....	28
2.13 Filogenetik Analizler: Distance (Uzaklık) Analizi.....	28
2.14 Filogenetik Analizler: Parsimony (Tutumluluk) Analizi.....	29

2.15 Filogenetik Analizler: Likelihood (Maksimum olasılık) Analizi	29
2.16 Filogenetik Analizler: Bayesian Analizi	29
2.17 Mitokondrial DNA Haplotiplerinin Genetik Çeşitlilik Parametreleri	30
3. BULGULAR	31
3.1 Baz Kompozisyonu	31
3.1.1 <i>ND4</i> (mtDNA) Bölgesi	31
3.1.2 <i>Cyt b</i> (mtDNA) Bölgesi	33
3.2 <i>ND4</i> ve <i>Cyt b</i> Gen Bölgeleri Haplotip Dağılımı	35
3.3 Filogenetik Analizler	40
3.3.1 <i>ND4</i> Gen Bölgesi	40
3.3.2 <i>Cyt b</i> Gen Bölgesi	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Testudo</i> kompleksi üyelerinin dünya üzerindeki yayılış alanı	2
Şekil 1.2. <i>Testudo</i> (s.l) cinsi türlerinin coğrafi dağılımı.....	2
Şekil 2.1. Ülkemizde yayılış gösteren morfolojiye dayanarak tanımlanmış taksonlar	17
Şekil 2.2. Örneklerin toplandığı lokaliteler	18
Şekil 3.1. JC baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı	45
Şekil 3.2. Heuristic Search sonrası elde edilen parsimonik ağaçlar	46
Şekil 3.3. Parsimoni analizi sonucu elde edilen dört ağacı özetleyen 50% Majority Rule Consensus ağacı.....	47
Şekil 3.4. TIM baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş olan Maksimum olasılık (ML) ağacı.....	48
Şekil 3.5. 239 örneğe ait <i>ND4</i> bölgesi Parsimoni Network ilişkisi.....	49
Şekil 3.6. K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı	54
Şekil 3.7. Parsimoni analizi sonucu elde edilen 4 ağacı özetleyen 50% Majority Rule Consensus ağacı.....	55
Şekil 3.8. HKY+G baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş olan Maksimum olasılık (ML) ağacı.....	56
Şekil 3.9. <i>ND4</i> soy hatlarının ülkemizdeki dağılımı	57
Şekil 3.10. <i>Cyt b</i> soy hatlarının ülkemizdeki dağılımı	58

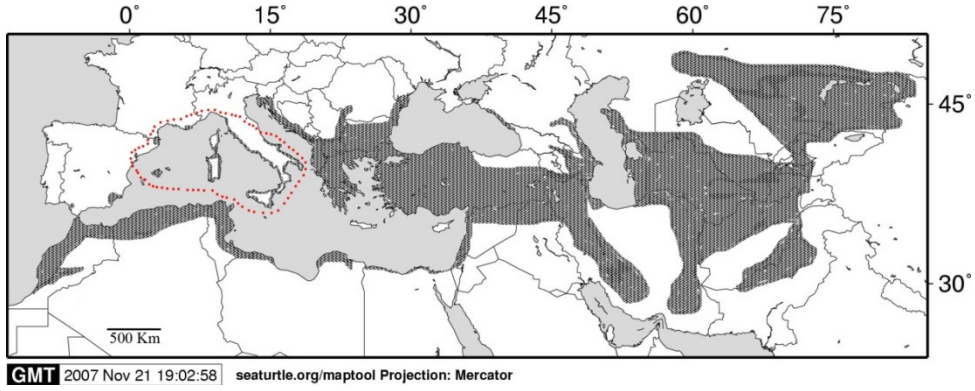
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Örneklerin toplandığı lokaliteler.....	9
Çizelge 2.2. Analizde kullanılmak üzere GenBank'tan alınan <i>ND4</i> dizileri.....	12
Çizelge 2.3. Analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan alınan <i>Cyt b</i> dizileri .	13
Çizelge 2.4. Kullanılan primerler.....	24
Çizelge 2.5. <i>ND4</i> gen bölgesi için kullanılan Master Mix bileşenleri ve konsantrasyonları.....	25
Çizelge 2.6. <i>Cyt b</i> gen bölgesi için kullanılan Master Mix bileşenleri ve konsantrasyonları.....	25
Çizelge 2.7. <i>ND4</i> gen bölgesi PCR programı.....	26
Çizelge 2.8. <i>Cyt b</i> gen bölgesi PCR programı.....	26
Çizelge 3.1. <i>ND4</i> dizileri Tajima's Neutrality Test sonuçları.....	31
Çizelge 3.2. <i>ND4</i> gen bölgesi kullanılarak hesaplanan Ham Nükleotid Çeşitliliği (Dxy), Net Nükleotid Çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği.....	32
Çizelge 3.3. <i>Cyt b</i> dizileri Tajima's Neutrality Test sonuçları.....	33
Çizelge 3.4. <i>Cyt b</i> gen bölgesi kullanılarak hesaplanan Ham Nükleotid Çeşitliliği (Dxy), Net Nükleotid Çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği.....	34
Çizelge 3.5. Lokalitelere göre <i>ND4</i> ve <i>Cyt b</i> haplotiplerinin dağılımı.....	35
Çizelge 3.6. Parsimonik dört ağacı karşılaştıran Kishino-Hasegava Test sonuçları.....	40
Çizelge 3.7. Parsimonik 12 ağacı karşılaştıran Kishino-Hasegava Test sonuçları.....	50

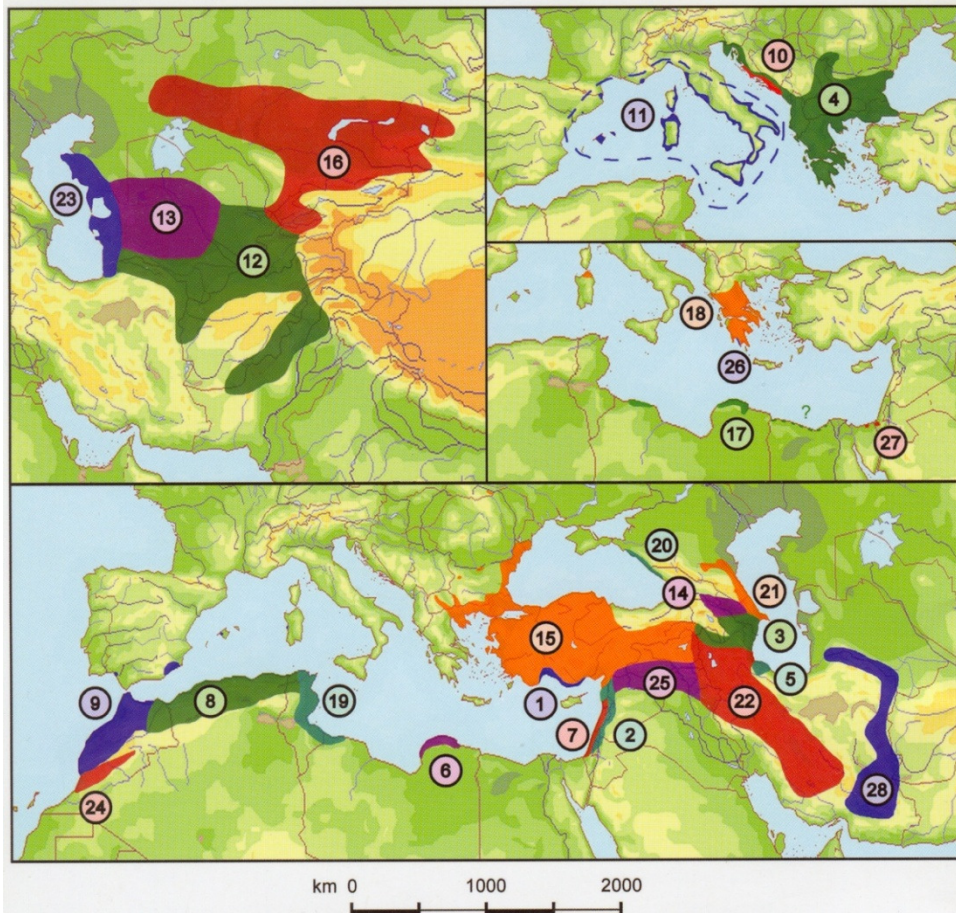
1. GİRİŞ

Testudinidae familyası 17 cins 47 türden oluşan geniş bir gruptur (Rhodin vd., 2010). Bu geniş grubun bir üyesi olan *Testudo* kompleksi morfolojik olarak bazı uzmanlara göre tanımlanmış 28 taksondan (Guyot vd., 2004) son zamanda yapılmış bir çalışmaya göre ise 20 taksondan (Rhodin vd., 2010) oluşmaktadır. Ancak özellikle son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar morfolojik olarak tanımlanmış bazı taksonların aslında genetik olarak farklı olmadıklarını ortaya koymuştur (Van der Kuyt vd., 2002, 2005; Parham vd., 2006b; Fritz vd., 2007). Rhodin vd. (2008) tarafından oluşturulan listeye göre *Testudo* kompleksi içinde üç tür (*Testudo graeca*, *Testudo marginata* ve *Testudo kleinmanni*) yer almaktadır. *Testudo horsfieldii* ve *Testudo hermanni* ise *Agrionemys* cinsi içinde değerlendirilmiş fakat bunun yanında parantez içinde “veya *Testudo*” ibaresi de kullanılmıştır. Fritz vd., (2009) tarafından yapılan son çalışmada *Agrionemys horsfieldii* türünün *T. horsfieldii* olarak sınıflandırılması gerektiği belirtilmiştir. Bu son durumda *Testudo* kompleksi içerisindeki tür sayısı beştir. Yine Rhodin vd. (2010) yayınladıkları güncellemede *Testudo* cinsi içerisinde beş tür değerlendirmiştir. Bu türler *Testudo graeca*, *Testudo kleinmanni*, *Testudo marginata*, *Testudo* (veya *Chersine*) *hermanni* ve *Testudo* (veya *Agrionemys*) *horsfieldii* olarak sıralanmıştır.

Testudo Linnaeus, 1758 cinsi güneybatı Paleartik Bölgesi'nin büyük bir kısmında yayılış göstermektedir (Ernst vd., 2000; Fritz ve Cheylan, 2001). Bu yayılışta en büyük payı Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarında yayılış gösteren *T. graeca* kompleksi almaktadır. Bu küçük yapılı Akdeniz taksonu uygun çevre ve iklim koşullarının olduğu geniş bir coğrafyada yayılış gösterir. Doğu İran'dan Fas'ın Atlantik kıyılarına, Güneyde Libya'nın Cyrenaica Yarımadası'ndan kuzeyde Tuna Nehri Havzası'na kadar yayılış göstermektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 *Testudo* kompleksi üyelerinin dünya üzerindeki yayılış alanı.



Şekil 1.2. *Testudo* (s.l) cinsi türlerinin coğrafi dağılımı (Guyot vd., 2004); 1. *Testudo anamurensis*, 2. *T. antakyensis*, 3. *T. armeniaca*, 4. *T. boettgeri*, 5. *T. buxtoni*, 6. *T. cyrenaica*, 7. *T. floweri*, 8. *T. graeca*, 9. *T. cf. graeca*, 10. *T. hercegovinensis*, 11. *T. hermanni*, 12. *T. horsfieldii*, 13. *T. cf. horsfieldii*, 14. *T. iberica*, 15. *T. cf. iberica*, 16. *T. kazachstanica*, 17. *T. kleinmanni*, 18. *T. marginata*, 19. *T. nabeulensis*, 20. *T. nikolskii*, 21. *T. pallasi*, 22. *T. perses*, 23. *T. rustamovi*, 24. *T. soussensis*, 25. *T. terrestris*, 26. *T. weissingeri*, 27. *T. wernerii*, 28. *T. zarudnyi*.

Testudo graeca Linneaus, 1758 uzun yıllar 4-6 alttüre sahip tek bir tür olarak değerlendirilmiştir (Mertens, 1946; Wermuth, 1958; Wermuth ve Mertens, 1961, 1977; Anderson, 1979; Ernst ve Barbour, 1989; Gasperetti vd., 1993; Fritz vd., 1996; Ernst vd., 2000). Fakat son zamanlarda morfolojiye dayalı pek çok yeni tür ve alttür tanımlanmıştır (Chkhikvadze ve Tuniyev, 1986; Weissinger, 1987; Highfield ve Martin, 1989 a, b, c; Highfield, 1990; Chkhikvadze ve Bakradze, 1991, 2002; Perälä, 1996, 2002a; Pieh, 2001; Pieh ve Perälä, 2002, 2004). Kompleks bazı yazarlar tarafından (Bour, 1989; Highfield ve Martin, 1989 a, b, c; Highfield, 1990; Gmira, 1993a, b, 1995; David, 1994; Pieh, 2001; Perälä, 2002a, b; Pieh ve Perälä, 2002, 2004; Guyot vd., 2004) 28 kadar türe ayrılmıştır. Bahsi geçen bu türler ve yayılış alanları Şekil 1.2’de verilmiştir.

Highfield (1990), Perälä (1996) gibi bazı araştırmacılar Mertens (1946) ve Wermuth (1958)’un hipotezine karşı çıkarak *T. iberica*’nın Kuzey Afrika formu olan *T. graeca*’dan ayrı, iyi bir biyolojik tür olduğunu öne sürmüştür. Yine Fritz vd., (1996) kompleksin kötü bir şekilde tanımlandığını aslında kompleksin iki farklı soy hattının olduğunu belirtmiştir. Bu soy hatlarından ilkinin İspanya, Kuzey Afrika ve Levant kıyası boyunca yayılan küçük boyutlu ve açık renkli bireyleri, ikincisinin ise kompleksin geri kalan kısmında yayılış gösteren daha iri ve koyu renkli formları kapsadığını söylemiştir.

Son yıllarda özellikle Batı Akdeniz’de mitokondrial DNA (mtDNA) varyasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Alvarez vd., 2000; van der Kuyl vd., 2002, 2005; Harris vd., 2003). Bu çalışmalarda yavaş evrimleşen 12S rRNA, *Cyt b* bölgesinin 426 baz çiftlik (bç) küçük bir kısmı ve 411 bç D-Loop bölgeleri kullanılmış ve çok fazla genetik farklılık tespit edilememiştir. Van der Kuyl vd., (2005)’te iki ana soy hattı ortaya çıkmıştır, bunlardan birisi Kuzey Afrika diğeri ise Ortadoğu ve

Türkiye’dir. Bu çalışmada araştırmacılar Afrika soy hattının *T. graeca*, Orta Doğu ve Türkiye’de de bulunan soy hattının *T. iberica* olarak değerlendirilmesi gerektiğini söylemiştir. Yine bu çalışma ve bundan sonraki çalışmalarda bu güne kadar tanımlanmış olan alttürlerin genetik olarak farklılık göstermediği konusunda birleşmişlerdir. Buna karşın Semyenova vd., (2004) ve Korsunen vd., (2005) nükleer genomik fingerprint (Randomly Amplified Polymorphic DNA = RAPDs) yaparak dört farklı doğu takson ortaya koymuştur. Bu taksonlar *T. graeca iberica*, *T. graeca nikolskii*, *T. graeca pallasi* ve *T. graeca terrestris*’tir. RAPDs ile elde edilen sonuçların taksonlara özgü değil de popülasyonlara özgü farklılıkları yansıttığı göz önünde bulundurulduğunda (Haig vd., 1994, 1997; Prior vd., 1997; Tassanakajon vd., 1997; Gomes vd., 1998; Vanlerberghe-Masutti ve Chavigny, 1998; Palkovacs vd., 2003) bu karşıt bulguların sürpriz olmadığı görülmektedir. Daha sonra Parham vd., (2006b) *ND4* gen bölgesini kullanarak doğu taksonları üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmada kompleksin monofiletik olduğu ve altı ana soy hattına ayrıldığı, bu soy hatlarından bazılarında dahil olan yeni tanımlanmış bazı taksonların genetik olarak diğer taksonlarla tamamen benzer olduğu veya çok düşük değerlerde farklılıklara sahip oldukları belirtilmiş ve bu soy hatları hakkında sistematik olarak bilgi verilebilmesinin morfolojik ve diğer çalışma sonuçlarının entegrasyonu ile mümkün olabileceği belirtilmiştir. Yine Fritz vd., (2007) daha hızlı evrimleşen ve 12S rRNA’ya göre daha bilgi verici olan *Cyt b* bölgesini kullanarak kompleksi çözmeye çalışmıştır. Bu çalışmada, *Cyt b* verilerine göre kompleksin monofiletik olduğu ve altı ana soy hattına ayrıldığı görülmüş bu soy hatları alttür olarak kabul edilmiştir. Aynı çalışmada yapılan ISSR fingerprint çalışmalarına göre kompleks “conspezifik” olarak değerlendirilmiştir. Diğer çalışmalara göre bölgesel olarak daha kapsamlı olan Parham vd., (2006b) ve Fritz vd., (2007) çalışmalarının eksik noktası kompleksin 6 ana soy hattından 4 tanesinin yayılış gösterdiği ülkemizden örnekleme az olmasıdır. Parham vd., (2006b) ve Fritz vd., (2007) çalışmalarının ortak noktaları her iki çalışmanın da *Testudo* kompleksinin monofiletik olduğunu kabul etmesi, 6 ana soy hattı belirlemeleri ve daha hızlı evrimleşen gen bölgelerini kullanmalarıdır. İki araştırmacının ayrıldığı temel nokta ise Parham vd., (2006b)’nin ana soy hatlarının taksonomik durumunun çözümü için morfoloji vb. gibi araştırmaların sonuçlarının da entegrasyonu ile bir sonuca varılması gerektiğini öne sürmesidir. Zira Fritz vd. (2007) bu ana soy hatlarını bir alttür olarak kabul etmiştir. Yine Fritz vd. (2007) 6 soy hattından 4 ‘ü Kafkaslarda ve çevresinde bulunduğu için bu bölgenin “yayılış merkezi” olduğu fikrini öne sürmüştür. Halbuki Türkiye’den Hakkari ve

civarından örnekleri bulunmadığı için *buxtonii*”*perses*” soy hattının Türkiye’de de bulunduğunu tespit edememişlerdir.

Morfolojik veriler dikkate alındığında ülkemiz sınırları içerisinde bu türlerden dört tanesi yayılış göstermektedir. Morfolojik verilere göre ülkemizde bulunan türler *T. hermanni* Gmelin, 1789, *T. graeca* Linnaeus, 1758, *T. antakyensis* Perälä, 1996 ve *T. perses* Perälä, 2002’tir. Bu taksonlardan bazıları komşu ülkelerde de yayılış göstermektedir. *T. hermanni* ülkemizde Trakya ile sınırlı bir yayılışa sahiptir ve yayılış alanında *T. graeca* ile simpatrik olarak bulunur. Bu tür doğu taksonu olan *T. hermanni boettgeri* Mojosissovics, 1889 ile temsil edilir. *T. graeca* ise en geniş yayılışa sahiptir ve ülkemizde *T. graeca iberica* Pallas, 1814; *T. g. terrestris*, Forsskal, 1775; *Testudo g. anamurensis* Weissinger, 1987 ve *Testudo g. armeniaca* Chkhikvadze ve Bakradze, 1991 alttürleri ile temsil edilir. *T. antakyensis* ve *T. perses* ülkemizdeki monotipik türlerdir.

Kompleksin ülkemizdeki taksonomik durumuna bakıldığında uzun yıllar Mertens, 1946 ve Wermuth, 1958 tarafından ortaya konulan durum kabul görmüştür. Başoğlu ve Baran, 1977; Baran ve Atatür, 1998’e göre ülkemizde *T. graeca* Linnaeus, 1758 ve *T. hermanni* Gmelin, 1789 olmak üzere iki tür bulunmaktadır. Perälä 2002a’da İskenderun Körfezi civarında *T. antakyensis* Perälä, 1996 türünün yayılış gösterdiği belirtilse de bu durum çok fazla kabul görmemektedir. Ayrıca Brinckmeier vd., 1989 tarafından Efes antik kenti civarından *T. marginata* Schoepff, 1792 türü rapor edilmiştir. Bu türün yanlış kayıt olduğu birçok araştırmacı tarafından (Perälä, 1996; Baran ve Atatür, 1998) belirtilmiş fakat Demirsoy (1997) tarafından Türkiye kara kaplumbağaları listesine alınmıştır. Türkozan vd., (2001) tarafından yapılan bir çalışma ile bu kayıt Türkiye kara kaplumbağaları listesinden çıkartılmıştır. Benzer şekilde Türkozan vd. (2010) tarafından tüm Türkiye’yi kapsayan çalışmada da bu türün varlığından söz edilmemektedir. İran’da Zagros Dağları’ndan tanımlanan *T. perses* Perälä, 2002 türünün Hakkari Esendere civarında bulunduğu Perälä tarafından daha önce belirtilmiş ve Türkozan vd., (2004) tarafından bu türün ülkemizdeki varlığı muhtemel yayılış alanı ile birlikte kesinleştirilmiştir.

Ülkemizde *Testudo* cinsinin taksonomik durumu ve ekolojisi ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı sınırlıdır. Çevik (1982) Trakya bölgesi kara kaplumbağaları hakkında bilgi vermiştir. Tok (1999) Reşadiye Yarımadası’ndaki *T. g. iberica*

popülasyonlarının taksonomik durumlarını ekolojik özelliklerine de değinerek bir çalışma yapmıştır. Taşkavak vd., (2002) Ege ve Akdeniz Bölgesindeki *T. graeca* popülasyonları arası morfolojik farklılığı vurgulamıştır. Türkozan vd., (2003a) Türkiye'nin Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki *T. graeca* popülasyonlarını morfolojik ve serolojik olarak karşılaştırmıştır ve aralarında bir fark olmadığını belirtmiştir. Yine Türkozan vd., (2003b) Mardin ve çevresi kara kaplumbağaları hakkında bilgi vermiştir. Yine Türkozan vd., (2005a) İç Anadolu *Testudo* örneklerini Ege ve Güneydoğu Anadolu örnekleri ile karşılaştırmış ve morfolojik bazı farklılıklar ortaya koymuştur. Benzer şekilde Türkozan vd., (2005b) Trakya ve Anadolu'da yaşayan *T. graeca* ve *T. hermanni* popülasyonlarının dağılışı, popülasyon durumları ve taksonomisi hakkında bilgi vermiştir. Türkiye'de morfolojik olarak yayılış gösteren tüm taksonları temsil edecek şekilde tüm Türkiye'den örnekler içeren ve taksonların multivaryans analizi ile morfometrik karşılaştırılmasında (Türkozan vd., 2010) *T.g. armeniaca* ve *T. perses* taksonlarının morfometrik olarak diğer gruplardan ayrıldığını ancak Akdeniz kıyısı boyunca yayılış gösteren farklı 3 taksonun (*T.g. anamurensis*, *T. antakyaensis* ve *T.g. terrestris*) Perälä (2002a)'nın aksine morfometrik olarak farklılık göstermediği ortaya konulmuştur. Aslında bu çalışmada ortaya çıkan görüntü bir bakıma Parham vd., 2006b ve Fritz vd. 2007 çalışmalarında ortaya çıkan ana soy hatlarının bir bakıma morfometrik olarak yansımalarıdır. Diğer yandan Ermenistan'da yayılış gösteren *T.g. armeniaca*'ya baktığımızda bazı popülasyonların morfolojik olarak tipik *armeniaca* formundan farklı olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak yapılan çalışmaların tüm sonuç ve tartışmaları göz önüne alındığında tüm yayılış alanı içinde *Testudo* kompleksinin müthiş bir morfolojik varyasyon gösterdiğini, morfolojik olarak farklı görünen ve bu yüzden farklı taksonlar olarak tanımlanan grupların aslında genetik olarak benzer olduklarını kısacası sadece morfolojik, morfometrik veya genetik yaklaşımın bu grubun taksonomik durumunu çözmede yeterli olmadığını anlıyoruz.

