

149940

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORTA ANADOLU *APHANIUS* NARDO,
1827 (PISCES: CYPRINODONTIDAE)
TAKSONLARININ ÇEKİRDEK DNA
VARYASYONUNUN AFLP
BELİRTEÇLERİ İLE SAPTANMASI

EFKAN BAĞDA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2004

Danışman: Doç. Dr. Fevzi BARDAKCI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. H. H. Başbüyük
Üye: Doç. Dr. Fevzi Bardakcı
Üye: Yrd. Doç. Dr. İslam Gündüz

(Handwritten signatures of the jury members)

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

30,09,2004

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

(Handwritten signature of Prof. Dr. Rauf Emirov)
Prof. Dr. Rauf EMİROV

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi**

Orta Anadolu *Aphanius* Nardo, 1827 Taksonlarının (Pisces: Cyprinodontidae) Çekirdek DNA Varyasyonun AFLP Belirteçleri ile Saptanması

Efkan BAĞDA

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fevzi BARDAKCI

Dişli sazancıklar olan *Aphanius* cinsi, Tetis Denizi kıyısı boyunca yayılış gösteren ortak bir atadan evrimleştiği öne sürülen, bir Tetis reliktidir. *Aphanius*'un farklılaşma merkezinin Türkiye olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı, Orta Anadolu *Aphanius* populasyonları arasındaki genetik akrabalık ve Anadolu'nun jeolojik tarihiyle ilişkisini araştırmaktır. AFLP verilerinin hem fenetik hem de kladistik analizleri yapıldı. Her iki analizde de *Aphanius*'un Orta Anadolu'daki tür ve alttürlerine karşılık gelen dört klad ortaya çıkmıştır. Ayrıca, her klad daha önce hibritleme, mitokondri DNA ve RAPD veri analizlerinden elde edilen sonuçları destekleyerek, Orta Anadolu'da *Aphanius*'un türleşmesinde rolü olduğu gösterilen her bir jeolojik kıtayla sınırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Aphanius*, AFLP, DNA, Tetis Denizi.

SUMMARY**MSc Thesis****Detection of Nuclear DNA Variation in Central Anatolian *Aphanius* Nardo,
1827 Taxa (Pisces: Cyprinodontidae) using AFLP Markers****Efkan BAĞDA****Cumhuriyet University
Graduate School of Natural
and Applied Sciences
Department of Biology****Supervisor: Assoc. Prof. Fevzi BARDAKCI**

The killifish genus *Aphanius* is regarded as a Tethyan relicts whose members are thought to have evolved from a common ancestor distributed around the periphery of the Tethys Sea. It has been suggested that the center of diversity of *Aphanius* is Turkey. The aim of the present study is to investigate genetic relationships among Central Anatolian *Aphanius* populations and its relation with geological history of Anatolia. Both phenetic and cladistic analyzes of AFLP data was performed. Result of both analyzes revealed four clades corresponding to species and subspecies of *Aphanius* in Central Anatolia. In addition, each clade was restricted in each geological continent indicating its role in speciation of *Aphanius* in Central Anatolia, giving support to previous evidences obtained from hybridization, mitochondrial DNA and RAPD data analyzes.

Keywords: *Aphanius*, AFLP, DNA, Tethys Sea..

TEŐEKKŪR

Bu çalıŐmanın planlanmasında, yŪrŪtŪlmesinde ve çalıŐmalarımın her aŐamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Doç. Dr. Fevzi BARDAKCI'ya en içten teŐekkŪrlerimi sunarım.

Tezimin yazımı sırasında ilgi ve yardımlarını gŪrdŪğŪm ArŐ. GŪr. Nuray AKKAYA'ya ve E. Mahir KORKMAZ'a, ayrıca tezimi maddi olarak destekleyen C. Ū. AraŐtırma Fon Saymanlıđına (Proje no: F-135) ve TŪBİTAK'a (Proje no: TBAG-AY/296, 102T208) teŐekkŪrlerimi sunarım.

TŪm çalıŐmalarım boyunca gŪsterdikleri desteđi asla unutmayacađım aileme sonsuz teŐekkŪr ederim.

Efkan BAĞDA

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Anadolu'nun jeolojik oluşumunu gösteren harita. SK-Sakarya kıtası, TM-Toros-Menderes bloğu, KB-Kırşehir bloğu, DT-Doğu Toros bloğu, P-Pontid (Hrbek vd., 2002) 3
- Şekil 2.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Awise, 1994) 10
- Şekil 3.** AFLP belirteçlerinin hazırlanması (Mueller ve Wolfenbarger, 1999) 13
- Şekil 4.** Balıkların (Pisces), yaşayan diğer omurgalılar içindeki oranını ve tür sayısını gösteren grafik (Pough vd., 1996) 16
- Şekil 5.** Cyprinodontidae familyasına ait balıkların genel görünüşleri 18
- Şekil 6.** *Aphanius anatoliae anatoliae*, Düger, DSİ pompa istasyonu (Wildekamp vd., 1999) 19
- Şekil 7.** *Aphanius anatoliae splendens*, Salda Gölü, Burdur (Wildekamp vd., 1999) 21
- Şekil 8.** *Aphanius anatoliae sureyanus*, Burdur Gölü (Wildekamp vd., 1999) 21
- Şekil 9.** *Aphanius anatoliae transgrediens*, Acı Göl, Gemiş (Wildekamp vd., 1999) 22
- Şekil 10.** *Aphanius asquamatus*, Hazar Gölü, Elazığ (Wildekamp vd., 1999). 23
- Şekil 11.** *Aphanius danfordii*, Kanal 2, Soysalı, Seyhan Nehri (Wildekamp vd., 1999) 24
- Şekil 12.** *Aphanius fasciatus*, Marina di Modica, İtalya (Wildekamp vd., 1999) 25
- Şekil 13.** *Aphanius mento*, Kırkgöz, Antalya (Wildekamp vd., 1999) 26
- Şekil 14.** *Aphanius villwocki*, Sakarya Nehri, Ahiler (Hrbek ve Wildekamp, 2003) 27
- Şekil 15.** Örneklerin toplandığı alanlar 32
- Şekil 16.** Populasyonlar arası genetik uzaklık veri matrisine dayalı oluşturulan UPGMA dendogramı 41
- Şekil 17.** Tutumluluk metodu ile oluşturulan uyumluluk ağacı. Dallar üzerinde % seç-bağla değerleri gösterilmiştir 43

Şekil 18. UPGMA dendogramına dayanılarak oluşturulmuş Orta Anadolu *Aphanius* popülasyonlarına ait dört farklı grubun toplandığı alanlar 44

Şekil 19. Tutumluluk metoduyla elde edilen uyumluluk ağacına dayanılarak oluşturulmuş Orta Anadolu *Aphanius* popülasyonlarına ait dört farklı grubun toplandığı alanlar 45



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan <i>Aphanius</i> tür ve alttürlerin kısaltmaları ve toplandığı yerler ve koordinatları	30
Tablo 2. Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ve bunlarla çalışılan birey sayıları	36
Tablo 3. Populasyonlar arasındaki genetik uzaklık (Nei, 1972) veri matrisi	40
Tablo 4. UPGMA ile belirlenen grup içi ve gruplar arası ortalama genetik uzaklık değerleri ve grup içi en küçük ve en büyük genetik uzaklık değerleri	42



SİMGELER DİZİNİ

- PZR** Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD Rasgele Artırılmış Polimorfik DNA
AFLP Artırılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi
APS Amonyumpersülfat
SDS Sodyumdodesilsülfat
HPLC High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi).



1. GİRİŞ

Bütün insan kültürleri tarihin her aşamasında, aynı çevreyi paylaştıkları ve etkileşim içerisinde buldukları bitki ve hayvanları tanımaya ve tanımlamaya çalışmışlardır. Bunun için onlara adlar vererek benzerlerinden ayırma yoluna gitmişlerdir. Önceleri benzer olanları gruplandırma şeklinde yapılan sınıflandırma çalışmaları bitki ve hayvanlarla ilgili artan bilgilerin yardımıyla da farklı bir hal alarak sistematik adıyla yeni bir disiplinin doğmasını sağlamıştır. Günümüzde çok sayıda farklı sistematik anlayışlar bulunmakla beraber, tamamı temelde tür kavramına dayanmaktadır. Farklı tür tanımlarına sahip sistematik metotlar arasında ortak bir anlayış olarak, türü “ortak bir evrimsel tarihi paylaşan bireyler bütünü” olarak belirlemek mümkündür (Skelton, 1993). Buna göre türler, benzer diğer türlerden farklı evrimsel gelişim süreçlerine sahip olmalarıyla ayırt edilirler. Buna bağlı olarak da populasyonların, yeni türler vermek şeklinde gelişen bağımsız evrim süreçlerine sahip alt populasyonlara bölünmeleri süreci ise türleşme mekanizması olarak işler.

Zengin bitki ve hayvan gruplarının oluşumunu ve gelişimini açıklamaya yönelik farklı türleşme mekanizmaları, temelde atasal populasyonun farklı populasyonlar vermek üzere parçalanması sürecinin anlaşılması ile başlamıştır.

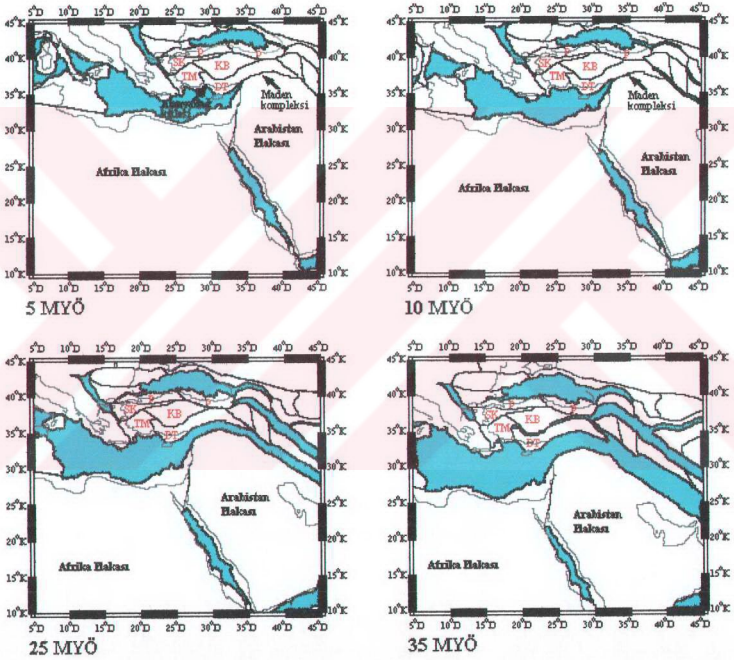
Mayr, allopatrik türleşme modelini; “mekansal olarak ayrı kalan populasyonlar birbirlerinden ayrılabilirler ve varyeteler, ırklar, alttürler ile türler arasındaki farklılıklar ise bir dereceye kadardır” şeklinde tanımlamıştır (Skelton, 1993). Futuyma ve Mayer’a (1980) göre ise, populasyonlar arasında gen akışını önleyen coğrafik bir engelin oluşumu sonucu bir populasyonun iki veya daha fazla popülasyona bölündüğü coğrafik türleşme ve bu populasyonların ayrı türler haline gelmesi için yeteri kadar değişmesi, allopatrik türleşmenin en ortak formu olarak görülmektedir (Avice, 1994; Hrbek ve Meyer, 2003). Bundan dolayı, içinde birçok izole coğrafik bölgeler bulunan jeolojik aktif bölgeler, coğrafik türleşme hipotezini test etmek için uygun olabilirler (Hrbek ve Meyer, 2003). Türkiye’nin de içinde bulunduğu Akdeniz bölgesi, Tetis Denizi’nin kapanmasıyla şekillenen coğrafik bölgeler içinde olup, jeolojik olarak aktif bölgelerdir. Altı ana tektonik ünitelerden oluşan Anadolu yarımadası (Şengör ve Yılmaz, 1983), Tetis Denizi’nin

kapanmasıyla şekillenen jeolojik oluşum süreci içinde coğrafik türleşmede önemli bir etken olarak rol almıştır (Hrbek ve Meyer, 2003). Trias'ta [251.4-205.1 milyon yıl önce (MYÖ)] Pangea'nın ekvatorial bölgesinde bir iç deniz olarak bulunan Tetis Denizi, dönem sonunda Pangea'nın ayrılmasıyla yayılmaya başlar. Pangea'nın ayrılması, Kretase (142-65.5 MYÖ) döneminde Lavrasya ve Gondvana'nın birbirinden uzaklaşmasıyla sonuçlanır. Pangea'nın parçalanmasından önce bir arada bulunan Gondvana ve Lavrasya faunal ve floral çeşitliliğin dağılımına olanak verecek şekilde birleşik durumdaydılar (Şengör ve Yılmaz, 1983).

Permien'de günümüz Türkiye'sinin kapladığı bütün alanlar, Gondvana'nın kuzey ucunu oluşturan bir bölgede bulunmakta ve bu kesim daha da kuzeyde yer alan Paleo-Tetis Okyanusu'na bakmaktadır (Şengör ve Yılmaz, 1983). Trias'ta Neo-Tetis'in açılmasıyla sonuçlanan Türkiye'nin Gondvana'dan koparak ayrılması Paleo-Tetis'in kapanmasına neden olmuştur. Orta Jura'da Paleo-Tetis'in kapanmasını izleyen evrede çarpışan kıtalar birbirlerine doğru yaklaşmaya devam etmişlerdir. Biju-Duval vd. (1977)'lerinin öne sürdüğü gibi, Afrika-Avrupa bağıl hareket yönlerine göre ise, Afrika ile Avrupa arasındaki asıl yaklaşma, geç Kretase sonunda (76-68 MYÖ) başlamaktadır (Şengör ve Yılmaz, 1983). Afrika Kıtası'nın Avrasya'yla çarpışması Tetis Denizi'nin kapanmasına ve Tetis Denizi fauna ve florasının ikiye ayrılmasına neden olmuştur (Hrbek ve Meyer, 2003). Tüm bu gelişim evrelerini izlemek suretiyle oluşan ve sonrasında kapanan Tetis Denizi, organizmal çeşitlilik üzerinde önemli bir etki yapmıştır.

Türkiye orojeni Akdeniz ve Asya Tetis sistemleri arasında kritik bir bağ oluşturmaktadır. Çünkü Tetis paleocoğrafyasının bu her iki sisteme özgü birimleri genellikle Anadolu yarımadasında sonlanmakta veya bir araya gelmektedir (Şengör ve Yılmaz, 1983). Türkiye'de Sakarya Kıtası, Pontitler, Kırşehir, Menderes-Toros ve Doğu Toros blokları Arap Yarımadası'nın kuzeye doğru sürüklenmesinin etkisiyle bir kara parçası içerisinde birleşmiş ve sıkışmıştır (Şengör ve Yılmaz, 1983) (Şekil 1). Tetis Denizi'nin kapanması sürecinde Anadolu'da; geç Eosen'de Orta Anadolu'nun doğusu ile Güneydoğu Anadolu'da yer alan İç Toros Okyanusu ve Maden Havzası kapanmıştır. Orta-Geç Miyosen

süresinde, Çüngüş Havzası tümüyle kapanmış, Bitlis kenet kuşağı boyunca Arabistan-Avrasya çarpışması başlamıştır (Şengör ve Yılmaz, 1983). Oligosen/Miyosen döneminde Tetis Denizi'nin kapanmasıyla sonuçlanan bu süreç birbirine doğru yaklaşan Avrasya ve Arabistan'ın sıkıştıran uçları arasında, Doğu Anadolu'nun kuzey güney yönde kışalmasına ve sonrasında da yana doğru itilip aradan uzaklaşmasına neden olmuştur (Şengör ve Yılmaz, 1983; Bozkurt, 2001).



Şekil 1. Anadolu'nun jeolojik oluşumunu gösteren harita. SK-Sakarya kıtası, TM-Toros-Menderes bloğu, KB-Kırşehir bloğu, DT-Doğu Toros bloğu, P-Pontid (Hrbeek vd., 2002).

Tetis Denizi'nin kapanmasını izleyen jeolojik olaylar, farklı birçok jeolojik yapının oluşmasını ve diğer yapılardan izolasyonunu sağlamıştır. Bu şekilde fauna ve flora içinde vikaryans yoluyla türleşmeler oluşmuştur. Ancak bu

varsayımı test edecek çok az sayıda veri bulunmaktadır (Tsukamoto ve Aoyama, 1998; Weisrock vd., 2001; Hrbek ve Meyer, 2003; Veith vd., 2003; Hrbek vd., 2004).

Aphanius Nardo, 1827 cinsine ait türler; ikincil (sekonder) tatlı su balıkları olup, genel yayılışları (fosil ve günümüz türleri, geç-periyot Tetis Denizi sahil çizgisi boyunca yaygın olarak dağılmıştır) dikkate alındığında Tetis Denizi reliktidirler (Kosswig, 1952; Wildekamp vd., 1999; Hrbek vd., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003). Günümüzde yayılış alanları; Akdeniz Bölgesi kıyı bölgeleri ve Kızıldeniz ve İran Körfezi'ni de içine alan kuzeybatı Hindistan'dan kuzeydoğu Somali'ye kadar ki kıyı bölgeleri, iç kısımlarda ise, Türkiye ve İran'ı da içine alan Akdeniz ve Yakın Doğu orojenik kuşağıyla sınırlıdır ki, bu alanlar Tetis Denizi'nin kapanmasıyla etkilenmiş bölgelerin tümünü kapsamaktadır (Hrbek ve Meyer, 2003).

Elde edilen jeolojik bulgular, Tetis Denizi'nin kapanmasının türleşme sürecinde oynadığı rolü sınamak için, Tetis relikt faunası içinde yer alan *Aphanius*'un iyi bir örnek olduğu Hrbek vd. (2002) tarafından gösterilmiştir. Bu hipoteze göre; atasal *Aphanius* türlerinin Tetis Denizi kıyısında yerleşmiş olduğu düşünülürse (Kosswig, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp vd., 1999; Hrbek vd., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003), atasal *Aphanius* popülasyonunun yaklaşık olarak 20 MYÖ'sinde Tetis Denizi'nin kapanmasıyla batı ve doğu olmak üzere iki gruba ayrılmış olmalıdır.

