

**T.C.**  
**HALIÇ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**SPARIDAE (PERCIFORMES, ACTINOPTERYGII)**  
**TÜRLERİNDE MİTOKONDRIYAL GENOM EVRİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan**  
**Deniz KANCA**

**Danışmanı**  
**Yrd.Doç.Dr. Mehmet Baki YOKEŞ**

**İstanbul – 2011**

T.C.

HALIÇ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi Deniz KANCA tarafından hazırlanan “Sparidae (Perciformes, Actinopterygii) Türlerinde Mitokondriyal Genom Evrimi” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 03.10.2011

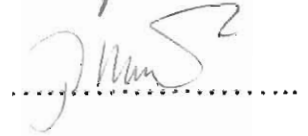
( Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu ) :

İmzası :

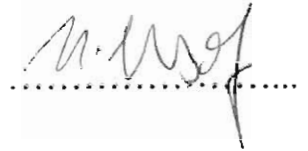
Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.M.Baki YOKEŞ  
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Doç.Dr.Murat BİLECENOĞLU  
Adnan Menderes Üniv. Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY  
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Burcu Irmak YAZICIOĞLU  
HAL.Üniv. Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Ergül BERBER  
Arel Üniv. Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, 2009-2011 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Hem lisans hem de yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana gösterdiği sonsuz sabır ve verdiği destek ile tez çalışmamın tamamlanmasını mümkün kılan danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr. Mehmet Baki Yokeş'e teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmamda kullanılmak üzere gerekli örneklere erişimi sağladığı için kendisine minnettarım.

Bütün hayatım boyunca olduğu gibi tez dönemim boyunca da göstermiş oldukları anlayış, sabır ve maddi manevi desteklerinden dolayı canım annem Nurhan ve babam Macit, biricik halam Mürvet Kanca ve kardeşim Tayfun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2011

Deniz KANCA

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

Şekil Listesi .....	III
Tablo Listesi .....	IV
Kısaltmalar .....	V
Genel Bilgiler .....	VI
General Information.....	VII
1. Giriş	
1.1.Evrim .....	1
1.1.1. Evrime Genel Bir Bakış .....	1
1.1.2. Evrim Araştırmalarının Tarihi .....	1
1.1.3. Moleküler Evrim .....	3
1.1.3.1. DNA ve Dizi Evrimi .....	4
1.1.3.2. Moleküler Evrimin Nötral Teorisi .....	6
1.1.3.2.1. Markov Modeli .....	7
1.2.Mitokondri .....	7
1.2.1. Genel Tanımı, Kökeni .....	7
1.2.2. Mitokondriyal Genom .....	11
1.2.2.1. D-Halkası .....	13
1.2.2.2. Sitokrom B Geni .....	13
1.2.2.3. NADH Dehidrogenaz Genleri .....	14
1.2.2.4. Sitokrom Oksidaz Genleri .....	14
1.2.2.5. ATPaz Genleri .....	14
1.2.2.6. 12S ve 16S rRNA Genleri .....	14
1.2.2.7. tRNA Genleri .....	15
1.2.3. Markör Olarak Mitokondri.....	15
1.3.Actinopterygii, Perciformes.....	17
1.3.1. Sparidae .....	19
1.3.2. Akdeniz'deki Sparidae Türleri .....	20
1.3.3. Sparidae Ailesinde Genetik Çalışmalar.....	20
2. Amaç .....	27
3. Materyal.....	27
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler .....	27
3.2. Genomik DNA İzolasyon Metodu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar .....	28
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Kimyasallar ve Tamponlar.....	28
3.3.1. Oligonükleotit Primerler.....	29
3.4. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar ....	29
3.5. DNA Büyüklük Markörleri .....	29
3.6. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	29
3.7. Cihazlar .....	30

3.8. Laboratuvar Gereçleri.....	30
3.9. Bilgisayar Programları.....	31
4. Metot .....	32
4.1. DNA İzolasyonu .....	32
4.2. Agaroz Jel Elektrophorezi .....	32
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	33
4.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	34
4.5. Dizi Analizi .....	34
4.6. Filogenetik Analiz .....	34
5. Bulgular .....	36
5.1. Örneklerin Tanımı .....	36
5.2. DNA İzolasyonu .....	36
5.3. 16S rRNA Geninin Moleküler Analizi .....	36
5.4. Sitokrom Oksidaz I Geninin Moleküler Analizi .....	37
5.5. PZR Ürünlerinin Dizi Analizi İçin Saflaştırılması .....	37
5.6. Çoğaltılan Gen Bölgelerinin Dizi Analiz Sonuçları .....	37
5.7. Verilerin Analizi .....	38
6. Tartışma .....	48
7. Kaynaklar.....	56
7.1. Makaleler.....	56
7.2. Kitaplar.....	60
7.3. İnternet .....	61
8. Özgeçmiş .....	62

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Transversiyon ( $\beta$ ) ve Transisyonların ( $\alpha$ ) Oranını Veren Kimura (1980) Yer Değiştirme Modeli .....	5
Şekil 1.2.	Mitokondrinin Yapısı .....	8
Şekil 1.3.	Mitokondri ve Çekirdek Arasındaki Etkileşim .....	8
Şekil 1.4.	Mitokondrinin Heteroplazmik Kalıtımı .....	9
Şekil 1.5.	Mitokondrinin Halkasal Genomu .....	12
Şekil 1.6.	Kuzeydoğu Akdeniz ve Atlantik'ten Alman 31 Karagöz Türünün 16S rDNA Bölgesi ile Yapılan Filogenetik Analizi .....	22
Şekil 1.7.	ML Analiziyle 13 Protein Kodlayan Genin Verileri Üzerinden Oluşturulan Soy Ağacı .....	24
Şekil 5.1.	İzole Edilen DNA Örneklerinin %0,7'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi .....	36
Şekil 5.2.	16S rRNA PZR Ürünlerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi ...	36
Şekil 5.3.	COI PZR Ürünlerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi .....	37
Şekil 5.4.	Saflaştırılan PZR Ürünlerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi .....	37
Şekil 5.5.	<i>Diplodus annularis</i> Türüne Ait Kromatogram Görüntüsü .....	38
Şekil 5.6.	Aynı Türün İki Bireyinin Karşılaştırmalı Kromatogram Görüntüsü ..	39
Şekil 5.7.	İki Farklı Türün Bireyinin Karşılaştırmalı Kromatogram Görüntüsü .....	39
Şekil 5.8.	MrBayes Platformunda Bayesian Analiziyle 16S rRNA Gen Verisiyle Çizilen Soy Ağacı .....	42
Şekil 5.9.	PAUP Platformunda ML Analiziyle 16S rRNA Gen Verisiyle Çizilen Soy Ağacı .....	43
Şekil 5.10.	PAUP Platformunda MP Analiziyle 16S rRNA Gen Verisiyle Çizilen Soy Ağacı .....	44
Şekil 5.11.	MrBayes Platformunda Bayesian Analiziyle COI Verisiyle Çizilen Soy Ağacı .....	45
Şekil 5.12.	PAUP Platformunda ML Analiziyle COI Verisiyle Çizilen Soy Ağacı .....	46
Şekil 5.13.	PAUP Platformunda MP Analiziyle COI Verisiyle Çizilen Soy Ağacı .....	47
Şekil 6.1.	16S rDNA Verilerine Dayanarak Oluşturulan Konsensus Soy Ağacı .....	49
Şekil 6.2.	Sparidae Üyelerinin Dental Morfolojilerine Göre Yapılan Sınıflandırma .....	50
Şekil 6.3.	16S rRNA ve Cytb Gen Verilerinden ML Analizi ile Oluşturulan Soy Ağacı .....	51

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1.1. Hayvan Mitokondriyal Genleri ve Gen Ürünleri .....	11
Tablo 1.2. Sparidae Ailesine Kadar Ulaşan Sınıflandırma Basamakları .....	18
Tablo 1.3. Akdeniz'deki Sparidae Türleri .....	20
Tablo 3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler .....	27
Tablo 3.2. Oligonükleotit Primerler .....	29
Tablo 4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İçeriği .....	33
Tablo 4.2. 16S PZR Döngü Koşulları .....	33
Tablo 4.3. COI PZR Döngü Koşulları .....	33
Tablo 5.1. 16S Geni İncelenen Bireylerin Literatürdeki Bireylerle Karşılaştırma Verileri .....	40
Tablo 5.2. COI Geni İncelenen Bireylerin Literatürdeki Bireylerle Karşılaştırma Verileri .....	40

## KISALTMALAR

<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>cytb</b>	: Sitokrom b geni
<b>CO</b>	: Sitokrom oksidaz geni
<b>ND</b>	: NADH Dehidrogenaz geni
<b>ATPaz</b>	: ATP sentetaz geni
<b>16S rDNA</b>	: Büyük ribozomal alt birim geni
<b>12S rDNA</b>	: Küçük ribozomal alt birim geni
<b>mRNA</b>	: Elçi RNA molekülü
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA molekülü
<b>tRNA</b>	: Taşıyıcı RNA molekülü
<b>bç</b>	: Baz çift
<b>kbç</b>	: Kilo baz çift
<b>BPB</b>	: Brom fenol mavisi
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotit
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit
<b>TBE</b>	: Tris-Borik asit-EDTA
<b>TE</b>	: Tris-EDTA
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>L</b>	: Litre
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>M</b>	: Molar
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>U</b>	: Ünite
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>mA</b>	: MiliAmper
<b>V</b>	: Volt
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Amonyum sülfat
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>MM</b>	: Master Miks
<b>ML</b>	: Maksimum Likelihood
<b>MP</b>	: Maksimum Parsimony



## GENEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Deniz KANCA  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Mehmet Baki YOKEŞ  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans - Eylül 2011

### ÖZET

Populasyon çalışmaları ve filogenetik analizler, türler içindeki ve türler arasındaki bağlantıları ortaya koymanın yanı sıra bireylerin kendi aralarındaki ve çevre ile etkileşimlerini de açıklamaya yarar. Farklı coğrafi ve iklimsel koşullara uyum sağlamaya çalışan türlerin gen havuzlarında olan değişimler evrimin temel mekanizmasını oluşturur. Bireylerin genetik yapısındaki değişime sebep olan mutasyonlar, bu mekanizmanın temel direğidir.

Tür içinde ve türler arasındaki evrimsel ilişkileri açıklamak için belirli genler kullanılırlar. Bu genler sahip oldukları korunmuşluk derecesi veya hızlı değişim özellikleri ile populasyon çalışmalarının özelleşmesini sağlarlar. Mitokondrinin büyük çoğunlukla anasal kalıtım göstermesi, genomunun küçük olması, mutasyon hızının yüksek olması, aşırı değişken bölgelerdeki kodlayıcı veya düzenleyici bölgelerin eksikliği ve rekombinasyona uğramaması mitokondriyal genlerin markör olarak tercih edilme sebeplerindedir. Evrimsel olarak korunmuş *16S rRNA* ve *COI* genleri türler arası filogenetik analizler ve tür-spesifik çalışmalar için uygundur.

Bu çalışmada, Akdeniz’de yaşayan Sparidae (Perciformes, Actinopterygii) türlerinde tür içi ve türler arası evrimsel ilişkileri açıklamak için mitokondriyal *16S rRNA* ve *COI* genleri MrBayes ve PAUP platformlarında incelenmiştir. *Spicara* cinsi kök atanarak çizilen soy ağaçları *Diplodus* cinsinin monofiletik olduğunu ve *Oblada melanura* türünün *Diplodus* cinsine dahil edilmesi gerektiğini, *Dentex* ve *Pagellus* cinslerinin parafiletik kökenlere sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** mtDNA, *16S rRNA*, *COI*, Sparidae, moleküler filogeni

## GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Deniz KANCA  
Department : Molecular Biology and Genetics  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist.Prof.Dr. Mehmet Baki YOKEŞ  
Degree Awarded and Date : Master of Science - September 2011

## SUMMARY

Population studies and phylogenetic analyses exhibit interspecific and intraspecific relations while explaining inter individuals and environmental interactions. The changes in the gene pool of the species which endeavour the adaptation to the different geographical and climatological conditions constitute the fundamental mechanism of evolution. The mutations which cause the changes in the genetic structure of individuals are essential for this mechanism.

Certain genes are used to describe interspecific and intraspecific evolutionary relations. These genes provide the specificity of population studies with their conservation degree or rapid change properties. Since mitochondria are generally maternally inherited, have a rapid mutation rate and a small genome along with the lack of coding and noncoding sites in hypervariable regions and nonoccurrence of recombination, mitochondrial genes are preferred markers. Evolutionary conserved *16S rRNA* and *COI* genes are suitable for intraspecific phylogenetic analyses and species specific studies.

In this study, mitochondrial *16S rRNA* and *COI* genes have been investigated on MrBayes and PAUP platforms in order to explain interspecific and intraspecific relations in Sparidae (Perciformes, Actinopterygii) members native to Mediterranean Sea. It has been shown that genus *Dentex* and *Pagellus* have paraphyletic origin while genus *Diplodus* has monophyletic origin and that *Oblada melanura* should be included in *Diplodus* genus, when genus *Spicara* are assigned as outgroup on the phylogenetic tree.

**Key words:** mtDNA, *16S rRNA*, *COI*, Sparidae, molecular phylogeny

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Evrim

### 1.1.1. Evrime Genel Bir Bakış

Evrime, canlı türlerinin nesilden nesile kalıtsal değişime uğrayarak başlangıçtaki özelliklerinden farklı özellikler kazanmasıdır. Bunun nasıl gerçekleştiği ve bu teoriler hakkında evrimin ilk ortaya atıldığı zamanlardan bu yana süregelen çok sayıda farklı görüş bulunmaktadır. Dünya üzerindeki tüm türler kendilerinden önce yaşamış ata türlerin devamı niteliğindedir ve ayırt edilebilir farklılıklar başarılı nesillerde meydana gelmiş genetik değişikliklerin bir sonucudur (Cummings, 2000).

Dünya üzerinde henüz 10.000-30.000 kadarının tanımlanamadığı düşünölen yaklaşık 1,5 milyon tür bulunmaktadır (Campbell ve ark., 2009). Bu türlerin hepsinin ortak bir atadan geldiği düşünölrse hepsi akrabadır. Ancak genlerdeki mutasyonlar, popülasyonlar arası göçler ve çeşitli türler arasındaki yatay gen aktarımları sonucu türler birbirlerinden farklılaşırlar. Bir popülasyonun gen havuzunda ne kadar çok varyasyon görülürse o popülasyon diğerlerinden o kadar farklılaşır. O halde popülasyon içindeki ya da popülasyonlar arasındaki değişkenler evrimin temel mekanizmasıdır (Cummings, 2000).

### 1.1.2. Evrim Araştırmalarının Tarihi

18. yüzyıl doğa bilimcisi Carolus Linnaeus'un, organizmalar arasındaki anatomik benzerlikleri ve farklılıkları belirleyerek, türlerin akrabalığını vurgulayan çalışması ve 19. yüzyılda Charles Darwin'in, organizmaların birbiriyle genetik akrabalığını açığa çıkarmak üzere, farklı türlerin ortak bir atadan köken aldığını belirten hipotezi üzerine 20. yüzyılda evrimsel akrabalıkları analiz etmek ve evrim kuramını geliştirmek için çok zengin kanıtlara sahip olan biyokimyacılar farklı türlerin hücrelerinin moleküler anatomisini, nükleik asitlerin ve proteinlerin alt birimlerinin dizinlerini ve üç boyutlu yapılarını açığa çıkarmıştır (Nelson, 2005).

Moleküler genetik çalışmaları ilk olarak uzak balık populasyonları arasında hemoglobin polimorfizminin araştırılmasıyla başlamıştır (Sick, 1961; Ward, 1994).

Örneklerin ayrımı sırasında karşılaşılan problemleri çözmek için özel histokimyasal boyama yöntemleri kullanılmıştır (Hunter, 1957). Eldeki genetik belirteçlerin çeşitliliğini sayıca artırabilmek için araştırmacılar 1980'li yılların başında Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'ten yararlanmaya başlamışlardır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar mitokondrial DNA (mtDNA) odaklı olup, "Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)" analizi kullanılmıştır (Lansman ve ark., 1981). Sonraki araştırmalar genetik materyale ait belirli bölgelerin dizi analizi üzerine odaklanmıştır (Bernartchez ve ark., 1992).

Evrin tarihi, populasyon ve türlerin oluşumuna neden olan nesillerin değişimlerini ve birbirlerinden ayrılmalarını içerir. Mutasyon, göç, seçim ve sürüklenme tek başına veya birlikte alel frekansını değiştirirler ve evrimsel ayrılma ve tür oluşumuna neden olurlar. Bu süreç sadece genetik farklılıklara değil, çevresel ve ekolojik farklılıklara da bağlıdır. Eğer bir populasyon pek çok alt çevre ya da niş içeren bir coğrafik alana yayılmış ise bu nişleri işgal eden populasyonlar ortama uyarlar ve genetik olarak farklılaşırlar. Farklılaşan populasyonlar dinamiklerdir. Varlıklarını sürdürebilirler, nesilleri tükenebilir, ana popülasyona karışabilir ya da kendi kendine üreyebilen bir populasyon haline gelene kadar ana popülasyondan farklılaşmaya devam ederek yeni türler oluştururlar (Cummings, 2000).

Alfred Russel Wallace ile Charles Darwin aynı yüzyılda ve birbirlerinden habersiz olarak doğal seçimle ilgili yayınlar yapmışlardır. Buna göre Wallace, türlerin bireyleri arasında boy, renk, çeviklik gibi fenotipik farklılıklar olduğunu, bu farklılıkların küçük ve önemsiz olanlarının bile kalıtsal ve yeni döllere aktarılabilen özellikler olduğunu, organizmaların hayatta kalabilecek daha fazla yavru bırakabilme endişesiyle bir seferde çok sayıda yavru verdiğini ve bu yavruların hayatta kalabilmek için sınırlı imkânları değerlendirme yeteneğinde olması gerektiğini ve yaşamak için gerekli mücadeleyi verebilen bireylerin diğerlerinden fenotipik olarak daha üstün olduklarını ve bunun kendilerine hayatta kalma ve üremede avantaj sağladığını açıklamıştır (Cummings, 2000).

Wallace ve Darwin doğal seçilimin neye göre olduğunu açıklamalarına rağmen çeşitliliği ve bu çeşitliliğin nasıl aktarıldığını açıklayamamışlardır. 20. yüzyılda Gregor Mendel'in çalışmalarının ilkeleri popülasyonlara uygulanınca çeşitliliğin kaynağı ve kalıtımın mekanizması açıklanmış ve zaman içinde alel frekanslarında değişim olduğu gözlenmiştir. Popülasyon genetiği ile doğal seçilimin birleşmesi "yeni Darwinizm" görüşünü oluşturmuştur (Cummings, 2000).

Her zaman fenotipik etkiye yol açmayan mutasyonların yarattıkları genotipik etkiler, kodlandıkları genlerin ürünlerinin elektroforetik tekniklerle incelenmesi ile incelenebilir. Farklı aleller tarafından oluşturulan enzimler (allozim) elektroforetik alanda farklı yürüme paterni sergileyerek kodlandıkları farklı kodonlar hakkında bilgi vererek evrimsel incelemeye katkıda bulunurlar (Cummings, 2000).

### **1.1.3. Moleküler Evrim**

Evrim esnasında DNA dizileri birbirinden uzaklaştığı ve değiştiği için, diziler arasındaki bu farklılıklar, aralarındaki evrimsel uzaklığı hesaplamada bir "moleküler saat" gibi kullanılabilir (Gavrilet, 2003). Genetik kıyaslamalar genellikle, türler arasındaki evrimsel akrabalığı nitelemede en doğru yöntem olarak kabul edilir ve bu yöntem, fenotipik kıyaslamalarla edinilmiş bazı yanıltıcı değerlendirmeleri de düzeltir (Campbell ve ark., 2009).

Moleküler evrim, nükleik asit ve proteinlerin değişim aşamalarının bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının incelenmesi ile takip edildiği evrimsel süreç olup bu özelliği ile bir "moleküler saat" niteliğindedir (Cummings, 2000).

Moleküler evrim, mutasyonlar ve alel frekansının değişimleri üzerinden ilerler. Mutasyonlar genetik materyaldeki kalıcı ve aktarılabilir değişikliklerdir. Bireylerde yarattıkları genotipik değişimin doğal seçilimle etkilediği fenotipik değişim oranında popülasyonun gen havuzunu etkilerler. Alel frekansları ise genetik sürüklenme, gen akışı veya göç, seçilim ve tekrarlayan mutasyonlar ile popülasyonda değişim gösterirler. Göçler, gen akışı ile alel frekanslarının homojen hale gelmesini sağlar ve popülasyonların birbirinden ayrılma eğilimini azaltır. Popülasyonlar arasında gen akışı azaldığı ya da olmadığı zamanlarda birbirinden ayrılan popülasyonlar fizyolojik, davranışsal ya da mekanik etmenlerle artık birbirleriyle çiftleşemeyecek hale gelip üremeyi kendi aralarında devam ettirerek yeni türlerin

oluşumunu sağlarlar. Yani moleküler değişiklikler çevresel etkenlerle birlikte düşünüldüğünde “türleşme” süreci başlar. Çevresel etkilerin kalıtım üzerindeki etkisi Theodosius Dobzhansky tarafından “doğa ve yetiştirme tarzı (nature and nurture)” kuramı ile açıklanmıştır (Dobzhansky, 1962). Bu kurama göre, genetik faktörler belli bir özellik değil, belli bir ortamda gerekli olan özelliği oluşturabilme yeteneğidir. Genetik değişimler, bir türün içinde yaşadığı çevreye uyum sağlaması için gerekli olan ham madde kaynaklarıdır. Sürekli değişmekte olan bir çevrede yaşayan organizma, kendisi için en uygun yeri bulmaya çalışır. Farklı coğrafik ve iklimsel koşullarda aynı genetik tabanlı canlılar buldukları yere uyum sağlayarak farklı gelişim gösterirler ve zaman içinde iki farklı tür haline gelirler (Cummings, 2000). Maruz kaldıkları farklı çevresel koşulların derecesine ve buna bağlı olarak gen akışının kesilmesine göre türleşme “allopatrik” ve “simpatrik” olarak sınıflandırılır. Allopatrik türleşme olayı, coğrafik olarak birbirinden ayrılmış populasyonlarda gerçekleşir ve ayrılan populasyonlar arasındaki gen akışı başlangıçta kesilir ya da indirgenir. Simpatrik türleşme şeklinde ise küçük bir populasyon, atasal populasyondan coğrafik olarak ayrılmadan kromozom değişiklikleri ve rastgele olmayan çiftleşmeler yoluyla yeni tür meydana getirir (Campbell ve ark., 2009).

