



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KALKAN (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) POPULASYONLARININ
MOLEKÜLER GENETİK VE FENOTİPİK TEKNİKLERLE ANALİZİ**

Serpil KARAN

**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
EYLÜL-2015**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALKAN (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) POPULASYONLARININ
MOLEKÜLER GENETİK VE FENOTİPİK TEKNİKLERLE ANALİZİ**

Serpil KARAN

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
EYLÜL-2015**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALKAN (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) POPULASYONLARININ
MOLEKÜLER GENETİK VE FENOTİPİK TEKNİKLERLE ANALİZİ**

SERPİL KARAN

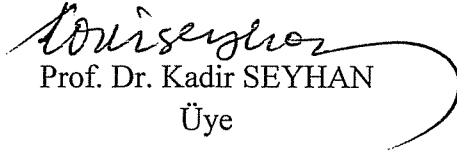
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

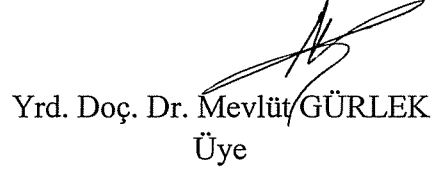
Prof. Dr. Cemal TURAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 08/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Cemal TURAN
Başkan



Prof. Dr. Kadir SEYHAN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Mevlüt GÜRLEK
Üye

Kod No:

Doç. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü v.

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

BAP Proje No: 12852

TÜBİTAK Proje No: 112 O 920

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

08/09/2015

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Serpil KARAN

ÖZET

KALKAN (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) POPULASYONLARININ MOLEKÜLER GENETİK VE FENOTİPİK TEKNİKLERLE ANALİZİ

Bu çalışmada kalkan *Scophthalmus maeoticus*'un dağılım alanını oluşturan Marmara ve Karadeniz populasyonlarının genetik ve fenotipik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Genetik analizler için nükleer DNA'ya bağlı mikrosatelite ve mitokondriyal DNA dizileme tekniği, fenotipik analizler için morfometrik ve meristik karakterler, otolit şekli ve otolit kimyası analizleri kullanılmıştır.

Mikrosatelite analizler için beş mikrosatelit lokusu kullanılmış ve tüm populasyonlarda ortalama alel sayısı 14.4 olarak bulunmuştur. *S. maeoticus* populasyonlarındaki ortalama gözlenen heterozigotluk değeri ise 0.42 olarak bulunmuştur. Populasyonların F_{ST} değerlerinin ikişerli karşılaştırılması sonucunda tüm populasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuş olup ($P<0,001$), en küçük genetik uzaklık (0.19549) Marmara Denizi ve Batı Karadeniz populasyonları arasında görülürken en büyük uzaklık (0.21755) ise Marmara Denizi ve Doğu Karadeniz populasyonları arasında görülmüştür. Populasyonlar içi genetik çeşitlilik ise en düşük Doğu Karadeniz populasyonunun (0.716082), en yüksek genetik çeşitlilik (0.748735) ise Batı Karadeniz populasyonunun olmuştur.

Mitokondriyal DNA dizi analizi sonucunda kullanılan 566 bç COI gen bölgesinin 10 bç'lik kısmı değişen bölge olup, 1 bç'lik bölge ise populasyonlar arasında parsimoni anlamlı bölge görevi görmüştür. Nükleotid kompozisyonu A= % 23.2, T=% 28.8, C= % 28.4, G= % 19.6 olarak belirlenmiştir. Tüm populasyonlar arasındaki ortalama genetik ve haplotipik çeşitlilik değerleri sırasıyla 0.00148 ve 0.6345 olarak bulunmuştur. Populasyonların genetik uzaklık değerlerinin ikişerli karşılaştırılması sonucunda sadece Marmara ve Doğu Karadeniz populasyonları arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuş olup ($P<0,001$), en küçük genetik uzaklık (0.001416) Doğu ve Batı Karadeniz populasyonları arasında görülürken en büyük uzaklık (0.001593) ise Marmara Denizi ve Doğu Karadeniz populasyonları arasında görülmüştür.

Morfometrik ve meristik karakterlerin kümeler arası korelasyon analizinde sadece Doğu Karadeniz populasyonu diğer populasyonlardan farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Otolit morfolojisinin kümeler arası korelasyon analizinde sadece Doğu Karadeniz populasyonunun diğer populasyonlardan farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir.

Otolit kimyasında Na, Ba, Mn, Sr, Ca, Zn, Mg, Fe ve K elementleri incelenmiş ve kümeler arası korelasyon analizinde tüm populasyonların birbirlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

2015, 59 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Scophthalmus maeoticus*, mikrosatelite, DNA dizileme, morfoloji, otolit kimya

ABSTRACT

MOLECULAR GENETIC and PHENOTYPIC ANALYSIS OF TURBOT POPULATIONS *Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1814

In this study, population structure of turbot *Scophthalmus maeoticus* were investigated with distributional range comprising the Marmara and Black Seas using genetic and morphological markers. Microsatellites as a nuclear DNA marker and COI gen as a mitochondrial DNA marker were used for genetic analysis. Morphometrics characters, meristics characters, otolith shape and otolith chemistry were applied for the phenotypic analysis.

Five microsatellite loci were used, and the mean number of alleles was 14.4. The mean observed heterozygosity were 0.42. The pairwise comparison of F_{ST} values were statistically significant ($P < 0,001$) between all populations, and the smallest genetic distance (0.19549) was observed between the Marmara and West Black Seas populations, and the highest genetic distance (0.21755) was observed between the Marmara and East Black Seas populations. The lowest (0.716082) and highest (0.748735) genetic diversity within populations was found in the East Black Sea and West Black Sea populations, respectively.

Mitochondrial DNA sequencing of COI region revealed 10 bp variable and 1 bp parsimony informative sites between populations. The nucleotide composition was A= 23,2 %, T= 28.8 %, C=28.4 %, G=19.6 %. The overall genetic and haplotype diversities were 0.00148 and 0.6345, respectively. The smallest (0.001416) and highest (0.001593) genetic distance was observed between East and West Black Seas and Marmara and East Black Seas populations, respectively. The pairwise comparison of genetic distance were statistically significant ($P < 0,001$) only between the Marmara and East Black Seas populations.

Discriminant function analysis of morphometric and meristic characters showed that only East Black Sea population was completely different from the other populations.

Similarly, discriminant function analysis of the otolith shape showed that only East Black Sea populations completely different from the other populations.

In otolith chemistry analysis, Na, Ba, Mn, Sr, Ca, Zn, Mg, Fe and K elements were used and discriminant function analysis revealed that all populations were completely different from each other.

2015, 59 pages

Key words: *Scophthalmus maeoticus*, microsatellite, DNA sequencing, morphology, otolith chemistry

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında büyük bir titizlik ve özveriyle sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cemal TURAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında katkılarını esirgemeyen hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mevlüt GÜRLEK ve Doç. Dr. Deniz ERGÜDEN'e, doktora öğrencisi arkadaşım Ali UYAN'a, yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Servet Ahmet DOĞDU ve Mehmet Nur GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve tez çalışmam süresince manevi desteklerini esirgemeyen annem ve babama çok teşekkür ederim.

112 O 920 numaralı TÜBİTAK ve 12852 numaralı BAP projeleriyle gerekli teçhizatı, kimyasalları ve malzemeleri temin etmemizi sağlayan TÜBİTAK ve M.K.Ü. BAP'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Taksonomik Sınıflandırma.....	9
3.1.2. <i>S. maoticus</i> 'un Diğer Kalkan Türlerinden Ayıran Özellikler.....	9
3.1.3. Örneklem Bölgesi.....	11
3.1.4. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Örneklerin Elde Edilmesi ve Korunması.....	12
3.2.2. Moleküler Genetik Analizler.....	13
3.2.2.1. DNA'nın Ekstrakte Edilmesi.....	13
3.2.2.2. DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi.....	13
3.2.3. Genetik Verilerin Analizi.....	16
3.2.3.1. Mikrosatellite Verilerinin Analizi.....	16
3.2.3.2. Mitokondriyal DNA Dizin Verilerinin Analizi.....	17
3.2.4. Morfolojik İnceleme.....	17
3.2.4.1. Morfometrik ve meristik.....	17
3.2.4.2. Otolit Şekil.....	19
3.2.4.3. Otolit kimyası.....	20
3.2.5. Morfolojik Verilerin Analizi.....	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	22
4.1. Genetik Bulgular.....	22
4.1.1. Mikrosatellite Bulguları.....	22
4.1.2. Mitokondriyal DNA Dizileme Bulguları.....	29
4.2. Morfolojik Bulgular.....	33
4.2.1. Morfometrik ve Meristik Bulgular.....	33
4.2.2. Otolit Şekil Analizi Bulguları.....	39
4.2.3. Otolit Kimya Analizi Bulguları.....	44
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Scophtalmus maeoticus</i> ' un ön görüntüsü	10
Şekil 3.2. <i>Scophtalmus maeoticus</i> ' un arka görüntüsü.....	10
Şekil 3.3. Kalkan (<i>Scophtalmus maeoticus</i>)'un örnekleme alanları	11
Şekil 3.4. DNA ekstraksiyonu sonrası DNA' nın agaroz jel görüntüsü.....	14
Şekil 3.5. PCR sonrası elde edilen PCR ürününün agaroz jel üzerinde kontrolü	15
Şekil 3.6. DNA dizin analizi sonucu elde edilen COI geninin BioEdit programı ile incelenmesi ve edit edilmesi işlemi	17
Şekil 3.7. <i>S.maeoticus</i> ' un morfometrik ölçümleri	19
Şekil 3.8. <i>S. maeoticus</i> otolitinde belirlenen 6 anahtar nokta ve bu noktalar arasında oluşturulan ölçüm uzunlukları	20
Şekil 4.1. 3/9-CA15 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi	22
Şekil 4.2. B12-I-GT14 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi	23
Şekil 4.3. SMA1 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi	23
Şekil 4.4. SMA02 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi ..	24
Şekil 4.5. SMA3 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi	24
Şekil 4.6. Mikrosatellit lokuslarının F_{ST} değerleri komşu kalıtmımlı soyağacı (Neighbour Joining tree) ve nodların güvenilirliğini gösteren seç-bağla (bootstrap) değerleri soyağacı üzerinde gösterilmiştir.	29
Şekil 4.7. Komşu kalıtmımlı soyağacı (Neighbour Joining tree) ve nodların güvenilirliğini gösteren seç-bağla (bootstrap) değerleri soyağacı üzerinde gösterilmiştir.....	32
Şekil 4.8. Ana bileşenler analizi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin ana bileşenlere göre dağılımı.....	37
Şekil 4.9. Ana bileşenler analizi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin ana bileşenlere göre dağılımı.....	41
Şekil 4.10. Ana bileşenler analizi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin ana bileşenlere göre dağılımı.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kalkan (<i>Scophthalmus maeoticus</i>)'un populasyonlara göre örnekleme bilgileri.....	11
Çizelge 4.1. Her bir lokusa ait gözlenen alel sayısı, gözlenen heterozigotluk, beklenen heterozigotluk değerleri	25
Çizelge 4.2. <i>S. maeoticus</i> populasyonları arasında beş mikrosatelit lokusu için tanımlayıcı istatistikler.....	27
Çizelge 4.3. Alt diyagonal populasyonların karşılıklı FST değerleri, koyu renk yazılmış değerler ise populasyonlar içi FST değerleri.....	28
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan 566 baz çifti uzunluğundaki COI geninin ortalama nükleotid kompozisyonu (%).....	29
Çizelge 4.5. Substitüsyon matrisi.....	30
Çizelge 4.6. Populasyonlar içi ortalama genetik çeşitlilik	30
Çizelge 4.7. <i>S. maeoticus</i> populasyonlarındaki COI haplotiplerinin frekansları ve popuasyonlara göre dağılımı.....	31
Çizelge 4.8. Populasyonlar arası karşılaştırmalı genetik farklılık değerleri.	32
Çizelge 4.9. Tajima nötralite testi (Tajima, 1989)	33
Çizelge 4.10. Populasyonların ayırımında kullanılan meristik karakterler ve minimum-maksimum değerleri	33
Çizelge 4.11. ABA sonucu varyansların AB'lere dağılımı.....	35
Çizelge 4.12. Morfometrik ve meristik karakterlerin etkinlik derecelerine göre, ana bileşenler analizi (ABA) sonucu sıralanışı.	36
Çizelge 4.13. Kümelerarası korelasyon analizi (KKA) değerleri	37
Çizelge 4.14. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi	38
Çizelge 4.15. Morfometrik ve meristik karakterlerin ayrışım analizi sonucunda her bir gruptaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılmasıI	
Çizelge 4.16. ABA sonucu varyansların AB'lere dağılımı.....	40
Çizelge 4.17. Ana bileşenler analizi sonucu stokları birbirinden ayırt etmede rol oynayan otolit ölçümleri	40
Çizelge 4.18. Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre otolit ölçümlerinin etkinlik derecesine göre gösterilmesi.....	42
Çizelge 4.19. Kümelerarası korelasyon analizi (KKA) değerleri	42
Çizelge 4.20. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi	43
Çizelge 4.21. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi	43
Çizelge 4.22. Otolit ölçümlerinin ayrışım analizi sonucunda her bir gruptaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması.....I	
Çizelge 4.23. Element analizi sonucu gözlenen ortalama ve standart sapma değerleri. .45	
Çizelge 4.24. ABA sonucu varyansların AB'lere dağılımı.....	46
Çizelge 4.25. Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre otolit elementlerinin etkinlik dercesine göre gösterilmesi	47
Çizelge 4.26. Kümelerarası korelasyon analizi (KKA) değerleri	47

Çizelge 4.27. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi	48
Çizelge 4.28. Elementlerin ayrışım analizi sonucunda her bir gruptaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması	I

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

G	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mA	: Mili Amper
µl	: Mikrolitre
A	: Adenin
C	: Sitozin
G	: Guanin
T	: Timin

KISALTMALAR

bç	: Baz çifti
kb	: Kilo baz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
COI	: Sitokrom c Oksidaz Subunit 1
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TE	: Tris-EDTA

1. GİRİŞ

İçinde bulunduğumuz yüzyılda, pek çok canlı türü, biz insanların doğayı son derece düşüncesizce kullanması sonucunda varlığını sürdürememiş ya da sürdürebilmek için direnmektedir. Canlılar, yaşadıkları ortamda insanların doğayı kötü kullanmasından kaynaklanan yapay seleksiyona maruz kalmakta ve bu tip seleksiyon baskılarına sadece genetik olarak güçlü populasyonlar karşı koyabilmektedir. Genetik olarak güçlü populasyonların varlığını sürdürmesi, ancak populasyonların gen havuzlarının korunmasıyla mümkün olabilir. Populasyonlar arasında meydana gelen göç yani gen alışverişi populasyonlar arasında meydana gelebilecek genetik farklılıkların ortadan kalkmasını sağlar. Yani bir populasyona göç ile katılan bireyler, bu populasyonun gen havuzuna yeni allellerin katılmasını, var olan allellerin ve genotipin korunmasını sağlar (Turan, 2000a).

Populasyon genetiği çalışmaları genel olarak populasyonlar arasında meydana gelen alel frekans değişiklikleri ve populasyonlar arasında meydana gelen göç olaylarının tespitine yöneliktir. Bu tespitin önemi, diğer populasyondan göç alarak taşıdığı genetik çeşitliliği her zaman sürdürebilen populasyonların, göç almayan populasyonlardan farklı olarak, doğada karşılaşılabilecekleri zorluklara karşı daha dirençli genetik yapıları içerisinde barındırdıklarının bilinmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca genetik çeşitlilikte meydana gelen azalmalar bir populasyonun suni veya doğal yolla çevrede meydana gelen değişmelere karşı daha zor adapte olmasına neden olabilmektedir. Bu durum, şiddetli populasyon dalgalanmalarına sebep olabilmekte ve o populasyonun yok olmasıyla sonuçlanabilmektedir. Bundan dolayı mevcut olan genetik çeşitlilik, adaptasyona dayanan evrimsel değişiklik için hayati bir rol oynamaktadır (Turan, 2000a). Bu sebeplerden yola çıkarak denizlerde bulunan canlı populasyonları arasında herhangi bir sebepten genetik değişiklik varsa bunun tespit edilmesi o populasyonların devamlılığının sağlanması için hayati önem taşımaktadır (Carvalho ve Hauser, 1994).

Populasyonlardan sürekli ürün alınabilmesi için populasyonları koruması gereken balıkçılık idarecileri, genellikle avcılığı yapılan balık miktarı ve bunun ekonomiye olan katkısı gibi kısa dönemli planlamalar yapmaktadır. Halbuki balıkçılık genetikçileri, gelecekte de mevcut olabilmeleri için stokların uzun dönemde adaptasyon kabiliyetleri ile ilgilenmektedirler. Balıkçılık idarecileri genellikle genetik değişimin

çok uzun zaman zarfında yani evrimsel süreçle gerçekleştiğini ileri sürmektedirler. Oysa genetik değişim, kuvvetli seleksiyon baskıları ve genetik kayma yoluyla birkaç yıl gibi kısa zaman zarflarında gerçekleşebilmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi balıkçılık idarecileri ve populasyon genetikçileri arasında aktif bir iletişim olmalıdır. Bu iletişim doğrultusunda ekonomik ve biyolojik devamlılığı sağlamak için asgari tedbirlerin ne olacağına karar verilmeli ve koruma amacıyla anahtar populasyonlar tespit edilmelidir (Turan, 2000a).

Populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin tespit edilmesi ile ilgili çalışmalar, protein elektroforezi, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), tek nükleotid polimorfizmi (SNP), Mikrosatelit ve DNA dizin analizi (DNA sequencing) gibi metotlarla gerçekleştirilmektedir.

Kalkan balığı ülkemizde ve dünyada ekonomik açıdan önemli bir türdür. Actinopterygii sınıfı, Pleuronectiformes takımı ve Scophthalmidae familyasına aittir. Kalkan balığı türleri, Atlantik'in Avrupa ve Kuzeybatı Afrika kıyıları boyunca, özellikle Kuzey Denizi ve Akdeniz'de dağılım göstermektedir (Fischer ve ark., 1987). Denizlerimizde kalkan familyasının; *Scophthalmus maeoticus*, *Scophthalmus maximus*, *Scophthalmus rhombus*, *Lepidorhombus boscii*, *Lepidorhombus whiffiagonis* ve *Zeugopterus regius* olmak üzere 6 türü bulunmaktadır (Turan ve ark., 2007).

Bu çalışmada ekonomik değeri olan, ülkemizde ve dünyada şimdiye kadar populasyon genetiği çalışması bulunmayan *Scophthalmus maeoticus* populasyonlarının Nükleer DNA'ya bağlı mikrosatelite ve mtDNA dizileme teknikleri ile populasyonlar arasındaki genetik ilişkinin derecesinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Genetik çalışmaların yanında populasyonlar morfolojik olarak da incelenecektir. Morfolojik olarak her bir bireyden morfometrik ve meristik ölçümler alınacaktır (Turan, 1999; Turan ve Başusta, 2001). Bunun yanı sıra populasyon çalışmalarında giderek yaygınlaşan otolit kimyası ve şekil analizi tekniklerinden de faydalanılacaktır (Turan ve Yağlıoğlu, 2010). Bu sayede eğer varsa populasyonlar arasındaki morfolojik farklılıkların genetik dayanağının olup olmadığı ortaya çıkartılacaktır

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Campana ve Casselman (1993), otolit şeklinin stok ayırımında belirleyici olduğu hipotezini test etmek amacıyla yaptıkları çalışmada Atlantik morinası (*Gadus morhua*)’dan aldıkları otolitlerin şekil analizini fourier analizini kullanarak belirlemişler ve otolit alan ve çevre ölçümlerini de bir araya getirmişlerdir. Morina örneklerinin çoğu arasında otolit şeklinin çok önemli farklılıklar göstermiştir. Sagittal otolitlerin lapılar ve yıldız otolitlerden biraz daha iyi stok ayrımcılığı sağladığını gözlemlemişlerdir.

Bouza ve ark. (1997), yaptıkları çalışmada 8 yetiştiricilik ve 3 doğal kalkan (*Scophthalmus maximus*) populasyonunun genetik çeşitliliğini 35 enzimatik lokus kullanarak elektroforetik analiz ile incelemişlerdir. Sonucu diğer yassı balık türleri ile karşılaştırıldığında kalkanın doğal populasyonlarının düşük genetik çeşitlilik gösterdiğini bulmuşlardır ($H_t=0,029 \pm 0,013$).