Doğu grubu içindeki atasal *A. mento* (Heckel, in: Russegger, 1843) Arabistan plakasının kuzey kıyılarına yerleşerek diğer doğu grubu üyelerinden ayrılmış, günümüzde de devam eden, Fırat-Dicle nehirlerinin paleo-drenaj havzasında yayılmışlardır. Bu grup içinde yer alan diğer bir *Aphanius* türü de *A. sirhani* (Villwock, Scholl & Krupp, 1983)'dir. Villwock vd. (1983), 13 MYÖ Kızıldeniz'in Ürdün'ün Wadi Sirhan havzasındaki yayılışıyla atasal *A. dispar* (Rüppel, 1828)'dan *A. sirhani*'nin ayrıldığı ileri sürmüşlerdir (Hrbek ve Meyer, 2003).

Batı Tetis bölgesinin jeolojisi daha karışıktır. Atlas Dağları, Tetis Deniz tabanının ve Fas ve Oran Mesetas'ın (mikro kıtalar) yükselmesiyle oluşmuştur.

Bunlar, Tellian ve Rif Atlas Bölgesi olmak üzere ikiye ayrılmışlardır. Güney İspanya'nın Bedic sistemi tamamen, Tetis Deniz tabanının yükselmesiyle meydana gelmiştir. Sıkışma ve bu bölgenin orojenisi Orta Oligosen'de başlayarak (30 MYÖ), çeşitli aşamalarla Erken Pliosen'e kadar sürmüştür (8 MYÖ). Sonuçta oluşan Bedic'in ve sırayla İspanya ve Fas'taki Rif koridorlarının kapanmasıdır (Garcés vd., 1998). Bu olaylar ve İber Yarımadası ile Atlas Dağları arasında meydana gelebilmesi muhtemel faunal değişiklikler 5.96 MYÖ Messinian tuzluluk krizinin başlamasına neden olmuştur. Buna göre, *A. iberus* (Valenciennes, 1846) ve *A. apodus* (Gervais, 1853) popülasyonları (*A. iberus* 5.96 MYÖ Messinian'ın başlamasından sonra Atlas Dağları ve İber Yarımadası arasında dağılmıştır) Geç Oligosen'den sonra *A. faciatus*'a (Valenciennes In: Humboldt & Valenciennes, 1821) benzer acı su atalarından jeolojik bloklar üzerinde izole olmuş, Krijgsman vd.'ne (1999) göre de, kuzey Afrika ve İber popülasyonları arasındaki tüm bağlantılar Messinia'nın sonunda (5.33 MYÖ) kopmuştur (Hrbek ve Meyer, 2003).

Türkiye'de *Aphanius* içeren bölgeler, Kırşehir ve Menderes-Toros blokları ve Tuz Gölü ile Haymana havzaları arasında engel oluşturan Sakarya Kıtası'dır (Şengör ve Yılmaz, 1983; Hrbek ve Meyer, 2003). Quennell (1984) ve Steininger ve Rögl'e (1984) göre, özellikle Menderes-Toros Blokları'nda katlanmalar meydana gelmiş ve Arabistan Plakası'nın kuzeye doğru hareketiyle son 5-10 MYÖ boyunca yükselmiştir (Bozkurt, 2001; Hrbek ve Meyer, 2003). Tuz Gölü ve Haymana havzaları ise, bölgenin jeolojik evrimi boyunca Sakarya Kıtası ve Menderes-Toros bloklarının havzası olarak hareket etmiştir (Görür vd., 1984). *Aphanius* içeren bölgelerin jeolojik oluşum süreçleri bu şekilde gerçekleşirken, cins üyelerinin günümüzdeki dağılımları esas itibari ile buzul ve buzullar arası dönemdeki iklimsel değişimler ve kıta hareketlerine bağlı olarak şekillenmiştir (Kosswig, 1952; Akşiray, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp vd., 1999; Hrbek vd., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003).

Erken Pliosen'de kıta yükselmesiyle günümüz Anadolu'nun büyük kısmını örten bir göl Tetis Denizi'nden koparak ayrılmış ve devam eden yükselme ve iklimsel değişimler bu gölü üç küçük alt sisteme bölmüştür; Doğu, Merkez ve

Batı sistemleri (Wildekamp vd., 1999). Doğu Sistemi tarihin erken dönemlerinde tekrar bölünerek Hazar Gölü'nde *A. asquamatus*'un (Sözer, 1942) ve daha batıdaki *A. danfordii*'nin (Boulenger, 1890) evrimleşmesine neden olmuştur. Tuz Gölü, Eğirdir Gölü ve Beyşehir Gölü Merkez Gölü'nün kalıntıları olup, bu göl şimdiki *A. a. anatoliae*'nin (Leidenfrost, 1912) evrimleşmesi için bir ortam oluşturmuştur. Merkez ve Batı Göl sistemleri, uzun bir periyot boyunca zaman zaman bağlanıp-ayrılmışlardır (Kosswig, 1952; Akşiray, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp vd., 1999). Sonuç olarak bugünkü Burdur Gölü, Ak Göl ve Acı Göl'ün oluşturduğu bir göl Batı sisteminden izole olmuş ve bu göllerde *A. a. splendens* (Kosswig ve Sözer, 1945), *A. a. transgrediens* (Ermin, 1946) ve *A. a. sureyanus* (Neu, 1937) evrimleşmiştir.

Aphanius ile ilgili yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bir çoğu morfolojik karakterlere (renklenme, pullanma, vücut desenleri, dişler, beslenme vb.) dayalı sistematik çalışmalarından oluşmaktadır (Battalgil, 1941; Sözer, 1942; Kosswig ve Sözer, 1945; Ermin, 1946; Akşiray, 1952; Kosswig, 1952; Kosswig, 1953; Slastenenko, 1955; Özarıslan, 1958; Kuru, 1975; Erk'akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988; Elvira, 1995; Leonardos ve Sinis, 1998; Leonardos ve Sinis, 1999; Wildekamp vd., 1999; Frenkel ve Goren, 2000; Maltagliati ve Camilli, 2000; Maltagliati vd., 2003). Tüm bu çalışmalar *Aphanius* cinsine ait farklı populasyonların akrabalık ilişkilerini anlamamıza yardımcı olmuşlardır. Ancak, *Aphanius*'ların filogenisinde kullanılabilecek morfolojik ve fenotipik karakterlerin sayısı sınırlıdır. Wildekamp vd. (1999) *Aphanius*'ların sistematikte ve sınıflandırılmasında kullanılan morfolojik karakterlerin, taksonomik olarak kararsız ve bu yüzden çok kullanışlı olmadığını ileri sürmüştür.

Villwock (1964), daha önce Akşiray (1952) ve Kosswig'in (1953) yaptığı *Aphanius* cinsinin Anadolu üyeleri arasındaki taksonomik ve sistematik çalışmalarına ilaveten, kapsamlı çalışmalar yürüten ilk araştırmacılardan biridir. Villwock (1964), endemik Anadolu populasyonları (*A. anatoliae*, *A. danfordii* ve *A. villwocki*) ile yaptığı hibritleme çalışmaları sonucunda, bunların Kızılırmak, Orta Anadolu ve Güneybatı Anadolu olmak üzere üç gruba ayrılabilceğini öne sürmüştür. Bu çalışmada; Villwock (1964), Kızılırmak grubunu oluşturan ve *A.*

danfordii'nin sinonimi olan *A. chantrei*'nin diğeri Orta Anadolu ve Güneybatı Anadolu *A. anatoliae* popülasyonlarıyla tam üreme izolasyonu gösterdiğini saptamıştır. Ayrıca Orta Anadolu ve Güneybatı Anadolu popülasyonları arasında kısmi üreme izolasyonu olmasına karşın *A. anatoliae* içinde değerlendirmiştir.

Hrbek vd. (2002), Anadolu *Aphanius* türleri ile yaptıkları çalışmada, mtDNA'sı kullanarak filogenisi ile Anadolu'nun jeolojik tarihi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. MtDNA verilerinin maksimum tutumluluk, minimum evrim ve maksimum olasılık analizleri sonucunda, dördü *A. anatoliae* ve birer *A. danfordii* ve *A. villwocki*'den oluşan toplam 6 klad belirlemişlerdir. MtDNA analizi ve hibritleme çalışmalarının sonuçları, Türkiye'deki *Aphanius* cinsinin türleşmesi ile Anadolu'nun jeolojik yapılanması arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Mitokondri DNA'sı anasal (maternal) olarak kalıtılması, rekombinasyon göstermemesi ve yüksek evrilme hızından dolayı filogenetik sistematiğe son derece kullanışlıdır. Ancak, mtDNA'sı çekirdek DNA'sı ile karşılaştırıldığında bazı dezavantajları vardır. Bunlar; (1) her ne kadar hayvan mtDNA'sı 37 genden oluşuyorsa da, tek bir birim olarak kalıtıldığından ve tek bir genin evrimsel tarihi tüm genomun tarihinden farklı olacağından, mtDNA verileriyle oluşturulmuş ağaçların değerlendirilmesinde daha yüksek bir hata payı olabilir (Avice, 1994). Sullivan vd. (2004) monofiletik Afrika nehir elektrikli balıklarının sitokrom *b* ve çekirdek DNA'sı AFLP analizine dayalı filogenetik ilişkilerini karşılaştırmışlar ve AFLP sonuçlarının morfolojik verilerle daha uyumlu olduğunu ortaya koymuşlardır. (2) MtDNA'sı hibrid zonlarda tek bir türden köken alabilir. Bunun nedenleri asimetrik çiftleşme ya da ancak belli hibritlerin hayatta kalmaları sayılabilir (örneğin, hibritlerin anasının sadece bir türden olması) (Ferris vd., 1983; Tegelstrom, 1987). Son olarak, (3) mtDNA'sının yüksek evrilme hızından dolayı uzak akraba taksonlar karşılaştırıldığında homoplasi önemli bir problem olabilir (Avice, 1994).

Anadolu'da yaşayan *Aphanius* tür ve alttürlerini temsil eden birkaç popülasyonun çekirdek DNA varyasyonu RAPD belirteçleri kullanılarak çalışılmıştır (Bardakçı vd., baskıda). RAPD belirteçleri her ne kadar kolay, ucuz

ve genomik DNA dizi bilgisine gerek olmayan kullanışlı bir metot ise de, RAPD bant profilinin PZR reaksiyon şartlarına çok duyarlı olmasından dolayı farklılık gösterebilmesi ve elektroforezde aynı büyüklükte olan bantlar arasında her zaman homolojinin olmaması handikapları olarak sayılabilir. Bu nedenle sadece RAPD belirteçlerine dayalı filogenetik çıkarsamalara şüpheyle yaklaşmak gerekir.

Bu çalışmada, öncekilerden farklı olarak çekirdek DNA'sı kullanılarak AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism-Artırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) (Vos vd., 1995) belirteçleri ile populasyon içi ve populasyonlar arasındaki genetik varyasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Çekirdek DNA analiz sonuçlarının, mtDNA sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca sonuçlar Anadolu *Aphanius* populasyonları için önerilen türleşme modelleri (Kosswig, 1952; Akşiray, 1952; Kosswig, 1953; Villwock, 1964; Wildekamp vd., 1999; Hrbek vd., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003; Bardakçı vd., baskıda) ile birlikte tartışılmıştır. AFLP metodu ile genomun farklı bölgelerinden aynı anda çok sayıda bilgi verici belirteçler oluşturulabilmesi ve bant profilinin yeniden elde edilebilirliği oldukça yüksek olduğundan filogenetik amaçlar için oldukça kullanışlıdır. Yukarıdaki özelliklerinden dolayı, çekirdek DNA'sı AFLP belirteçlerinin, yakın akraba türler ve populasyonlarda mtDNA'sına nazaran daha sağlıklı bir filogenetik ilişki ortaya koymasına beklenir (Sullivan vd., 2004)

2. GENEL BİLGİLER

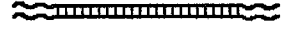
2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) Dayalı Bazı Moleküler Belirteçler

Cetus Şirketi'nden bir grup bilim adamınca 1984 yılında, *in vivo* koşullar yerine *in vitro* koşullarda bir DNA amplifikasyon prosedürü geliştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) olarak bilinen bu metotla; basit enzimatik reaksiyonlarla kompleks DNA örneğinden çok miktarda spesifik DNA fragmentleri üretilir (Mullis vd., 1986; Mullis ve Faloona, 1987; Saiki vd., 1988; White vd., 1989; Arnheim ve Erlich, 1992; Avise, 1994). PZR hücre dışı gen amplifikasyonu, nükleik asitlerin klonlanması, analiz edilmesi ve modifikasyonundaki birçok standart prosedürü kolaylaştırmıştır (Arnheim ve Erlich, 1992).

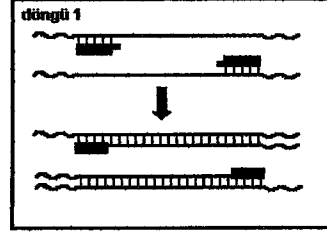
PZR üç şey ile karakterize edilir; seçicilik, hassaslık ve hız (Mullis vd., 1986; Saiki vd., 1988; White vd., 1989; Arnheim ve Erlich, 1992). Geleneksel klonlama yöntemi ile saf DNA fragmentlerinin kompleks genomdan elde edilmesi aylara varan uzun süreler gerektirir. Bu metotta, tek zincirli kalıp sekanstan spesifik DNA fragmenti sentezi için DNA polimeraz ve iki oligonükleotid primer kullanılır. Standart klonlama ve moleküler biyoloji analizlerinde alışılmış milyonlarca molekül ihtiyacına karşın, PZR az miktarda başlangıç materyaline gereksinim duyar (Mullis vd., 1986; Saiki vd., 1988; White vd., 1989; Arnheim ve Erlich, 1992). DNA saflaştırılmasında birçok uygulama kullanılmasına karşın, PZR ham hücre lizatından dahi çok iyi örnekler verir (Arnheim ve Erlich, 1992).

PZR, bir seri reaksiyon döngüsünden oluşur (Mullis vd., 1986; Mullis ve Faloona, 1987; Saiki vd., 1988; White vd., 1989; Arnheim ve Erlich, 1992; Avise, 1994) (Şekil 2). Her bir döngü (1) hedef nükleik asitin tek zincirini (kalıp DNA) veren denatürasyon basamağıyla başlar. (2) Bunu takip eden annealing (bağlanma) basamağı sırasında, serbest 3'-OH ucu taşıyan tek zincirli bir oligonükleotid olan primer, komplementeri olan kalıp DNA sekansına bağlanır. (3) Sonunda da her bir primer hedef bölgedeki DNA polimeraz aktivitesiyle uzar (extension). Bu üç basamaklı döngü yeterli miktarda ürün elde edilinceye kadar tekrarlanır.

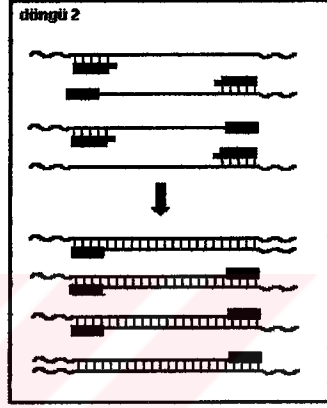
1) DNA İzolasyonu



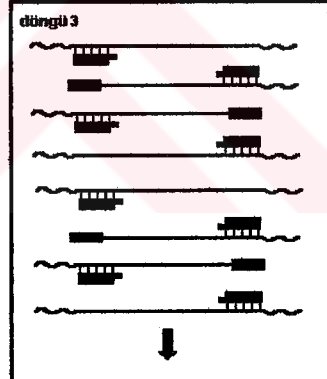
2) Denatürasyon ve Primerlerin Bağlanması



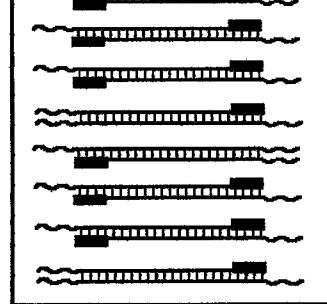
3) Primerlerin Uzaması



4) Denatürasyon ve Primerlerin Bağlanması



5) Primerlerin Uzaması



6) Denatürasyon ve Primerlerin Bağlanması

7) Primerlerin Uzaması

Şekil 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Avisé, 1994).

İstenilen bir DNA bölgesini çoğaltmak için bilinmesi gereken ilk bilgi, hedef DNA bölgesinin her iki ucunun nükleotid dizilerinin ne olduğudur. Böylelikle, DNA sentezinde DNA polimerazın senteze başlayacağı noktayı

belirlemede kullanılan, reaksiyon için gerekli, uygun primerler (öncü DNA molekülleri) sentezlenir. Primerler, DNA polimerazın senteze başlaması için ihtiyaç duyduğu serbest 3'-OH grubu taşıyan, 20-30 nükleotidden oluşmuş kısa oligonükleotidlerdir. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanabilmesi (hibritleşme) için sıcaklık 40-60°C'ye [bağlanma (annealing) sıcaklığı] kadar düşürülür. Primerlerin uzatılması (extension) için kullanılan enzim sıcak su kaplıcalarında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen DNA polimeraz I enzimidir. *Taq* DNA polimeraz adı verilen bu enzim, PZR sırasında DNA yüksek sıcaklık derecesinde denatüre edildiği zaman bozulmadan kalır. Hibritleşme sonrasında sıcaklık *Taq* DNA polimerazın optimal çalışma sıcaklığı olan 72°C'ye çıkarılarak ortamda bulunan dNTP'lerin yardımıyla *Taq* DNA polimerazın kalıp DNA'nın yeni zincirini sentezlemesi sağlanır.

Denatürasyon- primer bağlanması- sentez bir döngüdür ve bunun sonucunda mevcut DNA iki katına çıkar. Etkin bir DNA amplifikasyonu için gerekli olan döngü sayısı genellikle 25-40 arasındadır (Erlich, 1989). Ancak, döngü sayısındaki artışla birlikte daha fazla sayıda farklı yapıların (örneğin değerlendirilemeyen ürünler gibi) meydana gelme olasılığı artar (Caner ve Çarlı, 2001).

PZR ürünleri genellikle jel elektroforezi ile analiz edilir. Elektroforezden sonra etidyum bromid ile boyanarak elde edilen DNA bantları kolaylıkla okunabilir.

PZR'ye dayalı moleküler belirteç üretmek için yaygın kullanılan iki yöntem, RAPD (Rasgele Artırılmış Polimorfik DNA) ve AFLP (Artırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)'dir.