#### **1.1.3.1. DNA ve Dizi Evrimi**

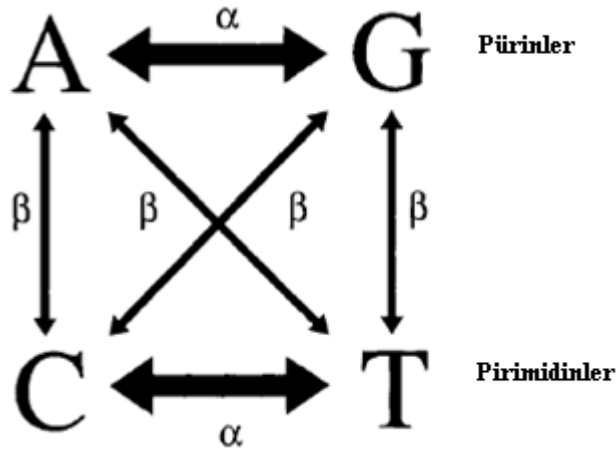
Evrim, genomlardaki değişiklikler üzerinden ilerler. Bu değişiklikler mutasyonlar, rekombinasyonlar ve gen akışları ile gerçekleşir. Değişikliklerin takibi nükleer veya mitokondriyal genomlar üzerindeki korunmuş bölgeler üzerindeki bazı değişiklikleri analiz edilerek yapılır (Cummings, 2000).

Mutasyonlar genetik çalışmaların temelini oluşturur ve genetik çalışmalarda ebeveynlerden oğul döllere genetik geçişlerin takibini sağlayan markörler olarak kullanılırlar. Mutasyonlar, tanımlanan özelliklerine göre “spontan ve uyarılmış”, “gametik ve somatik” ve “diğer” olarak sınıflandırılabilirler (Cummings, 2000). Bunun dışında oluşum tipine ve yaptıkları etkiye göre de sınıflandırılabilirler. Filogenetik çalışmalarda dizi karşılaştırmalarında yüksek varyasyonlu bölgelerdeki nokta mutasyonları, insersiyon, delesyon, bazı yer değiştirmeleri ve tekrar sayılarındaki değişimlerden sıkça yararlanılmaktadır (Kocher, 1997).

Rekombinasyon, iki homolog çift zincirli DNA molekülünün önemli oranda dizi homolojisi içeren eşdeğer pozisyonlarının değiş tokuşudur. Bu süreç döllerin ebeveynlerinden farklı gen dizilimlerine sahip olmasına ve daha önce olmayan yeni alleler üretmesine öncülük eder (Cummings, 2000).

DNA'daki bazlar serbest şekilde değişim geçirebilmiş gibi görünse de bazı bazların bir diğeri ile yer değiştirme frekansı diğerlerinden daha yüksektir. Populasyondaki seçim ve sürüklenme bu oranın fikse olmasını engellemektedir. Buna rağmen bazı yer değiştirme paternleri hayvan mitokondriyal DNA'sına özgül olup DNA dizi verilerine dayanarak filogeni oluşturmada kullanılmaktadır (Kocher, 1997).

Jukes ve Cantor'un (1969) dört nükleotit için önerdiği basit yer değiştirme modeline göre dört nükleotitin yer değiştirme olasılığı birbirine eşittir. Ancak transversiyon yolaklarınının tranzisyon yolaklarından 2 kat fazla olduğu göz önüne alınarak transversiyonel (pürin ↔ pirimidin) değişimlerin tranzisyonel değişimlerden 2 kat fazla olduğu görülmektedir. Jukes ve Cantor'un (1969) basit yer değiştirme modeli, hayvan mitokondriyal genomları için tranzisyonlar transversiyonlara göre daha yaygın gözlemlendiğinden yetersizdir. Bunun için Kimura (1980) tranzisyonların yüksek oranını da gösterebilecek iki parametrelili bir model sunmuştur (Şekil 1.1) (Kocher, 1997).



**Şekil 1.1.** Transversiyon ( $\beta$ ) ve transisyonların ( $\alpha$ ) oranını veren Kimura (1980) yer değiştirme modeli (Kocher, 1997)

Bazı nükleotit bölgeleri birden fazla yer değiştirme yapabilir. Gözlenen dizi farklılıkları meydana gelen asıl farklılıkların zayıf bir belirteci olup yeni farklılıkların oranı çoklu yer değiştirme ile oluşan aynı nükleotitlerin oranına eşittir. Bu noktada

yer değiştirmeler devam etse bile diziler doyuma ulaştıkları için birbirinden buyk farklılıklar göstermezler ve gerçek evrimsel oran bir bölgedeki çoklu yer değiştirmelerin ortaya çıkmasıyla saklanır (Kocher, 1997).

Bu modeller yer değiştirme oranını verirken dizilerin değişimini düzenleyen baskın kuvvet seçilimi göz ardı ederler. mtDNA'daki mutasyonların %90'ından fazlasının seçilimle filtrelendiği sessiz ve amino asit yer değiştirme bölgelerindeki nükleotit yer değiştirme oranlarının karşılaştırılması ile bunu kolayca gözler önüne serer (Kocher, 1997).

Her bir bölgede yer değiştirme olasılığı eşit değildir. Bazı bölgelerde seçilim yer değiştirmelere direnç gösterirken mutasyonlara izin veren diğer bölgelerde sabitlenebilir (Kocher, 1997).

### **1.1.3.2. Moleküler Evrimin Nötral Teorisi**

Moleküler evrimin nötral teorisi, çoğu mutasyonun zararlı olduğunu ve populyasyondan hızla uzaklaştırıldığını, geri kalanın ise tür içinde tespit edilen çeşitli seviyelerde polimorfizmler olarak gözlendiğini ifade etmektedir (Kimura, 1983).

Motoo Kimura amino asit değişikliğine neden olan mutasyonların daha nadir olduğunu açıklayan nötral teorisinde, bu mutasyonların bazen zararlı olsa bile çoğunlukla nötral olduğunu ve zararlı ya da uygun birkaç polimorfizmin populyasyon içinde doğal seçilimle korunacağı veya ortadan kalkacağını belirtmiştir. Bunların sıklığı, mutasyon hızı ve rastgele olan genetik sürüklenme ile tayin edilir (Cummings, 2000).

Çoğu zaman sessiz ve protein yapısını etkilemeyen kodon 3. pozisyon yer değiştirmelerinin grlme oranı seçilim tarafından baskılanan 1. ve 2. pozisyon mutasyonlarının spektrumundan daha yüksektir. Bu zellik mitokondriyal DNA evriminin baskın karakteri olup tranzisyonlar transversiyonlardan daha yüksek oranda ve "gama dağılım" modeli ile gözlenir (Kocher, 1997).

Tr içinde genetik varyasyonlar çoğunlukla mutasyonların rastgele genetik sürüklenmesi ile oluşur. Tr içinde ve türler arasında genetik çalışmalar için kullanışlı bir hipotez olup tür içindeki nükleotit polimorfizmlerinin miktarının türler arası farklılıkların miktarı ile bağlantılı olduğunu açıklar ve McDonald ve



Kreitmen'in (1991) formülize ettiği tür içi ve türler arası amino asit yer değiştirmesinin sessiz nükleotit farklılıklarına oranını belirlemeye yardımcı olur (Cheryl, 1997; Nachman, 1994).

#### **1.1.3.2.1. Markov Modeli**

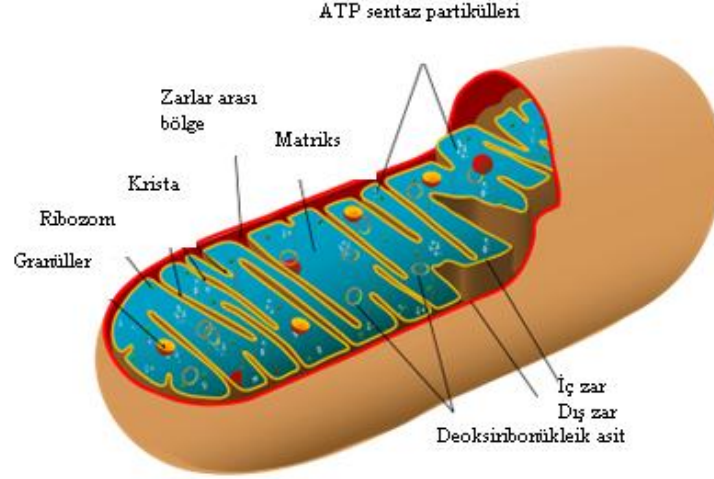
DNA dizi evriminde baz yer değiştirme modeli olan Markov modeli evrim boyunca bir nükleotitin diğeri ile yer değiştirme oranını veren parametreler üzerine kuruludur. Moleküler filogenetik analizlerde bir ağacın olasılığını hesaplamak ve diziler arası evrimsel mesafeyi kurmak için kullanılacak değişikliklerin göreceli oranlarını verir. Aynı zamanda mtDNA evrim oranının ölçümü için de kullanılan bu model ile mtDNA'nın çeşitli bölgelerinin kesin oranı ölçülerek nükleer genomdan kodlanan genlerin sonuçları ile karşılaştırılır (Saccone, 2000).

### **1.2. Mitokondri**

#### **1.2.1. Genel Tanımı, Kökeni**

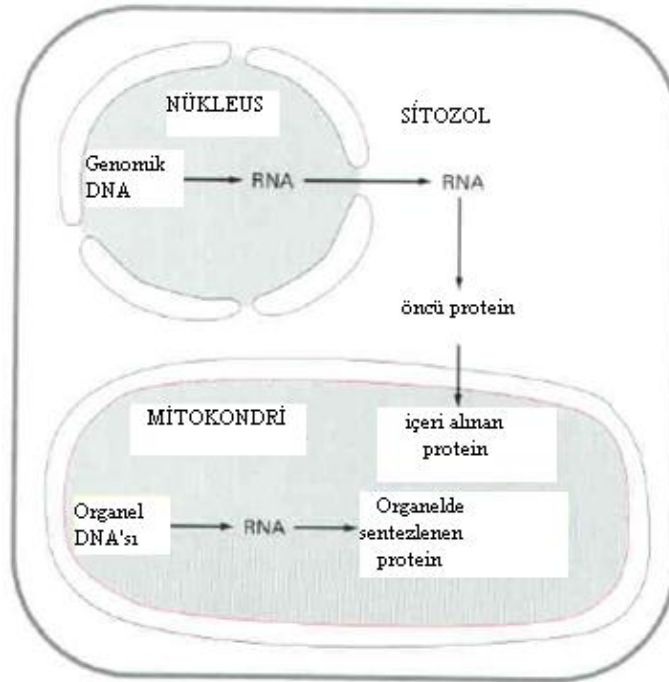
Mitokondri ökaryotik hücrelerde bulunan çift zarlı bir organeldir. Hücrelerin enerji santrali olup oksijen ve besin maddelerinden hücrenin metabolik aktivitelerini gerçekleştirmek için gerekli olan kimyasal enerji molekülü adenosin trifosfatın (ATP) sentezlenmesini sağlar. Hücresel solunum ile hücreye enerji sağlamanın yanı sıra kalsiyum iyonu depolama ve sinyal iletimi, hücresel farklılaşma, hücre ölümü, hücre döngüsü ve hücre büyümesinin kontrolü ile hastalık ve yaşlanma süreçlerinde de görev alır (Boore, 1999; Campbell ve ark., 2009).

Organeli çevreleyen protein-fosfolipit bileşimli dış zarın içerdiği proteinler organelin kanallarını oluşturur. İç zar, hücresel solunum için gerekli yüzey alanını artırmak üzere kıvrımlı yapıya sahiptir ve elektron taşıma zinciri için gerekli mitokondriyal membran potansiyelini oluşturur. Zarlar arası bölge, küçük moleküllerin geçişine olanak verir ve sitokrom c proteini burada lokalize olmuştur. Matriks, mitokondriyal enzimleri, özel mitokondriyal ribozomları, tRNA'ları ve mitokondriyal DNA genomunu içerir (Şekil 1.2) (Campbell ve ark., 2009).



Şekil 1.2. Mitokondrinin yapısı (Campbell ve ark., 2009)

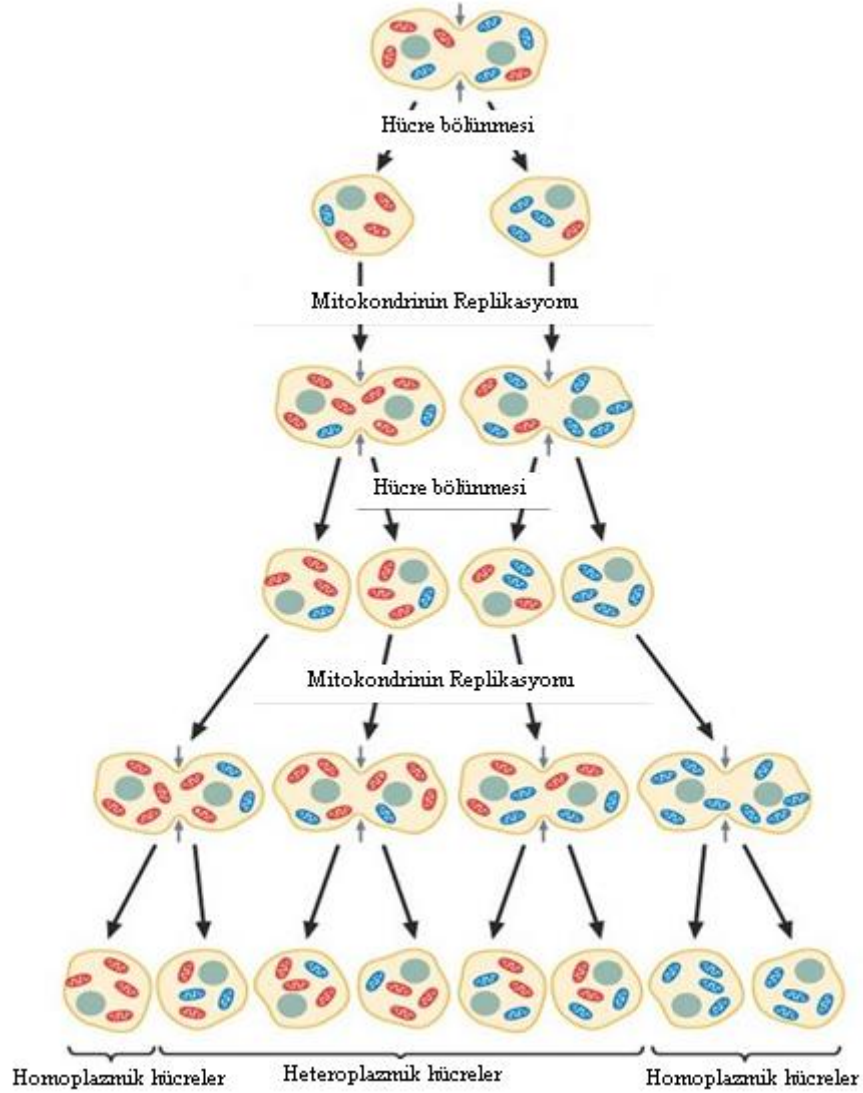
Birçok özelliği ile mitokondri kendine özel bir organeldir. Kendi genetik materyalini taşıyan bu organel yarı otonom olup nükleer genomdan bağımsız olarak kendini çoğaltabilmesine rağmen replikasyon, transkripsiyon, mRNA işlenmesi ve translasyonda nükleer genomun gen ürünlerinden faydalanır. Bu genler kendisinin sahip olduğu ama nükleer genoma transfer edilmiş genler olup mitokondrinin bağımsızlığının kontrol altına alınmasını sağlar. Mitokondriyal proteinlerin %95'i çekirdek genlerinde şifrelenir, sitoplazmik ribozomlarda çevirileri yapılır ve sonra organelin içine alınır (Boore, 1999; Campbell ve ark., 2009; Nelson, 2005) (Şekil 1.3) .



Şekil 1.3. Mitokondri ve çekirdek arasındaki etkileşim (Alberts ve ark., 2008)

Mitokondri sayısı, şekli ve mitokondriyal proteinler organizma ve doku tipine göre çeşitlenebilir. Enerji ihtiyacına göre, hücre bölünmesinden ayrı olarak kendilerini çoğaltabilirler (Campbell ve ark., 2009; Alberts ve ark., 2008).

Mitokondri, hücre bölünmesi sırasında replikatif segregasyona uğrar ve heteroplazmiktir (Campbell ve ark., 2009) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Mitokondrinin Heteroplazmik Kalıtımı

(<http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1302243361.pdf>)

Mitokondriyal genlerin kalıtımı nükleer genlerden farklıdır. Sperm mitokondrisi zigotta yer almadığı için mitokondriler yavru döllere yalnızca anne üzerinden aktarılır. Anasal kalıtım üzerinden çalışmak, populasyonların alt gruplara ayrılmasını saptamak için nükleer genlerin kullanımından daha hassas bir yoldur (Lee, 1995). Uniparental kalıtım mitokondrideki rekombinasyon olaylarını kısıtlar

ancak değişikliklerin populasyon içinde neredeyse sabit kalmasını sağlayarak türler arası evrimsel takibi kolaylaştırır (Kocher, 1999).

Oksidatif fosforilasyonun gerçekleştiği merkez olması olduğu için oksijen radikallerine daha fazla maruz kalması, histon gibi koruyucu proteinlerin olmaması ve DNA tamir mekanizmalarının yetersiz kalması sebebiyle mutasyon görölme oranı yüksektir (Campbell ve ark., 2009). Mitokondriyal genom, mutasyonlar yüzünden hızlı değişim göstermesine rağmen gen düzenlenmeleri genelde uzun periyotlar boyunca değişmeden kalır (Boore, 1999).

Mitokondriyal genom, yüksek mutasyon oranı ve aşırı değişken bölgelerdeki kodlayıcı veya düzenleyici bölgelerin eksikliği ile genetik varyasyonlar için çok kıymetli bir kaynak niteliğindedir. Aynı zamanda mitokondriler, lizozom, golgi aygıtı gibi organellerden farklı olarak daha önce var olan mitokondrilerden bölünerek çoğalırken parental genomlar arasında rekombinasyon olmaması tüm mitokondriyal genomların aynı mitokondriden kökenlenmesi anlamına gelir ve bu başlangıçtaki mitokondri “Mitokondriyal Havva (Mitochondrial Eve)” olarak adlandırılır (Campbell ve ark., 2009; Nelson, 2005).

Mitokondri ve kloroplastın bir milyar yıldan daha uzun bir süre önce endositoza uğramış bir bakteri olduğu düşünölmektedir. Bu “endosimbiont hipotez”e göre anaerobik prokaryotik hücrelerin bir kısmı aerobik prokaryot olarak devam ederken bir kısmı da çekirdek oluşumu ile günümüz anaerobik ökaryot hücrelerini oluşturmuştur. Oluşan bu çekirdekli hücreler endositoz ile aerobik prokaryotik hücreleri yutarak günümüz ökaryotik hücrelerini oluşturmuşlardır (Alberts ve ark., 2008). Mitokondriyal DNA’nın genetik yapısı (replikasyon, ribozomal alt birimler, elektron taşıma zincirinin pozisyonu), mitokondrilerin de bakteriler gibi ikiye bölünerek çoğalması, histon proteinleri taşıması ve bakterilerin duyarlı olduğu streptomisin, rifampisin gibi bazı antibiyotiklere duyarlı olması, başlangıç kodonunun fMet olması da bu teoriyi destekleyen özelliklerdendir (Nelson, 2005).

Mitokondrilerin en yakın akrabasının, Yang’ın (1985) rRNA dizileri üzerinden yaptığı çalışma ile yalnız yaşayan, fotosentez yeteneğini kaybetmiş ama solunum zincirini taşımaya devam eden mor fotosentetik bakteriler ( $\alpha$ -Proteobakteri)

olduğu ortaya çıkmıştır (Yang, 1985; Cummings, 2000; Alberts ve ark., 2008). Ancak çalışılan mitokondriyal genomların yalnızca birkaç geninin bu  $\alpha$ -proteobakterilerden geldiği ve ökaryotik hücreye giren bakterinin nükleer genomla genetik bir devre oluşturarak evrim boyunca nükleer genomdaki benzer fonksiyonlu genlerle yer değiştirmek üzere nükleer genoma fonksiyonel biçimde transfer olmuştur. (Gray, 1998; Adams, 2003). Konak hücrenin sahip olduğu genom ile mitokondriden nükleusa geçen genlerin kombinasyonu mitokondriyal biyogenez ve fonksiyonların gerçekleşmesini sağlamıştır (Gray, 1999).

### 1.2.2. Mitokondriyal Genom

Hayvan mitokondriyal genomu küçük ve ekstra kromozomal bir genom olup yaklaşık 15-20 kbç uzunluğunda dairesel çift zincirli bir moleküldür ve haploittir (Yamanoue, 2008). Guanince zengin zincirine “ağır zincir” (H-heavy chain) ve sitozince zengin zincirine “hafif zincir” (L-light chain) adı verilir. Genomunda 37 gen bulunur. Bunlar; 2 rRNA (12S-küçük ve 16S-büyük alt birimleri), 13 protein (solunum kompleksleri I, III, IV, V) ve 22 tRNA (20 standart amino asit ve ilave lösin ve serin) genlerini taşır (Şekil 1.5; Tablo 1.1).