Coughlan ve ark. (1998), kalkan (*S. maximus*) ‘nın kuluçka yetiştirmenin genetik varyasyona etkilerininini araştırmak için İrlanda ve Norveç’ten 2 doğal populasyon ve 2 yetiştiricilik populasyonundan gelen örnekleri üç polimorfik mikrosatellite lokusu kullanarak çalışmışlar. İrlanda yetiştiricilik örneklerinde nadir görülen önemli bir alel kaybı gözlemlenmesine rağmen istatistiksel olarak doğal populasyonlara oranla ortalama daha fazla heterozigotluk veya alel çeşitliliği bulunmuştur. Her iki ülkeden doğal ve yetiştiricilik populasyonları arasında önemli bir genetik heterojenlik bulunmasına rağmen iki doğal populasyon arasında ilişki saptanmamıştır. Yetiştiricilik populasyonları arasındaki genetik farklılaşmanın kuluçkahaneler arası sürüklenmenin neden olduğu düşünülmüştür.

Avşar (1999), Güneydoğu Karadeniz’deki kalkan balığı (*S. maximus*) stoklarının durumunu belirlemek amacıyla Nisan, Eylül 1990 ve Eylül-Ekim 1991 tarihleri arasında çalışma yapmıştır. Her iki cinsiyetin yaş-boy verisini kullanarak populasyon parametrelerinden boy-ağırlık ilişkisini, $W=0.0085*L^{3.18}$; V.Bertalanffy büyüme sabitlerini, $L = 825.7$ (mm), $K=0.17$ (yıl⁻¹), $t_0 = -0.93$ yıl, $W = 10590.43$ (g); toplam ölümlerin üssi katsayısını ve bileşenlerini, $Z=0.48$, $M=0.30$ ve $F=0.18$ olarak tahmin etmiştir. Araştırma bölgesindeki 0-100 m derinlik katmanında bulunan kalkanların Eylül-Ekim 1991 tarihleri arasındaki mevcut biyokütlesinin 407.6 ton olduğunu ve bu stoktan $E=0.37$ ’lik bir yararlanma oranı ile az yararlanıldığını saptamıştır.

Turan (2000b), fenotipik belirteçler olan otolit şekil ve meristik karakterleri Kuzeydoğu Atlantik Ringa Balığı popülasyonlarının morfolojik yapısını incelemek ve popülasyonları ayırt etmek için otolit şeklinde truss yöntemini kullanmıştır.

Suzuki ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada Karadeniz'deki kalkan *Psetta maxima*'nın yaş ve boy ilişkisini belirlemek için Trabzon'dan kıyı balıkçılığıyla ve Trabzon Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü tarafından Aralık 1997 ve Temmuz 1999'da trol ağıyla yakalanan örnekleri incelemiştir. İnceleme için uygun olan 641 çift otolit kullanmışlardır. Otolitlerin yaş halkalarını sayarak halka yarıçaplarını ölçmüşlerdir. Aralarındaki ilişkinin hesaplanması için standart boy (cm) L_t ; yaş t (yıl⁻¹) Bertalanffy büyüme sabitlerini kullanarak dişi ve erkek için $L_t=54.8\{1-e^{-0.481(t + 0.011)}\}$ ve $L_t=45.0\{1-e^{-0.597(t+0.011)}\}$ temsil edilmiştir.

Turan ve Aka (2003), Marmara ve Kuzeydoğu Akdeniz'de bulunan bakalyaro, *Merluccius merluccius*, popülasyonlarının farklılıkları otolit şekil analizi ile araştırmışlardır. Bu amaçla her bir denizden temsili olarak örnekler toplamışlar ve otolitler üzerinde ölçümler alarak, stoklar arasındaki farklılık, Kümeler Arası Korelasyon Analizi (KAKA) ve Ana Bileşenler Analizi (ABA) kullanarak incelemiştir. Ana bileşenler analizi sonucu toplam varyansın %35'i birinci ana bileşende, % 26'sı ise ikinci ana bileşende toplanmıştır. Ana bileşenler analizi sonucu stokları birbirinden ayırt etmede rol oynayan otolit ölçümleri önemlilik derecelerine göre sıralandığında en önemli otolit ölçümlerini 1*2 ve 2*4 olarak, kümeler arası korelasyon analizi sonucunda kendi grubuna doğru olarak sınıflandırılan bireylerin sayısı % 87,5 olarak yüksek bulmuşlardır.

Turan ve Gürlek (2003), Akdenizde bulunan ve ekonomik değeri yüksek olan barbunya türünün (*Upeneus moluccensis*, *Upeneus pori*, *Mullus barbatus* ve *Mullus surmuletus*) taksonomik ilişkilerini otolit şekil analizi ile araştırmışlardır. Bu amaçla kümelerarası korelasyon analizi ve ana bileşenler analizini kullanmışlardır. Sonuç olarak otolit şekil analizi türleri birbirinden ayırt etmede başarılı olmuş, türlerin birbirleri ile olan ilişkisi açısından *U. pori* en farklı tür olarak görülmüştür.

Rooker ve ark. (2003), çiftlikten geldiği varsayılan Atlantik mavi yüzgeçli orkinosu (*Thunnus thynnus*)' nun yavru bireylerini ayırt etmek için doğal etiket olan otolitlerin, kimyasal analizini kullanmışlardır. Bu amaçla altı element (Li, Mg, Ca, Mn, Sr ve Ba) tüm otolitler plazma kütle spektrometresi kullanılarak ölçülmüştür. Otolit

kimyası sonuçları çiftlikten gelen yavru bireylerin *T. thynnus* stoklarına göre farklı bulgular gösterdiğini değerlendirmişlerdir.

Nielsen ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada Kuzeydoğu Atlantik'te bulunan kalkan (*Scophthalmus maximus* L.)'nin genetik populasyon yapısını 8 değişkenli mikrosatelite lokusu kullanarak araştırmışlardır. Hibrid bölgelerinin, Kuzey Denizi ve Baltık Denizi arasındaki geçiş bölgesinde deniz balıkları için ortak bir olgu olduğunu göstermiştir.

Clark ve ark. (2004) Atlantik mavi yüzgeçli orkinos (*Thunnus thynnus thynnus*) için yirmi beş mikrosatelite karakterize etmişlerdir. 25 mikrosatellitlerin tümünde polimorfik olduğunu bildirmişler ve Doğu ve Kuzey batı Atlantik'te mavi yüzgeçli orkinos türü aşırı sömürülmekte olduğunu ve bunun da stok yapılarında büyük değişikliklere neden olabileceğini bildirmektedirler. Mikrosatellitler stok yapılarının ve populasyon yapılarının tahmininde kullanılmasında büyük yararları olacağını vurgulamışlardır.

Samsun (2004), Kalkan balığı avcılığında en önemli bölgelerden biri olan Sinop Bölgesi'nde 2001 yılında avlanan 201 adet kalkan (*S. maeoticus*) balığının biyolojik ve morfolojik özelliklerinin belirlenerek, literatür bilgileriyle karşılaştırılması amacıyla bir araştırmaya yapmıştır. İncelenen kalkan balıklarının yüzgeç ışın sayıları; Sırt Yüzgeci (D):59-68 adet, Karın Yüzgeci (A): 44-51 adet, Göğüs Yüzgeci (P):10-13 adet, Kuyruk Yüzgeci (C):14-16 adet ve Pelvik Yüzgeç (V): 4-7 adet olarak belirlenmiştir. Balıklarda 4 adet olan solungaç lamellerindeki diken sayıları 14-17 / 10-14 / 7-11 / 5-7 olarak sayılmıştır. Yaklaşık 1,5 cm olan düğme çaplarının büyük çoğunlukla göz çapına eşit ya da büyük olduğu, sırt (11-118) ve karın (3-206) kısımlarındaki düğme sayılarının çok değişken olup karın kısmında çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Karadeniz'de yapılan çalışmalarda kalkan balığı için farklı isimler kullanılmıştır. Bu çalışma sonunda elde edilen bilgilere göre; *S. maeoticus*'un, yüzgeç ışınları ve solungaç dikenini sayısı, vücudun her iki tarafında düğmelerin bulunması, morfolojik farklılık ve Karadeniz'e özgü olması sebebiyle, tür ismi olarak *S. maeoticus* kullanılmasının daha uygun olacağını söylemiştir.

Suzuki ve ark. (2004), mitokondriyal DNA analizi kullanarak genetik olarak iki ana farklı soydan oluşan Batı Akdeniz ve Doğu Akdeniz havzalarındaki kalkan (*Psetta maxima*)'ı araştırmışlardır. İkinci soy içinde, en çok haplotip Azak Denizi'nden

endemik ve bunların yarısından daha fazla tek bir atasal soydan türetilen haplotipi tüm Doğu Akdeniz alanlarında bulmuşlardır. Mitokondriyal soy ve kemikli tüberküller arasında morfolojik varyasyon ilişkisini saptamamışlardır.

Liu ve ark. (2006), çalışmalarında kalkan (*S. maximus*)'nın rastgele çoğaltılmış DNA ürününden izole edilmiş 5 polimorfik mikrosatelite lokusunu kullanmışlardır. Dizayn edilen 12 mikrosatelite primerin 5 çifti çalışıp polimorfik özellik göstermiştir ve bunlar 4 ve 9 allel arasında bulunmuştur. Heterozigotluğu sırasıyla; 0.76-0.90 ve 0.63-0.83 değiştiğini gözlemlemişler. İlave 5 balık türünün çapraz-türler amplifikasyonu sırasında tür başına pozitif amplifikasyonları bir ve üç arasında, polimorfik lokusun sıfır ve iki arasında ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Zengin ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada Karadeniz balığı kalkan (*Psetta maxima*)'nın yaş ve büyümesini tespit etmek için 1990 ve 1996 yıllarını arasında Doğu Karadeniz kıyıları boyunca toplamda 1445 birey toplamışlardır. Yaşlar büyüme halkalarından ve kırık sagittal otolitlerden tahmin edilmiştir. Marjinal artışı analizi net bir şekilde tek bir halkanın her yıl yaz başında oluşturulmuş olduğunu göstermiştir. Uzunlukta büyümenin cinsiyetler arasında farklılık gösterdiği ve aynı yaştaki dişilerin erkekler göre daha büyüdüğü görülmüştür. Uzunluk-Yaş verileri, The von Bertalanffy büyüme parametrelerine göre tüm popülasyon için; $L_{\infty} = 96.24$ cm $K = 0.119$ year⁻¹; $t_0 = -0.01$ bulmuşlardır.

Samsun ve Samsun (2006), yaptıkları çalışmada kalkan (*S. maeoticus*) balıklarının yaş dağılımının 2-11 arasında değiştiğini, 4. ve 5. yaş grupları genelin yaklaşık %54'ünü oluşturduğunu belirlemişlerdir. Alttaki (kör taraf) otolitlerin merkezinin otolit tam ortasında düzgün bir şekilde konduğu, üsttekinde (gözlü taraf) ise merkezin kenara yakın bir yerde bulunduğu ve bunlardaki yaş halkalarının sıkışık ve düzensiz olduğu saptanmıştır. Genel olarak alt ve üst otolit uzunlukları sırasıyla 0,66±0,009 cm ve 0,71±0,011 cm, ağırlıkları ise 0,0489±0,003 g ve 0,0459±0,002 g olarak belirlenmiştir. Balık uzunluğu ile otolit uzunlukları ve ortalama otolit ağırlığı ile yaş arasında yüksek korelasyonlu doğrusal ilişkiler belirlenmiştir.

Turan (2006), yaptığı çalışmada, Akdeniz istavriti (*Trachurus mediterraneus*)'nin Karadeniz, Marmara, Ege Denizi ve Doğu Akdeniz popülasyonlarını ayırt etmek için otolit şekil ve kimyasını kullanmışlardır. Otolit şekil ve kimyası analizlerinde Orta

Karadeniz (Sinop) ve Ege Denizi (İzmir) örneklerinin net bir ayrılıkla Akdeniz stoklarının arasındaki benzer bir farklılaşma göstermiştir.

Merigot ve ark. (2007), *Solea solea* (Linnaeus, 1758) üzerinden Kuzeybatı Akdeniz’deki tüm dil balığı popülasyonlarını ayırt etmek için otolit analizinden yararlanmışlardır. Morfolojik analizler sırasında sağ ve sol otolitler arasında önemli bir asimetri dikkat çekmiştir. Çalışma sonucunda Kuzeybatı Akdenizde birkaç yerel dil balığı popülasyonunun varlığını bulmuşlardır.

Espineira ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada yassı balık türlerinin genetik bilgilerinin tanımlanması için bir teknik geliştirmişlerdir. Teknik PZR ile ampfilike edilmiş DNA ve daha sonrasında DNA dizileme ile filogenetik analize dayanmaktadır. Sitokrom oksidaz alt birimini (COI) kullanılarak filogenetik ağaç elde etmişler ve bootstrap değerlerini hesaplamışlardır.

Ruan ve ark. (2010), kalkan balığının (*Scophthalmus maximus* L.) genetik bağlantı haritaları, “double pseudo testcross” stratejisi kullanılarak 158 mikrosatelit markırı oluşturulmuşlardır. Ebeveynler ve F₁ soyu (100 birey) popülasyonların ayrılmasında kullanılmıştır. 21 ve 30 genetik bağ gruplarının dişi ve erkek haritaları ayrı ayrı tanımlanmıştır. 110 lokus ve 721,7 cm yayılmış erkek bağlantı haritaları ile ortalama 9 cm intermarker aralığı oluşturulmuştur. Buna rağmen dişi haritası 110 loci oluşan ve 919,1 cm yayılmış ve ortalama 12,9 cm intermarker aralığı oluşturulmuştur. Bağlantı haritalarının yaklaşık kapsama erkek için %63,5, dişi için %54,2 olduğu saptanmıştır. Paylaşılan belirteçler için erkek: dişi rekombinasyon oranları 1:1,3 olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada kalkan balığının ikinci mikrosatelit genetik bağ haritası temsil etmektedir. Ek olarak, önemli ekonomik özelliklerin niceliksel lokus haritalaması yapılmışlardır. Erkek bağlantı grubu 7 de QTL ile Kalkan vücut uzunluğunun muhtemel ilişkisini saptamışlar. Bu QTL’ nin kalkan moleküler çalışmalarında marker seçimlerinde faydalı olacağı belirtmişler.

Ruan ve ark. (2011), kalkan (*S. maximus*)’nun tüm genomundan büyük ölçekli izolasyonu için koloni hibridizasyon stratejisi, mikrosatelit zenginleştirme kütüphaneleri yapımında kullanılmıştır. Kalkanın tüm genom çapındaki farklı nükleotid birimlerinin ayrıntılı analizi yapıldığında en sık bulunan mononükleotid tipi bulunurken, dinükleotid ünitesi 6 tekrarlama birimi türleri arasında baskın tekrar birimi olduğu belirlenmiştir. AGG (126,11) motifi değişimi 126,11 değerinin katsayısı ile bu

araştırmada en değişken tekrar birimi şekli olmuşuğunu göstererek, tekrar birimlerinin uzunluğu ve ortalama kopya sayısı arasındaki negatif korelasyon ($r = -0.5$, $p = 0.072$) olduğunu tespit etmişlerdir.

Atanassov ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada Batı Karadeniz kıyı alanının Kuzey Bulgrasitan ve Kuzey Romanya bölgelerinden 76 kalkan örneğini mitokondriyal kontrol bölgesi /CR/ ile karakterize etmişlerdir. Toplamda 36 haplotip tespit etmişlerdir. Bu 27 haplotipiten yeni olan 9 haplotipin daha önce rapor edilen Pmax haplotipleri ile aynı çıktığını bulmuşlardır. Haplotip dizi verilerinin analizinin Batı Karadeniz kıyılarında yaşayan kalkan populusyonları arasındaki filocoğrafik farklılaşmanın varlığını net bir şekilde sağlamadığını tespit etmişlerdir.

Turan ve ark., (2014), kalkan *S. maximus* (Linnaeus, 1758) türün de otolit kimyasını Marmara ve Karadeniz populusyonlarını ayırmak için kullanmıştır. Otolit kimyası analizleri kalkan stokları arasında yüksek farklılaşma göstermiş, Karadeniz (Düzce ve Trabzon) ve Marmara rneklerinin arasında net bir ayrılıkla kısıtlı gen akışı olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Tek değişkenli varyans analizinin tüm otolit elementlerin de (Ba, Mg, Mn, Sr, Na, K and Ca) ($P < 0.001$) bütün örneklerin ortalamasında anlamlı farklılık gösterdiğini bulmuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırma Mustafa Kemal Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Moleküler Ekoloji ve Balıkçılık Genetiği Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Taksonomik Sınıflandırma

ÂLEM	: Animalia
ŞUBE	: Chordata
ALT ŞUBE	: Vertebrata
SINIF	: Actinopterygii
TAKIM	: Pleuronectiformes
FAMİLYA	: Scopthalmidae
CİNS	: Psetta
TÜR	: <i>Scophthalmus maeoticus</i> (Pallas, 1811)

3.1.2. *S. maeoticus*'un Diğer Kalkan Türlerinden Ayıran Özellikler

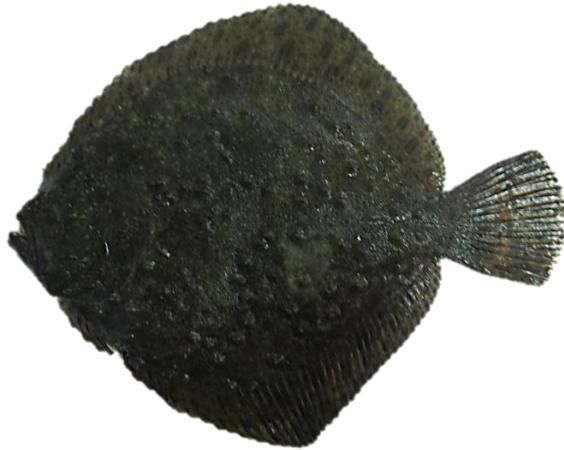
Karadeniz için karakteristik olan *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1811) türü üstten yassı, dairesel bir şekle sahiptir. Vücut lateralleri yassılaştırmış olup, gözler metamorfoz sonucu vücudun pigment içeren sol tarafında yer almıştır. Erginlerde vücut üzerinde iyi gelişmiş kemiksi dikenler vardır. Vücut yüksek, yüksekliği başın uzunluğundan daha fazla ve vücut uzunluğunun yarısından fazladır (yaklaşık % 56,9). Yaş ilerledikçe vücut yüksekliği artar. Genç bireylerde vücut yüksekliği daha az olup başın uzunluğu % 29,9 kadardır. Lateral çizgi çok belirgin olup, gözlerin hizasından başlayarak pektoral yüzgecin bitimine kadar kavisli, daha sonra düz bir şekilde kuyruk yüzgeci başlangıcında sona erer. Ağız, hafif dorsal konumlu olup, çeneler birçok sıra oluşturan dişler ile örtülüdür. Dudaklarda ince ve sertleşmiş halkalar bulunur. Burun delikleri gözlerin önünde yer alır (Slastenenko, 1956; Fischer ve ark., 1987; Zengin, 2000).

Deri kalın ve kaygandır. Vücudun alt tarafı beyaz bazen de kahverengi-siyah lekeli olabilir. Vücut rengi üst tarafta esmer-boz ya da kırmızımsı-boz olup, taze formlarda hiç leke bulunmaz. Bazılarında ise vücudun belirli ya da çeşitli yerlerine

dağılmış olarak irili ufaklı, koyu kahverengi-siyahımsı nokta, halka şeklinde lekeler veya hareler bulunur (Slastenenko, 1956; Fischer ve ark., 1987; Zengin, 2000).

Yüzgeçler genellikle esmer-grimsi renkte olup, ya tamamen lekesiz ya da belirli yerlerinde, koyu esmer-siyahımsı lekeler taşıyabilirler. Dorsal yüzgeç burun bitiminden, kuyruk yüzgeci basenine kadar kesiksiz olarak uzar. Dorsal yüzgecin bitiminden itibaren başlayan, yelpaze şeklinde bir kuyruk yüzgeci mevcuttur. Anal yüzgeç, ağız bitiminden başlayarak kuyruk yüzgeci basenine kadar devam eder. Pektoral yüzgeç, solungaç bitiminden başlar. İki taraflı olmasına rağmen, sağ taraftaki daha belirgin bir şekildedir. Bütün yüzgeçler yumuşak ışın içerir (Slastenenko, 1956; Akşiray, 1987; Fischer ve ark., 1987; Zengin, 2000; Turan ve ark., 2007).