RAPD tekniğinde; kısa (genellikle 10 baz uzunluğunda) olan sentetik, rasgele dizili primerler kullanılarak, genomik DNA, düşük primer bağlanma sıcaklığında PZR ile çoğaltılır (Williams vd., 1990). Welsh ve McClelland (1990) yirmi nükleotid uzunluğunda primer kullanarak geliştirdikleri benzer bir yöntemi rasgele primerli polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PZR) olarak adlandırmışlardır. Caetano-Anolles vd. (1991) ise on nükleotitten daha kısa primerler kullanarak [DNA Amplification Fingerprinting (DAF)] kompleks DNA parmak izi ürünleri

oluşturmuşlardır. Termal döngü sırasında primer bağlanma sıcaklığında, rasgele dizili primerler, kalıp DNA'daki komplementer dizili bölgelere bağlanırlar. Bu profil, primer ile kalıp DNA arasındaki nükleotid dizisinin homolojisine bağlıdır. Kalıp DNA sonuçlarında mevcut olan ya da olmayan bantlar, primer bağlanma bölgelerinin değişmesi nedeniyle açığa çıkan nükleotidler arasındaki çeşitliliği ortaya koyar. Ayrıca, primer bağlanma yerleri arasında yer alan insersiyonlar/delesyonlar da görüntülenebilir (Williams vd., 1990; Başıbüyük vd., 2000).

RAPD tekniğinin reaksiyon koşulları son derece hassastır. Kullanılan primerler spesifik olmadığından kontaminasyon olmamasına dikkat edilmelidir. Kalıp DNA konsantrasyonu, reaksiyondaki önemli birleşenlerden biridir.

RAPD primerleri genomda kendisine komplementer olan bölgelerle eşleşirler. Farklı genomlar karşılaştırıldığında, aralarında nükleotid farklılıkları varsa, primer bağlanma yerleri değişebilir. Bu yüzden, amplifiye edilen DNA parçalarının uzunlukları farklı olmakta ve elektroforez edildiğinde, bu polimorfizm, ilgili lokusta bandın bulunması veya bulunmaması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Aynı anda genomun çok sayıda farklı bölgesinde amplifikasyon olduğu için oluşan bant kalıbından, alelleri ayırmak mümkün değildir. Bu yüzden RAPD belirteçleri dominant özelliktedir. Alel ve genotip sıklıklarının hesaplanmasında kullanılmazlar.

RAPD ürünleri genellikle agaroz jelde ayrıştırılır ve etidiyum bromid ile boyanır. Ancak PAGE'de (poliakrilamid jel) bantlar daha iyi ayrıştırılabilir ve gümüş boyama yapılabilir.

RAPD belirteçlerinin dominant olması en büyük dezavantajıdır. Allozim, AFLP, RFLP ve mikrosatellitler gibi kodominant olan belirteçlere göre doğruluk payı daha azdır. Bu yüzden RAPD belirteçleri ile aynı doğrulukta sonuçlar elde etmek için daha fazla sayıda bireyin incelenmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Lynch ve Milligan, 1994). RAPD belirteçleri dominant olduğu için, eşeyssel olarak üreyen organizmalardan çok klonal organizmalar için daha uygundur (Welsh ve McClelland, 1990; Smith vd., 1992; Fani vd., 1993).

PZR'a dayalı diğer bir yöntem ise, Vos vd. (1995) tarafından geliştirilen AFLP'dir. AFLP tekniği, restriksiyon enzimle kesilen genomik DNA parçalarının

bir kısmının PZR ile seçici amplifikasyonuna dayanan bir metottür. Bu teknik üç aşama gerektirir; (1) DNA'nın kesilmesi ve oligonükleotid adaptörlerinin bağlanması, (2) oluşan DNA parçalarının seçici amplifikasyonu, (3) seçici olarak çoğaltılan DNA parçalarının elektroforetik analizi (Vos vd., 1995) (Şekil 3). Kesilen DNA parçalarının seçici olarak çoğaltılması, kesim bölgesindeki nükleotidlere komplementer olan primerlerin oluşan DNA parçalarına bağlanarak PZR ile çoğaltılması ile gerçekleştirilir. Seçici olarak çoğaltılan DNA parçaları elektroforezle ayrıştırılarak belli bir AFLP bant profili (AFLP parmak izi) elde edilir. Görüntülenen lokus sayısı 50-100 arasında değişir.

(a) AFLP kalıbı hazırlama

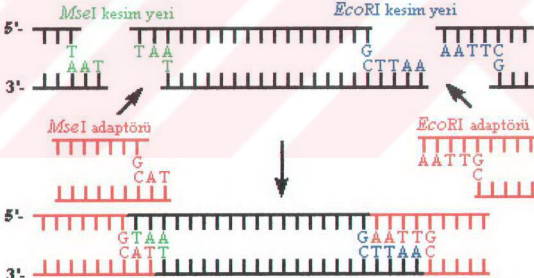
Bütün genomik DNA



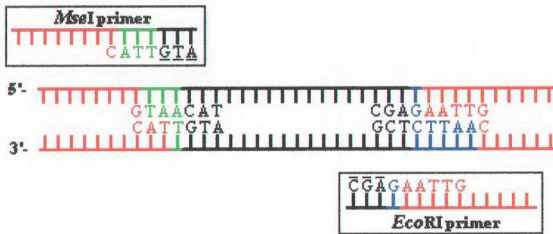
Restriksiyon enzimleri
(*MseI* ve *EcoRI*)
ve
DNA ligaz



(b) Restriksiyon ve ligasyon



(c) Seçici amplifikasyon (birçok primer kombinasyonundan sadece biri gösterilmiştir)



Şekil 3. AFLP belirteçlerinin hazırlanması (Mueller ve Wolfenbarger, 1999).

AFLP metodunda, genomik DNA biri seyrek ve diğeri ise sık kesen iki ayrı restriksiyon endonükleazla kesilir. Kesim sonucu oluşan DNA parçalarının kesim bölgelerine, PZR ile çoğaltmada primer tanıma yeri olarak rol alacak olan adaptörler bağlanır. Adaptörler, enzimin kestiği DNA dizilerine uygun olarak hazırlanırlar.

Adaptör dizilerine ilaveten rasgele üç nükleotidin primer baz dizisine ilave edilmesi, kesim sonucu oluşan DNA parçalarının sadece bir kısmının seçici olarak çoğaltılmasını sağlar.

Vos vd. (1995) yaptıkları çalışmada şu sonuçlara varmışlardır: (1) AFLP tekniği çok sayıda DNA fragmentinin eş zamanlı çoğaltılmasında etkili bir yol sağlar, (2) PZR ile çoğaltılan DNA parçaları, restriksiyon enzimlerle kesilen DNA parçalarıdır, (3) elde edilen fragmentlerin sayısı genom büyüklüğüne bağlı olarak artar ve teorik olarak beklenenle yüksek derecede uyumluluk gösterir ve (4) AFLP primerlerinin sonunda bulunan seçici primerler beklendiği üzere bantların sayısını azaltır.

AFLP metodu, genomik DNA'nın restriksiyon enzimle kesilmesi sonucu oluşan DNA parçalarının PZR ile seçici olarak çoğaltılmasına dayandığı için, AFLP belirteçleri aslında RFLP'dir (restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmidir). Bu nedenle, AFLP belirteçleri bireyler arasındaki genetik farklılıkları, populasyonları ve türleri, birbirinden bağımsız evrimleşen hatları araştırmada kullanışlıdır.

Bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakteriler de dahil olmak üzere çok sayıda taksada, kriptik türlerin (ikiz türler) gen varyasyonlarını belirlemek, diğer bazı moleküler ve morfolojik karakterler yardımıyla çözümlenmesi imkansız olan birbirine çok yakın türlerin teşhisinde AFLP belirteçleri yararlı olabilir (Russell vd., 1997; Waugh vd., 1997; Liu vd., 1998; Bachem vd., 1998; Kumar, 1999; İncirli vd., 2001; Marsan vd., 2001; Knorr vd., 2001; Waar vd., 2002; Li vd., 2002). Örneğin; AFLP belirteçlerinin; nematodların (Semblat vd., 1998), mikroorganizmaların (Lin vd., 1996) ve yeni patojenlerin hızlı bir şekilde teşhis edilmelerinde (Lin vd., 1996; Waar vd., 2002) diğer bir çok moleküler belirteçten daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, AFLP belirteçlerinin yakın akraba

türlerin filogenisinde de kullanışlı olduğu gösterilmiştir (Innan vd., 1999; Agresti vd., 2000; Li vd., 2002). AFLP belirteçlerinin, homolog bantların sayısının oldukça azalması yada olmamasından dolayı tür üstü taksonların filogenisinde kullanışlı olmadığı ileri sürülmüştür (Mueller ve Wolfenbarger, 1999). Bu nedenle, AFLP belirteçleri en geniş biçimde, özellikle populasyon yapısı ve farklılaşmalarının incelendiği araştırmalarda tür seviyesinin altındaki genetik varyasyonların analizinde uygulanmaktadır (Liu vd., 1998; Innan vd., 1999; Agresti vd., 2000; Li vd., 2002).

AFLP belirteçleri, ebeveyn analizleri ve bireysel teşhisler için “DNA parmak izleri” düzeyindeki genetik farklılıkları çözümleyebilecek potansiyele sahiptir. Teorik olarak, AFLP belirteçleri, akrabalık, analık-babalık, çiftleşme frekansı veya davranışsal ekolojideki diğer genetik parametrelerin analizinde kullanılmaya uygundur. AFLP çok az genetik farklılık gösteren yakın izogenik hatların (örneğin soya fasulyesi) genetik varyasyonunu ortaya koymada da etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

AFLP belirteçleri en az diğer moleküler metodlar kadar kullanışlıdır. Mueller ve Wolfenbarger (1999) tarafından yapılan derlemede AFLP belirteçleri için şu altı avantaj belirlenmiştir:

(1) Taksonomik alan: AFLP metodunu uygulamak için ilgili organizmanın genomunun DNA dizi bilgisine gerek yoktur ve bu yüzden tüm canlılara uygulanabilir.

(2) Hata seviyesi: AFLP amplifikasyonu yüksek seçici şartlarda uygulandığı için RAPD-PZR’da görülen tortular (background) yoktur. Tekrarlanan AFLP amplifikasyonlarında mükemmel yakın tutarlılık görülmüştür ve tüm hatalar (yanlış eşleme ve skor hataları da dahil) %2’den azdır. Farklı laboratuvarlarda yapılan AFLP analizi sonuçlarının birbirlerine son derece uyumlu olduğu gösterilmiştir. Laboratuvarlar arası hata %0.6 dan azdır.

(3) Doku ve DNA miktarı: AFLP analizi için az miktarda DNA’ya gereksinim vardır. Ayrıca kısmen yıkılmış olan DNA da kullanılabilir.

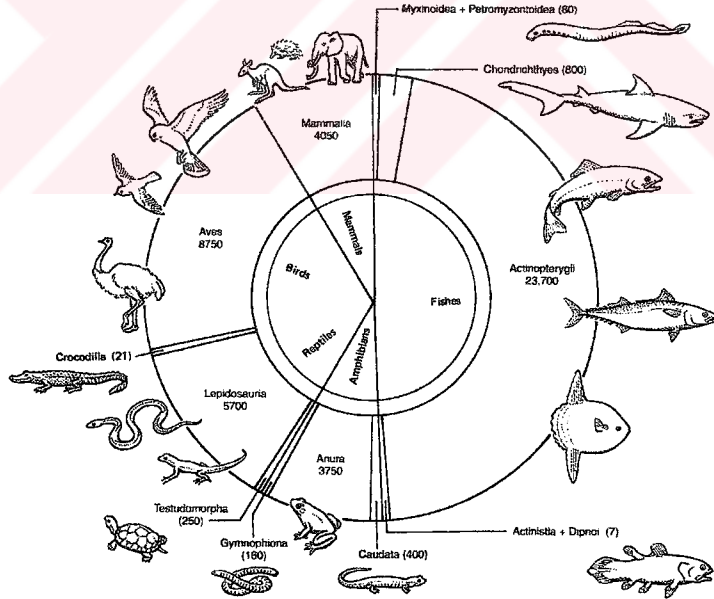
(4) Zaman verimi: AFLP metodu kısa sürede çok sayıda polimorfik belirteç elde etmek için kullanışlıdır.

(5) **Mendel kalıtımı:** AFLP belirteçleri Mendel kalıtımı gösterir. Populasyon genetiği ve QTL analizi için kullanılabilir (Mohan vd., 1997).

Hemen hemen sınırsız sayıda belirteç AFLP-PZR ile üretildiği için, (bir dizi değişik kombinasyonlarda primer kullanılarak) her organizmanın genomundaki en küçük değişiklikler bile gözlenebilir. Tek nükleotid değişikliği, poliakrilamid jelde veya otomatik genotipleyicilerle saptanabilir. AFLP belirteçlerini teknik olarak daha basit olan agaroz jelde de incelemek mümkündür.

2.2. Balıkların (Pisces) Moleküler Sistematiği

Bilinen mevcut 24.587 türle (Pough vd., 1996), yaşayan omurgalılar içinde en kalabalık grubu oluşturan balıkların (Şekil 4) sistematiği uzun yıllar boyunca yalnızca morfolojik ve anatomik karakterlerle yapılmıştır. Morfolojik karakterlerle yapılan sistematik çalışmaları sonucunda balıkların evrimi ve akrabalık ilişkileri ile ilgili önemli sonuçlar elde edilmiştir.



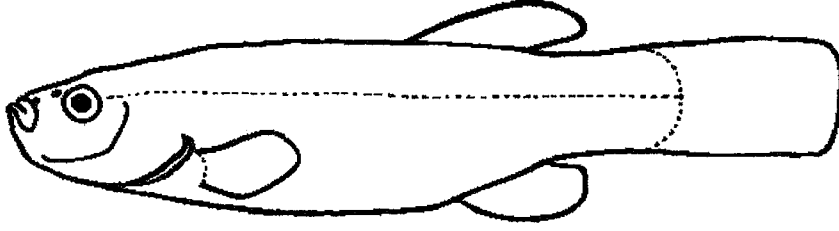
Şekil 4. Balıkların (Pisces), yaşayan diğer omurgalılar içindeki oranını ve tür sayısını gösteren grafik (Pough vd., 1996).

Günümüzde de sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan morfolojik karakterlere dayalı sınıflandırma çalışmaları, balıkları çeşitli taksonlar altında ayırmada başarısını korusa da, farklı karakter analiz yöntemleri

kullanılarak test edilmeleri gittikçe yaygınlaşmaktadır. Son 20 yılda büyük bir hızla gelişen ve etkinleşen moleküler teknikler sistematik çalışmalarında morfolojik karakterlerle oluşturulan sınıflandırmaların test edilmesinde kullanılan yaygın bir yol olmuştur. Genelde morfolojik ve moleküler verilere dayalı çalışma sonuçları birbirini desteklemektedir. Ancak bunun tersinin de yaşandığı durumlar söz konusudur.

2.2.1. Cyprinodontidae (Dişli Sazanıklar)'nin Genel Özellikleri

Morfolojik görünüşleri yönünden Cyprinidae familyasına çok benzerlerse de, çenelerinde maksil dişleri taşımaları nedeniyle “Dişli Sazanlar” olarak onlardan ayrılırlar (Şekil 5). Diğer taraftan, vücut uzunlukları da çok küçük olup, ancak 10 cm kadar olabilirler (Geldiay ve Balık, 1988). Başları üst taraftan basık ve yassılaştırmış; ağız yukarı doğru (superior), başın üst ön kenarında ve protraktıl özelliindedir. Bıyıkları yoktur. Her iki çenede de dişler mevcuttur (Slastenenko, 1955; Kuru, 1975; Erk’akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988). Gırtlığın üst ve alt kısmında üç çatallı (tricuspid) dişler yer alır (Kuru, 1975; Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999). Sırt yüzgeci (dorsal yüzgeç) vücudun arka kısmında (posterior) yer alır. Ovipar (yumurta ile çoğalan) balıklardır (Slastenenko, 1955; Kuru, 1975; Erk’akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988). Sindirim borusuna bağlı olan kör bağırsaklar bulunmaz. İyice basitleştirmiş olan küçük bir hava keseleri vardır veya hiç bulunmayabilir. Erkek ve dişiler arasında daima renk ve desen yönünden farklılıklar (dimorfizm) görülür. Bilhassa erkekler daha cazip renklerle süslenmişlerdir. Yüzgeç ışınlarında tam kemikleşme olmadığı için genellikle elastiki bir yapı gösterirler. Tek yüzgeçler erkek ve dişide farklı görünüştedir (Slastenenko, 1955; Kuru, 1975; Erk’akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999). Vücut genelde pullarla örtülmüş ise de, bazen yer yer pulssuz olan çıplak bölgeler bulunabilir veya tamamıyla çıplak olabilir (Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999).



Şekil 5. Cyprinodontidae familyasına ait balıkların genel görünüşleri.

Güney Avrupa, Afrika, Asya ve Amerika tatlı sularında yaşarlar. Gıda olarak ekonomik değeri olmayan familya balıklarının bazıları akvaryum için süs balığı olarak yetiştirilir ve çeşitli bilimsel çalışmalarda kullanılır (Frenkel ve Goren, 2000; Hrbek vd., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003).

2.2.1.2. *Aphanius*'un Genel Özellikleri ve Sistematığı

Total vücut uzunluğu nadiren 80 mm'nin üzerine çıkar; vücut az yada orta derecede yanlardan basıktır (Wildekamp vd., 1999). Pelvik yüzgeç olmayabilir; dorsal yüzgecin orijini anal yüzgecin orijininin biraz önünde veya üstünde yer alır (Erk'akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999). Kaudal (kuyruk) yüzgeç daima tek loplulu olup, serbest kenarı düz veya yuvarlaktır (Geldiay ve Balık, 1988). 1-2 dallanmamış dorsal ışın, 7-13 dallı dorsal ışın, 1-2 dallanmamış anal ışın, 7-14 dallı anal ışın taşır (Wildekamp vd., 1999). Lateral (yan) çizgi sadece başın üzerinde mevcut olup, porlu tübüler sistemden oluşur; pullanma indirgenmiş veya bazen yoktur (Wildekamp vd., 1999). Ağız superior (üst konumlu), alt çene sıklıkla dikey olarak yukarıya yöneliktir (Erk'akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999). Çenedeki dişler genellikle üç çatalıdır (Akşiray, 1952; Kuru, 1975; Erk'akan, 1981; Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999). İlk solungaç kolunun alt dalı üzerinde 9-17 tane tarak bulunur (Wildekamp vd., 1999). Vücut büyüklüğünde düşük seksüel dimorfizm görülür, erkekler dişilerle ya aynı büyüklükte ya da biraz daha uzundur (Wildekamp vd., 1999). Erkekler genellikle uzun dorsal ve anal yüzgeçli ve parlak renklidir (Geldiay ve Balık, 1988; Wildekamp vd., 1999). Genellikle sıcaklığı mevsimlere göre fazla değişmeyen kaynak suları ile tuzlu, acı ve sıcak su kaynakları bu balıkların tercih ettiği başlıca yaşam ortamları olarak bilinmektedir.