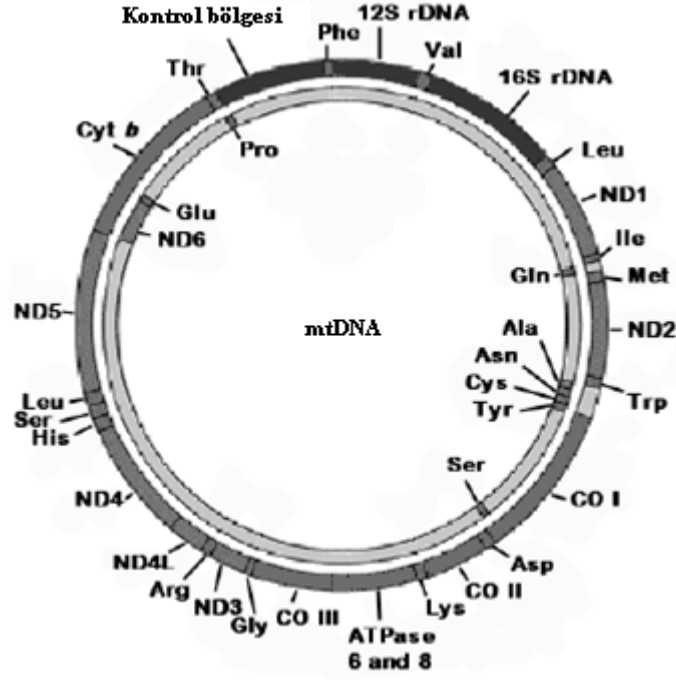
**Tablo 1.1.** Hayvan Mitokondriyal Genleri ve Gen Ürünleri (Boore, 2000)

Genin Gösterimi	Kodladığı Protein
COI, COII, COIII	Sitokrom oksidaz alt üniteleri (I, II, III)
Cytb	Sitokrom b apoenzimi
ND1-6, 4L	NADH* dehidrogenaz alt üniteleri (1-6 ve 4L)
ATP6, ATP8	ATP sentaz alt üniteleri (6 ve 8)
12S rRNA	Küçük ribozomal RNA alt ünitesi
16S rRNA	Büyük ribozomal RNA alt ünitesi
tRNAlar	18 amino asit spesifik transfer RNA
L(CUN) ve L(UUR)	2 lösin tRNA'sı
S(AGN) ve S(UCN)	2 serin tRNA'sı

\*diyaforaz, sitokrom b-5 redüktaz

Mitokondriyal genomda histon proteinleri, intronlar ve yalancı genler bulunmaz (Alberts ve ark., 2008). D-halkası harici bölgelerde dikkat çekici tekrar bölgeleri bulunmaz. Kodlayıcı olmayan bu bölgedeki kısa tekrarlar mitokondriyal genomun büyüklük varyasyonlarından sorumludur (Pereira, 2000).

Birçok hayvan mitokondri genomunda genler her iki zincire de dağılmışken birkaç türde tek zincirden transkribe olur (Yue, 2006). Hafif zincirden sentezlenen ND6, ND8, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>(UCN), tRNA<sup>Glu</sup> ve tRNA<sup>Pro</sup> genleri haricindeki genler ağır zincirden transkribe olur (Oh, 2008) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Mitokondrinin halkasal genomu (Pereira, 2000)

Mitokondri, protein sentez makinesinin bazı komponentlerini kodlayan ribozomal genler ile oksidatif fosforilasyon gibi fonksiyonlar için nükleer gen ürünleri ile birlikte kodlanan iki tip ürünün genlerini kodlar (Saccone, 2000).

Başlangıçta bütün omurgalı mitokondriyal gen sırasının korunmuş olduğu düşünülüyordu. Ancak mitokondriyal genom, konformasyon ve büyüklük açısından olduğu kadar gen içeriği, gen düzenlenmeleri ve ekspresyonundaki varyasyonlarla da dikkat çekmektedir (Gray, 1999). Memelilerden, *Xenopus laevis* türünden ve bazı balık türlerinden alınan mtDNA dizileri de bunu destekler niteliktedir. Genlerin duplikasyonu, yeniden düzenlenmeleri ve hafif zincir replikasyon orjininin ( $O_L$ ) kaybedilmesi ile bu sıranın değişebildiği gözlenmiştir (Macey, 1997).

Bir amino asitin birden fazla kodonla ifade edilmesi sonucu 0-27 arası tRNA geni içeren mitokondriyal genomun 3-67 arası farklı protein kodlamasına sebep olur. tRNA gen içeriğindeki bu farklılık, çekirdeğe aktarılmış tRNA'ların farklı kullanımlarını yansıtır ve nükleer genoma fonksiyonel homolog gen transferinin derecelerinden kaynaklanır. Mitokondriyal ribozomal protein ve süksinat dehidrogenaz genlerinin nükleer genoma transferi çiçekli bitkilerde (angiosperm) gösterilmiş olup bu süreç çiçekli bitkilerin evrimi boyunca sıkça, sporadik ve epizodik olarak meydana gelmiştir (Adams, 2003).

Mitokondriyal genler, nükleer genlerdeki kopyalarından daha hızlı değişim geçirmektir. Mitokondriyal ribozomal RNA ve taşıyıcı RNA'lar diğer mitokondriyal genlerden daha fazla korunmuştur (Brown, 1981).

#### **1.2.2.1. D-Halkası**

Yerinden ıkarma (Displacement) halkası, mitokondriyal genomun kodlayıcı olmayan ve yaklaşık %5-7'sini kapsayan (yaklaşık 800-1200 b) bölgesi olup taşıdığı tekrar bölgeleri ile türler arasında farklılıkların gözlenmesine olanak sağlar. D-halkası, en hızlı evrimleşen mtDNA gen bölgesi olup tek kopya nükleer DNA'lardan da 5-10 kat daha hızlı evrimleşir. Her iki zincir için de transkripsiyon başlangıç bölgesi olmakla birlikte, düzenleyici fonksiyonlar için bazı yapısal mitokondriyal genlerin ekspresyonundan ve ağır zincirin replikasyonundan da sorumludur (Southern, 1988). Fonksiyonel kısıtlamaların azalması ile kontrol bölgesinin bazı kısımları mitokondri genomunun tamamına göre daha hızlı evrim geçirir ve bu bölgeye yakın olan tRNA dizilerinde baz değişimleri ile insersiyon ve delesyon en yüksek oranda görülür (Lee, 1995). Nükleik asit dizilerinin yüksek çeşitliliğinden doğal populasyonlarda populasyon ayrılması ve gen akışının hesaplanması, yeterli populasyon büyüklüğü, populasyon büyümesi ve küçülmesi analizleri için yararlanılır (Alter, 2009; Pereira, 2000).

#### **1.2.2.2. Sitokrom b Geni**

Solunum zincirinde elektron transportundan sorumlu sekiz transmembran heliksli kanal proteininin sentezini yapan gen olup yapısı ve fonksiyonu iyi bilinen bu genin filogenetik çalışmalarda markör olarak tercih edilmesinin sebebi hem yavaş hem hızlı değişen kodon pozisyonlarıyla değişken bölge ve domainlerin daha korunmuş kalmasındandır (Farias, 2001).

Sitokrom b geni populasyon genetiğinden daha yüksek evrimsel ilişkilere kadar geniş bir yelpazede akrabalık seviyelerinin çeşitliliğini analiz etmek ve soy ağaçlarını çözmek için kullanılır (Kocher ve Stepien, 1997; Arnason, 1991).

Sitokrom b geni, dizinin göreceli kolay çoğaltılabilmesi, hem yavaş hem de hızlı evrim geçirebilen kodon pozisyonları içermesi, GenBank ve diğer veri tabanlarında bu bölgeye ait belirli miktar dizi bulunması ve çeşitli filogenetik

seviyelerde evrimsel tarihi aydınlatmak için kullanışlı markörler olmalarından dolayı tercih edilirler (Chiba, 2009).

### **1.2.2.3. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Dehidrogenaz Genleri**

Oksidatif fosforilasyonun iç mitokondriyal zara yerleşmiş ve elektronun NADH'tan koenzim Q'ya akışını sağlayan başlangıç enzim kompleksi (Kompleks I) dir. MtDNA'nın ND bölgesi, populasyon genetiğinde yüksek taksonomik gruplara kadar değişen ilişkileri analiz etmek için kullanılmaktadır (Lydeard ve Roe, 1997). ND5 ve ND6 geni balıklarda en iyi çalışılan genlerden biridir (Graybeal, 1993).

### **1.2.2.4. Sitokrom Oksidaz Genleri**

Sitokrom oksidaz genleri, oksidatif fosforilasyonun terminal enzimlerinden iç zarda bulunan sitokrom oksidaz multiproteinlerini kodlayan genler olup yüksek seviyede korunmuş olduklarından dolayı evrim çalışmalarında kullanılmaktadır (Nelson, 2005).

Sitokrom oksidaz I (COI) hayvan mitokondriyal genomu içinde protein kodlayan en korunmuş bölge olup filogenetik analizler için kullanılır. Türlerin taksonomik statusünü belirlemek ve aynı filum içindeki birbirine çok yakın türlerin birbirinden ayırt edilmesini sağlamak için COI dizi değişiklikleri tercih edilir (Hebert, 2003).

Sitokrom oksidaz II (COII) filogenetik akrabalıkların anlaşılmasında bu iş için kullanılan çok sayıda gene rağmen belki de en sık kullanılan gen niteliğindedir (Fрати, 1996).

### **1.2.2.5. Adenozin Trifosfataz Genleri**

ATP6 ve ATP8 genleri, oksidatif fosforilasyonun son enzim kompleksi (Kompleks V) olan ATP sentaz enziminin alt birimlerini kodlayan genlerdir.

### **1.2.2.6. 12S ve 16S Ribozomal RNA Genleri**

Mitokondriyal ribozomal RNA'nın küçük ve büyük alt birimlerini kodlayan genler olan rRNA genleri, göreceli daha yavaş evrim geçiren genler olarak evrimsel mesafe ve organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri açıklamak için kullanılır



(Clarridge, 2004). 16S rRNA geni de 12S rRNA genine göre yer değiştirme mutasyonları bazında daha yavaş evrim geçirir (Arnason, 1991; Kocher ve Stepien, 1997). 16S rRNA geni taşıdığı insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar ile genetik varyasyonların incelenebileceği bir bölgedir (Kochzius, 2008).

### 1.2.2.7. Taşıyıcı RNA Genleri

tRNA genleri kodladıkları amino asitlerin sınıflandırılmasına göre 3 gruba ayrılır. Bunlar, IQM, WANCY ve HSL olup IQM, İzolösin, Glutamat ve Metiyonin amino asitlerini, WANCY, Triptofan, Alanin, Aspartik Asit, Sistein ve Tirozin amino asitlerini ve HSL, Histidin, Serin ve Lösin amino asitlerini temsil eder (Pereira, 2000). Bu üç amino asit kodlayan gen grubu tipik omurgalı mitokondriyal genomları arasında iyi korunmuş bölgelerdir (Oh, 2008).

Glutamik Asit, Alanin, Aspartik Asit, Sistein, Tirozin, Serin (UCN), Glutamat, Prolin ve ND6 genleri hariç diğer tüm genler H zincirinden transkribe olur (Pereira, 2000).

Miya ve Nishida (1999) tRNA gen düzenlenmelerinin ilk örneklerini kemikli balıklarda ND6 ve kontrol bölgesi (ND6, cytb, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Pro</sup> ve tRNA<sup>Thr</sup>) arasında tespit etmiştir (Pereira, 2000).

### 1.2.3. Markör Olarak Mitokondri

Mitokondriyal DNA evrim ve populasyon çalışmaları için markör olup gen akışının ölçülmesi, etkili populasyon büyüklüğünün hesaplanması, populasyon alt bölünmelerinin belirlenmesi, tür farklılıklarının veya moleküler saati kullanarak tür içindeki tarihsel olayların tarihinin saptanmasına yardımcı olarak moleküler evrimin nötral modeline göre değişim gösterdiği farz edilen bir moleküldür (Wise, 1997; Nachman, 1994).

Mitokondriyal genomun küçük olması, hücrede bol bulunması, büyük çoğunlukla anasal olarak kalıtılması, nükleer DNA ile karşılaştırıldığında hızlı evrimleşme süreci ve bunlara bağlı olarak kısa birleşme zamanı ile mtDNA gen akımı, genetik varyasyon, hibridizasyon ve introgresyon analizleri gibi populasyon genetiği çalışmaları için kullanışlı bir markördür (Oh, 2007). Kalıtımın anasal olması, tamir mekanizması, rekombinasyon ve paralog genlerin olmaması ile sabit

bir gen içeriğine sahip olan mtDNA moleküler evrim, filojeni ve genom yapısı çalışmaları için model sistem olarak kullanır (Xia, 2008; Pereira, 2000).

Mitokondriyal genomdaki farklı genler farklı hızlarla evrim geçirir ve bu özelliği ile spesifik analizlerin bu genler üzerinde yapılmasını sağlar. Daha yavaş değişiklik geçiren genler filogenetik analizler için daha kullanışlı iken daha hızlı değişiklik gösteren genler popülasyon çalışmaları için tercih edilir (Avice, 1987; Brown, 1979). Mitokondriyal DNA dizilerinin filogenetik akrabalıkların anlaşılmasında kullanılması iyi yerleşmiş bir sistemdir (Simon 1994).

mtDNA tek kopyalı nükleer genlere oranla yaklaşık 10 kat daha fazla mutasyona uğrar (Kocher, 1989). Yüksek mutasyon oranı ve mutasyonların tür içindeki hızlı fiksasyonu mtDNA'yı tür içinde ve yakın türler arasında bireylerin karşılaştırılması ve özellikle küçük organizmaların tür tayini için kullanışlı bir araç yapar (Arnason, 1991, Kocher, 1989). Bu açıdan mitokondriyal DNA kökenli markörler, yakın türler arasında organizmalar ve genomları bazında evrim çalışmaları için popülerdir (Yue, 2006). Aynı şekilde balık popülasyonları arasında gen akışının seviyelerini çalışmak için en iyi bilgi mtDNA gen çeşitliliğinin gözlemlenmesi ile sağlanır (Lee, 1995). Ancak türler arası mesafe arttıkça dizi farklılıkları birikerek artar ve değişiklikleri saptamak imkânsızlaşır (Yue, 2006).

Mitokondriyal protein kodlayan genler ve transkript olmayan kontrol bölgelerinin sessiz kısımları cins, tür ve popülasyonlar arasındaki henüz farklılaşmış taksonların akrabalıklarının analizi için kullanışlıdır. Daha yüksek seviyeli sistematik analizler için çoklu yer değiştirmelerin olduğu ve bu nedenle filogenetik sinyalleri saklayan sessiz kısımlar ve hızlı evrimleşen bölgeler tercih edilmez. Daha yavaş değişen 12S ve 16S rRNA gibi bölgeler kullanışlıdır. Çünkü sessiz nükleotit bölgelerinde amino asit kodunu değiştiren baz değişimlerinin meydana gelmesi daha nadir olup derin karşılaştırmalar için yüksek bir sinyal oranı sağlar (Kocher ve Stepien, 1997). Aynı şekilde sitokrom b geni Sparidae üyeleri arasında oldukça korunmuş olup barkodlama çalışmalarında kullanılabilir niteliktedir (Xia, 2008).

Hayvan mitokondri DNA'sında dizi değişiklikleri dizi düzenlenmeleri, eklemeler, delesyonlar ve nükleotit yer değiştirmeleri olarak 4 ana grupta toplanır (Brown 1985). Filogenetik akrabalıkların elde edilmesinde mitokondriyal genomun

farklı bölgeleri arasında oran değişmesine rağmen tek kopyalı nükleer DNA'lara göre 5-10 kat daha fazla görülen baz yer değiştirmeleri kullanılır (Brown, 1979; Hoelzel, 1991).

Mitokondriyal genomda tRNA dizilerinin ikincil yapısı ile ilişkili gen yeniden düzenlenmeleri tandem duplikasyon ve çoklu delesyonlarla olduğu gibi inversiyon, transpozisyon (translokasyon ve yer değiştirebilen elementler vasıtasıyla), moleküller arası rekombinasyonlarla da olmaktadır (Brown, 1981). Bu yeniden düzenlenmeler omurgalıların daha yüksek taksonomik seviyelerinin belirlenmesi ve monofiletik grupların tanısı için kullanılabildiği gibi tRNA'nın ikincil yapısı, protein kodlayan genlerin başlama ve sonlanma kodonları gibi bazı özellikler de omurgalı mitokondriyal genomlarının karşılaştırılmasında kullanışlıdır (Pereira, 2000; Macey, 1997).

### 1.3. Actinopterygii, Perciformes

Teleostlar, Actinopterygii (Işın Yüzgeçliler) sınıfının 3 alt grubundan en geniş olanıdır. Işın yüzgeçliler, yüzgeçlerinde taşıdıkları dikenler ve bu dikenlerin simetrisine bakılarak adlandırılırlar. 24.000 tür sayısı ile en geniş omurgalı grubu olup tüm omurgalıların yarısından fazlasını teşkil ederler. Bu muhteşem simetrik çeşitlilik yalnızca morfolojik olarak değil aynı zamanda davranışsal, ekolojik ve fizyolojik olarak da gözlenir. Günümüze kadar gelen Teleost türlerinin en eski atasının yaklaşık 200 milyon yıl önce Orta Triyas dönemde ortaya çıktığı düşünülmektedir (Yue, 2006).

Işın Yüzgeçliler, Polypteriformes, Acipenseriformes, Lepisosteidler ve *Amia* cinsini içeren 4 ana soy ağacından oluşmakta olup "balık atası" olarak tanımlanırlar (Yue, 2006).

Teleostların alt grubu olan Perciformes, okyanus omurgalıları ile tropik ve subtropik bölge balıklarının en baskın takımıdır (Tablo 1.2). Bu takımda omurgalıların en çeşitli boylarda örneklerinden görülebilir. Boyu sadece en fazla 2,5 cm olan *Schindleria praematura* da yaklaşık 5 m uzunluğunda olan *Makaira nigricans* da bu takımdadır. 20 alt takım, 160 aile, 1539 cins ve 10.033 türden oluşur. Percoidei, Labroidei ve Gobioidi alt takımları türlerin yaklaşık 1/3'ünü oluşturur. En geniş alt takımı olan Percoidei, içinde Sparidae ailesinin de bulunduğu 79 aile,

549 cins ve yaklaşık 3.176 türden oluşmaktadır (Tablo 1.2) (Costello MJ, 2001; Nelson, 2006).

**Tablo 1.2.** Sparidae'ye kadar ulaşan sınıflandırma basamakları

<b>Sparidae Taksonomisi</b>	
<b>Alem</b>	Hayvanlar
<b>Takım</b>	Kordalılar
<b>Alt Şube</b>	Omurgalılar
<b>İnfr Şube</b>	Gnathostomata
<b>Süper Şube</b>	Osteichthyes
<b>Takım</b>	Actinopterygii
<b>Alt Takım</b>	Nopterygii
<b>İnfr Takım</b>	Teleostei
<b>Süper Sınıf</b>	Acanthopterygii
<b>Sınıf</b>	Perciformes
<b>Alt Sınıf</b>	Percoidei
<b>Süper Aile</b>	Percoidea
<b>Aile</b>	Sparidae
<b>Cins</b>	Acanthopagrus Archosargus Argyrops Argyrozona Boops Boopsoidea Calamus Cheimerius Chrysoblephus Crenidens Cymatoceps Dentex Diplodus Evynnis Gymnocrotaphus Lagodon Lithognathus Oblada Pachymetopon Pagellus Pagrus Parargyrops Petrus Polyamblyodon Pterogymnus Rhabdosargus Sarpa Sparidentex Polysteganus Porcostoma Pterogymnus Sparodon Sparus SpondylIOSoma Stenotomus Virididentex

(Costello MJ (2001))

### 1.3.1. Sparidae

Sparidae ailesi, geniş bir coğrafyaya dağılım göstermiş farklı neritik balıkların oluşturduğu bir gruptur (Orrell, 2004). Yaklaşık 125 tür ve 37 cinsten oluşur (Accioly, 2008). Sınıflandırılmaları, pullanma, vücut rengi ve özellikle de sert ve yumuşak kuyruk ışınlarının sayısı ve diş yapısı tanımlanarak morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır (Chiba, 2009). Fiedler (1991), Sparidae üyelerini diş yapıları ve beslenme tarzına göre Sparinae, Denticinae ve Boopsinae olarak 3 alt gruba ayırmıştır (Hanel, 2000). Smith (1938) ve Smith & Smith (1986) Sparidae üyelerini diş yapılarına ve beslenme tipine ilave olarak tropik türleşmelerini de dikkate alarak Pagellinae adında yeni bir grup daha açıp (Hanel, 2000) aileyi Boopsinae, Denticinae, Pagellinae ve Sparinae olarak 4 alt ailede sınıflandırmıştır. Boopsinae üyeleri otçul olup dıştaki kesici dişleri kısalmıştır. Denticinae, uzamış ön köpek dişleri ve arkadaki küçük konik dişleri ile piskivordur. Pagellinae, kaybettiği köpek dişleri yerine sahip olduğu dıştaki küçük konik dişler ve içteki küçük azı dişleri ile küçük omurgasızlarla beslenen etçillerdir. Sparinae, küte yakın yuvarlak posteriyor azı dişlerine sahip çenesi ve uzamış ön dişleri ile kabuklular, yumuşakçalar ve küçük balıklar ile beslenen etçillerdir. Akazaki (1962), Sparinae grubunu *Diplodus*, *Archosargus* ve *Lagodon* cinslerini alarak Diplodinae ve *Pagrus*, *Argyrops* ve *Evyynnis* cinslerini alarak Pagrinae olarak 2 yeni gruba bölmüştür. Diplodinae, çenesinde 6-8 ön diş ve öne eğilimli kesici ön dişlere sahiptir. Pagrinae, üst çenede 4 köpek dişine, kafasından gözler arası bölgeye uzanan pullara ve iki seri azı dişine sahiptir (Orrell, 2004; Orrell, 2002).