Vücut yüzeyinde bulunan tüberküller *S.maeoticus* türünde kanca biçiminde olup, *S.maximus* türünde sivri yapıdadır. Tüberküllerde görülen bu iki yapısal farklılık iki türü ayırt etmekte etkili olmaktadır.



Şekil 3.1. *Scopthalmus maeoticus*' un ön görüntüsü



Şekil 3.2. *Scopthalmus maeoticus*' un arka görüntüsü

3.1.3. Örnekleme Bölgeleri

Kalkan örnekleri, türün dağılım gösterdiği Doğu Karadeniz'i temsilen Trabzon, Batı Karadeniz'i temsilen Düzce, Marmara Denizi'ni temsilen Mudanya'dan temin edilmiştir. Örnekler birebir türün avcılığının yapıldığı trol ve uzatma tekneleri ile çıkılarak veya balıkçı limanlarında satın alınarak toplanmıştır. Populasyonları temsilen 25'er adet, toplam 75 adet örnekleme yapılmıştır.

Örneklerin toplandığı istasyonlar Şekil 3.3'de verilmiştir. Örneklerin kodu, örnek sayıları, cinsiyet oranları, avlandıkları bölgelerin koordinatları, avlanma tarihleri, avlanma metotları ve standart boy ortalamaları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kalkan (*Scophtalmus maeoticus*)'un populasyonlara göre örnekleme bilgileri

Ö. A	P. K	Ö. S	C. O (D/E)	B. K	A. T	A. M	S. B. O
Doğu Karadeniz	KD1	25	15/10	41° 22' 36" N 39° 44' 23" E	20.12.2014	Uzatma	36,7 (4,7)
Batı Karadeniz	KD2	25	13/12	41° 25' 29" N 30° 59' 06" E	22.10.2013	Trol	25,7 (10,0)
Marmara Denizi	MD	25	15/10	40° 43' 23" N 28° 36' 48" E	19.09.2014	Trol	38,5 (4,5)

• KD1: Karadeniz (Trabzon); KD2: Karadeniz (Akçakoca); MD: Marmara Denizi (Mudanya); Ö.A: Örnekleme Alanları; P.K: Populasyonların Kodları; Ö.S: Örnek Sayıları; C.O: Cinsiyet Oranları; B.K: Bölge Koordinatları; A.T: Avlanma Tarihleri; A.M: Avlanma Metodu; S.B.O: Standart Boy Ortalaması.



Şekil 3.3. Kalkan (*Scophtalmus maeoticus*)'un örnekleme alanları

3.1.4. Kullanılan Araç ve Gereçler

Genetik çalışmada DNA elektroforezis tankı, güç kaynağı, UV görüntüleme cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, mikrosantrifüj cihazı, hassas terazi ve PZR cihazı kullanılmıştır. Kullanılan cihazların teknik özellikleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların teknik özellikleri

Cihaz İsmi	Teknik Özellikler
DNA Elektroforezis Tankı	15 x 6 x 9 cm
Dikey Elektoroforez	34 x 29 x 18 cm
UV görüntüleyici	24.1 x 33.7x 12.1 cm
Mikrosantrifüj	100-15000 rpm
Hassas Terazi	Hassasiyet 0.1 mg
İnkübatör	120lt / 80 °C
PCR Cihazı	48 Tüplük
Otoklav	Max. 120 °C

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Elde Edilmesi ve Korunması

Toplanan balık örnekleri, fiziksel ve biyolojik bozulmayı önleme amacıyla ayrı ayrı etiketlenmiş ve polietilen torbalara yerleştirilmiştir. Örnekler kıyıya ulaşıncaya kadar teknedeki dondurucuya veya buza konulmuş, kıyıya geldikten sonra ise laboratuara ulaşıncaya kadar soğuk taşıma kabında (buzda) muhafaza edilerek laboratuara getirilmiş ve derin donduruculara yerleştirilmiştir. Türlerin tanısı ve sistematik ayrımı Slastenenko, (1956); Akşiray, (1987); Fischer ve ark., (1987); Zengin, (2000) ve Turan ve ark., (2007)’ye göre yapılmıştır. Laboratuvara getirilen örneklerin tür tayini yapıldıktan sonra genetik analiz için doku örnekleri alınmış ve % 95’lik etil alkolde vida kapaklı tüpler içerisinde +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Bunun dışında balık örneklerinden yaş doku örnekleri alınıp bu örnekler derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Laboratuvar koşullarında balıklardan otolitler sağ ve sol olmak üzere her iki taraftan alınmıştır. Otolitler temizlendikten sonra ölçümler yapılmak üzere muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Moleküler Genetik Analizler

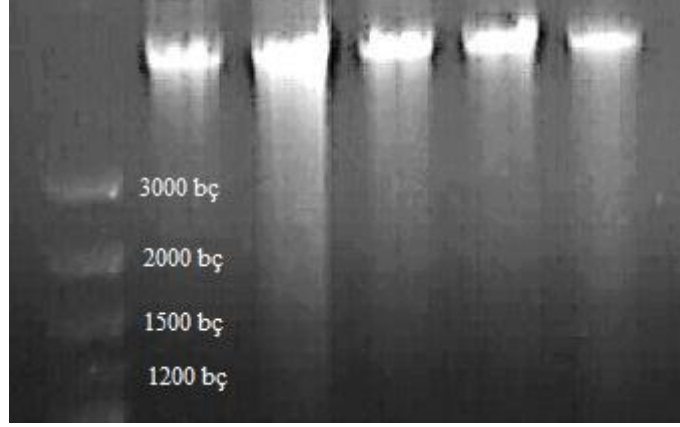
3.2.2.1. DNA'nın Ekstrakte Edilmesi

DNA'nın elde edilmesinde Blin ve Stafford (1976) tarafından verilen standart fenol kloroform yöntemi uygulanmıştır (Ergüden ve ark., 2010). Kalkan örneklerinin kas dokusundan alınan ve %95'lik etil alkol içerisinde vida kapaklı tüplerde muhafaza edilen dokulardan yaklaşık 50 mg, otoklavlanan eppendorf tüpler içerisine alındıktan sonra üzerlerine sırasıyla 300 µl CTAB (20 g/l CTAB; 1.4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA) buffer solüsyonu, 50 µl Proteinase K ve 30 µl RNase A ilave edilip cam çubuk aracılığıyla ezilmiştir. Daha sonra örnekler vortekslenip önceden 37.5°C'ye ayarlanan etüvde 1 gece bekletilmiştir. Etüvden alınan örnekler vortekslenip 380 µl fenol kloroform isoamil alkol (25:24:1) ilave edilip 15 dakika ters düz edilmek suretiyle karıştırılmıştır. Daha sonra 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin üst tabakaları farklı tüplere alınarak üzerlerine 380 µl kloroform isoamil alkol (24:1) ilave edilerek tekrar 15dakika ters düz edilmek suretiyle karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler 12000 rpm'de 10dakika santrifüj edilerek üst tabakalar yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bu işlemden sonra örneklerin üzerlerine, derin dondurucuda muhafaza edilen %100'lük etanol den 1 ml eklenip derin dondurucuda 2 saat bekletilmiştir. Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek içerindeki sıvı dikkatle boşaltılarak yine derin dondurucuda muhafaza edilen bu sefer %70'lik etanolden 1 ml eklenip 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra dikkatlice tüplerdeki sıvı boşaltılarak tüpler peletlerin kuruması için desikatörde bir süre vakumlanmıştır. Daha sonra kuruyan peletlerin üzerine 100 µl TE buffer eklenerek mitokondrial DNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır.

3.2.2.2. DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin miktarı belirlendikten sonra kalitesinin tespiti için % 0.7'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 0.175 gr agarose, 25 ml saf su ile karıştırılıp mikrodalga fırın yardımıyla agaroz homojen hale getirilmiştir. Saydamlaşan jel üzerine 0.5 ml seyreltilmiş 1x TBE Buffer ve 1.5 µl Ethidium Bromide eklenerek 60°C' ye kadar soğutulan jel 15x6x9 cm ebatlarındaki elektroforez küveti içerisine dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra, içerisinde seyreltilmiş 10x TBE Buffer bulunan elektroforez tankına koyulmuş ve 3 µl DNA örneğinden 6 µl'lik loading buffer

çözeltisinden karıştırılarak sırasıyla jeldeki kuyulara yerleştirilmiştir. Elektrik akımının gerçekleşmesi için, güç kaynağı 10 dk süre ile 25 mA ve 50 V'a ayarlanmıştır. Elektroforetik göç tamamlandıktan jel, elektroforez tankından dikkatlice alınmış ve UV transilluminatör cihazında, UV koruyucu maske ile örneklerin DNA yapıları gözlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. DNA ekstraksiyonu sonrası DNA' nın agaroz jel görüntüsü

Mikrosatellit Lokusların Çoğaltılması ve Kontrolü

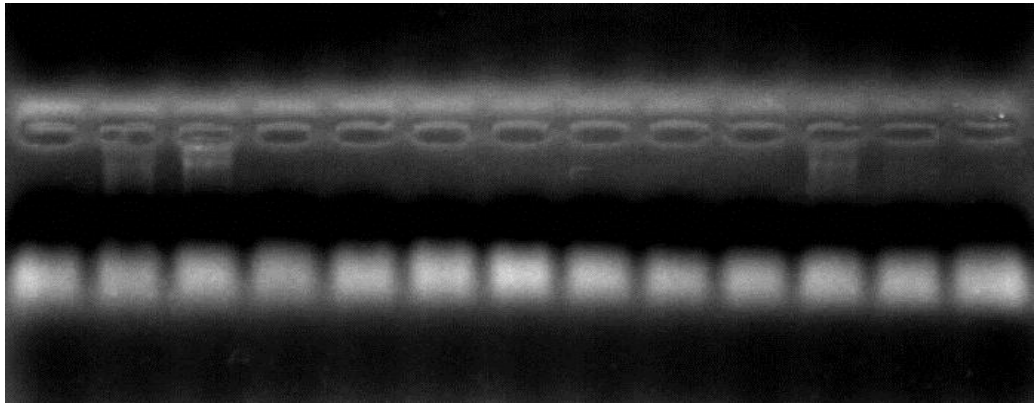
Mikrosatellit lokuslar DNA üzerinde iki, üç ya da dörtlü baz tekrarlarından oluşan farklı büyüklükteki nükleotit dizileridir. Analizlerimizde daha önce *S. maximus* türü için kullanılan ve *S.maeoticus* için daha önce hiç denenmemiş olan B12-I GT14 (Iyengar ve ark. 2000), 3/9CA15 (Iyengar ve ark. 2000), Sma1-125INRA (Estoup ve ark.. 1998), Sma-02 (Bouza ve ark., 2002) ve Sma3-12INRA (Estoup ve ark., 1998) mikrosatellit primerleri kullanıldı. Mikrosatellit lokuslarının her biri farklı reaksiyon şartlarında optimize edildi. Lokuslar için primer bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.2'de verilmiştir. PZR cihazı kullanılarak, PZR (Polimarez Zincir Reaksiyonu) için optimizasyon reaksiyonu oluşturulmuştur. Kurulmuş olan optimizasyon reaksiyonu içerisinde, her bir primer için 0.2 µl, Taq DNA polimeraz 1U, 1 µl NTPs, 2 µl MgCl₂, 6.3 µl saf su, 3 µl Taq buffer, 1.25 µl Primer F, 1.25 µl Primer R ve 1µl (≈10-25ng) kalıp DNA olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. PZR reaksiyon koşulları iki bölümde gerçekleştirilmiştir. İlk bölümde başlangıç denatürasyonu 95°C 1 dk denatürasyon 94°C 20 s (5 döngü), primerlerin bağlanması (annealing) 55°C (gradient) 20s, uzama 72°C 20 sn, ikinci bölümde 94°C 20 s (25 döngü) denatürasyon ve son uzama 72°C 20 sn olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 3.3. Her bir lokusa ait bağlanma (annealing) sıcaklığı, primer dizisi

Lokus	Primerler	Tekrarlı motif	Bağlama sıcaklığı °C
B12-I GT14	F: GTGATGGAAGATTGTACCAG R: CACAATAAAGGATAGACCAG	(GT) ₁₄	56-54°C
3/9CA15	F: AGAGTGAAGAACGTACCTGC R: CAATGGAGAGGCAGTATCGG	(CA) ₁₅	58-60°C
Sma1-125INRA	F: CACACCTGACAAAGCTCAAC R: GCTGAACATTTTCATGTTGATAG	(TAGA) ₁₁ - (TG) ₄	58°C
Sma-02	F: GGAGGATGTATTGAAAGTGT R: AGAGCAGGTCATTATACAGC	(TG) ₁₆	54-56°C
Sma3-12INRA	F: CACAATTGAATCACGAGATG R: GCCACCACTGCGTAACAC	(TG) ₂₁	54-58°C

Mikrosatelit Ürünlerinin Elektroforezi ve Görüntülenmesi

Çoğaltılan lokuslar % 1,5'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek PZR ürünleri kontrol edilmiştir. Bu amaçla 25 ml saf su içerisine 750 ml 1x TBE (89 mM Tris base, 89 mM Borik asit, 2 mM EDTA) ve 0,375 g agaroz eklenerek, mikrodalga fırın yardımıyla agaroz homojen hale getirilmiştir. 60 °C'ye kadar soğutulan jel içerisine 2,25 µl EtBr (Etidyum Bromür, 5 mg/ml) eklenerek, jel tablasına dökülmüş ve polimerize olması için beklenmiştir. Her bir PZR ürününden 3 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu ile birlikte kuyucuklara yüklenmiştir. Son olarak jele 1 µl Marker (Low Molecular Weight DNA Ladder Biolabs) yüklenerek 60 V'da 15 dakika yürütülmüş ve UV görüntüleme sisteminde fotoğflanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. PCR sonrası elde edilen PCR ürününün agaroz jel üzerinde kontrolü

Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle COI Geninin Çoğaltılması

Kalkan popülasyonları arasındaki genetik farklılığın derecesini belirlemek amacıyla mitokondrial DNA (mtDNA) COI geni kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra, universal primerler kullanarak PZR Metodu ile mtDNA COI genleri çoğaltılmıştır (Saiki ve ark. 1988). PZR ile uygulamasında; ilk önce 95 °C’de 5 dakika denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Bunu takiben amplifikasyon işlemi 94°C’de 30 sn, 65 °C’de 45 sn, 72 °C’de 2 dakikalık PZR sıcaklık profili 20 döngü olacak şekilde uygulandı ve 72 °C’de 5 dakika son uzama safhası izlenmiştir. Elde edilen PZR ürünü ise % 0,7’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bunun için aşağıda dizinleri verilen universal primerden yararlanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Her bir lokusa ait bağlanma (annealing) sıcaklığı, primer dizisi.

Lokus	Primer	Bağlanma Sıcaklığı °C
COI F:	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	58
COI R:	5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'	62

3.2.3. Genetik Verilerin Analizi

3.2.3.1. Mikrosatelite Verilerinin Analizi

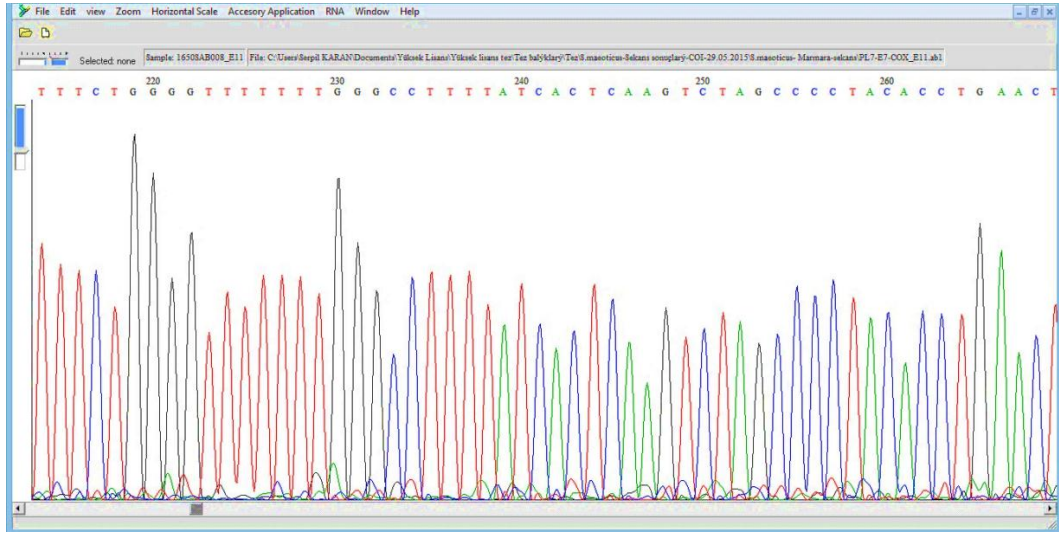
Anlaşılmalı firmaya PZR ürünü temizlendikten (pürüfikasyon) sonra gönderilmiş ve firma tarafından mikrosatelite analizi yapılmıştır. Elde edilen jel görüntülerinden Peak Scanner ile her bir bireyin allel büyüklükleri ve genotipleri belirlenmiştir. Bireylerden ve popülasyonlardan elde edilen genotipler Arlequin 3,0 (Excoffier ve ark., 2005) bilgisayar paket programı kullanılarak, tüm lokuslarda görülen alel frekansı, alellerin fiksasyon indeksleri, gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri ve popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı belirlenmiştir (Levene, 1949; Guo ve Thompson, 1992).

Popülasyonlar arasındaki genetik ilişkinin gösteriminde komşu katılımlı soyağacı (Neighbour Joining) kullanılmıştır. Dendogram üzerindeki dalların güvenilirliği PHYLIP (Felsenstein, 2002) bilgisayar paket programı ile seç bağla testi (bootstrapping) yapılarak test edilmiştir. Treeview bilgisayar programı kullanılarak dendogram ağaç olarak görüntülenmiştir. Popülasyonların arasında meydana gelen genetik değişimi incelemek için F_{ST} istatistikleri hesaplanmıştır (Slatkin, 1995). Popülasyonların genetik

varyasyonunun coğrafik dağılışlarını test etmek için moleküler varyans analizi (AMOVA) (Weir ve Cockerham, 1984) yapılmıştır. Bu hesaplamalar Arlequin 3,0 (Excoffier ve ark., 2005) bilgisayar paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3.2. Mitochondriyal DNA Dizin Verilerinin Analizi

Anlaşmalı firmaya PZR ürünü temizlendikten (pürüfikasyon) sonra gönderilen ve firma tarafından DNA dizin analizi yapılan örnekler BioEdit (Hall, 1999) programında kontrol edilmiş ve oldukça sağlıklı dizin analizleri elde edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. DNA dizin analizi sonucu elde edilen COI geninin BioEdit programı ile incelenmesi ve edit edilmesi işlemi

Genetik verilerin analizinde MEGA (Tamura ve ark., 2011), DnaSP (Librado ve Rozas, 2009) ve Arlequin 3 (Excoffier ve ark., 2005) bilgisayar paket programı kullanılmıştır.

3.2.4. Morfolojik İnceleme

3.2.4.1. Morfometrik ve meristik

Araştırmada kalkan populasyonları arasındaki morfolojik farklılaşmanın derecesi, MorFISH (Turan ve Oral, 2005) programı ile incelenmiştir. Bu amaçla her bir balık örneğinin fotoğrafı çekilerek daha önce belirlenmiş 18 farklı nokta işaretlenmiştir.

Kalibrasyon değeri 2.5 cm alınarak bu noktalar arasındaki mesafe program yardımıyla ölçülmüştür.

Bunun dışında morfometrik karakterlerden, her balığın göz çapı (GÇ), gözler arası mesafe (GAM), baş uzunluğu (BASUZ), pektoral yüzgeç uzunluğu (PEKUZ), ağız-göz arası mesafe (AGM), dorsal yüzgeç başlangıcı-operkulum arası mesafe (DOAM), tüberkül çapı (TÇ) ölçümlerinde 0.01 mm hassasiyetli kumpas ile her bir balığın ağırlığı ise 0.05 gr hassasiyetli terazi yardımıyla alınmıştır.