Belli başlı besinlerini çeşitli böcek larvaları ve küçük kabuklular oluşturur (Geldiay ve Balık, 1988; Frenkel ve Goren, 2000).

İkincil (sekonder) tatlı su balıkları olup, genel yayılışları dikkate alındığında Tetis Denizi reliktidirler (Kosswig, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp vd., 1999; Hrbek vd., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003). Günümüzdeki yayılışları, Akdeniz'in buzul ve buzullar arası dönemlerdeki su seviyesi değişimlerinden etkilenmiştir (Kosswig, 1952; Akşiray, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp vd., 1999).

Aphanius cinsi iki ana ekolojik gruba bölünebilir; bunlardan ilki acı su ve gerçek tuzlu körfez çevrelerinde yaşayan türleri, ikincisi ise tatlı su vahalarında, pınar, çay, bataklık ve denizle bağlantısı olmayan göllerde yaşayan türleri kapsar (Hrbek ve Meyer, 2003). Günümüzde 14 türden oluşan *Aphanius* cinsinin Türkiye'de 6 tür ve 4 alttürü bulunmaktadır (Hrbek ve Meyer, 2003).

***Aphanius anatoliae anatoliae* (Leidenfrost, 1912)**

Erkek ve dişilerdeki renklenme populasyon düzeyinde oldukça değişken olabilir (Şekil 6).



Şekil 6. *Aphanius anatoliae anatoliae*, Düger, DSİ pompa istasyonu (Wildekamp vd., 1999).

Erkeklerde vücut parlak gümüşü gridir. Yanlarda, arkadan abdomene doğru, sayı ve yükseklikleri değişik populasyonlarda farklılık gösteren, 6 ila 10 adet koyu gri vertikal (dikey) çizgi vardır. Ergenlik çağında, erkekler tabana (bazal) yakın açık gri bantlı siyah bir dorsal yüzgece sahip olurlar. Anal yüzgeç dar siyah bir çizgi ile çevrilmiş, limon sarısıdır ve yüzgecin geri kalan kısmında

ayrıca küçük çizgi yada benekler bulunabilir. Bazı populasyonlar anal yüzgeçte geniş terminal bir banda sahip olabilir. Kuyruk yüzgeci 2 yada 3 çapraz çizgili, renksiz, soluk sarı yada beyazdır.

Dişiler, yanlarda koyu gri benekli soluk gümüşü gridir. Bu benekler, başlıca orta lateral çizgi boyunca yoğunlaşmıştır. Kaudal pedunkulunun ortasında siyah bir benek vardır. Bütün yüzgeçler renksizdir.

Dağılımları; akarsular, küçük nehirlerin çevresinde ve Tuz Gölü, Eğirdir Gölü, Beyşehir Gölü içindeki akıntılarda ve Niğde'nin doğusu ile Konya arasındaki çeşitli nehirler, havuzlar ve bataklıklar ve Büyük Menderes Nehri'nin kaynak alanları ve Eskişehir civarındaki Yukarı Sakarya Nehri ve Selçuk yakınındaki düşük drenaj sistemlerinde bulunur. Tipik habitasyonu kapalı tatlı su kıyılarından acı sulara doğrudur.

***Aphanius anatoliae splendens* (Kosswig ve Sözer, 1945)**

Erkekler organizma düzeyinde değişkendir, çizgi genişliği her bireyde farklı olabilir. Gümüşü fonlu vücut, 8 ila 11 adet, düzensiz, koyu griden neredeyse siyaha değişen vertikal çizgilere sahiptir. Genellikle vücudun ve başın arkasında küçük siyah bir seri benek bulunur. Dorsal yüzgeç geniş siyah kenarlı, bazalde renksizdir. Beyazdan soluk sarıya değişen renkteki anal yüzgeç, dar siyah kenarlıdır. Kuyruk yüzgeci renksizden beyaza değişen renkte olup, genellikle siyah renkli çapraz iki bant bulunur.

Dişiler, yanlarda orta lateral çizgi boyunca yoğunlaşmış koyu kahverengi neredeyse siyah renkli, büyük benekli parlak gümüşü renktedir. Tüm yüzgeçler renksizdir.

Bu alttürün yalnızca iki lokalitede bulunduğu bilinir: Isparta'nın batısındaki Gölcük Gölü ve Yeşilova'nın batısındaki Salda Gölü (Wildekamp vd., 1999) (Şekil 7).



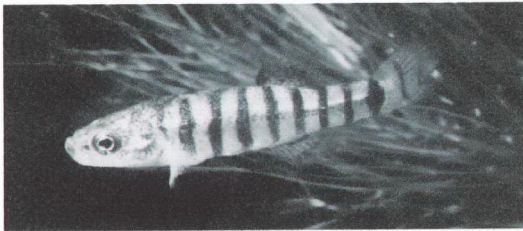
Şekil 7. *Aphanius anatoliae splendens*, Salda Gölü, Burdur (Wildekamp vd., 1999).

***Aphanius anatoliae sureyanus* (Neu, 1937)**

Erkeklerde, birey düzeyinde farklı vertikal çizgilenmeler görülür. Sayısı oldukça değişken olan düzensiz koyu gri neredeyse siyah renkte vertikal çizgiler taşıyan parlak gümüşü gri vücutları vardır. Dorsal ve anal yüzgeçler benzer olup, bazalde parlak gri olan renk koyulaşarak kenarda geniş siyah bir çizgi halini alır. Kuyruk yüzgeci, iki koyu vertikal çizgili olup; rengi, rensizden parlak griye değişir.

Parlak gümüşü renkli dişilerde, orta lateral çizginin üzerinde ve yukarısında rengi koyu kahverenginden koyu griye değişen 6-8 adet benek bulunur. Tüm yüzgeçler rensizdir.

Burdur Gölü için endemiktir. Erkekler genellikle kıyıya yakın kaya kenarlarında bulunur, alglerle beslenirler. Göl kıyısına yakın, nispeten tatlı, acı ve bazen de sülfürlü kaynak sularında yaşarlar. Bu habitatlarda bazı algler haricinde vejetasyon bulunmaz (Şekil 8).



Şekil 8. *Aphanius anatoliae sureyanus*, Burdur Gölü (Wildekamp vd., 1999).

***Aphanius anatoliae transgrediens* (Ermin, 1946)**

Erkeklerde renklenme popülasyon düzeyinde farklılık gösterir. Parlak gümüşü renkteki vücut üzerinde koyu gri renge siyaha değişen, genellikle düzensiz, 8 ila 11 adet vertikal çizgi bulunur. Genellikle siyah üzerinde bir seri koyu gri benek görülür. Renksiz dorsal ve anal yüzgeçler bazalda siyah çizgilidir. Bu çizgi çiftleşme boyunca genişler ve yüzgecin tamamı siyah olur. Kuyruk yüzgeci renksiz, soluk gri olup iki adet vertikal çizgi bulundurur.

Gümüş renkli dişiler yanlarda siyah üzeri koyu kahverengiden griye değişen beneklerle süslüdür. Beneklerin genellikle yan orta çizgi üzerinde toplandığı görülür. Bütün yüzgeçler renksizdir.

Türkiye'nin merkez güneyindeki Acı Göl'e yakın kaynaklarda bulunduğu bilinmektedir. Bu kaynaklar temiz, hafif acı su üretir. Bunlar genellikle gölde yaşamazlar. Çünkü göl suyu çok tuzlu olup yaz aylarında ki kuraklık periyotlarında tuzluluğu daha da artar. Ağır kış yağışları sırasında göl yeterince tatlı su alınca komşu popülasyonlar birbirine karışır. Uzak popülasyonlar bu durumdan etkilenmez (Şekil 9).



Şekil 9. *Aphanius anatoliae transgrediens*, Acı Göl, Gemiş (Wildekamp vd., 1999).

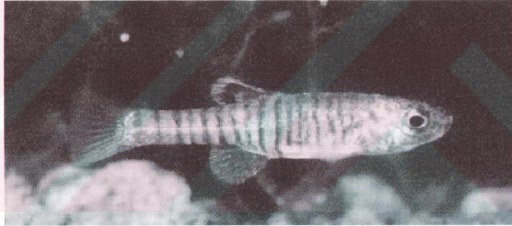
***Aphanius asquamatus* (Sözer, 1942)**

Erkeklerin yanlardaki çizgilenmeleri oldukça değişkendir. Yanlarda gümüşü gri arkaya doğru koyu gri ve karın kısmı gümüş rengindedir. Yanlarda küçük beneklerin toplanmasıyla (melanofor) oluşan 11-15 koyu vertikal çizgi görülür. Benzer benekler başta da görülür. Dorsal yüzgeç gri olup frontal bölgede siyah

vertikal bir kısım bulunur. Gümüş renkli hilal şeklindeki submarjinal bant, yüzgecin anterior kısmındaki siyah kısma kadar ulaşır. Dorsal yüzgeç ortada açık gri olup koyu gri bir bantla sonlanır. Anal yüzgeç gri donuk koyu bantlı ve dar siyah kenarlı. Kuyruk yüzgeci renksizden açık griye değişen renklerde ve işaretler bulunmaz. Üreme döneminde erkekler oldukça koyu, hemen hemen siyah renkte olurlar.

Dişilerin vücut rengi gri olup arkaya doğru koyu, karna doğru daha açıktır. Yanlarda 13-18 düzensiz, rengi koyu kahverenginden koyu griye değişen düzensiz yapıda benekler, devamsız horizontal (yatay) bantlar bulunur. Bütün yüzgeçler renksizdir.

Türkiye'nin doğusunda ki Hazar Gölü'ne endemiktir. Balık sürüleri halinde kapalı sahillerde yaşarlar. Üreme döneminde erkekler alglerden oluşan çalılı kayalar çevresindeki yaşam alanlarını işgal ederler (Şekil 10).



Şekil 10. *Aphanius asquamatus*, Hazar Gölü, Elazığ (Wildekamp vd., 1999).

***Aphanius danfordii* (Boulenger, 1890)**

Erkeklerde renk çoğunlukla populasyon düzeyinde, yanlar hariç, biraz değişkendir. Yanlarda açık gümüşü gri, arkaya doğru ve alt kısımda gri renklenme görülür. Vücudun yanlarında 9-12 tane koyu griden siyaha değişen vertikal çizgiler görülür. Bu çizgiler biçim, büyüklük ve sayı bakımından birey düzeyinde değişkendir. Kuyruk yüzgeci renksizden soluk beyaza değişen renklerde çoğunlukla 3 koyu vertikal çizgili, fakat bu 1 ila 4 arasında değişir. Üreme döneminde erkeklerde, bazalinde bazı açık benek bulunan siyah dorsal yüzgeç görülür. Soluk sarı anal yüzgeç 2-3 tane koyu çizgili ve dar siyah kenarlı.

Dişiler gümüşü gri renkte, koyu griden kahverengine değişen çok sayıda farklı büyüklük ve şekilde benekler bulunur. Vücudun arka ve yanlarında düzensiz boyuna bantlar bulunur. En büyük ve belirgin benek daima kuyruk yüzgecinin bazalinin merkezindedir. Dorsal yüzgeç soluk kahverengi olduğunda bütün diğer yüzgeçler genellikle rensiz olur.

Kızılırmak Nehri drenaj sisteminin orta bölgelerinden Karadeniz ağzına kadarki kaynaklar, küçük dereler ve çaylar içinde bulunurlar. Kayseri'nin güneyinde yukarı Seyhan Nehri drenaj sisteminde bazı lokalitelerde de bilinir. Bu türün tam dağılımı bilinmemektedir (Şekil 11).



Şekil 11. *Aphanis danfordii*, Kanal 2, Soysalı, Seyhan Nehri (Wildekamp vd., 1999).

***Aphanis fasciatus* (Valenciennes In: Humboldt & Valenciennes 1821)**

Erkeklerin renklenmeleri popülasyon düzeyinde farklıdır. Batı popülasyonlarının, doğu Akdeniz Havzası'nda bulunan popülasyonlardan daha az çapraz çizgilere sahip olduğu düşünülür. Arka yeşilden kahverengine değişen renkte, yanlarda 8-15 adet koyu mavi gri vertikal çizgili ve vücut gümüş rengi fonludur. Dorsal yüzgeç soluk sarı-gri bazalına yakın az koyu gri beneklidir. Dorsal yüzgecin frontal kısmında uzun dikey dar koyu gri bir kenarın içini soluklaştıracak şekilde siyah bir leke görülür. Anal yüzgeç soluk beyazdan açık maviye değişen renkte olup, önde birkaç kısa koyu çizgi görülür. Kuyruk yüzgeci sarıdan sarı-turuncuya değişen renkte olup, bazı popülasyonlarda geniş, koyu submarjinal bantlıdır.

Dişiler, arkada koyulaşan ve karında hemen hemen beyaz olan, griden gümüşü renge değişen renktedir. Üzerinde koyu kahverengi beneklerden oluşmuş

benekli desenler bulunan kısa, koyu kahverengi vertikal çizgiler orta yan çizgi boyunca görülür. Bütün yüzgeçler renksizdir.

Nehirlerin ve derelerin sahil bölgelerinde, lagünlerde yaşarlar. Nadiren kumlu sahiller üstünde rastlanır. Acı suda ve bazen tatlı veya tuzlu su girişlerinde bulunurlar. Akdeniz havzasının batı yarısında; kuzey Afrika'da Mısır'dan doğu Cezayir'e kadar; ayrıca kuzeydoğu Tunus'da Choods'da ki gibi kara ile çevrili belli havzalarda, kuzey Libya'da Al Agheila yakınlarında ki kükürtlü kaynaklarda ve simpatrik olarak oluşan *A. dispar*'ın bulunduğu kuzey batı Mısır'daki Siwa vahasında, Mısır'daki Acı Göl'de ki oraya Süveyş Kanalı boyunca göç ederek gelirler; güney Avrupa'da ki Korsika ve Sardunya adalarından, batıda güneydoğu Fransa'nın Rhone deltasından, İstanbul'un güney batısına kadar ve Anadolu'nun Akdeniz sahilleri ile Suriye ve batı İsrail'de dağılım gösterir (Şekil 12).



Şekil 12. *Aphanius fasciatus*, Marina di Modica, İtalya (Wildekamp vd., 1999).

***Aphanius mento* (Heckel in: Russegger, 1843)**

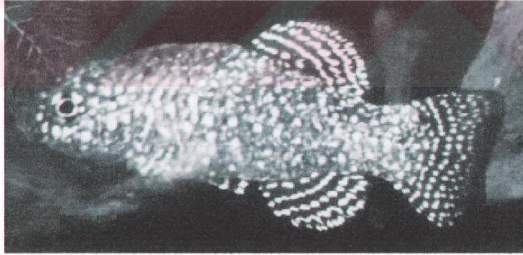
Renk deseni her iki cinsiyette de yüksek çeşitlilik gösterir.

Erkeklerin çiftleşme dönemindeki renklenmeleri normal renklenmeden farklıdır. Vücut rengi mavi-siyahtan çok koyu kahverengine değişen renkte, abdomene doğru soluklaşır. Yanlarda parlak maviden gümüş rengine değişen renkte çok sayıda benek görülür ve bunlar düzensiz vertikal çizgiler şeklinde olabilirler. Parlak beneklerden kavisli çizgiler bulunduran dorsal ve anal yüzgeçler mavi-siyahtan çok koyu kahverengine değişen renktedir. Kuyruk yüzgeci aynı renkte olup, düzensiz çizgi formu parlak beneklerden kavisli çizgiler bulunur.

Boğaz kenarından solungaç kapaklarına kadar turuncu-kırmızı renktedir. Üreme döneminde olmayan erkekler daha koyu ebruli gri-kahverengi renktedir.

Dişilerde bütün vücut gri-kahverengi, arkada daha koyu ve abdomende daha parlaktır. Bazı pulların yanlarında gümüş renğinde bir benek olabilir ve bazı popülasyonlarda da yanlarda birde bazı siyah benekler görülür. Pullar orta yan çizgi boyunca genellikle nispeten koyu kenara sahiptirler. Bütün yüzgeçler renksizdir.

Tatlıdan hafif acı sulara, kaynaklarda, derelerde, nehirlerde ve küçük göllerde genellikle kıyıya yakın yaşarlar. Erkeklerin oluşturduğu bölgeler genellikle vejetasyona kapalı veya vejetasyonlar arasındaki yerlerde bulunur. Orta Anadolu'nun doğusundaki Ceyhan Nehri drenajı girişinde ve Fırat ve Dicle Nehri vadilerinde, ayrıca Şat'ül Arab'da bulunurlar. Suriye, Lübnan, ve İsrail nehir sistemlerinin kıyılarında ve doğu Ürdün'deki Ürdün Vadisi içinden İsrail'deki Ölü Deniz'e kadarki alanda bulunurlar. Suriye'den itibaren Türkiye'nin güney kıyılarında Antalya çevresindeki alanlarda bulunur ki burası Toros Dağları ile Akdeniz'in bulunduğu batı sınırır. Bazı kapalı havza popülasyonları Orta Anadolu'da görülür (Şekil 13).



Şekil 13. *Aphanius mento*, Kırgözü, Antalya (Wildekamp vd., 1999).

***Aphanius villwocki* (Hrbek ve Wildekamp, 2003)**

Burun yuvarlağı, baş uzunluğunun %23'ü kadardır. Ağız direkt yukarıya yönelik, alt çene hemen hemen vertikaldir. Göz, başın %33'ü kadardır. Dorsal taraf kıvrımlı, baş tarafı düzdür. Dorsal yüzgecin başlangıcı, anal yüzgeç başlangıcının önünde ve vücudun orta kısmının arkasındadır. Dorsal yüzgeç 9-12, anal yüzgeç

10-12 ışıklıdır. Ventral bölge küçük pullu, yan arka kısım üzerindeki pulların arka kenarı ve kaudal pedunkula stenoid görünümlüdür (Şekil 14).