Ayrıca Sparidae, Nemipteridae ve Lethrinidae osteolojik yakın akrabalıklarına bakılarak “spariform” balıklar olarak adlandırılmıştır. Bu ailelerin Centracanthidae ile de yakın oldukları bulunmuş ve *Spicara* cinsinin (Centracanthidae) hariç tutulması ile monofiletik bir sınıf oluşturan bu dört aile sahip oldukları 54 morfolojik karakterin kladistik analizi sonucunda Sparoidea adında yeni bir süper aileye dahil edilmişlerdir (Chiba, 2009; Orrell, 2002).

Karagöz gibi türleri içeren Sparidae üyeleri daha çok tropik ve kıyıya yakın ılık tuzlu sularda yaşamakla birlikte genç ve küçük üyeleri topluluk halinde yaşarken yetişkin bireyleri daha derin sularda yaşarlar. Hermafroditizm bu aile içinde yaygın olup karagözlerin çoğu yenilebilen ve ticari önemi olan balıklardır (Birky, 2001).

### 1.3.2. Akdeniz'deki Sparidae Türleri

Bauchot ve Hureau'nun, "Kuzeydoğu Atlantik ve Akdeniz Balıkları (1986)" adlı eserinde yer alan Sparidae üyelerine ve coğrafi dağılımlarına dair bilgiler Tablo 1.3'te verilmiştir.

**Tablo 1.3.** Akdeniz'deki Sparidae üyeleri (Bauchot ve Hureau, 1986)

Cins	Tür	Bulunduğu Bölge
Boops	<i>Boops boops</i>	Tüm Akdeniz
Crenidens	<i>Crenidens crenidens</i>	İsrail'den Kızıl Deniz'e geçiş hattı
Dentex	<i>Dentex dentex</i>	40° enleminin güneyi
	<i>Dentex gibbosus</i>	40° enleminin güneyi ile Doğu Akdeniz
	<i>Dentex macrophthalmus</i>	Nadiren Akdeniz'in kuzey batı havzalarında, çoğunlukla güney batısında ve bolca doğudaki havzalarında
	<i>Dentex maroccanus</i>	Güney ve Doğu Akdeniz
Diplodus	<i>Diplodus annularis</i>	Akdeniz
	<i>Diplodus cervinus cervinus</i>	Akdeniz'in ılıman bölgelerinde
	<i>Diplodus puntazzo</i>	Akdeniz kıyı boyunca, yaygın
	<i>Diplodus sargus</i>	Akdeniz, yaygın
	<i>Diplodus vulgaris</i>	Tüm Akdeniz, yaygın
Lithognathus	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Akdeniz kıyı boyunca, yaygın
Oblada	<i>Oblada melanura</i>	Akdeniz kıyı boyunca, yaygın
Pagellus	<i>Pagellus acarne</i>	Tüm Akdeniz
	<i>Pagellus bellottii bellottii</i>	Güney batı Akdeniz
	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Batı Akdeniz, yaygın
	<i>Pagellus erythrinus</i>	Akdeniz kıyı boyunca, yaygın
Pagrus	<i>Pagrus auriga</i>	Akdeniz kıyı boyunca, çok nadir olarak kuzeyde
	<i>Pagrus coeruleostictus</i>	Akdeniz'in ılıman bölgelerinde
	<i>Pagrus pagrus</i>	Akdeniz, yaygın olarak ılık sularda ve nadiren kuzeyde
Sarpa	<i>Sarpa salpa</i>	Akdeniz kıyı boyunca
Sparus	<i>Sparus aurata</i>	Akdeniz kıyı boyunca
Spondyliosoma	<i>Spondyliosoma cantharus</i>	Tüm Akdeniz

### 1.3.3. Sparidae Ailesinde Genetik Çalışmalar

Ekonomik değeri olan balık türlerini içeren Sparidae ailesine dair genetik verilere dayalı yeterli genetik çalışma bulunmamaktadır. Yeni yapılan genetik temelli çalışmalar, türlerin sınıflandırmasını yapabilmek için morfolojik karakterlerin yeterli hassasiyeti sağlamadığını göstermektedir. Dış görünüş özelliklerine göre yapılan sınıflandırma ile genetik karakterlere göre yapılan sınıflandırma arasında farklılıklar olduğu Hanel ve Sturmbauer'in (2000), Orrell ve Carpenter'ın (2002; 2004), Ponce'nin (2008) ve Chiba'nın (2009) çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, fiziksel özellikleri ile sınıflandırıldıklarında monofiletik özellik gösteren bazı Sparidae üyelerinin, genetik yapılarıyla monofiletik olmadıklarını tespit etmişlerdir (Orrell, 2004; Hanel, 2000).

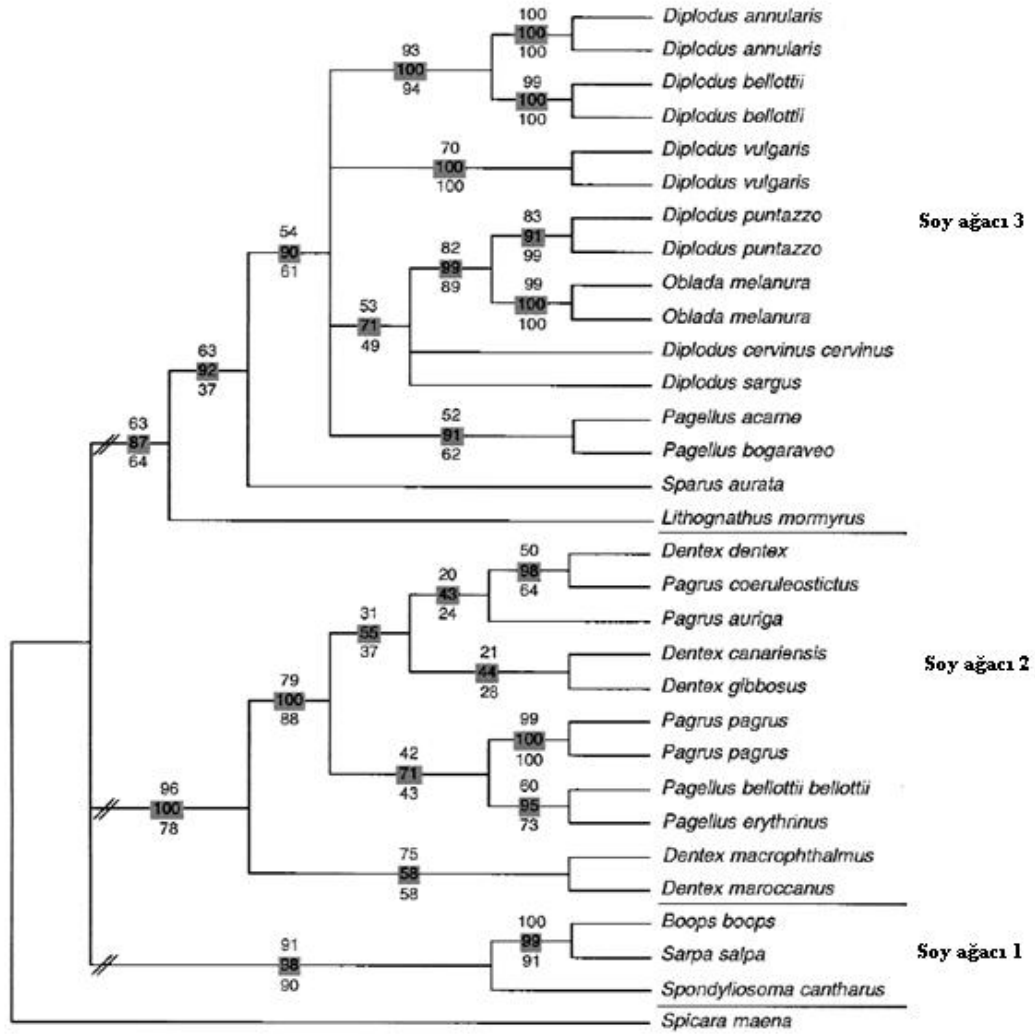
Hanel ve Sturmbauer'in (2000) Kuzeydoğu Atlantik ve Akdeniz'de tanımlanmış 24 Sparidae üyesi üzerinde mitokondriyal 16S rDNA (486 bç) dizileri ile yaptıkları çalışmada, bu türlerin köken ve alt aile akrabalık seviyeleri ile ekolojik ve morfolojik adaptasyonlarına bakılarak yollar yeniden açıklanmaya çalışılmıştır. Farklı beslenme stratejisi ve diş yapısına göre Fiedler (1991) tarafından ayrılan üç ana mitokondriyal soy ağacının var olan taksonomik ayırımla uyuşmadığı ve çözülen cinslerin ağız yapısı ve düzenlenmelerinin gösterdiği üzere parafiletik olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca Sparidae türleri ile benzer tropik türlerin çoklu ve bağımsız orjinleri olduğunu önermişler ve yeni bulunmuş üç ya da dört alt ailenin de yeniden tanımlanması gerektiğini belirtmişlerdir (Hanel, 2000).

Hanel ve Sturmbauer'in (2000), *Sparus* cinsinin *Pagrus* cinsine uzak olduğu ve farklı bir mitokondriyal soy ağacına yerleştiği, *Oblada melanura* türünün ışın yapısı olarak kardeşi olan *Diplodus puntazzo* ile birlikte *Diplodus* cinsi içinde yer aldığını göstermişlerdir. (Şekil 1.27; Soy ağacı 3). Atlantik Boopsinae ailesine sadece *Boops boops*, *Sarpa salpa* ve *Spondylisoma cantharus* türlerinin dahil edilebileceğini belirlemişlerdir (Şekil 1.27; Soy ağacı 1). Soy ağacı 2'yi ise *Dentex* ve *Pagrus* cinslerinin üyeleri ile *Pagellus erythrinus* ve *Pagellus bellottii bellottii* oluşturmaktadır. Aynı zamanda *Dentex maroccanus* ve *Dentex macrophthalmus* türleri *Dentex* üyelerinden ayrılmakta ve bu da bahsedilen türlerin parafiletik kökenine dikkat çekmektedir (Hanel, 2000).

*Lithognathus mormyrus*, *Sparus aurata*, *Pagellus acarne*, *Pagellus bogaraveo*, *Oblada melanura* ve tüm *Diplodus* türlerinin oluşturduğu soy ağacı, bu grubun genç evrimsel yaşı ve bu genin göreceli yavaş evrim hızı yüzünden 16S rDNA analizi ile çözülememiştir (Şekil 1.6; Soy ağacı 3) (Hanel, 2000).

Orrell ve Carpenter'ın (2002) çalışmaları ise 1140 bç'lik sitokrom b dizileri ile Sparidae (Sparoidea) ailesinin monofiletik özelliklerini incelemek ve Sparidae üyelerinin tanımlı 33'ünün akrabalıklarının anlaşılması üzere yapılmıştır. Bunun için 40 Sparidae türü, 10 yakın tür, 10 bazal Percoidae türü ve 2 Perciformes olmayan kök tür kullanmıştır. Çalışmada kullanılan, eşit ağırlıklı ve ağırlıklı data setiyle oluşturulan Parsimony analizi Centranchidae ailesine dahil olan *Spicara* cinsinin Sparidae ailesine katılarak monofilisini desteklemekte iken 6 Sparidae alt ailesinin (Boopsinae, Denticinae, Diplodinae, Pagellinae, Pagrinae ve Sparinae) monofiletik

olmadığını ve bu alt ailelerin çok kez bağımsız olarak çeşitlendiğini göstermektedir. Lethrinidae ailesinin Sparidae ailesi ile kardeş olduğunu, Sparidae ailesi ile Lethrinidae ailesinin yakın olmasının Carpenter ve Johnson'ın (2002) çalışmasındaki morfolojik analizle uyduğunu, Lethrinidae üyeleriyle Nemipteridae üyelerinin sitokrom b dizisi üzerinden akrabalığının doğrulanmamasının (Johnson, 1980) bu tezi desteklediğini ve Sparoidea süper ailesinin (Sparidae, Centracanthidae, Lethrinidae ve Nemipteridae) sadece ağırlıklı nükleotit filogenisinde monofiletik çıktığını belirtmişlerdir. Bu verilerle sitokrom b geninin balıklar için çeşitli taksonomik seviyelerde sağlam filogenilerin üretilmesi için değerli bir markör olduğu ve biyocoğrafik açıdan Sparidae evrimini açıklayabileceği sonucuna varmışlardır (Orrell, 2002).



Şekil 1.6. Kuzeydoğu Akdeniz ve Atlantik'ten Alınan 31 Karagöz Türünün 16S rDNA Bölgesi ile Yapılan Filogenetik Analizi (Hanel, 2000)



Orrell ve Carpenter'ın (2004) 16S rRNA ve sitokrom b dizileri ile 38 Sparidae türü ile Sparidae ailesine yakın 10 türü kök olarak atayarak ve 7 bazal Percoidae türü ile Perciformes olmayan kök türler üzerinden yaptıkları ve “parsimony” ve “maximum likelihood” metotlarıyla analiz ettikleri çalışmada ise Sparidae üyelerinin, Centranchidae ailesinde yer alan *Spicara* cinsinin de içine katılması ile monofiletik olduğu, *Spicara*, *Pagrus* ve *Pagellus* cinslerinin ise monofiletik olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu analizlerle Sparidae ailesinin iki ana soy ağacı yeniden düzenlenmiştir. Bu çalışma aynı zamanda Hanel ve Strumbauer'in (2000) yaptıkları çalışmayı da irdelemektedir. Hanel ve Strumbauer, 10 cins ve 24 Sparidae türü ile çalışma yaparken Centranchidae üyesi *Spicara* cinsini de kök olarak atamışlardır. Bulguları, tanımlanmış olan Boopsinae, Denticinae ve Sparinae alt aileleri ve *Dentex* cinsinin polifiletik olduğunu desteklememiştir (Orrell, 2004).

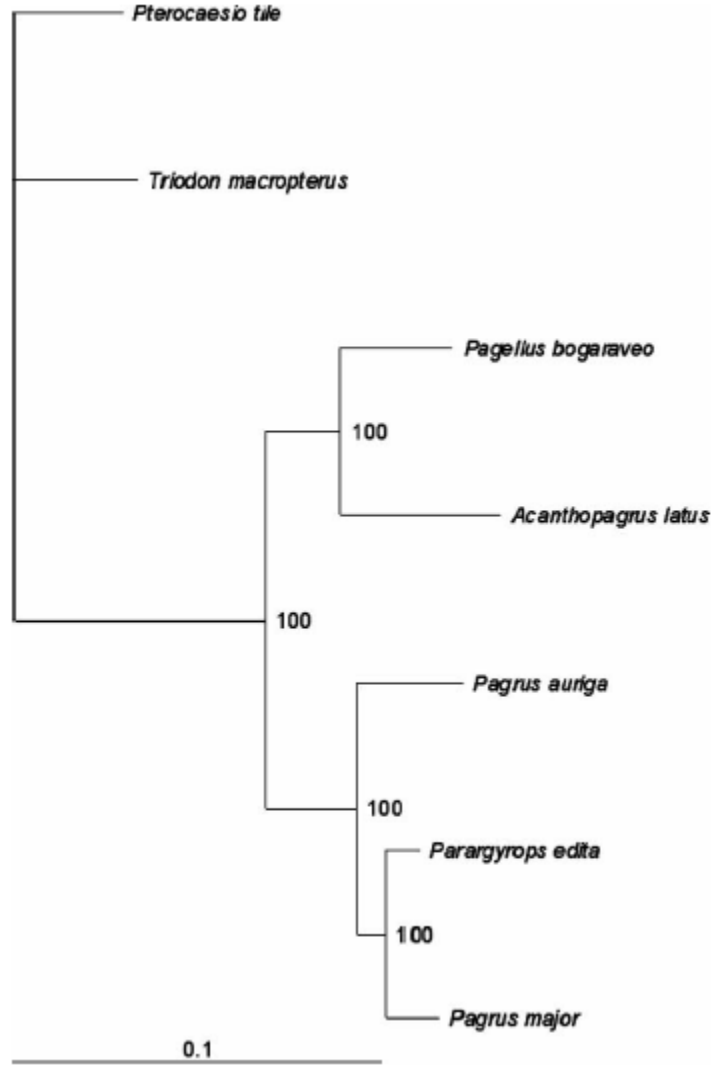
16S verisi *Sparidae* ile *Spicara* cinsinin monofiletik, *Dentex tumifrons* ile *Spicara alta* türlerinin ve *Spondyliosoma cantharus* ile *Spicara maena* türlerinin kardeş türler olduklarını açığa çıkarmıştır (Orrell, 2004).

Hanel ve Strumbauer, *Pagellus*, *Pagrus* ve *Dentex* cinslerinin ve Orrell (2002) *Pagellus*, *Pagrus*, *Dentex* ve *Spicara* cinslerinin monofiletik olmadığını sitokrom b verilerine bakarak bulmuşlardır. 16S verileriyle Smith (1938), Akazaki (1962) ve Smith ve Smith'in (1986) çalışmalarını destekleyen bulgulara ulaşmamışlardır. 16S verilerinin aileler arası sınıflandırmada yetersiz kaldığını görmüşlerdir (Orrell, 2004).

Bu çalışma ile Orrell ve arkadaşlarının (2002) çalışması tek tek ve birlikte 16S ve sitokrom b genlerinin aile içi Sparidae akrabalıkları için kullanışlı olduğunu göstermektedir. 16S geni, sitokrom b genine göre daha korunmuştur (taksonlar arası tüm değişiklikler daha az) ve daha yakın akrabalıklar için (örneğin Perciformes türleri için) bilgi vericidir. Alınan sonuçlardan yola çıkarak morfolojik özelliklerin bölgesel olarak sınıflandırmada kullanılabileceği ancak filogenetik amaçlı kullanılamayacağı sonucuna varmışlardır (Orrell, 2004).

Xia (2008), 13 protein kodlayan genin amino asit dizilerini kullanarak maksimum likelihood metoduyla yaptığı filogenetik analiz sonucuna göre Orrell'in (2004) çalışmasıyla örtüşen şekilde *Pagrus* cinsinin monofiletik olmadığını ve

*Pagrus* üyelerinin morfolojik karakterlerinin yeniden tanımlanmaya ihtiyacı olduğunu belirtmiştir. *Acanthopagrus latus* ile *Pagellus bogaraveo* türlerinin kardeş olduğunu, *Pagrus* cinsine dahil olan *Pagrus major* ve *Pagrus auriga* türlerinin bu şekilde sınıflandırılmayacağını, bunun yerine *Parargyrops edita* ile *Pagrus major* türlerinin kardeş gruplar olduğunu ve bu haliyle *Pagrus auriga* türüyle ayrı dallandığını göstermiştir (Şekil 1.7) (Xia, 2008).



Şekil 1.7. ML analiziyle 13 protein kodlayan genin verileri üzerinden oluşturulan soy ağacı (Xia, 2008).

Chiba (2009), mitokondrial sitokrom b dizileri üzerinden yaptığı çalışmada 66 Sparidae türü ve 23 kök tür kullanmış, “Maximum Likelihood (ML)” ve “Bayesian” metotları ile filogenetik analizleri gerçekleştirmiştir. Hanel ve Sturmbauer’in (2000) Orrell ve Carpenter’ın (2004) ulaştığı sonuçlara benzer biçimde *Spicara* cinsi ile Sparidae üyelerinin monofiletik olduğu, Sparidae türlerinin

alt ailelerinin monofiletik olmadığı ve geçerli sınıflandırmalardan farklı olacaklarını göstermiştir. *Acanthopagrus*, *Cheimerius*, *Dentex*, *Diplodus*, *Pagellus*, *Pagrus* ve *Spicara* cinslerinin monofiletik olmadığını, akrabalıklarının yeniden düzenlenmesi gerektiğini ve morfolojik karakterlerinin yeniden incelenmesi gerektiğini ileri sürmüştür. ML metoduyla tüm kodon pozisyonlarına göre türleri A, B, C olarak üç ana gruba ayırmıştır. C sınıfı diğer ağaçlara göre parafiletik olup doğu Pasifik ve batı Atlantik arası bölge türlerini ve A-B sınıfları farklı okyanusların lokal bölgelerinden toplanmıştır. Ayrıca parsimony kriterlerine göre 87 morfolojik karakterle evrimsel paterni de incelemişlerdir.

*Morone* ve *Dicentrachus* cinslerini içeren Moronidae ailesi ile Sparidae ailesinin monofiletik olduğunu, Haemulidae, Lutjanidae, Caesionidae, Chaetodontidae ve Pomacanthidae ailelerinin monofiletik bir sınıfta olduğunu, *Lateolabrax* cinsinin Moronidae ailesinden uzak bir cins olduğunu, Lateolabracidae ailesinin Moronidae ailesinden bağımsız olduğunu ML analizlerine dayanarak belirtmişlerdir.

C sınıfı topolojik farklılık taşımakta olup *Calamus*, *Stenotomus*, *Archosargus* ve *Lagodon* cinslerini içermektedir. Yapılan Bayesian analizleri sonucunda Akazaki'nin (1970) çalışmalarına uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Buna göre, sparidler Üst Kretase ile Paleosen arasında Tetis Denizi'nin Mezozoik okyanusundan kökenlenip erken Paleosen dönemde Yeni Dünya'nın kıyı bölgelerine göç etmişlerdir. A ve B sınıfı ise Üst Kretase dönemde okyanus bölgelerine dağılmış olup ataları Tetis Denizi'nden tropik ve ılıman kıyı sularına geçmişlerdir. Burada zaman içinde değişim geçirmişler ve örneğin, beslenme tarzlarındaki değişime (kabuklu ve yumuşakça) göre diş yapıları değişime uğramıştır.