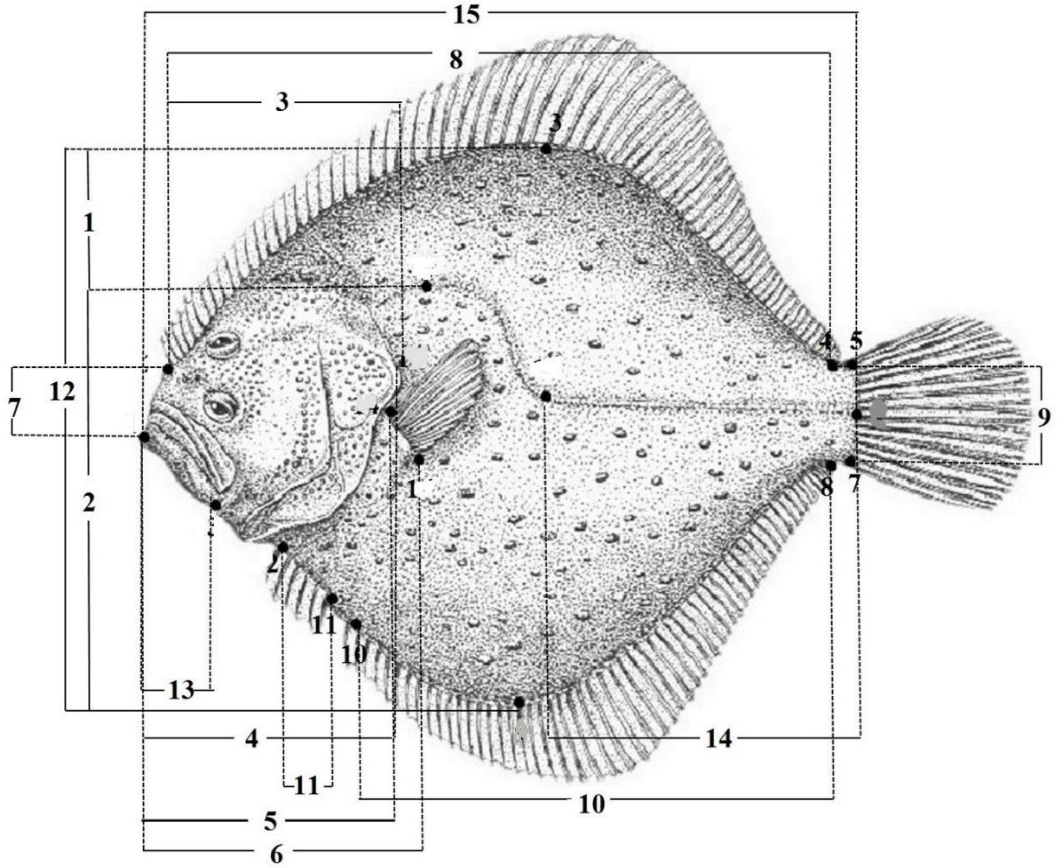
Meristik karakterlerden de dorsal, kaudal, anal, ventral, pektoral ve arka pektoral yüzgeç ışın sayıları ile solungaç diken sayısı, omur sayısı, ön dorsal tüberkül, ön ventral tüberkül, arka dorsal tüberkül, arka ventral tüberkül ve toplam tüberkül sayıları belirlenmiştir (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. Meristik analizde kullanılan karakterler ve kısaltmaları

Meristik Karakterler	Kısaltmalar
DSI	Dorsal yüzgeç ışın sayısı
VSI	Ventral yüzgeç ışın sayısı
ASI	Anal yüzgeç ışın sayısı
ADTS	Arka Bölge Dorsal Tüberkül sayısı
AVTS	Arka Bölge Ventral Tüberkül sayısı
KIS	Kuyruk yüzgeci ışın sayısı
SDS	Solungaç diken sayısı
OS	Omur sayısı

Çizelge 3.6. Morfometrik analizde kullanılan karakterler ve kısaltmaları

Morfometrik Karakterler	Kısaltmalar
GÇ	Göz çapı
GAM	Gözler arası mesafe
BASUZ	Baş uzunluğu
PEKUZ	Pektoral yüzgeç ışın uzunluğu
AGM	Ağız-göz arası mesafe
DOAM	Dorsal yüzgeç başlangıcı ile operkulum arası mesafe
TÇ	Tüberkül çapı

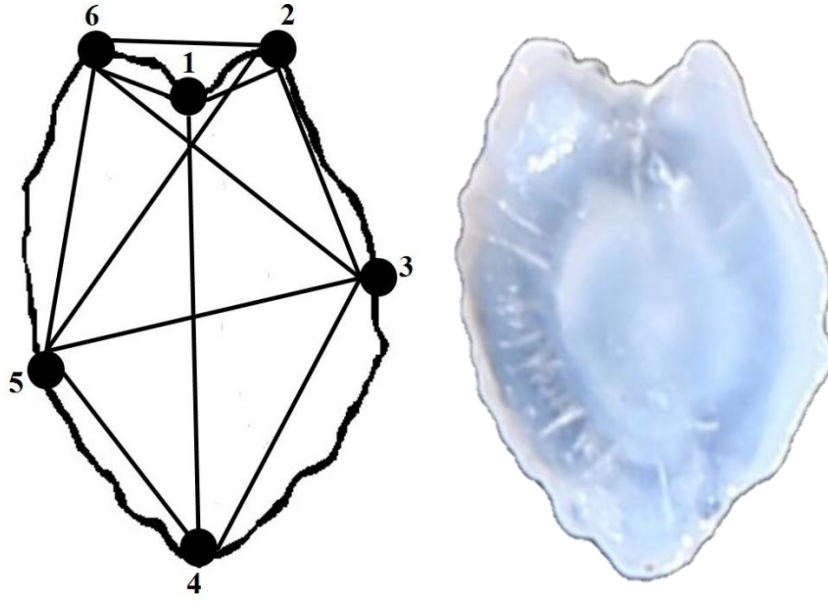


Şekil 3.7. *S.maeoticus*' un morfometrik ölçümleri

(1- Linea-Dorsal yükseklik; 2- Linea-Anal yükseklik; 3- Dorsal yüzgeç başlangıcı-Solungaç kapağı arası; 4- Ağız-pektoral yüzgeç başlangıcı; 5- Ağız-solungaç kapağı arası mesafe; 6- Ağız-pektoral yüzgeç bitişi arası mesafe; 7- Ağız- Dorsal başlangıcı arası; 8- Dorsal kaide uzunluğu; 9- Kaudal yüzgeç sapı genişliği; 10- Anal kaide uzunluğu; 11- Ventral uzunluğu; 12- Vücut yüksekliği; 13- Ağız başlangıç-son arası mesafe; 14- Yanal hat uzunluğu; 15- standart boy)

3.2.4.2. Otolit Şekil

Her balık örneği için otolitler pens ile alınarak üzerlerindeki dokular temizlenmiştir. Daha sonra her otolit binoküler mikroskoba yerleştirilerek digital makine ile fotoğraflanmış ve İmaj analiz sistemi ile bilgisayar ortamında otolitler üzerinden ölçümler koordinatlar şeklinde alınmış ve daha sonra bu ölçümler lineer değerlere çevrilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *S. maeoticus* otolitinde belirlenen 6 anahtar nokta ve bu noktalar arasında oluşturulan ölçüm uzunlukları

3.2.4.3. Otolit kimyası

Kimyasal analiz için, Otolitlerin yüzeyine yapışan biyolojik kalıntıların çözünmesi için ultra saf su içinde ıslatılmıştır. Daha sonra otolitler öncelikle kalan biyolojik tortunun çözünmesi için 5 dakika süreyle % 3 hidrojen peroksit ile ıslatılmış ve % 1 nitrik asit içinde 5 dakika bekletilmiştir. Otolitler sonra asiti uzaklaştırmak için 5 dakika boyunca, ultra saf su ile muamele edilmiştir. Son olarak otolitler kurutularak cam tüpler içinde 120°C de inkübatörde depolanmıştır. Enstimental analize başlamadan önce her otolit 0.001mg hassasiyetiyle tartılmış ve 10 ml %37'lik nitrik asit içinde çözülmüştür. Örneklerin Element konsantrasyonları, solüsyon bazlı, indüktif olarak bağlanmış plazma atomik emisyon spektrometresi (ICP-AES) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kalkan (*Scophthalmus maeoticus*)'ın otolitlerinin içinde bulunan Ba, Mg, Mn, Sr, Na, K ve Ca, Fe elementleri değerlendirilmiştir.

3.2.5. Morfolojik Verilerin Analizi

Analizler her balık örneğinden alınan 21 farklı morfometrik karakter ve 7 meristik karakter üzerinde yapılmıştır. Farklı populasyonlar arasındaki genetik ilişkinin şeklini ve derecesini bulmada Ana Bileşenler Analizi (ABA) ve Kümelerarası Korelasyon Analizi (KKA) kullanılmıştır. ABA (Ana Bileşenler Analizi) populasyonlar arasında farklılık oluşturan morfometrik karakterleri tespit etmekte kullanılmaktadır (Somers,

1986). KKA (Kümelerarası Korelasyon Analizi) ise, populasyonlan sahip oldukları morfolojik farklılıklara göre ayırt etmektedir.

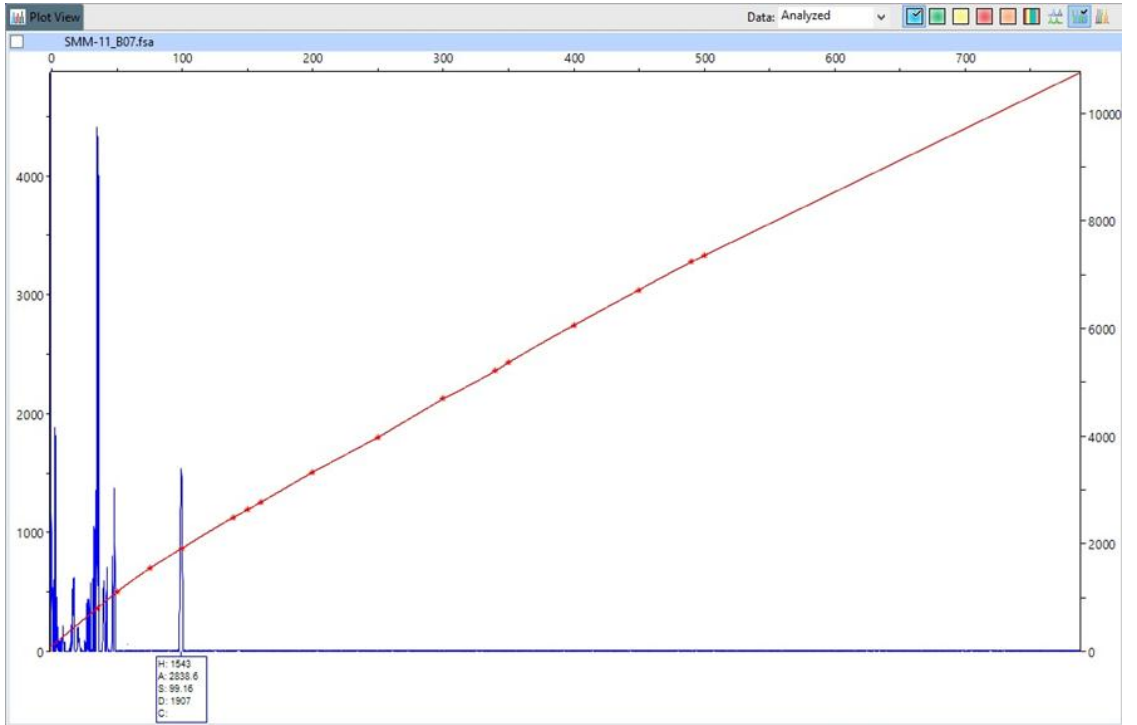
Ölçümü yapılan türlerin çok değişkenli analizlerinde, Ana Bileşenler Analizi (ABA), Kümelerarası Korelasyon Analiz (KKA) ve Tek Değişkenli Varyans Analizi (VA) kullanılmıştır. İlgili hesaplamalar "SPSS, Statistica for Windows Version 23.0" ve Excel Windows 2010 paket programları ile yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

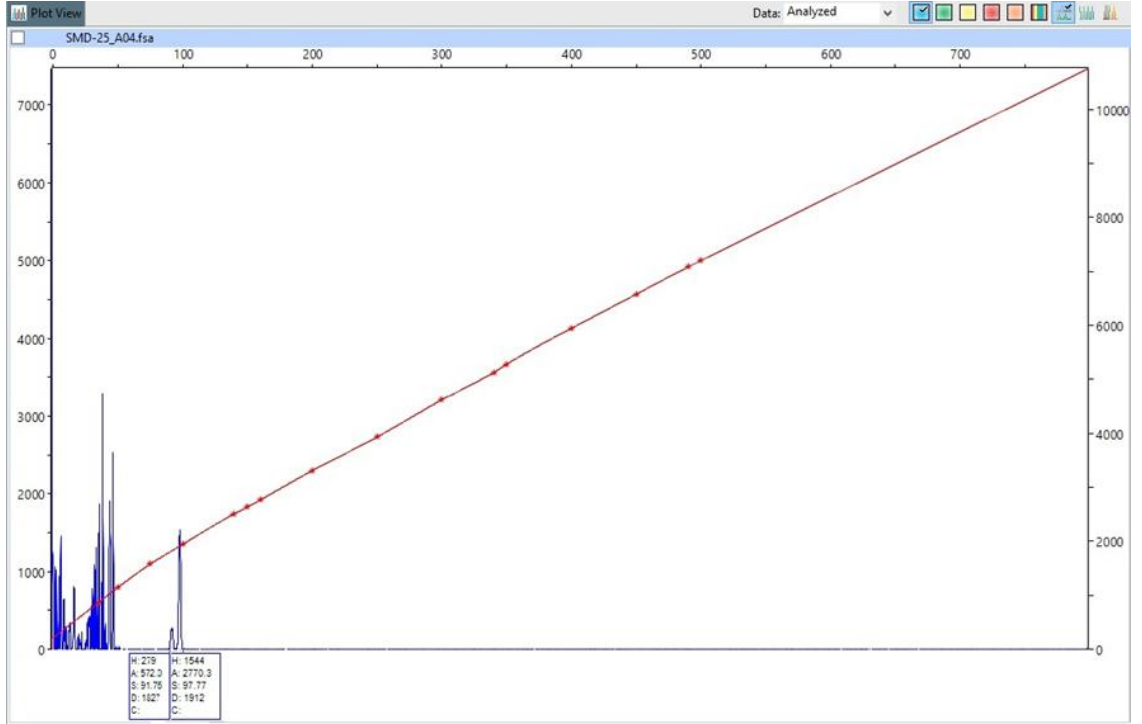
4.1. Genetik Bulgular

4.1.1. Mikrosatellite Bulguları

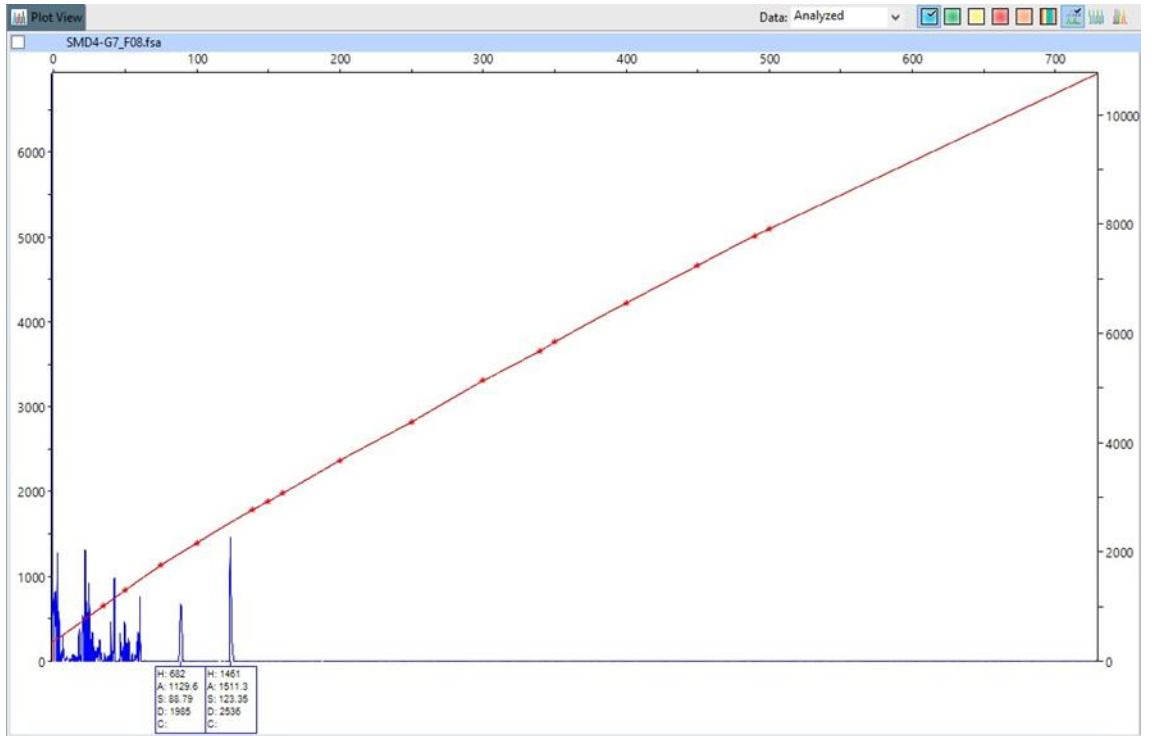
S.maeoticus populasyonlarına ait 3 farklı populasyondan 75 örnek çalışılarak populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya çıkarmaya çalışıldı. Bu çalışmada kullanılan beş mikrosatellite lokusu PZR ile çoğaltıldı ve Peak Scanner programı ile genotipleri belirlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



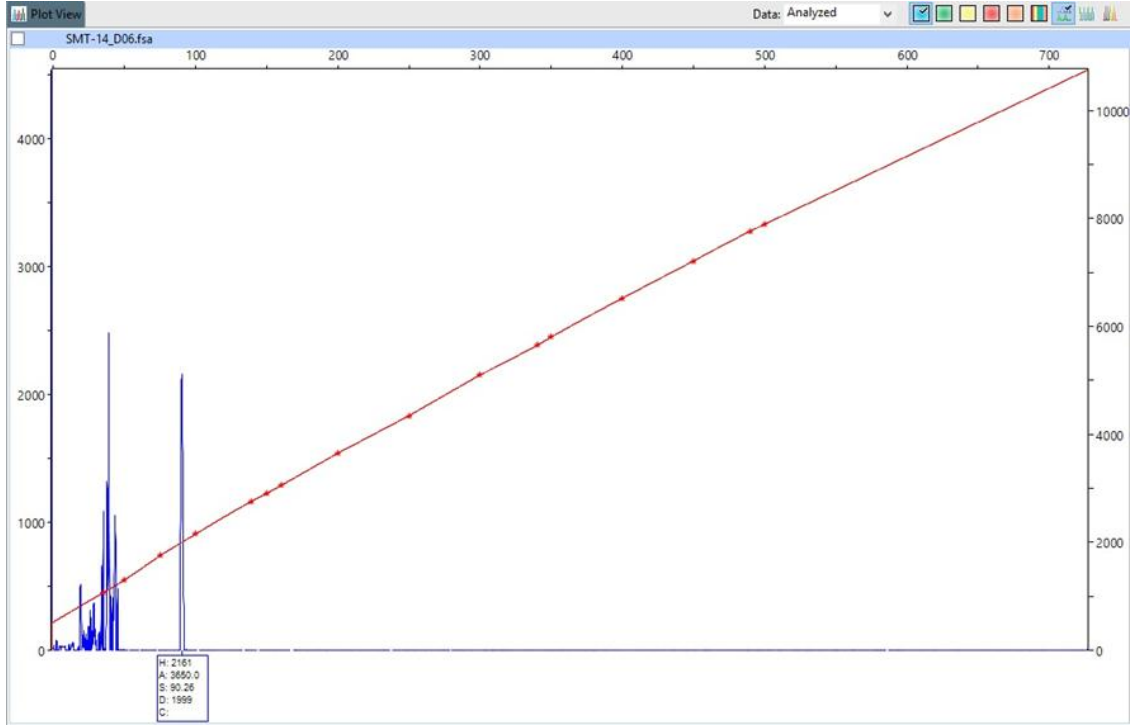
Şekil 4.1. 3/9-CA15 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi



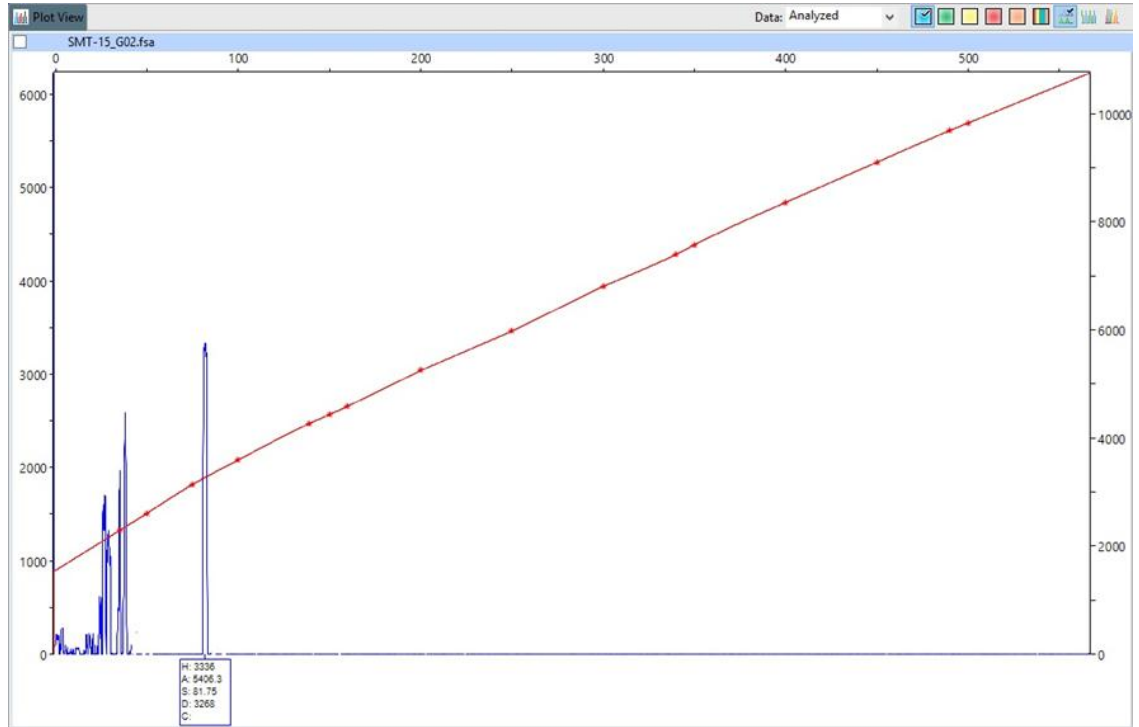
Şekil 4.2. B12-I-GT14 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi



Şekil 4.3. SMA1 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi



Şekil 4.4. SMA02 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi



Şekil 4.5. SMA3 mikrosatellit lokusu için genotipin Peak Scanner ile belirlenmesi

Elde edilen sonuçlara göre tüm lokuslara ait gözlenen alel sayıları 10 ile 18 arasında değişirken, en yüksek alel sayısı 18 ile SMA1 lokusuna, en düşük alel sayısı ise 10 ile 3/9CA15 lokusuna ait bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Her bir lokusa ait gözlenen alel sayısı, gözlenen heterozigotluk, beklenen heterozigotluk değerleri

Lokuslar	Gözlenen Alel Sayısı	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk
SMA1	18	0.45	0.81
SMA-02	15	0.43	0.72
SMA3	16	0.48	0.68
B12-I-GT14	13	0.36	0.77
3/9CA15	10	0.37	0.7
Ortalama	14,4	0.42	0.74

Her lokusa ait beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri hesaplanmıştır (Levene, 1949). Bu değerlere göre beklenen heterozigotluğu en yüksek 0.81 ile SMA1 lokusu, en düşük ise 0.68 ile SMA3 lokusu olmuştur. Bütün lokuslar ele alındığında beklenen heterozigotluk değerleri gözlenen heterozigotluk değerlerinden yüksek olduğu bulunmuştur. Beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri arasındaki en yüksek fark ise B12-I-GT14 lokusundur. Gözlenen heterozigotluk değerleri ortalaması 0.42 iken beklenen heterozigotluk değerleri ortalaması 0.74 dür (Çizelge 4.1).

Coughlan ve ark. (1998), *S. maximus* türü üzerine yaptıkları çalışmada üç mikrosatelite lokusu kullanmışlar, doğal ve yetiştiricilik İrlanda populasyonlarında ortalama gözlenen heterozigotluk oranını 0.66 ile 0.08 arasında, doğal Norveç populasyonlarında ise 0,71 ile 0,08 arasında bulmuşlardır.

Pardo ve ark., (2005), *S.maximus*'un yeni mikrosatelit belirteçlerini türetmek için yaptıkları çalışmada beklenen heterozigotluk değerini 0.13 ile 0.91 arasında, lokus başına alel sayısını ise 2 ile 15 arasında bulmuşlardır.

Liu ve ark., (2006), *S.maximus* üzerine yaptıkları çalışmada beş polimorfik mikrosatelite lokusu kullanmışlar ve gözlenen heterozigotluğu 0.76 ile 0.90 arasında, beklenen heterozigotluğu ise 0.63 ile 0.83 arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir.

Florin ve Höglund (2007), *Psetta maxima*'nın populasyon yapısını mikrosatelite tekniği ile inceledikleri çalışmada ortalama heterozigotluğun 0.64 ile 0.72, her lokusun örnek başına heterozigotluğu ise 0.28 ile 0.86 arasında değiştiğini bulmuşlardır.

Navajas-Pérez ve ark. (2012), *S. maximus* türünü kullanarak yaptıkları mikrosatelit çalışmasında lokus başına alel sayısını 2 ile 18 arasında beklenen heterozigotluğu ise 0.021 ile 0.951 arasında bulmuşlardır.

McConnell ve ark., (1995) Atlantik somon balıklarında mikrosatelit tekniği kullanarak yaptıkları çalışmada yedi popülasyonda 4 mikrosatelit lokusu kullanmışlar ve heterozigotluk oranlarını 0.08-0.92 değerleri arasında bulmuşlardır.

Takagi ve ark., (1997), *Pagrus major*'un yakından ilişkili olduğu türlerin izolasyonu için yaptıkları mikrosatelit çalışmasında lokus başına gözlenen alel sayısı 16 ile 32 arasında, heterozigotluğu ise 0.675 ile 0.907 arasında değiştiğini bulmuşlardır.

Shaw ve ark., (1999), *Clupea harengus*'un popülasyon yapısını belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada dört mikrosatelit lokusu kullanmışlar ve lokus başına alel sayısını 18 ile 41 arasında, beklenen ortalama heterozigotluğu ise 0.90 ile 0.93 arasında bulmuşlardır.

Wimberger ve ark., (1999), *Sebastes maliger*'in izolasyonu ve karakterizasyonu için oniki mikrosatelit lokusu karakterize etmişlerdir. Lokus başına alel sayısını 4 ile 15 arasında, alel ortalamasını ise 6.8 olarak bulmuşlardır. Beklenen heterozigotluk değerinin 0.38 ile 0.79 arasında değiştiğini ve ortalamasının 0.60 olduğunu bulmuşlardır.

Popülasyonların genetik yapılarını belirlemek amacı ile örnek sayıları, alel sayıları, her popülasyona ait beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri ve Garza-Williamson indeksi (Garza ve Williamson, 2001) hesaplanmıştır. Her bir popülasyona ait ortalama gözlenen heterozigotluk değerleri en düşük Marmara Denizi (0.25), en yüksek 0.40 ile Doğu Karadeniz ve Batı Karadeniz popülasyonları olduğu saptandı. Her mikrosatelit lokusu başına alel sayıları 11 lokusla Doğu Karadeniz popülasyonundaki SMA1 en düşük ise yine Doğu Karadeniz popülasyonundan 4 ile 3/9CA15 lokusuna ait olduğu bulunmuştur. Lokus genelinde ortalama alel sayıları Doğu Karadeniz (KD1) popülasyonunda 6.60, Batı Karadeniz (KD2) ve Marmara Denizi (MD) popülasyonlarında ise 7.20 iken Garza-Williamson indeksi en düşük SMA1 lokusunun KD2 örneklerinde, en yüksek ise B12-I GT14 lokusunun KD2 örnekleridir. Garza-Williamson indeks ortalaması en düşük KD1 (0.49), en yüksek KD2 (0.56) dir (Çizelge 4.2).

Ayrıca popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıkları test edilmiştir. 3/9CA15 lokusundaki Doğu Karadeniz (KD1) popülasyonlarındaki örnekler

Hardy-Weinberg dengesinde olup ($P>0.05$), bunun haricindeki tüm lokuslara ait olan populasyonlardaki örnekler Hardy-Weinberg dengesinde bulunmamıştır ($P<0.0001$). Birçok populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olmayışını örnek sayısının sınırlı oluşu ile ilintili olabilmektedir. Ayrıca, tüm populasyonlarda gözlenen heterozigotluk beklenenden daha yüksek bulunmuştur. Heterozigotluğun fazlalığı, birbirine benzemeyen genotipler arasındaki eşleşme ve heterozigotların yararına bir seleksiyon sonucu oluşabilir.

Çizelge 4.2. *S. maeoticus* populasyonları arasında beş mikrosatelit lokusu için tanımlayıcı istatistikler

Populasyonlar		Lokuslar					Genel Lokus Ort.
		SMA1	SMA02	SMA3	B12-I GT14	3/9CA15	
KD1	n	25	25	25	25	25	
	a	11	6	5	7	4	6.60
	Ho	0.52***	0.58**	0.12***	0.16***	0.72	0.40
	He	0.88***	0.70**	0.66***	0.72***	0.72	0.72
	G.W. index	0.24	0.75	0.55	0.35	0.57	0.49
	Alel aralığı	44	7	8	19	6	44
KD2	n	25	25	25	25	25	
	a	7	8	5	9	7	7.20
	Ho	0.32***	0.56***	0.12***	0.68***	0.32***	0.40
	He	0.78***	0.75***	0.69***	0.78***	0.74***	0.75
	G.W. index	0.14	0.33	0.62	1.00	0.70	0.56
	Alel aralığı	49	23	7	8	9	
MD	n	25	25	25	25	25	
	a	8	7	8	8	5	7.20
	Ho	0.52***	0.16***	0.24***	0.24***	0.08***	0.25
	He	0.78***	0.70***	0.70***	0.81***	0.64***	0.73
	G.W. index	0.19	0.44	0.36	0.89	0.63	0.50
	Alel aralığı	41	15	21	8	7	

((n):Örnek sayısı, (a): Alel sayısı, (Ho): Gözlenen alel sayısı, (He): Beklenen alel sayısı, (*), $P < 0.0001$.)

Rodriguez-Ramilo ve ark. (2007), *S. maximus* türünde yaptıkları çalışmada ortalama alel sayısını 15.10 bulmuşlardır. SMA1 lokusun alel sayısını 8, beklenen heterozigotluk değerini 0.745, gözlenen heterozigotluk değerini ise 0.734 olarak bulmuşlardır.

Kalkan populasyonları arasındaki genetik ilişki Nei (1978) genetik uzaklık (D) değerleri hesaplanarak yapıldı (Çizelge 4.3). Populasyonların ikiyeşerli karşılaştırmalar ile elde edilen genetik uzaklık değerlerine göre en küçük uzaklık Marmara Denizi ve Batı Karadeniz populasyonları arasında görülürken (0.19549), en büyük uzaklık ise Marmara

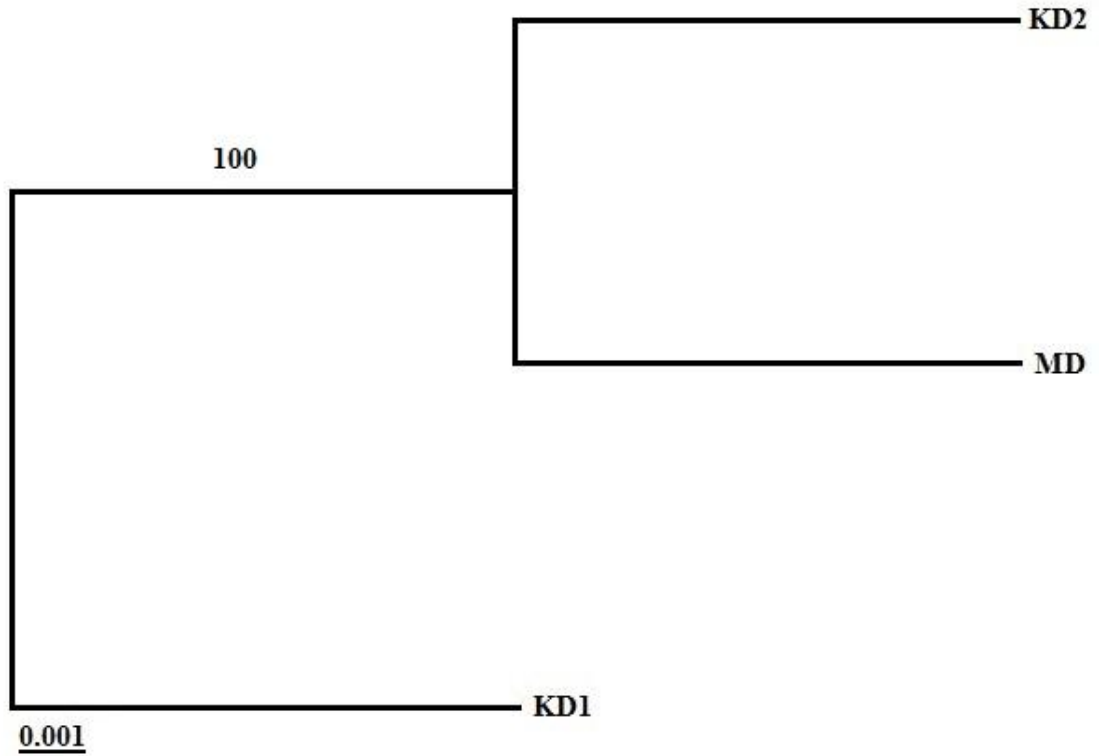
Denizi ve Doğu Karadeniz populasyonları arasında görüldü (0.21755). Elde edilen bu değerler kullanılarak populasyonlar arasında genetik ilişkiyi gösteren komşu kalıtmıli soyağacı elde edildi (Şekil 4.6). Yapılan analiz sonuçlarına göre Doğu Karadeniz (KD1) populasyonu Marmara Denizi populasyonu genetik uzaklık bakımından ayırmıştır. Bu da Marmara Denizi’den Doğu Karadeniz’e gen akışı olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.3. Alt diyagonal populasyonların karşılıklı FST değerleri, koyu renk yazılmış değerler ise populasyonlar içi FST değerleri

Populasyonlar	KD1	KD2	MD
KD1	0.716082		
KD2	0.21015	0.748735	
MD	0.21755	0.19549	0.725388

Populasyonlar içi genetik çeşitlilik değeri en düşük olan Doğu Karadeniz (0.716082) populasyonu olmuştur. Bu durumun Doğu Karadeniz populasyonu üzerindeki avcılık baskının yoğunluğundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. En yüksek genetik çeşitlilik ise Batı Karadeniz (0.748735) populasyonunda olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3).

Populasyonlar arası genetik ilişkiyi göstermek adına negatif branş uzunluğuna izin verilen komşu kalıtmıli soyağacı kullanılmıştır. Soyağacında en düşük genetik çeşitlilik değerine sahip olan Doğu Karadeniz populasyonu genetik farklılık oluşturmuştur. (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Mikrosalite lokuslarının F_{ST} değerleri komşu kalıtmıli soyağacı (Neighbour Joining tree) ve nodların güvenirliliğini gösteren seç-bağla (bootstrap) değerleri soyağacı üzerinde gösterilmiştir.

4.1.2. Mitokondriyal DNA Dizileme Bulguları

Yapılan model test sonucu verilerimize uygun en iyi model Jukes-Cantor modeli bulunmuştur (Jukes ve Cantor, 1969) ve *S. maeoticus* populasyonları arasındaki genetik çeşitlilik ve farklılaşmanın derecesi bu model esas alınarak belirlenmiştir. Elde edilen verilerden Neighbor-Joining metodu kullanılarak populasyonlar arasındaki genetik ilişkinin şekli belirlenmiştir.

Analiz edilen COI bölgesinin uzunluğu 566 bç olarak saptanmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid kompozisyonu Çizelge 4.4’de verilmiştir. Yapılan analizlerde A bazının oranı % 23.2 olarak, T bazının oranı % 28.8 olarak, C bazının oranı % 28.4 olarak, G bazının oranı % 19.6 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan 566 baz çifti uzunluğundaki COI geninin ortalama nükleotid kompozisyonu (%)

Baz adı	A	T	C	G
(%)	23.2	28.8	28.4	19.6

DNA dizi analizi yapılarında gösterilen 566 bç'lik bölgesi çalışılan COI geninin 556 bç'lik kısmı evrimsel süreçten etkilenmemiş bölgelerden oluşurken 10 bç'lik kısmı ise populasyonlar arasında çeşitli sebeplerden ötürü değişen bölge olarak tespit edilmiştir. 1 bç'lik bölge ise populasyonlar arasında parsimoni anlamlı bölge görevi görmüştür.

Çizelge 4.5. Substitüsyon matrisi

	A	T/U	C	G
A	-	8.33	8.33	8.33
T/U	8.33	-	8.33	8.33
C	8.33	8.33	-	8.33
G	8.33	8.33	8.33	-

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Jukes-Cantor metodu kullanılmıştır (Çizelge 4.5). Transisyonel substitüsyonlar koyu renkte, transversionel substitüsyonlar ise normal olarak gösterilmiştir. Substitüsyon oranları bir bazdan diğerine geçiş ihtimalini temsil etmektedir. Transisyonel substitüsyon oranları A/G 8.33, (T/U)/C 8.33, C/(T/U) 8.33, G/A 8.33 olarak bulunmuştur. Nükleotid frekansları A= %25, T/U= %25, C= %25 ve G= %25 şeklinde görülmektedir.

Modeltest sonucu en iyi model Jukes-Cantor modeli seçilmiş olup analizler bu modele göre yapılmıştır. Populasyonlar içi ortalama genetik çeşitlilik (diversity) değerleri Çizelge 4.6' de gösterilmiştir. Tüm populasyonlar arasındaki ortalama genetik çeşitlilik değeri 0,001481 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Populasyonlar içi ortalama genetik çeşitlilik

Populasyon	Genetik Çeşitlilik Değeri
Doğu Karadeniz (KD1)	0.001416
Batı Karadeniz (KD2)	0.001337
Marmara Denizi (MD)	0.001692

Elde edilen verilere göre en düşük genetik çeşitlilik Batı Karadeniz (KD2) populasyonunda gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. *S. maeoticus* populasyonlarındaki COI haplotiplerinin frekansları ve popuasyonlara göre dağılımı

Haplotipler	Doğu Karadeniz	Batı Karadeniz	Marmara Denizi
Hap 1	6	6	6
Hap 2	1	-	-
Hap 3	1	-	-
Hap 4	1	-	-
Hap 5	1	-	-
Hap 6	-	1	-
Hap 7	-	2	2
Hap 8	-	1	-
Hap 9	-	-	1
Hap 10	-	-	1

DNA dizin analizi ile 3 populasyonda toplam 10 haplotip gözlenmiştir (Çizelge 4.7). Haplotip çeşitliliği bakımından Doğu Karadeniz populasyonunda 5, Batı Karadeniz populasyonunda 4 ve Marmara Denizi populasyonunda 4 haplotip görülmüştür. Haplotip 1 Doğu Karadeniz, Batı Karadeniz ve Marmara populasyonlarında, Haplotip 2, Haplotip 3, Haplotip 4, Haplotip 5 sadece Doğu Karadeniz populasyonunda, Haplotip 6 sadece Batı Karadeniz populasyonunda, Haplotip 7 Batı Karadeniz ve Marmara populasyonlarında, Haplotip 8 sadece Batı Karadeniz populasyonunda, Haplotip 9 ve Haplotip 10 sadece Marmara populasyonunda belirlenmiştir. Populasyonlar arası ortalama haplotip çeşitliliği ise 0,6345 olarak bulunmuştur.

Stepien (1999), dil balığı türü olan *Microstomus pacificus*' nın filocoğrafik yapısını belirlemek amacıyla D-loop geni kullanarak yaptıkları mtDNA çalışmasında toplam 110 bireyde 90 haplotip belirlemiştir.

Suzuki ve ark., (2004), *Psetta maxima*'nın filocoğrafik ilişkini mitokondriyal DNA'nın haplotip değişimiyle anlamak amacı ile yaptıkları çalışmada toplam 66 kalkan sekansında 28 haplotip belirlemiştir.