Şekil 14. *Aphanius villwocki*, Sakarya Nehri, Ahiler (Hrbek ve Wildekamp, 2003).

Erkekler büyük ve güçlü, akvaryum örneklerinde standart uzunluk (SU) 50 mm'yi bulur. Vücut ve baş pulları gümüşü gri renktedir. Arkada pullar dar gri kenarlıdır. Yanda 13-19 tane düzensiz koyu gri çapraz çizgilidir. Dorsal yüzgeç şeffaf sarımsı gri, birçok koyu gri beneklidir. Anal yüzgeç sarımsı gri, genellikle işaretli, dar gri kenar görülebilir. Pelvik yüzgeç sarımsı gridir. Üretken erkekler soluk sarımsı, bütün vücudun üstü parlaktır. En büyük vücut yüksekliği pelvik yüzgecin ön tarafındadır. Tek yüzgeçlerin tamamı yuvarlaktır. Kuyruk yüzgeci kısa kesilmiş, arka kenarı biraz yuvarlaktır.

Dişiler erkeklerden daha küçüktür. Standart uzunluk 45 mm'yi bulur. Vücut yanlarda daha az basık ve erkeklerden daha dardır. En büyük vücut yüksekliği pelvik yüzgecin ön tarafındadır. Tek yüzgeçlerin tamamı yuvarlaktır. Anüs ve genital açıklık ayrılmıştır. Baş ve vücut yarısının üst yarısı parlak bakırmımsı gri, düzensiz dağılmış koyu gri işaretlidir. Alt vücut yarısı soluk gümüşü gridir. Orta yan çizgi üzerinde belirsiz gri çizgi bulunur. Bütün yüzgeçler renksizdir.

Aphanius villwocki sadece, Çavuşçu Gölü dahil, yukarı Sakarya Nehri Havzası'nda bilinmektedir (Hrbek ve Wildekamp, 2003).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Aphanius* cinsine ait 30 farklı popülasyondan (*A. anatoliae*-20 popülasyon; *A. danfordii*-5 popülasyon; *A. villwocki*-3 popülasyon; *A. asquamatus*-1 popülasyon ve *A. fasciatus*-1 popülasyon) toplanan 5 tür ve 4 alttür kullanılmıştır. Kullanılan tür ve alttürler ve toplandııkları yerler Tablo 1’de, toplama alanları ise Şekil 15’de verilmiştir. Dış grup seçilmesinde Hrbek vd. (2002) ve Hrbek ve Meyer (2003) tarafından yapılan çalışmaların ve dendogram sonuçlarından yararlanılmış ve *A. fasciatus* ve *A. asquamatus* dış grup olarak değerlendirilmiştir.

Örnekler, balık kepeçesi ve ağı kullanılarak toplanmış ve DNA analiz çalışmaları için %80’lik etanol içerisinde tespit edilerek saklanmıştır.

3.2 Total Genomik DNA İzolasyonu

Total genomik DNA, örneklerin sağ kuyruk sapından alınan eşit miktarlardaki kas dokusundan Hillis ve Moritz’in (1990) DNA izolasyon protokolünde bazı değişiklikler yapılarak izole edildi.

Kas dokularının alkolü uzaklaştırılarak, mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve üzerlerine 500µl STE (0.1 M NaCl, 0.05 M Tris ve 0.01 M EDTA, pH: 8) tamponu ilave edildi. Steril bir makasla dokular iyice parçalandı. Üzerlerine 25 µl proteinaz K (Sigma; 10 mg/ml) eklenerek karıştırıldı. 50 µl SDS (%10’luk) ilave edilen tüpler 2 saat 55°C’de, zaman zaman alt-üst edilerek, inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerlerine 500 µl PCI (Fenol:kloroform:izoamil alkol 25:24:1) eklenen tüpler yavaşça alt-üst edildi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Karışım 10 000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi. Bir mikropipet yardımıyla üst berrak tabaka alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Bu sırada interfazın (orta tabakanın) bozulmamasına dikkat edildi. Üzerlerine 500 µl CI (Kloroform-izoamil alkol 24:1) ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi, sonra 10 000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi. Mikropipetle üst berrak tabaka alındı ve yeni bir mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. İnterfazın bozulmamasına dikkat edildi. Üzerlerine %70’lik soğuk mutlak etanol ilave edildi. DNA gözle görününceye kadar tüp

yavaşça alt üst edildi. Numune 1-2 dk 10 000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Alkol uzaklaştırıldı. Çöktürülen DNA'dan alkolü tamamen uzaklaştırmak için, tüpler 37°C'de 5 dk inkübe edildi. Pellet 100 µl distile suda yeniden çözüldü.

3.3. Genomik DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzole edilerek distile su içerisinde çözülen DNA örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi için spektrofotometrede 260 nm'de absorbansları (soğurumları) okundu. Okunan optik dansite değerlerinden yararlanılarak aşağıdaki formülle DNA konsantrasyonu hesaplandı:

$$C_{DNA} = O.D. \times S.K. \times 50$$

O.D. → Optik Dansite (260 nm'de okunan absorbans değeri).

S.K. → Sulandırma katsayısı.

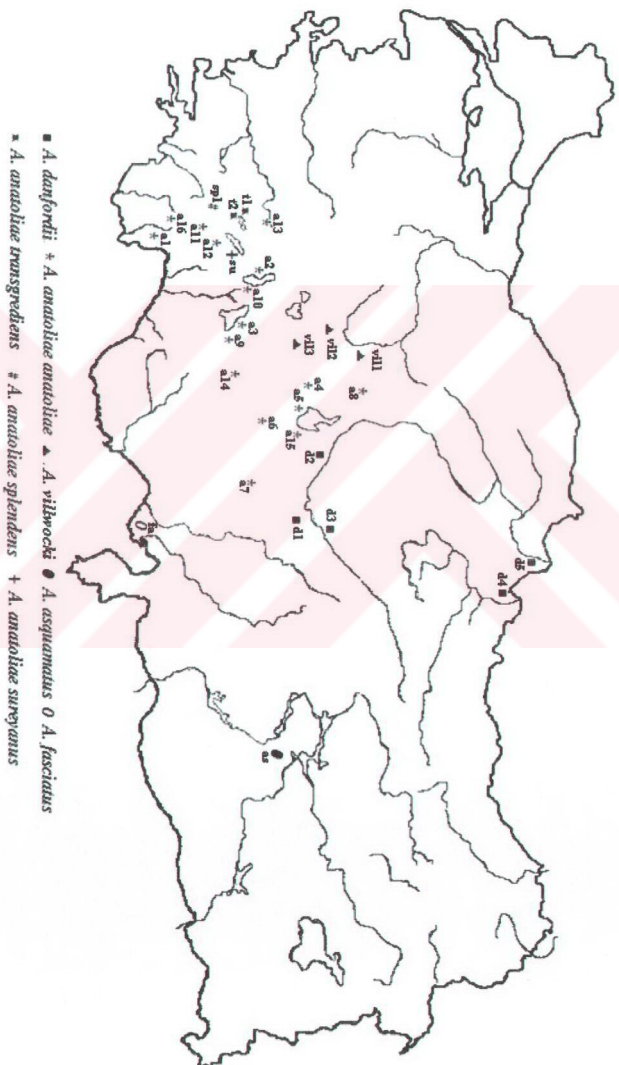
50 → Çift iplikli DNA için her absorbanstaki µg DNA miktarı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Aphanius* tür ve alttürlerin kısaltmaları ve toplandığı yerler ve koordinatları.

Tür ve Alttürler	Kısalt.	Toplandığı Yerler ve Koordinatlar
<i>A. anatoliae anatoliae</i>	<i>Ana1</i>	Avlan Gölü, Elmalı yakını 36°/34'47" K 29°/57'35" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana2</i>	Eğirdir Gölü, Akkeçili 38°/08'11" K 30°/46'17" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana3</i>	Beyşehir Gölü, Beyşehir 37°/41'03" K 31°/42'49" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana4</i>	İnsuyu Köyü, Cihanbeyli yakın 38°/40'22" K 32°/50'53" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana5</i>	Goyöz 2. dere, Cihanbeyli yakını 38°/33'09" K 33°/11'59" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana6</i>	Güneşli, Eşmekaya yakını 38°/11'22" K 33°/29'24" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana7</i>	Akkaya Barajı, Niğde yakını 37°/55'11" K 34°/36'24" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana8</i>	Baltalın, Aksaray girişi 39°/14'16" K 32°/44'40" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana9</i>	Eflatun Pınarı, Beyşehir Gölü 37°/49'31" K 31°/40'30" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana10</i>	Eğirdir Gölü, Karaot 38°/08'34" K 30°/52'58" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana11</i>	Düger DSİ pompa ist.,Burdur yakını 37°/34'24" K 30°/01'18" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana12</i>	Pınarbaşı sulama kanalı 37°/27'28" K 30°/02'19" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana13</i>	Eumeneia Kaynağı, Işıklı 38°/19'19" K 29°/51'11" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana14</i>	Erler, Konya 37°/49'29" K 32°/34'55" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana15</i>	Tuzgölü güneyi, Yenikent-Yeşilova 4.5. km 38°/22'47" K 33°/47'58" D
<i>A. a. anatoliae</i>	<i>Ana16</i>	Kırkpınar, DSİ pompa istasyonu 37°/08'33" K 29°/55'26" D
<i>A. a. splendens</i>	<i>Spl</i>	Salda Gölü 37°/31'30" K 29°/39'26" D
<i>A. a. sureyanus</i>	<i>Sur</i>	Burdur Gölü 37°/41'45" K 30°/11'28" D
<i>A. a. transgrediens</i>	<i>Tra1</i>	Acı Göl, Kaynak 6 37°/50'08" K 29°/57'57" D
<i>A. a. transgrediens</i>	<i>Tra2</i>	Acı Göl, Kaynak 14 37°/48'00" K 29°/53'39" D
<i>A. danfordii</i>	<i>Dan1</i>	Soysalı Kaynağı, Sultan Sazlığı 38°/23'23" K 33°/21'55" D

Tablo 1'in devamı.

Tür ve Alttürler	Kısalt.	Toplandığı Yerler ve Koordinatlar
<i>A. danfordii</i>	<i>Dan2</i>	Gözler, Kırşehir 38°/59'15" K 34°/06'58" D
<i>A. danfordii</i>	<i>Dan3</i>	Karpuzatan Kaynağı, Kayseri 38°/46'13" K 35°/27'19" D
<i>A. danfordii</i>	<i>Dan4</i>	Yeşilirmak Deltası, Çarşamba 41°/21'44" K 36°/44'23" D
<i>A. danfordii</i>	<i>Dan5</i>	Kızılırmak Deltası, Bafra 41°/39'40" K 36°/03'33" D
<i>A. villwocki</i>	<i>Vil1</i>	İmamoğlu köyü, Polatlı yakını 38°/53'35" K 31°/58'33" D
<i>A. villwocki</i>	<i>Vil2</i>	Salihler, Emirdağ yakını 39°/02'38" K 31°/19'31" D
<i>A. villwocki</i>	<i>Vil3</i>	Çavuşcu Gölü 38°/22'15" K 31°/50'56" D
<i>A. asquamatus</i>	<i>Asq</i>	Hazar Gölü 38°/27'46" K 39°/17'59" D
<i>A. phanius fasciatus</i>	<i>Fas</i>	Tuzla Gölü, Adana 36°/40'55" K 35°/05'02" D



Şekil 15. Örneklerin toplandığı alanlar.

3.4. AFLP Reaksiyonu

Çalışma için, Vos vd. (1995) tarafından geliştirilen AFLP reaksiyon protokolü değiştirilerek uygulandı.

AFLP reaksiyonu 3 ana basamakta gerçekleştirildi; (1) DNA'nın kesilmesi ve oligonükleotid adaptörlerinin bağlanması, (2) oluşan DNA parçalarının seçici amplifikasyonu, (3) seçici olarak çoğaltılan DNA parçalarının elektroforetik analizi.

3.4.1. Genomik DNA'nın Kesilmesi ve Oligonükleotid Adaptörlerinin Bağlanması

Genomik DNA (50-250 ng/μl), 10x tampon Y⁺/TANGO (Fermentas, MBI; 33 mM Tris-asetat, 10 mM Magnezyum-asetat, 66 mM Potasyum-asetat, 0.1 mg/ml BSA; pH: 7.9) tamponu, 10 U/μl *EcoRI* (Fermentas, MBI) ve 10 U/μl *MseI* (Fermentas, MBI) ile birlikte, son hacim distile suyla 25 μl'ye tamamlanarak 37°C'de her saat başı karıştırılarak 3 saat inkübe edildi. Enzimlerin inaktivasyonu için 70°C'de 15 dk tutuldu. Daha sonra üzerine, 5 μl; 1 μg/μl *EcoRI* adaptörü, 0.5 μg/μl *MseI* adaptörü, 1 U/μl T4 DNA ligaz (Fermentas, MBI) ve 10x tampon T4 DNA ligaz (Fermentas, MBI; 400mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5mM ATP pH: 7.8; 25°C'de) tamponu içeren çözelti eklendi. Vortekslendi ve çok kısa santrifüj edildi. Oda sıcaklığında, her saat başı karıştırılarak 4 saat inkübe edildi.

Adaptörlerin hazırlanması

Bütün oligonükleotidler HPLC (High Performance Liquid Chromatography = Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) saf olarak "Thermo BioSciences GmbH'dan" satın alındı. Oligonükleotidler, AFLP analizi için primer ve adaptör olarak kullanıldı.

Adaptörler, ayrı oligonükleotid zincirleri halinde satın alınarak laboratuvarında bir araya getirildiler. Bunun için, aşağıdaki prosedür takip edildi:

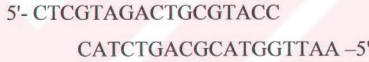
EcoRI adaptör (120 ligasyon için)

<i>EcoRI</i> -i oligonükleotid (1 µg/µl)	3.4 µl
<i>EcoRI</i> -ii oligonükleotid (1 µg/µl)	3.0 µl
10x tampon Y ⁺ /TANGO (Fermentas, MBI)	6.0 µl
dH ₂ O	107.6 µl

MseI adaptör (120 ligasyon için)

<i>MseI</i> -i oligonükleotid (0.5 µg/µl)	64 µl
<i>MseI</i> -ii oligonükleotid (0.5 µg/µl)	56 µl
10x tampon Y ⁺ /TANGO (Fermentas, MBI)	7.0 µl
dH ₂ O	3 µl

EcoRI adaptör yapısı aşağıdadır:



MseI adaptör yapısı aşağıdaki gibidir:



Adaptör karışımları PCR tüpleri içerisinde hazırlanarak 65°C'de 10 dk, 37°C'de 10 dk ve 25°C'de 10 dk tutuldu. Kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.4.2. Oluşan DNA Parçalarının Seçici Amplifikasyonu

Kompleks genomların AFLP parmakizi genellikle 2 basamaklı bir amplifikasyon gerektirir (Vos vd., 1995). Bu amplifikasyon prosedürünün ilk basamağını preamplifikasyon oluşturur. Bunu takiben seçici amplifikasyon uygulanır.

3.4.2.1. Preamplifikasyon

Preamplifikasyon tek bir seçici nükleotide sahip iki primerle çalışır (Vos vd., 1995). Bu çalışmada kullanılan her iki preamplifikasyon primeri aşağıda gösterilmiştir:

EcoRI + A oligonükleotid;



MseI + C oligonükleotid;



Sindirilmiş ve adaptörler bağlanmış DNA çözeltisi, 10x tampon PCR [Fermentas, MBI; 100mM Tris-HCl (pH: 8.8, 25°C'de), 500mM KCl, 0.8% Nonidet P40] tamponu, 5 U/μl *Taq* polimeraz (Fermentas, MBI), 100 μM dATP, 100 μM dTTP, 100 μM dCTP, 100 μM dGTP (Fermentas, MBI), 25 mM MgCl₂ (Fermentas, MBI), 50 ng/μl *EcoRI*+A oligo ve 50 ng/μl *MseI*+C oligo içeren çözelti, hacmi distile su ile 20 μl'ye tamamlanarak DNA amplifiye edildi. PCR (Stuart, UK) makinesi amplifikasyon için; denatürasyon 94°C'de 1 dk, annealing (primer bağlanması) 56°C'de 1 dk ve extension (primerlerin uzaması) 72°C'de 1 dk. 26 döngü süreci şekilde ayarlandı. Preamplifikasyon ürünü 5 kat seyreltildi ve seçici amplifikasyona kalıp olarak kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.4.2.2. Seçici Amplifikasyon

AFLP primerleri 3 bölümden oluşur: çekirdek sekans, enzim spesifik sekans (ENZ) ve seçici uzatma (extension) (EXT) (Vos vd., 1995).

	CORE	ENZ	EXT
<i>EcoR I</i>	5'- GAC TGC GTA CC	A ATT C	NNN -3'
<i>Mse I</i>	5'- GAT GAG TCC TGA G	TAA	NNN -3'

Yaptığımız çalışmada *EcoRI* ve *MseI* primerleri rasgele ikili kombinasyonlar şeklinde seçilerek kullanıldı. Tablo 2'de *EcoRI* ve *MseI* primerleri kullanıldıkları kombinasyonlar halinde ayrı olmak üzere, rasgele seçilmiş olan seçici üç nükleotitle (seçici uzatma) birlikte, *EcoRI* primerleri küçük bir harfle (a, b gibi), *MseI* primerleri ise bir rakamla (1, 2 gibi) gösterilmiştir. Tabloda ayrıca her bir primer kombinasyonunun uygulandığı toplam birey sayıları da yer almaktadır.