Bu çalışmanın amacı son zamanlarda yapılan iki çalışmada (Parham vd., 2006b; Fritz vd, 2007) kullanılan hızlı evrimleşen *ND4* ve *Cyt b* gen bölgelerini kullanarak hemen hemen ülkemizdeki tüm yayılış alanından örnekler elde ettiğimiz kompleksin ülkemizde bulunan soy hatlarını belirlemek ve bu soy hatlarının yayılış sınırlarını çizmektir. Ayrıca yaptığımız çalışmada GENBANK'ta bulunan ve Orta Doğu'da yayılış gösteren diğer *Testudo* cinsi içindeki taksonlara ait diziler indirilerek ülkemizde yayılış gösteren taksonların diğer gruplarla

evrimsel akrabalık ilişkilerini, yani filogenisini belirlemek bu çalışmanın diğer önemli bir amacıdır. Yapılan çalışma özellikle türün korunmasına yönelik yönetim planlarının hazırlanmasında, sınırlarda yakalanan bu türe ait canlı örneklerin nereden geldiklerinin belirlenmesinde önemli rol oynayacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması Ve Saklanması

Testudo kompleksinin ülkemizde yayılış gösterdiği tüm lokaliteleri ve morfolojik olarak tanımlanmış taksonları temsil edecek şekilde 100 farklı lokaliteden 205 örnek mtDNA (*ND4* (NADH dehydrogenase subunit 4) ve *Cyt b* (cytochrome b)) varyasyonunu tespit edebilmek için kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Araştırma materyalinin bir kısmı 2003-2006 tarihleri arasında Doç. Dr. Oğuz Türkozan yürütücülüğünde sonuçlandırmış olduğumuz “*Türkiye Kara Kaplumbağalarının Sistematik Revizyonu, Ekolojileri ve Populasyon Durumları*” (TÜBİTAK 102T104) isimli proje esnasında toplanmıştır. Bu proje sırasında örnek elde edilemeyen, ek örnek ihtiyacı olan ve ön analizlerimiz sonucunda örnek toplanmasına ihtiyaç duyulan bölgelerden projemiz kapsamında gerçekleştirilen arazi çalışmaları ile yeni örnekler elde edilmiştir. Ayrıca *ND4* bölgesi için 34 dizi (Çizelge 2.2) ve *Cyt b* bölgesi için 71 dizi (Çizelge 2.3) GenBank’tan alınmıştır. GenBank’tan alınan dizilerin bazıları morfolojik olarak tanımlanan taksonların tip lokalitelerinden toplanmış topotipleri de içermektedir.

Çalışma materyali, kaplumbağalardan alınan tırnak örneklerinden oluşmaktadır. Zaman zaman bulunan kaplumbağalara ait kemiklerden de örnekleme yapılmıştır. Örnekler toplanırken kontaminasyonu önlemek amacıyla her bireyde steril malzeme kullanılmış, tekrarlı örneklemeyi engellemek için bireylerin karapaslarına birkaç gün içerisinde silinen bir kalemle işaret konmuş veya arazi çalışması yapılan bir lokaliteye ikinci bir defa gidilmemiştir. Örneklerin toplandığı lokalitelerin GPS (Garmin eTrex Vista) ile koordinatları ve deniz seviyesinden yüksekliği tespit edilmiştir. Bu lokaliteler Çizelge 2.1’de ve Şekil 2.2’te gösterilmiştir.

Elde edilen tüm materyal laboratuvar çalışmalarına başlanıncaya kadar %98’lik etil alkol içerisinde ve +4°C’de korunmuştur.

Çizelge 2.1. Örneklerin toplandığı lokaliteler.

Lokalite	N	Lok. No	Enlem N	Boylam E	Yükseklik (m)
Edirne/Karaağaç	2	1	41° 39.385	26° 31.782	40
Edirne/Lalapaşa	4	2	41° 52.498	26° 41.194	268
Kırklareli/Pınarhisar Civarı	1	3	41° 36.956	27° 39.673	322
Kırklareli/Vize	1	4	41° 35.275	27° 48.340	385
Kırklareli/Çakılı	1	5	41° 30.400	27° 53.093	158
Kırklareli/ Vize/ Bahçeköy	1	6	41° 34.558	28° 06.060	84
Tekirdağ/ Malkara /Ereke	2	7	40° 53.688	27° 06.065	204
Tekirdağ/ Şarköy	1	8	40° 38.634	27° 05.582	86
Tekirdağ/ Şarköy-Evreşe	2	9	40° 38.148	26° 56.706	40
Çanakkale/ Truva	2	10	39° 57.215	26° 16.793	72
Balıkesir	2	11	39° 38.277	27° 52.726	166
Balıkesir/ Bandırma	2	12	40° 19.849	28° 00.053	58
Bursa	3	13	40° 13.370	28° 51.737	110
Bilecik	3	14	40° 07.392	29° 59.923	357
İzmit/ Gölcük	3	15	40° 40.957	29° 57.916	188
İzmit/ Sapanca	2	16	40° 40.690	30° 13.845	124
İzmit/ Kandıra-Şile arası	1	17	41° 05.682	29° 45.210	90
Kütahya-Afyonkarahisar yolu	1	18	39° 14.780	30° 06.319	
Afyonkarahisar-Antalya yolu	1	19	38° 38.598	30° 18.553	
Afyonkarahisar/ İncehisar	2	20	38° 52.308	30° 50.025	
Afyonkarahisar/ Çay	2	21	38° 35.525	30° 59.439	994
Sandıklı-Dinar arası	1	22	38° 13.196	30°11.061	
Isparta/ Eğirdir	2	23	37° 52.937	30° 45.806	998
Isparta-Ağlasun arası	2	24	37° 37.889	30° 37.510	
Burdur /Harmanlı	1	25	37° 34.867	29° 54.465	1061
Denizli/ Acıpayam	2	26	37° 21.866	29° 20.225	985
Denizli/ Tavas	3	27	37° 36.926	29° 09.316	1104
Manisa/ Gölarmara	2	28	38° 37.339	27° 56.256	85
Muğla /Kızılağaç	1	29	37° 05.011	28° 21.772	
Muğla/ Fethiye/ Günlüklü	3	30	36° 43.310	29° 01.910	

Çizelge 2.1. devamı

Muğla/Fethiye/ Letoon	3	31	36° 24.021	29° 17.635	
Antalya/ Kalkan-Kaş yolu	1	32	36° 12.648	29° 33.451	
Antalya/ Demre	1	33	36° 14.260	29° 58.372	
Antalya/ Kumluca-Kemer arası	1	34	36° 25.058	30° 25.301	
Antalya/ Perge	1	35	36° 57.086	30° 51.186	
Manavgat_Akseki Arası	1	36	36° 45.123	31° 31.178	
Kızılot-Akseki yolu	2	37	36° 45.870	31° 38.586	
Antalya/ Akseki	1	38	37° 01.884	31° 45.691	953
Konya / Hadim	2	39	36° 58.579	32° 25.826	1605
Gazipaşa-Anamur arası	3	40	36° 08.596	32° 27.608	
Mut-Ermenek Yolu	1	41	36° 39.655	33° 23.201	183
Silifke-Mut arası	1	42	36° 36.908	33° 26.460	
Bozyazı-Gülнар yolu	1	43	36° 11.993	33° 21.637	
Konya /Karapınar/Meke Gölü	7	44	37° 41.061	33° 38.813	
Konya/Cihanbeyli/Kırkışla	1	45	38° 34.970	32° 53.429	
Ankara/ Nallıhan	2	46	40° 10.338	31° 19.704	
Bolu /Mengen	1	47	40° 55.621	32° 04.243	680
Zonguldak	3	48	41° 26.972	31° 45.684	52
Bartın/ Amasra	2	49	41° 42.107	32° 21.785	235
Kastamonu/ Safranbolu	2	50	41° 12.370	32° 53.982	407
Kastamonu /Araç	1	51	41° 17.215	33° 26.630	845
Kastamonu/ İnebolu Aşağıçaylı	1	52	41° 56.221	33° 45.244	300
Kastamonu/Taşköprü	1	53	41° 31.321	34° 06.412	700
Kastamonu/ Tosya	1	54	41° 00.238	34° 03.472	
Sinop /Gerze	2	55	41° 42.150	35° 10.238	
Samsun	4	56	41° 22.031	36° 11.132	207
Amasya /Ovasaray	3	57	40° 31.580	35° 44.398	423
Çorum	2	58	40° 07.659	34° 11.207	645
Yozgat	2	59	39° 41.583	34° 36.981	953
Ürgüp-Avanos yolu	3	60	38° 40.317	34° 53.351	

Çizelge 2.1. devamı

Nevşehir	4	61	38° 38.192	34° 42.429	
Sivas	3	62	39° 47.457	37° 07.277	
Tokat /Çamlıbel	1	63	40° 28.519	37° 07.277	
Tokat/ Akbelen	1	64	40° 24.269	36° 41.425	
Sivas /Suşehri	1	65	40° 07.790	38° 13.063	882
Adana/ Saimbeyli	2	66	38° 12.304	36° 02.747	1628
Adana/ Kadırlı	1	67	37° 23.262	36° 06.235	
Adana /Kozan/ Çulluuşağı	1	68	37° 41.060	35° 52.535	722
Adana	1	69	36° 59.260	35° 21.533	
Adana/ Ceyhan	3	70	36° 53.100	35° 55.037	55
Adana/Ceyhan /İncirli	4	71	37° 31.962	35° 35.383	183
Hatay /Dört Yol/ Çaylı	5	72	36° 50.620	36° 12.004	47
Hatay/ Antakya	4	73	36° 24.003	36° 12.135	
Kilis-Hassa Arası	1	74	36° 50.403	36° 37.164	
Kahramanmaraş	3	75	37° 29.494	37° 01.430	635
Kilis	1	76	36° 44.280	37° 04.358	
Gaziantep	2	77	36° 59.515	37° 16.206	
Narlı-Gölbaşı yolu	2	78	37° 34.853	37° 29.530	922
Malatya	4	79	38° 09.077	37° 57.713	1142
Elazığ	2	80	38° 38.849	39° 15.457	1028
Diyarbakır	5	81	38° 03.071	40° 04.161	706
Mardin	2	82	37° 18.420	40° 54.313	
Batman /Beşiri	4	83	37° 54.591	41° 16.905	798
Siirt /Eruh/ Sağlarca Köyü	1	84	37° 49.352	41° 52.416	507
Van/ Yelkenli	5	85	38° 28.350	42° 32.876	1792
Şırnak	4	86	37° 40.885	42° 18.961	1527
Hakkari/ Yüksekova	3	87	37° 40.919	44° 04.379	1692
Hakkari-Başkale yolu	4	88	37° 43.623	44° 05.018	1695
Van/ Erciş	2	89	38° 58.339	43° 36.340	1702
İğdır/ Aralık/Nahçıvan Sınırı	1	90	39° 47.929	44° 35.500	809
İğdır/ Aralık	2	91	39° 53.031	44° 29.293	828
Muş-Varto Yolu	2	92	38° 59.755	41° 30.927	1282
Muş/ Solhan	1	93	38° 57.506	41° 07.110	1577
Bingöl /Genç	4	94	38° 39.116	40° 29.736	1266

Çizelge 2.1. devamı

Şanlıurfa	1	95	37° 13.146	38° 56.292	
Adana/ Sarioğlan	1	96	38° 42.362	36° 20.349	
Hatay/ İskenderun	1	97	36° 35.028	36° 10.318	
Balıkesir/ Ayvalık	1	98	39° 17.078	26° 41.010	
Erzincan /Kemaliye	1	99	39° 10.082	38° 38.573	
Hatay/ Kırıkhan	1	100	36° 29.368	36° 17.126	

Çizelge 2.2. Analizde kullanılmak üzere GenBank'tan alınan *ND4* dizileri.

	No	Orijin	Haplotip	Kaynak
<i>Agrionemys horsfieldii</i>	DQ080045		Hap_17	Parham vd 2006a
<i>Testudo hermanni</i>	EF100728		Hap_16	Parham vd 2006b
<i>Testudo kleinmanni</i>	DQ080048		Hap_18	Parham vd 2006a
<i>Testudo marginata</i>	DQ080047		Hap_19	Parham vd 2006a
<i>Testudo graeca</i>	DQ080049	Tunus	Hap_50	Parham vd 2006a
<i>Testudo graeca</i>	EF100729	Cezayir	Hap_20	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100730	İsrail	Hap_4	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	DQ080050	Türkiye	Hap_6	Parham vd 2006a
<i>Testudo graeca</i>	EF100731	Türkiye	Hap_5	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100732	Türkiye	Hap_1	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100733	Türkiye	Hap_3	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100734	Türkiye	Hap_7	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100735	Türkiye	Hap_2	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100736	Bulgaristan	Hap_9	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100737	Gürcistan	Hap_8	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100738	Rusya	Hap_8	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100739	Türkiye	Hap_8	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100740	Türkiye	Hap_8	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100741	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100742	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100743	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100744	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100745	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100746	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100747	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100748	İran	Hap_10	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100749	İran	Hap_12	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100750	İran	Hap_11	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100751	İran	Hap_11	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100752	İran	Hap_11	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100753	İran	Hap_11	Parham vd 2006b

Çizelge 2.2. devamı

<i>Testudo graeca</i>	EF100754	İran	Hap_11	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100755	Ermenistan	Hap_13	Parham vd 2006b
<i>Testudo graeca</i>	EF100756	Ermenistan	Hap_14	Parham vd 2006b

Çizelge 2.3. Analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan alınan *Cyt b* dizileri

	No	Orijin	Haplotip	Kaynak
<i>Testudo marginata</i>	AJ888318	Yunanistan	Cyt1	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888341	Libya	Cyt2	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888342	İspanya	Cyt3	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230965	Fas	Cyt3	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888344	İsrail	Cyt5	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888343	İtalya	Cyt4	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888345	İsrail	Cyt6	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230947	İsrail	Cyt6	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231006	İsrail	Cyt6	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AF888346	Ürdün	Cyt7	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230954	Suriye	Cyt7	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230955	Suriye	Cyt7	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230956	Suriye	Cyt7	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888347	Türkiye	Cyt8	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888349	Bulgaristan	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888350	Bulgaristan	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230973	Rusya	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231014	Yunanistan	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231015	Yunanistan	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231016	Yunanistan	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231018	Romanya	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231020	Romanya	Cyt9	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888351	Yunanistan	Cyt10	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888352	Yunanistan	Cyt11	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AJ888353	Türkiye	Cyt12	Fritz vd. 2007
<i>Testudo hermanni</i>	AJ888362	İtalya	Cyt13	Fritz vd. 2007
<i>Testudo hermanni</i>	AJ888364	İtalya	Cyt13	Fritz vd. 2007
<i>Testudo horsfieldii</i>	AJ888365	Kazakistan	Cyt14	Fritz vd. 2007
<i>Testudo kleinmanni</i>	AJ888370	Bilinmiyor	Cyt15	Fritz vd. 2007
<i>Testudo kleinmanni</i>	AJ888371	Bilinmiyor	Cyt15	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230948	Türkiye	Cyt16	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231003	Türkiye	Cyt16	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230949	Suriye	Cyt17	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230950	Suriye	Cyt17	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230951	Suriye	Cyt17	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230952	Suriye	Cyt17	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230953	Suriye	Cyt17	Fritz vd. 2007

Çizelge 2.3. devamı

<i>Testudo graeca</i>	AM230993	Suriye	Cyt17	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230957	Türkiye	Cyt18	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230958	İran	Cyt19	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230959	İran	Cyt19	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230962	İran	Cyt19	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230991	İran	Cyt19	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230960	İran	Cyt20	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230961	İran	Cyt20	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230968	Azerbaycan	Cyt21	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230975	Azerbaycan	Cyt21	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230977	Azerbaycan	Cyt21	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230978	Rusya	Cyt21	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230979	Rusya	Cyt21	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230980	Rusya	Cyt21	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230970	İtalya	Cyt22	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230983	İran	Cyt23	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230986	İran	Cyt23	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230987	İran	Cyt23	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230998	İran	Cyt23	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230988	İran	Cyt24	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230989	İran	Cyt25	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230992	Suriye	Cyt26	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230995	Türkiye	Cyt27	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM230999	İran	Cyt28	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231000	Rusya	Cyt29	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231001	Rusya	Cyt30	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231002	Türkiye	Cyt31	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231004	Türkiye	Cyt32	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231010	Bulgaristan	Cyt33	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231011	Bulgaristan	Cyt34	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231012	Bulgaristan	Cyt35	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231013	Gürcistan	Cyt36	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231017	Makedonya	Cyt36	Fritz vd. 2007
<i>Testudo graeca</i>	AM231023	Türkiye	Cyt37	Fritz vd. 2007

2.2. Ülkemizde Yayılış Gösteren Morfolojik Olarak Tanımlanmış *Testudo* Taksonları

Testudo graeca iberica Pallas, 1814

Büyük boyutları, çok yüksek olmayan (*armeniaca* kadar yassı değil) geniş kabuk şekli, posterior marjinalerin yanlara doğru açılması ve entoplastronlarının humero-pektoral sulcusu geçmemesi ile diğer gruplardan ayrılır (Şekil 2.1a). Güneydoğu Avrupa'dan, Anadolu (Kuzeydoğu Anadolu, Toros Dağları'nın güneyi, Güneydoğu Anadolu bölgesi ve Doğu Anadolu bölgesinde Iğdır çevresi ve Van civarı hariç) ve Kafkaslar'da Kura Nehri vadisinde yayılış gösterir.

Testudo antakiensis Perälä 1996

Perälä tarafından suprapygal kemiklerdeki yapı, neural seri konfigürasyonu gibi iskelet farklılıkları göz önünde bulundurularak tam ve bağımsız bir tür olarak tanımlanmıştır. Morfolojik olarak diğer kaplumbağalardan oldukça küçük yapısı, kafasındaki sarı renklenme ve vücut posterioründeki marjinal plakların yanlara doğru açılmaması ile ayrılır (Şekil 2.1b). Perälä türün yayılış alanını Antakya (Amanos'ların doğusu) olarak vermiş ve Suriye, Lübnan, Ürdün ve İsrail'den bazı lokaliteleri de yayılış alanına dahil etmiştir. Ayrıca Adana ve Gaziantep popülasyonları renklenme olarak benzerlikler göstermesine rağmen vücut büyüklüğü oldukça fazladır. İskenderun örneklerinin vücut büyüklüğü Yayladağı, Samandağı ve Reyhanlı örneklerinden fazladır.

Testudo graeca terrestris Forsskal, 1775

Kabuk kısa ve kompakttır, longitudinal profili yüksektir ve düzenli bir karapasa sahiptir. 3. vertebral plak hizasında kabuk en yüksek seviyededir. Ergin erkeklerde posterior marjinal plaklar hafifçe yanlara açılmıştır (Şekil 2.1c). Türkiye İran sınırı boyunca yayılış gösterir. Ülkemizde Toros Dağları'nın güneyinde Muğla'dan başlayarak Antakya civarından Van Gölü'ne doğru uzanan bir yayılışa sahiptir. Güneydoğu Anadolu bölgesinin güneydoğu ucu (Şırnak Hakkari) hariç yayılış gösterir.

Testudo graeca anamurensis Weissinger 1987

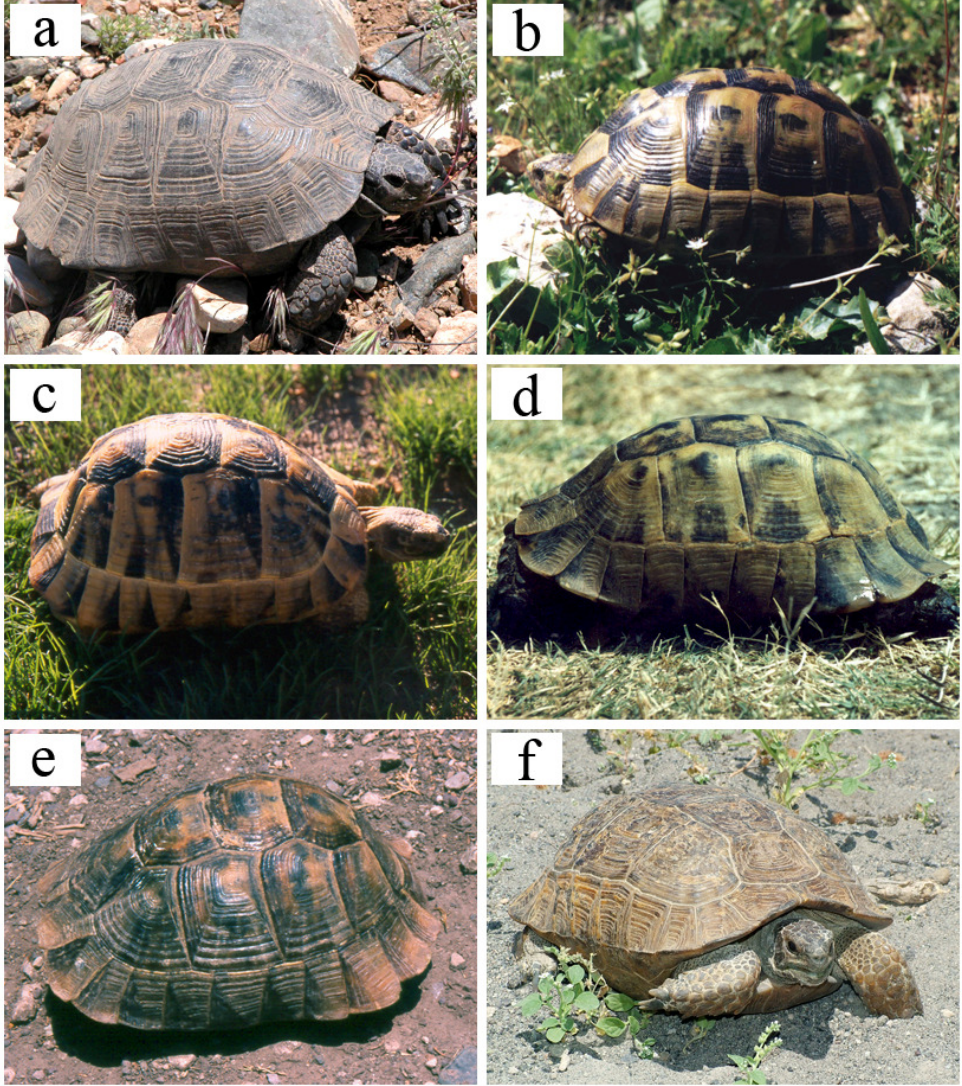
Kabuk yapısı *T. graeca iberica*'ya göre oldukça yassı, karapası dar, uzamış ve posterior marjinal plaklarının yanlara doğru daha fazla açılmış olması ile ayrılır (Şekil 2.1d). Weissinger'e göre bu alttür Bey Dağları'ndan Mersin'in batısına kadar güney sahilleri boyunca yayılış göstermektedir. Perälä'ya göre bu alttür bahsedilen ana yayılış alanının hem doğusunda hem de batısında da yayılışa devam etmektedir. Büyük ihtimalle Toros Dağları alttürün en kuzey yayılışını sınırlamaktadır. Bununla beraber yeni bulgular bu alttürün yüksek irtifalarda da yaşadığını (Akseki yolu) göstermiştir.

Testudo perses Perälä, 2002

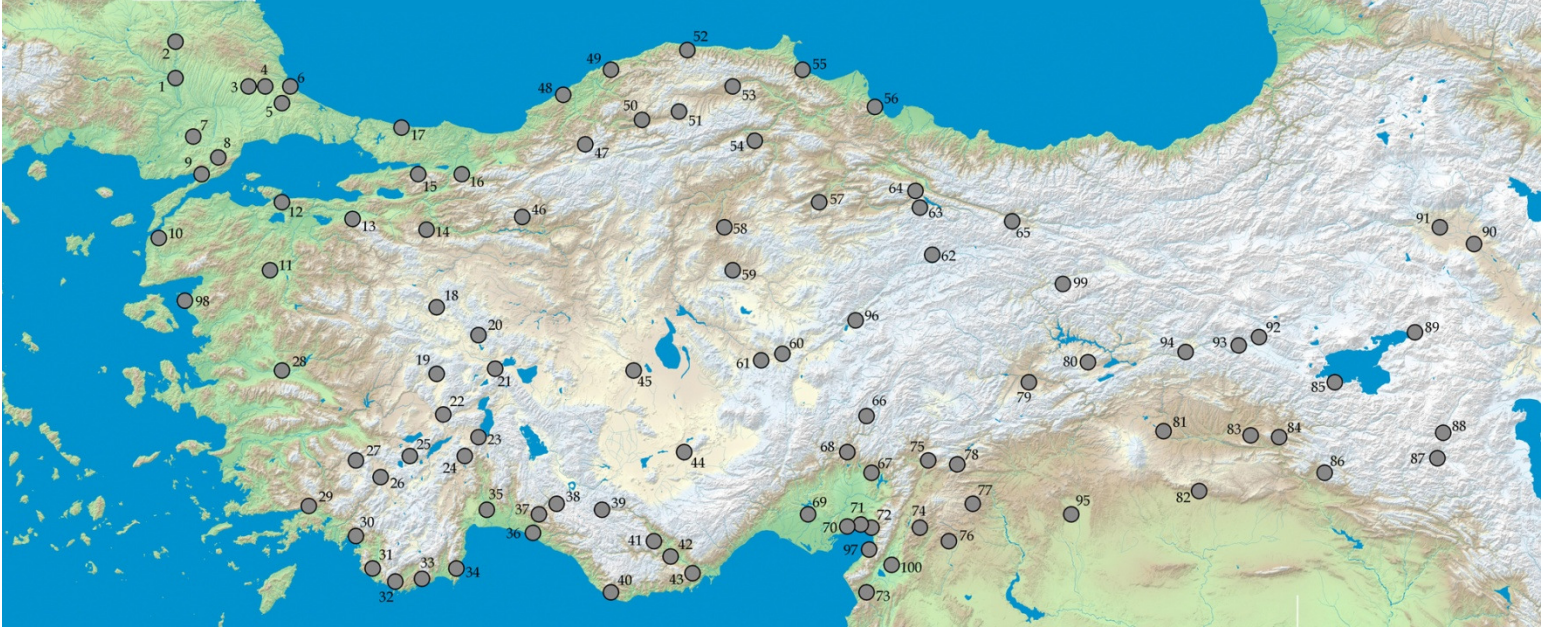
Bu takson daha önce *T.g. iberica* ve *T.g. zarudnyi* grupları içerisinde yazarlara bağlı olarak değerlendirilmiştir. Diğer kompleks üyelerinden ayrılmasında kullanılan belirgin karakterleri: birinci kostal plağın diyagonal uzunluğunun kısa olması, kısa beşinci vertebral plak ve bu plağın anterior ucu dar, çok geniş dördüncü vertebral plak, birinci vertebral geniş ve anterior ucu neural plağa doğru bir uzantı içerir (Şekil 2.1e), çok uzun ve geniş anal plak, çok uzun anal sturdur (femoral stur uzunluğundan fazla). Kuzeybatı-güneydoğu konumlu Zagros Dağları ve bu silsilenin uzantıları boyunca kuzeyde Hakkari'den (Şırnak, Başkale, Yüksekova) Esendere Urumiye Gölü'ne oradan aşağıya doğru kuzeybatı ve batı-orta İran, kuzeydoğu Irak'ta yayılış gösterir.

Testudo graeca armeniaca Chkhikvadze ve Bakradze, 1991

Bu alttür *Testudo graeca* kompleksinin en fazla özelleşmiş gruplarından biridir. *T. horsfieldii* ile birçok morfolojik özelliği -Yuvarlak kabuk şekli, hareketsiz plastronu gibi fossorial yaşamı ile ilişkili olabilecek özellikleri- paylaşır (Şekil 2.1f). Gular plak iç kısmında bulundurduğu "epiplastral çıkıntı" ayırt edici özelliklerinden birisidir. Toprağın içinde açtığı dehlizlerde yaşaması bu grup içindeki diğer türlerden ayrılan önemli bir özelliğidir. Tip lokalitesi güney Ermenistan'da Meghri'dir. Fakat Meghri civarında yuvarlak kabuklu olmayan ve hareketli plastrona sahip örneklerin de zaman zaman araştırmacılar tarafından tespit edilmiş olması bu takson için daha fazla çalışma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Ülkemizde Aralık, Iğdır civarında bulunur.



Şekil 2.1. Ülkemizde yayılış gösteren morfolojiye dayanarak tanımlanmış taksonlar: a) *T.g. iberica*, b) *T. antakiensis*, c) *T.g. terrestris*, d) *T.g. anamurensis*, e) *T. perses*, f) *T.g. armeniaca*



Şekil 2.2. Örneklerin toplandığı lokaliteler

2.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

TBE (Tris-Borik Asit-EDTA)

0.5M Tris-Base
0.5M Borik Asit
0.01M EDTA
pH 8.13-8.23

SDS

%10 SDS (w/v)
10 g SDS 100ml steril suda çözülür.

NaAc

3M NaAc
pH 5.2 (Glasiyal Asetik Asit ile ayarlanır)

STE Tamponu

0.1 M NaCl
0.05 M Tris-Base
0.001 M EDTA
pH 7.5 çözelti otoklavlanır ve +4°C de saklanır.

proteinazK

10 mg/ml çözelti kullanılmıştır. Çözelti sürekli dondurucuda korunmuştur.

PCI

Fenol-Kloroform-İzoamilalkol karışımı 25:24:1 oranında kullanılmıştır.

Fenol 25 ml
Kloroform 24 ml
İzoamilalkol 1 ml

Bu çözelti taze hazırlanmış, +4°C de korunmuş ve ışıkla teması minimum seviyede tutulmuştur. Kullanılmadan önce iyice karıştırılmıştır.

CI

Kloroform-İzoamilalkol karışımı 24:1 oranında kullanılmıştır.

Kloroform 24 ml
İzoamilalkol 1 ml

6X Yükleme tamponu

%30 Gliserol (3 ml Gliserol, / 97 ml su)

%0.03 boya (Bromfenol Blue)

2.4. Total DNA Eldesi

Örneklerden total DNA eldesi iki farklı yöntemle (Standart Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi ve E.Z.N.A.TM Tissue DNA Isolation Kit kullanılarak) yapılmıştır. Her iki yöntem öncesinde alkol içerisinde bulunan tırnak örnekleri steril kaplar içerisine çıkartılmış ve alkolün tamamen uçması sağlanmıştır. Alkolü tamamen uçan örneklerin üzerine alkolde beklemeden kaynaklanan sertleşmeyi gidermek için birkaç damla distile su damlatılmış ve yaklaşık yarım saat beklenmiştir. Alkolü uzaklaştırılan ve suda bekletilerek yumuşaması sağlanan tırnak parçaları steril bir pens ile tutularak ve her bir örnek için steril malzeme kullanılarak ince ince doğranmış ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konmuştur. Bu örnekler sıvı azot kullanılarak dondurulmuş ve steril eziciler kullanılarak tüplerin içerisinde pudra şekeri kıvamına gelinceye kadar ezilmiştir. Bu işlemde sonra dokuların kimyasal olarak parçalanması (liziz) işlemine geçilmiştir.

2.4.1. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi

Bazı örneklerden total DNA Hillis ve Morritz'in (1990) protokolünde küçük değişiklikler yapılarak izole edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde sıvı azot ile yukarıda belirtildiği şekilde toz haline getirilen yaklaşık 30 mg doku üzerine 500µl STE tamponu ilave edilmiştir. Tüpler tüm doku tamponla iyice karışması için yaklaşık 2' vortekslenmiştir. Daha sonra bu tüplerin üzerine 25µl ProteinazK (10mg/ml) ve 25µl SDS (%10) eklenmiş hafifçe karıştırılmış ve 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince ara ara tüpler hafifçe karıştırılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplere 500µl PCI (Fenol_Kloroform-İzoamilalkol, 25:24:1) ilave edilmiş ve ara ara karıştırarak oda sıcaklığında 5' inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler 7000g'de 5' santrifüjlenmiştir. Tüpte oluşan üst faz, orta faza zarar vermeden geniş uçlu bir mikropipetle dikkatle alınarak boş bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu tüpe yeniden 500µl PCI eklenmiş, aynı şekilde 5' inkübe edilmiş ve 5' santrifüjlenmiştir. Yine üst faz orta faza dokunmadan dikkatle yeni bir tüpe aktarılmıştır. Bu tüpe 300µl CI (Kloroform-

İzoamilalkol, 24:1) eklenmiş ve 3' ara ara karıştırarak oda sıcaklığında inkübe edilmiş, sonrasında 5' 7000g'de santrifüjlenmiştir. Yine üst faz dikkatle yeni bir tüpe alınmıştır. Bu tüpe 45µl NaAc (3M) ve 1ml soğuk mutlak alkol eklenmiştir. Tüp 10' buz üzerinde inkübe edilmiş ve süre sonunda tüp DNA görününceye kadar hafif hafif alt üst edilmiştir. DNA görünür hale gelince tüpler 7000g'de 3' santrifüjlenmiştir. DNA pelletine dokunmadan tüpteki alkol mikropipet ile mümkün olduğunca uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüpe 400µl %70'lik alkol konmuş, pellet tüpün yapıştığı noktasından kaldırılarak yıkanması sağlanmıştır. Tekrar 7000g'de 3' santrifüjlenmiş ve tüpteki alkol mümkün olduğunca mikropipetle alınarak tüpten uzaklaştırılmıştır. Alkolün tamamen uzaklaştığından emin olmak için tüp ağzı açık olarak ısıtma bloğu üzerinde 10' 37°C'de bekletilmiştir. Daha sonra pellet 100µl çift suda (ddH₂O) çözülmüştür. DNA içeren tüpler uygun şekilde etiketlenmiştir.

2.4.2. E.Z.N.A.TM Tissue DNA Isolation Kit Kullanılarak DNA Eldesi

Örneklerin bir kısmından total DNA eldesi ise E.Z.N.A.TM Tissue DNA Isolation Kit (Omega Bio-tec, Inc. D3396-02) kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon üreticinin dokulardan DNA eldesi protokolü uygulanarak yapılmıştır. Yine mikrosantrifüj tüpünde sıvı azot ile yukarıda belirtildiği şekilde toz haline getirilen yaklaşık 30 mg doku üzerine 200µl TL tamponu (Buffer TL) ve 25µl üreticinin belirttiği şekilde rekonstrükte edilmiş OB Proteaz (her OB Proteaz tüpü için 1,5ml 10mM Tris-HCl, pH 8,5 eklenerek rekonstrüksiyon yapıldı) eklenerek karışım iyice vortekslendi ve ilk 3 saati 55°C olmak üzere 37°C'de 16 saat inkübe edildi ve inkübasyon süresince ara sıra tüpler hafifçe karıştırıldı. İnkübasyon sonrasında protokolde opsiyonel olarak bulunan RNA'nın uzaklaştırılması işlemi yapıldı. Bu aşamada tüplere 4µl RNase A (100mg/ml) eklenerek oda sıcaklığında 2' inkübe edilmiştir. Daha sonra bu tüpler 16000g'de 5' santrifüjlenmiş ve süpernatant boş bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Bu tüpe 220µl BL tamponu (Buffer BL) eklenmiş ve 70 °C'de 10' boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpe 220µl oda sıcaklığında %98'lik alkol ilave edilmiş ve vorteksle iyice karıştırılmıştır. Kolon (HiBind[®] MDNA Mini Column) 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve mikrosantrifüj tüpündeki tüm içerik bu kolona yüklenmiştir. Kolon 10000g'de 1' santrifüj edilmiş ardından toplama tüpü atılarak kolon yeni bir tüpe yerleştirilmiştir. Bu aşamada kolona 500µl HB tamponu (Buffer HB) uygulanmış ve 10000g'de 1' santrifüj edilmiştir. Kolon tekrar yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve kolona üretici tarafından tarif edildiği şekilde mutlak alkol ile dilue edilmiş DNA Yıkama Tamponu (DNA Wash Buffer)

uygulanmıştır. Yine 10000g'de 1' santrifüj edilmiş, toplama tüpündeki sıvı dökülerek kolon aynı tüpe yerleştirilmiş ve tekrar 700µl DNA Yıkama Tamponu (DNA Wash Buffer) eklenerek bir kez daha 10000g'de 1' santrifüjlenmiştir. Bu aşamadan sonra toplama tüpü tekrar boşaltılmış ve kolona hiçbir tampon uygulanmadan 160000g'de 3' santrifüjlenerek alkolün tamamen uçması sağlanmıştır. Bu aşamada alkolün tamamen uçması ve kolonun kuruması önemlidir. Kuruyan kolon steril 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş üzerine 100µl önceden ısıtılmış (70°C) tampon (Elution Buffer, 10mM Tris, pH 8,5) eklenerek 3' oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 16000g'de 1' santrifüj edilmiş ve uygun şekilde, DNA içeren mikrosantrifüj tüpü etiketlenmiştir.

2.5. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

İzole edilen DNA örneklerindeki DNA konsantrasyonunu belirlemek ve protein kontaminasyonunun miktarını tespit etmek için spektrofotometrede 260nm ve 280nm dalga boyları kullanılarak absorbanslar ölçülmüştür. Bu ölçüm için DNA örnekleri 20 kat sulandırılmıştır. Yaklaşık DNA miktarının tespitinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$DNA (ng/\mu l) = 260nm\text{'deki Optik Dansite (Absorbans)} \times \text{Seyreltme Katsayısı} \times 50 \mu l\text{'de } 50ng \text{ çift iplikli DNA, } 1 \text{ Absorbans'a karşılıktır.}$

DNA'nın saflığını kontrol etmek için ise 260nm/280nm absorbans oranı dikkate alınmış ve saflık değerlendirilmiştir.

2.6. DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen tüm DNA örnekleri DNA'nın niteliği ve niceliği hakkında fikir edinmek için agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Genomik DNA'nın agaroz jel elektrofrezinde %0,8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Kullanılan tanka göre %0,8'lik (w/v) agaroz 1XTBE tamponunda çözülmüş ve yaklaşık 60°C'ye kadar hafif hafif çalkalayarak soğutulmuştur. Agaroz 1µl EtBr (5mg/ml) eklenerek uygun tarak yerleştirilmiş olan kalıba dökülmüş ve polimerleşmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 20' sonra tamamen polimerleşen jel içerisinde 1XTBE bulunan elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Jelde yürütülecek örneklerden 3µl alınarak 3µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Jelin ilk kuyucuğuna DNA büyüklük belirteci, diğer kuyucuklara ise sırayla 6X tamponla karıştırılmış olan örnekler yüklenmiş ve yaklaşık 45' 70V, 50mA güç kullanılarak yürütülmüştür. Daha sonra jel UV jel

görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. Görüntülemenin sonunda konsantrasyon, degradasyon ve kontaminasyon (RNA, protein) ile ilgili fikir edinilmiş ve spektrofotometrik analiz sonuçlarına da bakılarak gereken seyreltme, konsantrasyon etme, tekrar ve ayarlamalar yapılmıştır.

2.7. DNA'nın Konsantrasyonunun Ayarlanması

PCR (Polymerase Chain reaction) için uygun DNA miktarı 50ng/μl olacak şekilde ana stokta bu değerden daha yoğun DNA içeren örneklerde gerekli seyreltmeler yapılmış ve reaksiyonlarda kullanılacak miktar ana stoktan seyreltilerek alınmıştır.

DNA'nın yoğunlaştırılması gereken durumlarda, son konsantrasyonu 0,1M olacak şekilde NaCl ve arkasından total hacmin 2 katı kadar mutlak alkol eklenmiş ve -20°C'de 10' inkübe edilmiştir. Daha sonra bu tüp 1000g'de 15' santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış tüpe 700μl %70'lik alkol eklenmiş ve 10000g'de 2' santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 10' kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu pellet 25μl steril deiyonize suda çözülmüştür.

Böylece hem reaksiyonlar için standart kalıp DNA kullanılmış, hem de ana stok olası kontaminasyonlardan korunmuştur.

2.8. Mitokondrial *ND4* ve *Cyt b* Gen Bölgelerinin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması

2.8.1. Primerler

ND4 ve *Cyt b* gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu ve dizi analizinde kullanılan primerler Çizelge 2.4 de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Kullanılan primerler

<i>ND4</i>				
Primer Adı	Primer Dizisi	PCR	Sekans	Tm (°C)
L-ND4-TG	5' GTA GAG GCC CCA ATT GCA G 3' (Parham vd, 2006a, b)	✓	✓	64.5
H-Leu-TG	5' TGT ACT TTT ACT TGG AAT TGC ACC A 3'(Parham vd, 2006a, b)	✓	✓	65.1
<i>Cyt b</i>				
mt-A1	5' CCC CCT ACC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AAC TTC G 3' (Fritz vd, 2007)	✓	✓	70.7
mt-a-neu2	5' CTC CCA GCC CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AAC 3' (Fritz vd, 2007)	✓	✓	72.7
mt-Fr	5' CTA AGA AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA 3' (Fritz vd, 2007)	✓	✓	67.0
mt-c2	5' TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG 3' (Fritz vd, 2007)		✓	61.7
mt-E-Rev	5' GCA AAT AGG AAG TAT CAT TCT GG 3' (Fritz vd, 2007)		✓	60.4

2.8.2. PCR Reaksiyonları

Her iki gen bölgesi için PCR optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve özellikle farklı MgCl₂ konsantrasyonu ve primerlerin bağlanma sıcaklığı denemeleri yapılmıştır. PCR için *ND4* ve *Cyt b* reaksiyonlarında bileşenlerin konsantrasyonlarında farklılıklar bulunmaktadır. Her iki gen bölgesi için PCR bileşenleri ve konsantrasyonları Çizelge 2.5 ve Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.5. *ND4* gen bölgesi için kullanılan Master Mix bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşen	Son Konsantrasyon	50µl Reaksiyon için Kullanılan Miktar
10X Taq Buffer	1X	5µl
2.5mM dNTP mix	0.2mM	4µl
20µM Primer 1	0.4µM	1µl
20µM Primer 2	0.4µM	1µl
Taq DNA Polimeraz	1u	0.2µl
25mM MgCl ₂	1.5mM	3µl
Kalıp DNA	50 ng	1µl*
ddH ₂ O Nukleaz-Free		34.8µl

Çizelge 2.6. *Cyt b* gen bölgesi için kullanılan Master Mix bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşen	Final Konsantrasyon	50µl Reaksiyon için Kullanılan Miktar
10X Taq Buffer	1X	5µl
2.5mM dNTP mix	0.2mM	4µl
20µM Primer 1	0.4µM	1µl
20µM Primer 2	0.4µM	1µl
Taq DNA Polimeraz	1.5u	0.3µl
25mM MgCl ₂	2mM	4µl
Kalıp DNA	100ng	2µl*
ddH ₂ O Nukleaz-Free		32.7µl

2.8.3. PCR Programları

Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) Eppendorf Thermal Cycler ile gerçekleştirilmiştir. *ND4* ve *Cyt b* için PCR programları Çizelge 2.7 ve Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. *ND4* gen bölgesi PCR programı

Sıcaklık	Süre	Reaksiyon basamağı	
94°C	4'	Başlangıç Denatürasyonu	
94°C	45''	Denatürasyon	35 DÖNGÜ
57°C	30''	Primer Bağlanma (Annealing)	
72°C	1' 20''	Zincir Uzama (Extension)	
72°C	10'	Son Uzama	

Çizelge 2.8. *Cyt b* gen bölgesi PCR programı

Sıcaklık	Süre	Reaksiyon basamağı	
94°C	4'	Başlangıç Denatürasyonu	
94°C	45''	Denatürasyon	35 DÖNGÜ
57°C-53°C*	1'	Primer Bağlanma (Annealing)	
72°C	2'	Zincir Uzama (Extension)	
72°C	10'	Final Uzama	

(*) PCR 57°C Annealing sıcaklığı ile başlamış ve her 3 döngüde bir sıcaklık 0,5°C düşürülmüştür. 24. döngüde sıcaklık 53°C'ye indikten sonra reaksiyon bu sıcaklıkla sabit devam ettirilmiştir.

2.8.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin kalitesi ve büyüklüğünü kontrol etmek amacıyla PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Jelin hazırlanması DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi kısmında tarif edilen yöntemle aynıdır, fakat PCR ürünlerinin yürütüldüğü jel %1,5'lük (w/v) agaroz konsantrasyonuna sahiptir, ayrıca kullanılan DNA büyüklük belirteçleri amplicon boyutuna uygun şekilde seçilmiştir.

2.8.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Agaroz jelde yürütülerek görüntülenen ürünlerden tek ve doğru büyüklükte bant verenler SIGMA GenElute™ PCR Clean-Up kit (#NA1020) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu işlem sırasında üretici tarafından verilen protokol uygulanmıştır. Bu protokolda tüm santrifüj işlemleri 14000g'de yapılmaktadır. Kolonlar (GeneElute Miniprep Binding Column) toplama tüplerine yerleştirilir ve üzerlerine 500µl kolon hazırlama çözeltisi (Column Preparation Solution) eklenerek 1 dakika

santrifüjlenir. Toplama tüpüne biriken sıvı dökülerek kolon aynı tüpe yerleştirilir. Saflaştırılacak olan PCR ürünü 5 katı yükleme çözeltisi (Binding Solution) ile karıştırılarak kolona yüklenir ve 1' santrifüj edilir. Toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek kolon tekrar tüpe yerleştirilir. Kolon üzerine 500µl yıkama çözeltisi (Wash Solution) eklenir ve 1' santrifüj edilir. Tüpte biriken sıvı tekrar boşaltılır ve kolonun iyice kurumması için kolon boş tüpe yerleştirilerek 2' santrifüj edilir. Bu aşamadan sonra kolon steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir, 50µl elution çözeltisi kolonun merkezine uygulanarak oda sıcaklığında 1' inkübe edilir. İnkübasyon sonrası kolon 1' santrifüj edilir. Saflaştırılmış PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Spesifik olmayan bantlar ve primer dimerlerinin gözlemlenmediği örnekler dizi analizine hazırlanmıştır.

2.9. DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

ND4 PCR ürünleri, amplifikasyonda kullanılan L-ND4-TG ve H-Leu-TG primerleri kullanılarak çift yönlü olarak dizi analizi yapılmıştır. *Cyt b* PCR ürünleri ise amplifikasyon primerleri olan mt-A1, mt-a-neu2 ve mt-Fr primerleri ve bunlara ek olarak internal primerler olan mt-c2 ve mt-E-Rev (Çizelge 2.4) primerleri ile çift yönlü dizi analizi yapılmıştır.

Saflaştırılmış PCR ürünleri ve primerler dizi analizi için MacroGen (Güney Kore) isimli firmaya gönderilmiştir. Burada sekans reaksiyonu için BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılmış ve ürünler ABI 3730XL kapillar otomatik sekans aletinde yürütülmüştür.

2.10. Dizilerin Okunması

Elde edilen ham diziler Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation) ve BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) programları kullanılarak her bireye ait her bir gen için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *ND4* gen bölgesi için kullanılan 2 primere ait ham dizilerden her bir birey için bir *ND4* "contig" dizisi, yine *Cyt b* gen bölgesi için kullanılan 4 veya 5 primere ait ham dizilerden her bir birey için bir *Cyt b* "contig" dizisi elde edilmiştir. Bu işlem sırasında her bir baz dikkatle kontrol edilmiştir.

2.11. Dizilerin Hizalanması

Kompleksin genetik ilişkilerinin belirlenmesi için seçilen ve daha önceki çalışmalarda da (Stuart ve Parham, 2004; Spinks ve Shaffer, 2006; Parham vd.,

2006a, b) yakın taksonlarda kullanılışlılığı belirtilmiş olan mtDNA'nın *ND4* geni ve ek olarak tRNA'lar (H, S ve L) analizlerde kullanılmıştır. Bu bölge kısaca *ND4* olarak isimlendirilecektir.

ND4 ve *Cyt b* dizileri ayrı ayrı hizalanmıştır. Bireylere ait "contig" dosyaları BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) programına çekilmiş ayrıca GenBank'tan alınan *ND4* (Çizelge 2.2) ve *Cyt b* (Çizelge 2.3) dizileri eklenmiş ve hizalama işlemi BioEdit içerisine yerleştirilmiş olan Clustal W (Thompson vd., 1994) modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. "Full Multiple Alignment" algoritması geçerli ayarlar değiştirilmeden kullanılmış, hizalama işleminden sonra gözle gereken değişiklikler yapılmıştır.

2.12. Analizde Kullanılacak Veri Setlerinin Hazırlanması

Her iki gen bölgesi (*ND4* ve *Cyt b*) için ayrı ayrı hizalanmış dosyalar FASTA ve NEXUS dosya formatlarında kaydedilmiştir. Filogenetik analizlerde bilgisayar çalışma süresini kısaltmak için DnaSP 4.50 (Rozas vd., 2003) programı kullanılarak haplotipler belirlenmiş ve haplotip verilerini içeren yeni birer veri matrisi oluşturulmuştur.

Ayrıca filogenetik analizlerden Maksimum Olasılık (Likelihood) analizi için en uygun baz değişim modeli hem *ND4* hem de *Cyt b* gen bölgeleri için ayrı ayrı MODELTEST 3.7 (Posada and Crandall, 1998) programında bulunan hLRT "hierarchical likelihood ratio test" ve AIC "Akaike information criterion" testleri kullanılarak tespit edilmiş ve bu modele ait komut satırları dosyanın içine eklenerek ML (Maximum Likelihood) analizi için kullanılmak üzere nexus formatında kaydedilmiştir.

TCS (Clement vd., 2000) programı kullanılarak yapılacak Network analizi için diziler PHYLIP formatında kaydedilmiştir.

2.13. Filogenetik Analizler: Distance (Uzaklık) Analizi

Uzaklık Analizi PAUP* 4.0b10 (Swofford,2002) kullanılarak yapılmıştır. *ND4* ve *Cyt b* bölgeleri için ayrı ayrı yapılan MODELTEST analizlerinde, hLRT ve AIC baz değişim modeli testlerinin veri setlerimize en iyi uyan baz değişim modeli olarak tespit ettiği model ve bunun yanında daha basit modeller olan JC (Jukes-Cantor; Jukes ve Cantor, 1969 ve K2P (Kimura 2-parameter; Kimura, 1980) modelleri de

analizde denenmiş ve ayrı ayrı bootstrap yapılmıştır (10000 rep.). Distance analizlerinde NJ (Neighbor Joining) algoritması kullanılmıştır. Farklı modellerle elde edilen bu filogenetik ağaçların topolojileri karşılaştırılmış ve topolojiler arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür. Soy hatları için farklı modellerin verdiği bootstrap değerleri incelenmiş ve *ND4* için JC, *Cyt b* için ise K2P modelinin bootstrap değerlerinin daha yüksek olması nedeniyle çalışmada bu modeller kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaçlar verilmiştir.

2.14. Filogenetik Analizler: Parsimoni (Tutumluluk) Analizi

Parsimoni Analizi PAUP* 4.0b10 kullanılarak yapılmıştır. Parsimoni analizi yapılırken Heuristic araştırma metodu kullanılmıştır. Diziler analize 1000 rastgele tekrarlı olarak katılmış ve TBR swapping algoritması kullanılmıştır. Parsimoni analizi sonrası kaydedilen parsimonik ağaçlar birbirleri ile Kishino-Hesegawa Test kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca elde edilen ağaçlar için CI (Cosistency Index), RI Retention Index) ve değerleri ve ağaç uzunlukları tespit edilmiştir. Elde edilen bu parsimonik ağaçlar kullanılarak 50% Majority Rule ve Stric Consensus ağaçlar oluşturulmuştur. MP (Maximum Parsimony) analizi için bootstrap analizi yapılırken diziler analize 100 rastgele tekrarlı olarak alınmış ve 10000 replikasyon kullanılmıştır.

2.15. Filogenetik Analizler: Likelihood (Maksimum Olasılık) Analizi

Likelihood Analizi PAUP 4 kullanılarak yapılmıştır. Likelihood analizinde MODELTEST tarafından önerilen en uygun baz değişim modelleri, baz frekansları, G, I ve Ti/tv değerleri veri setine girilmiş ve bu değerler kullanılarak Heuristic araştırma metodu kullanılmıştır. Likelihood analizinde diziler analize alfabetik olarak (“as is”) katılmış ve TBR swapping algoritması kullanılmıştır. ML analizinde bootstrap değerleri elde edilirken 1000 replikasyon yapılmıştır. Bu analizde dizilerin analize “as is” olarak katılması ve bootstrap analizinde 1000 replikasyon kullanılmasının nedeni bilgisayarların limitlerinin daha fazlasına uygun olmamasından kaynaklanmaktadır.

2.16. Filogenetik Analizler: Bayesian Analizi

Bayesian analizi MrBayes 3.1 (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz eşit olmayan baz frekansları ile GTR+I+G (General Time Reversible Model) modeli altında gerçekleştirilmiştir. Model parametreleri analiz içerisinde belirlenmiştir. Markov Chain Monte Carlo (MCMC)

algoritması çalıştırılmış, analiz için başlangıç ağacı verilmemiş rastgele ağaçlarla analize başlanmış ve 1500000 jenerasyon tekrarlanmıştır. Her 10 jenerasyonda bir ağaçlar örneklenmiştir. Log likelihood skorlarının belirli bir dengeye ulaştığı nokta “burn in” olarak belirlenmiş ve bu noktadan önceki ağaçlar analizden çıkarılmıştır. Geriye kalan ağaçlar kullanılarak PAUP programında 50 % Majority Rule Consensus ağaç elde edilmiş ve bu ağaç üzerine “posterior probabilities” değerleri işlenmiştir.

2.17. Mitokondrial DNA Haplotiplerinin Genetik Çeşitlilik Parametreleri

ND4 ve *Cyt b* bölgeleri için haplotip çeşitliği DnaSP 4.50 (Rozas vd., 2003) bilgisayar programı kullanılarak ve JC modeli altında yapılmıştır. Nükleotid çeşitliliği yine DnaSP kullanılarak JC modeli altında analiz edilmiş ve soy hatları arasındaki ham DNA çeşitliliği (Dxy) ve Net DNA çeşitliliği (Da) (Nei ve Kumar, 2000) hesaplanmıştır. Standart hataları hesaplamak için 10000 replikasyon kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Baz Kompozisyonu

3.1.1. *ND4* (mtDNA) Bölgesi

Hizalanmış *ND4* gen bölgesi toplam 850 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Veri setine Tajima's Neutrality Test uygulanmıştır (Çizelge 3.1). Veri setinin 227 (%26,71) pozisyonunda varyasyon gözlenmiştir. Bu 227 pozisyonun 152 (%66,96) tanesi parsimonik bilgi içermektedir. Baz kompozisyonu A= %36,5, C=%24,7, T= %26,9 ve G= %11,8 dir. Buradaki G oranının yüzdesel olarak düşük olması bize bir pseudogenle değil, fonksiyonel bir mitokondrial bölge ile çalıştığımızı göstermektedir. Ayrıca bölge daha önce çalışıldığından GenBank'dan alınan dizilerle uyumuna da dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.1. *ND4* dizileri Tajima's Neutrality Test sonuçları. Analiz MEGA4 (Tamura vd., 2007) kullanılarak yapılmıştır. Tüm eksik veriler ve boşluklar analizden çıkartılmıştır (Casewise deletion). m = dizi sayısı, S = segresyona uğrayan pozisyon sayısı, $p_s = S/m$, $\Theta = p_s/a_1$, and π = nükleotid çeşitliliği. D Tajima Test sonucu.

m	S	p_s	Θ	π	D
239	227	0.270560	0.044709	0.018662	-1.824060

Analizlerde kullanılan 239 örneğe ait *ND4* bölgesi dizileri için toplam 52 mtDNA haplotipi saptanmıştır (Çizelge 3.5). Haplotip çeşitliliği, H_d : 0,8530, haplotip çeşitliliği varyansı 0,00037 ve haplotip çeşitlilik için $SD=0,019$ olarak hesaplanmıştır. Nükleotid çeşitliliği $P_i= 0,01866$ (uncorrected-p), $P_i (JC)= 0,01928$, $SD= 0,00194$ 'tür.

Çizelge 3.2. *ND4* gen bölgesi kullanılarak hesaplanan Ham Nükleotid Çeşitliği (Dxy), Net Nükleotid Çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği (koyu karakterle gösterilmiştir). Dxy: üstdiagonal, Da: alt diagonal.

	A KLADI	B KLADI	C KLADI	D KLADI	E KLADI	F KLADI	<i>kleinmanni</i>	<i>marginata</i>	<i>horsfieldii</i>	<i>hermanni</i>
A KLADI	0.00303	0.01615	0.03462	0.02559	0.02639	0.02951	0.06068	0.06066	0.11894	0.09971
B KLADI	0.01430	0.00065	0.02886	0.02156	0.02339	0.03005	0.06578	0.06347	0.12531	0.10009
C KLADI	0.03311	0.02853	0.00000	0.02601	0.03147	0.03576	0.07509	0.06794	0.12753	0.10226
D KLADI	0.02194	0.01909	0.02387	0.00428	0.02481	0.03267	0.06794	0.06436	0.12550	0.10191
E KLADI	0.02440	0.02259	0.03099	0.02219	0.00095	0.03004	0.07151	0.06079	0.12277	0.09917
F KLADI	0.02204	0.02376	0.02980	0.02457	0.02360	0.01192	0.06913	0.06794	0.12336	0.10107
<i>kleinmanni</i>	0.05917	0.06545	0.07509	0.06580	0.07104	0.06317	n/c	0.05483	0.12396	0.10775
<i>marginata</i>	0.05914	0.06315	0.06794	0.06222	0.06031	0.06198	0.05483	n/c	0.12396	0.10894
<i>horsfieldii</i>	0.11742	0.12499	0.12753	0.12336	0.12229	0.11740	0.12396	0.12396	n/c	0.10846
<i>hermanni</i>	0.09617	0.09774	0.10024	0.09775	0.09666	0.09309	0.10572	0.10691	0.10644	0.00405

3.1.2. *Cyt b* (mtDNA) Bölgesi

Hizalanmış *Cyt b* gen bölgesi toplam 1012 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Veri setine Tajima's Neutrality Test uygulanmıştır (Çizelge 3.3). Veri setinin 278 (%27,47) pozisyonunda da varyasyon gözlenmiştir. Bu 278 pozisyonun 219 (%78,78) tanesi parsimonik bilgi içermektedir. Baz kompozisyonu A= %30,7, C=%29,8, T= %28,0 ve G= %11,5 şeklindedir.

Çizelge 3.3. *Cyt b* dizileri Tajima's Neutrality Test sonuçları. Analiz MEGA4 kullanılarak yapılmıştır. Tüm eksik veriler ve boşluklar analizden komple çıkartılmıştır (Complete deletion) m = dizi sayısı, S = segresyona uğrayan pozisyon sayısı, $p_s = S/m$, $\Theta = p_s/a_1$, and π = nükleotid çeşitliliği. D Tajima Test sonucu.

m	S	p_s	Θ	π	D
269	278	0,285421	0,046259	0,024838	-1,443287

Analizlerde kullanılan 269 örneğe ait *Cyt b* bölgesi dizileri toplam 74 haplotip altında toplanmaktadır (Çizelge 3.5). Haplotip çeşitliliği, Hd: 0,9306, haplotip çeşitliliği varyansı 0,00019 ve haplotip çeşitlilik için SD=0,020 olarak hesaplanmıştır. Nükleotid çeşitliliği $P_i = 0,02484$ (uncorrected-p), P_i (JC)= 0,02484, SD= 0,00176'dır.

Çizelge 3.4. *Cyt b* gen bölgesi kullanılarak hesaplanan Ham Nükleotid Çeşitliliği (Dxy), Net Nükleotid Çeşitliliği (Da) ve grup içi nükleotid çeşitliliği (koyu karakterle gösterilmiştir). Dxy: üst diagonal, Da: alt diagonal.

	A KLADI	B KLADI	C KLADI	D KLADI	E KLADI	F KLADI	<i>kleinmanni</i>	<i>marginata</i>	<i>horsfieldii</i>	<i>hermanni</i>
A KLADI	0.00472	0.02322	0.03330	0.04230	0.04043	0.04690	0.07787	0.07913	0.09709	0.11854
B KLADI	0.01976	0.00222	0.03810	0.04713	0.04379	0.05491	0.08639	0.08229	0.10383	0.12222
C KLADI	0.03024	0.03626	0.00141	0.03012	0.03149	0.03542	0.08060	0.07136	0.09668	0.11208
D KLADI	0.03329	0.03933	0.02272	0.01340	0.04060	0.04821	0.08670	0.08088	0.10290	0.11824
E KLADI	0.03673	0.04129	0.02940	0.03256	0.00273	0.04218	0.08812	0.08599	0.10207	0.12586
F KLADI	0.04011	0.04933	0.03025	0.03709	0.03636	0.00891	0.08342	0.08753	0.10293	0.11602
<i>kleinmanni</i>	0.07553	0.08527	0.07988	0.08002	0.08676	0.07897	0.00000	0.06057	0.08624	0.10780
<i>marginata</i>	0.07679	0.08116	0.07064	0.07420	0.08462	0.08308	0.06057	n/c	0.09446	0.10267
<i>horsfieldii</i>	0.09475	0.10270	0.09596	0.09622	0.10070	0.09848	0.08624	0.09446	n/c	0.10472
<i>hermanni</i>	0.11620	0.12110	0.11136	0.11156	0.12449	0.11157	0.10780	0.10267	0.10472	0.00000

3.2. *ND4* ve *Cyt b* gen Bölgeleri Haplotip Dağılımı

Çalışmamızda materyal ve yöntem bölümünde bahsettiğimiz GENBANK örneklerine ilaveten ülkemizin değişik noktalarından daha önce morfolojik olarak tanımlanmış tüm taksonları da temsil edecek şekilde toplanmış örneklerimize ait lokalite bilgileri, örnek sayıları ve bu örneklerin filogenetik analizlerimizde kullanılan hangi *ND4* ve *Cyt b* haplotipleri taşıdığına dair bulgular Çizelge 3.5'te verilmektedir.

Çizelge 3.5. Lokalitelere göre *ND4* ve *Cyt b* haplotiplerinin dağılımı (haplotip isminin yanındaki parantez içindeki değerler haplotipin görülme sayısını göstermektedir)

Lokalite	N	HAPLOTİP (<i>ND4</i>)	HAPLOTİP (<i>Cyt b</i>)	Lokalite No
Karaağaç/Edirne	2	Hap_8 (2)	Cyt40 (2)	1
Lalapaşa	4	Hap_8 (1) Hap_21 (2) Hap_22 (1)	Cyt40 (2)	2
Pınarhisar Civarı	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	3
Vize	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	4
Çakıllı/Vize	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	5
Bahçeköy-Vize	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	6
Ereke	2	Hap_23 (2)	-	7
Şarköy	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	8
Şarköy-Evreşe Arası	2	Hap_8 (1) Hap_24 (1)	Cyt40 (1) Cyt71 (1)	9
Truva	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	10
Balıkesir	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	11
Bandırma	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	12
Bursa	3	Hap_8 (3)	Cyt9 (3)	13
Bilecik	3	Hap_8 (3)	Cyt9 (3)	14
Gölcük	3	Hap_8 (3)	Cyt9 (2) Cyt40 (1)	15

Çizelge 3.5. devamı

Şile	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	17
Kütahya-Afyon yolu	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	18
Afyon-Antalya yolu	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	19
İşcehisar	2	Hap_8 (2)	Cyt40 (1) Cyt9 (1)	20
Çay/Afyon	2	Hap_2 (2)	Cyt9 (1) Cyt40 (1)	21
Sandıklı-Dinar arası	1	Hap_2 (1)	Cyt9 (1)	22
Eğirdir	2	Hap_2 (2)	Cyt22 (2)	23
Isparta-Ağlasun arası	2	Hap_2 (1) Hap_25 (1)	Cyt22 (2)	24
Harmanlı/Burdur	1	Hap_8 (1)	Cyt9 (1)	25
Acıpayam	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (1) Cyt40 (1)	26
Tavas	3	Hap_8 (3)	Cyt9 (1) Cyt40 (2)	27
Gölmarmara	2	Hap_8 (2)	Cyt40 (2)	28
Kızılağaç/Muğla	1	Hap_26 (1)	Cyt22 (1)	29
Günlüklü	3	Hap_27 (3)	Cyt22 (3)	30
Letoon	3	Hap_27 (3)	Cyt22 (3)	31
Kalkan-Kaş yolu	1	Hap_2 (1)	Cyt22 (1)	32
Demre	1	Hap_2 (1)	Cyt22 (1)	33
Kumluca-Kemer arası	1	Hap_28 (1)	Cyt22 (1)	34
Perge	1	Hap_2 (1)	Cyt22 (1)	35
Manavgat_Akseki Arası	1	Hap_29 (1)	Cyt73 (1)	36
Kızılot-Akseki yolu	2	Hap_30 (1) Hap_31 (1)	Cyt73 (2)	37
Akseki	1	Hap_32 (1)	Cyt22 (1)	38
Hadim/Konya	2	Hap_33 (2)	Cyt74 (2)	39
Gazipaşa-Anamur arası	3	Hap_1 (3)	Cyt22 (3)	40
Mut-Ermenek Yolu	1	Hap_1 (1)	Cyt22 (1)	41
Silifke-Mut arası	1	Hap_1 (1)	Cyt22 (1)	42

Çizelge 3.5. devamı

Bozyazı-Gülнар yolu	1	Hap_1 (1)	Cyt22 (1)	43
Meke Gölü/Karapınar	7	Hap_8 (4) Hap_33 (2) Hap_34 (1)	Cyt22 (2) Cyt60 (4) Cyt61 (1)	44
Kırkışla/Cihanbeyli	1	Hap_8 (1)	Cyt40 (1)	45
Nallıhan	2	Hap_8 (2)	Cyt40 (2)	46
Mengen/Bolu	1	Hap_8 (1)	Cyt9 (1)	47
Zonguldak	3	Hap_8 (2) Hap_35 (1)	Cyt9 (3)	48
Amasra	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	49
Safranbolu	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	50
Araç/Kastamonu	1	Hap_8 (1)	Cyt9 (1)	51
İnebolu	1	Hap_36 (1)	Cyt9 (1)	52
Taşköprü/Kastamonu	1	Hap_8 (1)	Cyt9 (1)	53
Tosya	1	Hap_8 (1)	Cyt9 (1)	54
Sinop	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	55
Samsun	4	Hap_8 (4)	Cyt9 (4)	56
Amasya	3	Hap_8 (3)	Cyt9 (3)	57
Çorum	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (2)	58
Yozgat	2	Hap_8 (2)	Cyt9 (1) Cyt40 (1)	59
Ürgüp-Avanos yolu	3	Hap_8 (3)	Cyt40 (1) Cyt41 (2)	60
Nevşehir	4	Hap_8 (4)	Cyt41 (3)	61
Sivas	3	Hap_8 (2) Hap_37 (1)	Cyt41 (2) Cyt43 (1)	62
Çamlıbel/Tokat	1	Hap_8 (1)	Cyt41 (1)	63
Akbelen	1	Hap_38 (1)	Cyt44 (1)	64
Suşehri	1	Hap_39 (1)	Cyt44 (1)	65
Saimbeyli	2	Hap_2 (2)	Cyt45 (2)	66
Kadirli	1	Hap_6 (1)	Cyt46 (1)	67
Çullu	1	Hap_2 (1)	Cyt46 (1)	68
Adana	1	Hap_2 (1)	Cyt22 (1)	69

Çizelge 3.5. devamı

Ceyhan	3	Hap_2 (3)	Cyt22 (2) Cyt38 (1)	70
Ceyhan İNCİRLİ	4	Hap_2 (4)	Cyt22 (2) Cyt38 (2)	71
Dörtyol	5	Hap_2 (3) Hap_6 (1) Hap_40 (1)	Cyt17 (3) Cyt38 (2)	72
Antakya	4	Hap_2 (1) Hap_5 (2) Hap_41 (1)	Cyt17 (2) Cyt26 (1) Cyt47 (1)	73
Kilis-Hassa Arası	1	Hap_6 (1)	Cyt17 (1)	74
Kahramanmaraş	3	Hap_6 (3)	Cyt17 (3)	75
Kilis	1	Hap_6 (1)	Cyt17 (1)	76
Gaziantep	2	Hap_6 (2)	Cyt17 (2)	77
Adıyaman	2	Hap_2 (1) Hap_6 (1)	Cyt17 (2)	78
Malatya	4	Hap_2 (1) Hap_6 (2) Hap_42 (1)	Cyt17 (3) Cyt49 (1)	79
Elazığ	2	Hap_7 (2)	Cyt69 (1)	80
Diyarbakır	5	Hap_7 (2) Hap_43 (3)	Cyt48 (2) Cyt57 (1) Cyt67 (1) Cyt72 (1)	81
Mardin	2	Hap_7 (1) Hap_43 (1)	Cyt57 (2)	82
Batman	4	Hap_2 (1) Hap_7 (2) Hap_43 (1)	Cyt12 (1) Cyt50 (1) Cyt51 (1) Cyt52 (1)	83
Eruh	1	Hap_43 (1)	Cyt27 (1)	84
Yelkenli	5	Hap_7 (4) Hap_44 (1)	Cyt12 (4) Cyt58 (1)	85

Çizelge 3.5. devamı

Şırnak	4	Hap_45 (4)	Cyt56 (3) Cyt59 (1)	86
Yüksekova	3	Hap_46 (3)	Cyt55 (1) Cyt56 (1) Cyt68 (1)	87
Başkale	4	Hap_46 (4)	Cyt62 (1) Cyt63 (1) Cyt64 (1) Cyt65 (1)	88
Erciş	2	Hap_7 (2)	Cyt66 (2)	89
Aralık	1	Hap_13 (1)	Cyt18 (2)	90
Aralık	2	Hap_13 (1) Hap_47 (1)	Cyt18 (1)	91
Muş-Varto Yolu	2	Hap_7(2)	Cyt54 (2)	92
Solhan	1	Hap_7 (1)	Cyt54 (1)	93
Genç/Bingöl	4	Hap_7 (2) Hap_48(2)	Cyt53 (4)	94
Sanliurfa	1	Hap_49 (1)	Cyt53 (1)	95
Sarıoğlan	1	Hap_15 (1)	-	96
İskenderun	1	Hap_52 (1)	Cyt17 (1)	97
Ayvalık	1	Hap_34 (1)	Cyt9 (1)	98
Erzincan Kemaliye Karanlık Kanyon Dilli Deresi	1	Hap_51 (1)	Cyt42 (1)	99
Kırnkhan	1	Hap_6 (1)	Cyt39 (1)	100

3.3. Filogenetik Analizler

3.3.1. ND4 Gen Bölgesi

Kullanılan 4 farklı filogenetik analiz (NJ, MP, ML, BI) ile elde edilen filogenetik ağaçlar birbirine çok yakın topolojiye sahiptir (Şekil 3.1-8). Bu analizlerle elde edilen ağaçlarda *Testudo* kompleksi *T. kleinmanni* ve *T. marginata*'ya göre monofiletiktir (%99-100 bootstrap, 0.98 Posterior Prob.). Yine tüm metotlarla elde edilen ağaçlarda *Testudo* kompleksinin 6 ana soy hattı ile temsil edildiği

görülmektedir. Çalışmamızda bazı kladlar morfolojik olarak daha önce tanımlanmış birden fazla taksonu içerdiği için, karışıklığı önlemek amacıyla harfle isimlendirilmişlerdir. Bu altı mtDNA soy hattından beş tanesi (A, B, C, D, E) Orta Doğu ve Kafkaslarda, bir tanesi (F) ise Afrika’da yayılış göstermektedir. Bu soy hatlarında yer alan haplotipler ve bu haplotiplerin ülkemizdeki coğrafik yayılışı Çizelge 3.5’de verilmiştir. MP ağacında Afrika soy hattını temsil eden F KLADI diğer tüm *T. graeca* soy hatları ile kardeş (sister) grupken, NJ ağacında C KLADI+D KLADI+E KLADI ile fakat ML ağacında ise sadece E KLADI ile kardeş gruptur. Detayları ileriki bölümlerde görüleceği gibi, filogenetik ağaçlarda taksonomide öncelik ilkesi dikkate alınarak yapılan isimlendirmede A kladı (A KLADI) *terrestris*, B kladı (B KLADI) *ibera*, C kladı (C KLADI) *zarudnyi*, D kladı (D KLADI) *buxtoni*, E Kladı (E KLADI) *armeniaca* ve F kladı (F KLADI) Afrika soy hatlarını temsil etmektedir. Soy hatlarının morfolojik olarak tanımlanmış hangi türleri içerdiği konusuna ileriki bölümlerinde değinilecektir.

NJ algoritması JC baz değişim modeli kullanılarak çalıştırılmıştır. Elde edilen filogram Şekil 3.1 te verilmiştir. NJ ağacında elde edilen ana soy hatlarının bootstrap değerleri %90-99 arasında değişmektedir. *Testudo* kompleksine ait bu 6 ana soy hattından 4 tanesinin temsilcileri (A, B, D ve E kladları) ülkemiz sınırlarında bulunmaktadır. Ülkemizde yayılış gösteren gruplar arasındaki genetik uzaklıklar değerlendirildiğinde birbirine en yakın olanlar A KLADI ile B KLADI (%1.98) ve en uzak olanlar B KLADI ile D KLADI (%3.93)’dir. Parsimoni analizinde “Heuristic Search” algoritması kullanılarak *ND4* gen bölgesinin 152 parsimoni bilgi verici karakteri analiz edilmiştir. Analiz sonrasında eşit uzunluğa sahip (parsimonik) 4 ağaç elde edilmiştir (Şekil 3.2). Bu ağaçların uzunlukları 344, Consistency Index (CI) 0,718, Retention Index (RI) 0,848 dir. Elde edilen bu ağaçlar arasında farklılık olup olmadığı Kishino-Hasegava Test ile kontrol edilmiş ve anlamlı farklılık bulunmamıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Parsimonik 4 ağaç karşılaştıran Kishino-Hasegava Test sonuçları

Ağaç	Uzunluk	Uzunluk Farkı	sd	t	p
1	344	best			
2	344	0	1.41734	0.000	1.000
3	344	0	1.41734	0.000	1.000
4	344	0	0.00000	0.000	1.000

Aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan bu dört ağaç kullanılarak ağacın özeti olarak Stric ve 50% Majority Rule Consensus ağaçları oluşturulmuştur. Bu iki özet ağaç topoloji olarak aynıdır ve parsimonik 4 ağaçtan bir tanesi ile de bire bir uyuşmaktadır. Bu nedenle burada 50% Majority Rule Consensus ağacı verilmiş ve bu konsensus ağacın düğüm noktalarına 10000 replikasyonla elde edilen bootstrap değerleri yazılmıştır (Şekil 3.3).

ML analizinde MODELTEST tarafından önerilen TIM (Transition Model) baz değişim modeli kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ağaç Şekil 3.4'de verilmiştir. Yine bu ağaç üzerinde aynı topolojiye sahip Bayesian Analizi sonucu elde edilmiş 50% Majority Rule Consensus ağacına ait posterior probability değerleri verilmiştir.

Tüm metotlarla elde edilen ağaçlar incelendiğinde, *T. graeca* kompleksinin ana soy hatlarının basal ilişkisi çok iyi derecede desteklenmese de, bazı soy hatları arasındaki kardeş grup ilişkisi yüksek bootstrap değerleri ile ortaya konmuştur. Ağaç dallarının güvenilirliklerinin korelasyonu ile ilgili çok fazla tartışma olmasına rağmen, Leache ve Reeder (2002) tarafından önerilen konservatif kullanım benimsenmiştir. Burada standart nonparametrik bootstrap değerlerine karşılık posterior probability değerleri istatistiksel öneme sahip olması için bootstrap değeri >70, posterior probability >%95 olmalıdır denilmektedir. Bu soy hatlarından genetik olarak birbirine en yakın olanlar A KLADI ile B KLADI (%1.43) ve birbirinden en uzak olanlar ise A KLADI ile C KLADI'dir (%3,31). Daha önce belirttiğimiz gibi *Testudo* kompleksine ait bu 6 ana soy hattından 4 tanesinin temsilcileri ülkemiz sınırlarında bulunmaktadır. Ülkemizde yayılış gösteren gruplar arasındaki genetik uzaklıklar değerlendirildiğinde birbirine en yakın olanlar A KLADI ile B KLADI (%1.43) ve en uzak olanlar A KLADI ile E KLADI (%2,44)'dir. Testudinidae familyası üyesi, geçerli türlerden *T. marginata*, *T. kleinmanni* ve *T. hermanni* arasındaki genetik uzaklıklar incelendiğinde %5.48 ile %10.57 arasında değiştiği görülmektedir.

Elde ettiğimiz mtDNA *ND4* bölgesi sonuçlarına göre, ülkemizde bulunan haplotiplerin dağılımı Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir. Morfolojik olarak tanımlanmış taksonları ele alındığında A KLADI yakın zamanda morfolojik

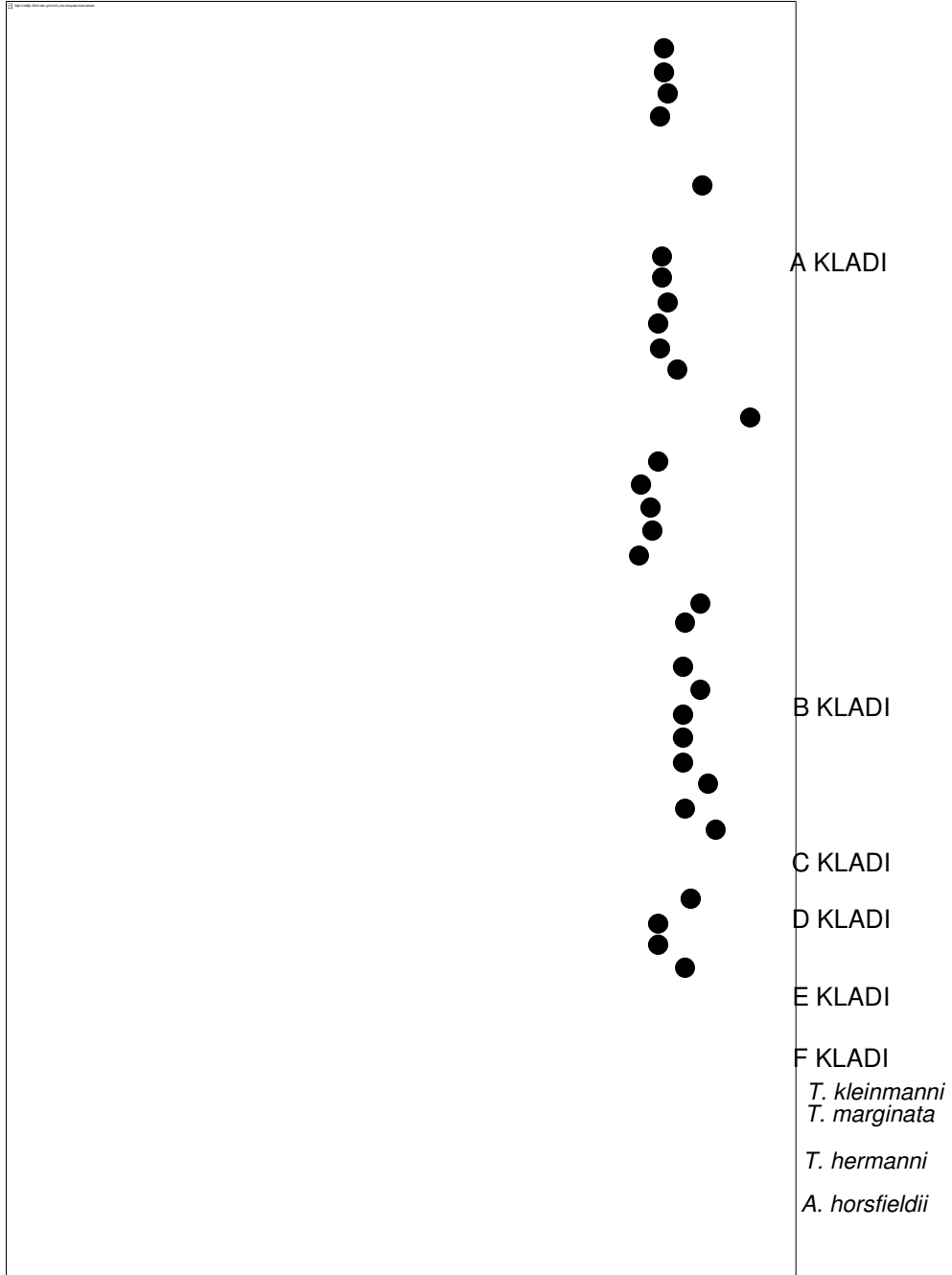
farklılıklara dayanarak tanımlanmış “*anamurensis*” ve “*antakyensis*” taksonlarına ait haplotipleri, ayrıca *terrestris* ve “*floweri*” haplotiplerini içermektedir. Bu soy hattının kendi içindeki genetik farklılığı sadece %0,3’tür. Diğer yandan morfolojik olarak çizilen yayılış sınırlarına göre *ibera* taksonunun yayılış gösterdiği (Eğirdir, Çay, Meke Gölü) bazı noktalarda da A KLADI haplotipleri tespit edilmiştir. Burada en ilginç bulgu, Meke Gölü’nden elde edilen 7 örnekten 2 tanesinin A KLADI, 5 tanesinin ise B KLADI haplotiplerini taşımasıdır. A kladında morfolojik olarak tanımlanmış taksonlardan birinin ismiyle adlandırmak istendiğinde, bu soy hattını priorite kuralına bağlı olarak *terrestris* soy hattı olarak isimlendirebiliriz. Bu soy hattı morfolojik olarak tanımlanmış taksonlar olan “*anamurensis*”, “*antakyensis*” ve “*floweri*” taksonlarını da kapsadığı için, adı geçen bu taksonlar arasında her ne kadar morfolojik farklılıklar bulunsa da, genetik bir farklılık olmadığı ortaya çıkmıştır. Kısacası ülkemizde yakın zamanda tanımlanmış olan *T.g. anamurensis* ve *T. antakyensis*’in mevcut taksonomik durumlarının yeniden ele alınması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Diğer yandan Meke Gölü örneklerinde *terrestris* (A KLADI) ve *ibera* (B KLADI) kladladlarına ait haplotiplerinin birlikte bulunması oldukça ilginçtir. Zira genel olarak iki alttüre ait bireyler simpatrik bulunamayacağından dolayı, morfolojik olarak tanımlanmış olan *T. g. terrestris* ve *T. g. ibera* taksonlarının durumlarının yeniden değerlendirilmesi gereğini ortaya koymuştur. İki farklı soy hattına ait haplotiplerin aynı alanda bulunması, bölgede muhtemel bir hibritleşmenin olabileceğini göstermektedir. B KLADI soy hattı *ibera* ve “*nikolskii*” haplotiplerini içermektedir ve soy hattının kendi içerisindeki genetik farklılığı sadece %0.065’tir. Morfolojik olarak tanımlanmış bu iki takson *ND4* bölgesi için genetik olarak tamamen benzerdir. “*nikolskii*” *ND4* Hap 8 haplotipine sahiptir ve bu haplotip 239 örneğin 83 tanesinde bulunmuştur. Ülkemizden birçok lokaliteden (Çizelge 2.1) ve Tiflis’ten elde edilen (Bu lokalite cf. *ibera* taksonunun tip lokalitesine çok yakındır) örneklerinde dahil olduğu haplotiptir. Bu durum, yeni tanımlanmış “*nikolskii*” taksonun taksonomik durumunu şüpheye düşürmektedir. Bu nedenle bu soy hattının *ibera* olarak isimlendirilmesi uygun bulunmuştur. C KLADI ülkemiz sınırlarında bulunmayan bir soy hattıdır ve kendi içerisindeki genetik çeşitlilik *ND4* bölgesi için %0’dır. Orta ve Doğu İran platolarında yayılış gösteren *zarudnyi* taksonuna ait 8 bireyde aynı *ND4* haplotipine sahiptir ve *zarudnyi* soy hattı olarak isimlendirilebilir. D KLADI soy hattı içerisinde *buxtoni* taksonuna ait topotip, yeni tanımlanmış “*perses*” taksonunun yayılış alanından elde edilen örnekler (bunlardan bir tanesi topotiptir)

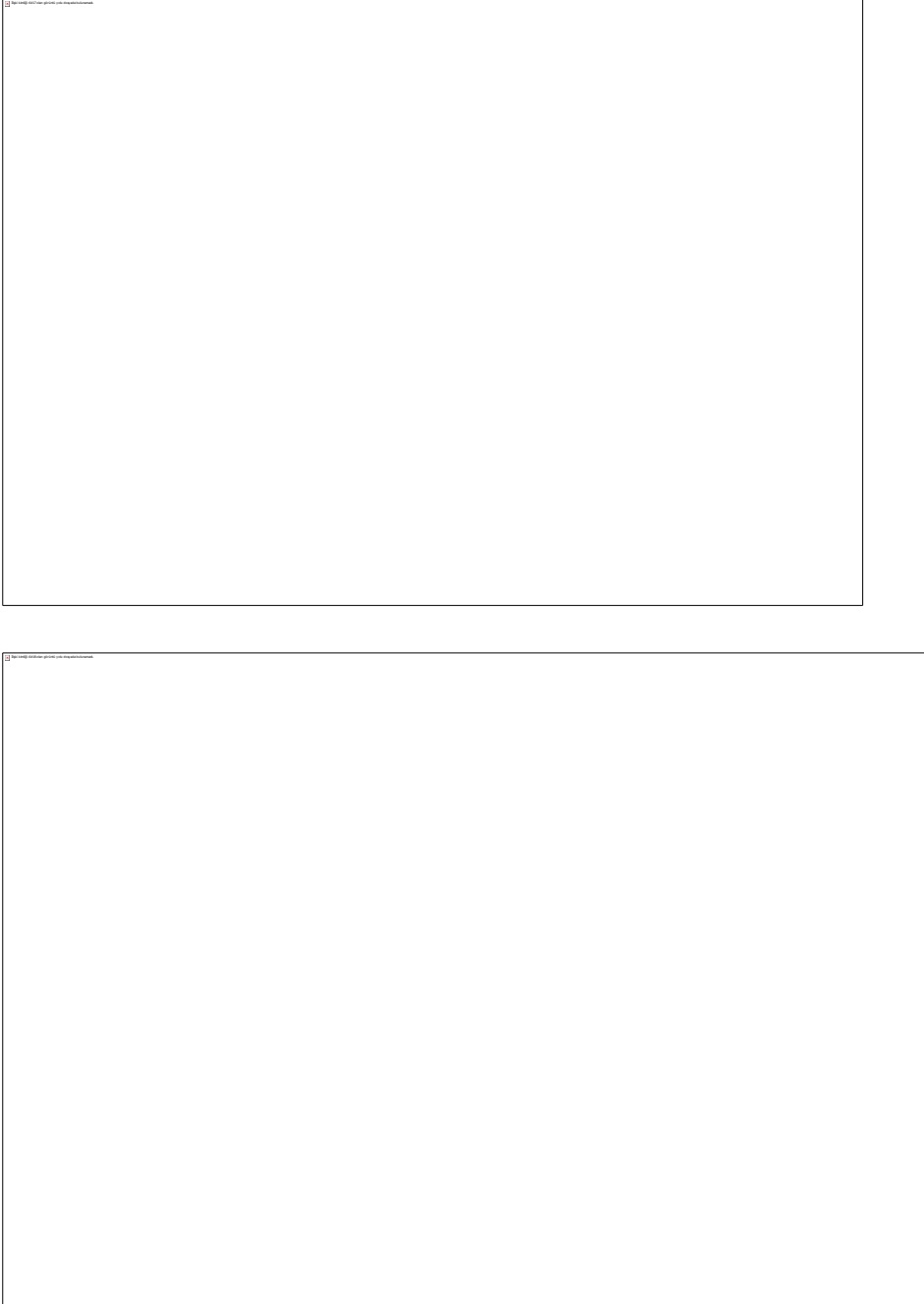
ile beraber, ülkemizde Şırnak, Yüksekova ve Başkale'den elde edilen örnekler bulunmaktadır. Bu bulgular ülkemiz sınırları içerisinde *buxtoni* soy hattının varlığını ilk kez ortaya koymaktadır. Morfolojik olarak tanımlanmış taksonlar ve yayılışlarına bakıldığında, *buxtoni* taksonunun yayılış alanına dahil olmayıp, “*perses*” taksonunun yayılış alanından elde edilmiş İran örneklerinin *buxtoni* topotipik örneği ile *ND4* gen bölgesi açısından tamamen benzer olduğu görülmüştür. Yüksekova ve Başkale örneklerinin *buxtoni* topotipik örneğine, Şırnak örneklerinin ise “*perses*” topotipik örneğine genetik olarak daha yakın olduğundan D KLADI içerisinde yer aldığı tespit edilmiştir. D KLADI içerisindeki genetik farklılık %0.43'tür. Öncelik kuralına uygun olarak bu soy hattı *buxtoni* olarak isimlendirilmiştir. Bu durumda Hakkari bölgesinde yayılış gösterdiği bilinen “*perses*” taksonunun da geçerliliği şüphelidir. E KLADI Ermenistan ve Iğdır (Aralık ve Merkez) örneklerini içermektedir. Bu soy hattının grup içi genetik farklılığı %0.095'tir. Bu soy hattı *armeniaca* morfolojik taksonunun yayılış alanını temsil etmektedir ve Ermenistan örneği topotipik *armeniaca* taksonuna aittir. Bu soy hattı da *armeniaca* olarak isimlendirilmiştir. F KLADI Tunus ve Cezayir'den iki örnek içermektedir ve bu soy hattının kendi içindeki genetik farklılığı %1.19'dur.

Sonuç olarak, genetik olarak bakıldığında A KLADI *terrestris*, B KLADI *ibera*, C KLADI *zarudnyi*, D KLADI *buxtoni*, E KLADI *armeniaca* ve F KLADI Afrika soy hatlarını temsil etmektedir. Sadece morfolojik karakterlere dayanarak tanımlanmış olan “*anamurensis*”, “*antakyensis*”, “*floweri*”, “*nikolskii*”, “*perses*” taksonları genetik olarak desteklenmemiştir. Morfolojik olarak tanımlanmış bu taksonların hangi soy hatları içinde yer aldıkları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

TCS programı kullanılarak mtDNA *ND4* bölgesi (850bç) için 239 dizi analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, atasal haplotip *ibera* olarak isimlendirilen soy hattı, B KLADI içerisinde konumlanan Hap 8 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5).



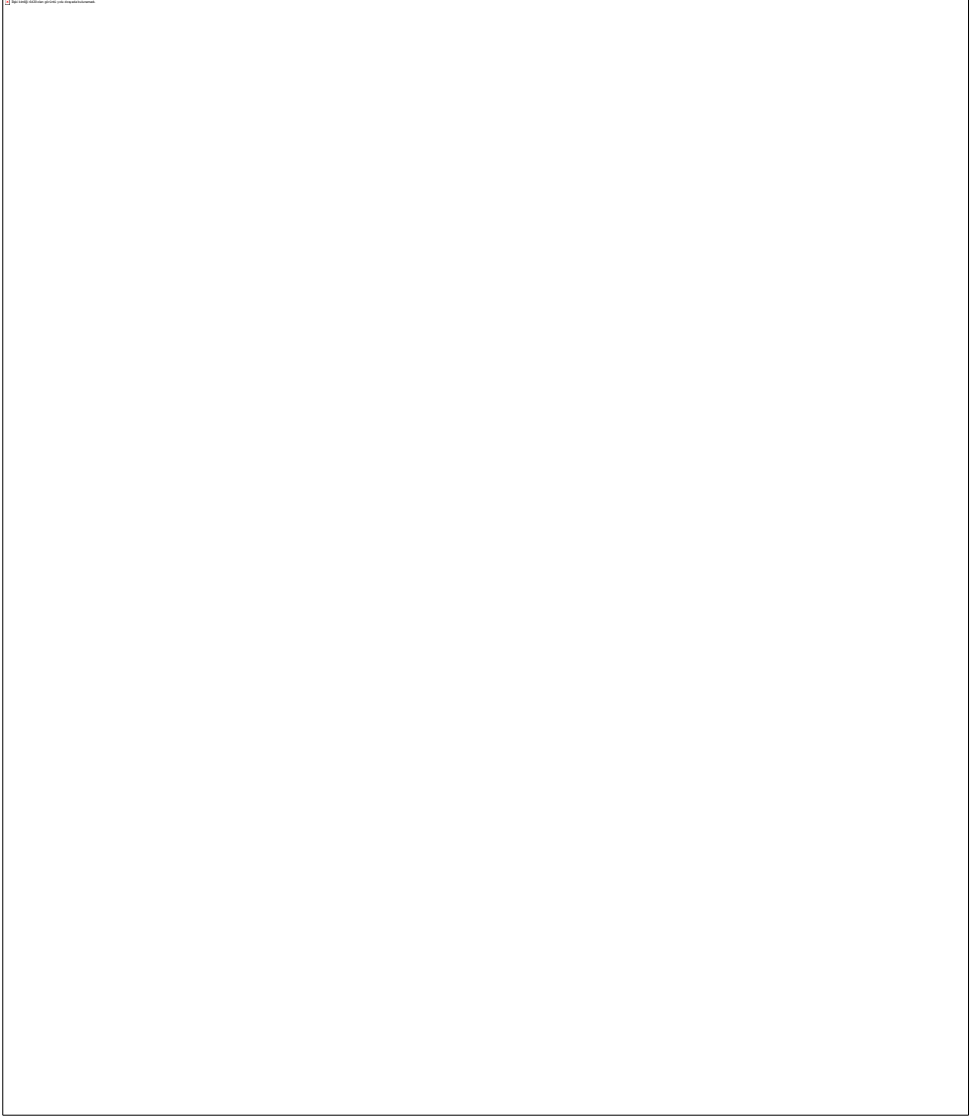
Şekil 3.1. ND4 bölgesi için JC baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı. Ana soy hatları renklendirilmiş ve isimlendirilmiştir. Dalların güvenilirlikleri 10000 bootstrap yapılarak test edilmiş ve bu değerlerden %70'in üzerinde olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir. Yeni haplotip ●



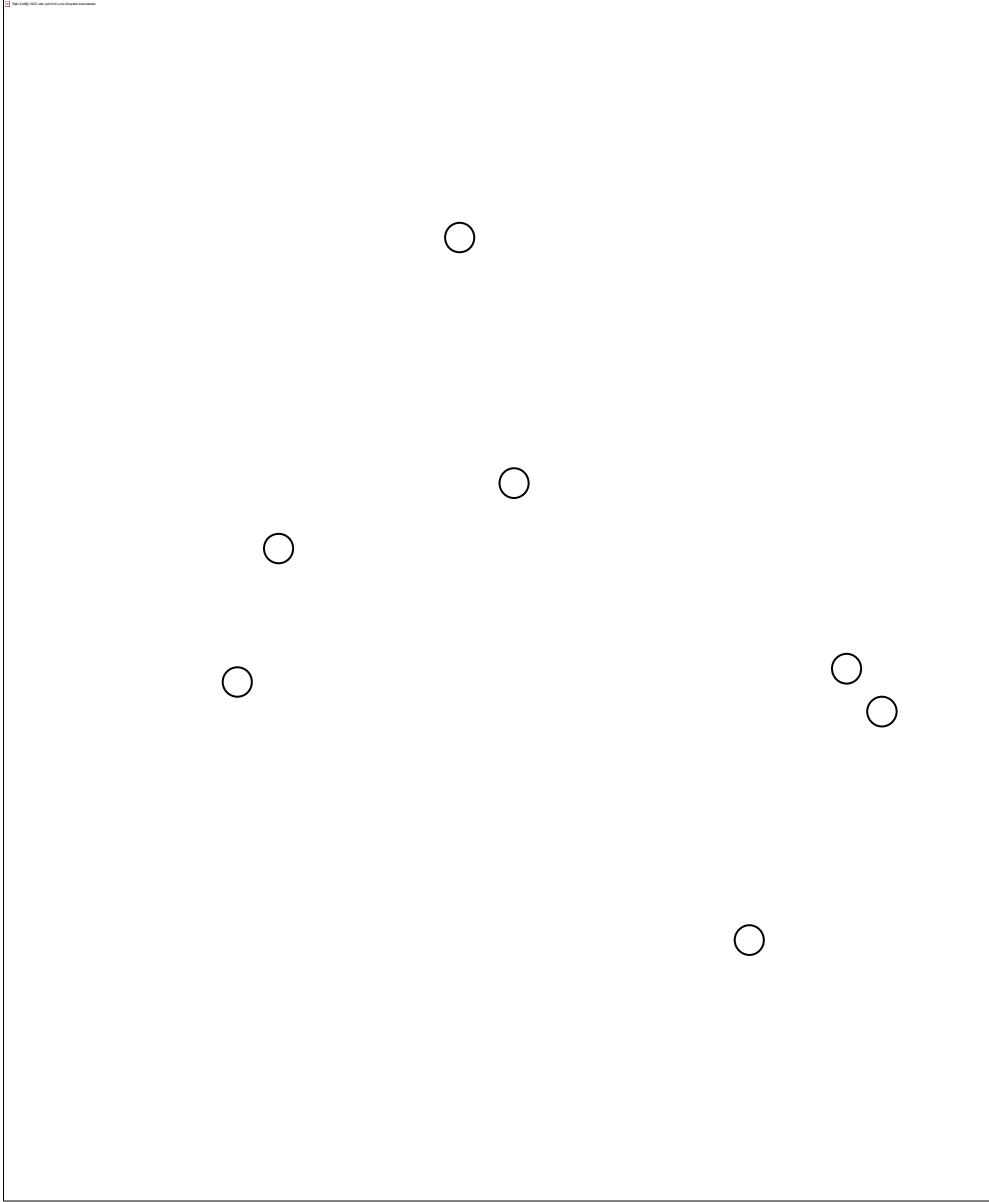
Şekil 3.2. Heuristic Search sonrası elde edilen parsimonik ağaçlar.



Şekil 3.3. Parsimoni analizi sonucu elde edilen dört ağacı özetleyen 50% Majority Rule Consensus ağacı (*ND4*). Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap değerleridir.



Şekil 3.4. TIM baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş olan Maksimum olasılık (ML) ağacı (ND4). Düşüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap, altındaki değerler ise posterior probability değerleridir.



Şekil 3.5. 239 örneğe ait *ND4* bölgesi Parsimoni Network ilişkisi. Renkler ana soy hatlarını temsil etmektedir. Sembol büyüklükleri yaklaşık haplotip frekansını göstermektedir. Sembollerin yanındaki rakamlar *ND4* gen bölgesine ait haplotip numaralarıdır (Çizelge 3.5). Kayıp atasal haplotipler düğüm noktalarında beyaz daire ile gösterilmiştir.

3.3.2. *Cyt b* Gen Bölgesi

Kullanılan 4 farklı filogenetik metod (NJ, MP, ML, BI) ile elde edilen filogenetik ağaçlar birbirine çok yakın topolojiye sahiptir (Şekil 3.6-Şekil 3.8) Tüm metotlarda elde edilen ağaçlarda *Testudo* kompleksi *T. kleinmanni* ve *T. marginata* türlerine göre monofiletiktir (%90-99 bootstrap, 0.95 Posterior Prob.). Yine tüm metotlarla elde edilen ağaçlarda *Testudo* kompleksinin 6 ana soy hattı ile temsil edildiği görülmektedir. Bu soy hatlarından 5 tanesi orta doğu ve Kafkaslarda bir tanesi ise Afrika'da yayılış göstermektedir. Bu soy hatlarında yer alan haplotipler ve bu haplotiplerin coğrafi olarak yayılışı Çizelge 3.5'de verilmiştir.

NJ algoritması K2P baz değişim modeli kullanılarak çalıştırılmıştır. Elde edilen filogram Şekil 3.6'da verilmiştir. NJ ağacında elde edilen ana soy hatlarının bootstrap değerleri %90-99 arasında değişmektedir ve soy hatları istatistiksel olarak iyi derecede desteklenmektedir. *Testudo* kompleksine ait bu 6 ana soy hattından 4 tanesinin temsilcileri ülkemiz sınırlarında bulunmaktadır. Ülkemizde yayılış gösteren gruplar arasındaki genetik uzaklıklar değerlendirildiğinde birbirine en yakın olanlar A KLADI ile B KLADI (%1.98) ve en uzak olanlar B KLADI ile D KLADI (%3.93)'dir.

Parsimoni analizinde "Heuristic Search" algoritması kullanılarak *Cyt b* gen bölgesinin 219 parsimoni bilgi verici karakteri analiz edilmiştir. Analiz sonrasında eşit uzunluğa sahip (parsimonik) 12 ağaç elde edilmiştir. Bu ağaçların uzunlukları 497, Consistency Index (CI) 0,654, Retention Index (RI) 0,868 dir. Elde edilen bu ağaçlar arasında farklılık olup olmadığı Kishino-Hasegawa Test ile kontrol edilmiş ve anlamlı farklılık bulunmamıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Parsimonik 12 ağacı karşılaştıran Kishino-Hasegava Test sonuçları

Ağaç	Uzunluk	Uzunluk Farkı	sd	t	p
1	497				
2	497	0	0.00000	0.000	1.000
3	497	0	2.45070	0.000	1.000
4	497	0	2.82983	0.000	1.000
5	497	0	1.41491	0.000	1.000
6	497	0	1.41491	0.000	1.000
7	497	0	2.00099	0.000	1.000
8	497	0	2.45070	0.000	1.000
9	497	0	3.74351	0.000	1.000
10	497	0	3.74351	0.000	1.000
11	497	0	2.00099	0.000	1.000
12	497	0	2.00099	0.000	1.000

Aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan bu 12 ağaç kullanılarak bu 12 ağacın özeti olarak Stric ve 50% Majority Rule Consensus ağaçları oluşturulmuştur. Bu iki özet ağaç topoloji olarak aynıdır ve parsimonik 12 ağaçtan bir tanesi ile de bire bir uyuşmaktadır. Bu nedenle burada 50% Majority Rule Consensus ağacı verilmiş ve bu konsensus ağacın düğüm noktalarına 10000 replikasyonla elde edilen bootstrap değerleri yazılmıştır (Şekil 3.7).

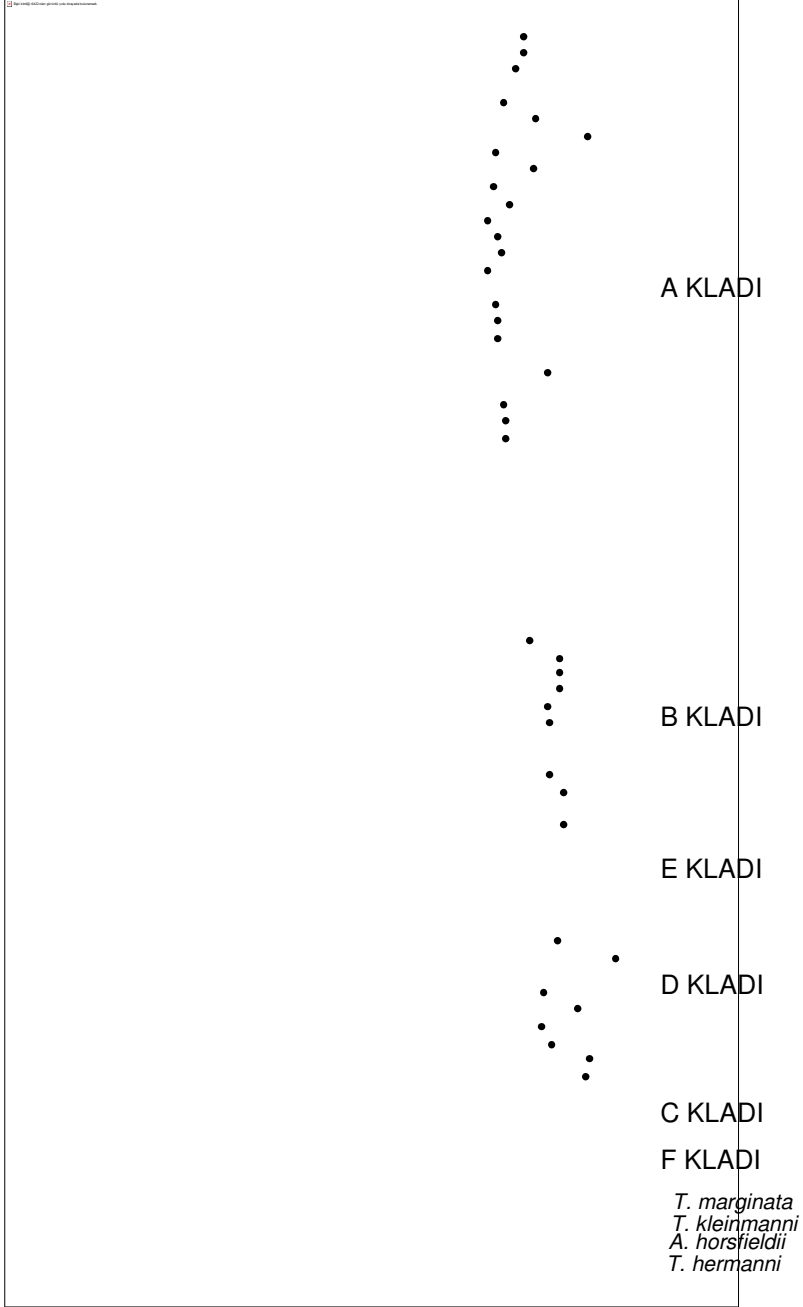
ML analizinde MODELTEST tarafından önerilen HKY+G baz değişim modeli kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ağaç Şekil 3.8’de verilmiştir. Yine bu ağaç üzerinde aynı topolojiye sahip Bayesian Analizi sonucu elde edilmiş 50% Majority Rule Consensus ağacına ait posterior probability değerleri verilmiştir.

Tüm data ele alındığında genetik uzaklıkların %1.98 (A KLADI-B KLADI) ile %12.45 (*horsfieldii*-E KLADI) arasında değiştiği görülmektedir. Yine geçerli türler olan *T. kleinmanni* ve *T. marginata* arasındaki genetik uzaklık %6.06. Kompleks içindeki genetik varyasyona bakıldığında, genetik uzaklık değerlerinin %1.98 (A KLADI-B KLADI) ile %4.93 (B KLADI-F KLADI) arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 3.4). Ana soy hatlarının kendi içlerindeki genetik çeşitlilik

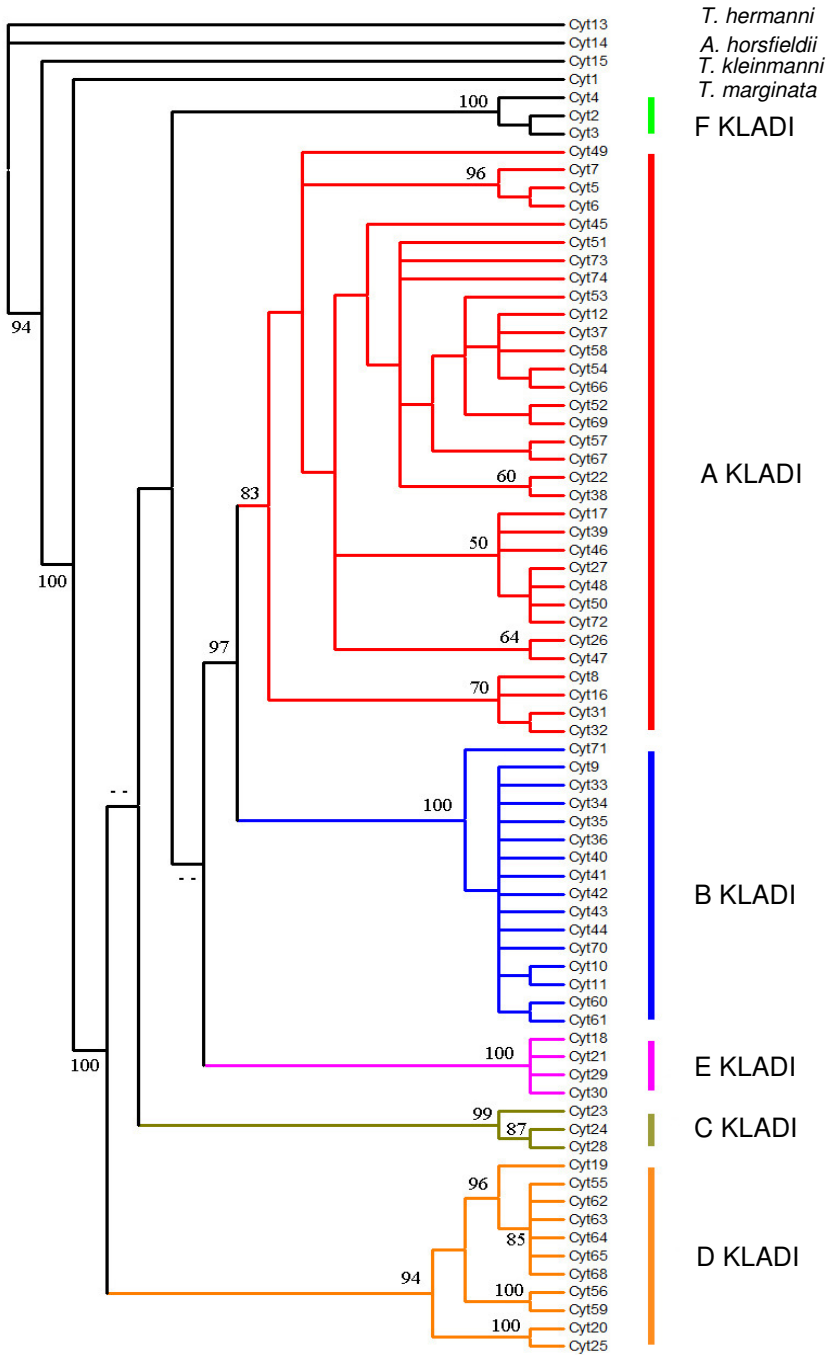
değerlerine bakıldığında 6 ana soy hattından D KLADI'nin grup içi genetik çeşitlilik değerinin %1.34 olduğu diğerlerinin ise %1'den daha düşük olduğu görülmektedir.

mtDNA *Cyt b* sonuçlarımıza göre, A KLADI Güney, Güneydoğu ve Doğu Anadolu ve Levant bölgesi örneklerine ait haplotiplerinden oluşmaktadır. Bunun yanında orta Anadolu'dan bir lokalitede (Meke Gölü) bu soy hattına dahil bir haplotip B KLADI'ye dahil iki haplotip ile beraber bulunmuştur. Morfolojik olarak tanımlanmış taksonlar bazında baktığımızda bu soy hattı *T. g. anamurensis*, *T. g. antakyensis*, *T. g. floweri*, *T. g. ibera*, *T. g. terrestris* ve Sicilya'dan elde edilmiş fakat orada doğal yayılım göstermeyen bir örneği içermektedir. Bu soy hattında son zamanlarda tanımlanmış olan ve geçerliliği tartışmalı durumda bulunan “*anamurensis*”, “*antakyensis*”, “*floweri*” taksonları *terrestris* haplotipleri ile birlikte gruplanmıştır. Bu durumda “*anamurensis*”, “*antakyensis*”, “*floweri*” taksonları genetik olarak geçerliliğini kaybetmekte ve priorite kuralları gereği *terrestris* taksonu bu soy hattının temsil ettiği takson olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında GenBank'tan alınan örnekler içerisinde morfolojik *ibera* taksonunun yayılım alanından edilmiş olan 2 örnek (Van, Erciş) doğal olarak bu soy hattı altında gruplanmıştır. Yine GenBank'tan alınan Sicilya örneği bu soy hattı içerisinde gruplanmıştır fakat morfolojik olarak Sicilya örneği *T. graeca graeca* taksonuna dahildir ve Kuzey Afrika örnekleri ile beraber gruplanması gerekir. Bu şekilde *terrestris* soy hattında gruplanan Sicilya örneğinin buraya doğal olmayan yollardan geldiği düşünülmektedir. B KLADI Balkanlar, Anadolu ve Batı ve orta Kafkaslar'dan morfolojik olarak *ibera* ve *nikolskii* taksonuna ait haplotipleri içermektedir. Bu soy hattı içerisinde yer alan “*nikolskii*” taksonu *ibera* taksonu ile genetik olarak tamamen benzerdir ve priorite kuralları gereği bu soy hattı *ibera* olarak isimlendirilmiş ve “*nikolskii*” taksonu da genetik olarak ortadan kalkmıştır. C KLADI doğu İran'dan elde edilmiş örnekleri içermektedir ve bu soy hattı zarudnyi olarak isimlendirilmiştir. Bunun yanında GenBank'tan alınan bazı “*perses*” örnekleri de bu soy hattında gruplanmıştır. Bu örneklerin lokalite bilgilerinden morfolojik olarak “*perses*” olarak tanımlanmış bu örneklerin aslında zarudnyi taksonunun yayılım alanından elde edilmiş olduğu ve bu durumun örneklerin morfolojik olarak hatalı tanımlanmasından kaynaklandığı görülmektedir. D KLADI ülkemizde Şırnak, Yüksekova ve Başkale'den, Kuzey batı İran ve orta İran'dan toplanmış örnekleri içermektedir. Bu soy hattı içerisinde morfolojik olarak “*perses*” ve *buxtoni* olarak sınıflandırılmış taksonlar gruplanmıştır. Soy hattı içerisinde aynı lokaliteden veya birbirine çok yakın lokalitelerden elde edilmiş farklı örneklerin *buxtoni* veya “*perses*” haplotiplerini

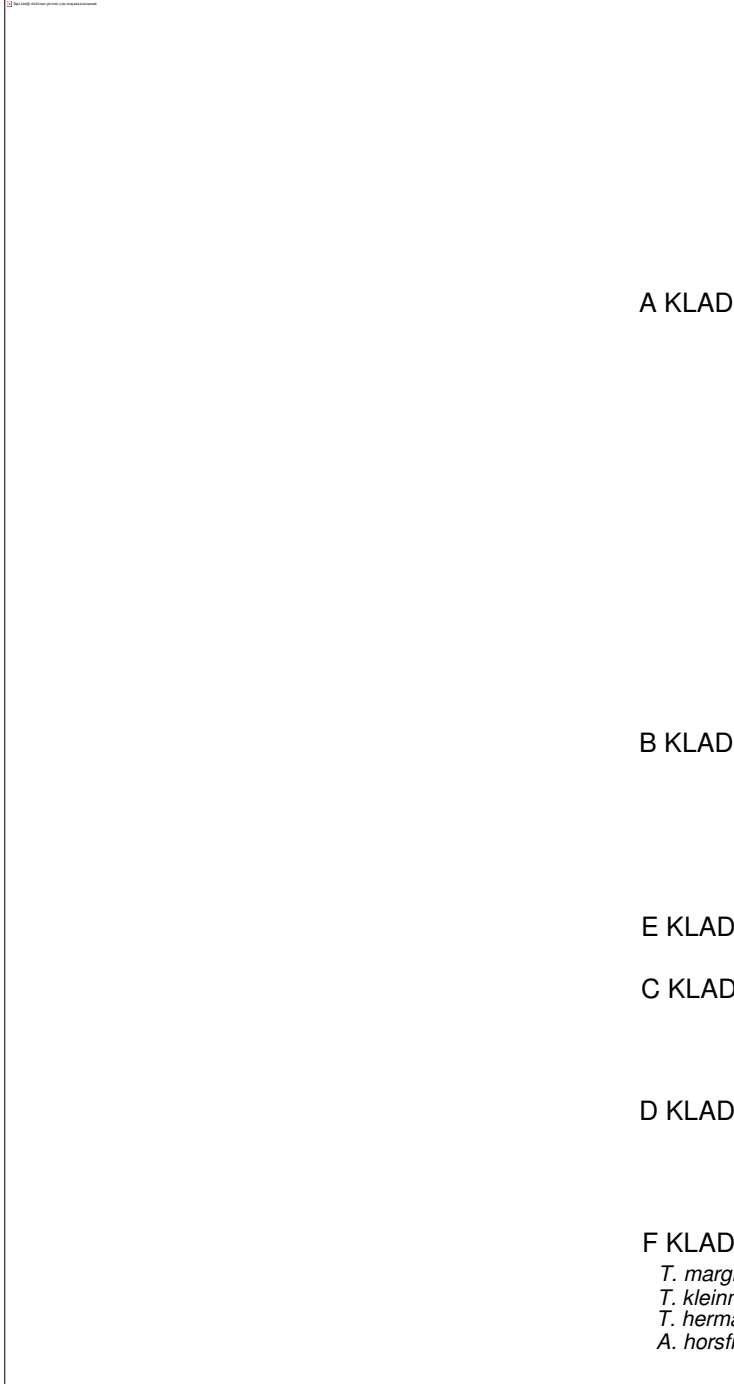
taşımakta olduğu görülmüştür. Bu nedenle priorite kuralları gereği “*perses*” taksonu genetik olarak geçerliliğini yitirerek bu soy hattı *buxtoni* olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca *buxtoni* soy hattının ülkemizde yayılış gösterdiği genetik olarak ilk defa burada elde edilen bilgiler ile ispatlanmıştır. E KLADI ülkemizde Aralık’tan ve Doğu Kafkaslardan elde edilmiş ve morfolojik olarak *armeniaca*, “*pallasi*” ve *ibera* olarak tanımlanmış örnekler için haplotipleri içermektedir. Burada “*pallasi*” örnekleri *armeniaca* örnekleri ile genetik olarak benzer olduğundan dolayı geçerliliğini kaybetmiş ve bu soy hattı *armeniaca* olarak isimlendirilmiştir. Bu soy hattı içerisinde gruplanan Azerbaycan orijinli bir adet *ibera* haplotipi yine bir *armeniaca* örneğinin morfolojik olarak hatalı bir şekilde *ibera* şeklinde tanımlanmasından kaynaklanmaktadır. F KLADI veya Afrika soy hattı kuzey Afrika ve bazı batı Akdeniz adalarından elde edilmiş *T. graeca graeca*, *T. g. nabeulensis* ve *T. g. cyrenaica* örneklerine ait haplotipleri içermektedir.



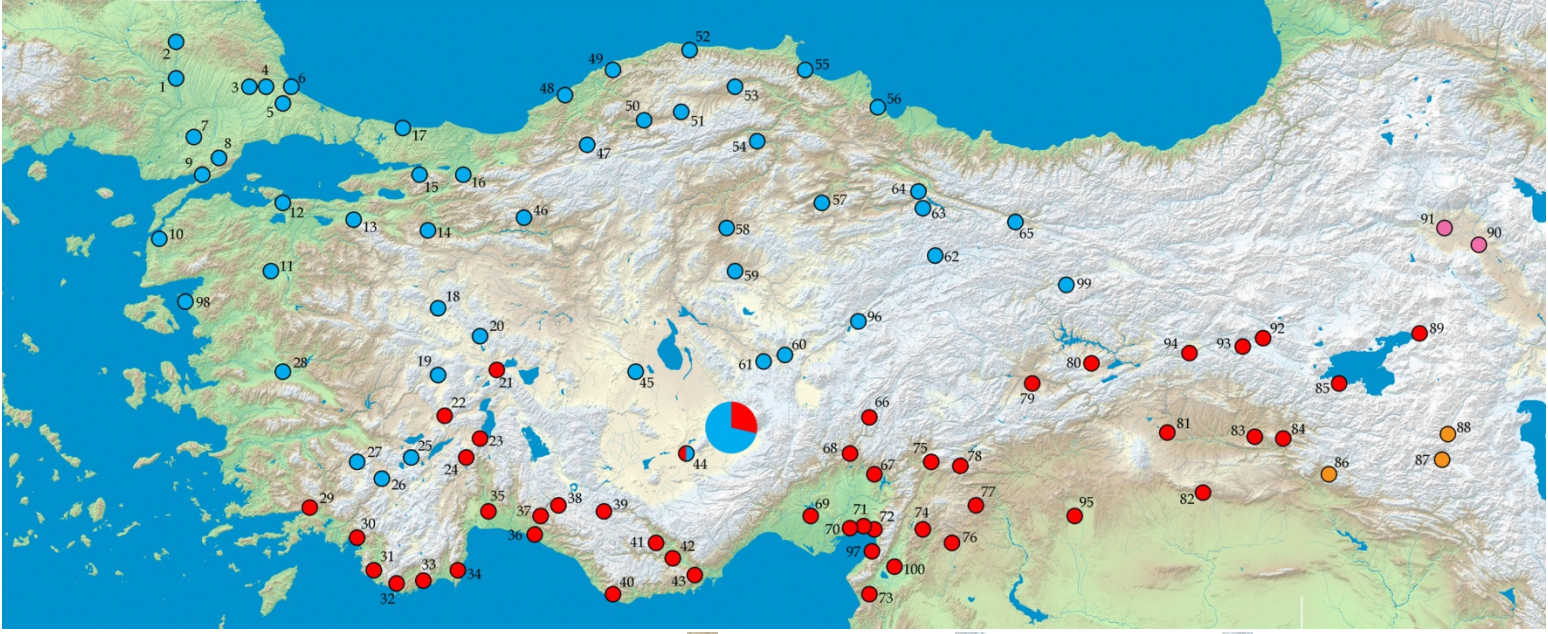
Şekil 3.6. K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (*cytb*). Ana soy hatları renklendirilmiş ve isimlendirilmiştir. Dalların güvenilirlikleri 10000 bootstrap yapılarak test edilmiş ve bu değerlerden %70'in üzerinde olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir. Yeni haplotip •








Şekil 3.7. Parsimoni analizi sonucu elde edilen 12 ağacı özetleyen 50% Majority Rule Consensus ağacı (*cytb*). Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap değerleridir.

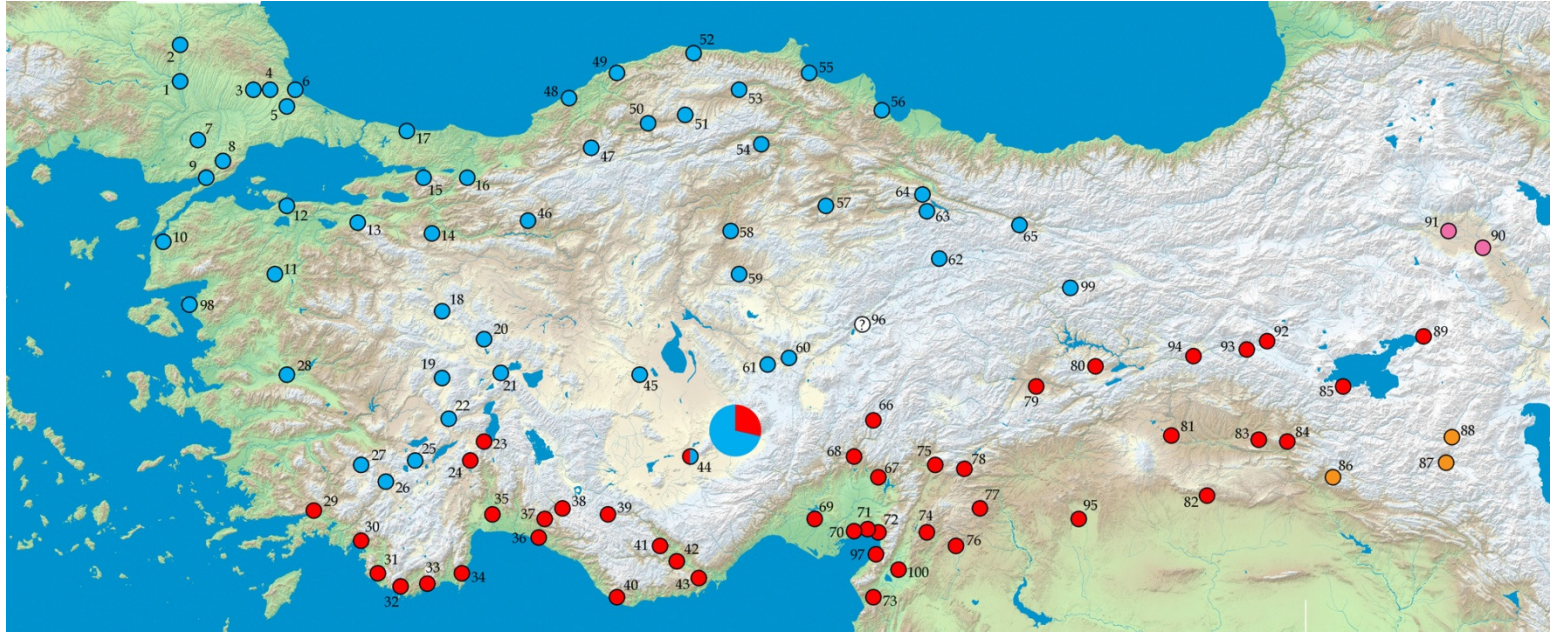


Şekil 3.8. HKY+G baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş olan Maksimum olasılık (ML) ağacı (*cytb*). Düğüm noktaları üzerindeki değerler bootstrap, altındaki değerler ise posterior probability değerleridir.





Şekil 3.9. *ND4* soy hatlarının ülkemizdeki dağılımı.  Klade A haplotipi,  Klade B haplotipi,  Klade D haplotipi,

 Klade E haplotipi,  Klade A ve Klade B haplotiplerinin beraber gözleendiği lokalite, Pasta grafik bu lokalitede farklı kladlara ait haplotip frekanslarını göstermektedir.



Şekil 3.10. *Cyt b* soy hatlarının ülkemizdeki dağılımı.  Klade A haplotipi,  Klade B haplotipi,  Klade D haplotipi,

 Klade E haplotipi,  Klade A ve Klade B haplotiplerinin beraber gözlendiği lakolite, Pasta grafik bu lokalitede farklı kladlara ait haplotip frekanslarını göstermektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız çalışma sonucunda *Testudo graeca* kompleksi içerisindeki genetik varyasyonun daha önceki çalışmalarda da (Van der Kuyl vd. 2002, 2005; Parham vd., 2006b; Fritz vd., 2007) tespit edildiği gibi düşük olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalardan birinde (Van der Kuyl vd., 2002) 12S rRNA gen bölgesi çalışılmış ve 28 örnekte 10 haplotip tespit edilmiş olup, bu haplotiplerin birbirinden yalnızca bir veya iki transisyon ve bir insersiyon ile ayrıldığı belirtilmiştir. Yine Van der Kuyl vd. tarafından 2005 yılında 12S rRNA bölgesine ek olarak D-loop bölgesi de dahil edildiği, bir çalışmada, *T. graeca* kompleksinin 5 iyi desteklenmiş soy hattının bulunduğu, fakat tüm veri seti arasındaki ortalama uzaklığın sadece %1 olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada ise birbiriyle yakın ilişkili diğer kaplumbağa türlerinde çeşitli araştırmacılar (Stuart ve Parham 2004; Spinks ve Shaffer 2006, Parham vd., 2006a, b) tarafından *Testudo* kompleksinin filogenetik ilişkisini test etmek için kullandıkları *ND4* bölgesi seçilmiştir. Bu bölge için *T. graeca* kompleksi içerisindeki ortalama genetik uzaklık %3,3 olarak tespit edilmiştir. Araştırmamızda *ND4* gen bölgesine ilaveten (Caccone vd., 1999; Palcovacs vd., 2003; Austin vd., 2003; Fritz vd., 2005a, 2006,2007) tarafından daha önceki filogenetik çalışmalarda kullanılan 12S rRNA'ya göre daha bilgi verici bir belirteç olduğu gösterilen mtDNA *Cyt b* bölgesi de kullanılmıştır. Bu bölge için kompleks içi ortalama genetik uzaklık %3.4 olarak tespit edilmiştir. Ana soy hatlarının birbirlerine göre genetik uzaklıkları incelendiğinde, Van der Kuyl vd., (2005)'te, *ibera* ile *terrestris* örneklerine ait iki haplotip (*Tg6-Tg7*) arasındaki genetik uzaklık %1.4 gibi yüksek bir değerken, diğer ana soy hatları arasındaki genetik uzaklıklar oldukça düşük bulunmuştur. *Cyt b* bölgesini kullanarak yaptığı çalışmasında Fritz vd., (2007) kompleksin ana soy hatları arası genetik mesafeyi %3-5.5 arasında vermektedir. Bizim verilerimizde elde ettiğimiz sonuçlara göre *ND4* bölgesi için soy hatları arası genetik uzaklıklar %1.43 ile %3.10 arasında, *Cyt b* bölgesi için ise %1.98 ile %4.93 arasında değişiklik göstermektedir. Yine kompleksin ana soy hatları kendi içerisindeki genetik farklılıkları açısından ele alındığında Van der Kuyl vd. (2005)'te komplekse ait ana soy hatları için değerlerin %0 ile %0.2 arasında değişen çok düşük değerler olduğu görülmektedir. Yine *ND4* bölgesi açısından Parham vd., 2006b çalışması bu değerleri %0 ile %1.1 arasında bulmuştur. *Cyt b* bölgesi için ise Fritz vd. 2007'de ana soy hatlarını kendi içlerindeki genetik mesafeleri %0.24 ile %1.34 arasında rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada bu değerlere baktığımızda, *ND4* bölgesi için %0 ile %1.19

arasında (Çizelge 3.2), *Cyt b* bölgesi için ise %0.14 ile %1.34 arasında (Çizelge 3.4) değiştiği görülmektedir. Bulunan bu değerler Fritz vd. (2007) sonuçlarıyla uyum içerisindedir.

ND4 ve *Cyt b* haplotiplerinin dağılımı incelendiğinde, Van der Kuyl vd. (2002; 2005) çalışmaları yeterli sayıda örnekleme yapılmadığından haplotipler, dağılımları ve kladlar arasındaki genetik farklılık hakkında güvenilirliği yüksek veriler olması muhtemel olmayabilir. *ND4* bölgesi için Parham vd. (2006b) ve *Cyt b* bölgesi için ise Fritz vd. (2007) tarafından yapılan çalışmaların bulguları, bu çalışmadakilerle uygun olarak 6 ana soy hattı içerdiği görülmektedir. Bu iki çalışmanın esas eksik noktası, ülkemiz gibi farklı ekolojik ve zoocoğrafik alanlara sahip büyük ve önemli bir alandan çok sınırlı sayıda örneğin incelenmesidir. Bu nedenle, bu iki çalışmada da ülkemizde bulunan mtDNA soy hatlarından biri olan *buxtoni* soy hattı tespit edilememiştir. Ayrıca tespit edilmiş olan soy hatları için coğrafi olarak net bir yayılış sınırı da verilememiştir. Bu yüzden, mevcut çalışma örnekleme alanı ve dağılımı açısından da önemlidir. Keza, ülkemizde yayılış gösterdiği öne sürülen morfolojik olarak tanımlanmış tüm taksonları ve onların ülkemizdeki tüm yayılış alanlarını kapsamaktadır. Elde edilen bulgular sonucunda *ND4* bölgesi için 52 haplotip, *Cyt b* bölgesi için ise 74 haplotip saptanmış ve ana soy hatlarının yayılış alanları daha net bir şekilde çizilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10). Tespit edilen haplotiplerden *ND4* bölgesi için 33, *Cyt b* bölgesi için ise 34'ü yenidir yani bu çalışma ile ortaya çıkartılmıştır. Bunun yanında daha önceki çalışmalarda ülkemizde varlığı tespit edilememiş olan *buxtoni* soy hattının varlığı ortaya konmuş ve böylece komplekse ait ana soy hatlarından 4'ünün ülkemiz sınırları içinde yayılış gösterdiği tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada “*perses*” ve *buxtoni* haplotiplerinin aynı veya yakın lokalitelerde birlikte bulunması nedeniyle, bu soy hattının (D KLADI) tamamının *buxtoni* olması gerektiği açıklığa kavuşturulmuştur. Yine tüm Anadolu’da *iberalterrestris*, *terrestris/buxtoni* soy hatlarının yayılış sınırları ortaya çıkarılmıştır. Bu alanlardan özellikle Meke Gölü kuvvetle muhtemel bir *terrestris/ibera* hibridizasyon bölgesidir, çünkü bu bölge hem *ibera* hem de *terrestris* haplotipini taşıyan bireyleri barındırmaktadır. *Testudo* kompleksi içinde bu şekilde bir olası *terrestris/ibera* hibrit zonu bu çalışma ile ilk defa ortaya çıkarılmıştır.

Filogenetik sonuçlara bakıldığında *ND4* bölgesi için, daha önceki çalışmalardan Parham vd. (2006b)’da elde edilen filogenetik ağaçlar ile çalışmamızda elde edilen

ağaçlar uyumludur. *T. kleinmanni* ve *T. marginata* türlerine göre *T. graeca* kompleksinin monofiletik olduğu hem Parham vd., (2006b)'da hem de Fritz vd., (2007)'de belirtilmiştir. Yapılan tüm filogenetik analizler de bu monofiletik ilişki doğrulamıştır. Ayrıca komplekse ait 6 ana soy hattının varlığı açısından da çalışmamız bu iki çalışma ile uygunluk göstermektedir. *ND4* bölgesi için elde edilen parsimoni ağacı Parham vd., (2006b)'da verilen ağaçla karşılaştırıldığında tamamen aynı topolojiye sahiptir, ülkemizden elde ettiğimiz haplotipler *terrestris*, *ibera*, *armeniaca* ve *buxtoni* kladları içerisine yerleşmiştir. ML analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaçta Afrika Kladi olarak da isimlendirilen F KLADI *armeniaca* örneklerini içeren E KLADI ile kardeş grup ilişkisi içersindedir. Bu durum önceki çalışmada da (Parham vd., 2006b) belirtilmiştir. *Cyt b* bölgesi için elde edilen filogenetik ağaçlar da Fritz vd., 2007 ile uyumludur. Fritz vd. 2007'de mtDNA'ya ek olarak ISSR'ler de kullanılmış fakat *T. graeca* kompleksi ISSR sonuçlarına göre kongenerik çıkmıştır.

Yaptığımız çalışmadaki filogenetik ağaçlar ve haplotiplerin dağılımları incelendiğinde ülkemizdeki mtDNA soy hatlarının sınırları tam olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.9, Şekil 3.10). Daha önce de belirttiğimiz gibi önceki çalışmaların aksine ülkemizde yayılışı olan mtDNA soy hattı sayısı 4'tür. Bu soy hatlarından A KLADI *terrestris*, "*anamurensis*", "*antakyensis*" ve "*floweri*" haplotiplerini içermektedir ve bu morfolojik taksonlara ait diziler A KLADI içerisinde yer almışlardır. Fritz vd. 2007'de "*antakyensis*" ve "*anamurensis*" morfolojik taksonlarına ait dizilerin klad içerisinde çok kuvvetli desteklenmeyen 3 alt klada ayrıldığı belirtilmesine karşın çalışmamızda bu şekilde bir ilişki tespit edilmemiştir. Ayrıca "*anamurensis*", "*antakyensis*" ve "*floweri*" morfolojik taksonlarına ait dizilerin *terrestris* dizileri ile genetik olarak neredeyse ve hatta zaman zaman tamamen benzer olduğu görülmüştür. Bu durumda A KLADI ülkemizde Muğla/Kızılağaç'tan başlayarak Toroslar boyunca güneyde Eruh'a kadar yayılış gösterir. Bu yayılışta zaman zaman Toroslar'dan içeri girişler bulunmaktadır. Bu girişler batıdan doğuya doğru sırayla incelenecek olursa:

1. Muğla/Kızılağaç: Toros Dağlarının bariyer özelliği Çine Vadisi'nde sona ermektedir (Demirsoy,1996). Bu nedenle Çine ve batısında kalan alan olası *ibera/terrestris* hibritlerine rastlanabilecek ilk alandır.

2. Eğirdir, Çay: Bu bölge daha önceki çalışmalarda morfolojik olarak tanımlanmış *ibera* taksonunun yayılış alanı olduğu bildirilmiş, ancak çalışmamızda bu bölgeden elde edilen bireylerin *terrestris* mtDNA soy hattına dahil olduğu görülmüştür. Coğrafik olarak incelendiğinde, Aksu, Sütçüler, Kovada Gölü ve Eğirdir Gölü hattı boyunca düşük rakımlı vadilerin bulunduğu görülmektedir. Bu durumda bu bölge *ibera/terrestris* olası hibritlerinin aranabileceği uygun noktalardan bir tanesidir.
3. Karapınar/Meke Gölü: Bu alan ilk iki alandan daha farklı bir statüye sahiptir. Meke Gölü'nden elde ettiğimiz 7 örnekten 5 tanesi B KLADI (*ibera*), 2 tanesi A KLADI (*terrestris*) haplotipi taşımaktadır. Normalde morfolojik sınıflandırmada bu alan *ibera* yayılış alanına girmektedir. Ancak, Meke Gölü örnekleri diğer *ibera* ve *terrestris* örneklerinden morfolojik olarak farklıdır (Türkozan vd., 2005). Bu alan Göksu Nehri vadisi boyunca Mut-Karaman üzerinden Toroslar'ın güneyi ile ilişkilidir. Bu geçit başka türlerle yapılan diğer çalışmalarda da öne çıkan bir geçittir. Fakat burada ilginç olan aynı alanda morfolojik 2 taksona ait haplotiplere de rastlanmasıdır. Bu alan *ibera/terrestris* hibritlerinin aranabileceği önemli alanlardan bir tanesidir.
4. Malatya-Elazığ-Bingöl-Muş: Bu bölgelerden analiz edilen örnekler A kladi (*terrestris*) içerisinde yer almıştır ve burası *terrestris* soy hattının Toros Dağ sırasının kuzeyine geçtiği alanlardır. Bu geçişin düşük rakımlı Fırat Nehri vadisi boyunca olduğuna işaret etmektedir. Fırat Nehri, Tatvan, Muş Ovası, Genç/Bingöl, Elazığ, Malatya ve sonunda da Kahramanmaraş'a ulaşan önemli bir kola sahiptir ve Yukarı Fırat Havzası Doğu Toroslar'ı güneybatı doğrultusunda bu hattı kullanarak aşar. Bu düşük rakımlı ılıman vadi bu alanlardan elde ettiğimiz örneklerin Toroslar'ın kuzeyindeki yayılışına açıklık getirmektedir. Burada ilginç olan Kemaliye/Erzincan lokalitesinin (Lok. No. 99) Yukarı Fırat havzasına çok yakın olmasına rağmen, B KLADI haplotipine sahip olmasıdır. Bu nedenden dolayı Yukarı Fırat havzası da olası *ibera/terrestris* temas noktalarındandır.
5. Van Gölü: Van Gölü civarından elde edilen örnekler morfolojik olarak ele alındığında, *ibera* taksonunun yayılış alanına girmektedir, fakat bazı

araştırmacılar bu alanda yayılış gösteren kaplumbağa örneklerini taksonomik durumuna tam bir açıklama getirmemişler ve bu alanın çalışılması gerekliliğini vurgulamışlardır. Yine Fritz vd. (2007)'de Van Gölü civarından elde edilmiş 2 örnek *ibera* olarak etiketlenmiş, daha sonra yapılan analiz sonucunda bu örneklerin *terrestris* kladında yerleştiği görülmüştür. Van Gölü civarından elde ettiğimiz örnekler A KLADI (*terrestris*) içerisinde yer almaktadır. Bu alanda A KLADI haplotiplerinin bulunması bir önceki maddede belirttiğimiz Fırat yolunun aslında Muş ovasından sonra Tatvan'a kadar gelmesidir. Çünkü Fırat Nehrinin önemli kollarından birisi Tatvan'dan başlayarak, Muş Ovası, Genç, Elazığ, Malatya, Kahramanmaraş yolunu izlemektedir. Diğer A KLADI örneklerinin elde edildiği lokalitelere göre rakımın yüksek olmasının yanında, bu farkı kısmen tolere edebilecek iki önemli etken Van Gölü'nün A KLADI haplotiplerinin yayılış gösterdiği Muş Ovası, Genç ve Elazığ ile aynı enlemde bulunması ve Van Gölü'nün çevresinde iklimin nispeten ılıman olmasıdır (Atalay, 2008). Van Gölü örnekleri diğer örneklerle göre yine de morfolojik farklılıklar göstermektedir. Van civarından topladığımız örnekler, 1792 ve 1702 m rakımla en yüksek rakımdan elde ettiğimiz lokaliteleri oluşturmaktadır. Kemaliye'nin doğusu ve Erciş'in kuzeyinden daha kuzeydoğuda *Testudo* örneği elde edilememiştir (Aralık civarından elde edilen *armeniaca* örnekleri hariç). Daha önceki çalışmalarda (Başoğlu, Baran 1977) bu alandan bazı lokalitelerde *Testudo* kayıtları verilmiştir, fakat genel görüş Anadolu'nun kuzeydoğu ucunda *Testudo* türlerinin yayılış göstermediğidir. Bu nedenle yüksek rakımlı Van Gölü olası *iberalterrestris* temas bölgesi olarak değerlendirilmemekle beraber, burada yayılış gösteren ve diğer örneklerden ayrılan kabuk yapısına sahip bireyler üzerine daha fazla çalışma yapılması gereklidir.

Yukarıda belirttiğimiz A KLADI/B KLADI temas alanlarının yanında A KLADI (*terrestris*) ülkemizde varlığı ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiş olan D KLADI (*buxtoni*) ile de temas halindedir. Bu iki kladın birbirine en fazla yaklaştığı nokta Sağlarca/Eruh ile Şırnak lokaliteleridir (Şekil 3.9,Şekil 3.10). Bu iki lokaliteden Sağlarca/Eruh (Lok. No: 84) lokalitesinden elde edilen örnek A KLADI haplotipine, Şırnak'tan (Lok. No: 86) elde edilen örnekler ise D KLADI haplotipine sahiptir. Bu lokalitelerdeki örnekler için morfolojik olarak yapılan değerlendirmelerde Başoğlu ve Baran (1977) tarafından Hakkari civarından bir

örnek T. g. *ibera* olarak verilmiş, ancak son zamanlarda yapılan bir çalışma ile (Türkozan vd., 2005b) Şırnak, Yüksekova ve Başkale civarında *T. perses* taksonunun varlığı belirtilmiştir. Bu iki lokalite coğrafik açıdan ele alındığında, aralarındaki mesafe sadece 88 km olmakla beraber, Sağlarca/Eruh ile Şırnak, Yüksekova ve Başkale lokaliteleri arasındaki temel farklılık deniz seviyesinden yüksekliktir. Sağlarca/Eruh 507m, Şırnak 1527m, Yüksekova 1692m ve Başkale 1695m rakıma sahiptir (Çizelge 2.1).

Daha önceki bazı kaynaklarda (Başoğlu ve Baran, 1977) Erzurum ve Doğubeyazıt'tan kaplumbağa kayıtları literatür bilgisine bakılarak verilmiştir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda ve bu çalışmada Suşehri ve Kemaliye lokalitelerini birleştiren doğru ile Solhan Erciş lokalitelerini birleştiren doğruların Kuzeydoğusunda kalan alan Aralık, Iğdır ve Kars Ani köyü Hariç, *Testudo* kompleksine ait örnek bulunmayan alanlardır. Aralık ve Iğdır'dan elde edilen örnekler morfolojik olarak diğer taksonlardan (*ibera*, *terrestris*, *perses*) farklıdır (Türkozan vd. 2010). Genetik olarak Aralık Melekli köyünden bir örnek Fritz vd., (2007) çalışmasında analize dahil edilmiş ve *armeniaca* soy hattında yer almıştır. Bu bölgeden elde edilen örnekler Parham vd. (2006b) ve Fritz vd. (2007) örnekleri ile beraber analiz edilmiş ve bu örneklerin E KLADI (*armeniaca*) haplotiplerine sahip olduğu ve diğer *armeniaca* haplotipleri ile gruplandığı tespit edilmiştir. Parham vd. (2006b) çalışmasında kullanılan *armeniaca* örneklerinden bir tanesi topotiptir. Aynı çalışmada tip lokalitenin 11 km uzağından elde edilen başka bir örnek ile topotip örneği arasındaki genetik farklılık %0.1 gibi çok düşük bir değer olmasına rağmen, bu iki birey birbirinden fenotipik olarak çok farklı bulunmuştur. Parham vd., (2006b)'na göre bu bireylerden topotipik olan tamamen *armeniaca* özelliklerini taşıyan bir fenotipe sahipken, diğer örnek öteki *Testudo* kompleks üyeleri gibi yüksek kubbeli bir kabuğa ve plastral kinesise sahiptir. Bu soy hattı ve temsil ettiği takson *armeniaca* Ermenistan ve Dağlık Karabağ Cumhuriyeti'nin en güney noktalarında yayılış gösterir ve bu alanların güneyinde İran'ın kuzeyinde *buxtoni* soy hattı ile muhtemel temas noktaları içermeye ihtimali vardır. Tip lokalite Meghri (*armeniaca* tip lokalitesi) bu sınırdaki bulunan bir lokalitedir ve topotipik örnek ile yakındaki lokaliteden alınan genetik olarak nerdeyse özdeş, ancak fenotipik olarak *armeniaca* örneklerinden daha çok diğer *Testudo* kompleksi üyelerine ait özellikler taşıyan birey için olası açıklama, hibritleşme olabilir. Yani bu örnek *armeniaca* mitokondrisine sahip bir *buxtoni* olabilir ve bunun için çekirdek DNA analizinin yapılması gerekir. Fritz vd., (2007) Hazar Denizi

güneybatı kıyısı boyunca elde ettiği bazı örnekleri morfolojik olarak “*pallasi*” olarak tanımlamış, fakat mtDNA analizleri sonucunda bunların *armeniaca* haplotipleri ile beraber aynı soy hattında bulunduğunu belirtmiştir.

Perälä (2002a) Türkiye’nin Akdeniz kıyıları boyunca yayılan *T. graeca* popülasyonlarını morfometrik verileri göz önünde bulundurarak bir çok tür ve alttüre ayırmıştır. Daha sonra tüm Türkiye’yi kapsayan detaylı morfometrik değerlendirmede (Türkozan vd., 2010) Akdeniz kıyıları boyunca yayılış gösteren popülasyonların morfometrik olarak daha önce belirtildiği gibi çok farklı olmadığını ortaya koymuştur. Bu durum Parham vd., 2006b ve Fritz vd., 2007 çalışmalarındaki mtDNA kladlarının sınırları ile ve bizim çalışmamızda elde edilen mtDNA kladlarının sınırları ile uygunluk göstermektedir.

Perälä, (2002a) İran’dan morfolojik ve morfometrik verilere dayanarak tanımladığı “*perses*” taksonunun yayılış alanının Hakkari Esendere’ye kadar uzandığını belirtmiştir. Bu çalışmaya dayanarak bölgede yapılan diğer bir araştırmada (Türkozan vd., 2005b) türün burada bulunduğu ve morfolojik olarak da diğer gruplardan farklılık gösterdiği doğrulanmış ve türün yayılış alanı genişletilmiştir. Zira son yapılan çalışmada (Türkozan vd., 2010) bu grubun morfometrik olarak diğer gruplardan farklı olduğu bir kez daha ortaya konmuştur. Ancak Fritz vd., (2007)’de İran’dan elde edilmiş “*perses*” örneklerinin mtDNA açısından daha önce tanımlanmış İran taksonu olan *buxtoni* ile bir farklılık içermediği belirtilmiştir. Hem Parham vd., 2006b da hem de Fritz vd. 2007’de bu iki morfolojik taksona ait örnekler aynı mtDNA soy hattında yer almış ve bu soy hattı priorite kuralları gereği bu iki çalışmada da *buxtoni* olarak isimlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da Parham vd., (2006b)’da kullanılan topotipik örnekler de dahi edilerek yapılan analizlerde, ülkemizdeki örneklerin *buxtoni* soy hattı içerisinde gruplandığı görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda bu bölgeden örnek bulunmadığı için bu soy hattının ülkemizdeki varlığı ilk defa ortaya konmuştur. Ayrıca, önceki çalışmalara ek olarak bu soy hattı için kuzeybatı sınırı ortaya çıkmış, ülkemizde bu ana soy hattına ait örneklerin varlığı genetik olarak tespit edilmiştir. Böylece Türkiye sınırları içerisinde yayılış gösteren *Testudo* kompleksine ait soy hatlarının sayısı 3 ten 4 e çıkmış ve *Testudo* kompleksinin olası gen merkezi tartışmalarına yeni bir boyut kazandırılmıştır. Zira kompleks için gen merkezi hem fazla sayıda soy hattı (4 soy hattı) içermesi hem de bu bölgeden elde edilmiş fosillerin bulunması nedeniyle Kafkaslar olarak belirtilmiştir (Fritz vd.,

2007). Fakat bu çalışmada Kafkaslarda varlığı öne sürülen ana soy hatlarından E KLADI (*armeniaca*), B KLADI (*ibera*) ve kısmen de D KLADI (*buxtoni*) Kafkaslarda yayılışa sahiptir, fakat bu çalışmada belirtilen A KLADI (*terrestris*) örnekleri Kafkaslarda yayılış göstermemektedir. Muhtemelen Fritz vd., (2007) çalışmasında gen merkezi ile ilgili iddiasını ortaya koyarken, Van civarından elde ettiği ve *ibera* olarak isimlendirdiği 4 örneği Kafkaslara yakın olması nedeniyle Kafkaslar faunasına dahil etmiş olabilir. Doğal olarak bizim çalışmamızda da ortaya koyduğumuz gibi, Van Gölü civarından elde edilmiş örnekler A KLADI (*terrestris*) soy hattına dahil olduğundan, bu sayı realist olmayan bir şekilde araştırmacı tarafından suni olarak 4'e çıkartılmıştır. Oysaki Kafkas bölgesini gösteren haritaların hiç birisinde sınırlar ülkemizi, özellikle de Van civarını kapsamamaktadır. Bu nedenle genetik veriler Kafkaslarda yayılış gösteren üç soy hattının varlığını ileri sürmektedir. Bu durumda Anadolu bugüne kadar yapılan çalışmalarda (Parham vd., 2006b, Fritz vd. 2007) altı soy hattından dördünün (*ibera*, *terrestris*, *armeniaca* ve *buxtoni*) yayılış alanı olmasından dolayı Kafkaslara göre daha fazla ön plana çıkmaktadır.

Fritz vd., (2007), Myers vd. (2000) çalışmasına atıf yaparak diğer tüm organizmalarda olduğu gibi, *T. graeca* kompleksinde de bu bölgede yüksek oranda çeşitlilik göstermesi ve fosil kayıtlarının bulunması nedeniyle gen merkezi olduğunu ileri sürmüştür. Kafkas Bölgesinin bir endemizm ve çeşitlilik merkezi olduğu yadsınamaz, ancak bu durum bazı türler, özellikle iklimsel olarak daha sıcak ortamları tercih eden reptiller için geçerli olmayabilir. *Testudo* kompleksinin yayılış alanının kuzey sınırını oluşturan Kafkaslardan ziyade, bu çalışmanın bulguları daha uygun ekolojik şartların olduğu Anadolu'nun gen merkezi olabileceğini ileri sürmektedir. Bu grubu temsil eden en eski fosiller nesli tükenmiş olan *T. burtschaki* ve *T. elderica* Azerbaycan ve Gürcistan'da Orta ve Üst Miyosen tabakalarında (Chkhikvadze, 1983, 1989; Danilov, 2005) bulunmuştur. Ülkemizde bu yönde çalışmalar çok fazla yapılmadığından ve elde edilen fosiller tam olarak değerlendirilmediğinden bu noktada eksiklerimiz bulunmaktadır.

Testudo kompleksine sistematik açıdan bakarsak, Parham vd., (2006b) komplekse ait bu ana soy hatlarının sistematik olarak değerlendirilebilmesi için morfoloji gibi diğer çalışmaların sonuçları ile verileri birleştirerek değerlendirilmesi gerektiğini

belirtmiştir. Diğer yandan Fritz vd., 2007 ise bu ana soy hatlarını alttür olarak değerlendirmiştir.

Sonuç olarak sadece morfolojik ve morfometrik çalışmalar *Testudo* kompleksinin sistematik durumunu çözmek için yeterli değildir. Çalışmamızda mtDNA bölgelerinden iki tanesi kullanılarak (nd4, *Cyt b*) bu altı ana soy hattından ülkemizde bulunan 4 tanesinin sınırları net olarak çizilmiştir. Bu yeni harita coğrafi olarak ve yayılış olarak da desteklenen sınırlara sahiptir. Bu mtDNA sınırlarının yanında çekirdek DNA'sına ait sınırların tespit edilmesi *Testudo* kompleksinin durumunun değerlendirilmesinde bir sonraki adım olmalıdır. Ayrıca mtDNA sonuçlarına göre ortaya konulan olası *Testudo* soy hatlarının hibrit zonlarının varlığını desteklemek için çekirdek DNA belirteçleri ile de araştırılması gerekir.

KAYNAKLAR

- Álvarez, Y., Mateo, J.A., Andreu, A.C., Díaz-Paniagua, C., Diez, A., Bautista, J.M. 2000. Mitochondrial DNA haplotyping of *Testudo graeca* on both continental sides of the Straits of Gibraltar. **J. Heredity**, 91: 39-41.
- Anderson, S.C. 1979. Synopsis of the turtles, crocodiles, and amphisbaenians of Iran, **Proc. California Acad. Sci., 4th Ser.**, 41 (22): 501-528.
- Atalay, İ. 2008. Ekosistem Ekolojisi ve Coğrafyası Cilt 2. 824 s., İzmir.
- Austin, J.J., Arnold, E.N., Bour, R. 2003. Was there a second adaptive radiation of giant tortoises in the Indian cean? Using mitochondrial DNA to investigate speciation and biogeography of *Aldabrachelys*. **Mol. Ecol.**, 12: 1415-1424.
- Baran, İ., Atatür, M. K. 1998. Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler), T.C. Çevre Bakanlığı, 214 s., Ankara.
- Başoğlu, M., Baran, İ. 1977. Türkiye Sürüngenleri. Kısım I Kaplumbağa ve Kertenkeleler, Ege Univ. Fen Fak. Kitaplar Ser. N:76, 217s., Bornova-İzmir.
- Bour, R. 1989. Caractères diagnostiques offerts par le crâne des tortues terrestres du genre *Testudo*. **Mésogée**, 48: 13-19.
- Brinckmeier, C., Bode, F. And Hampe, A. 1989. First record of the margined tortoise, *Testudo marginata* in Turkey. **Zoology in the Middle East**, 3: 47-48.
- Caccone, A., Amato, G., Gratry, O.C., Behler, J., Powell, J.R. 1999. A molecular phylogeny of four endangered Madagascar tortoises based on mtDNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 12: 1-9.

- Chkhikvadze, V.M. 1983. Iskopaemye cherepakhi Kavkazai Severnogo Prichernomorya, Tbilisi, Metsniereba.
- Chkhikvadze, V.M. 1989. Neogenovye cherepakhi SSSR. Tbilisi, Metsniereba.
- Chkhikvadze, V.M., Bakradze, M.A. 1991. O sistematicheskom polozhenii sovremennoi sukhoputnoi cherepakhi iz doliny reki Araks, Trudy Tbilissk. gosudarstven. Univ., 305, 59-63.
- Chkhikvadze, V.M., Bakradze, M.A. 2002. Novyi podvid sukhoputnoi cherepakhi iz Dagestana. **Trudy Inst. Zool., Akad. Nauk Gruzii**, 21: 276-279.
- Chkhikvadze, V.M., Tuniyev, B.S. 1986. O sistematicheskom polozhenii sovremennoi sukhoputnoi cherepakhi zapadnogo Zakavkazy. **Soobshch. Akad. Nauk Gruzinsk. SSR**, 124: 617-620.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, 9 (10): 1657-1660.
- Çevik, I.E. 1982. Trakya Kaplumbağa ve Kertenkelelerinin Taksonomik Araştırılması. (Doktora Tezi), Bornova–İzmir, 1–61.
- Danilov, I.G. 2005. Die fossilen Schildkröten Europas. In: Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Band 3/IIIB: Schildkröten (Testudines) II, Fritz, U., Ed., 442 s., Wiebelsheim, Aula-Verlag.
- David, P. 1994. Liste des reptiles actuels du monde. I. Chelonii. **Dumerilia**, 1: 7-127.
- Demirsoy, A. 1996. Genel ve Türkiye Zoocoğrafyası ve Hayvan Coğrafyası, Meteksan A.Ş., 660 s., Ankara.
- Demirsoy, A. 1997. Türkiye Omurgalıları Ve Sürüngenleri, Meteksan A.Ş., 205s., Ankara.

- Ernst, C.H., Barbour, R.W. 1989. *Turtles of the World*, Washington, DC, Smithsonian Institution Press.
- Ernst, C.H., Altenburg, R.G.M., Barbour, R.W. 2000. *Turtles of the World*, World Biodiversity Database, CDROM Series, Windows Version 1.2. Amsterdam, Biodiversity Center of ETI.
- Fritz, U., Bischoff, W., Martens, H., Schmidler, J.F. 1996. Variabilität syrischer Landschildkröten (*Testudo graeca*) sowie zur Systematik und Zoogeographie im Nahen Osten und in Nordafrika. **Herpetofauna**, 18 (104): 5-14.
- Fritz, U., Cheylan, M. 2001. *Testudo* Linnaeus, 1758 – Eigentliche Landschildkröten. In: Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIIA: Schildkröten (Testudines) I, Fritz, U., Ed., Wiebelsheim, 124s., Aula-Verlag.
- Fritz, U., Široký, P., Kami, H., Wink, M. 2005a. Environmentally caused dwarfism or a valid species – Is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 37: 389-401.
- Fritz, U., Auer, M., Bertolero, A., Cheylan, M., Fattizzo, T., Hundsdörfer, A.K., Martin Sampayo, M., Pretus, J.L., Široký, P., Wink, M. 2006. A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. **Zool. Scr.**, 35: 531-543.
- Fritz, U., Hundsdörfer, A.K., Siroky, P., Auer, M., Kami, H., Lehman, J., Mazaneva, L.F., Türkozan, O., Wink, M. 2007. Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae). **Amphibia-Reptilia**, 28: 97-121.

- Fritz, U., Harris, D. J., Fahd, S., Rouag, R., Martinez, E. G., Casalduero, A. G., Siroky, P., Kalboussi, M., Jdeidi, T. B., Hunsdörfer, A. 2009. Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: Old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. **Amphibia-Reptilia**, 30: 63-80.
- Gasperetti, J., Stimson, A.F., Miller, J.D., Ross, J.P., Gasperetti, P.R. 1993. Turtles of Arabia. **Fauna of Saudi Arabia**, 13: 170-367.
- Gmira, S. 1993a. Une nouvelle espèce de tortue Testudinine (*Testudo kenitrensis* n. sp.) de l'Inter Amirien- Tensiftien de Kénitra (Maroc). **C.R. Acad. Sci. Paris**, 316 (II): 701-707.
- Gmira, S. 1993b. Nouvelles données sur les espèces actuelles de *Testudo*. **Bull. Soc. Herpétol. Fr.**, 65/66: 49- 56.
- Gmira, S. 1995. Étude des chéloniens fossiles du Maroc. Paris, Cahiers de Paléontologie, CNRS Éditions.
- Gomes, C., Dales, R.B.G., Oxenford, H.A. 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. **Mol. Ecol.**, 7: 1029-1039.
- Guyot-Jackson, G., Ed. 2004. Numéro spécial *Testudo*. **Manouria** 7 (22): 1-52.
- Haig, S.M., Rhymer, J.M., Heckel, D.G. 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. **Mol. Ecol.**, 3: 581-595.
- Haig, S.M., Gratto-Trevor, C.L., Mullins, T.D., Colwell, M.A. 1997. Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. **Mol. Ecol.**, 6: 413-427.

- 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.
- Harris, D.J., Znari, M., Macé, J.-C., Carretero, M.A. 2003. Genetic variation in *Testudo graeca* from Morocco estimated using 12S rRNA sequencing. **Rev. Esp. Herpetol.**, 17: 5-9.
- Highfield, A.C. 1990. Tortoises of north Africa; taxonomy, nomenclature, phylogeny and evolution with notes on field studies in Tunisia. *J. Chelon. Herpetol.*, 1 (2): 1-56.
- Highfield, A.C., Martin, J. 1989a. A revision of the Testudines of North Africa, Asia and Europe. Genus: *Testudo*. **J. Chelon. Herpetol.**, 1 (1): 1-12.
- Highfield, A.C., Martin, J. 1989b. *Testudo whitei* Bennett 1836. New light on an old carapace – Gilbert White's Selborne tortoise re-discovered. **J. Chelon. Herpetol.**, 1 (1): 13-22.
- Highfield, A.C., Martin, J. 1989c. Description of a miniature tortoise *Testudo flavominimaris* n. species from North Africa. London, The Tortoise Trust/Tortoise Survival Project.
- Hillis, D., Moritz, C. 1990. Molecular Systematics. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Jukes Th Ve Cantor Cr. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, Academic Press, 232s., New York.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, 16:111-120.
- Korsunen, A., Vasilyev, V., Pereshkolnik, S., Mazanaeva, L., Lapid, R., Bannikova, A., Semyenova, S. 2005. DNA polymorphism and

genetic differentiation of *Testudo graeca* L. In: Herpetologica Petropolitana. Proceedings of the 12th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica, August 12-16, 2003. Ananjeva, N., Tsinenko, O., Eds, Russ. J. Herpetol. 12 (Suppl.): 40-42.

Leaché, A.D. Ve Reeder, T.W. 2002. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): A comparison of parsimony, likelihood and Bayesian approaches, **Syst. Biol.**, 51: 44–68.

Mertens, R. 1946. Über einige mediterrane Schildkröten- Rassen. **Senckenbergiana**, 27: 111-118.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858.

Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Palkovacs, E.P., Marschner, M., Ciofi, C., Gerlach, J., Caccone, A. 2003. Are the native giant tortoises from the Seychelles really extinct? A genetic perspective based on mtDNA and microsatellite data. **Mol. Ecol.**, 12: 1403- 1413.

Parham, J. F., Macey J. R., Papenfuss T. J., Feldman C. R., Türkozan O., Polymeni R., Boore J. 2006a. The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 38: 50-64.

Parham, J.F., Türkozan, O., Stuart, B.L., Arakelyan, M., Shafei, S., Macey, J.R., Papenfuss, T.J. 2006b. Genetic evidence for premature taxonomic inflation in Middle Eastern tortoises. **Proc. Calif. Acad. Sci.**, 57: 955-964.

- Perälä, J. 1996. Etelä-Turkin maakilpikonnista. Morfologisia ja ekologisia eroja (*Testudo ibera* Pallas 1814 ve *Testudo ibera anamurensis* Weissinger 1987) sekä uuden maakilpikonnalajin kuvaus + 15 kuvaa. In: Virallinen kongressijulkaisu, p. 14-26. Herpetokongressi I. Perälä, J., Vikberg, J., Kanza, M., Eds, Helsinki, Suomen herpetologinen yhdistys ry.
- Perälä, J. 2002a. Morphological variation among Middle Eastern *Testudo graeca* L., 1758 (sensu lato), with a focus on taxonomy. **Chelonii** 3: 78-108.
- Perälä, J. 2002b. The genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae): phylogenetic inferences. **Chelonii** 3: 32-39.
- Pieh, A. 2001. *Testudo graeca soussensis*, eine neue Unterart der Maurischen Landschildkröte aus dem Sousstal (Nordwest-Marokko). **Salamandra** 36: 209-222.
- Pieh, A., Perälä, J. 2002. Variabilität von *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 im östlichen Nordafrika mit Beschreibung eines neuen Taxons von der Cyrenaika (Nordostlibyen). **Herpetozoa** 15: 3-28.
- Pieh, A., Perälä, J. 2004. Variabilität der Maurischen Landschildkröten (*Testudo graeca* Linnaeus, 1758 – Komplex) im zentralen und nordwestlichen Marokko mit Beschreibung zweier neuer Taxa. **Herpetozoa** 17: 19-47.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution, **Bioinformatics** 14 (9): 817-818.
- Prior, K.A., Gibbs, H.L., Weatherhead, P.J. 1997. Population genetic structure in the black rat snake: implications for management. **Conserv. Biol.** 11: 1147-1158.

- Rhodin, A.G.J., Van Dijk, P.P., Parham, J.F. 2008. Turtles of the World: Annotated Checklist of Taxonomy and Synonymy, **Chelonian Research Monographs**, Chelonian Research Foundation.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19: 1572-1574.
- Rozas, J., Sàñches-Delbarrio, J., C., Messeguer, X., Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19: 2496-2497.
- Semyenova, S.K., Korsunenkov, A.V., Vasilyev, V.A., Pereschkolnik, S.L., Mazanaeva, L.F., Bannikova, A.A., Ryskov, A.P. 2004. RAPD variation in Mediterranean turtle *Testudo graeca* L. **Russ. J. Genetics** 40: 1348- 1355.
- Spinks, P.Q., Shaffer, H.B. 2006. Conservation phylogenetics of the Asian box turtles (Geoemydidae, Cuora): mitochondrial introgression, numts, and inferences from multiple nuclear loci. **Conservation Genetics** 8: 641-657.
- Stuart, B.L., Parham, J.F. 2004. Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese box turtle *Cuora galbinifrons*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31:164-177.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123:585-595.
- Tamura K, Dudley J, Nei M Ve Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24:1596-1599.

- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P., Boonsaeng, V. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.** 6: 110-115.
- Taşkavak, E., Türkozan, O., Kumlutaş, Y. 2002. Some investigations on the taxonomic status of *Testudo graeca* from the Aegean and Mediterranean regions of Turkey. Proceedings of International Congress on Testudo Genus. *Chelonii*. 3: 72-77.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. And Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**.
- Tok, V. 1999. The taxonomy and ecology of *Mauremys caspica rivulata* Valenciennes. 1833 (Testudinata: Bataguridae) and *Testudo graeca iberica* Pallas, 1811 (Testudinata: Testudinidae) on Reşadiye (Datça) Peninsula. **Tr. J. of Zoology**. 23: 17-21.
- Türkozan, O., Kumlutaş, Y., Ilgaz, Ç. 2001. On the possible occurrence of the marginated tortoise, *Testudo marginata*, in Turkey. **Chelonian Conservation and Biology** 4(1): 208-210.
- Türkozan, O., Kumlutaş, Y., Arikan, H., Ilgaz, Ç., Avcı, A. 2003a. Morphological and serological comparison of Mediterranean spurthighed tortoises, *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 from the Aegean region and southeastern Turkey. **Zoology in the Middle East** 29: 41-50.
- Türkozan, O., Ayaz, D., Tok, C.V., Cihan, D. 2003b. On *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 Specimens of Mardin Province. **Turk. J. Zool.** 27: 145-151.

- Türkozan, O., Olgun, K., Taşkavak, E., Kiremit, F. 2004. On the occurrence of Zagros Mountain Tortoise, *Testudo perses* Perälä 2002, in Turkey. **Russian Journal of Herpetology**. 11(2): 150- 154.
- Türkozan, O., Olgun, K., Wilkinson, J., Gillett, L., Spence, J. 2005a. A Preliminary Survey of *Testudo graeca* Linnaeus 1758 Specimens from Central Anatolia, Turkey. **Tr. J. of Zoology** 29: 255-262.
- Türkozan, O., Kiremit, F., Taskavak, E., Olgun, K. 2005b. Status, distribution and population structure of land tortoises in European Turkey and northwest Anatolia, **Russian Journal of Herpetology**, 12 (3):209-216.
- Türkozan, O., Kiremit, F., Parham, J.F., Olgun, K., Taşkavak, E. 2010. A quantitative reassessment of morphology-based taxonomic schemes for Turkish tortoises (*Testudo graeca*). **Amphibia-Reptilia** 31 (2010): 69-83
- Van Der Kuyl, A.C., Ballasina, D.L.P., Dekker, J.T., Maas, H., Willemsen, R.E., Goudsmit, J. 2002. Phylogenetic relationships among the species of the genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae) inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** 22: 174-183.
- Van Der Kuyl, A.C., Ballasina, D.L.P., Zorgdrager, F. 2005. Mitochondrial haplotype diversity in the tortoise species *Testudo graeca* from North Africa and the Middle East. **BMC Evol. Biol.** 5: 29.
- Vanlerberghe-Masutti, F., Chavigny, P. 1998. Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. **Mol. Ecol.** 7: 905-914.
- Weissingen, H. 1987. *Testudo graeca anamurensis* ssp. nov. aus Kleinasien. **ÖGH-Nachrichten** 10/11: 14-18.

Wermuth, H. 1958. Status und Nomenklatur der Maurischen Landschildkröte, *Testudo graeca*, in SW-Asien und NO-Afrika. **Senckenbergiana Biol.** 39: 149-153.

Wermuth, H., Mertens, R. 1961. Schildkröten, Krokodile, Brückenechsen. Jena, Fischer.

Wermuth, H., Mertens, R. 1977. Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalia. Das Tierreich 100: I-XXVII, 1-174.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ferhat KİREMİT
Doğum Yeri ve Tarihi : 12.02.1976 Kütahya

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi
Biyoloji Öğretmenliği
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI

TÜRKOZAN, O., ÖZDEMİR, A. & KİREMİT F. 2008. International Testudo trade. Chelonian Conservation and Biology, (7) 2: 269-274.

TÜRKOZAN, O. KİREMİT, F, PARHAM, J. F., OLGUN K.& TAŞKAVAK, E. 2010. A quantitative reassessment of morphology based taxonomic schemes for Turkish tortoises. Amphibia-Reptilia, 31: 69-83.

-Diğer

TÜRKOZAN, O, KİREMİT, F, TASKAVAK, E., OLGUN, K., 2005. Status, distribution and population structure of land tortoises in European Turkey and northwest Anatolia. Russian Journal of Herpetology, 12 (3):209-216.

TÜRKOZAN, O. & KİREMİT, F. 2007. Testudo trade in Turkey. Applied Herpetology. 4:31-37.

b) Bildiriler -Uluslar arası

ŞAHİNER, A, BIYIK, H, GÜÇLÜ, O, KİREMİT, F. & TÜRKOZAN, O 2005. Mycoflora of Loggerhead Turtle, Caretta caretta , nest and eggshell at Fethiye (Turkey). The Second Mediterranean Conference on the Marine Turtles. 4-7 May 2005 Antalya-Turkey.

TÜRKOZAN, O. & KİREMİT, F. 2007. Land tortoises of Turkey: Morphometric comparisons based on phylogenetic assignments. 5th

Annual Symposium on Conservation and Biology of Tortoises and Freshwater Turtles 25-28 July 2007 Atlanta, USA

KİREMİT, F. TÜRKOZAN, O. & BARDAKCI, F. 2009. Mitochondrial DNA variation of Testudo complex in Turkey. Seventh Annual Symposium on Conservation and Biology of Tortoises and Freshwater Turtles, 5-8 August 2009, St. Louis, USA.

KİREMİT, F., BARDAKCI, F. & TÜRKOZAN, O. 2010. Phylogenetic relationships of Testudo complex in Anatolia based on mtDNA cytb gene. 8th Annual Symposium on the Conservation Biology of Tortoises and Freshwater Turtles 16-19 August 2010, Orlando, USA.

-Ulusal

GÜÇLÜ, Ö. KİREMİT, F., ÜLGER, C. & TÜRKOZAN, O. 2007. İribaşlı deniz kaplumbağası (*Caretta caretta*)'nın Türkiye'deki bazı kumsallardaki genetik yapısı. 2. Ulusal Deniz Kaplumbağaları Sempozyumu 26-28 Ekim 2007 Dalyan-Muğla.

BAŞIMOĞLU KOCA, Y., KİREMİT, F., TAŞKAVAK, E., TÜRKOZAN, O. 2004. Benekli Tatlı Su Kaplumbağasının, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758), (Reptilia; Testudines, Emydidae) Kan Hücre Morfolojisi, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran 2004, ADANA.

ÖZDEMİR, B, KİREMİT, F., TÜRKOZAN, O. 2004. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'ndeki *Chelonia mydas* Türü Deniz Kaplumbağasının Vücut Boyu İle Yumurta Sayısı Arasındaki İlişki ve İki Yuvalama Arasındaki Periyot, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran 2004, ADANA.

METİN, K., KIRAL, F., TÜRKOZAN, O., TAŞKAVAK, E., AVCI, A., KİREMİT, F. 2004. Türkiye'de Yaşayan Bazı Su Kaplumbağalarının Plazma Biyokimyasal Parametreleri İncelenmesi, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran 2004, ADANA.

c) Katıldığı Projeler

Deniz Kaplumbağalarının izinde: Deniz Kaplumbağası Yuvalama Kumsallarının Değerlendirilmesi Projesi, Yardımcı Araştırmacı, WWF-Turkey, Adnan Menderes Üniversitesi 2003.

Deniz Kaplumbağası ve Nil Kaplumbağası populasyonlarının araştırılması ve Korunması Projesi, Araştırmacı, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Özel Çevre Koruma Kurumu Başkanlığı 2005.

Adana Akyatan Av Yaban Hayatı Koruma Sahası, Yumurtalık Tabiatı Koruma alanı ve Tuzla'da deniz kaplumbağası ve Yumuşak kabuklu Nil Kaplumbağası Populasyonlarını Araştırma, İzleme ve Koruma Çalışması, Araştırmacı WWF-Türkiye, Çevre ve Orman Bakanlığı 2006.

Türkiye Kara Kaplumbağalarının Sistematik Revizyonu, Ekolojileri Ve Populasyon Durumları, Araştırmacı, TÜBİTAK Projesi, TBAG-2206 (102T104) 2006.

Dalyan ve Göksu deltası *Caretta caretta* deniz kaplumbağalarının genetik çeşitliliğinin ortaya konması, Araştırmacı, Adnan Menderes Üniversitesi, Araştırma Fonu 2006.

Ülkemiz Testudo kompleksinin Filocoğrafyası, Araştırmacı TUBİTAK Projesi (106T242) 2009.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Arş. Gör. 2002-

İLETİŞİM

E-posta Adresi : fkiremit@gmail.com

Tarih :04.01.2011