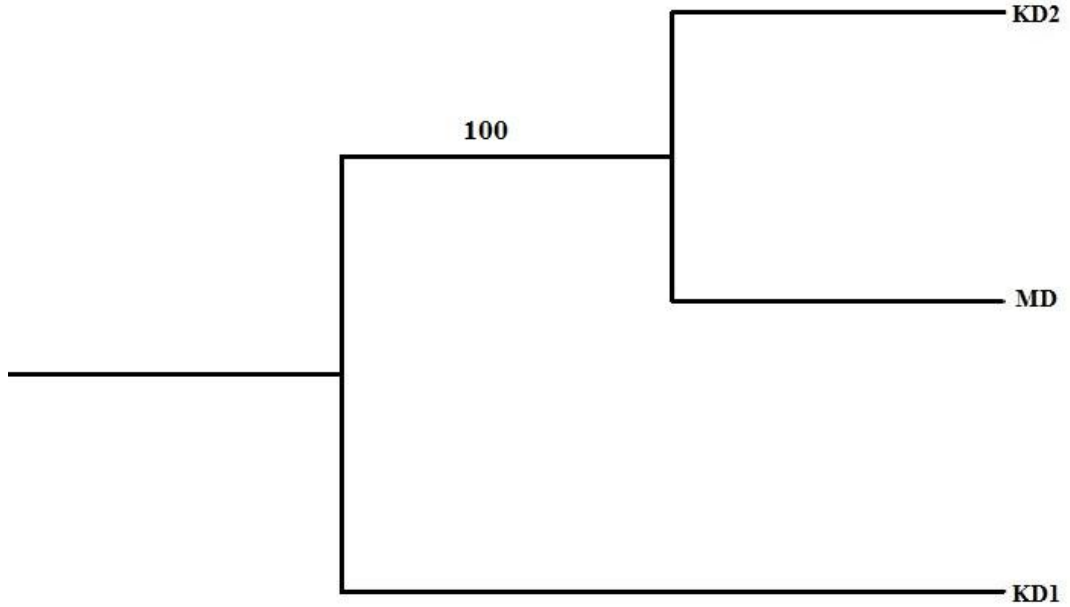
Atanassov ve ark., (2011), Karadeniz ve Romanya kıyılarından gelen *Psetta maxima* populasyonlarında mitokondriyal DNA kullanarak yaptıkları çalışmada toplam 36 haplotip belirlemiştir, populasyonlar arası ortalama haplotip çeşitliliğini ise 0.47 olarak bulmuşlardır.

COI geni kullanarak *S. maeoticus* türünde yapmış olduğumuz çalışmada ise toplam 3 populasyonda 10 haplotip belirledik ve ortalama haplotip çeşitliliğini 0,6345 olarak bulduk.

Çizelge 4.8. Populasyonlar arası karşılaştırmalı genetik farklılık değerleri. ***, P<0.001

Populasyonlar	KD1	KD2	MD
KD1	—		
KD2	0.001416		
MD	0.001593***	0.001452	—

Populasyonlar arası genetik farklılık düzeyi incelendiğinde en yüksek genetik farklılaşma düzeyi Marmara (MD) ve Doğu Karadeniz (KD1) populasyonları arasında bulunmuştur (Çizelge 4.8). Tüm populasyonlar arasındaki ortalama genetik farklılık (divergence) değeri 0,001485 olarak bulunmuştur. Populasyonların genetik uzaklık değerlerinin ikişerli karşılaştırılması sonucunda sadece Marmara ve Doğu Karadeniz populasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuştur.



Şekil 4.7. Komşu kalıtmalı soyağacı (Neighbour Joining tree) ve nodların güvenilirliğini gösteren seç-bağla (bootstrap) değerleri soyağacı üzerinde gösterilmiştir.

Populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi göstermek adına negatif brans uzunluğuna izin verilen komşu kalıtmalı soyağacı kullanılmıştır. Soyağacının oluşturulmasında güvenilirliği sağlamak için her bir ağaca 1000 tekrarlı bootstrap testleri uygulanmıştır. Komşu kalıtmalı soyağacına göre Doğu Karadeniz populasyonu genetik olarak en farklı populasyon olarak görülmektedir (Şekil 4.7).

Çizelge 4.9. Tajima nötralite testi (Tajima, 1989)

m	S	p_s	Θ	π	D
30	10	0.017668	0.004460	0.001482	-2.114293

m: Sekans sayısı, **S**:Toplam Polimorfik bölge sayısı, **p_s**: Polimorfik bölge oranı, **Θ**: Grup mutasyon oranı, **π**: Nükleotid farklılıkları, **D**: Tajima nötralite değeri

Populasyonların dengede olup olmadığını test etmek amacıyla nötralite testlerinden olan Tajima (1989)'nın nötralite testi uygulanmıştır (Çizelge 4.9). Bu test ile doğal olarak gelişen bir DNA dizisi ile doğal olmayan süreç kapsamında gelişen DNA dizisi ayırt edilmektedir. Çalışmamızda Tajima nötralite değeri (D) -2.114293 bulunmuştur. Tajima D değerinin yeni mutasyonlar yüksek miktarda görüldüğünde, seçici süpürme (selective sweep), ya da populasyon genişlemesi (population expansion) durumlarında negatif çıkmaktadır (Innan, 2000; McVean, 2002; Koban ve ark., 2008, Lenger, 2011).

4.2. Morfolojik Bulgular

4.2.1. Morfometrik ve Meristik Bulgular

Yapılan meristik incelemeler sonucunda ventral ışın sayısı tüm populasyonlarda aynı çıkmıştır ve Samsun (2004)'ün belirttiği gibi 4-7 değerleri aralığında bulunmuştur (Çizelge 4.10). Pektoral ışın sayısı, arka pektoral ışın sayısı, solungaç diken sayısı ve omur sayısı Doğu Karadeniz (KD1) ve Batı Karadeniz (KD2) populasyonlarında aynı çıkmıştır. Populasyonların tümü dikkate alındığında kuyruk yüzgeci Samsun (2004)'e göre *S. maeoticus* türünün kuyruk yüzgeci 14-16 değerleri arasında iken çalışmamızda minimum değer 15 maksimum değer ise 19 ile Doğu Karadeniz (KD1) populasyonunda gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.10. Populasyonların ayırımında kullanılan meristik karakterler ve minimum-maksimum değerleri

Populasyonlar	DIS	PIS	AIS	VIS	APIS	KIS	SDS	OS
KD1 (Trabzon)	60-68	10-13	44-49	6	10-13	15-19	15-17	30-31
KD2 (Düzce)	59-70	10-13	42-51	6	10-13	16-18	15-17	30-31
MD (Mudanya)	61-76	11-12	45-51	6	11-12	16-17	14-17	31

DIS: Dorsal ışın sayısı PIS: Pektoral ışın sayısı AIS: Anal yüzgeç sayısı VIS: Ventral ışın sayısı APIS: Arka pektoral ışın sayısı KIS: Kuyruk yüzgeci sayısı SDS: Solungaç diken sayısı OS: Omur sayısı

Akşiray (1987)'e göre dorsal ışın sayısı 60-71, anal ışın sayısı 44-52 değerleri arasında iken çalışmamızda sırasıyla 59-76 ve 42-51 bulunmuştur.

Populasyonların ayırımında kullanılan ana bileşenler analizi (ABA), *S. maeoticus* populasyonları arasında farklılık oluşturabilecek muhtemel morfometrik ve meristik karakterlerin belirlenmesinde ve örneklerin yaş ve boy farklılıklarından kaynaklı varyasyonun (allometri) elimine edilmesinde kullanılmıştır.

Meristik karakterlerden tüberkül sayılarının ise aynı bölgenin farklı örnekleri arasında dahi yüksek farklılık gösterdiği tespit edilmiş ve bu farklılıktan dolayı populasyon ayırımında etkili bir sonuç gösteremeyeceğinden bu değerler göz önünde bulundurulmamıştır.

Populasyonların ayırımında ana bileşenler analizi (ABA) sonucu 28 ana bileşen üretilmiştir. Varyansların ana bileşenlere göre dağılımı Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre toplam varyansın %48'i birinci ana bileşende, %13'ü ise ikinci ana bileşende toplanmıştır. Böylece ilk ana bileşen toplam varyasyonun %62'lik kısmını oluşturmuştur.

Çizelge 4.11. ABA sonucu varyansların AB'lere dağılımı

Değişken	Varyans (%)	Genel Toplam (%)
AB1	48.370	48.370
AB2	13.275	61.645
AB3	8.697	70.341
AB4	6.222	76.564
AB5	4.564	81.127
AB6	3.473	84.601
AB7	3.036	87.636
AB8	2.035	89.672
AB9	1.881	91.552
AB10	1.660	93.212
AB11	1.429	94.641
AB12	1.218	95.859
AB13	1.013	96.872
AB14	0.820	97.692
AB15	0.715	98.407
AB16	0.464	98.871
AB17	0.282	99.153
AB18	0.275	99.428
AB19	0.204	99.632
AB20	0.092	99.725
AB21	0.085	99.810
AB22	0.075	99.885
AB23	0.055	99.940
AB24	0.038	99.978
AB25	0.008	99.986
AB26	0.007	99.994
AB27	0.005	99.998
AB28	0.002	100.000

ABA analizi sonucu populasyonların ayırımında rol oynayan morfometrik ve meristik karakterlerin etkinlik derecelerinin ana bileşen (AB) unsurlarına göre dağılımı Çizelge 4.12'de verilmiştir.

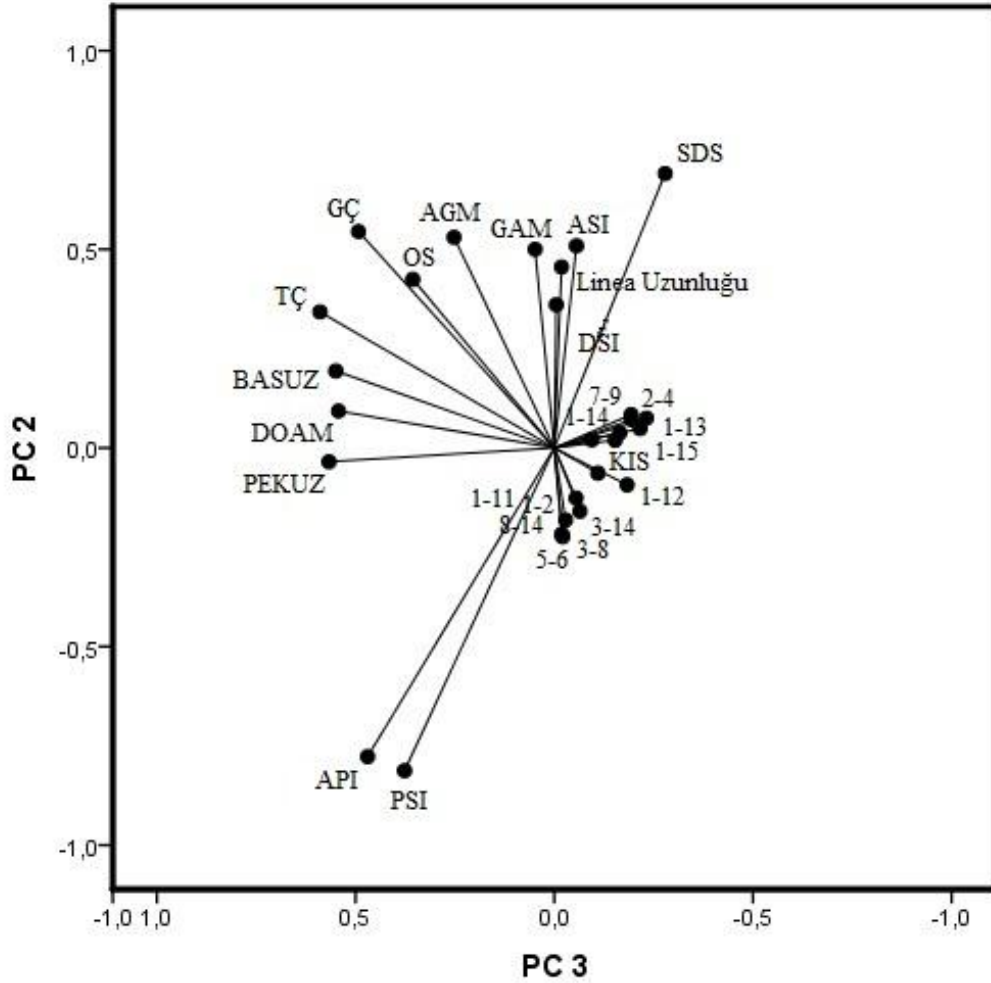
Çizelge 4.12. Morfometrik ve meristik karakterlerin etkinlik derecelerine göre, ana bileşenler analizi (ABA) sonucu sıralanışı.

Değişkenler	AB2	AB3	AB4	AB5
1-14	0.019	-0.153	0.005	0.023
8-14	-0.181	-0.029	-0.024	0.045
7-9	0.071	-0.194	0.076	0.003
2-4	0.084	-0.194	0.093	0.012
3-8	-0.217	-0.019	-0.047	0.042
1-15	0.049	-0.216	0.031	0.052
2-14	0.038	-0.165	0.041	0.011
3-14	-0.159	-0.065	-0.036	0.013
5-6	-0.224	-0.021	-0.063	0.063
1-13	0.075	-0.232	0.025	0.071
1-12	-0.093	-0.183	-0.058	0.034
10-11	-0.063	-0.110	-0.029	0.001
1-2	-0.126	-0.055	-0.120	0.062
BASUZ	0.194	0.550	0.302	-0.167
DOAM	0.093	0.543	0.417	-0.167
Linea uzunluğu	0.456	-0.018	0.002	-0.293
PSI	-0.813	0.377	0.043	0.322
API	-0.777	0.470	-0.008	0.293
SDS	0.691	-0.279	0.035	-0.061
GÇ	0.545	0.493	-0.365	0.153
AGM	0.530	0.252	-0.334	0.280
GAM	0.500	0.048	-0.376	0.470
OS	0.424	0.356	-0.300	0.028
TÇ	0.342	0.589	-0.117	-0.059
PEKUZ	-0.035	0.567	0.254	-0.218
ASI	0.509	-0.056	0.658	0.249
DSI	0.360	-0.005	0.648	0.397
KIS	0.020	-0.094	0.148	0.572

Bu çizelgeye göre; morfometrik karakterlerin meristik karakterlere göre popülasyonların ayrımında daha etkili oldukları gözlenmiş ve morfometrik karakterlerden ağız-göz arası mesafe ve göz çapı ölçümlerinin, meristik karakterlerden ise pektoral ışın sayısı, arka pektoral ışın sayısı ve solungaç diken sayısının ayrımında daha etkili oldukları tespit edilmiştir.

Ana bileşenler analizi sonucu elde edilen ikincil ve üçüncü ana bileşenlerin birbirleri ile grafiklendirilmesi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin vektörel dağılımı incelendiğinde yukardaki sonuçları destekler bir şekilde

ağız-göz arası mesafe, göz çapı, SDS, API ve PSI'nin yüksek derecede etkili olduğunu görmekteyiz (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Ana bileşenler analizi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin ana bileşenlere göre dağılımı.

Kümelerarası Korelasyon Analizi (KKA) sonucu iki fonksiyon elde edilmiş olup, birinci fonksiyon toplam varyansın % 73'ünü ikinci fonksiyonsa % 27'sini içermektedir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Kümelerarası korelasyon analizi (KKA) değerleri

Fonksiyonlar	Eigen Değişkeni	Varyans %	Toplam %	Korelasyon
1	0.521	73	73	0.585
2	0.190	27	100	0.399

Kümelerarası korelasyon analizi sonucu oluşan birinci ve ikinci korelasyonun birlerine olan değerleri istatistiksel olarak önemli ($P < 0.001$) bulunmuş olması populasyonlar arasında görülen farklılığı desteklemektedir (Çizelge 4.14). Wilks' Lambda değeri ve Ki-Kare değeri, ayrışım modelinin gücünü belirlemek için kullanılmıştır. Wilks' Lambda, gruplar içindeki homojenliğin ölçülmesinde kullanılmıştır. Lambda, 0 ile 1 arasında değer almaktadır. 0 değeri, grup ortalamalarının farklılaştığı, 1 değeri ise, tüm grup ortalamalarının aynı olduğu anlamına gelmektedir. Wilks' Lambda değeri çizelge 4. 6'da görüldüğü gibi çok düşük ve 41 gibi büyük bir Ki-Kare ve 0 önemlilik değerine sahiptir. Düşük bir Wilks' Lambda değeri ve önemlilik değeri ile büyük bir Ki-kare değeri, ayrışım modelinin etkili bir ayrıştırma gücüne sahip olduğunu gösterir (Yap ve ark., 2010; Gürlek, 2012).

Çizelge 4.14. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi

Fonksiyon Testi	Wilks' Lambda	Ki-Kare	Serbestlik Derecesi	Önem Düzeyi
1'in 2. fonksiyona olan değeri	0.553	41.816	8	0.000
2	0.841	12.245	3	0.007

Kümelerarası Korelasyon Analizinde (KKA), her bir populasyondaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması sonucu örneklerin tamamının % 68'i doğru olarak kendi orijinal grubuna göre sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Morfometrik ve meristik karakterlerin ayrışım analizi sonucunda her bir gruptaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması

STOK	KD1	KD2	MD	TOPLAM
KD1	21	3	1	25
KD2	6	16	3	25
MD	7	4	14	25
KD1	84	12	4	100
KD2	24	64	12	100
MD	28	16	56	100

Kendi grubuna doğru sınıflandırmada en yüksek oran % 84 ile en anlamlı farklılaşmayı gösteren Doğu Karadeniz (KD1) örnekleri olmuştur. Bu da Doğu Karadeniz popülasyonunun diğer popülasyonlara göre çok daha farklı olduğunu ve Doğu Karadeniz (KD1) popülasyonundan diğer popülasyonlara önemli bir oranda göç olmadığını göstermiştir.

Batı Karadeniz (KD2) popülasyondaki bireylerin kendi grubuna doğru olarak sınıflandırılmasında % 64 gibi bir oran bulunmuştur. Morfometrik ve meristik karakterler bakımından bu popülasyondaki bireylerin 16 tanesi benzerlik gösterirken 6 tanesi Doğu Karadeniz (KD1) popülasyonundaki bireylerle 3 tanesi ise Marmara Denizi (MD) popülasyonlarındaki bireylerle benzerlik göstermiştir.

Bu sonuçlara göre, popülasyonların birbirinden farklı çıkmasının birçok nedeni olabilmektedir. Bölgelerdeki gerek coğrafi, gerekse iklimsel farklılıkların önemi büyüktür. Bununla birlikte balığın bulunduğu ortamın besinsel yönden çeşitli ve zengin olması daha erken gelişmeye neden olabilmektedir. Ayrıca ekolojik faktörlerde balıkların gelişmesinde önemli bir etken olarak sayılabilmektedir.

Denizlerimiz ele alındığında; Karadeniz kendine özgü ekosistemi olan bir yarı kapalı deniz konumundadır. Tuzluluk oranı diğer denizlere göre daha düşüktür. Marmara Denizi, diğer üç denizimize oranla daha küçük bir iç denizimizdir. Ancak son yıllarda aşırı kirliliğe maruz kalmış durumdadır. Bu özellikler göz önüne alındığında popülasyonların morfolojik olarak farklı çıkabilmesinde denizlerimizin yapısal özellikleri de önemli bir faktör teşkil edebilir.

4.2.2. Otolit Şekil Analizi Bulguları

Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonucu 9 ana bileşen üretilmiştir, bu ana bileşenlerin sahip oldukları varyasyon yüzdeleri Çizelge 4.16'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre toplam varyansın % 43'ünü birinci ana bileşende, % 20'sini ise ikinci ana bileşende toplanmıştır. Böylece ilk iki ana bileşen toplam varyansın % 63'ünü temsil etmiştir.

ABA sonucu stokları birbirinden ayırt etmede rol oynayan otolit ölçümlerinin önemliliklerine göre ana bileşen yüklemeleri büyüklük sıralarına göre Çizelge 4.17'de verilmiştir. Buna göre türleri birbirinden ayırt etmede en önemli otolit ölçümü 1-4 ve 2-3 olarak görülmektedir.

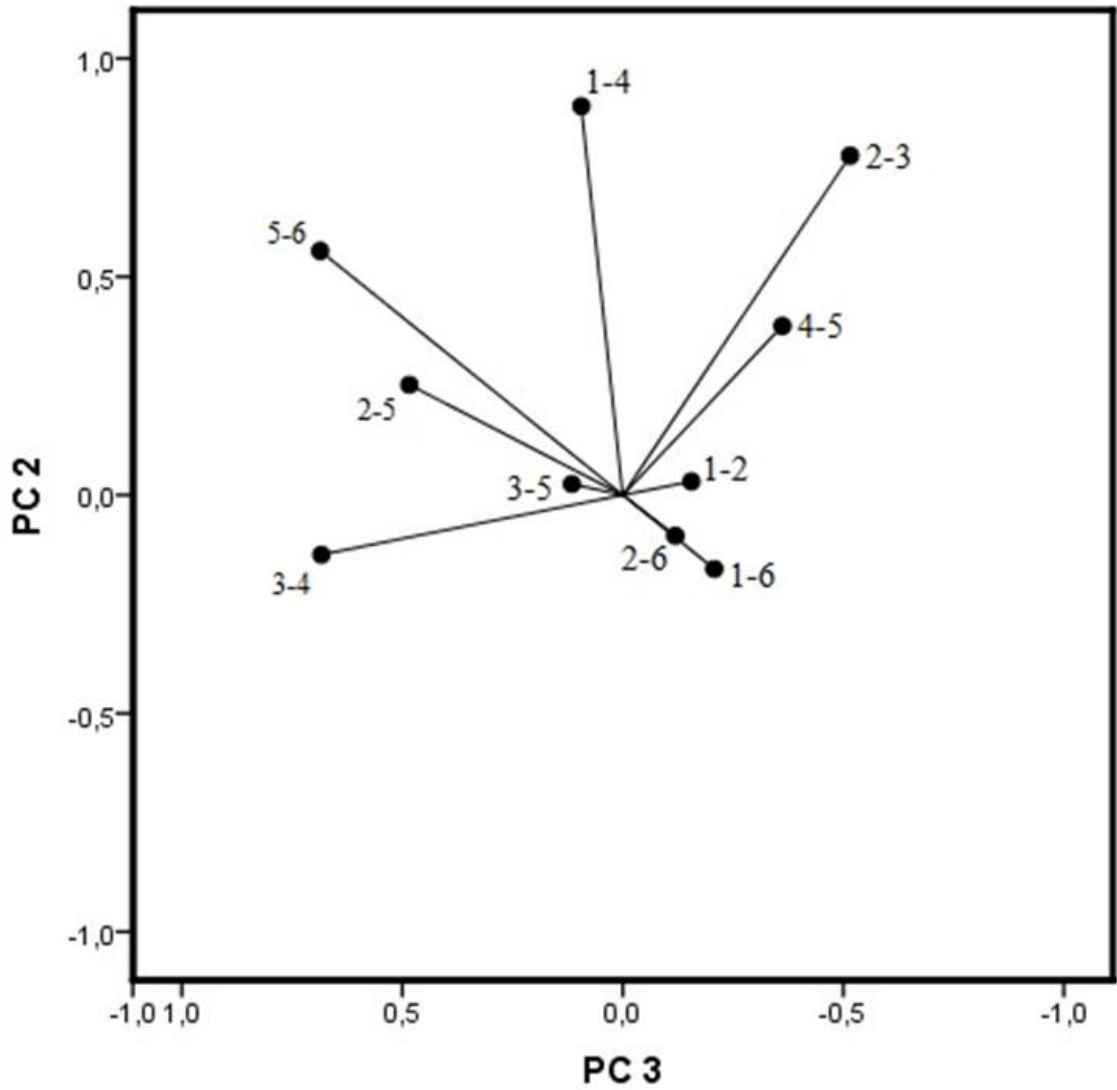
Çizelge 4.16. ABA sonucu varyansların AB'lere dağılımı

Değişken	Varyans (%)	Genel Toplam (%)
AB1	43	43
AB2	20	63
AB3	17	79
AB4	11	90
AB5	4	94
AB6	2	97
AB7	1	98
AB8	1	99
AB9	1	100

Ana bileşenler analizi sonucu elde edilen ikinci ve üçüncü ana bileşenlerin birbirleri ile grafiklendirilmesi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin vektörel dağılımı incelendiğinde yukardaki sonuçları destekler bir şekilde Şekil 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.17. Ana bileşenler analizi sonucu stokları birbirinden ayırt etmede rol oynayan otolit ölçümleri

Değişkenler	AB2	AB3	AB4
2-6	-0.093	-0.119	-0.272
1-6	-0.169	-0.208	0.061
3-5	0.025	0.115	0.296
1-2	0.031	-0.155	-0.530
2-5	0.253	0.484	-0.294
1-4	0.891	0.094	0.083
2-3	0.777	-0.515	-0.160
5-6	0.559	0.686	-0.134
3-4	-0.137	0.684	0.340
4-5	0.387	-0.362	0.620



Şekil 4.9. Ana bileşenler analizi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin ana bileşenlere göre dağılımı.

Türlerin ayrımında otolit ölçümlerinin etkinlik dercesine göre ABA unsurlarına göre sıralanışı Çizelge 4.18’de gösterilmektedir. Buna göre; birinci ana bileşene göre otolit ölçümlerinden ağırlıklı olarak 2-3 ve 1-4 gibi ölçümlerin ayırmda etkili olduğu gözlemlenirken, ikinci ana bileşen için 3-5 ve 4-5 ölçümlerinin etkili olduğu dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.18. Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre otolit ölçümlerinin etkinlik derecesine göre gösterilmesi

Morfolojik karakterler	Fonksiyon	
	1	2
2-3	0.618*	0.426
1-4	0.527*	0.224
3-4	-0.262*	0.163
1-6	-0.229*	0.052
3-5	-0.254	0.421*
4-5	0.094	0.396*
5-6	0.033	0.328*
1-2	0.129	-0.187*
2-6	-0.087	-0.133*
2-5	-0.090	0.115*

*Herhangi bir ayırt edici özellik ve her bir değişken arasındaki mutlak korelasyon

Ana bileşenler analizi sonucu elde edilen ana bileşenler, populasyonlar arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmada kullanılan kümelerarası korelasyon analizinde kullanıldı. KKA sonucu 2 fonksiyon elde edildi ve birinci fonksiyon toplam varyasyonun % 65'ini, ikinci fonksiyon ise toplam varyasyonun % 35'ini taşıdığı görülmüştür (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Kümelerarası korelasyon analizi (KKA) değerleri

Fonksiyonlar	Eigen Değişkeni	Varyans %	Toplam %	Korelasyon
1	0.804	65	65	0.668
2	0.436	35	100	0.551

Yapılan kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimler Çizelge 4.20 ve Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi

	Wilks' Lambda	F	Serbestlik Derecesi 1	Serbestlik Derecesi 2	Önem Düzeyi
1-2	0.972	1.031	2	72	0.362
1-6	0.958	1.564	2	72	0.216
2-6	0.986	0.498	2	72	0.610
2-3	0.722	13.894	2	72	0.000
2-5	0.988	0.443	2	72	0.644
3-5	0.886	4.647	2	72	0.013
5-6	0.955	1.715	2	72	0.187
3-4	0.938	2.399	2	72	0.098
4-5	0.930	2.708	2	72	0.073
1-4	0.803	8.835	2	72	0.000

Çizelge 4.21. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi

Fonksiyon Testi	Wilks' Lambda	Ki-Kare	Serbestlik Derecesi	Önem Düzeyi
1'in 2. fonksiyona olan değeri	0.386	64.237	20	0.000
2	0.697	24.402	9	0.004

Wilks' Lambda değeri tabloda görüldüğü gibi çok düşük ve 64 gibi bir Ki- Kare ve 0 önemlilik değerine sahiptir. Düşük bir Wilks' Lambda değeri ve önemlilik değeri ile büyük bir Ki-kare değeri, ayrışım modelinin etkili bir ayrıştırma gücüne sahip olduğunu gösterir (Yap ve ark., 2010; Gürlek, 2012).

Kümeler Arası Korelasyon analizi (KKA) sonucu, her bir popülasyondaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması sonucu örneklerin tamamının % 69 'u doğru olarak kendi orijinal grubuna göre sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.22). En yüksek farklılaşma oranını (% 80) ise, Doğu Karadeniz (KD1) örnekleri göstermiştir. Bu da Doğu Karadeniz popülasyonunun diğer popülasyonlara göre daha farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 4.22. Otolit ölçümlerinin ayrışım analizi sonucunda her bir gruptaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması

	STOK	KD1	KD2	MD	TOPLAM
<i>Direkt Sayım</i>	KD1	20	4	1	25
	KD2	0	17	8	25
	MD	7	3	15	25
<i>%</i>	KD1	80	16	4	100
	KD2	0	68	32	100
	MD	28	12	60	100

Batı Karadeniz (KD2) populasyonundaki bireylerin kendi grubuna doğru olarak sınıflandırılmasında % 68 gibi bir oran bulunmuştur. Otolit ölçüm değerleri bakımından bu populasyondaki bireylerin 17 tanesi benzerlik gösterirken, 8 tanesi Marmara Denizi (MD), populasyonundaki bireylere benzerlik göstermiştir.

Marmara Denizi (MD) populasyonunun kendi grubuna doğru olarak sınıflandırılmasında % 60 gibi bir oran bulunmuş otolit ölçüm değerleri bakımından bu populasyondaki bireylerin 15 tanesi benzerlik gösterirken, 7 tanesi Doğu Karadeniz (KD1) ve 3 tanesi Batı Karadeniz (KD2) populasyonlarıyla benzerlik göstermiştir.

4.2.3. Otolit Kimya Analizi Bulguları

Yapılan element analizler sonucu her bir populasyon için gözlenen ortalama ve standart sapma (SD) değerleri Çizelge 4.23'de verilmiştir. Buna göre populasyonlar arasında önemli derecede element miktar farklılıkları gözlenmektedir.

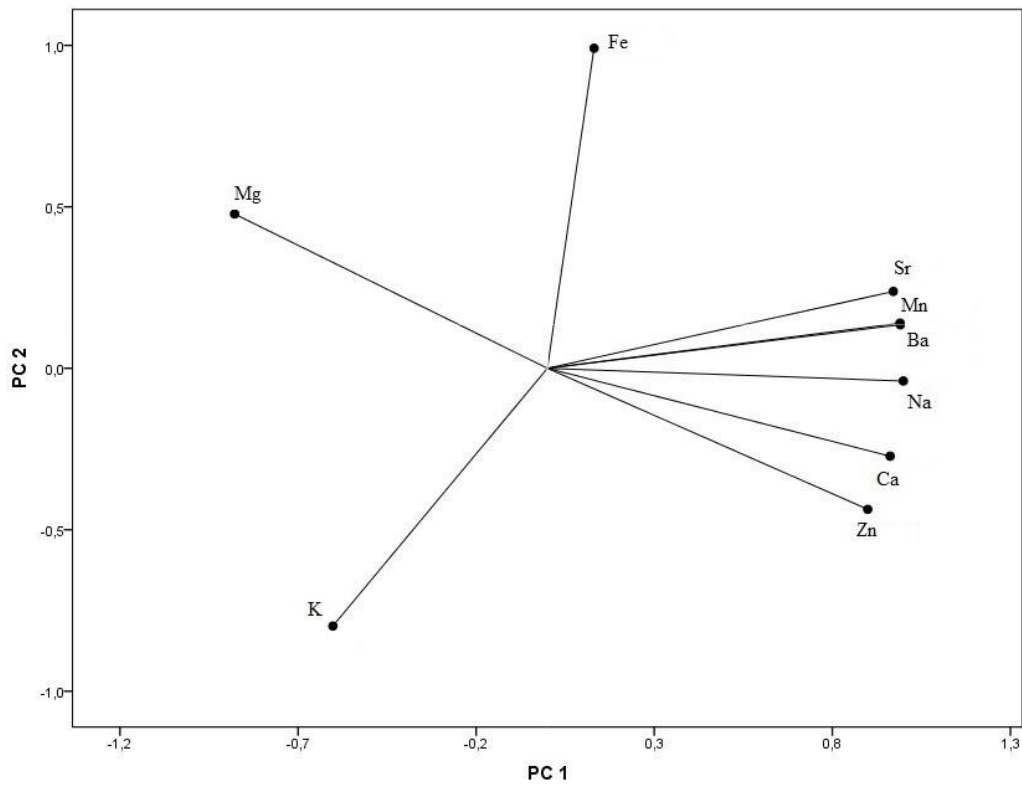
Çizelge 4.23. Element analizi sonucu gözlenen ortalama ve standart sapma değerleri.

Elementler	Populasyon		
	Doğu Karadeniz (KD1)	Batı Karadeniz (KD2)	Marmara Denizi (MD)
Fe ppm	3.59	2.285	0.37
SD	0.2	0.02	0.1
Zn ppm	0.49	2.6789	1.41
SD	0.23	0.004	0.12
Ba ppm	10.37	28.635	6.71
SD	0.02	0.04	0.09
Mg ppm	82.48	51.983	68.48
SD	2.83	0.016	1.83
Mn ppm	8.08	16.749	6.28
SD	0.05	0.015	0.06
Sr ppm	1869.69	3492.315	1274.54
SD	10.19	0.018	14.12
Na ppm	122.71	437.345	129.03
SD	99.65	0.01	59.72
K ppm	431.98	377.08	873.61
SD	7.65	0.11	9.67
Ca g/kg	212.48	473.044	280.37
SD	2.29	0.04	1.96

Yapılan varyans analiz testi (ANOVA) sonucu tüm elementler için populasyonlara arasında önemli derecede farklılık gözlenmiştir ($P < 0.001$). Ana Bileşenler Analizi sonucu 6 ana bileşen üretilmiş ve bu ana bileşenlerin sahip oldukları varyasyon yüzdeleri çizelge 4.24'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre toplam varyansın %75'ini birinci ana bileşende, %25'ü ise ikinci ana bileşende toplanmıştır ve ilk iki ana bileşen toplam varyansın %100'ünü temsil etmiştir.

Çizelge 4.24. ABA sonucu varyansların AB'lere dağılımı

Değişken	Varyans (%)	Genel Toplam (%)
AB1	75	75
AB2	25	100
AB3	0.018	100
AB4	0.003	100
AB5	0.001	100



Şekil 4.10. Ana bileşenler analizi sonucu türleri birbirinden ayırt etmede rol oynayan özelliklerin ana bileşenlere göre dağılımı

Türlerin ayırımında kimyasal elementlerinin etkilik derecesine göre ABA unsurlarına göre sıralanmasında birinci ana bileşene göre elementlerden Na, Ba, Mn, Sr, Ca, Zn ve Mg'un ayırımında etkili olduğunu gözlemlenirken, ikinci ana bileşen için Fe ve K'un etkili olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 4.25). Turan ve ark., (2014)'nın *S. maximus* türünün Doğu Karadeniz, Batı Karadeniz ve Marmara populasyonlarının ayırımı için yaptıkları otolit kimyası çalışmasına göre populasyonları ayırt etmede ilk ana bileşene göre Sr ve Mg, ikinci ana bileşene göre ise Mn ve Na elementlerinin daha

etkili olduğunu söylemişlerdir. Aynı cinse ait iki farklı tür olan *S.maeoticus* ve *S.maximus* arasında elde edilen bu sonuçların bu farklılığı otolit kimyasının türlerin ayrımı için de etkili olabileceğini göstermektedir. Turan ve Yağlıoğlu, (2010) *Sepia officinalis* populasyonlarının ayırımında da kemik kimyasının etkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.25. Ana Bileşenler Analizi (ABA) sonuçlarına göre otolit elementlerinin etkinlik dercesine göre gösterilmesi

Elementler	Fonksiyon	
	1	2
Na	0.999	-
Ba	0.991	0.135
Mn	0.990	0.140
Sr	0.971	0.238
Ca	0.962	-0.272
Zn	0.899	-0.437
Mg	-0.878	0.478
Fe	0.131	0.991
K	-0.602	-0.798

Ana bileşenler analizi sonucu elde edilen ana bileşenler, populasyonlar arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmada kullanılan kümelerarası korelasyon analizinde kullanıldı. KKA sonucu 2 fonksiyon elde edildi ve birinci fonksiyon toplam varyasyonun % 82'sini, ikinci fonksiyon ise toplam varyasyonun % 18'ini taşıdığı görülmüştür (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26. Kümelerarası korelasyon analizi (KKA) değerleri

Fonksiyonlar	Eigen Değişkeni	Varyans %	Toplam %	Korelasyon
1	45794794.860	82	82	1.000
2	10152794.371	18	100	1.000

Wilks' Lambda değeri çizelge 4.27'da görüldüğü gibi çok düşük ve 776 gibi büyük bir Ki- Kare ve 0 önemlilik değerine sahiptir.

Çizelge 4.27. Kümelerarası korelasyon analizi sonuçlarından biri olan istatistik denetimi

Fonksiyon Testi	Wilks' Lambda	Ki-Kare	Serbestlik Derecesi	Önem Düzeyi
1'in 2. fonksiyona olan değeri	0.000	776.778	18	0.000
2	0.000	371.065	8	0.000

Kümeler Arası Korelasyon Analizi sonucu, her bir populyondaki örneklerin kendi grubuna sınıflandırılması sonucunda örneklerin tamamının (%100) doğru olarak kendi orjinal grubuna göre sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.28).

Bu değerlere göre otolit kimyasal analiz sonuçları KD1 (Doğu Karadeniz), KD2 (Batı Karadeniz) ve MD (Marmara Denizi) stokları arasında önemli ölçüde bir farklılık olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.28. Elementlerin ayrışım analizi sonucunda her bir gruptaki örneklerin kendi grubuna sayısal ve % olarak sınıflandırılması

STOK	KD1	KD2	MD	TOPLAM
KD1	10	0	0	10
KD2	0	10	0	10
MD	0	0	10	10
KD1	100	0	0	100
KD2	0	100	0	100
MD	0	0	100	100

Direkt Sayım
%

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada ekonomik değeri olan, dünyada şimdiye kadar populasyon genetiği çalışması bulunmayan *Scophthalmus maeoticus* populasyonlarının Nükleer DNA'ya bağlı mikrosatellit ve mtDNA dizileme teknikleri ile populasyonlar arasındaki genetik ilişkinin derecesinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Genetik çalışmaların yanında populasyonlar morfolojik olarak da incelenmiştir. Ayrıca, populasyon çalışmalarında giderek yaygınlaşan otolit kimyası ve şekil analizi tekniklerinden de faydalanılmıştır.

Denizlerimizde (Doğu Karadeniz, Batı Karadeniz ve Marmara Denizi) bulunan populasyonlardan temsile her bölgeden 25 adet toplamda 75 adet örnekleme yapılmıştır. Türün tanısı ve sistematik ayrımı Slastenenko, (1956); Akşiray, (1987); Fischer ve ark., (1987); Zengin, (2000); Turan ve ark., (2007)'ye göre yapılmıştır.

Denizlerimizden elde edilen bu örnekler ilk olarak SMA1, SMA-02, SMA3, B12-I-GT14 ve 3/9-CA15 genleri kullanılarak Nükleer DNA'ya bağlı mikrosatelite tekniği ile incelenmiş, daha sonra COI geni kullanılarak mtDNA Dizin analizi tekniği ile incelenmiştir. Kullanılan bu iki teknikte populasyonlar arasındaki genetik ilişkinin şekli ve derecesi araştırılmıştır.

Kalkan populasyonlarının mikrosatelite analizi sonucunda 5 mikrosatelite lokusundan toplam 72 adet alel saptanmıştır. Tüm populasyonlarda ortalama alel sayısı ise 14,4 olarak bulunmuştur. *S. maeoticus* populasyonlarında gözlenen heterozigotluk 0,36 ile 0,48 değerleri arasında değişmektedir. Ortalama heterozigotluk değeri ise 0,42 olarak bulunmuştur. Kalkan populasyonları arasındaki F_{ST} analizi sonucunda en küçük uzaklık (0.19549) Marmara Denizi ve Batı Karadeniz populasyonları arasında görülürken, en büyük uzaklık (0.21755) ise Marmara Denizi ve Doğu Karadeniz populasyonları arasında görülmüş olup tüm populasyonların genetik olarak birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir.

Populasyonlar içi genetik çeşitlilik değeri en küçük olan Doğu Karadeniz (KD1) populasyonunda gözlemlenmiştir. Bu durumun Doğu Karadeniz populasyonu üzerindeki avcılık baskının yoğunluğundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. En yüksek genetik çeşitlilik ise Batı Karadeniz populasyonunda olduğu gözlemlenmiştir.

DNA dizin analizi sonucunda, populasyonlar içi ortalama genetik çeşitlilik en düşük (0.001337) Batı Karadeniz populasyonunda belirlenmiştir. Bu sonuç Batı Karadeniz populasyonunun yakın bir geçmişte genetik dar boğaza girmiş olabileceği ihtimalini işaret etmektedir. Genetik çeşitlilik değeri en yüksek ise (0.001692) Marmara Denizi populasyonunda olduğu bulunmuştur. Populasyonlar arası genetik farklılık düzeyi incelendiğinde en yüksek genetik farklılaşma düzeyi Marmara (MD) ve Doğu Karadeniz (KD1) populasyonları arasında bulunmuştur. Populasyonların genetik farklılıklarına baktığımızda sadece Marmara ile Doğu Karadeniz populasyonlarının birbirlerinden farklı oldukları gözlenmiştir. Komşu kalıtmı soy ağacı (Neighbour Joining tree) sonuçlarına göre Doğu Karadeniz populasyonu genetik olarak en farklı populasyon olarak karşımıza çıkmıştır. Batı Karadeniz ve Marmara Denizi populasyonları ise birbirlerine yakın çıkmıştır. Gözlenen bu farklılık Trabzonun sahip olduğu çevresel farklılıktan ve Marmara ve Batı Karadeniz populasyonlarından jeoğrafik olarak izole olduğundan populasyonlar arasında sınırlı gen akışı olduğunu ve bundan kaynaklı farklılaşmanın oluştuğu varsayılabilir.

Populasyonlar arasındaki morfolojik ilişkiyi tespit etmek amacıyla kümeler arası korelasyon analizi (KKA) yapılmıştır, analiz sonucunda Doğu Karadeniz (KD1) populasyonu Batı Karadeniz (KD2) ve Marmara Denizi (MD) populasyonlarından farklılık göstermiştir. Yapılan otolit şekil analizi sonucunda da Batı Karadeniz (KD1) populasyonu diğer populasyonlardan farklı çıkmıştır. Bu sonuçlar otolit şekillerinin populasyonlar arasındaki ilişkiyi saptamak için en az morfolojik karakterler kadar etkili olduğunu göstermektedir.

Balıklardaki morfometrik karakterler, ortamda bulunan besin yoğunluğu ve sıcaklık gibi çevresel koşullardaki değişikliklere bağlı olarak fenotipik farklılık gösterirler. Doğu Karadeniz ve Batı Karadeniz bölgesindeki sıcaklık, tuzluluk ve besin yoğunluğu gibi faktörlerin farklılaşma göstermesi Doğu Karadeniz (KD1) ve Batı Karadeniz (KD2) populasyonları arasında fenotipik farklılaşmaya neden olabilir.

Marmara (MD) ve Batı Karadeniz (KD2) populasyonları ise morfometrik karakterler ile otolit şeklinde de fenotipik olarak benzerlik göstermiştir. Marmara Denizi ve Batı Karadeniz örnekleri arasındaki bu benzerliğin sebebi aralarındaki coğrafik yakınlık, buna bağlı olarak populasyonlar arasındaki yüksek gen akışı ve etkisi altında oldukları benzer çevresel koşullardır. Yapılan araştırmalar, morfolojik varyasyonların

belirlenmesinde çevresel faktörlerin büyük rol oynadığını (Winans, 1984) ve özellikle de yaşamın ilk evrelerindeki gelişim koşullarının, meristik karakterlerin belirlenmesinde büyük oranda etkili olabileceğini belirtmiştir (Bembo ve ark., 1996).

Morfometrik ve meristik karakterlerin etkinlik derecelerini belirlemek için yapılan ABA sonucuna göre linea uzunluğu, ağız-göz arası mesafe, gözler arası mesafe, göz çapı, pektoral ışın sayısı, arka pektoral ışın sayısı ve solungaç diken sayısının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Demir (1968)'e göre balıklarda bulunan solungaç dikenlerindeki gelişimin sadece ontogenetik gelişim süresince değil, balığın tüm yaşamı boyunca devam ettiğini ve buna bağlı olarak diğer karakterlere göre çevresel faktörlerden daha çok etkilendiğini belirtmiştir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlara göre morfometrik karakterler meristik karakterlere göre daha fazla farklılık göstermiştir. Buda populasyonların ayırımında morfometrik karakterlerin daha etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Yapılan otolit kimyası sonuçlarına göre Doğu Karadeniz (KD1), Batı Karadeniz (KD2) ve Marmara (MD) populasyonlarının kendi gruplarına göre yapılan sınıflandırmasında tümü birbirinden farklılık göstermiştir. Otolitler ortamdaki element ve bileşenlerin katmanlaşmasıyla büyüyen yapılardır. Buna bağlı olarak balığın içinde yaşadığı su kompozisyonunu da içerebilirler (Campana ve Neilson, 1985, Campana, 1999). Türkiye denizleri, biyotik ve abiyotik faktörler bakımından birbirleriyle benzeşmeyen farklı yapılar gösterir. Kapalı deniz özelliğini taşıyan Türkiye denizleri birbirleriyle olan ilişkilerine rağmen denizel ortamlardaki ekolojik farklılık nedeniyle verimlilik dereceleri ve üretim olarak da ayrımları barizdir. Karadeniz'in hidrokimyasal özellikleri hakkında yapılan çalışmalarda Karadeniz'in iyonik bileşenleri araştırılmış ve Marmara Denizi'yle karşılaştırıldığında farklı bulunmuştur. Buna ek olarak Batı Karadeniz bölgesindeki demir-çelik fabrikaları ve diğer sanayi kuruluşlarının atıklarının denize deşarjı bu bölgedeki deniz suyu yapısına etki etmektedir (Ataç, 1997). Deniz sularının hidrokimyasal ve fiziksel özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar bulduğumuz otolit kimyası sonuçlarını destekler niteliktedir. Sonuç olarak bu bulgular değerlendirildiğinde su parametrelerinin otolit yapısı üzerinde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

S. maeoticus'un yapısını incelemek için yapmış olduğumuz çalışma sonucunda elde edilen moleküler genetik analizler, morfometrik-meristik analizler ve otolit kimyası

analizleri değerlerine göre tüm analizler birbirini kısmen veya tamamen destekler nitelikte çıkmıştır.

Sonuç olarak elde edilen tüm bu sonuçlar ışığında, genetik ve morfolojik olarak Doğu Karadeniz ve Marmara Denizi *S. maeoticus* populasyonları birbirinden bağımsız iki farklı stoğu oluşturdukları ve Batı Karadeniz stoğunun ise bu iki stok arasında kısmen veya sınırlı gen akışı içinde olabileceğini söyleyebiliriz.

Yapmış olduğumuz mikrosatelit, DNA dizileme ve morfometrik analizlerin sonuçlarının hepsinde Doğu Karadeniz populasyonun farklılık göstermesi bu bölgede avcılık baskısının çok olmasından ve/veya deniz kirliliğinden kaynaklanabilir. Bu bölgede deniz kirliliğinin yüksek oluşuyla ilgili bir çevresel literatür rastlanmadığından. Avcılık baskının çok olması bölgede bulunan *S. maeoticus* stoklarının azalmasına neden olduğu düşünülebilir. Bunların önüne geçmek için Doğu Karadeniz bölgesinde av yasağı 1-2 yıl getirilebilir, avlanma boyu arttırılarak balığa avlanmadan önce daha fazla üreme şansı verilerek stokların artması sağlanabilir ve/veya bölgede av yasağı süresi uzatılabilir.

KAYNAKLAR

- Akşiray, F., 1987. Türkiye deniz balıkları ve tayin anahtarı (1.Baskı), İ.Ü Yayınları, 324-327 ss.
- Ataç, Ü., 1997. Karadeniz bölgesi'nde su kirliliğine sebep olan faktörlerin belirlenmesi ve su ürünlerine etkilerinin araştırılması. **Yunus Araştırma Bülteni**, 2005(2).
- Atanassov, I., Ivanova, P., Panayotova, M., Tsekov, A. ve Rusanov, K., 2011. Mitochondrial control region DNA variation in turbot populations from the Bulgarian and Romanian Black Sea coasts. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 25(4): 2627-2633.
- Avşar, D., 1999. Identification of turbot (*Scophthalmus maximus*) stock along the Turkish Black Sea coast. **Turkish Journal of Zoology**, 23(EK1): 207-214.
- Bembo, D. G., Carvalho, G. R., Cingolani, N., Arneri, E., Giannetti, G. ve Pitcher, T. J., 1996. Allozymic and morphometric evidence for two stocks of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in Adriatic waters. **Marine Biology**, 126: 529-538.
- Blin, N. ve Stafford, D.W., 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. **Nucleic acids research**, 3(9): 2303-2308.
- Bouza C, Sánchez L, Martínez P. 1997., Gene diversity analysis in natural populations and cultured stocks of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Animal Genetics**, 28, 28–36.
- Bouza, C., Presa, P., Castro, J., Sánchez, L. ve Martinez, P., 2002. Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 59(9): 1460-1473.
- Campana, S. E., Neilson, J. D., 1985. Microstructure of fish otoliths. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42(5): 1014-1032.
- Campana, S. E. ve Casselman, J. M., 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 50(5): 1062-1083.
- Campana, S. E., 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. **Marine ecology. Progress series**, 188: 263-297.
- Carvalho, G.R. ve Hauser, L., 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4: 269-271.
- Clark, T. B., Ma, L., Saillant, E. ve Gold, J. R., 2004. Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) and other species of genus Thunnus. **Molecular Ecology Notes**, 4(1): 70-73.
- Coughlan, J. P., Galvin, P. T., Fitzgerald, R. D., Naevdal, G. ve Cross, T. F., 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. **Journal of Fish Biology**, 52(5): 916-922.
- Demir, N., 1968. Analysis of local populations of the anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), in Turkish waters based on meristic characters. **İstanbul Üniv. Fen Fak. Mec. Ser. B**, 33(1-2): 25-57.

- Ergüden, D., Gürlek, M., Yağlıoğlu, D., ve Turan, C., 2010. Genetic identification and taxonomic relationship of Mediterranean mugilid species based on mitochondrial 16S rDNA sequence data. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 9(2): 336-341.
- Espiñeira, M., González-Lavín, N., Vieites, J. M. ve Santaclara, F. J., 2008. Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. **Journal of agricultural and food chemistry**, 56(19): 8954-8961.
- Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J. M., Adriamanga, M., Guyomard, R., 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). **Molecular Ecology**, 7(3): 339-353.
- Excoffier, L., Laval, G. ve Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, 1: 47.
- Felsenstein, J., 2002. {PHYLIP}(Phylogeny Inference Package) version 3.6 a3.
- Fischer, W., Schneider M., Bauchot M.L., 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume II. Vertébrés. Publication Préparée par la FAO et la Commission des Communautés Européennes (Projet GCP/INT/422/EEC) financée conjointement par ces deux organisations. FAO, Rome, 761-1530.
- Florn A. B. ve Höglund, J., 2007. Absence of population structure of turbot (*Psetta maxima*) in the Baltic Sea. **Molecular Ecology**, 16: 115–126.
- Garza, J. C., ve Williamson, E. G., 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular ecology**, 10(2): 305-318.
- Guo, S. W. ve Thompson, E. A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, 361-372.
- Gürlek, M., 2012. Doğu Akdeniz'deki Caranx (Carangidae) Cinsine ait Türlerinin Moleküler Filogenetiği. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 64 s.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, 41: 95-98.
- Innan, H., ve Stephan, W., 2000. The coalescent in an exponentially growing metapopulation and its application to Arabidopsis thaliana. **Genetics**, 155(4); 2015-2019.
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, Heipel DA, Stone DM, Howell BR, Child AR, Maclean N., 2000. A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) with potential for use across several flatfish species. **Mol. Ecol.** 9: 365-378.
- Jukes, T. H., ve Cantor, C. R., 1969. Evolution of protein molecules. **Mammalian protein metabolism**, 3; 21-132.
- Koban, M., Sita, L. V., Le, W. W., ve Hoffman, G. E., 2008. Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. **Sleep**, 31(7): 927.

- Lenger, Ö. F., 2011. Türkiye'deki yerli tavuk ırkları ve ticari tavuk tipleri arasındaki, mhc gen bölgesindeki, genetik farklılıkların belirlenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 82 s.
- Levene, H., 1949. On matching problem arising in genetics. **Annals of Mathematical Statistics**, 20: 91-94.
- Librado, P., ve Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25(11): 1451-1452.
- Liu, Y. G., Liu, L. X., Lei, Z. W., Gao, A. Y., Li, B. F., 2006. Identification of polymorphic microsatellite markers from RAPD product in turbot (*Scophthalmus maximus*) and a test of cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, 6(3): 867-869.
- McConnell, S., Hamilton, L., Morris, D., Cook, D., Paquet, D., Bentzen, P., ve Wright, J., 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. **Aquaculture**, 137(1): 19-30.
- McVean, G. A., 2002. A genealogical interpretation of linkage disequilibrium. **Genetics**, 162(2): 987-991.
- Merigot, B., Letourneur, Y., Lecomte-Finiger, R., 2007. Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. **Marine Biology**, 151(3): 997-1008.
- Navajas-Pérez, R., Robles, F., Molina-Luzón, M. J., De La Herran, R., Álvarez-Díos, J. A., Pardo, B. G. ve Martínez, P., 2012. Exploitation of a turbot (*Scophthalmus Maximus* L.) immune-related expressed sequence tag (Est) database for microsatellite screening and validation. **Molecular Ecology Resources**, 12(4): 706-716.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89(3): 583-590.
- Nielsen, E. E., Nielsen, P. H., Meldrup, D., Hansen, M. M., 2004. Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea. **Molecular Ecology**, 13(3): 585-595.
- Pardo, G. B., Casas, L., Fortes, G. G., Bouza, C., Martínez, P., Clark, M. S., ve Sánchez, L., 2005. New microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) derived from an enriched genomic library and sequence databases. **Molecular Ecology Notes**, 5(1): 62-64.
- Rodríguez-Ramilo, S. T., Toro, M. Á., Martínez, P., Castro, J., Bouza, C., ve Fernández, J., 2007. Accuracy of pairwise methods in the reconstruction of family relationships, using molecular information from turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, 273(4), 434-442.
- Rooker, J. R., Secor, D. H., Zdanowicz, V. S., De Metrio, G. ve Relini, L. O., 2003. Identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) stocks from putative nurseries using otolith chemistry. **Fisheries Oceanography**, 12: 75-84.

- Ruan, X., Wang, W., Kong, J., Yu, F., ve Huang, X., 2010. Genetic linkage mapping of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using microsatellite markers and its application in QTL analysis. **Aquaculture**, 308(3): 89-100.
- Ruan, X. H., Wang, W. J., Kong, J., Hu, J. J., 2011. Isolation and analysis of microsatellites in the genome of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Afr J Biotechnol**, 10(4): 507-518.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, Scharf, S.J., Beddington, J.R., 1988. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Samsun, N., 2004. Sinop yöresinde avlanan kalkan (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) balıklarının, bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, OMÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 162 s.
- Samsun, N., Samsun, S., 2006. Kalkan (*Scophthalmus maeoticus* Pallas, 1811) balığının otolit yapısı, yaş ve balık uzunluğu-otolit uzunluğu ilişkilerinin belirlenmesi. **Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Der.**, 18(2): 181-187.
- Shaw, P. W., Turan, C., Wright, J. M., O'connell, M., ve Carvalho, G. R., 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. **Heredity**, 83(4): 490-499.
- Slastenenko, E., 1956. Karadeniz Havzası Balıkları [Fishes of Black Sea Basin]. **Et ve Balık Kurumu Yayınları**, İstanbul, 711 s.
- Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 139: 457-462.
- Somers, K. M., 1986. Multivariate allometry and removal of size with principal components analysis. **Systematic Biology**, 35(3): 359-368.
- Stepien, C. A., 1999. Phylogeographical structure of the dover sole *Microstomus pacificus*: the larval retention hypothesis and genetic divergence along the deep continental slope of the northeastern Pacific Ocean. **Molecular Ecology**, 8: 923-939.
- Suzuki, N., Kondo, M., Gunes, E., Ozongun, M., ve Ohno, A., 2001. Age and growth of turbot *Psetta maxima* in the Black Sea, Turkey. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 1(2).
- Suzuki, N., Nishida, M., Yoseda, K., ÜstÜndağ, C., Şahin, T., ve Amaoka, K., 2004. Phylogeographic relationships within the Mediterranean turbot inferred by mitochondrial DNA haplotype variation. **Journal of fish biology**, 65(2): 580-585.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123(3): 585-595.
- Takagi, M., Taniguchi, N., Cook, D., ve Doyle, R. W., 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. **Fisheries science**, 63(2): 199-204.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., ve Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, 28(10): 2731-2739.

- Turan, C., 1999. A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: the truss system. **Turkish Journal of Zoology**, 23: 259-264.
- Turan, C., 2000a. Stok ve tür tespitinde kullanılan moleküler genetik teknikler. **IV. Su Ürünleri Sempozyumu**, Erzurum, 151-152.
- Turan, C., 2000b. Otolith shape and meristic analysis of herring (*Clupea harengus*) in the North-East Atlantic. **Archive of Fishery and Marine Research**, 48: 213-225.
- Turan, C., ve Başusta, N., 2001. Comparison of morphometric characters of twaite shad (*Alosa fallax nilotica*, Geoffroy Saint-Hilaire, 1808) among three areas in Turkish seas. **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, (362-363): 1027-1035.
- Turan, C., Gurlek, M., 2003. Akdenizde bulunan barbunya türleri (*Mullidae*) arasındaki taksonomik ilişkinin otolit şekil analizi ile tespiti. **XII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu**, Elazığ, 4-9.
- Turan, C., Aka, Z., 2003. Türkiye denizlerinde bulunan bakalyaro (*Merluccius merluccius*)'nun otolit şekil analizi ile stok tespiti. Ulusal Su Günleri 2003 (22-24 Ekim 2003, Ankara), 220-226.
- Turan, C., ve Oral, M., 2005. A computer package program for morphometric identifications of fish populations: MorFISH. In ITAFE'05-International congress on information technologies in agriculture, Food and Environment, Cukurova University, Adana, Turkey, October. 12-14.
- Turan, C., 2006. The use of otolith shape and chemistry to determine stock structure of Mediterranean horse mackerel *Trachurus mediterraneus* (Steindachner). **Journal of Fish Biology**, 69(sc): 165-180.
- Turan, C., Ozturk, B., Erguden, D., Gurlek, M., Yaglioglu, D. ve Uygur, N., 2007. Atlas of marine bony fishes of Turkey. Atlas and systematic of marine bony fishes of Turkey. Nobel Publishing House, Adana, 83-485.
- Turan, C., ve Yaglioglu, D., 2010. Population identification of common cuttlefish (*Sepia officinalis*) inferred from genetic, morphometric and cuttlebone chemistry data in the NE Mediterranean Sea. **Scientia Marina**, 74(1): 77-86.
- Turan, C., Öksüz, A., Gürlek, M., Uyan, A., Karan, S., 2014. Stock structure analysis of turbot *Scophthalmus maximus* using otolith chemistry. **10th International Hydrogeological Congress**, Thessaloniki, Greece.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38: 1358-1370.
- Wimberger, P., Burr, J., Gray, A., Lopez, A., ve Bentzen, P., 1999. Isolation and characterization of twelve microsatellite loci for rockfish (Sebastes). **Marine Biotechnology**, 1(3): 311-315.
- Winans, G. A., 1984. Multivariate morphometric variability in pacific salmon -technical demonstration. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 41, 1150-1159.
- Yap, B., Yong, D. G., Poon, W. C., 2010. How Well do financial ratios and multiple discriminant analysis predict company failures in Malaysia. **International Research Journal of Finance and Economics**, 54: 166-175.

- Zengin, M. 2000. Türkiye'nin Doğu Karadeniz kıyılarındaki kalkan (*Scophthalmus maeoticus*) balığının biyoekolojik özellikleri ve populasyon parametreleri, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, Trabzon, 225 s.
- Zengin, M., Gümüş, A. ve Bostancı, D., 2006. Age and growth of the Black Sea turbot, *Psetta maxima* (Linneaus, 1758) (Pisces: Scophthalmidae), estimated by reading otoliths and by back-calculation. **Journal of Applied Ichthyology**, 22: 374–381.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kütahya'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Kütahya'da tamamladı. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden 2012 yılında Su Ürünleri Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2013 yılında başladığı Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.