Preamplifikasyondan elde edilen ve 5 kat sulandırılan DNA seçici amplifikasyon için kalıp olarak kullanıldı. Preamplifiye DNA, 10x tampon PCR (Fermentas, MBI; 100mM Tris-HCl (pH: 8.8, 25°C'de), 500mM KCl, 0.8% Nonidet P40) tamponu, 5 U/μl *Taq* polimeraz (Fermentas, MBI), 100 μM dATP, 100 μM dTTP, 100 μM dCTP, 100 μM dGTP (Fermentas, MBI), 25 mM MgCl₂ (Fermentas, MBI), 50 ng/μl *EcoRI*+ANN oligo ve 50 ng/μl *MseI*+CNN oligo içeren çözelti hacmi distile su ile 20 μl'ye tamamlanarak DNA, PCR (Stuart, UK)

makinesinde amplifiye edildi. Amplifikasyon için; denatürasyon 94°C'de 30 saniye, primer bağlanması 60°C'de 30 saniye ve primerlerin uzaması 72°C'de 2 dk, primer bağlanma sıcaklığı her bir döngüde 0.7°C azaltılarak, 12 döngü; denatürasyon 94°C'de 30 saniye, primer bağlanması 56°C'de 30 saniye ve primerlerin uzaması 72°C'de 1 dk 23 döngü boyunca gerçekleştirildi.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ve bunlarla çalışılan birey sayıları.

EcoRI, MseI primerleri	Birey sayısı
a. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG C 1. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACG C	10
c. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAA T 3. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT G	6
a. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG C 4. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT A	5
b. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC A 3. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT G	5
b. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC A 2. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA C	5
a. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG C 2. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA C	6
b. 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC A 1. 5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACG C	5

3.4.3. Seçici Olarak Çoğaltılan DNA Parçalarının Elektroforetik Analizi

Amplifikasyon ürünü üzerine 8 µl yükleme tamponu (%98 deiyonize formamid, ksilen siyanol FF, Bromfenol blue, 0.5 M EDTA, pH: 8.0) eklenerek 90°C'de 4 dk denatüre edildi ve daha sonra buz üzerinde hızlı bir şekilde soğutulularak 1x TBE tamponu (10xTBE 0.089 M Tris, 0.089 M Borik asit ve 0.011 M EDTA, pH: 8.3) içinde, %6'lık denatüre edici vertikal poliakrilamid jele yüklendi. Jel matrisi %40 akrilamid-bisakrilamid (19:1 akrilamid:bisakrilamid), 10xTBE tamponu, 7.5 M üre kullanılarak hazırlandı. Vakum pompası yardımıyla 10 dk çözeltinin gazı uzaklaştırıldı. Jel çözeltisinin 100 ml'sine 400 µl, % 10'luk APS ve 100 µl

TEMED eklendi ve jel "ThermoEC160 DNA sequencing system", 35x 45 cm jel aparatı kullanılarak döküldü. 4.5-6 µl örnek yüklendi. Elektroforez; "ThermoEC4000P (4000 V, 300mA, 300 W)" güç kaynağı kullanılarak 75 W'ta 2 saat 20 dk ila 2 saat 50 dk uygulandı.

Jel, %10'luk glasiyel asetik asit içerisinde, karıştırılarak 30 dk fikse edildi. Distile su ile 3 kez 3'er dk karıştırılarak yıkandı. Boyama çözeltisi (%0.1 AgNO₃, %0.15 formaldehit- %37) içinde 45 dk karıştırılarak boyandı. Jel distile su içine batırılıp çıkarıldı. Distile sudan geçirilen jel geliştirici çözelti (%3 Na₂CO₃, %0.15 formaldehit- %37, 400 µl sodyumtiyosülfat-10 mg/ml) içerisinde bant gelişimi gözleninceye kadar karıştırıldı. Bant oluşumu tamamlandığı sırada geliştirici çözeltisinin üzerine fiksatif çözeltisi eklendi. Karamanın durması için 15 dk beklendi. Jel distile su ile yıkandı, kurutuldu ve bantların okunması için streçfilm ile paketlenildi.

3.5. AFLP Verilerinin Analizi

AFLP verileri jelde bantların bulunup bulunmamasına göre değerlendirildi. Bantların bulunma durumları 1, bulunmama durumları da 0 ile gösterildi. Bandın bulunması dominant, bulunmaması resesif fenotipi temsil eder.

Elde edilen verilerin analizi Popgene 32 (versiyon 1.3.1) adlı bilgisayar programı kullanılarak yapıldı (Yang ve Boyle, 1999). Bu analiz programı Nei'in (1972) genetik benzerlik (I) ve genetik uzaklık (D) formüllerini kullanarak çalışmaktadır. Bu formüller aşağıdaki gibidir:

$$I = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

$\sum x_i y_i$, x ve y popülasyonlarının toplam ortak bant sayısı ve $\sum x_i^2$, x bireylerinin, $\sum y_i^2$ ise y bireylerinin toplam bantlarının sayısıdır. Elde edilecek olan I değeri, 0 ile 1 arasında bir değer olacaktır.

Nei'nin (1972) genetik uzaklık formülü ise:

$$D = -\ln(I)$$

dir.

Popgene32 programı ile AFLP verilerin analizi sonucunda elde edilen uzaklık matrisi, Phylip (versiyon 3.6b) (Felsenstein, 1988) Neighbor-Joining (Saitou ve Nei, 1987) prosedürünün değişikliğe uğratılmasıyla UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) dendogramı elde edilmiştir.

AFLP verilerinin filogenetik analizi Phylip (versiyon 3.6b) (Felsenstein, 1988) adlı bilgisayar programı kullanılarak tutumluluk (parsinomi) metodu ile yapıldı. Bunun için AFLP veri seti seqboot ile 1000 replikasyon oluşturulup, bootstrap (seç-bağla) ve tam karakter ağırlaması (just weights) yapıldı. Seqboot analiz sonuçları Wagner parsinomi ile değerlendirilerek en iyi ağaç arandı. Hrbek vd. (2002) mtDNA sonuçları ve UPGMA dendogramından elde edilen sonuçlara dayanılarak *Fas* popülasyonu dış grup olarak belirlenerek, uyumluluk ağacı oluşturuldu. Bu yolla oluşturulan uyumluluk ağacında dalların tekrar oluşturulmaları sağlanarak en güvenilir ağaç elde edildi. Ağaç üzerinde dalların % seç-bağla değerleri gösterildi.

Genetik uzaklık ve tutumluluk sonuçları karşılaştırılarak ortak olan ve olmayan noktaları değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanmış, *Aphanius* cinsine ait toplam otuz popülasyon arasındaki genetik polimorfizmi belirlemek için, 19 baz uzunluğunda iki oligonükleotidin yedi farklı kombinasyonu, primer olarak kullanıldı. Bu primerlerle elde edilen bant sayısının 23 ile 76 arasında değiştiği görüldü. Poliakrilamid jel analizi sonucunda toplam 312 lokus belirlendi, analizler sonucunda 291 tanesinin polimorfik olduğu bulundu. Bu polimorfik lokusların toplama oranı ise %94.17 olarak hesaplandı.

Veriler öncelikle, popülasyonlar içi yada arasındaki genetik benzerlik yada farklılık derecesini anlamaya yarayan genetik uzaklık ölçümü (Nei, 1972) metoduyla analiz edildiler. Elde edilen genetik uzaklık veri matrisi Tablo 3'de gösterildi. Bu metod, popülasyonlar (yada taksonlar) arasındaki evrimsel ilişkiden çok, popülasyonların benzerlikleri veya farklılıkları temelinde gruplanması ya da ayrılmaları prensibinden hareketle takson sınırlarının belirlenmesinde işlev görür.

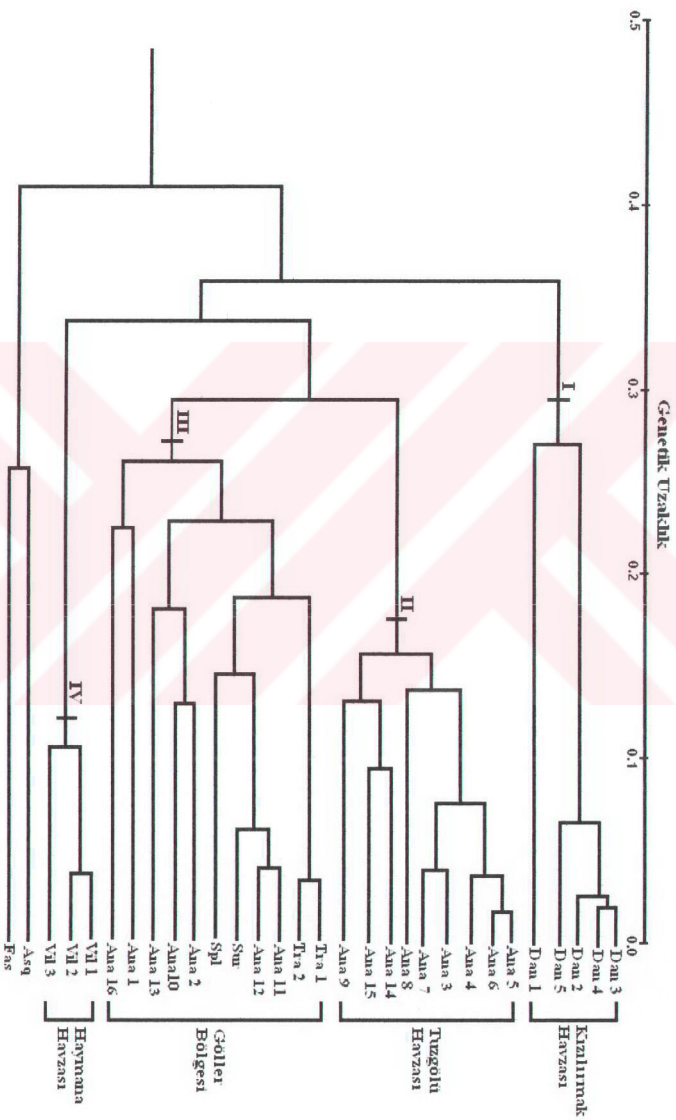
Genetik uzaklık veri matrisinden en küçük (0.0159) genetik uzaklığın *Ana6* ile *Ana5* popülasyonlarının, en büyük (0.4338) genetik uzaklığın ise *Vil3* ile *Dan2* popülasyonları arasında olduğu belirlendi.

Genetik uzaklık veri matrisinin analizi ile UPGMA dendogramı elde edildi. Dendogram Şekil 16'da gösterildi.

UPGMA dendogramının (Şekil 16) incelenmesinden popülasyonların 4 ayrı grup içerisinde toplandığı, *Fas* ve *Asq* popülasyonlarının da bu gruplara dış grup olarak yapılandığı görüldü. Bu gruplar içinde yer alan popülasyonların genetik uzaklıklarından yararlanılarak grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri hesaplandı (Tablo 4). Gruplar harita üzerinde (Şekil 18) gösterildi. Buna göre genetik uzaklık bakımından birbirine en yakın olan II. ile III. (0.2940), en uzak olan ise I. ile IV. (0.3879) gruplardır. Ayrıca grup içi en küçük genetik uzaklık değerine (0.0836) IV., en büyük genetik uzaklık değerine (0.2116) ise III. grubun sahip olduğu belirlendi.

Tablo 3. Populasyonlar arasındaki genetik uzaklık (Nei, 1972) veri matrisi.

Pop	Ana1	Ana2	Ana3	Ana4	Ana5	Ana6	Ana7	Dan1	Dan2	Dan3	Dan4	Dan5	Ana8	VIII	VII2	Ana9	Ana10	Tral	Tr2	Sur	Ana11	Ana12	Ana13	VII3	Ana14	Ana15	Ana16	Asq	Fas	
Ana1	*****																													
Spl	0.1913	*****																												
Ana2	0.2565	0.2139	*****																											
Ana3	0.3613	0.2950	0.2421	*****																										
Ana4	0.3607	0.3146	0.2621	0.0905	*****																									
Ana5	0.3612	0.3118	0.2335	0.0760	0.0348	*****																								
Ana6	0.3432	0.2908	0.2665	0.0562	0.0362	0.0159	*****																							
Ana7	0.3437	0.2785	0.2332	0.0392	0.0991	0.0675	0.0570	*****																						
Dan1	0.3152	0.3312	0.2606	0.3175	0.3084	0.3073	0.3081	0.3032	*****																					
Dan2	0.3822	0.4018	0.3288	0.4259	0.4030	0.3871	0.3971	0.3997	0.2742	*****																				
Dan3	0.3797	0.3997	0.3315	0.4138	0.4105	0.3917	0.3944	0.3952	0.2849	0.0220	*****																			
Dan4	0.3592	0.3664	0.3051	0.4002	0.3934	0.3639	0.3681	0.3694	0.2692	0.0271	0.0190	*****																		
Dan5	0.3447	0.3669	0.2875	0.3782	0.3758	0.3457	0.3510	0.3357	0.2579	0.0731	0.0644	0.0562	*****																	
Ana8	0.3564	0.3039	0.2869	0.1658	0.1277	0.1271	0.1141	0.1555	0.2802	0.3277	0.3361	0.3180	0.2952	*****																
VIII	0.3948	0.3897	0.3369	0.3955	0.3543	0.3394	0.3387	0.3651	0.3495	0.4026	0.3964	0.3746	0.3155	*****																
VII2	0.3833	0.3914	0.3251	0.4095	0.3675	0.3537	0.3526	0.3898	0.3403	0.3847	0.3807	0.3726	0.3606	0.3282	0.0381	*****														
Ana9	0.3750	0.3075	0.2684	0.1277	0.1670	0.1492	0.1462	0.1294	0.3178	0.4003	0.3947	0.3757	0.3546	0.1633	0.3379	0.3338	*****													
Ana10	0.2664	0.2307	0.1304	0.2357	0.2344	0.2212	0.2136	0.2020	0.2705	0.3363	0.3431	0.3208	0.3035	0.1918	0.3069	0.3072	0.1341	*****												
Tral	0.2683	0.2554	0.2732	0.2776	0.2629	0.3390	0.3387	0.3505	0.3514	0.3381	0.3717	0.3359	0.3357	0.2845	0.3635	0.3651	0.2877	0.1995	*****											
Tr2	0.2475	0.2218	0.2685	0.3786	0.3507	0.3388	0.3338	0.3555	0.3628	0.3757	0.3902	0.3722	0.3556	0.2815	0.3488	0.3576	0.2914	0.2020	0.0328	*****										
Sur	0.2741	0.1481	0.2592	0.3247	0.3598	0.3338	0.3260	0.3128	0.3617	0.3788	0.3704	0.3485	0.3319	0.2763	0.3355	0.3354	0.2418	0.1857	0.1667	0.1492	*****									
Ana11	0.2620	0.1552	0.2659	0.3065	0.3331	0.3045	0.3019	0.2870	0.3458	0.3495	0.3471	0.3325	0.3197	0.2617	0.3028	0.3038	0.2440	0.1826	0.1841	0.1672	0.0540	*****								
Ana12	0.2680	0.1277	0.2678	0.3063	0.3461	0.3251	0.3081	0.2963	0.3411	0.3631	0.3387	0.3523	0.3348	0.2715	0.3187	0.3256	0.2577	0.1851	0.1802	0.1645	0.0689	0.0401	*****							
Ana13	0.2809	0.2746	0.2127	0.2913	0.2918	0.2799	0.2621	0.2599	0.2859	0.3347	0.3416	0.3359	0.3053	0.2245	0.2979	0.2951	0.2286	0.1500	0.2208	0.2157	0.2355	0.2129	0.2100	*****						
VII3	0.3842	0.3742	0.3246	0.3904	0.3660	0.3436	0.3529	0.3591	0.3544	0.4338	0.4324	0.4242	0.4051	0.3175	0.1047	0.1080	0.3309	0.2872	0.3247	0.3346	0.3084	0.2614	0.2593	0.2592	*****					
Ana14	0.3957	0.3579	0.3147	0.1443	0.3044	0.1742	0.1748	0.1748	0.3839	0.3946	0.4033	0.3984	0.3795	0.1940	0.3613	0.3749	0.1180	0.2208	0.3218	0.3497	0.2865	0.2639	0.2771	0.2834	0.3157	*****				
Ana15	0.3358	0.2944	0.2476	0.1744	0.1547	0.1130	0.1349	0.1634	0.3244	0.3631	0.3808	0.3634	0.3323	0.1476	0.3129	0.3203	0.1454	0.1842	0.2734	0.2837	0.2678	0.2290	0.2539	0.2222	0.2836	0.0936	*****			
Ana16	0.2255	0.2275	0.2009	0.3637	0.3604	0.1935	0.3254	0.3190	0.3592	0.3814	0.3788	0.3517	0.3259	0.2800	0.3093	0.2974	0.2853	0.2384	0.3067	0.2478	0.2222	0.2517	0.2533	0.2856	0.2930	0.2504	*****			
Asq	0.3822	0.4246	0.4054	0.3820	0.4205	0.3902	0.3811	0.3809	0.4253	0.4714	0.4422	0.4455	0.4395	0.4188	0.4377	0.4425	0.3351	0.3421	0.4047	0.4086	0.3548	0.3391	0.3603	0.3330	0.3947	0.3210	0.3519	0.3097	*****	
Fas	0.4042	0.4745	0.4423	0.4229	0.4089	0.3987	0.4026	0.4089	0.4526	0.4811	0.4838	0.5007	0.5097	0.3764	0.4785	0.4669	0.3808	0.3358	0.4062	0.4148	0.4619	0.4359	0.4574	0.3875	0.4314	0.3392	0.3463	0.3936	0.2549	*****



Şekil 16. Populasyonlar arası genetik uzaklık veri matrisine dayalı oluşturulan UPGMA dendrogramı.

Tablo 4. UPGMA ile belirlenen grup içi ve gruplar arası ortalama genetik uzaklık değerleri ve grup içi en küçük ve büyük genetik uzaklık değerleri.