Bu araştırmacıların taksonomik çalışmalarının yanı sıra Ponce (2008), "uzun PZR" metodu ile tüm genomu çıkardığı *Pagellus bogaraveo* türünde WANCY bölgesinde yer alan O<sub>L</sub>'nin tRNA<sup>Cys</sup> yalancı geninin (66bç'lik uzun element) katılmasıyla bozulduğunu ve dizi duplikasyon ve delesyonları ile uzunluk heteroplazmisinin varlığını açığa çıkarmıştır. Bu farklılığı sağlayan "tandem duplikasyon ve rastgele kayıp (TDRL)", "duplikasyon ve rastgele olmayan kayıp" ve "rekombinasyon" modellerinden biridir.

## 2. AMAÇ

Evrım mekanizması çok uzun yıllardan bu yana çeşitli markörler geliştirilerek incelenmeye ve açıklık getirilmeye çalışılan bir konudur. Bunun için kullanılan markörlerden biri, tür içinde veya türler arasında korunduğu bilinen genomik veya mitokondriyal DNA dizileridir. DNA dizi analiz tekniklerinin gelişmesi ile belirli genlerin dizi karşılaştırmalarının yapılması olanaklı hale gelmiştir. Bunun yanı sıra mitokondriyal genom büyük çoğunlukla anneden kalıtılması, genomunun küçük olması ve çok sayıda korunmuş gen bölgesi taşıdığı için sıkça tercih edilmektedir.

Sparidae üyeleri, Akdeniz’de yaşayan ve ekonomik değeri yüksek balık türleridir. Morfolojisine göre yapılan filogenetik akrabalıkları hala çok net olmadığı için mitokondriyal genomları üzerinden çalışılmaya devam edilmektedir. Birkaç türünün tüm genomu çıkarılmış ve birçok türünde de 16S rRNA geni gibi korunmuş genler üzerinden evrimsel soy ağacı çıkarma çalışmaları yapılmıştır. Filogenetik seviyelerin belirlenmesinde önemli bir markör olan mitogenomlar yalnızca beş Sparidae türü için mevcuttur ve karşılaştırmalı filogenetik çalışmalar için bundan daha fazla veriye ihtiyaç duyulacağı için mitokondriyal genomun çıkarılması gerekmektedir.

Bu tez kapsamında Akdeniz’den toplanan Sparidae üyelerinin mitokondriyal *16S rRNA* ve *COI* genlerinin dizileri karşılaştırılarak evrimsel ilişkilerin açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL

#### 3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu araştırmada kullanılan örnekler 2006 - 2011 yılları arasında Türkiye kıyılarında yürütölen çeşitli projeler kapsamında toplanmıştır. Elde edilen örnekler ya bütün olarak ya da kas dokusu alınarak %70 etanol içerisinde kullanılacakları zamana kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir. Her bir örneğe üzerinde tür adı, toplama tarihi ve toplanan yerin bilgilerini taşıyan etiketlere göre sayısal kodlama yapılmıştır (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Araştırmada Kullanılan Örnekler

Örnek Kodu	Tür Adı	Toplanan Bölge
402	<i>Boops boops</i>	Bodrum
820, 821,822		İskenderun
729	<i>Dentex gibbosus</i>	Fethiye
253	<i>Dentex moroccanus</i>	Çanakkale
468-477	<i>Diplodus annularis</i>	Antalya
983		İskenderun
1114-1116		Fethiye
399	<i>Diplodus sorgus</i>	Bodrum
398	<i>Diplodus vulgaris</i>	Bodrum
1121		Antalya
844-846	<i>Lithognathus mormyrus</i>	İskenderun
774	<i>Oblada melanura</i>	Kaş
361-371	<i>Pagellus acarne</i>	İskenderun
396		Bodrum
803, 804		İskenderun
400	<i>Pagellus erythrinus</i>	Bodrum
824, 825		İskenderun
892,893		Antalya
179-184	<i>Pagrus coeruleostictus</i>	İskenderun
854, 855, 857		İskenderun
771-773	<i>Pagrus pagrus</i>	Kaş
903, 904		Antalya
1118		Fethiye
1058	<i>Sarpa salpa</i>	İskenderun
401	<i>Spicara flexuosa</i>	Bodrum
805	<i>Sparus aurata</i>	İskenderun
864-869		İskenderun
1103	<i>Spondyliosoma cantharus</i>	Fethiye

### 3.2. Genomik DNA İzolasyonu Metodu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

SDS-Lizis Tamponu (pH 8,0)	: 50 mM Tris (pH 8,0), 50 mM Sükroz, 100 mM NaCl, 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7,4), %1 SDS
NaCl	: 5M
Low-TE Tamponu (pH 8,0)	: 10 mM Tris (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
Proteinaz K	: Steril suda 10 mg/ml (Roche, ALMANYA)
% 70 Etanol	: Distile su içinde % 70 EtOH
Abzolüt Etanol	

### 3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

10X MgCl <sub>2</sub> 'süz Tampon	: 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 750 mM Tris-HCl (pH 8,8), % 0,1 Tween 20 (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl <sub>2</sub>	: dH <sub>2</sub> O'da 25 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotitler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.3.1. Oligonükleotit Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.2’de gösterilmiştir (Palumbi, 1991; Ward,2005).

**Tablo 3.2.** Oligonükleotit Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi
16Sar_L	5’- CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3’
16Sbr_H	5’- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3’
COI_fishF1F	5’- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3’
COI_fishR1	5’- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3’

### 3.4. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) (pH 8,3): 890 mM Tris-Baz,

890 mM Borik Asit,

20 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O

6X DNA yükleme boyası

: 10mM Tris-HCl (pH 7,6)

2,5 mg/ml BPB

2,5 mg/ml Ksilen siyanol

5g/ml gliserol

60mM EDTA

(Fermentas, LİTVANYA)

Etidyum Bromür (EtBr)

: 10 mg/ml (Sigma, ALMANYA)

Agaroz Jel

: 0,5X TBE tamponunda %0,7 ve %1’lik

Agaroz (Prona, EEC)

### 3.5. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 1 kbç DNA Markörü : 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 baz çiftlik fragmanlar içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.6. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizileme işlemi için PZR ürünlerinin saflaştırılması gerekmektedir. Bu işlem için “High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ALMANYA)” firmanın önerdiği protokole uygun olarak kullanılmıştır.

### 3.7. Cihazlar

Su Arıtma Sistemi	: Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)
Derin Dondurucular	: -20C, Arçelik 2021 D (TÜRKİYE) -80C Thermo Fisher Scientific (A.B.D.)
Buzdolapları	: Beko 8742 (TÜRKİYE) Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
PZR Cihazı	: Techne TC-512 (İNGİLTERE)
Yatay Elektroforez Sistemi	: MultiSub Midi (Cleaver Scientific, İNGİLTERE)
Güç Kaynağı	: EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ)
Görüntüleme Sistemi	: Bio-RAD Universal Hood II (BIO-RAD, İTALYA)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE) PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA)
Su Banyosu	: Nüve BM 402 (TÜRKİYE)
Santrifüj	: MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)
Manyetik Karıştırıcı	: MR3001 (Heidolph, ALMANYA)
Tartı	: Hassas Terazî, XB220 A (Presica, İSVİÇRE)
Etüv	: Nüve FN 500 (TÜRKİYE)

### 3.8. Laboratuvar Gereçleri

Mikropipet Seti	: 0,2-2, 2-20, 20-200 ve 100-1000 µl FinnpiPETTE (Thermo Scientific, FİNLANDİYA)
-----------------	---



### **3.9. Bilgisayar Programları**

Dizi analizi kromatogramlarını incelemek için ChromasPro programı, dizileri hizalamak ve analiz platformlarında kullanılacak hale getirmek için Mega 5.03 programı, filogenetik ağaç oluşturmak için MrBayes 3.1 ve PAUP 4.0 platformları ve Maksimum Likelihood analizi için en uygun sekans evrim modelini bulmak için PAUP 4.0 ve MrModeltest2 programları kullanıldı.

## 4. METOT

### 4.1. DNA İzolasyonu

Sparidae ailesi üyelerinden alınan örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirmek için total DNA izolasyon metodu kullanıldı. Balık örneklerinden 2 mm<sup>3</sup> boyutunda parçaların bulunduğu 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne sırasıyla 250 µl SDS-lizis tamponu, 10 µl Proteinaz K ve 15-20 tane Chelex eklendi. 56°C'deki inkübatörde 10 dakikada bir parmakla çalkalanarak solüsyon haline gelmesi sağlandı. En yüksek devirde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pelete temas etmeden çekilerek yeni bir tüpe alınıp üzerine 100 µl 5 M NaCl ve 100 µl dH<sub>2</sub>O eklendi ve pipetlenerek iyice karışması sağlandı. En yüksek devirde 10 dakika santrifüj edildi. Yeni tüpe alınan süpernatanta, hacminin 2,5 katı kadar soğuk absolüt etanol tüpün kenarından yavaşça sızdırılarak eklendi. Tüpler aşağı-yukarı hareketle yavaşça çalkalandı ve en yüksek devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından tüpe 200 µl %70'lik etanol eklendi ve pelet çözünene kadar parmakla çalkalandı. En yüksek devirde 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Tüpler baş aşağı dizilerek kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelet üzerine 50µl low TE eklenerek çözüldü. Kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı.

İzole edilen DNA örneklerinin PZR gibi işlemlerde kullanılmak üzere uygun olup olmadığının kalitatif analizi agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Bunun için DNA varlığı ve kalitesi %0,7'lik agaroz jelde 120V ve 300mA'de 20 dakika yürütülerek kontrol edildi.

### 4.2. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen DNA'nın ve PZR ürünlerinin kalitatif analizi %0,7'lik ve %1'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Agaroz 0,5X TBE içinde kaynatıldıktan sonra yaklaşık 50°C'ye kadar soğutuldu ve içerisine son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde Etidyum bromür çözeltisinden eklendi. Jel, iyonik kuvveti ile pozitif ve negatif elektrotlar arasındaki iletkenliğin ve elektrik alanının oluşumunu sağlayan 0,5X TBE tamponu içeren bir tanka yerleştirildi. DNA örnekleri 3 µl örneğe 1 µl 6X DNA

yükleme boyası ve PZR ürünleri 5 µl örneğe 1 µl 6X DNA yükleme boyası eklenerek jele yüklendi. Son olarak örneklerin bant boyunu görebilmek için jele 2 µl 1 kbç DNA markörü yüklendi. Tank güç kaynağına bağlandı ve jele yüklenen DNA örnekleri 120V ve 300mA’de 20 dakika yürütüldü.

### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Mitokondriyal genomunun çoğaltılabilmesi için polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu temel olarak denatürasyon, bağlanma ve uzama olarak 3 aşamada gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.1.’deki referans makalelerde tanımlanmış diziler olup genler üzerinde bağlandıkları bölgeler Chromas Pro ile belirlendi ve uzun PZR primerleri türlere özgü modifikasyonlardan geçirildi.

Tablo 3.1’de verilen primer çiftlerinden, çoğaltılacak gen bölgesine özgü primerler kullanılarak Tablo 4.1.’de belirtilen içerikte reaksiyon hazırlanarak Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.’te verilen koşullarla PZR gerçekleştirildi.

**Tablo 4.1.** Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İçeriği

	<b>Son Konsantrasyon</b>
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5
10X MgCl <sub>2</sub> ’süz Tampon	1X
dNTP karışımı (mM)	0,2
Primerler (pM)	100
Taq DNA Polimeraz	1U
Kalıp DNA (ng)	200

**Tablo 4.2.** 16S PZR Döngü Koşulları (618 bç)

<b>16Sar_L ve 16Sbr_H (618 bç)</b>	
Başlangıç Denatürasyonu	94°C, 2dk
Denatürasyon	94°C, 30sn
Bağlanma	50 °C, 30sn
Uzama	72 °C, 1dk
Son Uzama	72°C, 5dk
Döngü Sayısı: 40	

**Tablo 4.3.** COI PZR Döngü Koşulları

<b>COI FishF1 ve COI FishR1 (714 bç)</b>	
Başlangıç Denatürasyonu	94°C, 2dk
Denatürasyon	94°C, 30sn
Bağlanma	54°C, 30sn
Uzama	72 °C, 1dk
Son Uzama	72°C, 5dk
Döngü Sayısı: 35	

PZR ürünleri, reaksiyonun kontrolü amacıyla 5µl ürün, 1µl DNA yükleme boyası ile karıştırılarak %1’lik agaroz jele 1kbç DNA markörü ile birlikte yüklenip 120V-300mA’de 30 dakika yürütüldü.

#### **4.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Dizilemeye gönderilecek örnekler “High Pure PCR Purification Kit (Roche)” ile saflaştırıldı. Bunun için PZR ürünlerinin 20 µl’si üzerine 100 µl bağlama tamponu eklendi. Bu solüsyon toplama tüpleri içine yerleştirilen filtrelili tüplere aktarıldı. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edildi. Üzerine 100 µl yıkama tamponu eklendi. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edildi. Üzerine yeniden 100 µl yıkama tamponu eklendi. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edildi. Filtrelili tüpler yeni toplama tüplerine yerleştirilerek en yüksek devirde 30 saniye santrifüj edildi ve ardından filtrelili tüpler yeni 1,5ml’lik tüpe geçirilerek üzerine 20 µl süzme tamponu filtrenin tam orta noktasına gelecek şekilde eklendi. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilerek saflaştırılmış PZR ürününün 1,5ml’lik tüpün dibine toplanması sağlandı.

Pürifikasyon sonrası PZR ürünlerinin kalitatif analizi %1’lik agaroz jelde yapıldı.

#### **4.5. Dizi Analizi**

Pürifiye edilen örnekler dizi analizi için MacroGen Inc. Seoul (Kore) firmasına gönderildi.

#### **4.6. Filogenetik Analiz**

Elde edilen dizilerin çoklu sekans eşleştirmesi MEGA5 platformunda ClustalW ile yapıldı (Tamura ve ark., 2011). Elde edilen çoklu eşleştirmeler manuel olarak kontrol edildi.

Filogenetik çalışma için PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002) platformunda Maximum Parsimony (MP) ve Maksimum Likelihood (ML) analizleri, MrBayes platformunda ise bayesian yaklaşımıyla (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001; Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) ML analizi gerçekleştirildi.

Maximum Likelihood analizi için en uygun sekans evrim modeli PAUP ve MrModeltest2 programları kullanılarak bulundu (Nylander, 2004). Hem 16S hem de COI eşleştirmesi için en uygun modelin (GTR+I+G) modeli olduğu görüldü. Maximum likelihood analizi için PAUP ve MrBayes bloklarında aşağıdaki parametre değişiklikleri yapıldı.

PAUP platformunda 16S analizi için kullanılan parametreler:

Lset Base=(0.2888 0.2601 0.2327) Nst=6 Rmat=(19.5170 177.2534 77.3343  
4.2242 239.3379) Rates=gamma Shape=0.7627 Pinvar=0.5816;

PAUP platformunda COI analizi için kullanılan parametreler:

Lset Base=(0.2485 0.2920 0.1542) Nst=6  
Rmat=(36144.1211 592139.3125 97854.9453 27653.6367 549340.5625)  
Rates=gamma Shape=1.6311 Pinvar=0.6569;

MrBayes platformunda 16S ve COI analizleri için kullanılan parametreler:

Lset nst=6 rates=invgamma;

Prset statefreqpr=dirichlet(1,1,1,1);

Bayesian analizi için Monte Carlo Markov Chain örnekleme frekansı 10 olacak şekilde 1.000.000 jenerasyon tekrar edildi.

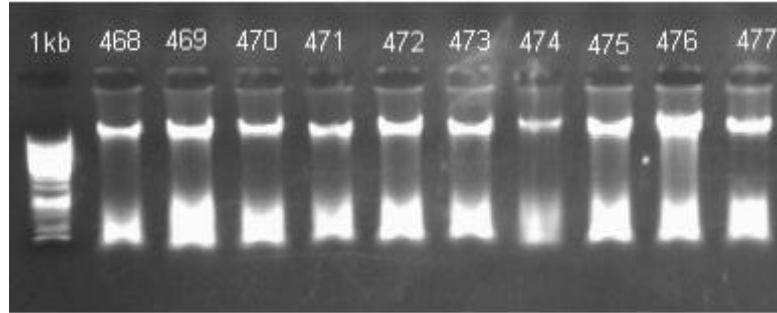
## 5. BULGULAR

### 5.1. Örneklerin Tanımı

Bu çalışmaya Tablo 3.1.'de verilen Sparidae ailesinin 15 türü katıldı. 16S ribozomal RNA geni için bu 15 türün hepsi analiz edilirken, sitokrom oksidaz I geni için 13 tanesi analiz edildi.

### 5.2. DNA İzolasyonu

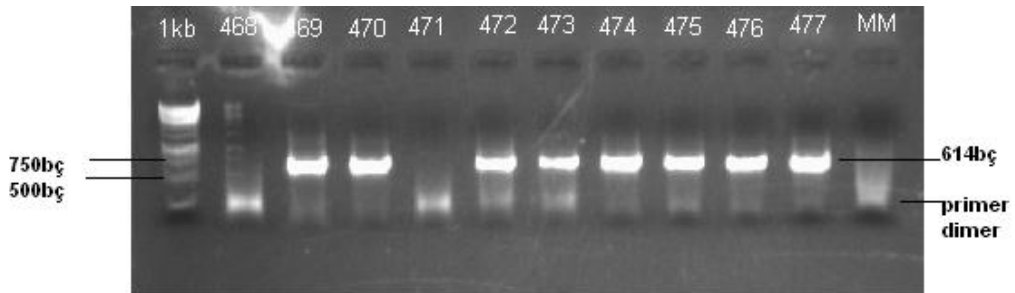
DNA izolasyonu toplanan örneklerin kas dokularından Bölüm 4.1.'de anlatılan total DNA izolasyon protokolü ile gerçekleştirildi. İzolasyonun kontrolü %0,7'lik agaroz jelde yapıldı ve DNA örneklerinin izolasyon sırasında kırılmadan elde edildikleri gözlemlendi (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. İzole edilen DNA örneklerinin %0,7'lik agaroz jelde görüntülenmesi

### 5.3. 16S rRNA Geninin Moleküler Analizi

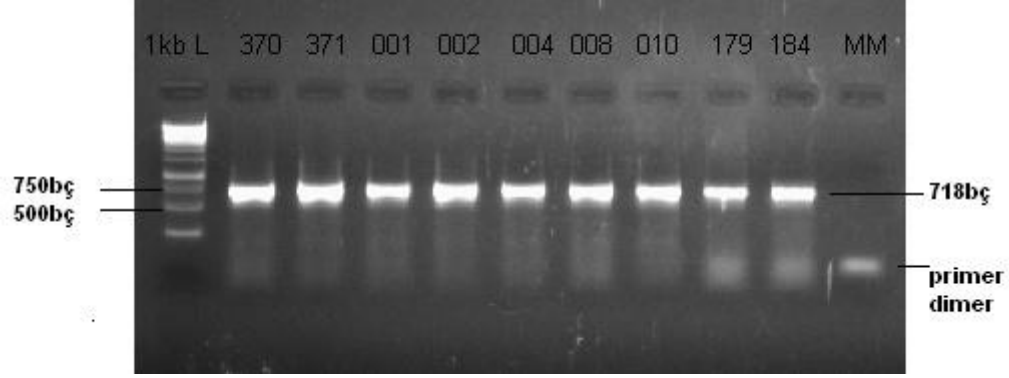
15 Sparidae üyesinden izole edilen DNA örneklerinin 16S gen bölgesi Bölüm 4.3.'te anlatılan koşullarla PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünlerinin kalite kontrolü Bölüm 4.4.'te anlatıldığı gibi %1'lik agaroz jelde 120V'ta 20 dakika yürütülerek yapıldı (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. 16S rRNA PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

#### 5.4. Sitokrom Oksidaz I Geninin Moleküler Analizi

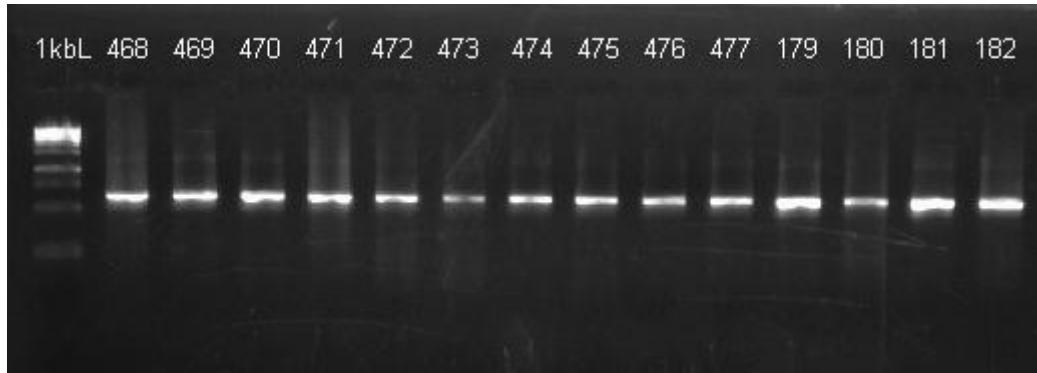
13 Sparidae üyesinden izole edilen DNA örneklerinin COI gen bölgesi Bölüm 4.3.'te anlatılan koşullarla polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PZR ürünlerinin kalite kontrolü Bölüm 4.4.'te anlatıldığı gibi %1'lik agaroz jelde 120V'ta 20 dakika yürütülerek yapıldı (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. COI PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

#### 5.5. PZR Ürünlerinin Dizi Analizi için Saflaştırılması

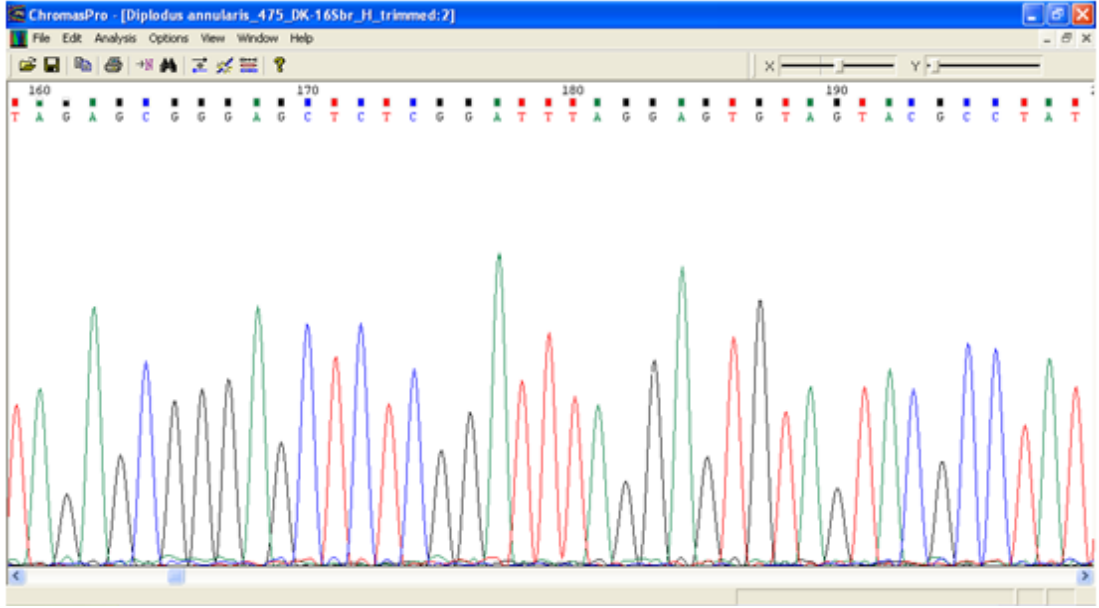
Her iki polimeraz zincir reaksiyonunun ürünleri de Bölüm 4.5.'te anlatıldığı gibi "High Pure Purification Kit" ile saflaştırıldı ve işlemin başarısı %1'lik agaroz jelde 120V'ta 20 dakika yürütülerek kontrol edildi (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Saflaştırılan PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

#### 5.6. Çoğaltılan Gen Bölgelerinin Dizi Analiz Sonuçları

Kromatogram sonuçları elde edilmek istenen gen bölgelerinin dizisini göstermekte olup incelenmek istenen tür içi ve türler arası farklılıkların gözlenmesini sağlamaktadır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. *Diplodus annularis* türüne ait 16S rRNA geni kromatogram görüntüsü

### 5.7. Verilerin Analizi

Dizi analizinden gelen kromatogram sonuçları “Chromas Pro” programı ile incelendi. Kromatogramdaki baz farklılıklarının dizi analizi reaksiyonundaki bir hatadan mı yoksa dizi üzerindeki bir değişiklikten mi kaynaklandığını anlamak için önce aynı türlerin kromatogramları kendi aralarında (Şekil 5.6), sonra diğer türlerin (Şekil 5.7) kromatogramlarıyla karşılaştırılarak incelendi. Farklılıklar için karar vermeden önce NCBI’da daha önceden benzer çalışmalarla bu genler yüklenmişse bu genlerle elimizdeki verilerin karşılaştırması yapıldı ve dizi analiz reaksiyonundan kaynaklı bir sorunsuzsa modifiye edildi. NCBI’da daha önceki çalışmalardan elde edilen 16S rRNA ve COI gen bölgeleri ile karşılaştırma sonuçları ise Tablo 5.1. ve Tablo 5.2.’de gösterildi.





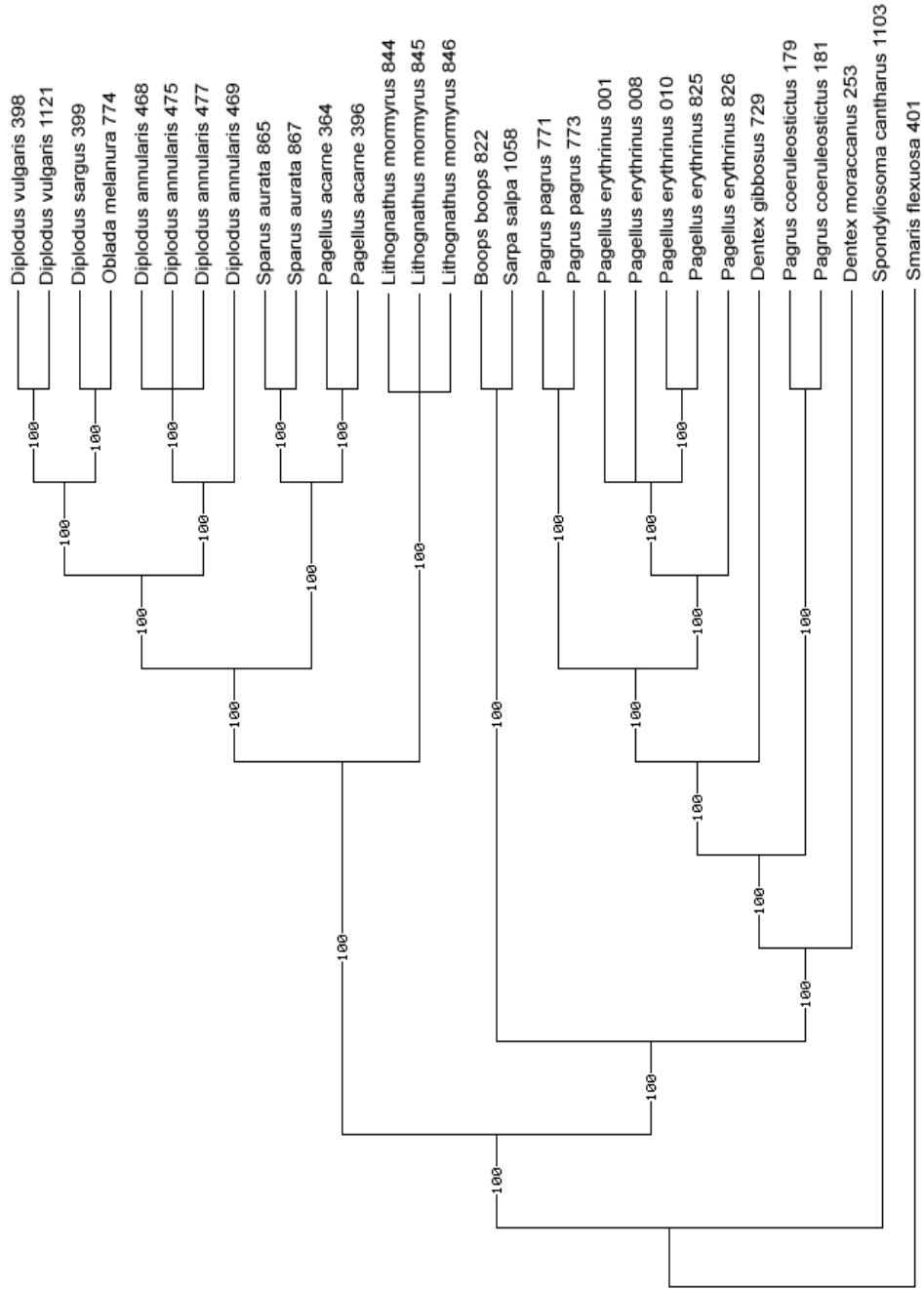
**Tablo 5.1.** 16S geni incelenen bireylerin literatürdeki bireylerle karşılaştırma verileri

16S GENİ			
TÜR ADI	ÖRNEK KODU	NCBI ERİŞİM NO	BENZERLİK ORANI
<i>Boops boops</i>	402, 820, 821, 822	AF247396.1	549/550
<i>Dentex gibbosus</i>	729	-	
<i>Dentex moroccanus</i>	253	-	
<i>Diplodus annularis</i>	477	AJ247286.1	477/478
	475, 476, 472	AJ247286.1	478/478
	473,474	AJ247286.1	478/478
	468-469	AJ247286.1	477/478
<i>Diplodus sargus</i>	399	-	
<i>Diplodus vulgaris</i>	398	AJ247295.1	477/478
	1121	AJ247294.1	478/478
<i>Lithognathus mormyrus</i>	844	AF247410.1	540/541
	845	AF247410.1	535/538
<i>Oblada melanura</i>	774	AF247399.1	532/533
<i>Pagellus acarne</i>	361-371, 396, 803, 804	AJ247281.1	479/479
<i>Pagellus erythrinus</i>	826, 825, 824,8-10, 1-4	-	
<i>Pagrus coeruleostictus</i>	181, 182, 857	-	
	179,180, 183,184, 854, 855	-	
<i>Pagrus pagrus</i>	771, 772, 903	AF247426.1	531/535
	773, 904, 1118	AF247426.1	518/521
<i>Sarpa salpa</i>	1058	AF247402.1	546/549
	1058	AJ247269.1	477/479
<i>Spicara flexuosa</i>	401	FJ625835.1	555/556
<i>Sparus aurata</i>	805, 866, 867	AJ247279.1	468/468
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	1103	AF247403.1	547/549

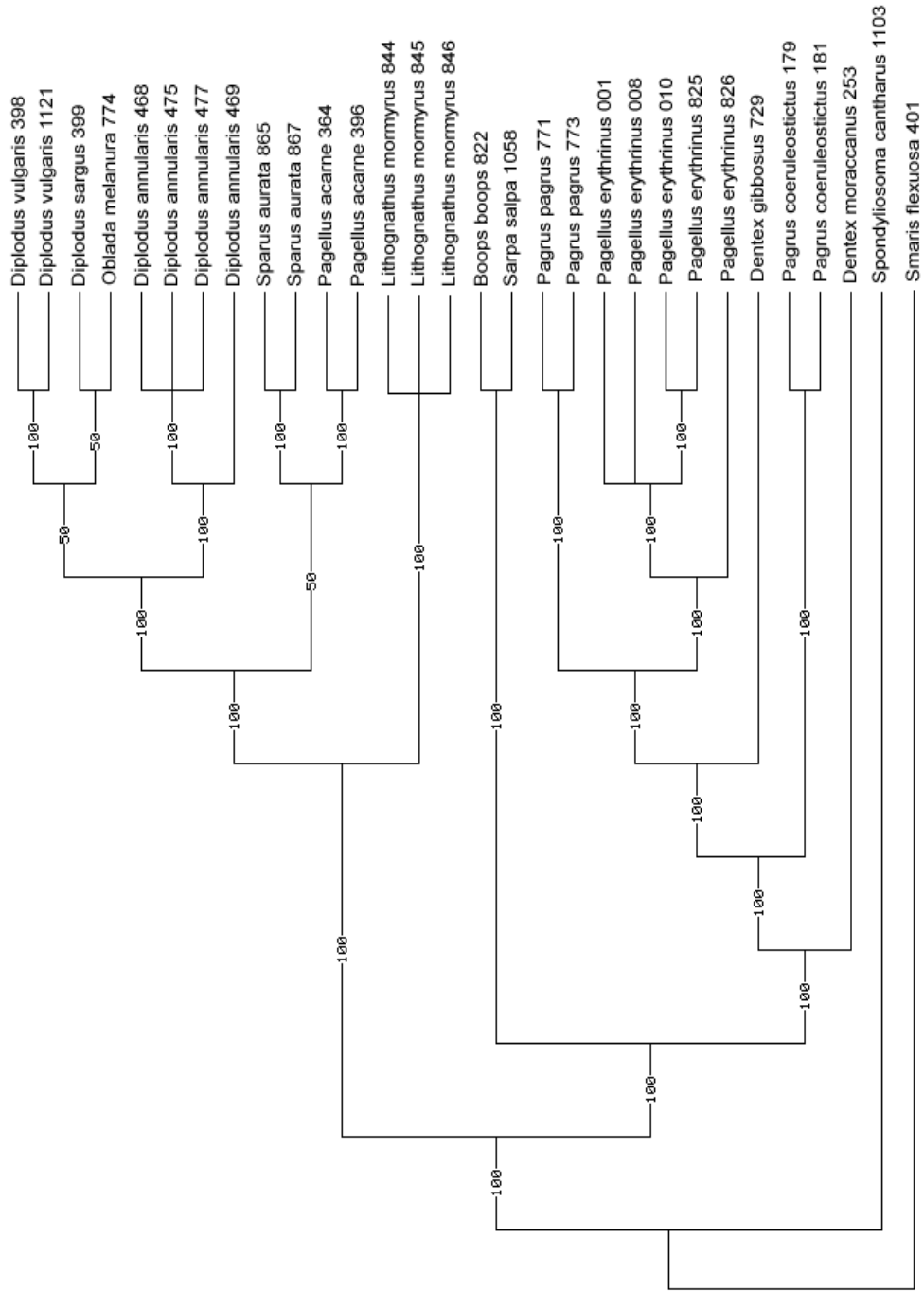
**Tablo 5.2.** COI geni incelenen bireylerin literatürdeki bireylerle karşılaştırma verileri

COI GENİ			
TÜR ADI	ÖRNEK NO	NCBI ERİŞİM NO	BENZERLİK ORANI
<i>Boops boops</i>	820, 821	FN689085.1	455/455
<i>Dentex gibbosus</i>	729	-	
<i>Dentex moroccanus</i>	253	-	
<i>Diplodus annularis</i>	468-477	-	
<i>Diplodus sargus</i>	399	EU239693.1	561/562
<i>Diplodus vulgaris</i>	398	FN689129.1	455/455
<i>Lithognathus mormyrus</i>	844	-	
<i>Oblada melanura</i>	774	-	
<i>Pagellus erythrinus</i>	367	FN689213.1	455/455
<i>Pagrus coe.</i>	179-184	-	
<i>Pagrus pagrus</i>	771-773	-	
<i>Pagellus acarne</i>	361-366, 368-371	FN689213.1	455/455
<i>Sparus aurata</i>	805, 864, 865	DQ248312.1	628/629
		FN689315.1	455/455

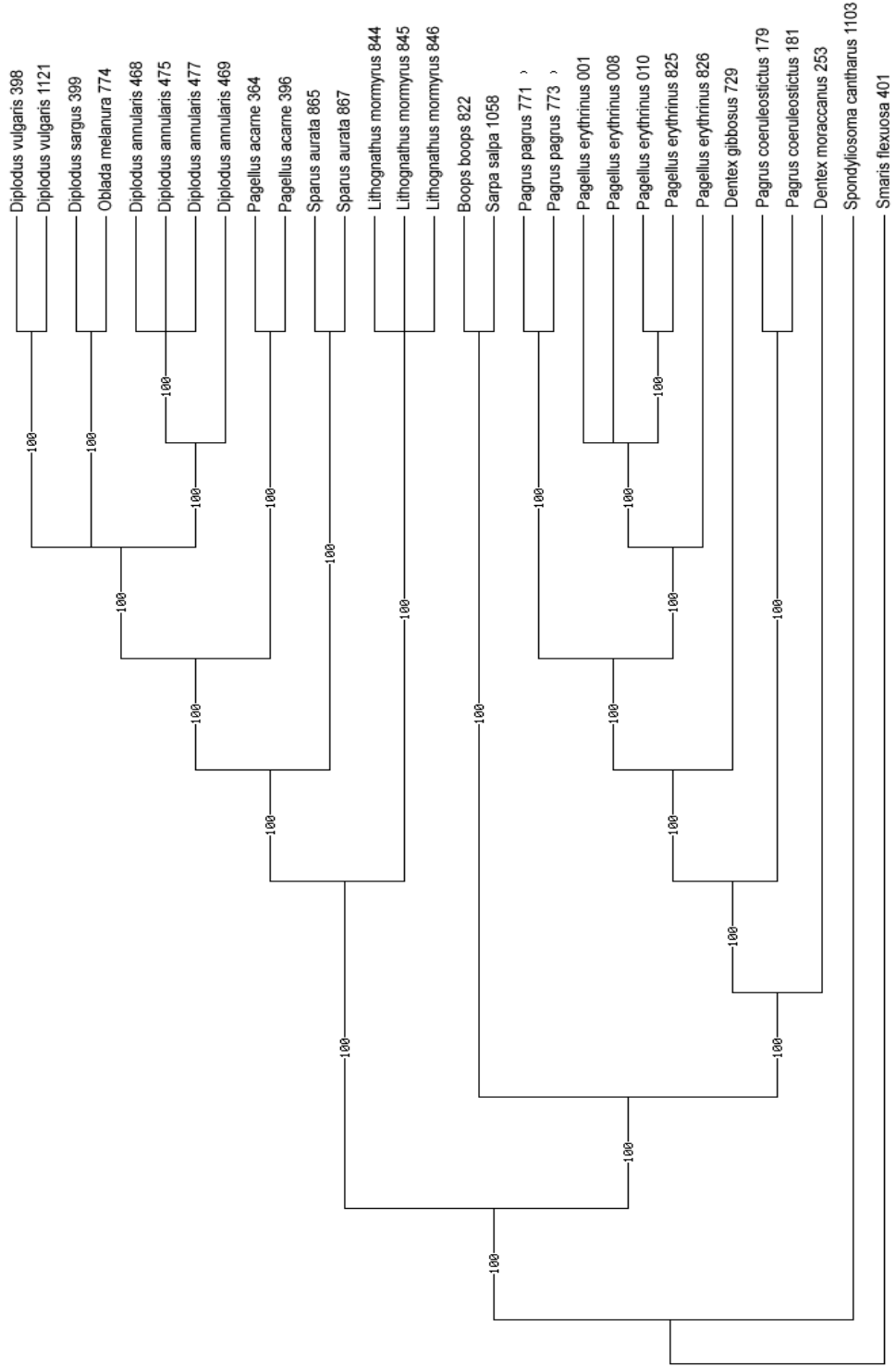
Tüm bu veriler incelendikten sonra soy ağaçlarını oluşturmak için Mega5 programını kullanarak tüm diziler hizalandı, sarkan uçlar kesilerek ve eşleşen bölgelerde kayma varsa düzeltilerek diğer programlarda kullanıma hazır hale getirildi. Filogenetik çalışma için Bölüm 4.6.'da anlatıldığı gibi “PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002)” platformunda “Maximum Parsimony (MP)” ve “Maksimum Likelihood (ML)” analizleri, “MrBayes” platformunda ise “Bayesian” yaklaşımıyla (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001; Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) ML analizi gerçekleştirildi. Analiz sonunda 16S rRNA ve COI gen verileriyle elde edilen soy ağaçları Şekil 5.8 – Şekil 5.13'te verildi.



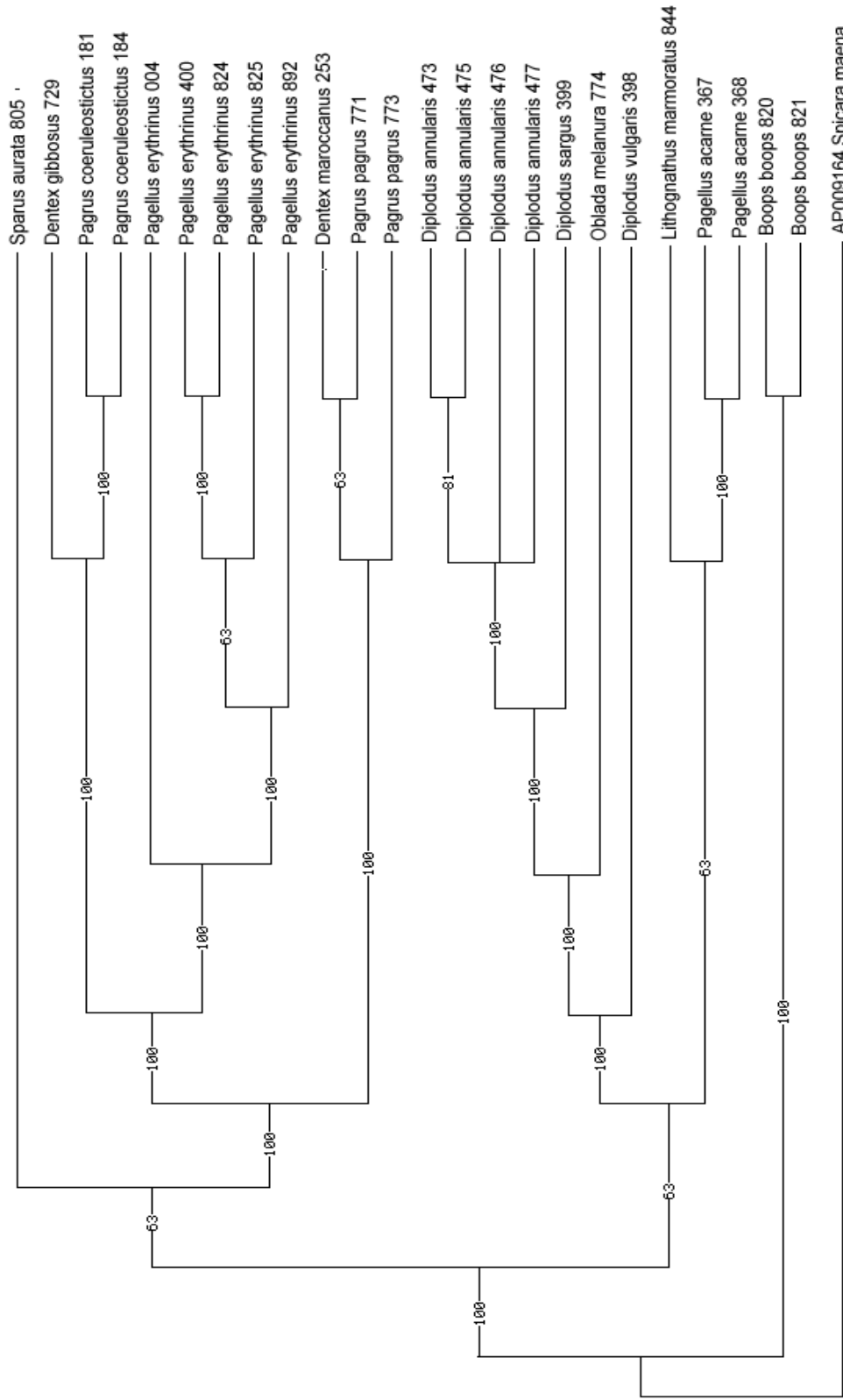
**Şekil 5.8.** MrBayes Platformunda Bayesian analizyle 16S rRNA gen verisiyle çizilen soy ağacı



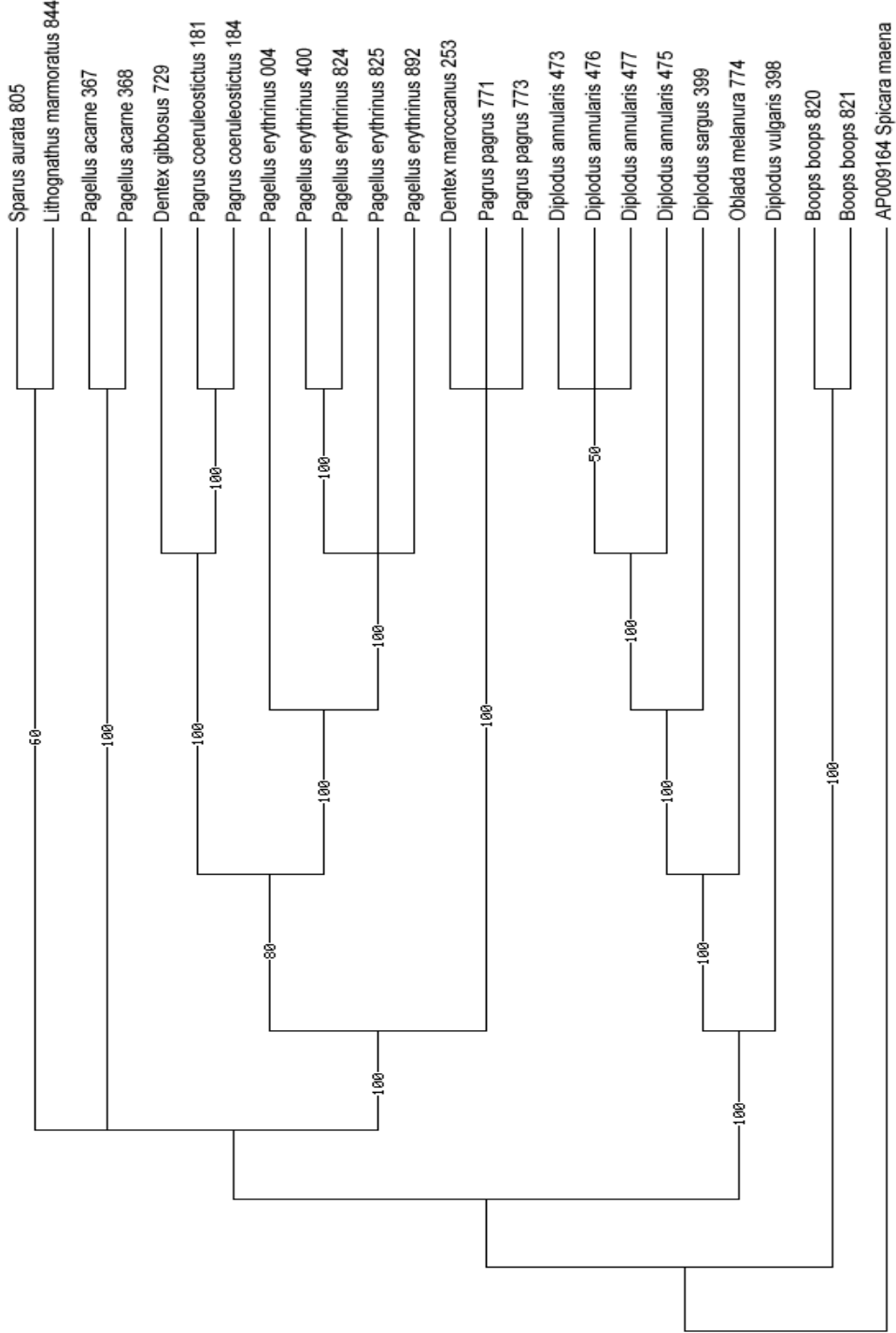
Şekil 5.9. PAUP platformunda MP analiziyle 16S rRNA gen verisiyle çizilen soy ağacı



**Şekil 5.10.** PAUP Platformunda ML analiziyle 16S rRNA gen verisiyle çizilen soy ağacı

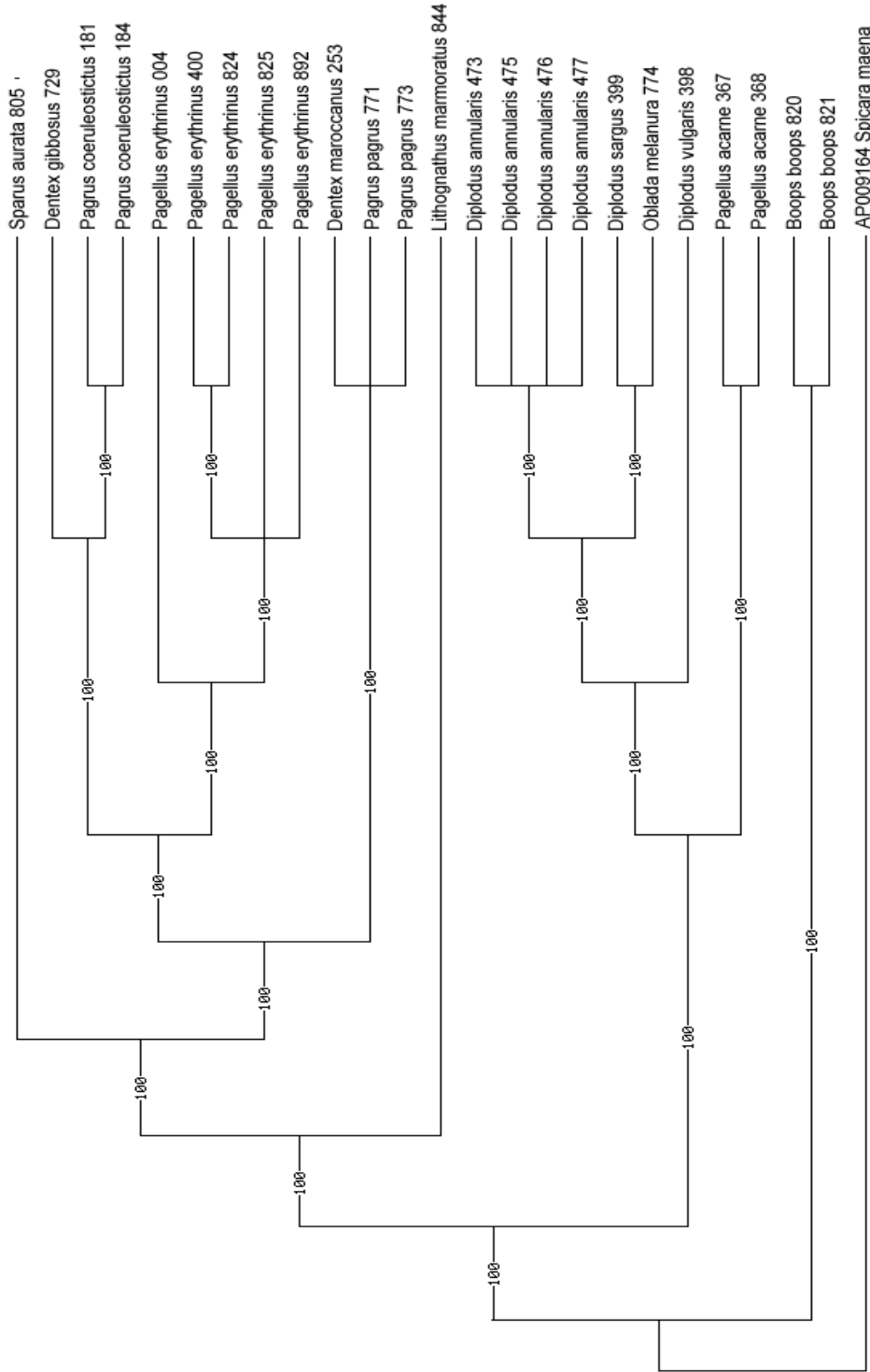


**Şekil 5.11.** MrBayes Platformunda Bayesian analiziyile COI verisiyle çizilen soy ağacı



Şekil 5.12. PAUP Platformunda MP analiziyle COI verisiyle çizilen soy ağacı





**Şekil 5.13.** PAUP Platformunda ML analiziyle COI verisiyle çizilen soy ağacı

## 6. TARTIŞMA

Ekonomik öneme sahip Sparidae ailesi üyeleri, morfolojik özelliklerine göre tanımlanan ancak yapılan genetik çalışmalarla tanımlamada kullanılan karakterlerin tür tayini yapmada yetersiz kaldığı görülen balıklardır. Sparidae ailesi, diş yapıları ve beslenme tarzına göre Sparinae, Denticinae ve Boopsinae olarak 3 alt gruba ayrılır. Bu iki özelliğe ek olarak tropik türleşmeleri de dikkate alındığında Sparidler Boopsinae, Denticinae, Diplodinae, Pagellinae, Pagrinae ve Sparinae olarak 6 alt ailede sınıflandırmıştır. İncelenen her yeni özellik yapılan bu tanımlamaların geçerliliğini sorgular nitelikte olup morfolojik tayinle genetik yapıya bağlı tayin arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. Diş görünüşleri incelenerek monofiletik olduğu düşünülen türlerin aslında monofiletik olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Orrell, 2004).

Hanel ve Sturmbauer (2000) de Kuzeydoğu Atlantik ve Akdeniz’de tanımlı 24 Sparidae üyesi ile *16S rDNA* üzerinden yaptıkları çalışmalarında beslenme tipi ve diş yapısına bağlı şimdiki taksonomik ayrıma katılmadıklarını ve incelenen cinslerin parafiletik olduğunu göstermişlerdir (Şekil 6.1).

*Boops boops*, *Sarpa salpa* ve *Spondyliosoma cantharus* türlerinin yakın olduğunu ama *Spondyliosoma cantharus* türünün diğer iki türe daha uzak olduğunu göstererek Boopsinae alt ailesindeki değişikliği göstermişlerdir (Şekil 6.1; Soy ağacı 1).

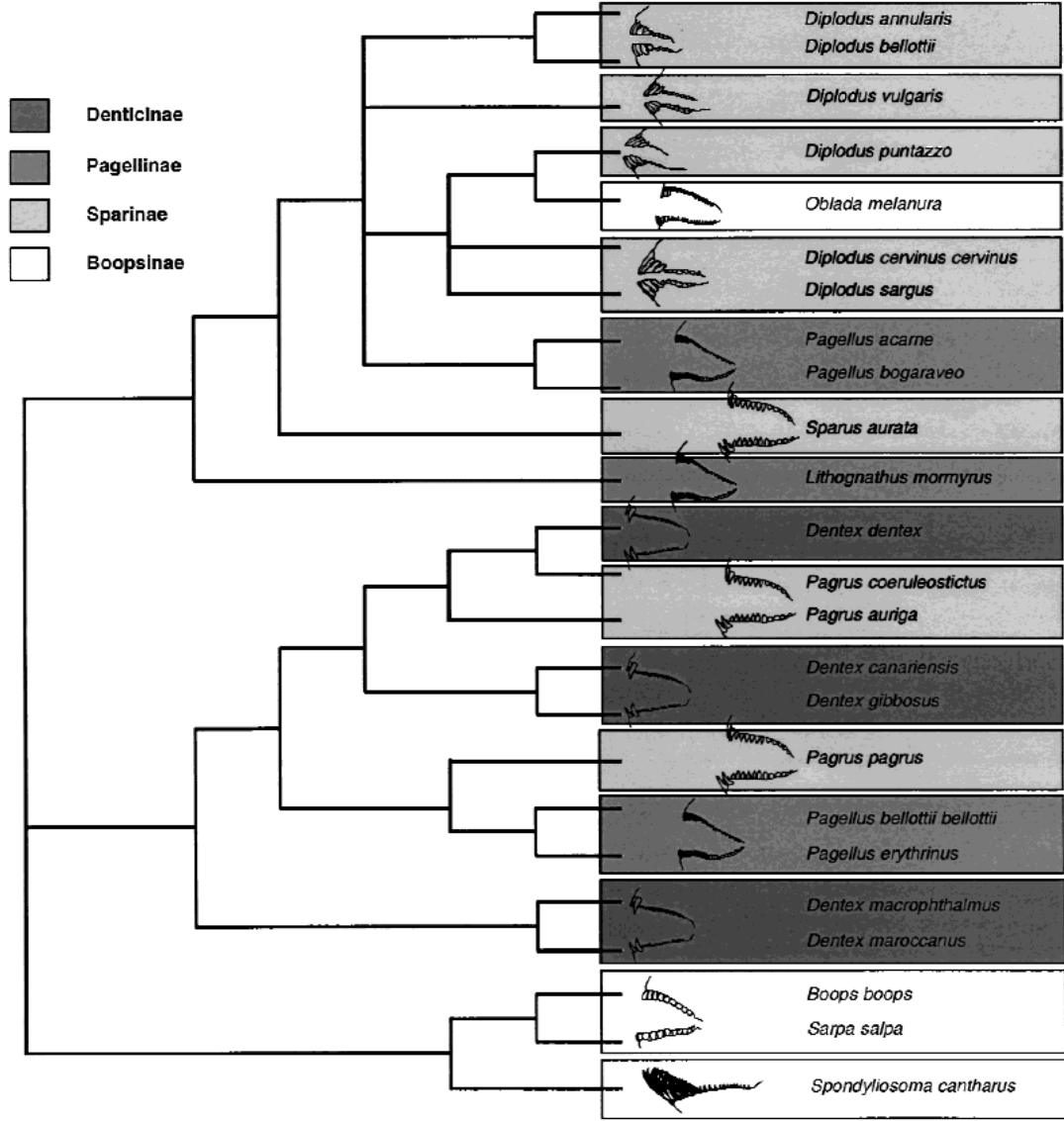
*Dentex macrophthalmus* ve *Dentex maroccanus* diğer *Dentex* türlerinden farklı bir yerde durmakta ve eskiden *Cheimereus* cinsine dahil olan *Dentex canariensis* ve *Dentex gibbosus*, *Pagrus coeruleostictus* ve *Pagellus erythrinus* ile birlikte ayrı dallanmaktayken *Dentex* cinsinin parafiletik kökeni gözlenmektedir (Şekil 6.1; Soy ağacı 2). Aynı şekilde *Pagellus* türlerinin bir kısmı soy ağacı 2’de *Dentex* üyeleriyle sınıflanırken bir kısmı da soy ağacı 3’te *Diplodus* üyeleriyle sınıflanarak *Pagrus* cinsinin parafiletik olduğuna dikkat çekmektedir. *Oblada melanura* türünün *Diplodus puntazzo* ile kardeş grup oluşturarak *Diplodus* cinsine dahil olduğu ve

böylece *Diplodus* cinsinin yeniden şekillendiği de görülmektedir (Şekil 6.1; Soy ağacı 3).



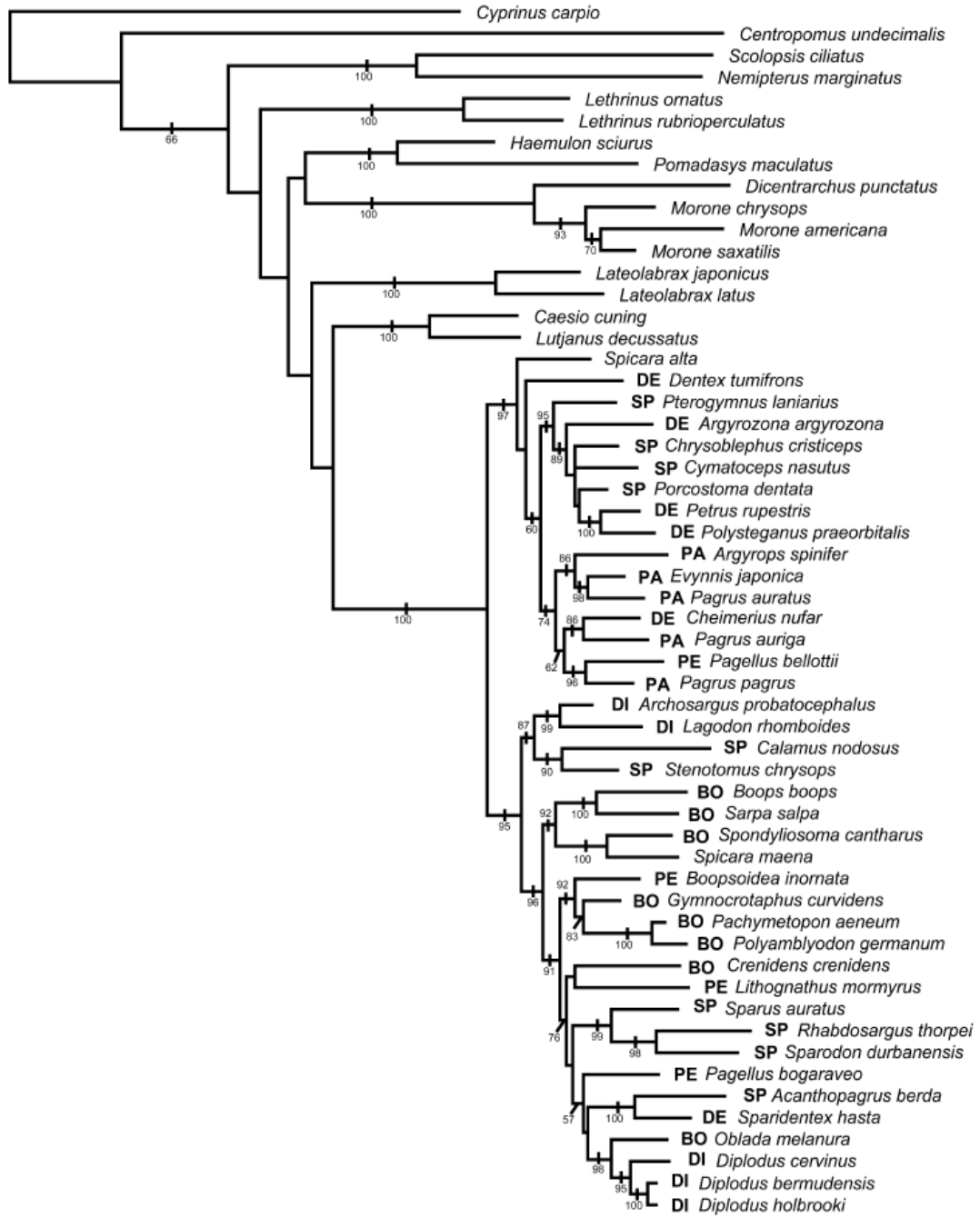
**Şekil 6.1.** 16S rDNA verilerine dayanarak oluşturulan konsensus soy ağacı (Hanel, 1999)  
(Dalın yukarıdaki sayılar MP için bootstrap değerleri; dalın üzerindeki sayılar quartet puzzling ile elde edilen likelihood değerleri; dalın altındaki sayılar neighbor joining için bootstrap değerleri)

Orrell ve Carpenter'ın (2004) araştırmasında ise Sparidae alt ailelerinin ayrımı yapılmakta, *Spicara*, *Pagrus* ve *Pagellus* cinslerinin monofiletik olmadığı, Centracanthidae ailesine dâhil olan *Spicara* cinsinin Sparidae ile monofiletik olduğu bulunmuştur. Daha önce diş yapısına bakılarak Pagellinae alt ailesine dahil edilen *Sparus aurata* türünün bu araştırma ile Sparinae alt ailesine ve Sparinae alt ailesine dahil olan *Pagrus pagrus* ve *Pagrus auriga* türlerinin Pagrinae alt ailesine dahil olduğu gösterilmiştir (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. Sparidae üyelerinin dental morfolojilerine göre yapılan sınıflandırma (Hanel, 2000)

Orrell ve Carpenter çalışmalarında elde ettikleri verilerle ML analizi ile çizdikleri soy ağacında Hanel'in çalışmasında olduğu gibi *Oblada melanura* türünün *Diplodus* üyeleri ile yakın olduğunu, *Boops boops* ve *Sarpa salpa* ile *Spondylisoma cantharus* ve *Spicara maena* türlerinin kardeş ve bu iki kardeş grubun aynı yerden kök aldığını, *Pagrus pagrus* ve *Pagrus auriga* türlerinin farklı türlerle kardeş ve bu kardeşlerin aynı yerden kök aldığını ve *Pagellus bogaraveo* türünün *Diplodus* üyeleriyle aynı yerden dallanmaya başladığını bulmuşlardır (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. 16S rRNA ve cytb gen verilerinden ML analizi ile oluşturulan soy ağacı (Orrell, 2004)  
 (BO: Boopsinae; DE: Denticinae; DI: Diplodinae; PA: Pagrinae; PE: Pagellinae; SP: Sparinae;  
 Dallardaki sayılar bootstrap değeri, >%50)

16S rRNA gen dizileri ile MrBayes platformunda Bölüm 4.6.'da verilen parametrelerle yapılan analiz sonucunda elde edilen soy ağacında (Şekil 5.8) *Oblada melanura* türünün *Diplodus sargus* türü ile kardeş tür olduğu ve *Diplodus* cinsine dâhil olduğu, bu kolun *Diplodus vulgaris* türü ile yakın olduğu ve bu *Diplodus* üyelerinin *Diplodus annularis* türü ile yakın olduğu, *Sparus aurata* ile *Pagellus acarne* türlerinin yakın olduğu, *Lithognathus mormyrus* türünün *Diplodus* üyeleriyle

*Sparus aurata* ve *Pagellus acarne* türlerinden ayrı dallandığı, ağacın diğer yarısında ise *Boops boops* ve *Sarpa salpa* türlerinin kardeş türler olup diğer ana koldan ayrıldığı ve bu ayrılan kolun üyelerinin *Pagrus* ve *Pagellus* üyeleri olduğu, *Pagrus* ve *Pagellus* üyelerinin kendi arasında sınıflandığı görülmektedir. Bu kısımda *Dentex* üyeleri dikkat çekmektedir. Şöyle ki *Dentex gibbosus*, aynı noktadan ayrıldığı *Pagrus* ve *Pagellus* üyeleriyle bir arada bulunurken, *Dentex moroccanus* tüm bu bireylerden ayrı olarak dallanmaktadır. Son olarak, *Spondyllosoma cantharus* türünün diğer türlerden ayrı olarak dallanmaya başladığı görülmektedir. Bu veriler bir arada düşünüldüğünde çalışmada kullanılan *Diplodus*, *Pagellus* ve *Pagrus* cinslerinin bazı üyelerinin monofiletik kökenli olmadığı anlaşılmaktadır.

PAUP platformunda *16S rRNA* dizileriyle Bölüm 4.6.'daki verilerle yapılan Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen Şekil 5.9.'daki soy ağacında dallanma değerlerindeki değişiklik dışında fark bulunmamaktadır. Dallanma değerlerindeki değişiklik ise atanan sabit değer üzerinde olup dallanmayı farklı değerlerle de olsa doğrular niteliktedir.

PAUP platformunda detayları Bölüm 4.6.'da verilen Maksimum Likelihood analizi ile *16S rRNA* gen dizilerinden çizilen soy ağacında (Şekil 5.10) ise *Pagellus acarne* ve *Sparus aurata* türlerinin diğer türlere göre konumu değişmiştir. MrBayes platformunda bu iki tür aynı noktadan dallanmakta iken, PAUP platformunda *Pagellus acarne* türü, *Oblada melanura* türünü de içine alan *Diplodus* üyeleri ile bir grup oluştururken *Sparus aurata* bunlardan önce ayrılmaktadır.

Sitokrom oksidaz I (COI) gen dizileriyle, MrBayes platformunda Bölüm 4.6.'da verilen parametrelerle yapılan analiz sonucunda elde edilen soy ağacı (Şekil 5.11), *16S rRNA* verileriyle elde edilen sonuçlardan daha farklı sonuçlar sunmaktadır. Şöyle ki, *Boops boops* diğer türlerden ayrı dallanmakta, *Boops boops* türü harici grup kendi içinde ikiye ayrıldıktan sonra, bir kol *Oblada melanura* türünü de içeren *Diplodus* üyeleri ve *Pagellus acarne* türünü taşıırken, diğer kol yine *Pagellus*, *Pagrus* ve *Sparus* üyelerini taşımaktadır. *Dentex moroccanus* türünün *Pagrus pagrus* türüyle birlikte dallandığı, bu kolun *Pagellus erythrinus*, *Pagrus coeruleostictus* ve *Dentex gibbosus* ile akraba olduğu, *Sparus aurata* türünün tüm bu türlerin dışında kaldığı görülmektedir. Yine burada *Dentex* üyelerinin birbirinden çok uzak olduğu dikkat çekmektedir. Alt ana kol ise *Pagellus acarne* türüyle yakın olan

*Lithognathus mormyrus* türünü taşıyan kol ile *Diplodus* üyelerini taşıyan kol olarak ikiye ayrılmaktadır. *16S rRNA* verilerinden farklı olarak burada *Diplodus vulgaris* diğer *Diplodus* üyelerinden ayrı dalda bulunmakta olup bu ayrılan dal da yine diğer *Diplodus* türleriyle *Oblada melanura* türünün ayrıldığı bir grubu oluşturmaktadır. Sonuç olarak *Diplodus sargus* ile *Diplodus annularis* türlerinin birbirine daha yakın olduğu, önce *Diplodus vulgaris* türünün, sonra *Oblada melanura* türünün bu üyelerden ayrıldığı anlaşılmaktadır.

PAUP platformunda Bölüm 4.6.'daki verilerle yapılan Maksimum Parsimony analizi sonucu *COI* dizilerinden elde edilen Şekil 5.12.'deki soy ağacında *Boops boops* türü ile ayrıldıktan sonra diğer türleri içeren grupta *Pagellus* ve *Pagrus* üyelerini içeren kolda *Sparus aurata* ile önceki analizde alt kolda *Pagellus acarne* ile dallanan *Lithognathus mormyrus* türünün dallanmasında fark bulunmaktadır. *Sparus aurata* MrBayes analizinde *Pagrus* ve *Pagellus* üyelerinden tek başına ayrılmışken PAUP programının MP analizinde *Lithognathus mormyrus* ile kardeş tür olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda önceki analizde *Lithognathus mormyrus* ile dallanan *Pagellus acarne* türü bu gruptaki diğer türlerden ayrı dallanmıştır.

*COI* gen dizilerinden PAUP platformunda Maksimum Likelihood analiziyle hazırlanan diğer soyağacında ise *Boops boops* türünden ayrıldıktan sonra oluşan grubun üst kolu bazı dallardaki dallanma yüzdeleri hariç MrBayes platformunun analiz sonucu ile benzemektedir. Ancak *Lithognathus mormyrus* türü her iki ağaçtan da farklı olarak dallanmış ve üst kolun dallanmasının başlangıcı olmuştur. Alt kolda ise *Oblada melanura* türünün *16S rRNA* dizisiyle yapılan analizde olduğu gibi *Diplodus sargus* ile yine kardeş tür olduğu ancak bu kez *Diplodus annularis* üyeleriyle aynı noktadan dallandığı görülmektedir. *Pagellus acarne* türü de *Oblada melanura* türünün de içinde olduğu *Diplodus* üyeleriyle aynı noktadan dallanarak ağaca yerleşmiştir. Sonuç olarak *COI* gen verilerine dayanarak yapılan analizlerde de Sparidae ailesinde yer alan *Dentex* ve *Pagellus* cinslerinin parafiletik kökeni dikkat çekmektedir.

Araştırma sonuçları Hanel ve Strumbauer'in (2000) yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla benzer ve farklı yanlar içermektedir. Şöyle ki *Spicara maena* türünün kök olarak atandığı Hanel'in çalışmadaki soy ağacı ile bu çalışmanın *16S* gen dizileriyle hazırlanan soy ağaçları karşılaştırılırsa *Boops boops* ve *Sarpa salpa*

türlerinin kardeş tür olduğu bilgisi örtüşmekle birlikte diğer türler için bazı farklılıklar olduğu görülmektedir. Örneğin, *Spondyliosoma cantharus* türünün diğer türlerden daha önce ayrıldığı sonucuna ulaşmamıza rağmen Hanel'in çalışmasında bu tür *Boops boops* ve *Sarpa salpa* ile birlikte yer almaktadır. *Dentex gibbosus* türünün *Dentex canariensis* türüyle kardeş tür olduğu ve bazı *Pagrus* ve *Dentex dentex* türlerinin bir arada bulunduğu bir kol ile aynı noktadan dallandığı Hanel'in çalışmasından farklı olarak *Dentex gibbosus*, *Pagellus* ve *Pagrus* üyeleriyle aynı noktadan ayrılmaktadır. Her iki çalışmada da *Sparus aurata*, *Diplodus* üyeleriyle farklı dallarda ancak aynı gruplarda bulunmaktadır. Buna karşılık *Sparus aurata*, Hanel'in çalışmasında *Pagellus acarne* ve *Pagellus bogaraveo* türlerine uzakken, çalışmamızda MrBayes ve PAUP MP analizlerinde *Pagellus acarne* ile aynı noktadan dallanmakta ve PAUP ML analizinde ise *Diplodus* üyeleriyle dallanmakta olup *Pagellus acarne* türüne uzak gözükmektedir.

Orrell ve Carpenter'in (2004) çalışmasının sonuçlarıyla karşılaştırma yapacak olursak çalışma için seçilen birçok tür farklı olmakla birlikte ortak yön olarak *Oblada melanura* türünün *Diplodus* üyeleriyle bir arada olması ve farklılık olarak da Orrell'in çalışmasında kardeş çıkan *Boops boops* ve *Sarpa salpa* türlerinin *Spondyliosoma cantharus* ile aynı noktadan dallanırken, çalışmamızda *Spondyliosoma cantharus* türünün diğer tüm üyelerden önce ayrılmış olması gösterilebilir.

Tüm bu araştırmaları toparlayacak olursak, 16S Parsimony ve ML analizleri Orrell ve Carpenter'ı *Diplodus* cinsinin monofiletik olduğu sonucuna götürürken, sitokrom b dizileri ile çalışan Hanel ve Sturmbauer'i (2000) ise *Pagellus*, *Pagrus* ve *Dentex*'in monofiletik olmadığı ve yine sitokrom b dizisini kullanan Orrell'i (2002) *Pagellus*, *Pagrus*, *Dentex* ve *Spicara* cinslerinin parafiletik olduğu sonucuna götürmüştür. Araştırmamızda ise Orrell'in çalışmasıyla uyumlu olarak *Diplodus* cinsinin hem 16S rRNA hem de COI gen dizileriyle yapılan analiz sonuçlarıyla monofiletik olduğu ve *Dentex* üyeleri, *Lithognathus mormyrus*, *Sparus aurata* türlerindeki değişik dallanma paternlerinin gösterdiği üzere bazı Sparidae üyelerinin parafiletik karakteri belirlenmiştir. Ayrıca *Diplodus* türleri ile dallanan *Oblada melanura* türünün *Diplodus* cinsine dâhil edilebileceği ve "*Diplodus melanura*" olarak adlandırılabilceği görülmektedir. Aynı zamanda COI gen verileriyle oluşturulan soy ağaçları, 16S rRNA gen verileriyle hazırlanan soy ağaçlarının Hanel



(2000) ve Orrell (2004)'in araştırmalarındaki soy ağaçlarıyla olan uyumundan farklı dallanmalar göstermektedir. Bu nedenle monofiletik olmadığı belirlenen Sparidae türlerinde başka genler birkaç farklı metotla analiz edilmeli, genetik ve morfolojik karakterler birlikte irdelenmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

### 7.1. Makaleler

Accioly, I.V., Molina, W.F. (2008). Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes). *Genetics and Molecular Research* 7(2): 358-370.

Adams, K.L., Palmer, J.D. (2003). Evolution of Mitochondrial Gene Content: Gene Loss and Transfer to the Nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 380-395.

Alter, S.E., Palumbi, S.R. (2009). Comparing evolutionary patterns and variability in the mitochondrial control region and cytochrome b in three species of Baleen Whales. *Journal of Molecular Evolution* 68: 97-111.

Arnason, U., Gullberg, A., Widegren, B. (1991). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the Fin Whale, *Balaenoptera physalus*. *Journal of Molecular Evolution* 33: 556-568.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb C.A. ve Saunders N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ecology, Evolution and Systematics* 18: 489-522.

Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161-173

Birky, C.W. Jr. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms and models. *Genetics* 35: 125-148.

Boore, J.L. (1999). Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8): 1767-1780.

Brown, W.M., George, M. Jr., Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(4): 1967-1971.

Brown, W.M. (1981). Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA. *The New York Academy of Science* 119-134.

Burger, G., Gray, M.W., Lang, B.F. (2003). Mitochondrial Genomes: Anything Goes. *Trends in Genetics* 19(12): 709-716.

Carpenter, K.E., Johnson, G.D. (2002). A phylogeny of Sparoid Fishes (Perciformes, Percoidei) Based on Morphology. *Ichthyological Research, Research* 49: 114-127.

Chiba, S.N., Iwatsuki, Y., Yoshino, T. ve Hanzawa, N. (2009). Comprehensive Phylogeny of the Family Sparidae (Perciformes: Teleostei) Inferred from Mitochondrial Gene Analyses. *Genes Genetic System* 84: 153-170.

Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology* 17(4): 840–862.

Clayton, D.A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction* 15(2): 11-17.

Costello M.J. (2001). European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. *Collection Patrimoines Naturels* 50: 357-374.

Curole, J.P., Kocher, T.D. (1999). Mitogenomics: Digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Tree* 14: 394-398.

Dobzhansky, T. (1962). Genetics, Society and Evolution. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 38(7): 451-459.

Elmerot, C., Arnason, U., Gojobori, T., Janke, A. (2002). The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene* 295: 163-172.

Farias, I.P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H. ve Meyer, A. (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53: 89-103.

Fiedler, K. (1991). Familie Sparidae. *Lehrbuch der Speziellen Zoologie* 2: 354-355.

Frati, F., Simon, C., Sullivan, J., Swofford, D.L. (1997). Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *Journal of Molecular Evolution* 44: 145-158.

Gavrilet, S. (2003). Perspective: models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 57(10):2197-2215.

Giovanni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J. ve Pace, N.R. (1989). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *The journal of Bacteriology* 170: 3584-3592.

Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* 283: 1476-1481.

- Graybeal, A. (1993). Evaluating the Phylogenetic Utility of Genes: A Search for Genes Informative About Deep Divergences among Vertebrates. *Systematic Biology* 43(2): 174-193.
- Hanel, R., Sturmbauer, C. (2000). Multiple Recurrent Evolution of Trophic Types in Northeastern Atlantic and Mediterranean Seabreams (Sparidae, Percoidae). *Journal of Molecular Evolution, Research* 50: 276-283.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society* 270: 96-99.
- Hoelzel, A.R., Hancock, J.M., Dover, G.A. (1991). Evolution of cetacean mitochondrial Dloop region. *Molecular Biology and Evolution* 8(3): 474-493.
- Hunter, R.L. ve Markert, C.L. (1957) Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. *Science* 28: 1294-1295.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2001). A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: Resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(2): 275-285.
- Johnson, G.D. (1980). The Limits of the Lutjanidae and Associated Families. *Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography* 24:1-114.
- Kochzius, M., Nölte, M., Weber, H., Silkenbeumer, N., Hjörleifsdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Marteinson, V., Kappel, K., Planes, S., Tinti, F., Magoulas, A., Vazquez, E.G., Turan, C., Hervet, C., Falguera, D.C., Antoniou, A., Landi M. ve Blohm, D. (2008). DNA microarrays for identifying fishes. *Marine Biotechnology* 10: 207-217.
- Lansman, R.A., Shade, R.O., Shapira, J.F., Avise, J.C. (1981). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *Journal of Molecular Evolution* 17: 214-226.
- Lee, W.J., Conroy, J., Howell, W.H., Kocher, T.D. (1995). Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41: 54-66.
- Lin G., Lo, L.C., Zhu Z.Y., Feng, F., Chou, R. ve Yue, G.H. (2006). The complete mitochondrial genome sequence and characterization of single nucleotide polymorphisms in the control region of the Asian Seabass (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology* 8: 71-79.
- Macey, J.R., Larson, A., Ananjeva, N.B., Fang, Z. Ve Papenfuss, T.J. (1997). The Novel Gene Orders and the Role of Light-Strand Replication in Rearrangement of the Vertebrate Mitochondrial Genome. *Molecular Biology and Evolution* 14(1): 91-104.

- Miya, M., Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree based exploration under the Maximum Parsimony Optimality Criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17(3): 437-455.
- Miya, M., Takeshima, H. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: A new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 26: 121-138.
- Nachman, M.W., Boyer, S.N., Aquadro, C.F. (1994). Nonneutral Evolution at the Mitochondrial NADH Dehydrogenase Subunit 3 Gene in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 6364-6368.
- Oh, D.J., Kim, J.Y., Lee, J.A., Yoon, W.J., Park, S.Y. ve Jung, Y.H. (2007). Complete mitochondrial genome of the rabbitfish *Siganus fuscescens* (Perciformes, Siganidae). *DNA Sequence* 18(4): 295-301.
- Oh, D.J., Kim, D.J., Jung, Y.H. (2008). Comparison of the mitochondrial genomes of East Asian Pseudolabrus fishes. *Mitochondrial DNA* 19(5): 453-460.
- Orrell, T.M., Carpenter, K.E., Musick, J.A., Graves, J.E. (2002). Phylogenetic and Biogeographic Analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidae) from Cytochrome b sequences. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 3: 618-631.
- Orrell, T.M., Carpenter, K.E. (2004). A Phylogeny of the Fish Family Sparidae (Porgies) Inferred from Mitochondrial Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 425-434.
- Ostellari, L., Bargelloni, L., Penzo, E., Patarnello, P. ve Patarnello, T. (1996). Optimization of Single Strand Conformation Polymorphism and Sequence Analysis of the Mitochondrial Control Region in *Pagellus bogaraveo* (Sparidae, Teleostei): rationalized Tools in Fish Population Biology. *Animal Genetics* 27: 423-427.
- Pereira, S.L. (2000). Mitochondrial Genome Organization and Vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology* 23(4):745-752.
- Poletto, A.B., Ferreira, I. Cabral-de-Mello, D.C., Nakajima R.T., Mazzuchelli, J., Ribeiro, H.B., Venere, P.C., Nirchio, M., Kocher, T.D. ve Martins, C. (2010). Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics* 11: 50-62.
- Ponce, M., Infante, C., Cantizano, R.M.J., Pérez, L. Ve Machado, M. (2008). Complete Mitochondrial Genome of the Blackspot Seabream, *Pagellus bogaraveo* (Perciformes: Sparidae), with High Levels of Length Heteroplasmy in the WANCY Region. *Gene* 409: 44-52.
- Saccone, C., Gissi, C., Lanave, C., Larizza, A., Pesole, G. ve Reyes, A. (2000). Evolution of the Mitochondrial Genetic System: An Overview. *Gene* 261: 153-159.
- Sick, N. (1961). Hemoglobin Polymorphism in Fishes. *Nature* 192: 894 – 896.

Sogin, M.L. (1991). Early Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development* 1: 457-463.

Southern, S.O., Southern, P.J., Dizon, A.E. (1988). Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* 28: 32-42.

Vard, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360: 1847-1857.

Vellai, T., Vida, G. (1999). The Origin of Eukaryotes: The difference Between Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *The Royal Society* 266: 1571-1577.

Wise, C.A., Sraml, M., Eastal, S. (1998). Departure from Neutrality at the Mitochondrial NADH Dehydrogenase Subunit 2 Gene in Humans, but Not in Chimpanzees. *Genetics Society of America* 148: 409-421.

Xia, J., Xia, K., Jiang, S. (2008). Complete mitochondrial DNA sequence of the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* and a genomic comparison among closely related sparid species. *Mitochondrial DNA* 19(4): 385-393.

Yamanoue, Y., Miya, M., Matsuura, K., Miyazawa, S., Tsukamoto, N., Takahashi, H., Mabuchi, K., Nishida, M. ve Sakai, H. (2008). Explosive speciation of Takifugu: Another use of fugu as a model system for evolutionary biology. *Molecular Biology and Evolution* 26(3): 623-629.

Yang, D., Oyaizu, Y., Olsen, G.J., Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 4443-4447.

Yue, G.H., Liew, W.C., Orban, L. (2006). The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae). *BMC Genomics* 7: 242-255.

## 7.2. Kitaplar

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell, The genetic systems of mitochondria and plastids* (5. Baskı) içinde 859-870. New York: Garland Press.

Bauchot, M.L., Hureau, J.C. (1986). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean, Volume II*. Paris: UNESCO Press.

Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B. (2009). *Biology* (8. Baskı). San Fransisco: Benjamin Cummings Press.

Cummings, M.R., Klug, W.S. (2003). *Genetik Kavramlar C. Öner (Çev) Genetik ve Evrim* (6. Baskı) içinde (713-733). Ankara: Palme Yayıncılık.

Kocher, T.D., Stepien, C.A. (1997). Molecular Systematics of the Fishes, *Molecules and Morphology in studies of fish evolution* içinde 1-9. California: Academic Press.

Kocher, T.D., Carleton, K.L. (1997). Molecular Systematics of Fishes *Base Substitution in Fish Mitochondrial DNA: Patterns and Rates* içinde 13-24. California: Academic Press.

Kocher, T.D., White, T.J. (1989). PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, *Evolutionary analysis via PCR* içinde (137-147). M Stockton Press.

Nelson, J.S. (2006). Fishes of the World, *Class Actinopterygii* (4. Baskı) içinde 341-370. New Jersey: John Wiley & Sons Press.

Nelson, D.L., Cox MM (2005). Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, *Yaşamın Moleküler Anlamı; Biyoenerjetikler ve Metabolizma* (3. Baskı), içinde (15; 690). Ankara: Palme Yayıncılık.

Scheffler, I.E. (2008). Mitochondria, *Evolutionary Origin of Mitochondria* (2. Baskı) içinde (7-17). New Jersey: John Wiley & Sons Press.

Lydeard, C., Roe, K.J. (1997). Molecular systematics of fishes, *The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among actinopterygian fishes* içinde 285-300. California: Academic Press.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S. ve ark. (1991). The Simple Fool's Guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu.

### 7.3. İnternet

<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/animalia/omurgali/baliklar/Osteichthyes.htm> (29.08.11)

<http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=3&ID=445&what=species&TotRec=5> (29.08.11)

<http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=1&ID=5066&what=species&TotRec=4> (29.08.11)

<http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=3&ID=6356&what=species&TotRec=9> (29.08.11)

<http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?ID=890&what=species> (29.08.11)

[http://www.dictall.com/picture/bking/ch\\_62/62\\_3\\_2\\_0.jpg](http://www.dictall.com/picture/bking/ch_62/62_3_2_0.jpg) (29.08.11)

<http://www.aquamaps.org/receive.php> (29.08.11)

<http://www.searchfish.org/fish/25809/parargyrops-edita/> (29.08.11)

<http://www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/2k2endosymb.html> (29.08.11)

<http://science.jrank.org/pages/48413/Endosymbiont-Theory.html> (29.08.11)

<http://www.eol.org/pages/210894> (29.08.11)

<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=23843&genusname=Schindleria&speciesname=praematura&AT=schindleria+praematurus&lang=English> (01.09.11)

<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=216&genusname=Makaira&speciesname=nigricans&AT=makaira+nigricans&lang=English> (01.09.11)



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Deniz Kanca, 1987 yılında İstanbul'da doğdu. 2005 yılında İstanbul Yeni Levent Süper Lisesi'nden mezun olduktan sonra yine aynı yıl Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde başladığı yüksek öğrenimini 2009 yılında tamamladı.

Yüksek lisans eğitimine 2009 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne girerek devam etti. 2009 yılından beri Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.