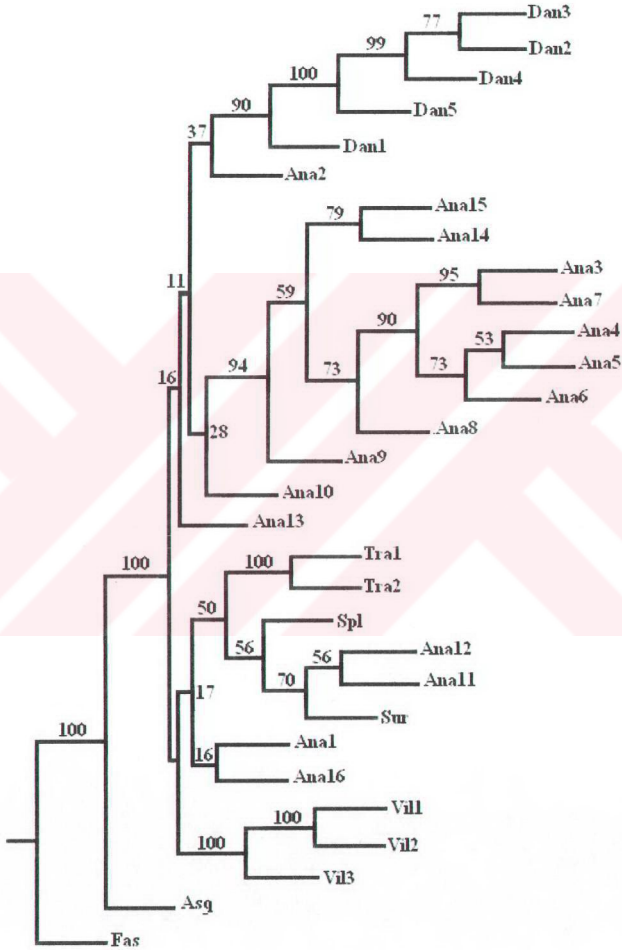
Grup	I (Kızılırmak Havzası)	II (Tuzgözü Havzası)	III (Göller Bölgesi)	IV (Haymana Havzası)
I	0.1348 (0.2849-0.0190)			
II	0.3643 (0.4259-0.2802)	0.1238 (0.2044-0.0159)		
III	0.3452 (0.4018-0.2606)	0.2940 (0.3957-0.1341)	0.2116 (0.3067-0.0328)	
IV	0.3879 (0.4338-0.3403)	0.3485 (0.4259-0.2836)	0.3349 (0.3948-0.2614)	0.0836 (0.1080-0.0381)

AFLP verileri ayrıca tutumluluk ile analiz edilmiş ve uyumluluk ağacı oluşturulmuştur (Şekil 17).

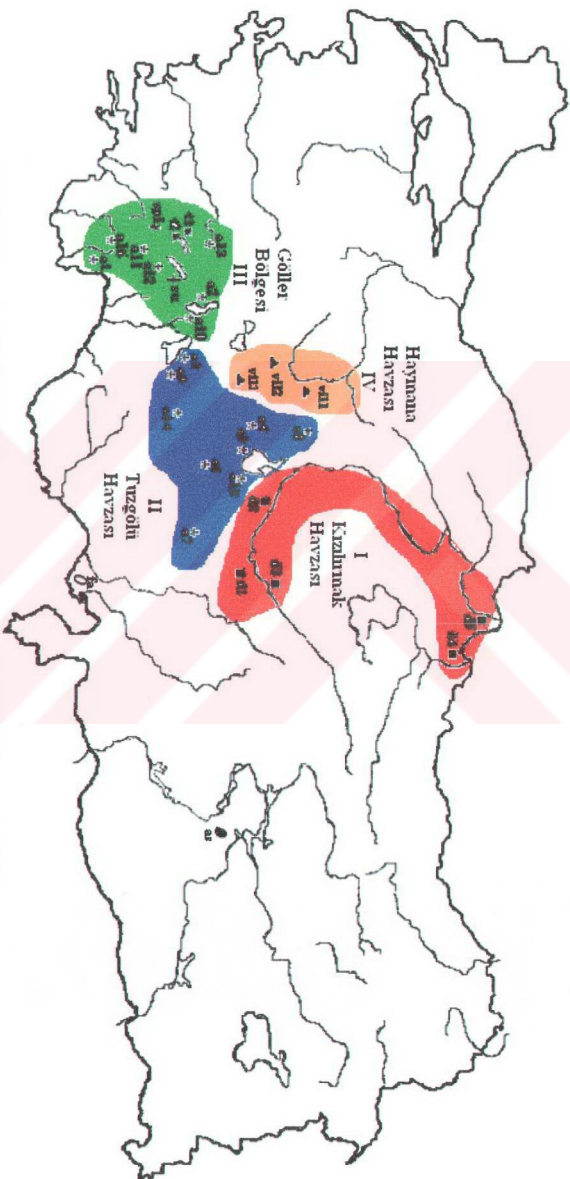
Tutumluluk analiz sonuçları, çalışılan tüm *Aphanius* popülasyonlarının *A. fasciatus* benzeri bir atasal popülasyondan geliştiklerine işaret etmektedir. Bu atasal popülasyondan *A. asquamatus* (yüzde seç-bağla değeri: %100) ve diğer Anadolu *Aphanius* türlerini veren atasal popülasyonları (%100) ayrıldığını göstermektedir.

Tutumluluk analiz sonuçları temelde genetik uzaklık analiz sonuçlarıyla uyumluluk göstermekle birlikte, bazı farklılıklar da içermektedir. UPGMA dendogramında dört grup içerisinde toplanan popülasyonlar kladogramda da aynı dört grup içerisinde yer almışlardır. Tutumluluk analizi ile oluşturulan toplam 1000 ağaçtan %90'ı I. grubu, %94'ü II. grubu, %50'si III. grubu desteklerken, %100'ü IV. grubu desteklemektedir. UPGMA dendogramında III. grup içinde yer alan *Ana2*, *Ana10* ve *Ana13* tutumluluk dendogramında farklı gruplara daha yakın konumlanmışlardır. Her üç popülasyonun da bu durumu çok az sayıda ağaç tarafından desteklenmektedir. Ayrıca *Anal* ve *Ana16* popülasyonları III. gruba bağlı olmakla birlikte ancak 1000 ağacın %17'si tarafından desteklenmektedir. Gruplar ve yayılış alanları Şekil 19'da gösterilmiştir. *Anal*, *Ana2*, *Ana10*, *Ana13*

ve *Ana16* populasyonlarının ağaç üzerindeki durumlarının az sayıda ağaç tarafından desteklenmesinden dolayı bu gruplama içerisinde yer verilmemiştir.



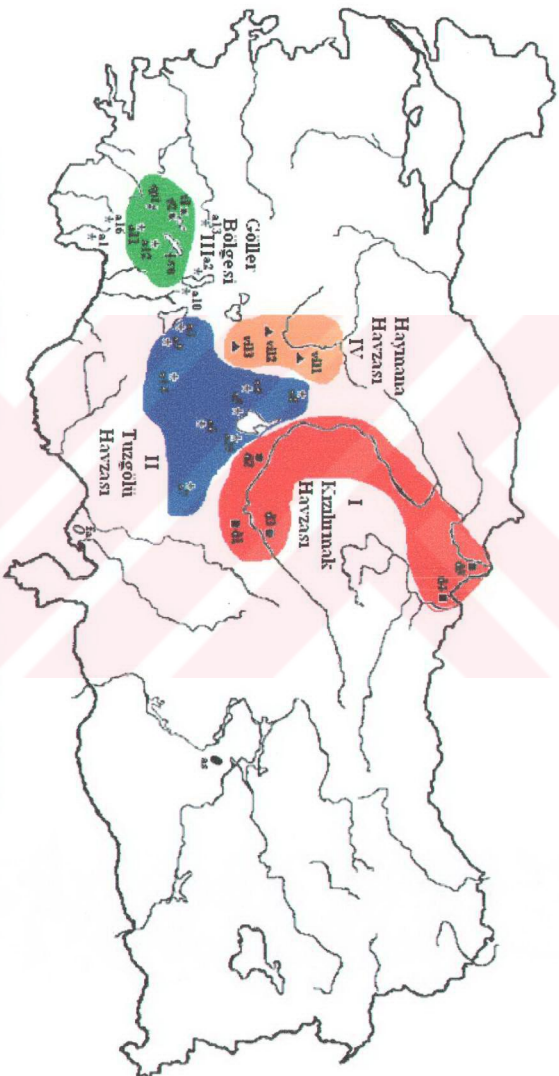
Şekil 17. Tutumluluk metodu ile oluşturulan uyumluluk ağacı. Dallar üzerinde % seç-bağla değerleri gösterilmiştir.



■ *A. danfordii* + *A. anatolicae anatolicae* ▲ *A. vilhockii* ● *A. asquamatus* ○ *A. fasciatus*

* *A. anatolicae transspedans* * *A. anatolicae splendans* + *A. anatolicae surseyanus*

Şekil 18. UPGMA dendrogramına dayanılarak oluşturulmuş *Aphanis* popülasyonlarına ait dört farklı grubun toplandıği alanlar.



■ *A. danfordi* * *A. anatolicus anatolicus* ▲ *A. silbrocki* ● *A. asquamatus* ◊ *A. fasciatus*

■ *A. anatolicus transgrediens* * *A. anatolicus splendens* † *A. anatolicus suryanus*

Şekil 19. Tutumluluk metoduyla elde edilen uyumluluk ağacına dayanılarak oluşturulmuş *Aphanius* popülasyonlarına ait dört farklı grubun toplandığı alanlar.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anadolu, *Aphanius* cinsi için bir çeşitlenme merkezidir (Wildekamp ve Ark., 1999). Tanımlanmış yaşayan 14 türe sahip *Aphanius* cinsinin, Türkiye’de 6 tür ve 4 alttürü bulunur (Hrbek vd., 2002). Orta Anadolu’da ise *A. danfordii*, *A. villwocki* ve *A. anatoliae* türleri bulunmaktadır. Ayrıca *A. anatoliae* da 4 alttür ile temsil edilmektedir. Bu çalışmada, *Aphanius* cinsinin Türkiye’de yayılış gösteren 5 tür (ikisi dış grup) ve 4 alttüründen oluşan toplam 30 populasyonun AFLP belirteçleri kullanılarak çekirdek DNA varyasyonu araştırılmıştır. AFLP veri setinin fenetik ve kladistik analiz sonuçları, önceki çalışmalar ve Türkiye’nin jeolojik gelişimiyle karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Aphanius türleri ikincil tatlı su balıkları olup, genel yayılışları dikkate alındığında Tetis Denizi reliktidirler (Kosswig, 1952; Wildekamp ve Ark., 1999; Hrbek ve Ark., 2002; Hrbek ve Meyer, 2003). Hrbek ve Meyer (2003) mutasyon oranından yararlanarak *Aphanius* cinsinin yaşını belirlemişlerdir. Mutasyon oranı, geleneksel olarak jeolojik ve fosil kayıtları kullanılarak kalibre edilmektedir. Sauvage (1874) Orta Oligosen Avrupa’sında bir *Aphanius* benzeri Cyprinodont olan *Prolebias*’ı ve Priem (1908) kuzey-batı İran’da Orumiyeh Gölü havzasındaki Orta Miyosen *Aphanius* fosillerini tanımlamışlardır (Hrbek ve Meyer, 2003). Diğer *Aphanius* benzeri balıkların Oligosen ve Miyosen ise fosilleri İspanya’da, Fransa’da ve İsviçre’de tanımlanmıştır (örneğin; Gaudant, 1978; Reichenbacher ve Weidmann, 1992; Gaudant, 1993). Buna göre, fosil kayıtlarına bakıldığında, *Aphanius* cinsinin yaşının yaklaşık 30 milyon yıl olduğu tahmin edilmektedir (Hrbek ve Meyer, 2003). Yirmi MYÖ Tetis Denizi’nin kapanması ve bunun sonucunda meydana gelen izolasyonlar, Tetis Denizi’nde yayılış gösteren, atasal *Aphanius* populasyonunun türleşme sürecine önemli bir etki yapmıştır. (Hrbek ve Meyer, 2003).

AFLP verileri kullanılarak yapılan fenetik ve kladistik analiz sonuçları, morfolojik karakterlere dayalı yapılmış sistematik çalışmalarla ortaya konulduğu gibi, Orta Anadolu *Aphanius* populasyonlarını tür ve alttür düzeyinde net bir şekilde ayırmıştır. Bazı populasyonlar hariç, dört soy hattı oluşturan Orta Anadolu *Aphanius* populasyonları monofiletik olup, muhtemelen *A. fasciatus* benzeri atasal

bir popülasyondan farklılaşmıştır. *A. danfordii*, *A. villwocki* ve *A. anatoliae* popülasyonları dört farklı coğrafik alanda yayılmışlardır. Bunlar; Kızılırmak Havzasında *A. danfordii* (I. grup), Haymana Havzasında *A. villwocki* (IV. grup), Tuzgölü Havzası (II. grup) ve Göller Bölgesi'nde (III. grup) ise *A. anatoliae*'nin 4 alttürü yayılış gösterir.

Analizler sonucunda, *A. fasciatus* (Tuzla Gölü, Adana) diğer tüm popülasyonlara dış grup, *A. asquamatus* ise (Hazar Gölü, Elazığ) kardeş grup olarak yapılanmıştır. Hrbek ve Meyer (2003) fosil ve mtDNA dizi analizi hesaplamalarına göre; *A. asquamatus*'un 23.29 ± 3.17 MYÖ, *A. fasciatus*'un ise 14.07 ± 1.63 MYÖ diğer *Aphanius* türlerinden ayrıldığını belirterek, *A. fasciatus*'un, *A. asquamatus* dahil diğer tüm *Aphanius* türlerine dış grup olduğunu göstermiştir. Bardakcı vd. (baskıda) RAPD belirteçleri ile çalıştıkları çekirdek DNA analiz sonuçlarına dayanarak dış grup olarak *A. mento*'yu göstermişlerdir. Her üç çalışmada da *A. asquamatus* ve *A. fasciatus*'un tüm Orta Anadolu popülasyonlarına dış grup olduğu belirlenmiştir.

Tutumluluk metoduyla oluşturulan toplam 1000 ağacın %90'ı I. grubu, %100'ü II. grubu, %94'ü III. grubu ve %50'si ise IV. grubu desteklemektedir. UPGMA dendogramında IV. grup içinde yer alan *Ana2*, *Ana10* ve *Ana13* tutumluluk kladogramında farklı gruplara daha yakın konumlanmışlardır. Seç-bağla testi her üç popülasyonda bu durumu çok az sayıda ağaç tarafından desteklemektedir. Ayrıca *Ana1* ve *Ana16* popülasyonları IV. gruba bağlı olmakla birlikte, ancak 1000 ağacın %17'si tarafından desteklenmiştir. Bu durum muhtemelen AFLP bant profillerinin okunması sırasındaki olası hatalardan kaynaklanmış olabilir.

Her bir grup yayılış alanları itibarıyla Anadolu'yu oluşturan dört farklı jeolojik plaka üzerinde yerleşmiştir. Villwock (1964), Kızılırmak, Orta Anadolu ve Güneybatı Anadolu, Hrbek ve Ark. (2002); Kızılırmak Havzası, Haymana Havzası, Tuzgölü Havzası, Göller Bölgesi, Büyük Menderes ve Güneybatı Anadolu kladları ve Bardakcı vd. (baskıda); Haymana Havzası, Kızılırmak Havzası ve Tuzgölü Havzası olmak üzere Anadolu *Aphanius* popülasyonlarını benzer gruplara ayırmışlardır.

Kızılırmak ve Yeşilirmak Havzası ve Sultan Sazlığı'nda bulunan *A. danfordii* monofiletik olup, Develi çöküntüsündeki volkanik dağ sırası diğer populasyonlardan izolasyonunu sağlayarak ayrı evrimleşme baskısı oluşturmuştur (Hrbek ve Meyer, 2003). Benzer durum, çalışmada IV. grup içinde yer alan *A. villwocki* populasyonu içinde geçerlidir. Kırşehir bloğunun volkanik yapılarla Tuzgölü Havzası'ndan izole olması, burada farklı bir tür olarak *A. villwocki*'nin gelişmesini sağladığı ileri sürülmüştür. Ancak, Oligosen (~30 MYÖ) döneminde gerçekleşen bu izolasyon volkanik yapıda meydana gelen erozyonla zaman zaman kırılmıştır (Hrbek ve Meyer, 2003). *A. anatoliae*, *A. villwocki* ve *A. danfordii* türleri arasında en küçük genetik uzaklık değerinin *A. anatoliae* ve *A. villwocki* arasında olması, bu durumu desteklemektedir. Çalışmada iki ayrı grup içerisinde değerlendirilen *A. anatoliae*, dört alttüre ait populasyonlardan oluşmuştur. Merkez Gölü'nün kalıntıları olan Tuzgölü, Eğirdir Gölü ve Beyşehir Gölü *A. a. anatoliae* populasyonlarının (II. grup) yayılış alanları iken, Batı Gölü'nün parçalanmasıyla oluşan Burdur Gölü, Ak Göl ve Acı Göl ise *A. a. anatoliae*, *A. a. transgrediens*, *A. a. splendens* ve *A. a. sureyanus* populasyonlarının (III. grup) yayılış alanlarıdır. Merkez ve Batı göl sistemleri, uzun bir periyot boyunca (buzul ve buzullar arası dönemlerde) zaman zaman bağlanıp-ayrılmışlardır (Kosswig, 1952; Akşiray, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp ve Ark., 1999; Hrbek ve Meyer, 2003). Bu durum, muhtemelen vikaryans yoluyla aynı türe ait farklı alttürelerin oluşmasında etkili olmuştur. Benzer şekilde günümüzde de yağışlı dönemlerde oluşan su köprüleriyle populasyonlar arasında geçişler olmakta (örneğin; Acı Gölü besleyen kaynaklardaki *A. a. transgrediens* populasyonları); kuraklık dönemlerinde ise bir kendilenme baskısı yaşanmaktadır (örneğin; Karpuzatan *A. danfordii* populasyonu) (Kosswig, 1952; Akşiray, 1952; Kosswig, 1953; Wildekamp ve Ark., 1999; Hrbek ve Meyer, 2003). Gruplar arası genetik uzaklık hesaplamalarında en küçük genetik uzaklık değerinin (0.2940) *A. anatoliae* grupları arasındadır. Bunlar aynı türün populasyonları olduğu için beklenen bir sonuçtur. Villwock (1964), tarafından yapılan hibridizasyon çalışmaları Kızılırmak Havzasında bulunan *A. danfordii*'nin Orta Anadolu ve Güneybatı Anadolu *A. anatoliae* populasyonlarından üreme bakımından izole olduğunu, bu populasyonlar arasında

ise kısmi üreme izolasyonu olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *A. villwocki* diğer Orta Anadolu *Aphanius* türlerinden üreme bakımından izole olacak kadar farklılaşmıştır (Hrbek ve Meyer, 2003; Hrbek ve Wildekamp, 2003).

A. danfordii'nin diğer kladlardan ayrılması filogenetik çözülemeye göre, tahminen 12.25 ± 0.08 MYÖ gerçekleşmiştir (Hrbek ve Meyer, 2003). Genetik uzaklık hesaplamalarından *A. danfordii* diğer bütün Orta Anadolu *Aphanius* popülasyonlarına kardeş grup olarak yerleşmişken, *A. villwocki* *A. anatoliae* alttürlerine kardeş grup olarak belirlenmiştir. Genetik uzaklık bakımından birbirine en uzak olan gruplar I. ve IV. (0.3879) grup olarak belirlenmiştir. Bu durum, Hrbek ve Meyer (2003) tarafında da ileri sürüldüğü gibi, *A. danfordii*'nin diğer Anadolu kladlarından erken dönemde izole olması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, çekirdek DNA'sı AFLP analizinin filogenetik çalışmalar için kullanışlı olduğu gösterilmiştir. Sullivan vd.'leri (2004) AFLP belirteçleri ve mtDNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılmasından AFLP analizinin filogenetik çıkarsamada mtDNA'sına göre daha hassas olduğunu ileri sürmüştür. Bu çalışmada da AFLP analizinin sonuçlarının morfolojik, hibritleme ve mtDNA analiz sonuçlarıyla genel olarak uyumludur. AFLP'de genomun değişik bölgeleri rasgele tarandığından sonuçlarının daha az hatalı olması beklenir. Bir veya birkaç gene dayalı moleküler filogenetik analizlerde genomun farklı bölgelerinin evrilme hızlarının farklı olmasından dolayı türün evrimi ve türleşme süreçleri hakkında yanlış çıkarsamalara yol açabilir. Bunun yanı sıra AFLP analizi ile aynı anda çok sayıda lokusun taranması, genom hakkında bir ön bilgiye gerek olmaması, tekrar edilebilirliği ve çok sayıda belirteç vermesi açısından diğer moleküler metodlara göre daha avantajlı sayılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Agresti, J. J.; Seki, S.; Cnaani, A.; Poompuang, S.; Halleerman, E. M.; Umiel, N.; Hulata, G.; Gall, G. A. E.; May, B., 2000.** Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*. 185: 43-56.
- Akşiray, F., 1952.** Anadolu Cyprinodontid'lerinin sistematik münasebetlerine ait genetik tetkikler. İst. Üni. Fen Fak. Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü Yayınları, Hidrobiyoloji Mecmuası. Seri A, Cilt 1, Sayı 1, 51-60.
- Arnheim ve Erlich, 1992.** Polymerase chain reaction strategy. *Assoc. Rev. Biochem.*, 61: 132-156.
- Avise, J. C., 1994.** Molecular markers, natural history and evolution. New York.
- Bachem, C. W. B.; Oomen, R. J. F. J. and Visser R. G. F., 1998.** Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 157-173.
- Bardakçı, F., Tatar, N., Hrbek, T.** Genetic relationships between Anatolian species and subspecies of *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) based on RAPD markers. (baskıda, *Biologia*)
- Başbüyük, H. H.; Bardakçı, F.; Belshaw, R.; Quicke, D. L. J., 2000.** Phylogenetic systematics, "A practical guide to theory and practice". Önder Matbaa, Sivas, Turkey. ISBN 975-93823-0-X.
- Battalgil, F., 1941.** Türkiye'nin tatlı su balıkları (Les poissons des eaux douces de la Turquie). *Rev. Fac. Sci. Istanbul, Ser. B*, 6, 170-186.
- Boulenger, G. A., 1890.** Description of two new Cyprinodontoid fish. *Annals and Magazine of Natural History* (6) 6: 169-170.
- Bozkurt, E., 2001.** Neotectonics of Turkey- a synthesis. *Geodinamica Acta* 14, 3-30.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. 1991.** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/ Technology* 9: 553-557.
- Caner, V. ve Çarlı, K. T., 2001.** Polimeraz zincir reaksiyonu (Pcr) ve bazı tavuk infeksiyonlarındaki yeri. *J. Fac. Vet. Med.* 20 (2001) 137-145.

- Cuvier, G. and Valenciennes, A., 1846.** Histoire naturelle des poissons. Tome dix-huitième. Suite du livre dix-huitième. Cyprinoïdes. Livre dix-neuvième. Des Ésoques ou Lucioïdes. Hist. Nat. Poiss. i-xix, 2 pp., 1-505, 2 pp.
- Elvira, B., 1995.** Conservation status of endemic freshwater fish in Spain. *Biological Conservation*. 72 (1995), 129-136.
- Erk'akan, F., 1981.** Sakarya havzası balıklarının (Pisces) sistematığı ve biyo-ekolojik ilişkileri üzerine araştırmalar. Hacettepe Üni. Fen Bil. Ens. (Doktora Tezi), Ankara. 68-70.
- Ermin, R., 1946.** Cyrinodontidler'de pul reduksiyonu (Schuppenreduktion bei Zahnkarpfen (Cyprinodontidae)). *Istanbul Üniv. Fen. Fak. Mecm. Seri B*, 11, 217-271.
- Erlich, H. A., 1989.** PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, USA. 1-246. ISBN:0-333-48948-9.
- Fani, R., Damiani, G., Di Serio, C., Gallari, E., Grifon, A. and Bazzicalupa, M. 1993.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Molecular Ecology* 2: 243- 250.
- Felsenstein, J. 1988.** Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22: 521-565.
- Ferris, S. D., Sage, R. D., Huang, C. M., Nielsen, J. T., Ritte, U. & Wilson, A. C. 1983.** Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 2290-2294.
- Frenkel, V. and Goren, M., 2000.** Factors affecting growth of killifish, *Aphanius dispar*, a potential biological control of mosquitoes. *Aquaculture* 184 2000 255–265.
- Garcés, M.; Krijgsman, W. and Agustí, J., 1998.** Chronology of the late Turolian deposits of the Fortuna basin (SE Spain): implications for the Messinian evolution of the eastern Betics. *Earth and Planetary Science Letters*, 163: 69–81.
- Geldiay, R. ve Bahk, S., 1988.** Türkiye tatlısu balıkları. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 1–491.

- Gervais, F. L. P., 1853.** Remarques sur les poissons fluviatiles de l'Algérie, et description de deux genres nouveaux sous les noms de Coptodon et Tellia. Ann. Sci. Nat., Paris (Zool.) (Sér. 3), 5-17.
- Görür, N.; Oktay, F. Y.; Seymen, İ. and Şengör, A. M. C., 1984.** Palaeotectonic evolution of the Tuzgölü basin complex, Central Turkey: sedimentary record of a Neo-Tethyan closure. In: The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean (J.E. Dixon & A.H.F. Robertson, eds), pp. 467–482. Geological Society Special Publication no. 17, Blackwell Scientific, Oxford.
- Heckel, J. J., 1843.** Ichthyologie. pp. 1089–1090. In: J. Russegger, Reisen in Europa, Asien und Afrika, mit besondere Rücksicht auf die naturwissenschaftliche Verhältnisse der betreffend Länder, unternommen in den Jahren 1835 bis 1841. Band I. Zweiter Theil. Reise in Griechenland, Unteregypten, im nördlichen Syrien und südöstlichen Kleinasien. E. Schweizerbart'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- Hillis, D. M. and Moritz, C., 1990.** Molecular systematics. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Hrbek, T.; Küçük, F.; Stölting, K. N.; Wildekamp, R. H.; Meyer, A., 2002.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. Molecular Phylogenetics and Evolution. 25 (2002) 125-137.
- Hrbek, T. and Meyer, A., 2003.** Closing of the Tethys Sea and the phylogeny of Eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). Journal Evolution Biology. 16 (2003) 17-36.
- Hrbek, T. and Wildekamp, R., 2003.** *Aphanius villwocki*, a new species from Sakarya River basin of central Anatolian plain, Turkey (Teleostei: Cyprinodontiformes). Ichthyol. Explor. Freshwater, 14, 2, 137-144.
- Hrbek T., Stölting K. N., Bardakçı F., Küçük F., Wildekamp R. H. Meyer, A., 2004.** Plate tectonics and biogeographical patterns of the *Pseudophoxinus* (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey. Molecular Phylogenetics and Evolution, 32: 297–308.

- Innan, H.; Terauchi, R.; Kahl, G.; Tajima, F., 1999.** A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*. 151: 1157-1164.
- İncirli, A.; Bilgiç, H.; Akaya, M. S., 2001.** Assessment of polymorphic AFLP markers in *Triticum durum* and *Aegilops* sp. *Turkish Journal of Biology*, 25, 291-299.
- Knorr, C.; Cheng, H. H.; Dodgson, J. B., 2001.** DNA cloning and sequence analysis of chicken AFLP. *Animal Genetics*. 32, 156-159.
- Kosswig, C. ve Sözer, F., 1945.** Orta Anadolu'nun yeni Cyprinodontid'leri hakkında (Nouveaux Cyprinodontides de l'Anatolie centrale). *Istanbul Üniv. Fen. Fak. Mecm. Seri B*, 10, 77-83.
- Kosswig, C., 1952.** Türkiye tatlısu balıklarının zoocoğrafyası. *İst. Üni. Fen Fak. Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü Yayınları, Hidrobiyoloji Mecmuası. Seri A, Cilt II, Sayı 1*, 3-20.
- Kosswig, C., 1953.** Über die Verwandtschaftsbeziehungen anatolischer Zahnkarpfen. *Hidrobiyoloji, İstanbul Üniv. Fen fak. Ser. B 1*, 186-198.
- Kumar, L. S., 1999.** DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*, 17: 143-182.
- Kuru, M., 1975.** Dicle-Fırat, Kura-Aras, Van Gölü ve Karadeniz Havzası tatlı sularında yaşayan balıkların (Pisces) sistematik ve zoocoğrafik yönden incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doçentlik Tezi), Erzurum*. 128-129.
- Leidenfrost, G., 1912.** Kis-âzsi ai halak (Fishes from Asia Minor). *Allattani Közlemények*, 11 (3): 130-131, figures. (Zoological Messages, Budapest).
- Leonardos, I.; Sinis, A., 1998.** Reproductive strategy of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces: Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research* 35 1998 171-181.
- Leonardos, I.; Sinis, A., 1999.** Population age and sex structure of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces: Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research* 40 (1999) 227-235.

- Li, Y., Byrne, K., Miggiano, E., Whan, V., Moore, S., Keys, S., Crocos, P., Preston, N., Lehnert, S., 2002.** Genetic mapping of the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture*, 62091, 1-14.
- Lin, J.-J.; Kuo, J.; Ma, J., 1996.** A PCR-based DNA fingerprinting technique. AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research*. Vol. 24, No. 18, 3649-3650.
- Liu, Z.; Nichols, A.; Li, P.; Dunham, R. A., 1998.** Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 258: 260-268.
- Lynch, M. and Milligan, B. G. 1994.** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91- 99.
- Maltagliati, F. and Camili, L., 2000.** Temporal genetic variation in a population of *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a brackish-water habitat at Elba Island (Italy). *Environmental Biology of Fishes.* 57: 107–112.
- Maltagliati, F.; Domenici, P.; Fosch, C. F.; Cossu, P.; Casu, M.; Castelli, A., 2003.** Small-scale morphological and genetic differentiation in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a coastal brackish-water pond and an adjacent pool in northern Sardinia. *Oceanologica Acta*, 26: 111-119.
- Mohan, M.; Nair, S.; Bhagwat, A.; Krishna, T. G.; Yano, M.; Bhatia, C. R. and Sasaki, T., 1997.** Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Review. Molecular Breeding*, 3: 87–103.
- Mueller, U. G. and Wolfenbarger, L. L., 1999.** AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE*. Vol. 14. 389-394.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp.* 51: 263-273.
- Mullis, K., Faloona, F., 1987.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase- catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* Vol. 155. 335-350.

- Nardo, J. D., 1827.** Prodrömus observationum et disquisitionum ichthyologiae Adriaticae. Giornale di Fisica, Chimica, Storia naturale, Medicine ed Arti. Pavia, Italy, 2 (10): 22-40.
- Nei, M. 1972.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. Ann. Human Genet. London 41:225-233.
- Neu, W., 1937.** Burdur Gölü'nden çıkan *Cyprinodon sureyanus* n. sp., *Cyprinodon sureyanus* n. sp., aus dem Burdur Göl. Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul 2 (2): 1-5.
- Özarslan, S., 1958.** Anadolu Cyprinodontid'lerinin akrabalık dereceleri hakkında morfolojik ve anatomik araştırmalar (Recherches anatomiques et morphologiques sur les degrés de parenté (souche) des Cyprinodontides de l'Anatolie). Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul. Ser. B. 23 (1-2): 59-117.
- Pough, F. H.; Heiser, J. B.; McFarland, W. N.; 1996.** Vertebrate life. Fourth Edition. Prentice Hall International Inc. ISBN 0-13-228727-7. 1-798.
- Rüppell, W. P. E. S., 1828.** Atlas zu der Reise im nördlichen Afrika. Fische des Rothen Meeres. Frankfurt am Main. 141 p. (Part I (1828):1-26, Pls. 1-6; Part II (1829):27-94, Pls. 7-24; Part III (1830):95-141, Pls. 25-35).
- Russell, J. R.; Fuller, J. D.; Macaulay, M.; Hatz, B. G.; Jahoor, A.; Powell, W. and Waugh, R., 1997.** Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor. Appl. Genet. 95, 714-722.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. Vol: 239, 487-491.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4:406-425.
- Sauvage, H. E., 1874.** Notice sur les poissons tertiaries del'Auvergne. Bull. Soc. Hist. Nat. 8: 171-198.

- Skelton, P., 1993.** Evolution, a biological and palaeontological approach. Addison Wesley, Harlow, England. ISBN: 0-201-54423-7.
- Slastenenko, E., 1955.** Karadeniz Havzası balıkları. Et ve Balık Kurumu Umum Müdürlüğü Yayını, 711. 704-705.
- Smith, M. L., Bruhn, J. N. And Anderson, J. B. 1992.** The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. Nature 356: 428-431.
- Sözer, F., 1942.** Türkiye Cyprinodontid'leri hakkında (Les cyprinodontides de la Turquie). Rev. Fae. Sci. Univ. Istanbul, Ser. B, 7,307-16.
- Sullivan, J. P., Lavoue, S., Arnegard, M. E. And Hopkins, C. D., 2004.** AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of African electric fish (Mormyroidea: Teleostei). Evolution, 58(4), pp. 825–841.
- Şengör, A. M. C. ve Yılmaz, Y., 1983.** Türkiye'de Tetis'in evrimi: Levha tektoniği açısından bir yaklaşım. Türkiye Jeoloji Kurumu, Yerbilimleri Özel Dizisi No. 1, 1-75.
- Tegelstrom, H. 1987.** Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to bank vole (*C. glareolus*). Journal of Molecular Evolution 24: 218-227.
- Tsukamoto, K. and Aoyama, J., 1998.** Evolution of freshwater eels of the genus *Anguilla*: a probable scenario. Environmental Biology of Fishes. 52, 139-148.
- Valenciennes, A., 1821.** Untitled section: 155–165. In: Humboldt, F.H.A. (Von) & A.J.A. de Bonpland. Recherches sur les poissons fluviatiles de l'Amérique equinoxiale. Voyage de Humboldt et Bonpland. Receueil d'observations de zoologie et d'anatomie comparée. 2. Zoologie. Livre 12. Schoell et Dufour, Paris: 145–224, plates, figures.
- Veith, M., Schmidtler, J. F., Kosuch, J. and Seitz, A., 2003.** Palaeoclimatic changes explain Anatolian mountain frog evolution: a test for alternating vicariance and dispersal events. Molecular Ecology. 12, 185–199.

- Villwock, W., 1964.** Genetische Untersuchungen an altweltlichen Zahnkarpfen der Tribus Aphaniini (Pisces: Cyprinodontidae) nach Gesichtspunkten der neuen Systematik. Zeitschrift für Geologische Systematic und Evolutionsforschung, 2: 267-382.
- Villwock, W., Scholl, A. and Krupp, F., 1983.** Zur Taxonomie, bei Fischen und Speziation des Formenkreises *Aphanius dispar* (Rüppel, 1828) und Beschreibung von *Aphanius sirhani* n. sp. (Pisces; Cyprinodontidae). Mitt. Hamb. Zool. Mus. Institute. 80: 251-277.
- Vos P.; Hogers R.; Bleeker M.; Reijans M.; van de Lee T.; Hornes M.; Frijters A.; Pot J.; Peleman J.; Kuiper M.; Zabeau, M., 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407-4414.
- Waar, K., et al., 2002.** Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. The Journal of Infectious Diseases. 185: 1121-1127.
- Wagh, R.; Bonar, N.; Baird, E.; Thomas, B.; Graner, A.; Hayes, P.; Powell, W., 1997.** Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. Mol. Gen. Genet.. 255: 311-321.
- Weisrock, D. W.; Macey, J. R.; Uğurtaş, İ. H.; Larson, A. and Papenfuss, T. J., 2001.** Molecular phylogenetics and historical biogeography among salamandrids of the “true” salamander clade: Rapid branching of numerous highly divergent lineages in *Mertensiella luschani* associated with the rise of Anatolia. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 18, No. 3, 434-448.
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, Vol. 18, No. 24, 7213-7218.
- White, T. J., Arnheim, N. and Erlich, H. A., 1989.** The polymerase chain reaction. Trends in Genetics. Vol. 5, No. 6, 185-189.
- Wildekamp, R. H.; Küçük, F.; Ünlüsayın, M.; Neer, W. V., 1999.** Species and subspecies of the genus *Aphanius* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in Turkey (Received: 1996). Turkish Journal of Zoology. 23 (1999) 23-44.

- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey S. V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22, 6531-6535.
- Yang, R.; Yeh, C. F. & Boyle, T., 1999.** Population genetic analysis POPGENE version 1.32. Ag/For Molecular Biology and Biotechnology center, University of Alberta and Center for International Forestry Research, 28 pp.



7. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı :Efkan BAĞDA.
Doğum Yeri : Iğdır
Doğum Tarihi : 14/07/1974

Öğrenim Hakkında

Lise : 1989-1992, Kurtuluş Lisesi, Ankara.
Lisans : 1993-1998, Hacettepe Üniversitesi. Fen-Ed. Fak. Biyoloji Bölümü.
Yüksek Lisans : 2001- , C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
Yabancı Dili : Almanca.

Akademik ve Mesleki Deneyimler

Eylül-2001 : 2001- C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Yüksek Lisans Öğrencisi.
Ekim-2001 : C.Ü. Fen-Ed. Fak. Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi.