ANKARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DE KÜLTÜR VE DOĞAL ÇİPURA (*Sparus aurata* L. 1758) POPULASYONLARI ARASINDAKİ FİLOGENETİK FARKLILIKLARIN MİTOKONDRİYAL GEN BÖLGELERİNİN DNA DİZİ ANALİZLERİ İLE TANIMLANMASI

Levent DOĞANKAYA

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2010

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Levent DOĞANKAYA tarafından hazırlanan "**Türkiye'de Kültür ve Doğal Çipura (*Sparus aurata* L.) Populasyonları Arasındaki Filogenetik Farklılıkların Mitokondriyal Gen Bölgelerinin DNA Dizi Analizleri ile Tanımlanması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : *(Unvanı, Adı ve Soyadı)*

Jüri :

(Unvanı, Adı ve Soyadı, Kurumu)
(Üniversite Adı, Anabilim Dalı)

(Unvanı, Adı ve Soyadı, Kurumu)
(Üniversite Adı, Anabilim Dalı)

(Unvanı, Adı ve Soyadı, Kurumu)
(Üniversite Adı, Anabilim Dalı)

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'DE KÜLTÜR VE DOĞAL ÇİPURA (*Sparus aurata* L.) POPULASYONLARI ARASINDAKİ FİLOGENETİK FARKLILIKLARIN MİTOKONDRİYAL GEN BÖLGELERİNİN DNA DİZİ ANALİZLERİ İLE TANIMLANMASI

Levent DOĞANKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Süleyman BEKCAN

Bu çalışmada, kıyılarımızda bulunan doğal çipura (*Sparus aurata*) populasyonları ile balık çiftliklerinde üretilen çipura populasyonlarının filogenetik ilişkilerinin incelenmesi ve bu stoklar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma için Adana, Mersin, Antalya, Bodrum ve İzmir olmak üzere beş istasyon seçilmiştir. Her istasyonda doğal ve kültür balık stoklarından temin edilen örneklerin karaciğerlerinden doku numuneleri alınmış ve DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lardan, uygun primerler kullanılarak mitokondriyal 12S rRNA, Sitokrom oksidaz II ve Sitokrom b genleri polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Bu işlem sonrası gerçekleştirilen pürifikasyon aşamasının ardından gen bölgelerine ait nükleotid dizileri otomatik DNA dizileme cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen verilerden konsensüs ağaçları oluşturulmuş ve populasyonların birbirleri ile olan ilişkileri filogenetik ağaçlarla gösterilmiştir.

Hem doğal hem de kültür örnekleri arasındaki farklılıkların çok düşük olduğu ve herhangi bir alt dal varlığı ya da bölgesel farklılık bulunmadığı belirlenmiştir.

Mart 2010, 103 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Sparus aurata*, filogenetik, mtDNA, 12S rRNA, Sitokrom oksidaz II, Sitokrom b, DNA dizi analizi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DESCRIPTION OF PHYLOGENETIC DIFFERENCES BETWEEN WILD AND CULTURE POPULATIONS OF GILTHEAD SEABREAM (*Sparus aurata* L.) IN TURKEY BY DNA SEQUENCES OF MITOCHONDRIAL GENE REGIONS

Levent DOĞANKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries and Aquaculture

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Süleyman BEKCAN

In this study, phylogenetic differences between wild and cultured populations of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) were investigated.

In this purpose, five sampling area were chosen as Adana, Mersin, Antalya, Bodrum and İzmir. DNA isolations were performed by commercial kits from liver tissue. Three mitochondrial gene regions (12S rRNA, Cytochrome Oxidase II and Cytochrome b) were amplified with PCR (Polymerase Chain Reaction) and the PCR products were sequenced. The sequence data were used for phylogenetic analysis.

As a result, there were no significant genetic differences neither between wild fish nor cultured stocks. There were no evidence of distinct subdivided populations and all samples seemed monophyletic.

March 2010, 103 pages

Key Words: *Sparus aurata*, phylogenetic, mtDNA, 12S rRNA, Cytochrome Oxidase II, Cytochrome b, DNA sequence

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, tavsiye ve yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren ve yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Süleyman BEKCAN'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü); Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Hasan H. ATAR (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü) ve Sayın Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); doktora eğitimim süresince manevi desteğini her an ve eksiksiz hissettiğim değerli bölüm başkanımız Prof. Dr. Serap PULATSÜ'ya (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü); deney aşamalarının başından sonuna kadar bilgi ve tecrübelerini paylaşarak maddi ve manevi çok büyük katkılar sağlayan arkadaşım Arş. Gör. Emre KESKİN'e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü); laboratuar çalışmaları boyunca hem bilgi ve önerileri hem de örnek bilimsel yaklaşımı ile çok önemli katkılar sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü); çalışmalarımın kritik aşamalarında çok büyük emekleri bulunan ve moleküler teknikler konusunda kendisinden çok şey öğrendiğim Uzman Biyolog Nilgün TEKİN'E; örnekleme aşamalarındaki yardımlarından dolayı sevgili arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Özge ZENCİR, Dr. Özden FAKIOĞLU ve Ziraat Yüksek Mühendisi Selami MALAL'a, laboratuar çalışmalarında altyapı olanaklarını kullanıma sunan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Entitüsü Yönetimi'ne, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuarı'na, laboratuar çalışanlarına ve Genombilim ekibinin değerli üyelerine; hem öğrencilik hem de iş yaşamımda en büyük desteğim olan ve emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim canım aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK tarafından "Türkiye'de Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarının Kültür ve Doğal Populasyonları Arasındaki Filogenetik Farklılıkların Mitokondriyal Gen Bölgelerinin DNA Dizi Analizleri ile Tanımlanması" konulu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Levent DOĞANKAYA

Ankara, Mart 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

TEŞEKKÜR iii

SİMGELER DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

ÇİZELGELER DİZİNİ viii

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ 6

2.1 Kuramsal Temeller 6
2.1.1 Mitokondriyal DNA 6
2.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 7
2.1.3 Agaroz jel elektroforezi 9
2.1.4 DNA dizi analizi 10
2.1.5 Filogenetik analiz 12
2.2 Konuya İlişkin Çalışmalar 14

3. MATERYAL VE YÖNTEM 18

3.1 Materyal 18
3.1.1 Balık materyali 18
3.1.2 Deneylerde kullanılan cihaz, gereçler ve sarf malzemeleri 19
3.2 Yöntem 21
3.2.1 Doku örneklerinin alınması 21
3.2.2 DNA ekstraksiyonu 23
3.2.3 DNA'nın spektrofotometrik analizi 24
3.2.4 DNA konsantrasyonunun ayarlanması 24
3.2.5 Jel elektroforezi 24
3.2.6 Gen amplifikasyonu 26
3.2.7 DNA dizi analizi 30
3.3 Filogenetik Analiz 34

4. BULGULAR 35

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 48

KAYNAKLAR 53

EK 1 Beş farklı istasyondan alınan örneklerin üç farklı gen bölgesinden elde edilen dizilere ait elektroferogramlar 58
EK 2 Beş farklı istasyondan alınan örneklerin üç farklı gen bölgesinden elde edilen nükleotid dizileri 85

ÖZGEÇMİŞ 101

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Çok biçimliliği)
bç	Baz çifti
C	Sitozin
cm	Santimetre
cpDNA	Kloroplast DNA'sı
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
g devir	Yerçekimi ivmesi ($m\ s^{-2}$)
g	Gram
G	Guanin
HCl	Hidroklorik asit
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
m	Metre
mg	Miligram
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mtDNA	Mitokondriyal DNA
Na Asetat	Sodyum asetat
ng	Nanogram
nm	Nanometre

pmol	Pikomol
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Çok biçimli DNA)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Revolutions per minute / dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
s	Saniye
T	Timin
UV	Ultraviyole
µl	Mikro litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Çipura balığı 1

Şekil 1.2 Sparus aurata'nın coğrafik dağılım alanları 2

Şekil 1.3 Dünya üzerinde çipura balığının tespit edildiği noktalar 2

Şekil 1.4 Türkiye'de yetiştiricilik ve avcılık yoluyla çipura üretiminin yıllara göre seyri 4

Şekil 2.1 Mitokondriyal DNA'nın şematik yapısı 6

Şekil 2.2 PCR reaksiyonunun aşamaları 8

Şekil 2.3 Agaroz jel elektroforezi 10

Şekil 2.4 DNA dizi analizi işleminin şematik gösterimi 11

Şekil 2.5 Filogenetik ağaç 13

Şekil 3.1 Araştırma için örneklenen çipura balıkları 18

Şekil 3.2 Örnekleme istasyonları 19

Şekil 3.3 Balıkların karaciğerlerinin çıkarılması 22

Şekil 4.1 PCR ürünlerinin Agaroz jel görüntülerinden bir örnek 35

Şekil 4.2 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntülerinden bir örnek 36

Şekil 4.3 Çipura 12S rRNA geni için tüm istasyonları temsil eden dizilerin çoklu hizalanmış gösterimi (Multialignment) 39

Şekil 4.4 Çipura 12S rRNA bölgesi için çizilen filogenetik ağaç 40

Şekil 4.5 Çipura Sitokrom oksidaz II geni için tüm istasyonları temsil eden dizilerin çoklu hizalanmış gösterimi (Multialignment) 42

Şekil 4.6 Çipura Sitokrom oksidaz II bölgesi için çizilen filogenetik ağaç 43

Şekil 4.7 Çipura Sitokrom b geni için tüm istasyonları temsil eden dizilerin çoklu hizalanmış gösterimi (Multialignment) 45

Şekil 4.8 Çipura Sitokrom b bölgesi için çizilen filogenetik ağaç 46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 DNA izolasyonu için karaciğer dokusu alınan örneklerin istasyonlara göre dağılımı 22

Çizelge 3.2 Primer dizileri 26

Çizelge 3.3 Çipura 12S rRNA PCR reaksiyon protokolü ve döngü koşulları 28

Çizelge 3.4 Çipura Sitokrom oksidaz II PCR reaksiyon protokolü ve döngü koşulları . 28

Çizelge 3.5 Çipura Sitokrom b PCR reaksiyon protokolü ve döngü koşulları 29

Çizelge 3.6 Çipura 12S rRNA Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması reaksiyon protokolü ve döngü koşulları 31

Çizelge 3.7 Çipura Sitokrom oksidaz II Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması reaksiyon protokolü ve döngü koşulları..... 31

Çizelge 3.8 Çipura Sitokrom b Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması reaksiyon protokolü ve döngü koşulları..... 32

Çizelge 3.9 DNA dizi analizi yapılan örneklerin istasyonlara göre dağılımı 34

Çizelge 4.1 Çipura örneklerine ait DNA indeks numaraları 37

Çizelge 4.1 Çipura örneklerine ait DNA indeks numaraları (devamı)..... 38

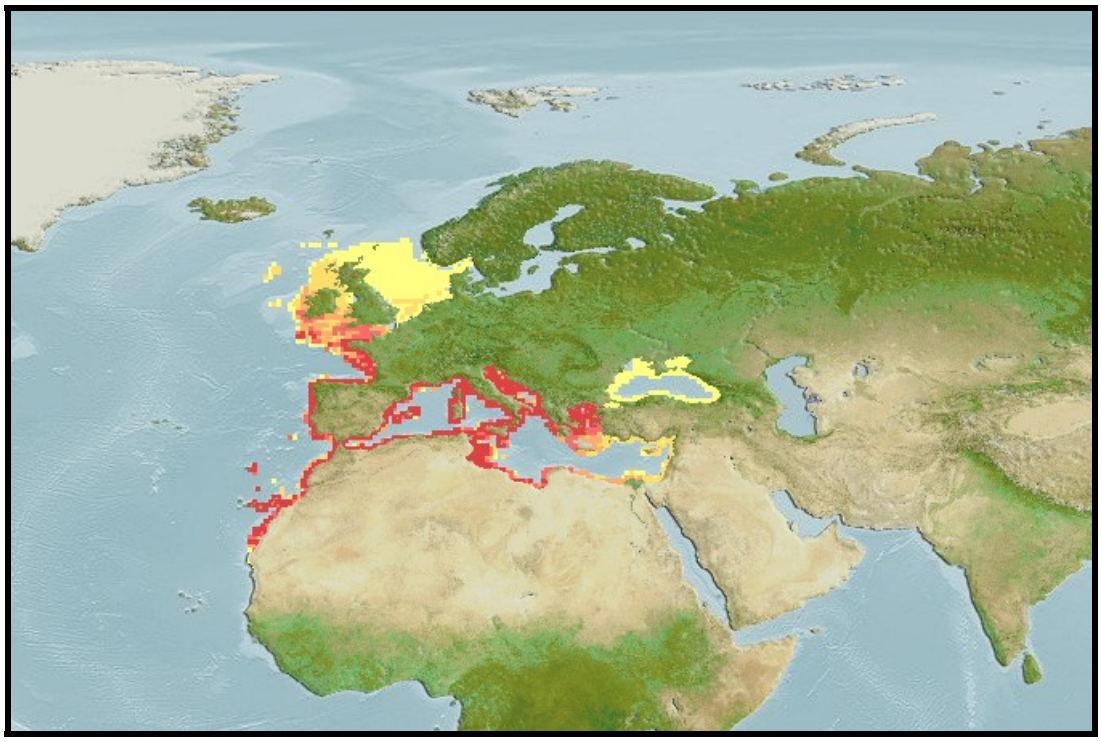
1. GİRİŞ

Sparidae familyasına ait türler, Akdeniz'deki akuakültür üretiminde önemli bir paya sahiptir ve bunlar arasında en önemlisi çipura (*Sparus aurata*)'dır (Brown vd. 2005). Çipura (*Sparus aurata* L.) tüm Akdeniz'e, ayrıca Britanya Adaları'ndan Cape Verde ve Kanarya Adaları'na kadar Atlantik kıyılarına yayılmıştır (Launey vd. 2003).

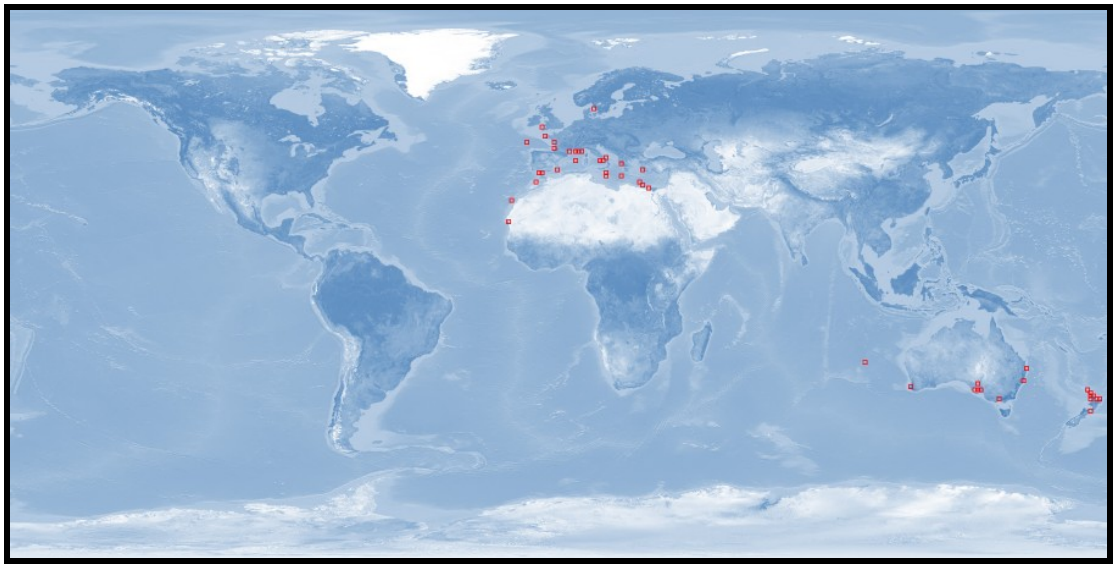
Çipura balıkları özellikle Avrupa Kıtası'nda iyi tanınan, Akdeniz'e kıyısı olan bütün ülkelerde önemle üzerinde durulan ve Türkiye su ürünleri sektöründe son derece önemli bir balık türüdür.



Şekil 1.1 Çipura balığı



Şekil 1.2 *Sparus aurata*'nın coğrafik dağılım alanları (http://www.aquamaps.org/receive.php 2009)



Şekil 1.3 Dünya üzerinde çipura balığının tespit edildiği noktalar (http://www.aquamaps.org/receive.php 2009)

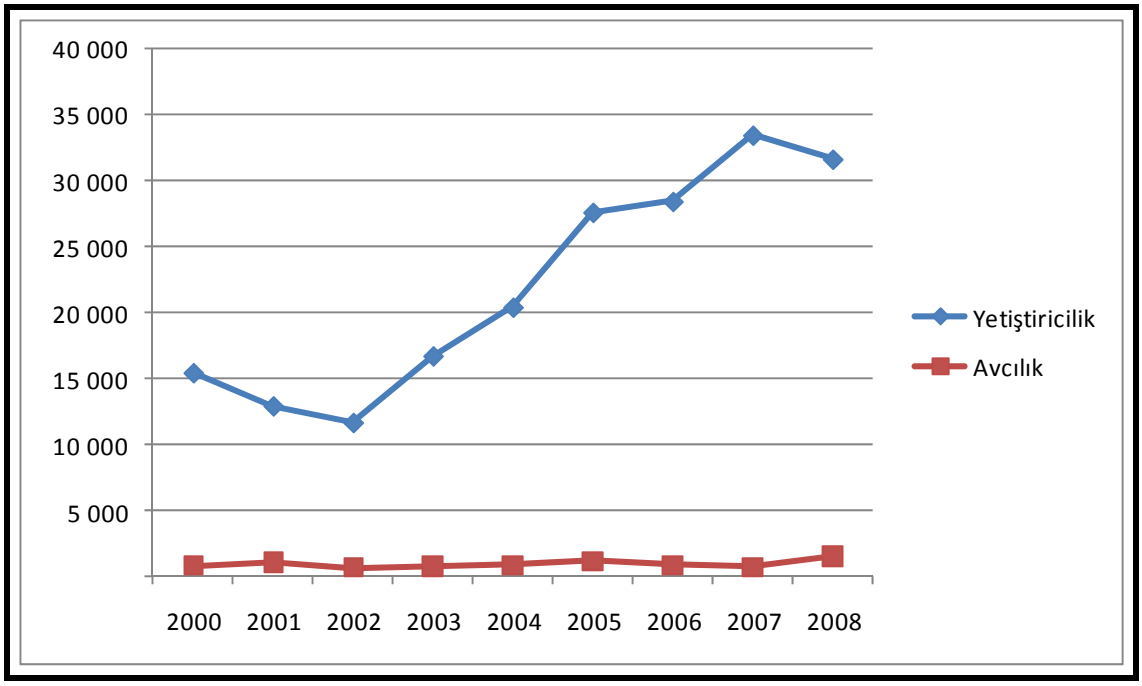
Çipura balığının sistematik sınıflandırması (Anonymous 2008):

- Alem : Animalia
- Şube : Chordata
- Sınıf : Actinopterygii
- Takım : Perciformes
- Familya : Sparidae
- Cins : Sparus
- Tür : *Sparus aurata*

Çipura balığı genellikle kumlu bölgelerde, kumlu-çamurlu ve çamurlu biotoplarda bulunur. Nehir ağızları ve lagünlerde de çok rastlanır. Tropik, subtropik ve ılıman kuzey denizlerinde yayılım göstermektedir. Yazın sığ sularda (0,5-9 m) bulunmasına karşın kışın daha derin (35-40 m) sulara göç eder. Özellikle iki yaş ve üzerindeki bireyler daha derinlere inebilmektedir. 6°C'den 32°C'ye kadar su sıcaklıklarında yaşayabilir. Ancak optimal büyüme sıcaklığı 22-25°C'dir. 3°C'nin altında ve 34°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayamazlar. 7-10 °C su sıcaklığında ise büyüme tamamen durur. Çipura için tuzluluk alt sınırı ‰5, üst sınırı ise ‰50 olarak belirlenmiştir. Karnivor bir tür olup özellikle krustasea ve mollusklarla beslenmektedir. Larva döneminde zooplanktonu tercih ederler (Atay ve Bekcan 2000).

Anatomik yapı bakımından vücut yüksek ve yandan basıktır. Pelvik yüzgeçte beşten fazla ışın vardır. Sırt yüzgeci önde ve sert ışınlıdır. Vücut baş kısmına kadar pul ile örtülü olup pulları serttir. Yan çizgi belirgin şekilde oluşmuştur. Ağız ve diş yapısı sert olup kabuklu canlıları bile kırabilecek niteliktedir. Doğal ortamda yumurtlama 5-25 m derinlikte olur ve bir balık bir üreme mevsiminde 500 bin ile 1 milyon arası yumurta verebilir. Yumurtlama sıcaklığı 14-19 °C civarında olup Akdeniz'de Aralık ayına denk gelmektedir (Alpbaz 1996).

Çupra, alyanak ve 200 g'dan küçükleri lidaki olarak da bilinir. Boyları maksimum 70 cm'e ulaşır. Genellikle 20-50 cm arasındadır. Sırt yüzgecinde 11 diken ışın ve 13-14 yumuşak ışın; anüs yüzgecinde 3 diken ışın ve 11-12 yumuşak ışın bulunur. Vücudu sırt yüzgecinin başlangıcında yüksektir. Yanal çizgide 73-85 adet pul vardır. Her iki çenesinin ucunda 4-6 köpek dişi, bu dişleri takip eden 2-4 sıralı molar diş vardır. Vücudu gümüşi gri renktedir. Ergin bireylerin gözlerinin arasında altın sarısı bir bant vardır. Solungaç kapağının üst kısmında tipik siyahımsı bir leke, alt kısmında kırmızı bir leke yer alır. Kuyruk yüzgecinin arka kenarı koyu renkle çevrilidir. Ege Denizi'nde Kasım-Şubat, Akdeniz'de Ekim Aralık arasında ürerler; protandrik hermafroditizm görülür; ilk eşeysel olgunluğa erkekler 1-2 yaş (20-30 cm boyda), dişiler 2-3 yaşta (33-40 cm boyda) erişirler; Karadeniz'de yumurta bırakmazlar (Can ve Bilecenoğlu 2005).



Şekil 1.4 Türkiye'de yetiştiricilik ve avcılık yoluyla çipura üretiminin yıllara göre seyri (Türkiye İstatistik Kurumu verilerinden hazırlanmıştır).

Türkiye'de deniz balıkları yetiştiriciliği 80'li yıllarda çipura yetiştiriciliği ile başlamıştır. Yavruların doğadan yakalanıp büyütülmesi şeklinde başlayan yetiştiricilik çalışmaları doğaya bağımlılığı ortadan kaldırmak ve stokları korumak amacıyla

çiftlikler bünyesinde damızlık stoku oluşturma ve yumurtadan yavru elde etme sistemine dönmüştür (Atay ve Bekcan 2000). Günümüzde Türkiye'de yetiştirilen çipura balıklarının tamamı kuluçkahanelerde üretilmektedir. 2008 yılında denizlerde ve içsularda yetiştiricilik üretimi bir önceki yıla göre %8,8 oranında artarak yaklaşık 152 bin ton olmuştur. Yetiştirilen en önemli türler içsularda %43,32 ile alabalık, denizlerde %32,37 (49 270 ton) ile levrek, %20,81 (31 670 ton) ile çipuradır (Anonim 2009). Eldeki son verilere göre ülkemizde 314 adet çipura çiftliği ve 17 adet kuluçkahane bulunmaktadır (Anonim 2010).

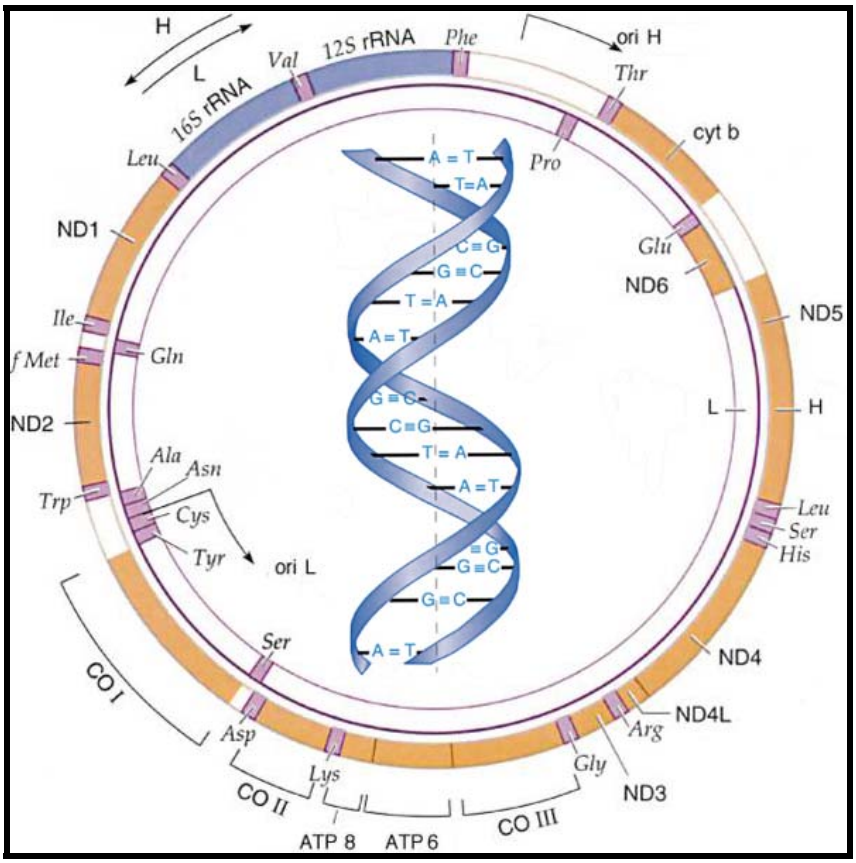
Çiftlikler bünyesinde damızlık balıklardan yavru üretiminin başlamasıyla üstün özellikler sergileyen balıklar damızlık olarak ayrılmış ve istemeden de olsa bir ıslah uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ancak bu şekilde her çiftlik içerisinde kapalı bir gen havuzu oluşturulmuştur. Dolayısıyla uzun süreler aynı damızlıkların kullanılması ve yeni damızlıkların bunların yavruları arasından seçilmesi, doğal stoklarla bu damızlık stoklar arasında genetik açıdan bazı farklılıklara yol açabilmektedir. Bu çekinceler nedeniyle son yıllarda damızlık stoklarının incelenmesi ve geliştirilmesi yönündeki çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bir çok işletmede kan tazeleme olarak bilinen uygulamayla zaman zaman doğal stoklara ait bireyler, işletmelerdeki damızlık stoklarına dahil edilmektedir.

Balıkların genetik özelliklerinin korunması veya artırılması yönündeki uygulamalarda, söz konusu türlerin genetik yapılarına ilişkin bilgiler çok değerlidir. Klasik sınıflandırmada Türkiye kıyılarında bulunan çipura balıklarında herhangi bir alt tür varlığından söz edilmemektedir. Fakat bu balıklara ilişkin eldeki genetik bilgi son derece kısıtlıdır. Çalışmamızda, Türkiye'de bulunan hem kültür hem de doğal stokların mitokondriyal gen bölgeleri üzerinden filogenetik analizleri yapılarak bu konudaki ilk veriler ortaya koyulmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kuramsal Temeller

2.1.1 Mitokondriyal DNA



Şekil 2.1 Mitokondriyal DNA'nın şematik yapısı (http://www.ipvgen.unipv.it 2009)

Mitokondri DNA'sının (mtDNA) moleküler yönü ve gen ürünleri ile ilgili oldukça fazla bilgi mevcuttur. Ökaryotların çoğunda mtDNA çift iplikli, kapalı halkasal şekilde bulunur, yarı saklı replike olur ve ökartoyik DNA'nın tipik özelliğinin aksine proteinlerle ilişkili değildir. Bazı silli tek hücrelilerde istisnalar vardır ve bunların DNA'sı doğrusaldır.

Büyüklük olarak mtDNA, cpDNA'dan daha küçüktür ve organizmalar arasında oldukça fazla değişiklik gösterir. İnsanların da içinde bulunduğu çeşitli hayvan gruplarında mtDNA büyüklüğü 16 bin ile 18 bin bç (16-18 kb) arasında değişir. Fakat maya (Saccharomyces) mtDNA'sı 75 kb büyüklüğündedir. Bitkilerde ise bu miktar çok fazladır. Örneğin hardal bitkisi *Arabidopsis* mitokondrisindeki DNA 367 kb'dır. Omurgalılarda organel başına 5 ile 10 DNA molekülü varken bitkilerde organel başına 20 ile 40 kopya bulunur (Klug vd. 2009).

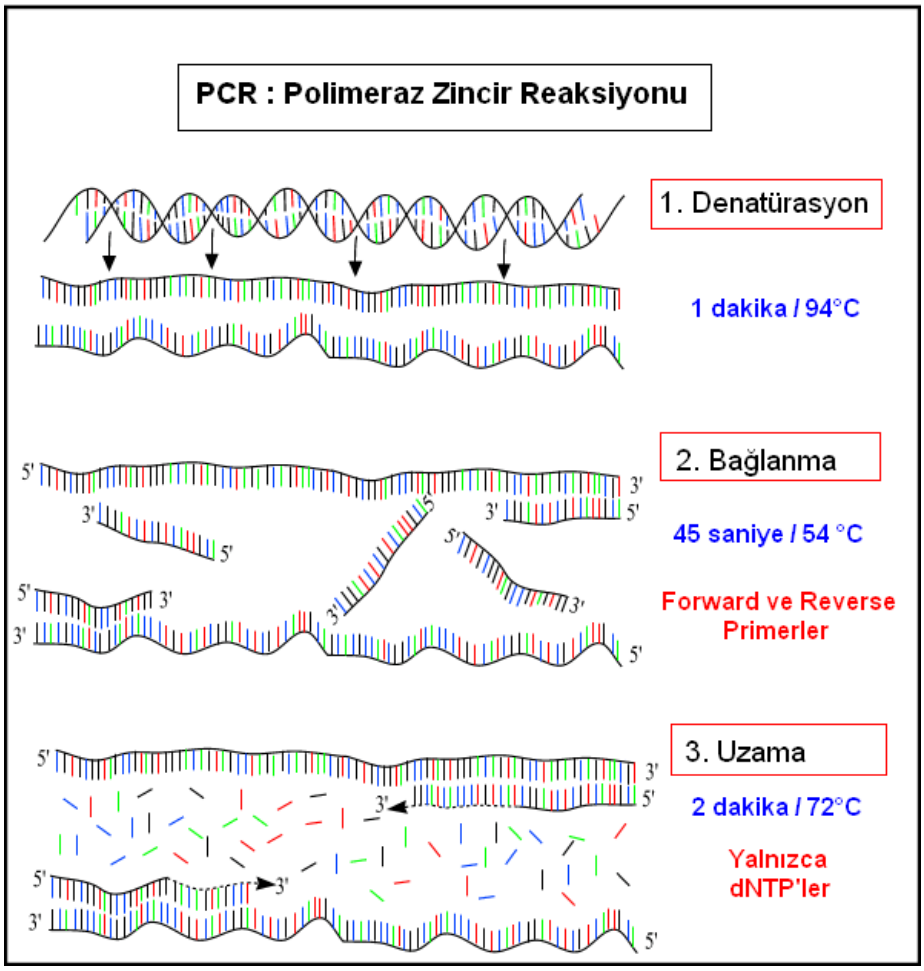
Bazı aykırı durumlar hariç intronlar (çekirdek DNA'sına özgü, araya giren, kodlamayan DNA dizileri) mitokondri genlerinde yoktur ve gen tekrarları da nadiren bulunur. Genler arası ara DNA dizleri de genellikle yoktur. Replikasyon, çekirdek DNA'sınca kodlanan enzimlerle yapılır. İnsanlarda mtDNA, iki ribozomal RNA (rRNA) ve 22 taşıyıcı RNA (tRNA) ile birlikte organelin oksijenli solunum işlevi için gerekli olan 13 polipeptidi kodlamaktadır (Klug vd. 2009).

2.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR, DNA klonlaması için hızlı bir tekniktir ve bu nedenle rekombinant DNA araştırmalarının gücünü artırarak DNA klonlamasındaki konak hücre gereksinimini ortadan kaldırmıştır. Hücreye dayalı klonlama hala kullanılmasına rağmen PCR; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim, koruma ve adli tıp gibi birçok uygulamada kullanmak için seçilen bir yöntemdir.

PCR, bir seri *in vitro* reaksiyon boyunca özgül bir DNA dizisinin birçok kopyasını yapar ve farklı DNA molekülleri topluluğunda yok denecek kadar az miktarda bulunan hedef DNA dizisini çoğaltabilir. PCR için ön koşul, klonlanacak DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekliliğidir. Dizi bilgisi, iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır: klonlanacak DNA dizisinin bir 5' ucu için, bir de 3' ucu için olmak üzere iki primer. Tek zincirli duruma getirilmiş DNA örneğine primerler ilave edilir. Primerler klonlanacak dizideki eşlenik nükleotidlere bağlanır (hibridizasyon).

Hibridizasyondan sonra ortama ısıya dayanıklı DNA polimeraz ilave edilir ve DNA'nın ikinci zinciri sentezlenir. Bu adımların tekrarıyla DNA'nın birçok kopyası oluşturulur (Klug vd. 2009).



Şekil 2.2 PCR reaksiyonunun aşamaları (Vierstraete 1999)

Pratikte PCR'da üç adım vardır. Çoğaltılan DNA'nın miktarı teorik olarak sadece bu adımların tekrarlanma sayıları ile sınırlanır.

- Klonlanacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA; genomik DNA, mumya kalıntıları, fosiller, kurumuş kan, semen gibi adli örnekler, tek bir saç teli ya da tıbbi kayıtlara ait kurumuş örnekler gibi değişik kaynaklardan elde

edilebilir. Çift zincirli DNA'nın 90-95°C'de ısıtılması onu tek zincirli hale getirerek denatüre eder (yaklaşık 5 dakika süreyle).

- Sıcaklık 50°C ile 70°C arasında bir değere düşürülür ve bu birleşme (annealing) sıcaklığında primerler tek zincirli DNA'ya bağlanır. Yukarıda anlatıldığı gibi, primerler yapay oligonükleotidlerdir (15-30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak hedef DNA'nın uçlarındaki dizilere eşleniktir (komplementer). Primerler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

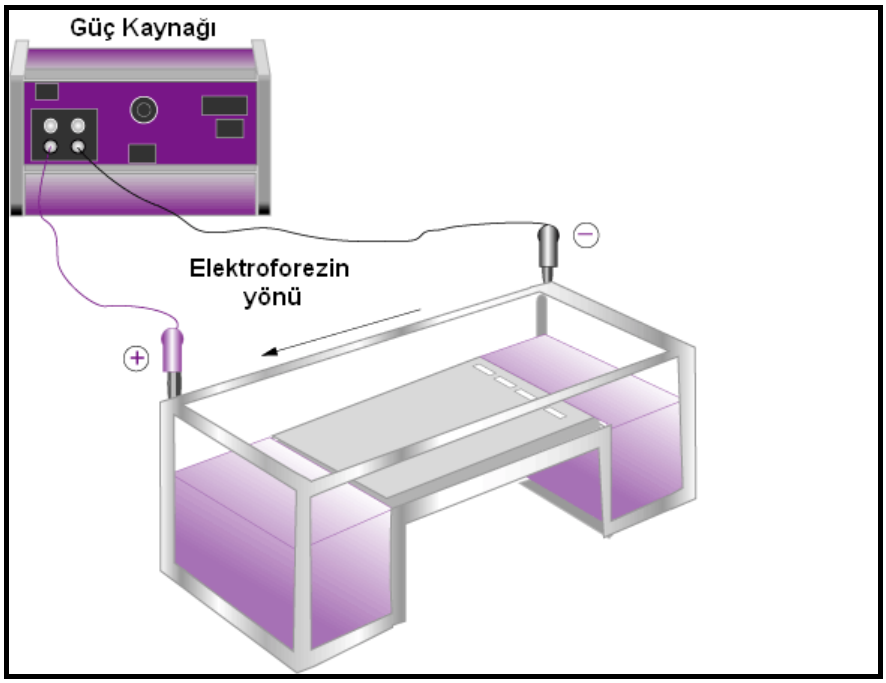
- DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir formu (Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir. DNA sentezi 70°C ile 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Taq polimeraz, nükleotidleri 5′'den 3′'ne doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını yapar.

PCR, DNA zincirlerinin sayısının her döngüde iki katına çıktığı ve eski zincirlerle beraber yeni zincirlerin de bir sonraki döngüde kalıp görevi gördüğü bir zincir reaksiyondur. Yaklaşık 5 dakika süren bir döngü birçok kez tekrar edilir ve 3 saatten daha az bir zamanda 25-30 döngü sonunda DNA miktarı milyon kattan daha fazla artar. (Klug vd. 2009)

2.1.3 Agaroz jel elektroforezi

Genel olarak elektroforez bir karışımdaki molekülleri bir elektrik alanının etkisiyle hareket etmelerini sağlayarak ayırır. Eğer iki molekül yaklaşık aynı kütleye ve biçime sahipse, net yükü en fazla olan, zıt polaritedeki elektroda doğru daha hızlı hareket eder ve küçük moleküller büyük moleküllere göre jelde daha hızlı yol alır. Ayırımın kilit noktası jel matriksine (gözeneklere) dayanmaktadır. Gözenekler, büyük moleküllerin hareketini küçüklere göre daha fazla kısıtlar. Elektroforez tamamlandıktan sonra, çeşitli büyüklüklerdeki molekülleri temsil eden bantlar, ya otoradyografi ile (molekülün

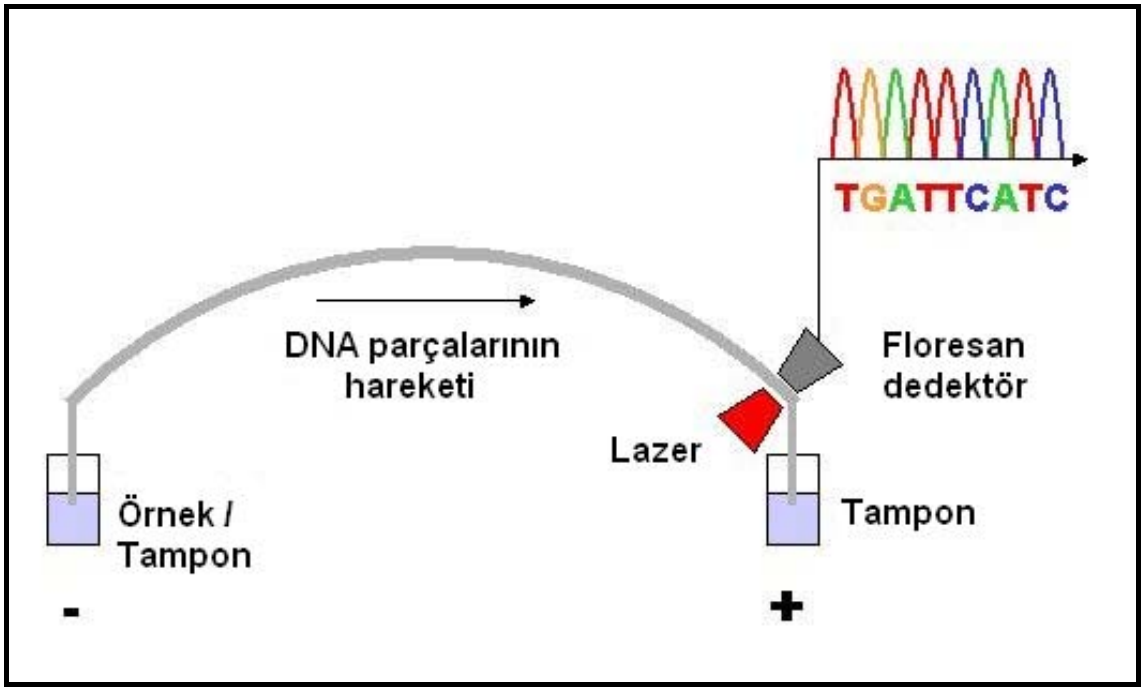
bileşenlerinden biri radyoaktif işaretli ise) ya da nükleik asitlere bağlanan floresan bir boya ile görüntülenir (Klug vd. 2009).



Şekil 2.3 Agaroz jel elektroforezi (http://www.biochem.arizona.edu 2010)

2.1.4 DNA dizi analizi

Klonlanmış bir DNA molekülü ya da bir klondan bir genoma kadar herhangi bir DNA ancak nükleotid dizisi bilindiği zaman tam anlamıyla karakterize edilebilmektedir. En çok kullanılan DNA dizi analiz yöntemi James Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilendir. Bu işlemde dizisi belirlenecek DNA molekülü bir seri eşlenik zincirlerinin sentezlenebilmesi için önce tek zincirli hale dönüştürülür. Bu eşlenik zincirlerden her biri; farklı, özgül nükleotidlerde gelişigüzel sonlanmıştır. Bu işlem sonucunda elektroforezle birbirinden ayrılan bir seri DNA parçaları ortaya çıkar ve DNA dizisinin saptanması için incelenir (Klug vd. 2009).



Şekil 2.4 DNA dizi analizi işleminin şematik gösterimi (http://www.dnasequencing.files.wordpress.com 2010)

DNA dizi analizi büyük çaplı genom dizisi projelerinde otomatik hale gelmiştir. Bu amaçla nükleotid dizilerini belirleyebilen makineler kullanılmaktadır. Bu işlemde dört dideoksinükleotid analoglarından her biri farklı flüoresan boya ile işaretlenmiştir, böylece örneğin adenozin ile sonlanan zincirler bir renkte iken sitozin ile sonlanan zincirler başka renktedir ve bu şekilde dört ayrı renk bulunur. Tüm işaretli dideoksinükleotidler tek bir tüpe ilave edilir ve primerler DNA polimerazla uzadıktan sonra reaksiyon ürünleri jelin tek bir kuyucuğuna yüklenir. Jel, lazer ışık kaynağı ile taranarak her bandın farklı renkte ışıma vermesi sağlanır. Dizi makinesine bağlı bir detektör her bandın rengini okur ve A, T, C ve G'den hangisinin olduğunu saptar. Aletin yazıcısından her biri bir nükleotide karşılık gelen renkli pikler elde edilir (Klug vd. 2009).

2.1.5 Filogenetik analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla filogenetik analizlerden yararlanılmaktadır. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde meydana gelen değişikliklerin hızını ve karakterini belirlemeye ve böylece genler ile organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymada en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizler yoluyla filogenetik ağaçlara dönüştürülmesidir (Saitou ve Imanishi 1989).

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm ve dallardan oluşur. Dallar, türlerin atasal populasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev populasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.5 Filogenetik ağaç (http://www.tutorvista.com 2010)

En tutumlu ağaçların güvenilirlik derecelerini istatistiksel olarak değerlendirmek mümkündür. Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri seç-bağla testi (bootstrapping) olarak adlandırılır. Seç-bağla testi belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir. Seç-bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Örneğin, çalışmada 300 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa, bilgisayar bu pozisyonlardan birini rastgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öğe olarak kullanmakla seç-bağla testine başlar. Daha sonra, rastgele seçtiği bir pozisyon, yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı olma şansı 1/300'dür). Bilgisayar, orijinal verinin rastgele bir örneklemesini temsil eden, 300 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlemi tekrarlamak suretiyle araştırmacı, yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesini %50, %80 ya da %100 şeklinde ortaya koyabilir. Seç-bağla tahmininde

bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusundaki güven artmaktadır. Eğer belli bir dal için seç-bağla desteği az ise (%50'nin altında) araştırmacı genellikle ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda da yayınladığı ağaçta bu dalı tek düğümden çok çatallı (politomi) (belirsizlik noktası) olarak verecektir (Freeman ve Herron 1999).

İkinci bir yaklaşım ise sade parsimoni dışında Maksimum olasılık (maximum likelihood) ve genetik uzaklık (genetic distances) gibi alternatif metotlar kullanmaktır. Bu metotlar, karakterlerin nasıl evrimleştikleri konusunda farklı varsayımlar kullanmaktadırlar. (Freeman ve Herron 1999).

2.2 Konuya İlişkin Çalışmalar

Mitokondriyal DNA, evrimsel ve filogenetik çalışmalarda çok kullanılan bir moleküldür. Gen bölgelerinin tek tek veya tüm mtDNA'nın sekanslanması bu tür çalışmalarda kullanılabilecek ve güvenilirliği yüksek veriler sunmaktadır.

Bernatchez vd. (1991), mitokondriyal DNA restriksiyon analizini alabalıkgiller (Coregoninae) alt familyasındaki 21 sınıf arasındaki filogenetik düzeni araştırmada kullanmış, bu familyaya dahil üyelerde mtDNA ile allozim modelleri arasında morfolojik analizlere oranla daha büyük uyum olduğunu ve filogenetik yapının incelenmesinde genetik analizlerin daha uygun olduğunu, morfolojik bulguların filogenetik bağlantılardan ziyade adaptasyon sürecine yönelik daha iyi belirteçler olduğunu bildirmişlerdir.

Bernatchez vd. (1992), 24 farklı *Salmo trutta* populasyonundan 151 adet balık kullanarak karaciğer ve ovaryum dokularından izole edilen DNA'ların mitokondriyal kontrol bölgesi sekans varyasyonunu incelemiş ve sonuçlarının, *Salmo trutta* populasyonlarında filogenetik ilişkinin incelenmesinde mitokondriyal DNA sekanslarının çok kullanışlı olduğunu gösterdiğini bildirmiştir.

Magoulas vd. (1996), hamsi mitokondriyal DNA üzerinde yaptıkları çalışmada Akdeniz'deki populasyonun geçmişte bir farklılaşmaya uğradığı belirlemiş ve iki farklı şube (filum) bulunduğunu bildirmiştir.

Noack vd. (1996), sistematikte hem ışın yüzgeçliler (Actinopterygii) hem de yuvarlak yüzgeçli olarak sınıflandırılan, alternatif olarak da kendi grupları Brachiopterygii'de tanımlanan bichir balıklarından ornate bichir'in (*Polypterus ornatipinnis*) tüm mitokondriyal DNA'sını sekanslamış ve filogenetik analiz sonuçlarının bu balıkların yuvarlak yüzgeçliler sınıfına dahil olmadıklarını ve ışın yüzgeçliler sınıfının yaşayan temel üyeleri olduklarını ortaya koyduğunu bildirmişlerdir.

Cichlidae familyasının mitokondriyal DNA filogenisini araştıran Farias vd. (1999), 564 bp'lık 16S rDNA üzerinden yaptıkları incelemede Neotropikal cichlidlerin hızlı moleküler evrime uğradığını ve Afrika türleriyle yüksek genetik varyasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Inoue vd. (2001), *Conger myriaster* (Anguilliformes) için tüm mitokondriyal DNA sekansı ile yaptıkları çalışmada novel gen dizilerini kullanarak bu balıkların evrimi ve filogenisi hakkında önemli bilgiler elde etmiş ve bu karmaşık ilişkilerin belirlenmesinde tüm mitokondriyal DNA sekansının önemini vurgulamışlardır.

Çipura gibi yoğun üreme kabiliyetine sahip balıklarda seleksiyon uygulanmış populasyonlarda çiftleşme şemaları kullanılmadığı takdirde erken hayat devrelerindeki yüksek ölüm oranları ve dişiye ait önemli nongenetik etkiler sonucu genetik çeşitliliğin hızla kaybolması söz konusu olabilir (Perez-Enriquez vd. 1999).

Farklı doğal ve yapay çevrelerde seleksiyon baskısı ve akrabalı yetiştirme seviyeleri değişiklik göstermektedir. Bu nedenle yabani ve evcil çipura hatları yetiştirme

ortamında büyüme ve yaşama performansları açısından farklılık gösterebilmektedir (Knibb 2000).

Düzgün genetik programları olmadığında lokal balık çiftlikleri genellikle az sayıda damızlık ve küçük etkin populasyon büyüklükleri ile kendi kendilerine seleksiyon yapmaya yönelmektedir. Üstelik planlı seleksiyon olmadan çiftlik yönetimi genellikle yoğun akrabalı yetiştirmeye yol açmaktadır. Akrabalı yetiştirme yabani populasyonlardaki genetik çeşitliliğin yok olması üzerinde etkilidir. İyi yönetilen genetik programları akrabalı yetiştiriciliği minimuma indirmeye çalışmaktadır (Knibb 2000).

Summerer vd. (2001), Diplodus (Sparidae) türleri arasındaki akrabalığı araştırdıkları bir çalışmada 16S rDNA mitokondriyal gen bölgesi üzerinde çalışmış ve bu cins altında yer alan birçok tür arasındaki yakın akrabalık ilişkisini ortaya koymuştur.

Rossi vd. (2006), Orta Akdeniz'deki çipura balıklarının genetik yapısına ilişkin yaptıkları çalışmada allozim analizi ile gen-enzim sistemleri üzerinden 6 farklı istasyondan alınan örnekleri incelemiştir. Ancak örnekleme noktaları yalnızca İtalya kıyılarını kapsamıştır.

Orrell (2000), Sparidae familyasına ait türler arasındaki ilişkiyi sitokrom b ve 16S mtDNA analizleri ile incelemiştir.

Sola vd. (2007) GENIMPACT projesi kapsamında çipura balıklarının populasyon genetiklerini incelemiş ancak Yunanistan, İtalya, Tunus ve İspanya kıyılarındaki populasyonlar üzerinde durulurken Doğu Akdeniz bölgesi ele alınmamıştır.

Bargelloni vd. (2003), Kuzeydoğu Atlantik ve Akdeniz'deki Sparidae familyası üyeleri üzerinde yaptıkları çalışmada allozim analizi yöntemini kullanmış ve türler arasındaki coğrafik ve genetik varyasyonları ortaya koymuşlardır.

Alarcon vd. (2004), Avrupa kıyılarındaki doğal ve kültür çipura populasyonlarının genetik karşılaştırmalarına ilişkin çalışmalarında Güney Atlantik ve Akdeniz'de 6 doğal, 5 kültür populasyonundan örnekleme yaparak allozim, mikrosatellit ve mtDNA varyasyonlarını incelemişlerdir. Mikrosatellitler allozim'lere göre daha fazla varyasyon ortaya koyarken mtDNA analizleri populasyonlar arasında hiçbir farklılık göstermemiştir.

Palma vd. (2001), çipura balıklarının doğal ve kültür stoklarında genetik heterozigotluk tespiti için yaptıkları araştırmada beş farklı ülkeden örnekleme yapmış ve kültür stoklarında nadir allellerin kaybı sonucu genetik varyasyonun azaldığına dair bulgular ortaya koymuştur.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde çok önemli bir yere sahip çipura balıkları üzerinde çok sayıda genetik çalışma yapılmaktadır. Son yıllarda bu araştırmalar populasyonların genetik yapıları ve bunun yetiştiricilik alanındaki etkilerine yönelmiştir. Bu araştırmada Türkiye kıyılarında bulunan doğal ve kültür çipura stoklarından alınan örneklerin mitokondriyal DNA'larına ait üç farklı gen üzerinden son derece kesin sonuçlar veren dizi analizi yöntemiyle filogenetik ilişkileri incelenmiş ve bulgular filogenetik ağaçlar ile ortaya koyulmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Balık materyali

Araştırmada Akdeniz ve Ege Denizi'nde yakalanan çipura balıkları ile balık çiftliklerinden alınan çipura balıkları kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Araştırma için örneklenen çipura balıkları

Örnekleme istasyonları Adana (1), Mersin Körfezi (2), Antalya Körfezi (3), Muğla-Bodrum (4), İzmir (5) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2). Örnekler, karaciğer dokuları çıkarılmak üzere soğuk muhafaza ile Ankara'daki laboratuara nakledilmiştir.



Şekil 3.2 Örnekleme istasyonları (www.yeniresimler.net 2009)

3.1.2 Deneylerde kullanılan cihaz, gereçler ve sarf malzemeleri

Laboratuar çalışmaları DNA izolasyonu, gen amplifikasyonu ve dizi analizi olmak üzere üç ana safhadan oluşmuştur.

DNA izolasyonu aşamasında kullan cihazlar:

- Sonic homojenizatör (Sonics VibraCell)

- Su banyosu (LabLine AquaBath)
- Santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 18)
- Vakumlu santrifüj (Thermo DNA 120)
- NanoDrop ND-1000

Gen amplifikasyonu aşamasında kullanılan cihazlar:

- Gradient Thermocycler (MJ Research DNA Engine Tetrad2)
- Laminar Flow kabin (Holten LaminAir 1.8)

Dizi analizi aşamasında kullanılan cihazlar:

- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- Gradient Thermocycler (MJ Research DNA Engine Tetrad2)
- Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System

Farklı aşamalarda ortak kullanılan cihazlar:

- Elektroforez tankı ve güç ünitesi (BioRad Tank / Labnet Power Station 300)
- Hassas terazi (Shimadzu BX320H)
- UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) ve termal yazıcı (Sony UP-D895)
- Otoklav (Hirayama HVA-110)
- Saf Su (Millipore Milli-Q Gradient)

- Vortex (Harmony VTX-300L)
- Mikrodalga fırın

Deneyler süresince farklı aşamalarda kullanılan gereçler ve sarf malzemeleri:

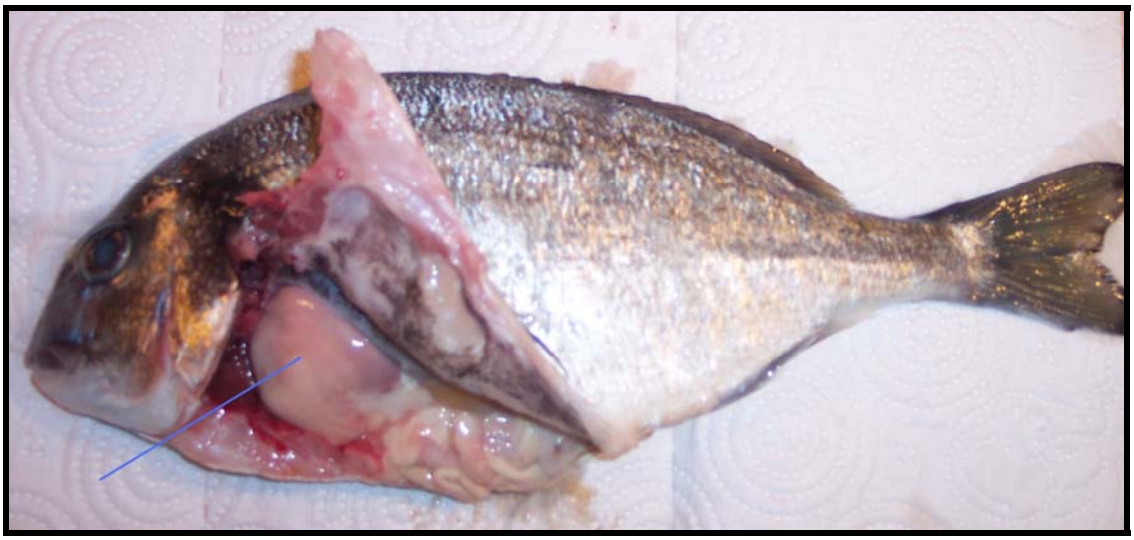
- Çeşitli cam malzeme (beher, ölçü silindiri vb.)
- Otomatik pipetler
- Farklı hacimlerde plastik tüpler
- Etanol
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (A1120)
- EDTA (5M, pH=8,0)
- Borik Asit (Sigma B6768)
- Trima Base (Sigma T6066)
- Ethidium Bromide (Sigma E7637)
- 6X Loading Dye (Fermantas 0611)
- DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus)
- Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega A9282)
- Na Asetat
- GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) (Beckman Coulter P/N 608120)

3.2 Yöntem

3.2.1 Doku örneklerinin alınması

Mitokondriyal DNA karaciğer, kan, kas, epitelyum, göz gibi çok çeşitli dokulardan elde edilebilmektedir. Çalışmamızda bu dokulardan ikisi (karaciğer ve kan) denenmiştir. Kan örnekleri ile yapılan ön denemelerde istenilen kalite ve miktarda DNA elde edilememiş ve hem daha kaliteli hem de miktarca fazla DNA elde edilen karaciğer dokularının kullanılmasına karar verilmiştir. Karaciğer dokuları, balıkların karın duvarı anüs

açıklığından başlayarak kafa yönüne doğru makas ile kesildikten sonra karaciğer dışarı alınarak elde edilmiş (Şekil 3.3) ve karaciğerden alınan dokular %95'lik etanol içeren tüplere yerleştirildikten sonra etiketlenerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. İşlem sırasında örnekler arasında bulaşma olmaması için son derece titiz çalışılmış, kullanılan makas, pens v.b gereçler her kullanımdan önce alkol ile temizlenmiştir.



Şekil 3.3 Balıkların karaciğerlerinin çıkarılması

Çizelge 3.1 DNA izolasyonu için karaciğer dokusu alınan örneklerin istasyonlara göre dağılımı

İstasyon	**Örnek sayısı**	
	Kültür	**Doğal**
Adana	100	3
Mersin	100	11
Antalya	10	4
Bodrum	100	4
İzmir	100	3

3.2.2 DNA ekstraksiyonu

Karaciğer dokularından DNA izolasyonu, Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (A1120) kullanılarak yapılmıştır ve üretici firma tarafından sağlanan protokole (http://www.promega.com/ 2009) uygun olarak gerçekleştirilmiştir:

- 600 µl Nuclei Lysis Solution, 15 ml'lik santrifüj tüpüne (TPP 91015) alınır ve buz üzerinde soğutulur. 10–20 mg taze doku örneği, içerisinde soğutulmuş Nuclei Lysis Solution (Promega A7943) bulunan santrifüj tüpüne alınır ve 10 saniye süre ile bir homojenizatör yardımı ile homojenize edilir.
- Elde edilen lizat 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne (Isolab ETTP0003) aktarılır. Tüpün kapağı parafin ile kaplanarak, daha önceden 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda, 15–30 dakika inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrasında lizat üzerine 3 µl RNase A (4mg/ml, Promega A7973) eklenir ve 2–5 defa alt üst edilerek karıştırılır. Karışım 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15-30 dakika boyunca inkübasyona bırakılır.
- Bu aşamadan sonra örneğin oda sıcaklığında 5 dakika soğutulması gerekmektedir. Oda sıcaklığında soğutulan örnek üzerine 200 µl Protein Precipitation Solution (Promega A7953) eklenir ve vorteks yardımı ile 20 saniye boyunca yüksek hızda karıştırılır. Karıştırdıktan sonra örnek buz üzerinde 5 dakika soğutulur. Daha sonra örnek 13000–16000 g devirde 4 dakika süre ile santrifüjlenir. Çöken protein beyaz bir pelet olarak görülecektir.
- DNA'yı içeren süpernatant, dikkatli bir biçimde alınarak, içerisinde 600 µl, oda sıcaklığında Isopropanol (Riedel-de Haen 24137) içeren 1,5 ml'lik temiz bir tüpe aktarılır. Çözelti, DNA iplikçiği görülebilir hale gelene kadar, alt üst edilerek yavaşça karıştırılır. Örnek oda sıcaklığında, 13000-16000 g'de, 1 dakika süre ile santrifüj edilir. Bu aşamada DNA beyaz pelet halinde görülebilir olacaktır. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılır.
- DNA üzerine 600 µl, oda sıcaklığında %70 etanol eklenir ve DNA'yı yıkamak için birkaç kez alt üst edilerek karıştırılır. Örnek bir kez daha, oda sıcaklığında, 13000-16000 g'de 1 dakika süre ile santrifüj edilir. Tüpte bulunan Etanol pipet yardımı ile dikkatlice uzaklaştırılır. Bu aşamada DNA peleti çok gevşek

olduğundan, pipetle etanol uzaklaştırılırken DNA'yı da çekmemeye özen gösterilmelidir.

- Etanol uzaklaştırıldıktan sonra tüp kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek 10-15 dakika boyunca kuruması beklenir.
- Kurutma işlemi de tamamlandıktan sonra DNA üzerine 100 µl DNA Rehydration Solution (Promega A7963) eklenir ve 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 1 saat süre ile inkübasyona bırakılarak çözülmesi sağlanır.

Daha sonra kullanılana kadar bekletmek üzere 4°C'de saklanır.

3.2.3 DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'nın miktar ve saflık analizleri spektrofotometre'de (NanoDrop ND-1000) gerçekleştirilmiştir. 1 µl DNA örneği cihaza pipet yardımı ile yerleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu 260 nm'de 1 OD'nin 50 ng/ml çift zincir DNA'nın absorbsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplanmıştır. DNA'nın saflığını değerlendirirken 260 nm/280 nm (DNA'nın absorbsiyon değeri/ protein'in absorbsiyon değeri) ve 260 nm/230 nm (DNA'nın absorbsiyon değeri/Fenol'ün abrobsiyon değeri) değerleri göz önüne alınmıştır (http://www.nanodrop.com 2008).

3.2.4 DNA konsantrasyonunun ayarlanması

Spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonları belirlenen örnekler, ana stokların kontamine olmaması ve tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının standardize edilmesi amacı ile DNA konsantrasyonu 200 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır (http://www.jgi.doe.gov/ 2010) ve ileriki aşamalarda bu standart numuneler kullanılmıştır.

3.2.5 Jel elektroforezi

DNA varlığını görüntülemek için jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Jel elektroforezine başlamadan önce agaroz jel ve gerekli çözeltiler hazırlanmıştır:

- 5X Trisma Base EDTA (TBE):

54 g Trima Base (Sigma T6066), 27,5 g Borik Asit (Sigma B6768) ve 20 ml EDTA (5M, pH=8,0) 800–900 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanır (Lenzmeier 2009).

- 1X Trisma Base EDTA (TBE):

Daha önce hazırlanmış olan 5X TBE, saf su ile 1:4 oranında seyreltilerek hazırlanır

- Ethidium Bromide (10 mg/ml):

1 g Ethidium Bromide (Sigma E7637) 100 ml distile su içerisinde, manyetik karıştırıcı kullanılarak, boya çözülene kadar iyice karıştırılır.

- DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus):

DNA Ladder üzerine 166 µl 6X Loading Dye (Fermantas 0611) ve 734 µl distile su ilave edilir. Vorteks yardımı ile yüksek hızda karıştırılır.

- %1'lik Agaroz Jel:

1 g agaroz (Sigma A9539) hassas terazi (Shimadzu BX320H) ile tartılır ve üzerine 100 ml 1X Trisma Base EDTA (TBE) eklenir. Mikrodalga fırın yardımı ile kaynatılarak agaroz'un çözülmesi sağlanır. Çözelti soğutulduktan sonra, çeker ocak altında, içerisine 5 µl Ethidium Bromide eklenir ve yavaşça karıştırılarak homojenize hale gelmesi sağlanır. Karışım son olarak jel tablasına yavaşça dökülerek 20-30 dakika, oda sıcaklığında, donana kadar beklenir.

%1'lik agaroz jel içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Scie-Plas HU10W) yerleştirilir. 2 µl DNA, 2 µl 6X Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenir. Jel'deki ilk kuyuya DNA Ladder yüklenir. Örnekler 100 voltta 30 dakika yürütülür ve

görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) aktarılır. Burada UV ışık altında görüntülenerek bütünlüğü saptanan DNA'nın görüntüsü, GeneSnap 6.08.04 yazılımı ile çekilerek, termal yazıcıdan (Sony UP-D895) çıktı alınır.

3.2.6 Gen amplifikasyonu

mtDNA'ya ait yüksek derecede stabiliteye sahip ve filogenetik çalışmalarda anlam ifade eden 3 mitokondriyal gen bölgesi uygun primerler; 12 S rRNA için L1091 ve H1478 (Kocher vd. 1989), Sitokrom b için kendi tasarladığımız SAcytB Forward ve SAcytB Reverse, Sitokrom oksidaz II için L7450 ve H8055 kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile Mamuris vd (1999) 'e göre çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgeleri %2 lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonlar jel dokümantasyon sisteminde görüntülenmiştir.

Çalışmada kullanılacak primerler (Çizelge 3.2) PCR analizinde kullanılmak üzere uygun konsantrasyonlara ayarlanmıştır. PCR'da kullanılacak olan liyofilize primer, üretici firma tarafından verilen nmol değerlerinin 10 misli distile su ile sulandırılarak 100 pmol/µl'lik stok primer elde edilmiştir. Daha sonra stok primer 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak PCR reaksiyonunda kullanılacak 10 pmol/µl'lik stok primer oluşturulmuştur.

Çalışmaya başlamadan önce primerlerin hesaplanan erime sıcaklığında çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla primer çifti ile, gradient thermocycler (MJ Research DNA Engine Tetrad2) kullanılarak, 50–65°C sıcaklık aralığında, farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında optimizasyon için reaksiyon kurulmuştur. Optimizasyon sonrası kullanılan reaksiyon protokolü ve PCR döngü koşulları Çizelge, 3.3 - 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.2 Primer dizileri

Primer adı	**Gen bölgesi**	**Primere ait baz dizisi**
L1091	12 S rRNA	5’-AAAAAGCTTCAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3’
H1478	12 S rRNA	5’-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3’
SAcytB Forward	Sitokrom b	5’-TCGGAGTTGTCCTCCTCCTA-3’
SAcytB Reverse	Sitokrom b	5’-GTGACTGGTCGGAAGGTGA-3’
L7450	Sitokrom oksidaz II	5’-AAAGGAAGGAATCGAACCCCC-3’
H8055	Sitokrom oksidaz II	5’-GCTCATGAGTGGAGGACGTCTT-3’

Çizelge 3.3 Çipura 12S rRNA PCR reaksiyon protokolü ve döngü koşulları

Bileşen	**Hacim**	**Döngü koşulları**
10X SE-Taq DNA Polymerase Buffer * (SibEnzyme E 332)	5 µl	94°C'de 2 dakika
dNTP mix (10 mM) (SibEnzyme N 025)	1 µl	94°C'de 30 saniye
Primer (Forward) (10 pmol/µl)	1 µl	55°C'de 30 saniye
Primer (Reverse) (10 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase (5U/µl, SibEnzyme E 332)	0.4 µl	72°C'de 1 dakika (35 döngü)
DNA (200 ng/µl)	2 µl	72°C'de 5 dakika
Distile Su	39.6 µl	
Toplam Hacim	50 µl	

*60mM Tris-HCl (ph 8.5 / 25°C), 1.5 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 % Triton X-100

Çizelge 3.4 Çipura Sitokrom oksidaz II PCR reaksiyon protokolü ve döngü koşulları

Bileşen	**Hacim**	**Döngü koşulları**
10X SE-Taq DNA Polymerase Buffer * (SibEnzyme E 332)	3.75 µl	95°C'de 5 dakika
dNTP mix (10 mM) (SibEnzyme N 025)	1 µl	95°C'de 30 saniye
Primer (Forward) (10 pmol/µl)	1 µl	50°C'de 30 saniye
Primer (Reverse) (10 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase (5U/µl, SibEnzyme E 332)	0.4 µl	72°C'de 30 saniye (35 döngü)
DNA (200 ng/µl)	4 µl	72°C'de 10 dakika
Distile Su	38.85 µl	
Toplam Hacim	50 µl	

*60mM Tris-HCl (ph 8.5 / 25°C), 1.5 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 % Triton X-100

Çizelge 3.5 Çipura Sitokrom b PCR reaksiyon protokolü ve döngü koşulları

Bileşen	**Hacim**	**Döngü koşulları**
10X SE-Taq DNA Polymerase Buffer * (SibEnzyme E 332)	3 µl	94°C'de 5 dakika
dNTP mix (10 mM) (SibEnzyme N 025)	1 µl	94°C'de 40 saniye
Primer (Forward) (10 pmol/µl)	1 µl	50°C'de 1 dakika
Primer (Reverse) (10 pmol/µl)	1 µl	
Taq DNA Polymerase (5U/µl, SibEnzyme E 332)	0.4 µl	72°C'de 2 dakika (40 döngü)
DNA (200 ng/µl)	4 µl	72°C'de 5 dakika
Distile Su	39.6 µl	
Toplam Hacim	50 µl	

*60mM Tris-HCl (ph 8.5 / 25°C), 1.5 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 % Triton X-100

Kolon yöntemi ile PCR ürünlerinin saflaştırılmasında Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega A9282) kullanılmıştır (http://www.promega.com/ 2009):

- Elde edilen PCR ürünlerinin hacimleri ölçülür. Üzerlerine 1:1 oranında Membran Binding Solution (Promega A9303) eklenir ve pipetaj yaparak karıştırılır.
- Kolonlar (Promega A129B) temiz tüpe (Promega A130B) takılır ve üzerlerine PCR ürünleri yüklenir. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir.
- Tüpler 14000 rpm'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlenir.
- Kolonların altında kalan kısım uzaklaştırılır.
- Kolonlara 700 µl Membrane Wash Solution (Promega A929C) eklenir.
- 14000 rpm'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlenir.
- Kolonların altında kalan kısım uzaklaştırılır.
- Membrane Wash Solution'dan 500 µl eklenerek işlem tekrarlanır.
- 14000 rpm devirde 5 dakika süre ile santrifüjlenir.
- Kolonlar temiz tüplere takılıp, örnek isimleri tüplere ve kapaklarına yazılır. Tüplerin kapakları, bistüri yardımı ile tüpten ayrılır.

- 25 µl Nuclease Free Water (Promega P119E), kolon membranına değmeden, tam ortasına bırakılır. Oda sıcaklığında 1 dakika süre ile bekletilir.
- Daha sonra örnekler 14000 g'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlenir.
- Son olarak kolonlar atılır, tüplerin kapakları kapatılır ve kullanılana kadar 4°C'de saklanır.

Saflaştırılan PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel'de, 100 voltta 30 dakika yürütülmüş ve UV görüntüleme sistemine görüntülenmiştir.

3.2.7 DNA dizi analizi

Pürifiye edilmiş gen bölgelerine ait nükleotit dizileri, "Sanger Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması" prensibiyle (Sanger vd. 1977), otomatik DNA dizileme cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonunu gerçekleştirmek için GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) (Beckman Coulter P/N 608120) kullanılmıştır.

Dizi analizi için kurulacak reaksiyonlarda öncelikle primerler 1,6 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde saf su ile seyreltilmiştir. Primerlerin belirtilen erime sıcaklıklarında çalışıp çalışmadığını kontrol etmek ve reaksiyonda kullanılacak uygun örnek miktarını belirlemek üzere, Gradient Thermocycler (MJ Research DNA Engine Tetrad2) kullanılarak, üretici firma tarafından verilen sıcaklık değerleri ve farklı örnek miktarları ile optimizasyon reaksiyonları kurulmuştur. Sonraki reaksiyonlarda her balık türü ve farklı gen bölgesi için tespit edilen ideal reaksiyon değerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.6 - 3.8).

Çizelge 3.6 Çipura 12S rRNA Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması reaksiyon protokolü ve döngü koşulları

Bileşen	**Hacim**	**Döngü koşulları**
DTCS Premix	4 µl	96°C'de 3 dakika 96°C'de 20 saniye 62°C'de 20 saniye (30 döngü) 60°C'de 4 dakika
Primer (1.6 pM/µl)	1 µl	
Betain	2 µl	
DNA	2 µl	
Distile Su	1 µl	
Toplam Hacim	10 µl	

Çizelge 3.7 Çipura Sitokrom oksidaz II Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması reaksiyon protokolü ve döngü koşulları

Bileşen	**Hacim**	**Döngü koşulları**
DTCS Premix	4 µl	96°C'de 3 dakika 96°C'de 20 saniye 58°C'de 20 saniye (30 döngü) 60°C'de 4 dakika
Primer (1.6 pmol/µl)	1 µl	
Betain	2 µl	
DNA	2 µl	
Distile Su	1 µl	
Toplam Hacim	10 µl	

Çizelge 3.8 Çipura Sitokrom b Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması reaksiyon protokolü ve döngü koşulları

Bileşen	**Hacim**	**Döngü koşulları**
DTCS Premix	4 µl	96°C'de 3 dakika 96°C'de 20 saniye 60°C'de 20 saniye (30 döngü) 60°C'de 4 dakika
Primer (1.6 pmol/µl)	1 µl	
Betain	2 µl	
DNA	2 µl	
Distile Su	1 µl	
Toplam Hacim	10 µl	

Etanol/EDTA/Sodyum Asetat presipitasyonu (Griffith University Ethanol/EDTA/ Sodium Acetate Precipitation Protocol'den modifiye edilmiştir; http://www.griffith.edu.au 2009):

- Sekans PCR ürünlerinin hacmi az olduğundan tüpler spin'lenir
- Her örnek için 1,5 ml'lik tüplerden hazırlanıp üzeri yazılır
- Her tüpe 1µl 125 mM EDTA (pH 8,3) koyulur
- PCR ürünlerinin tamamı tüpün içine bırakılıp buza alınır
- Tüplere 1µl 3 mM Na Asetat (pH 5,2) koyulur
- Çok kısa süre vortex'lenir
- Tüplere 35 µl saf etanol (-20 °C'de muhafaza edilmiş) eklenip tüpler oda koşuluna alınır
- Çok kısa süre vortex'lenir
- Tüpler 15 dakika inkübasyona bırakılır
- Yönlerine dikkat edilerek yerleştirilen tüpler +4°C ve 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir
- Peletin bulunduğu kısma değmeden sıvı kısım pipetle çekilerek atılır

- Tüplere 135µl %70'lik etanol koyulur ve tüpler 1 kez alt-üst edilir
- Yönlerine dikkat edilerek yerleştirilen tüpler +4°C ve 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir
- Tüpler fazla sarsılmadan alkol dökülür ve kalan alkol pipet yardımıyla alınarak uzaklaştırılır
- Tüplere 135µl %70'lik etanol koyulur
- Yönlerine dikkat edilerek yerleştirilen tüpler +4°C ve 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir
- Tüplerdeki alkol dökülür
- Tüpler 35 sn spin'lenir
- Tüplerde kalan alkol peçeteye emdirilip vakumlu santrifüjde 10 dk kurutulur
- Tüplere 20 µl sıvı formamid koyulur
- Tüpler 8 sn vortex'lenir ve sıvının dibe inmesi için tüpler yere vurulur
- Peletin olduğu bölge kazınarak pipetaj yapılır
- Kazıma sonunda örnek pipete çekilip plate üzerindeki kuyulara 45°'lik açıyla yüklenir
- Örneklerin buharlaşmasını önlemek için kuyulara birer damla mineral yağ ilave edilir
- Buffer plate üzerinde aynı sıraya denk gelen kuyulara seperation buffer koyulur
- Plate'ler sekans cihazına yerleştirilmeye hazırdır

Dizi analizleri Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.9 DNA dizi analizi yapılan örneklerin istasyonlara göre dağılımı

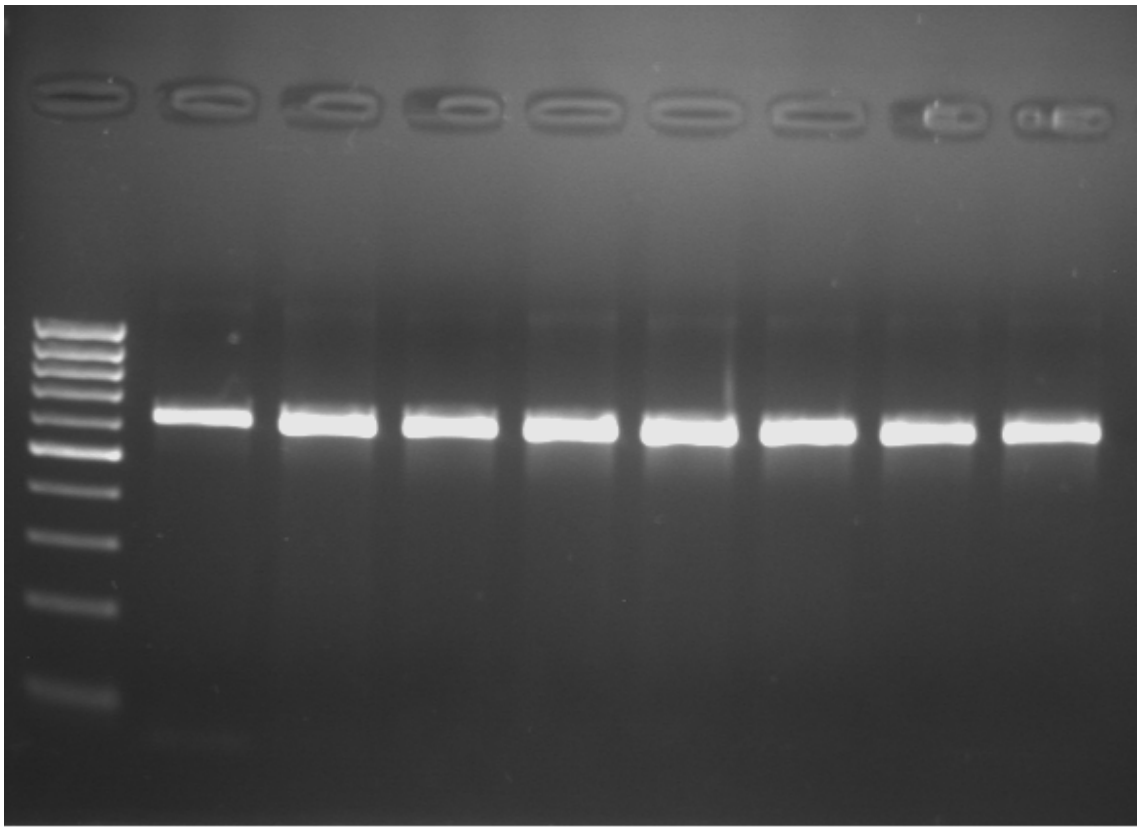
İstasyon	Gen bölgesi	Örnek sayısı	
		Kültür	Doğal
Adana	12S rRNA	3	3
	Sitokrom Oksidaz II	3	3
	Sitokrom b	3	3
Mersin	12S rRNA	3	3
	Sitokrom Oksidaz II	3	3
	Sitokrom b	3	3
Antalya	12S rRNA	3	3
	Sitokrom Oksidaz II	3	3
	Sitokrom b	3	3
Bodrum	12S rRNA	3	3
	Sitokrom Oksidaz II	3	3
	Sitokrom b	3	3
İzmir	12S rRNA	3	3
	Sitokrom Oksidaz II	3	3
	Sitokrom b	3	3
Toplam		**45**	**45**

3.3 Filogenetik Analiz

Sekans verilerinin hizalanmasında ve filogenetik ağaçların oluşturulmasında Sequencer 4.9 ve MEGA4 programları kullanılmıştır. Elde edilen verilerden Neighbor Joining (NJ) ve Minimum Evolution (ME) yöntemleri kullanılarak bireyler arasındaki filogenetik ilişki belirlenmiştir. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında güvenilirliği sağlamak için 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) testleri yapılmış ve filogenetik ağaçlar konsensus ağaçlarına göre verilmiştir (Keskin ve Can 2009).

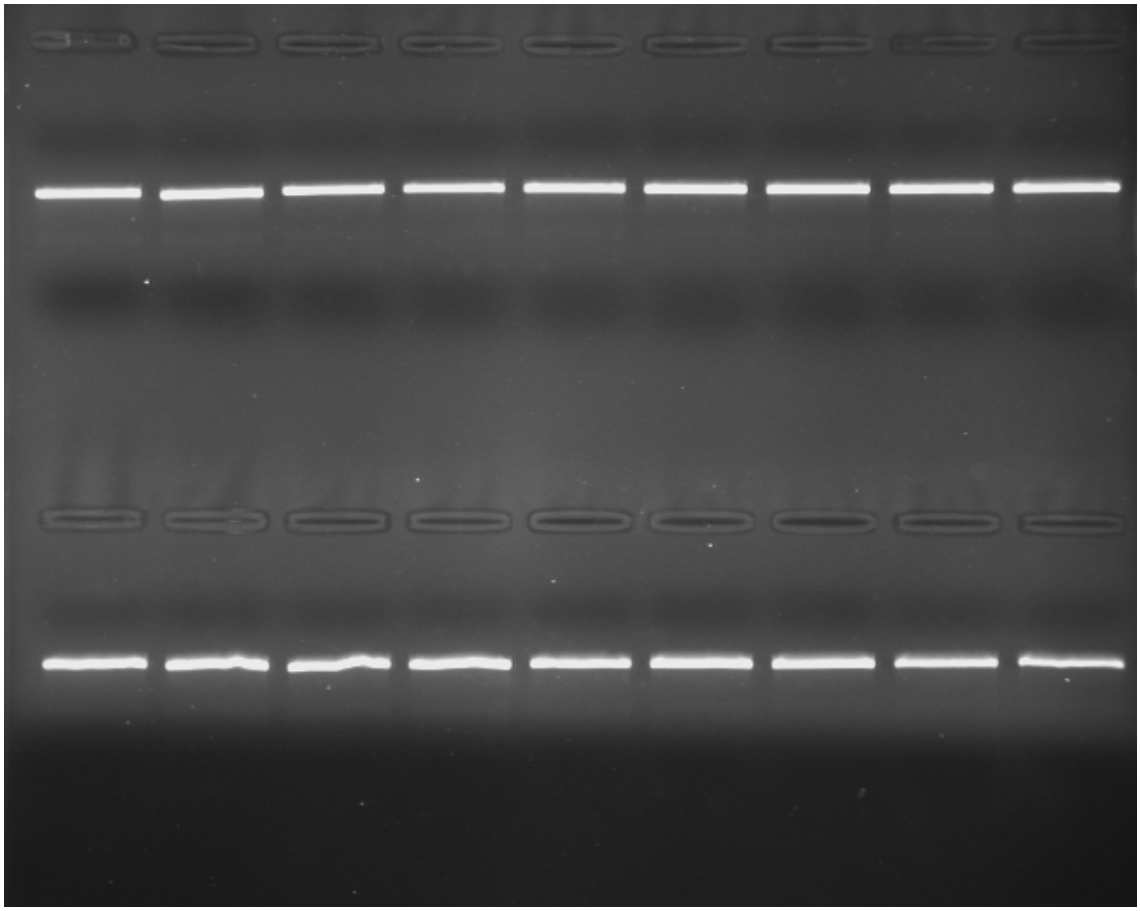
4. BULGULAR

Karaciğer dokularından izole edilen DNA'lar analize alınmadan önce DNA varlığını görüntülemek ve bütünlüğünü kontrol etmek amacıyla Nanodrop'la ölçümleri yapılmış ve %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.1). İstenen kaliteye sahip olmayan numuneler, verilerin kalitesini yüksek tutmak ve gereksiz malzeme israfını önlemek amacıyla denemeden çıkarılmıştır.



Şekil 4.1 PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülerinden bir örnek

PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen amplikonlar, %2'lik agaroz jelde görüntülenerek saflaştırma işleminin başarısı kontrol edilmiş (Şekil 4.2) ve düzgün sonuç vermeyen numuneler tekrar edilmiş ya da deneme dışında bırakılmıştır.



Şekil 4.2 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntülerinden bir örnek

Dizi analizi aşamasında verilerin kaydedilmesi ve analiz aşamasında olabilecek karışıklıkları önlemek ve kolaylık sağlamak açısından farklı gen bölgelerini ifade eden indeks numaralarına dayalı bir kodlama yapılmıştır (Çizelge 4.1) ve bundan sonra örnekler bu indeks numaraları ile anılacaktır.

Çizelge 4.1 Çipura örneklerine ait DNA indeks numaraları

İSTASYON	DNA İndeks Numarası		
	12S rRNA (A)	**Sitokrom oksidaz II (B)**	**Sitokrom b (C)**
Bodrum - Kültür	KA1	KB1	KC1
	KA2	KB2	KC2
	KA3	KB3	KC3
Bodrum - Doğal	DA26	DB26	DC26
	DA27	DB27	DC27
	DA28	DB28	DC28
Mersin - Kültür	KA4	KB4	KC4
	KA5	KB5	KC5
	KA6	KB6	KC6
Mersin - Doğal	DA7	DB7	DC7
	DA8	DB8	DC8
	DA9	DB9	DC9
Antalya - Kültür	KA10	KB10	KC10
	KA11	KB11	KC11
	KA12	KB12	KC12
Antalya - Doğal	DA13	DB13	DC13
	DA29	DB29	DC29
	DA30	DB30	DC30
Adana - Kültür	KA14	KB14	KC14
	KA15	KB15	KC15
	KA16	KB16	KC16

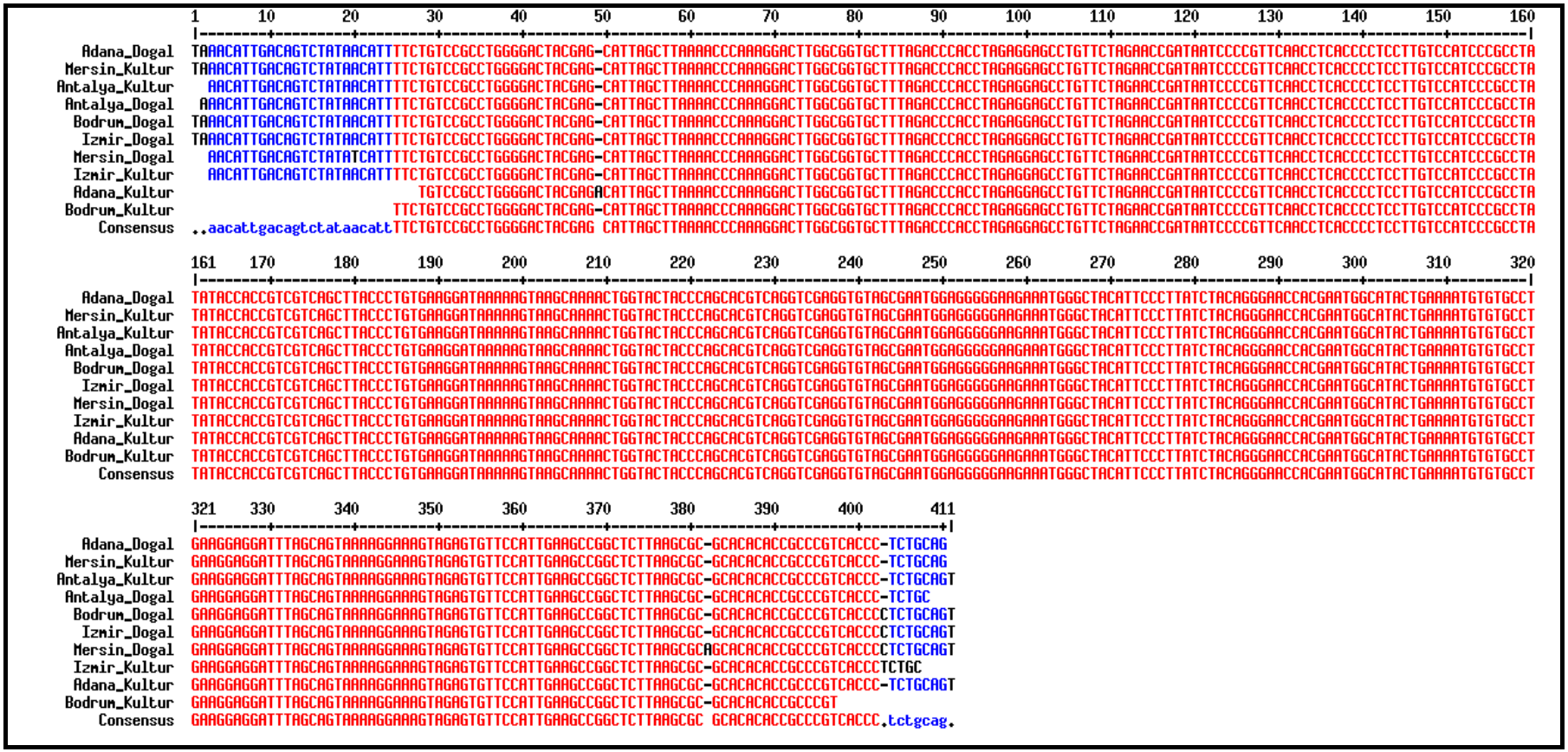
Çizelge 4.1 Çipura örneklerine ait DNA indeks numaraları (devamı)

Adana - Doğal	DA17	DB17	DC17
	DA18	DB18	DC18
	DA19	DB19	DC19
İzmir - Kültür	KA20	KB20	KC20
	KA21	KB21	KC21
	KA22	KB22	KC22
İzmir - Doğal	DA23	DB23	DC23
	DA24	DB24	DC24
	DA25	DB25	DC25

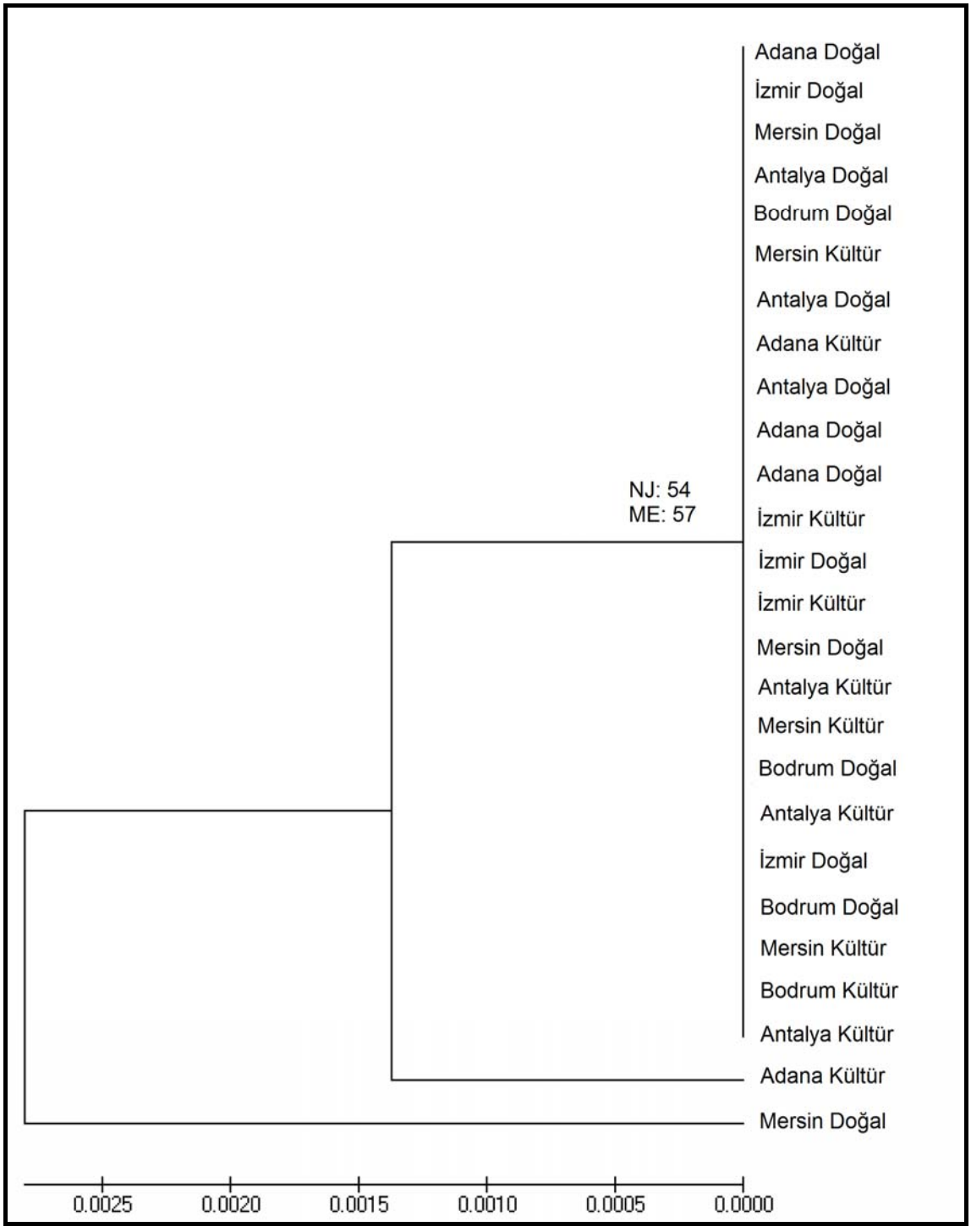
Her istasyonu temsil eden örneklere ait nükleotid dizileri belirlendikten sonra MEGA4 programı kullanılarak hizalanmıştır (Tamura vd. 2007)

5 farklı istasyondan kültür ve doğal çipura stoklarına ait mitokondriyal 12S rRNA, Sitokrom oksidaz II ve Sitokrom b gen dizileri Neighbor Joining ve Minimum Evolution algoritmaları kullanılarak aralarındaki filogenetik ilişki ortaya çıkarılmış ve bu ilişkiyi kullanmak için filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında güvenilirliği sağlamak için 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) testleri yapılmış ve filogenetik ağaçlar bootstrap konsensus ağaçlarına göre verilmiştir.

Üç farklı gen bölgesi için her istasyonu temsil eden diziler aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. Hizalama için online Multialin programı kullanılmıştır (Multialin Software http://multalin.toulouse.inra.fr/ 2010). 12S rRNA bölgesine ait yaklaşık 400 baz uzunluğundaki dizilerin çoklu hizalanmış hali Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Çipura 12S rRNA geni için tüm istasyonları temsil eden dizilerin çoklu hizalanmış gösterimi (Multialignment). Yüksek konsensüs (%90) bölgeleri kırmızı, düşük konsensüs bölgeleri (%30) mavi renkle gösterilmiştir.

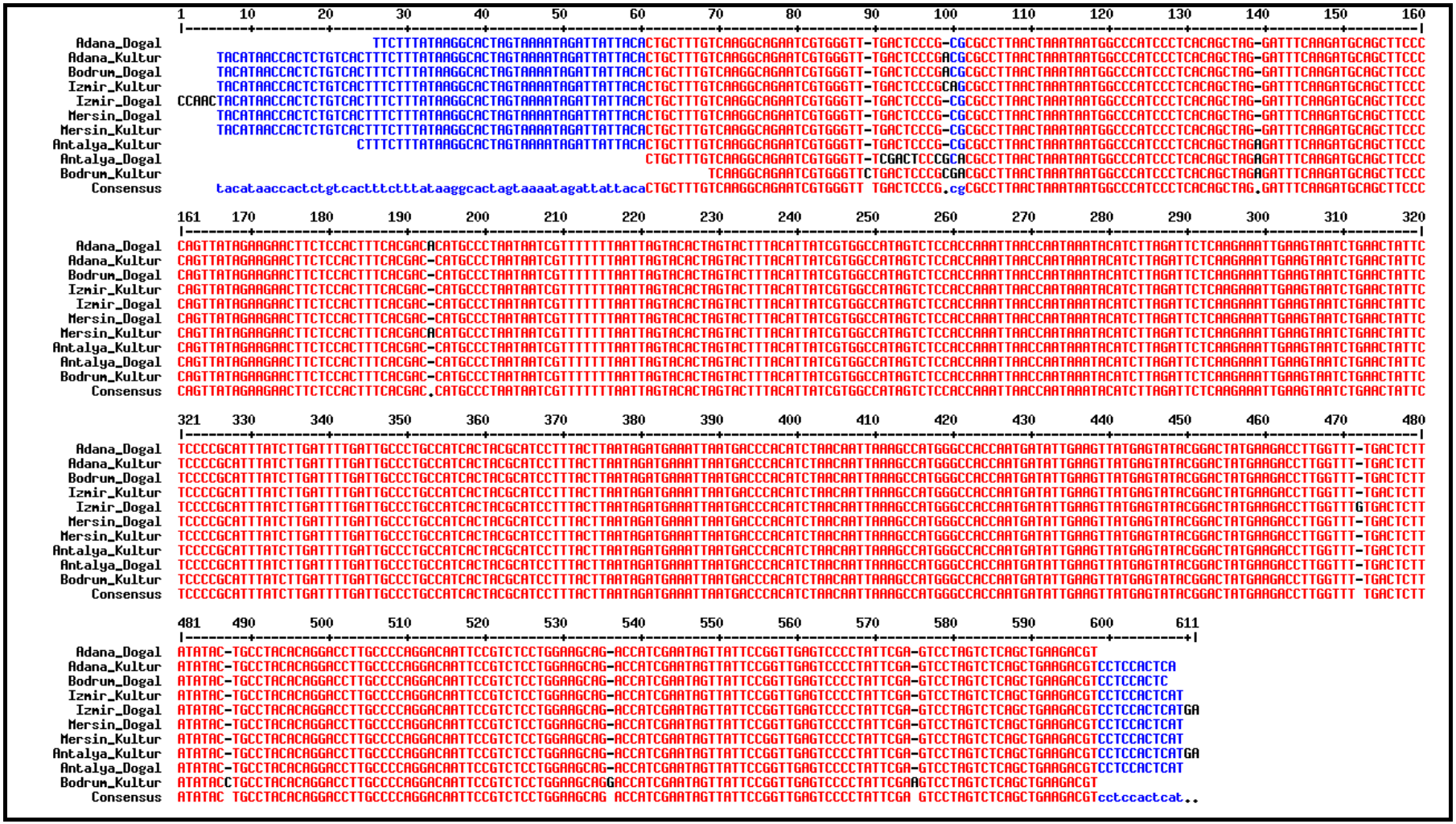


Şekil 4.4 Çipura 12S rRNA bölgesi için çizilen filogenetik ağaç

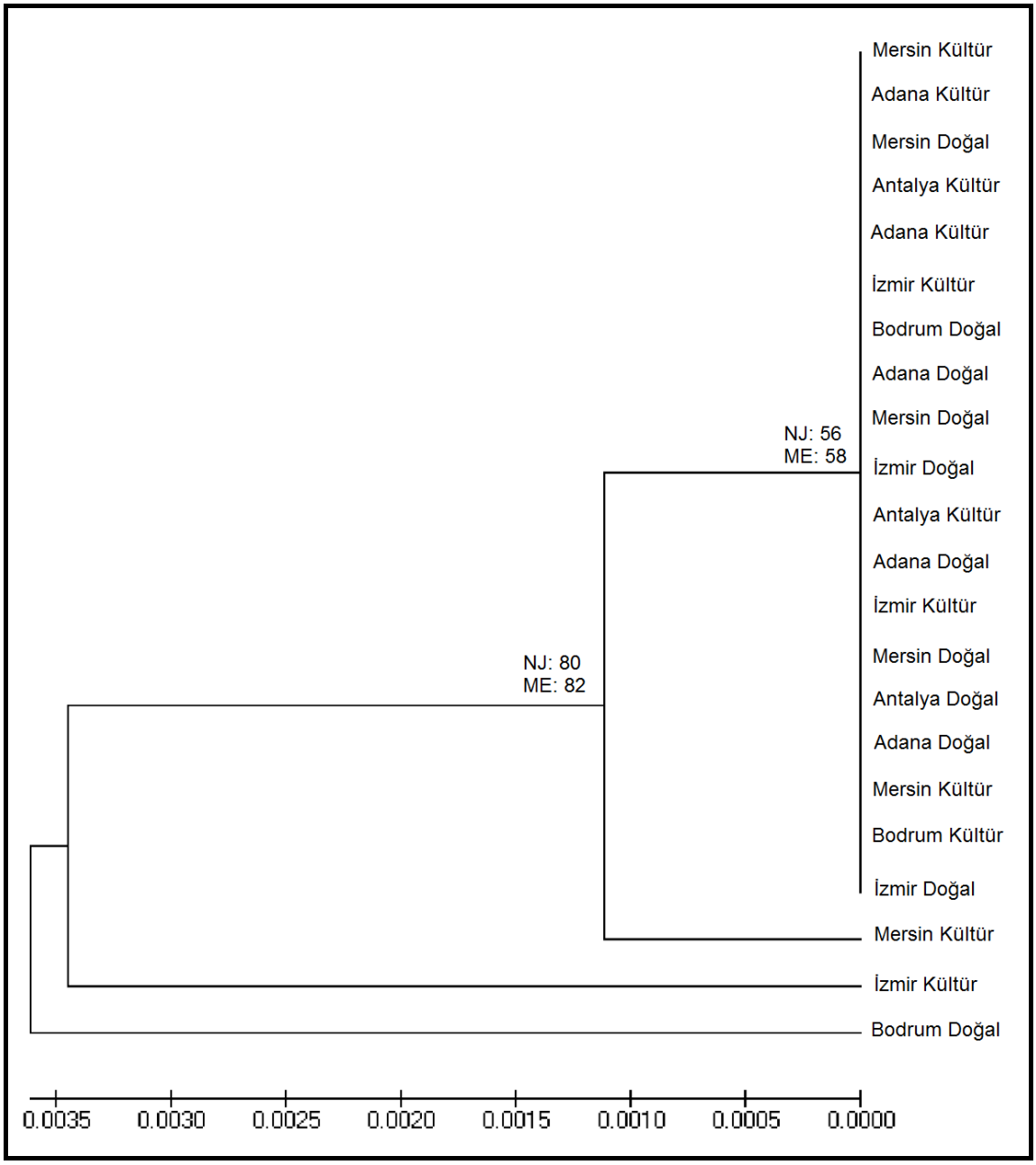
Filogenetik ağaca (Şekil 4.4) ilk bakışta kültür ve doğal stoklar içerisindeki en büyük varyasyonun 0.0030 (pairwise genetik uzaklık) olduğu görülmektedir. Ağaç iki ana dala

ayrılmaktadır. Mersin istasyonundan örneklenen DA9 indeks numaralı doğal çipura örneğinin diğer tüm örneklerden belirgin bir biçimde ayrıldığı ve bu örneğin ilk ana dalı oluşturduğu görülmektedir. İkinci ana dal ikiye ayrılmaktadır. İkiye ayrılan dalın ilk dalını Adana istasyonundan örneklenen KA15 indeks numaralı kültür çipura örneği temsil etmektedir. İkiye ayrılan dalın ikinci dalında ise diğer tüm istasyonları temsil eden doğal ve kültür stoklarına ait örnekler herhangi bir genetik farklılık (pairwise) göstermeksizin bir arada bulunmaktadır.

Sitokrom oksidaz II bölgesine ait yaklaşık 600 baz uzunluğundaki dizilerin çoklu hizalanmış hali Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Çipura Sitokrom oksidaz II geni için tüm istasyonları temsil eden dizilerin çoklu hizalanmış gösterimi (Multialignment). Yüksek konsensüs (%90) bölgeleri kırmızı, düşük konsensüs bölgeleri (%30) mavi renkle gösterilmiştir.

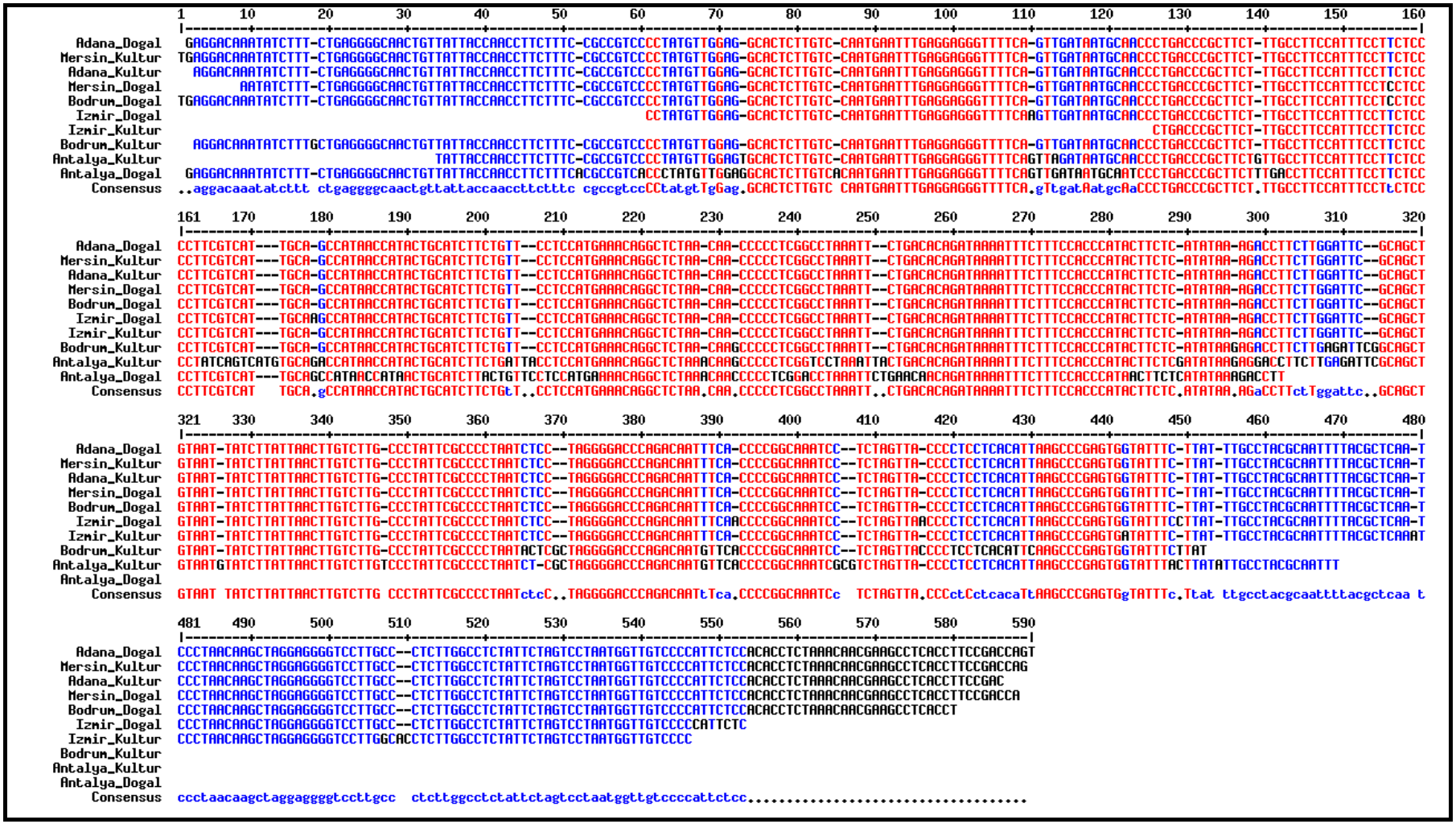


Şekil 4.6 Çipura Sitokrom oksidaz II bölgesi için çizilen filogenetik ağaç

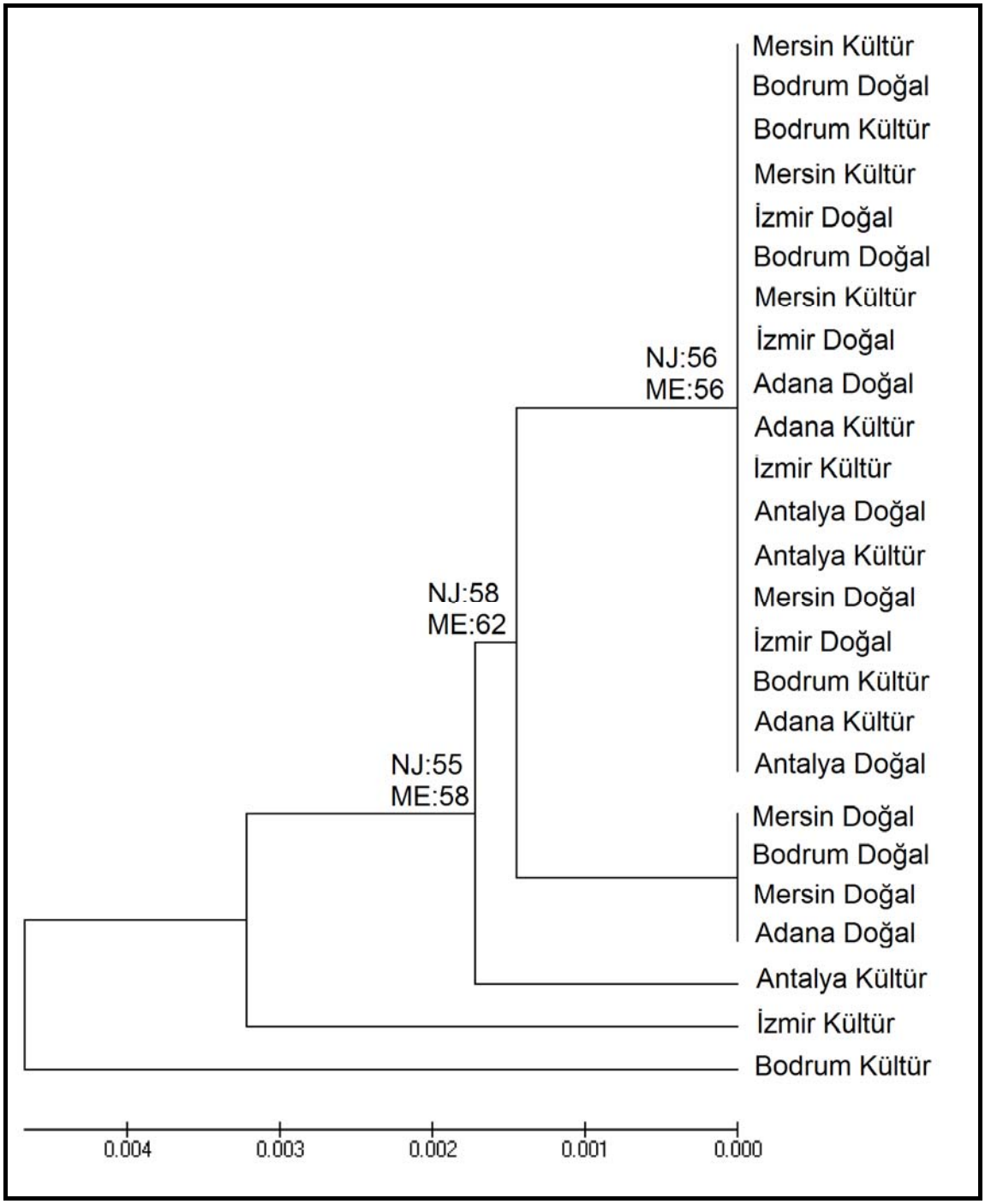
Şekil 4.6'daki filogenetik ağaca bakıldığında kültür ve doğal örnekler arasındaki en büyük varyasyonun 0,0030 (pairwise genetik uzaklık) olduğu görülmektedir. Sitokrom oksidaz II dizilerinden elde edilen filogenetik ağaç iki ana dala ayrılmaktadır. İlk ana dalda İzmir istasyonundan örneklenen KB22 indeks numaralı kültür çipura örneğinin diğer tüm örneklerden ayrıldığı görülmektedir. İkinci ana dal kendi içinde ikiye

ayrılmakta ve birinci dalı İzmir istasyonundan örneklenen DB25 indeks numarasına sahip doğal çipura örneği temsil etmektedir. İkinci dal kendi içerisinde tekrar ikiye ayrılmakta ve bunun ilk dalını Bodrum istasyonundan örneklenen DB28 indeks numarasına sahip doğal çipura örneği temsil etmektedir. Ayrılan ikinci dal kendi içerisinde üç farklı dala ayrılmaktadır. Birinci dalı Antalya istasyonundan elde edilen KB12 indeks numarasına sahip kültür çipura örneği, ikinci dalı Mersin istasyonundan elde edilen KB6 indeks numarasına sahip kültür çipura örneği temsil etmekte, üçüncü ve son dalda ise diğer tüm istasyonları temsil eden doğal ve kültür stoklarına ait örneklerin herhangi bir genetik farklılık (pairwise) göstermeksizin bir arada bulunduğu görülmektedir.

Sitokrom b bölgesine ait yaklaşık 600 baz uzunluğundaki dizilerin çoklu hizalanmış hali Şekil 4.7'te verilmiştir.



Şekil 4.7 Çipura Sitokrom b geni için tüm istasyonları temsil eden dizilerin çoklu hizalanmış gösterimi (Multialignment). Yüksek konsensüs (%90) bölgeleri kırmızı, düşük konsensüs bölgeleri (%30) mavi renkle gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Çipura Sitokrom b bölgesi için çizilen filogenetik ağaç

Çipura Sitokrom b bölgesi için çizilen filogenetik ağaç incelendiğinde kültür ve doğal stoklar içerisindeki en büyük varyasyonun 0,0050 (pairwise genetik uzaklık) olduğu görülmektedir. Sitokrom b dizilerinden elde edilen filogenetik ağaç iki ana dala

ayrılmaktadır. Birinci ana dalı Bodrum istasyonundan elde edilen KC2 indeks numarasına sahip kültür çipura örneği temsil etmektedir. İkinci ana dal kendi içerisinde ikiye bölünmekte ve ilk dalı İzmir istasyonundan elde edilen KC21 indeks numarasına sahip kültür çipura örneği temsil etmektedir. İkinci dal üç kola ayrılmakta, üç koldan ilkini Antalya istasyonundan elde edilen KC11 indeks numarasına sahip kültür çipura örneği temsil etmektedir. İkinci dalı Adana istasyonundan örneklenen DC18 indeks numarasına sahip doğal çipura örneği, Mersin istasyonundan elde edilen DC7 ve DC8 indeks numaralarına sahip doğal çipura örnekleri ve Bodrum istasyonundan örneklenen DC26 indeks numarasına sahip doğal çipura örneği temsil etmektedir. Üçüncü ve son dalda ise diğer tüm istasyonları temsil eden doğal ve kültür stoklarına ait örnekler herhangi bir genetik farklılık (pairwise) göstermeksizin bir arada bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda kullanılan genler seçilirken literatürde sıkça karşılaşılan genler göz önünde bulundurulmuştur (Orrell 2000, Park vd. 2000, Apostolidis vd. 2001, Sarmaşık vd. 2008). Veri tabanları tarandığında sitokrom oksidaz II ve sitokrom b genlerine ait diziler görülebilmektedir. Fakat Akdeniz'de bulunan çipura balıklarının 12S rRNA gen bölgesine ilişkin daha önce girilmiş herhangi bir diziye rastlanmamıştır ve bu gen bölgesinin filogenetik analizlerde kullanılabilirliğini görmek üzere çalışmamıza dahil edilmiş ve 12S rRNA gen bölgesine ait dizi ilk defa tarafımızdan veri tabanına kaydedilmiştir. Analiz edilen üç gen bölgesine ait diziler NCBI GenBank veri tabanına kaydettirilerek kayıt numaraları (GenBank accession number) alınmıştır (12S rRNA – GU902250; Sitokrom b - GU902251; Sitokrom oksidaz II - GU902252).

Kültür ve doğal örnek ayrımı yapmaksızın tüm bireyler arasındaki genetik varyasyon mitokondriyal 12S rRNA bölgesinden yola çıkarak yapılan analizde en çok 0,0030 düzeyindedir. Bu genetik uzaklık kültür ve doğal çipura stokları arasında çok büyük bir ayrım olmaksızın büyük bir genetik farklılık olmadığını göstermektedir. Diğer örneklerden en belirgin bir biçimde farklılık gösteren örneğin Mersin istasyonundan elde edilen DA9 indeks numarasına sahip doğal çipura olduğu görülmektedir. Fakat aynı istasyondan alınan DA7 ve DA8 indeks numaralarına sahip doğal çipura örneklerinin ise ikinci ana dalın ikinci dalında kültür veya doğal örnek farkı gözetmeksizin diğer örneklerle beraber yer alması, bu farklılığın doğal ve kültür stoklar arasında mitokondriyal 12s rRNA geni bakımından belirgin bir farklılık olduğunu söylemekte yetersiz olduğunu göstermektedir.

Sitokrom oksidaz II geni için de 12S rRNA'dan elde edilen filogenetik ağaçla benzer şekilde bazı bireylerin (KB6, KB12, KB22, DB25, DB28) diğer bireylerden en yükseği 0,0030'luk (KB22) bir fark gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu farktan yola çıkarak Sitokrom oksidaz II gen bölgesi bakımından istasyonlar veya kültür ve doğal stoklar arasında önemli bir fark olduğu söylenemez.

Sitokrom b bölgesi ele alındığında bireyler arasındaki en büyük genetik farklılığın 0,0050 olduğu görülmektedir. 12s rRNA ve Sitokrom oksidaz II bölgelerinden elde edilen sonuçlarla benzer şekilde bu genetik farklılık ta oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır. En büyük genetik farklılığa (0,0050) KC2 indeks numaralı örneğin, örneklerin kültür ve doğal balık farkı gözetmeksizin bir arada temsil edildiği son kolda bulunan KC1 ve KC3 indeks numaralı örneklerle aynı istasyondan elde edildiği göz önüne alındığında bu farklılığın da kültür ve doğal stokları birbirinden ayırmada yeterli olmadığı söylenebilir.

Benzer bir çalışmada Apostolidis vd. (2001), barbun balıklarından (Mullidae) dört tür için sitokrom b ve 16S rRNA genlerinin sekanslarından yola çıkarak filogenetik analiz yapmışlar ve levreksiler (*Sparus aurata, Perca fluviatilis*) için önceden yayınlanmış verilerle birlikte yorumladıkları sonuçların mevcut taksonomik sınıflandırmayı desteklediğini bildirmişlerdir. Filogenetik analizlerde bizim çalışmamızda da kullanılan Minimum Evolution (ME) ve Neighbor Joining (NJ) gibi algoritmalarla çizilen ağaçlar üzerinden yaptıkları yorumlar, farklı balık türleri söz konusu olsa da yaklaşım açısından bizim yorumlarımızla paraleldir.

Bilgen vd. (2007), Ege Bölgesi'nde Seferihisar ve Aliağa'da bulunan iki farklı kuluçkahanedeki çipura balıklarının genetik farklılıklarının RAPD-PCR yöntemiyle belirlenmesine yönelik çalışmalarında iki grup arasında ciddi bir genetik farklılık bulunmadığını belirlemiştir ve bulguları bizim çalışmamızla örtüşmektedir.

Zouros (1999), Yunanistan, İtalya, İspanya ve Portekiz kıyılarından örneklediği doğal ve kültür çipura balıklarında allozim, mikrosatellit ve mtDNA üzerinden yaptığı karşılaştırmada kültür stoklarında genetik varyasyonun az da olsa düştüğünü belirtmiş fakat Akdeniz ve Adriyatik örnekleri arasında herhangi bir coğrafik genetik heterojenlik bulunmadığını bildirmiştir. Paralel olarak bizim sonuçlarımızda da Akdeniz içerisindeki dağılımda herhangi bir genetik alt dal oluşumu gözlenmemiştir. Bulguları, çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Rossi vd. (2006), İtalya kıyılarındaki çipura balıklarının genetik yapılarını incelemek üzere allozim analizi ile gerçekleştirdikleri çalışmada örnekler arasında genetik farklılaşmaya yönelik bulgular elde etmiş fakat bunun oldukça düşük düzeyde kaldığını belirtmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar ışığında söz konusu örnekleme istasyonlarında temsil edilen stoklar arasında önemli bir genetik farklılık olmadığı görülmüştür. Kültür stokları bazında bu zaten beklenen bir sonuçtur çünkü ülkemizdeki kuluçka ve yavru üretim modeline bakıldığında kuluçkahanelerin belli bölgelerde toplandığı ve diğer birçok çiftliğin buralardan satın aldığı yavruları büyütme yoluna gittiği bilinmektedir. Dolayısıyla kültür balıklarını aslında tek bir populasyon olarak değerlendirmek yanlış olmayacaktır. Her ne kadar tür içi genetik varyasyon sınırlarını aşmıyor olsa da bazı istasyonlarda kültür populasyonunu temsil eden bireylerde gözlenen küçük farklılıklar, ülkemizdeki yavru ihtiyacını karşılamak üzere her yıl çok miktarda yavru ithalatı yapıldığını düşündüğümüzde oldukça normaldir.

Akdeniz'in kapalı coğrafik yapısı göz önüne alındığında doğal örnekler arasında belirgin bir fark olmayışı da normaldir. Ayrıca, yetiştiricilik faaliyet alanlarına göre seçilen örnekleme istasyonları yakın bölgelerdedir. Ülkemiz kıyılarında bulunan doğal çipura populasyonlarında herhangi bir alt tür ayrımı ya da genetik farklılık konusunda daha önce yayınlanmış herhangi bir veri de bulunmamaktadır.

Doğal stoklar ile kültür stoklarının da genetik olarak ayrılmıyor olması iki şekilde açıklanabilir. Ülkemizde 1980'li yıllarda başlayıp günümüze kadar gelen çipura yetiştiriciliği faaliyetlerinin tarihine baktığımızda önceleri doğadan yavru yakalamaya dayalı üretimin daha sonra damızlık stokları oluşturarak kuluçkahanelerde yavru yetiştirilmesi ilkesine döndüğü görülmektedir. Söz konusu damızlık stokları kıyılarımızda bulunan doğal stoklara ait bireylerle oluşturulmuştur. Dolayısıyla çiftliklerdeki damızlık yönetimi uygulamalarında sahip olunan gen havuzunun değişmesine yol açacak uygulamalarda bulunulmadığı söylenebilir.

İkinci olarak da kafes yetiştiriciliği sistemlerinde balıkların çeşitli nedenlerde kaçarak doğaya karıştığı bilinen ve dünya genelindeki tüm balık çiftliklerinde yaşanan bir durumdur. Dolayısıyla bu balıkların doğal populasyonlara karışması ya da kıyılarımızda yeni topluluklar oluşturmaları neticesinde örnek gruplarına dâhil olma ihtimalleri de bulunmaktadır. Nitekim bazı örnekleme istasyonlarında doğal balıkları temsil eden bireylerde gözlenen sonuçlar bu olasılığı desteklemektedir.

Kültür ve doğal populasyonlar arasında farklılık bulunmamış olması, üzerinde durulması gereken bir husustur. Doğal stoklar üzerindeki araştırmanın genişletilmesi ve çiftliklerdeki balık stoklarının bunlar üzerindeki etkilerinin detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Bütün dünyada önemle üzerinde durulan bu tip etkiler, biyoçeşitliliğin korunması bakımından yakın takibe alınmalıdır. Elde ettiğimiz bulgular, bu konuda Türkiye denizleri için bir çıkış noktası olacaktır.

Çipura balıklarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında gen-enzim sistemleri, AFLP ve mtDNA analizleri ile ilgili çeşitli araştırmalara rastlanmaktadır. Bugüne kadar yaklaşık 25 mikrosatelit lokus tanımlanmış ve yüzlerce moleküler marker ile çalışmalar yapılmıştır (Launey vd. 2003, Brown vd. 2005). Araştırmaların sonuçları karşılaştırıldığında genetik varyasyon ve alt tür ayrımları konusunda oldukça farklı ve çelişen sonuçlar gözlenebilmektedir. Marine Genomics Europe (MGE) (marine-genomics-europe.org 2009) ve Aquafirst (aquafirst.vitamib.com 2009) gibi projelerle çipura balıklarının tüm genomik yapıları ortaya konulmaya çalışılmaktadır fakat genel olarak bakıldığında mtDNA dizilerinin analizleri ile yapılan çalışmaların son derece az olduğu görülmektedir. Bu çalışmanın kurgulanmasında göz önünde bulundurulan faktörlerden önemli bir tanesi de bu alandaki eksikliğe gidermeye yönelik katkı sağlanabilmesi olmuştur.

Yine de çok kesin yargılarda bulunmak için denizlerimizde bulunan çipura balıklarına ilişkin mevcut genetik veriler yeterli değildir. Özellikle DNA dizi analizleri üzerinde yoğunlaşılması ve mitokondriyal genomun tümüyle sekanslanması, çipura genom projesinin tamamlanması, tekli nükleotid polimorfizmi (SNP) analizleri ve haplotiplerin

tespiti ile çok daha net yorumlar yapmak ve mevcut şüpheleri tamamen ortadan kaldıracak yorumlar yapmak mümkün olabilecektir.

Elde edilen veriler, çipura yetiştiriciliği için büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmaların, çiftlik koşullarında balıkların yaşama, büyüme ve yem değerlendirme performansını artırmaya yönelik uygulamalar üzerinde yoğunlaştığı açıkça görülmektedir. Ortaya koymuş olduğumuz sonuçlar, bu alanlarda yapılacak çalışmaların ele alınışı ve planlanmasında katkı sağlayabileceği gibi, damızlık yönetim planlarının oluşturulması ve geliştirilmesinde önemli bir çıkış noktası olacaktır. Damızlık stoklarını gençleştirme veya yenileme ya da kan tazeleme gibi uygulamalarda bunun göz önünde bulundurulması, çiftliklerde damızlık yönetiminden sorumlu personele kolaylık ve katkı sağlayacaktır.

Çipura, su ürünleri sektörü ve doğal ekosistem açısından son derece önemli bir balık türüdür. Bu çalışmayla, Türkiye kıyılarındaki doğal ve kültür çipura balıklarının filogenetik ilişkileri incelenmiş ve bulgular filogenetik ağaçlar ile ortaya konularak ülkemizde bu balıkların genetik dağılımları hakkındaki çalışmalara büyük katkı sağlanmıştır. Türkiye denizlerinde bulunan çipura balıklarının DNA dizi analizine ilişkin ilk olması ve gelecekteki çalışmalara ışık tutması açısından ortaya konulan sonuçlar oldukça değerlidir.

KAYNAKLAR

Alarcón, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E. and Alvarez, M. C. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture Volume 230, Issues 1-4, 16 February 2004, Pages 65-80.

Alpbaz, A.G. 1996. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları no:20 Bornova İzmir.

Anonim. 2009a. Türkiye İstatistik Kurumu Su Ürünleri İstatistikleri

Anonim. 2009b. Türkiye Fiziki Haritası 2009.http://www.yeniresimler.net/r-haritalar-69-turkiye-fiziki-haritasi-resmi-1089.htmRossi, A. R., Perrone, E. and Sola, L., 2006. Genetic structure of gilthead seabream, *Sparus aurata*, in the Central Mediterranean Sea, Central European journal of Biology. 1 (4) 636-647.

Anonim. 2010. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü resmi web sitesi. http://www.tagem.gov.tr

Anonymous. 2004. Marine Genomics Europe: Implementation of high-throughput genomic approaches to investigate the functioning of marine ecosystems and the biology of marine organisms. Research Project, NoE, CT-2003-505403. http://www.marine-genomics-europe.org.

Anonymous. 2008a. Global Biodiversity Information Facility. http://data.gbif.org/species /13527319/

Anonymous. 2008b. The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf

Anonymous. 2008c. Aquafirst: Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance marker assisted selection in fish and shellfish. Research Project, EU Contribution SSP8-CT-513692. IMBG, Greece. Scientific Responsible: Dr. G. Kotoulas. http://aquafirst.vitamib.com 2008.

Anonymous. 2009a. Aquamaps Web sitesi. Computer Generated Maps for *Sparus aurata* . http://www.aquamaps.org/

Anonymous. 2009b. Dipartimento di Genetica e Microbiologia - Via Ferrata 1, 27100 Pavia Italy. Laboratory of Human Genetics http://ipvgen.unipv.it/docs/projects/pix/ mtDNA.jpg Erişim Tarihi: Aralık 2009.

Anonymous. 2009c. Global biodiversity information facility. www.gbif.net http://data.gbif.org/species/13527319/ http://data.gbif.org/species/13544973/ 30/10/2009

Anonymous. 2009d. Griffith University Ethanol/EDTA/ Sodium Acetate Precipitation Protocol. http://www.griffith.edu.au/science/dna-sequencing-facility/pdf/ethanoledtaso diumacetateprotocol.pdf Erişim Tarihi: Aralık 2009

Anonymous. 2009e. Promega Technical Bulletin Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Instructions for use of products A9280, A9281 AND A9282. printed in USA. Revised 3/09 Part# TB308 http://www.promega.com/tbs/tb308/tb308.pdf

Anonymous. 2009f. Promega Technical Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Instructions for use of products A1120, A1123, A1125 and A1620. printed in USA. Revised 3/09 Part# TM050 http://www.promega.com/tbs/tm050/tm050.pdf

Anonymous. 2010a. DNA Sequencing Service Web sayfası. http://dnasequencing.files.wordpress.com /2007/10/ce_basic.jpg Erişim Tarihi: Ocak 2010.

Anonymous. 2010b. Heredity and Evolution - Evolution and Classification http://www.tutorvista.com/content/science/science-ii/heredity-evolution/evolution-classification.php Erişim Tarihi:Ocak 2010.

Anonymous. 2010c. Multialin Software 2010. http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html 2010

Anonymous. 2010d. The University of Arizona Department of Biochemistry and Molecular Biophysics 2010. Web sayfası. http://www.biochem.arizona.edu

Anonymous. 2010e. JGI Doe Joint Genome Institute web sitesi 2010. DNA Quantification Protocol www.jgi.doe.gov/sequencing/protocols/DNA QuantificationSOP.DOC

Apostolidis, P.A., Mamuris, Z. and Triantaphyllidis, C. 2001. Phylogenetic Relationship Among Four Species of Mullidae (Perciformes) Inferred from DNA Sequences of Mitochondrial Cytochrome b and 16S rRNA Genes. Biochemical Systematics and Ecology. 29:901-909.

Atay, D. ve Bekcan, S. 2000. Deniz Balıkları ve Üretim Tekniği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, Yayın no:1515. Ankara.

Bargelloni, L., Alarcon, J. A., Alvarez, M. C., Penzo, E., Magoulas, A., Reis, C. and Patarnello, T. 2003. Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic–Mediterranean divide, J. EVOL. BIOL., 16, 1149–1158.

Bernatchez, L., Colombani, F. and Dodson, J.J. 1991. Phlyogenetic Relationship among the Subfamily Coregonidae as Revealed by Mitochondrial DNA Restriction Analysis. Journal of Fish Biology. 39 (Supplement A): 283-290.

Bernatchez, L., Guyomard, R. and Bonhomme, F. 1992. DNA Sequence Variation Of The Mitochondrial Control Region Among Geographically And Morphologically

Remote European Brown Trout *Sazmo Tvutta* Populations Molecular Ecology 1: 161-173

Bilgen, G., Akhan, S., Arabaci, M. and Oguz, I. 2007. Genetic Diversity of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Broodstocks as Determined by RAPD-PCR The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 59(4), 217-223.

Brown, R . C., Tsalavouta, M., Terzoglou, V., Magoulas, A. and McAndrew, B. J., 2005. Additional Microsatellites for *Sparus aurata* and Cross-Species Amplification within the Sparidae Family, Molecular Ecology Notes, 5, 605-607.

Can, A. ve Bilecenoğlu, M. 2005. Türkiye Denizleri'nin Dip Balıkları Atlası. Arkadaş Yayınevi, Ankara, 224 s.

Farias, I. P., Ortı´, G., Sampaio, I., Schneider, H. and Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. J Mol Evol. 48:703–711

Freeman, S. and Herron, J. C. 1999. Evrimsel Analiz. (8. Baskıdan çeviri) Çıplak, B., Başıbüyük, H. H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ. (eds), Palme Yayıncılık, Ankara, 2009, 838 s.

Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. 2001. Complete Mitochondrial DNA Sequence of *Conger myriaster* (Teleostei: Anguilliformes): Novel Gene Order for Vertebrate Mitochondrial Genomes and the Phylogenetic Implications for Anguilliform Families. J Mol Evol. 52:311–320

Keskin, E. and Can, A. 2009. Phylogenetic Relationships Among Four Species and a Sub-species of Mullidae (Actinopterygii; Perciformes) Based on Mitochondrial Sitokrom b, 12S rRNA and Sitokrom oksidaz II Genes. Biochem. Syst. Ecol. Doi:10.1016/j.base

Klug W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. 2009. Genetik Kavramlar. (8. Baskıdan çeviri). C. ÖNER, .S. SÜMER, R. ÖNER, A. ÖĞÜŞ, L. AÇIK. (eds.) Palme Yayıncılık , Ankara, 2009.677 s.

Knibb, W. 2000. Genetic Improvement of Marine Fish – Which Method for Industry? Aquaculture Research, 31, 11-23.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 6196–6200.

Launey, S., Krieg, F., Haffray, P., Bruant, J-S., Vannier, A. and Guyomard, R. 2003. Twelve New Microsatellite Markers for Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.): Characterization, Polymorphism and Linkage, Molecular Ecology Notes, 3, 457-459.

Lenzmeier, B.A. 2009. Laboratory Experimental Protocols. http://web.bvu.edu/faculty/lenzmeier/protocolsframe.htm Erişim Tarihi:2009

Magoulas, A., Tsimenides, N. and Zouros, E. 1996. Mitochondrial DNA Phylogeny and the Reconstruction of the Population History of a Species: The Case of the European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Mol. Biol. Evol. 13(1):178-190.

Mamuris, Z., Stamatis, C., Bani, M. and Triantaphyllidis, C. 1999. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA, J. Fish Biol., 55, 572–587.

Noack, K., Zardoya, R. and Meyer, A. 1996. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Bichir *(Polypterus ornutipinnis),* a Basal Ray-Finned Fish: Ancient Establishment of the Consensus Vertebrate Gene Order Genetics 144: 1165-1180.

Orrell, T.M. 2000. A molecular phylogeny of the sparidae (perciformes: percoidei). A Dissertation Presented to The Faculty of the School of Marine Science The College of William and Mary in Virginia. 291 pages.

Palma J., Alarcon J.A., Alvarez C., Zouros E., Magoulas A. and Andrade, J.P. 2001. Developmental stability and genetic heterozygosity in wild and cultured stocks of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). J. Mar. Biol. Ass. U.K., 81: 283-288.

Park, J.Y., Lee, H.J., Kim, W.J., Lee, J.H. and Min, K.S. 2000. Mitochondrial Cytochrome b Sequence variation in Korean Salmonids. Journal of Fish Biology. 56:1145-1154.

Perez-Enriquez, R., Takagi M. and Taniguchi, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers, Aquaculture, 173, 413–423.

Saitou N. and Imanishi, T. 1989. Relative efficienciens of the Ficth-Margoliash, Maximum Parsinomy, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. Mol Biol Evol; 6: 514-525.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74, 5463-7.

Sarmasık, A., Arık Colakoglu, F. and Altun, T. 2008. Mitochondrial DNA Sequence and Body Size Variations in Turkish Sardine (*Sardina pilchardus*) Stocks. Turk. J. Zool. 32:229-237.

Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaiskou, N., Magoulas, A., Rossi, A.R., Rye, M., Triantafyllidis, A. and Tsigenopoulos C.S. 2007. Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. Gilthead sea bream - *Sparus aurata*., In: Svåsand T., Crosetti D., García-Vázquez

E., Verspoor E. (eds). Genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802). http://genimpact.imr.no/ p 47-54.

Summerer, M., Hanel, R. and Sturmbauer, C. 2001. Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of sea breams of the genus Diplodus (Sparidae), Journal of Fish Biology 59, 1638–1652.

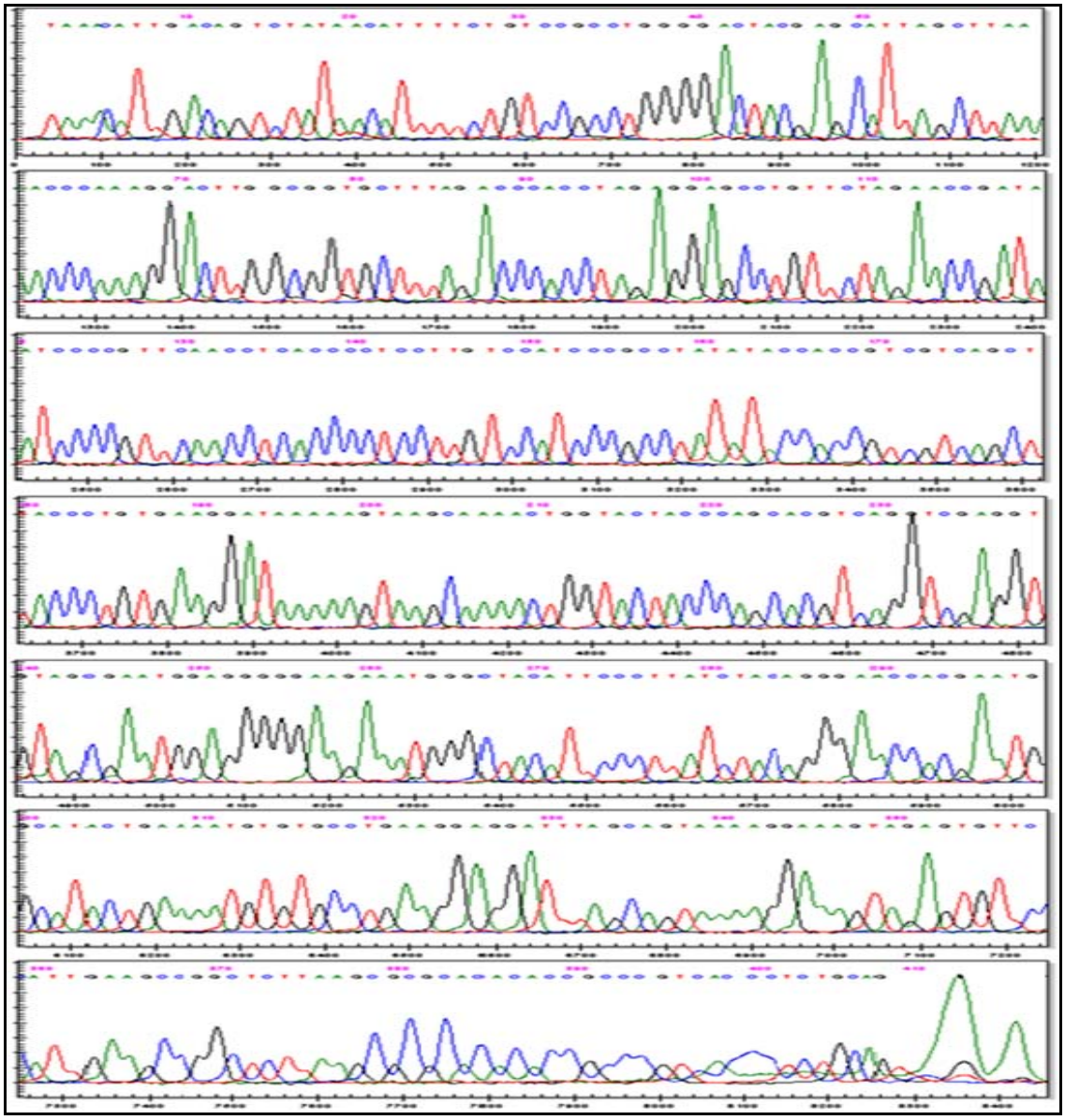
Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) SOFTWARE VERSİON 4.0. Molecular Biology and Evolution, Vol. 24: 1596-1599.

Vierstraete, A. 1999. Principle of the PCR**.** http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

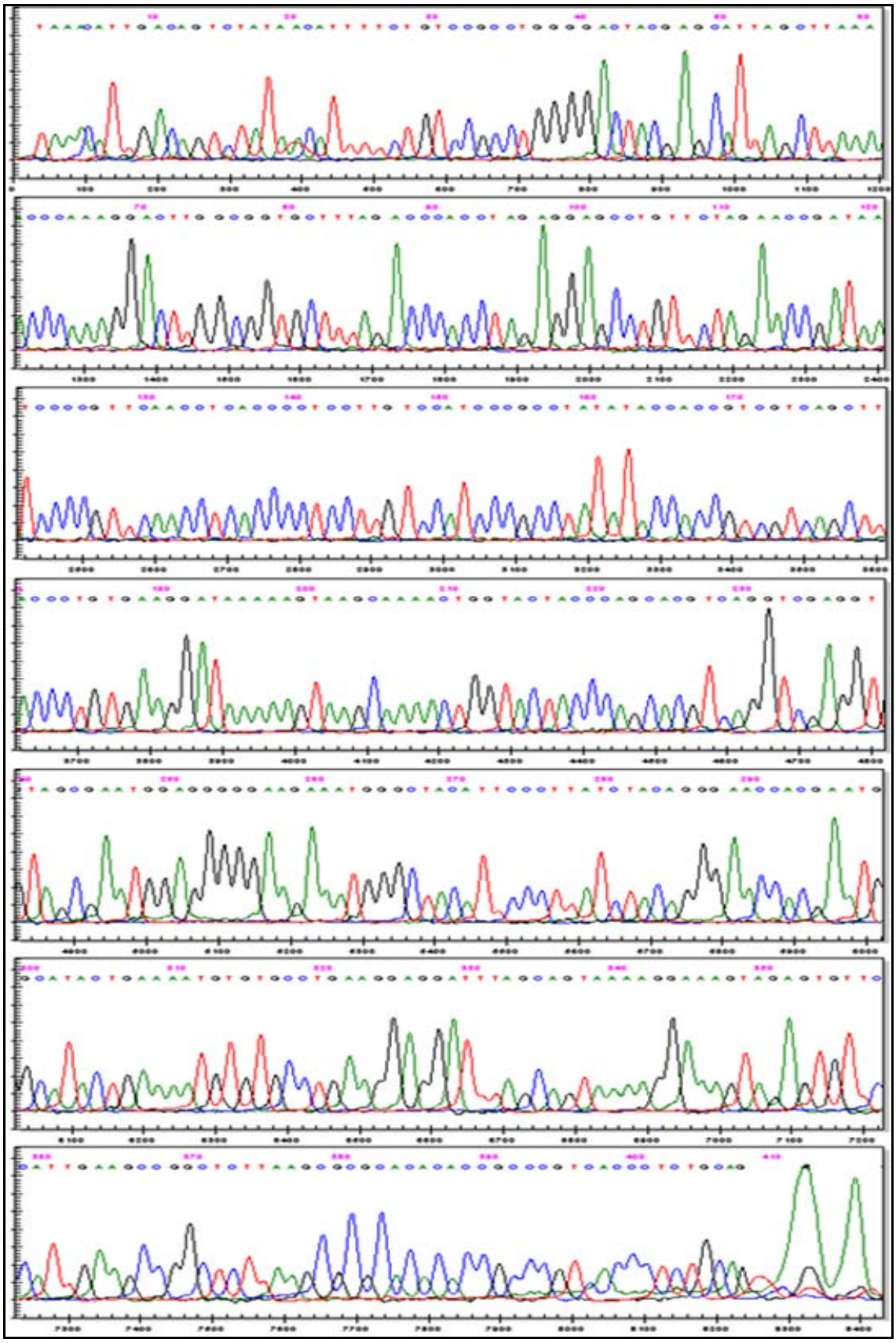
Zouros, E. 1999. A Comprehensive Genetic Study of Cultured and Wild Stocks of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and Genetic Assessment of Several Related Species as Candidates for Aquaculture BBP/FAIP Workshop on Farm Animal Biodiversity Friday, 4 June 1999. Veterinary Faculty, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands 21

EKLER

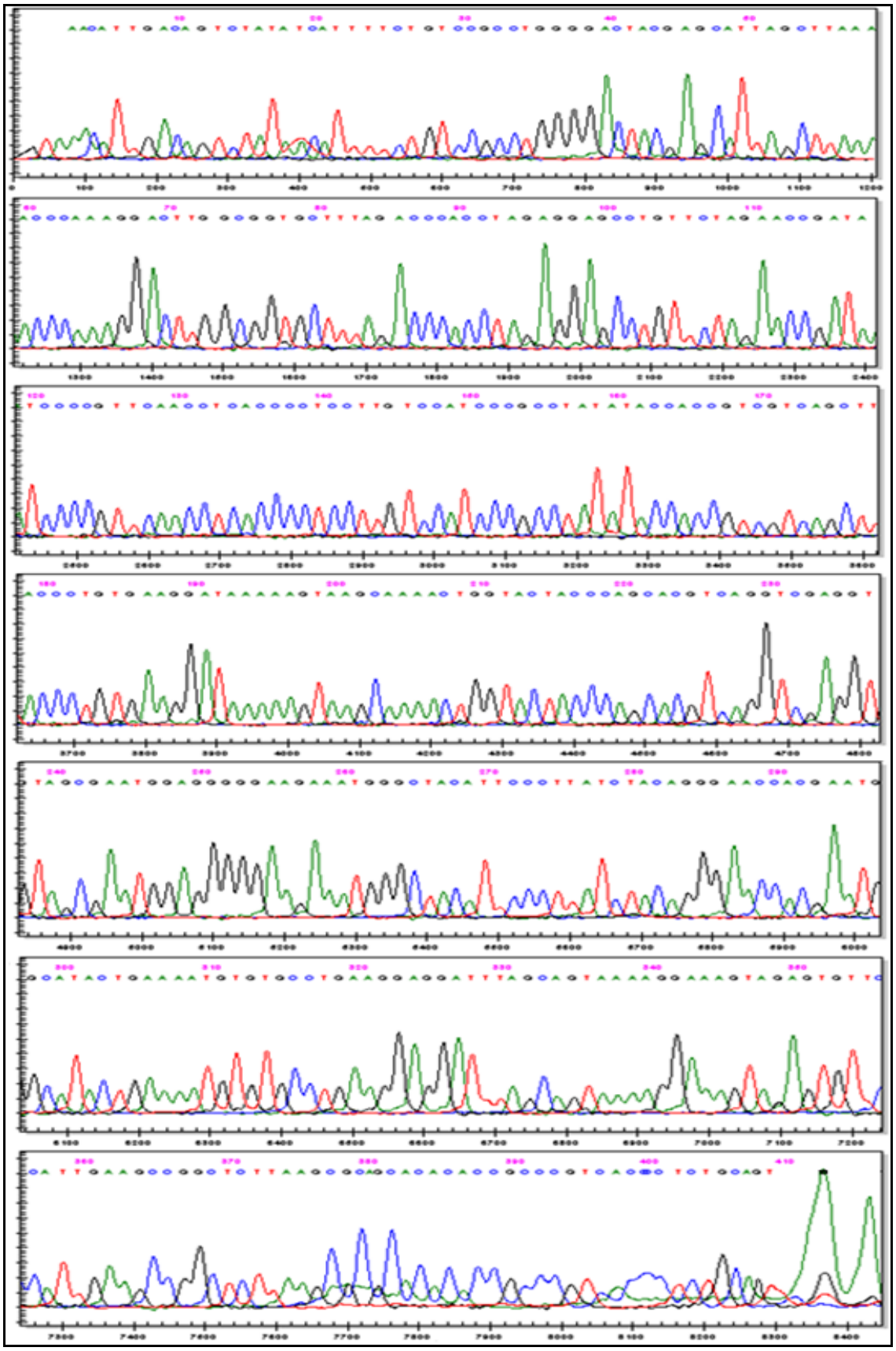
EK 1 Beş farklı istasyondan alınan örneklerin üç farklı gen bölgesinden elde edilen dizilere ait elektroferogramlar



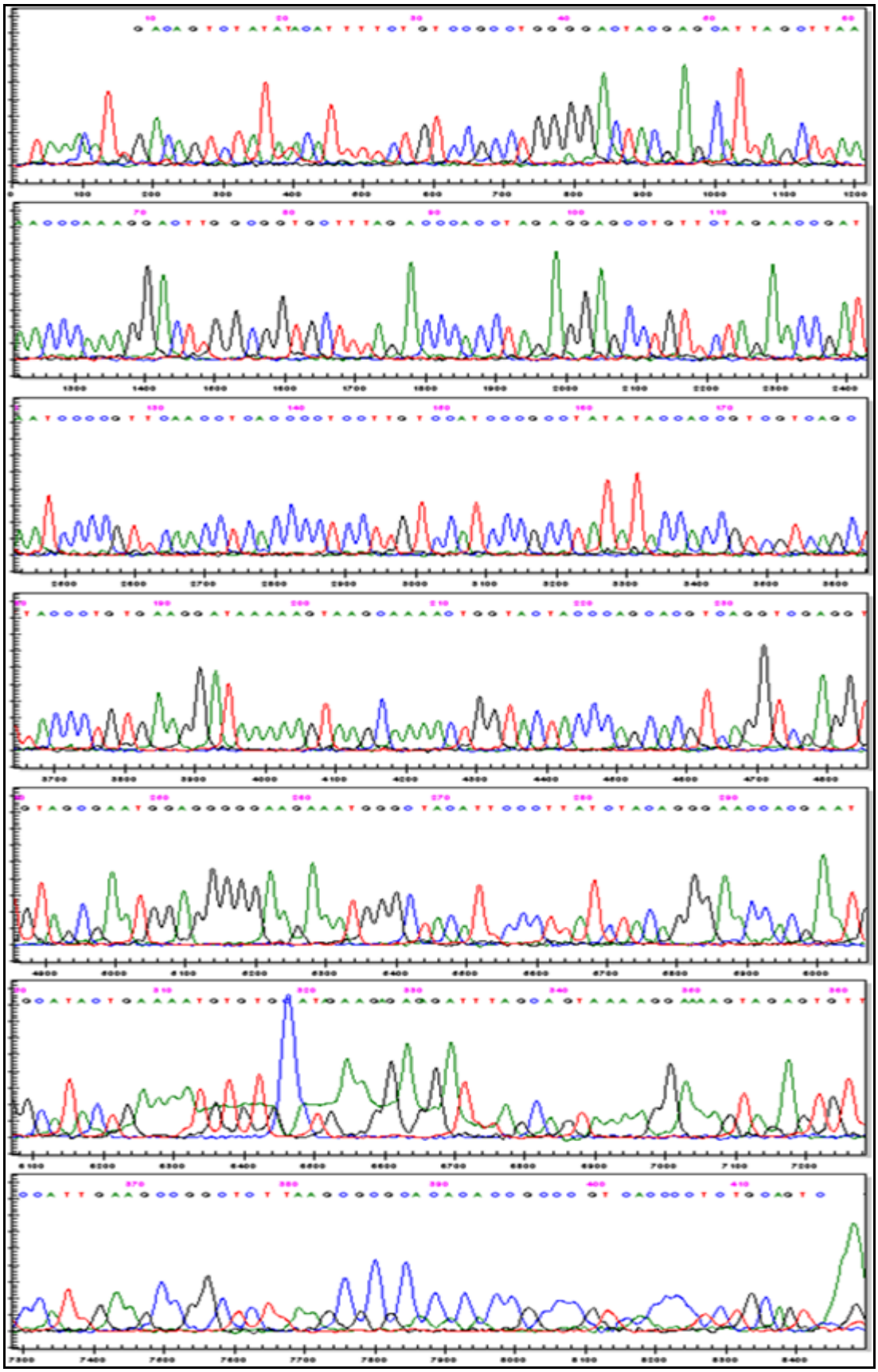
Adana doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



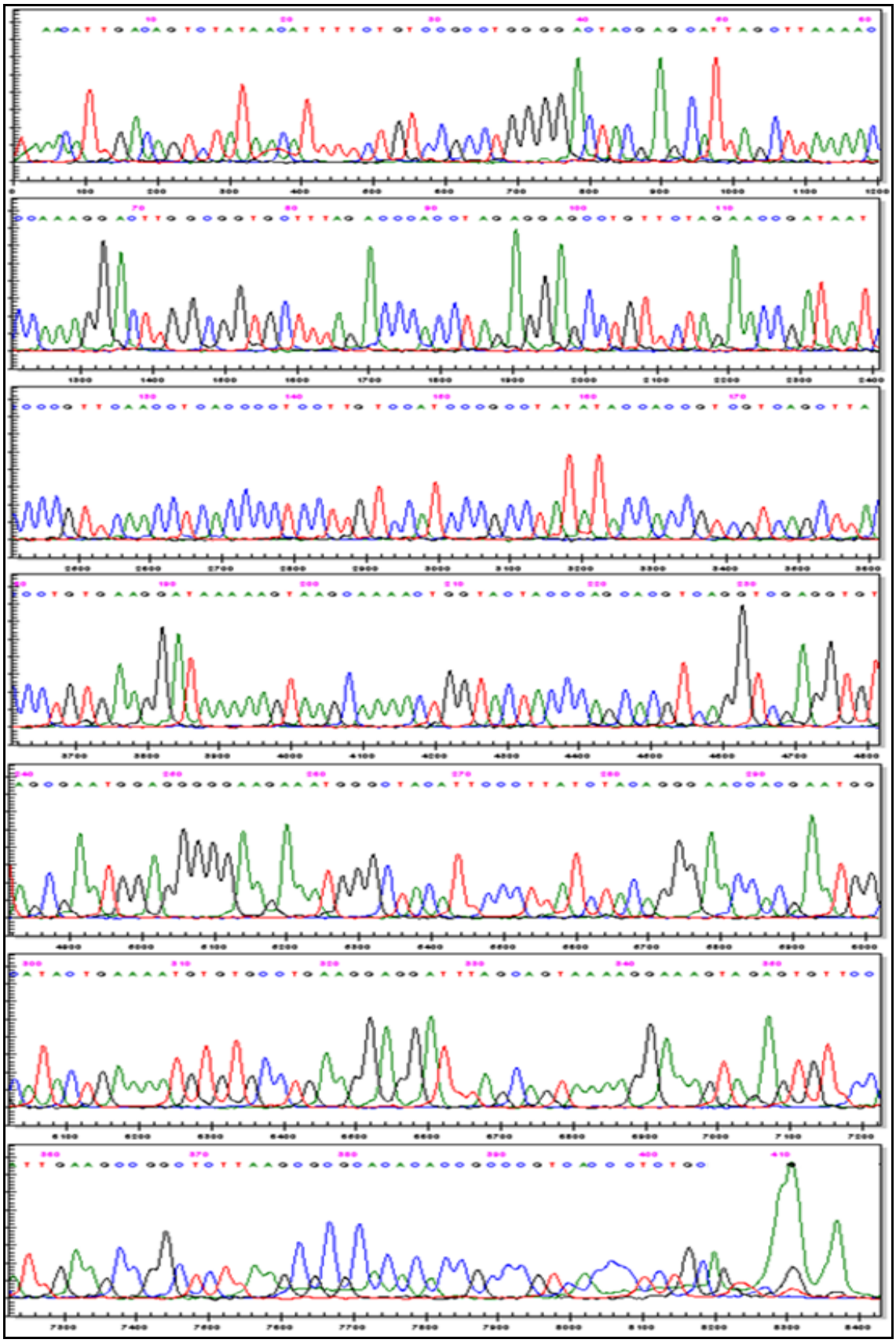
Mersin kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



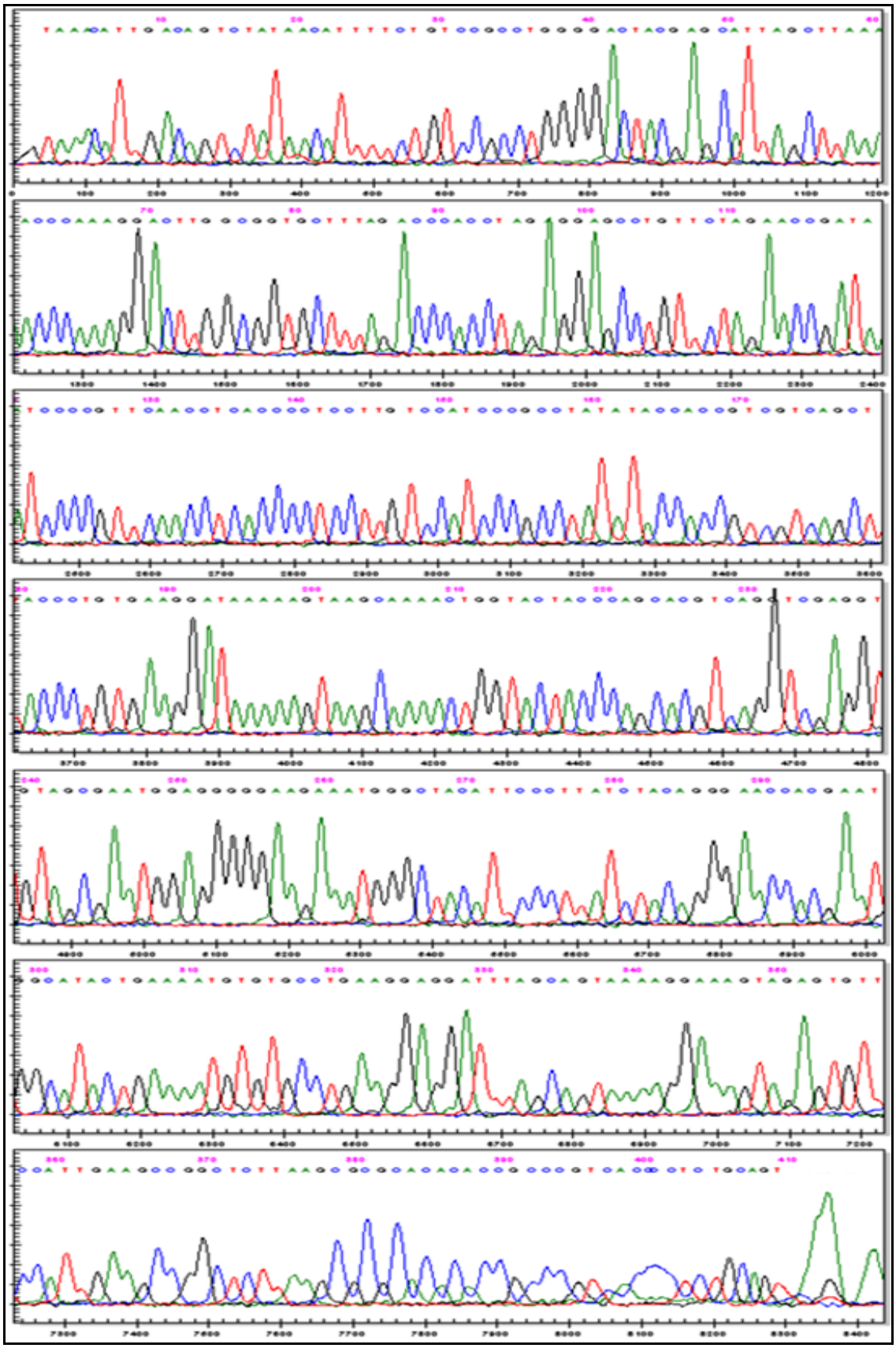
Mersin doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



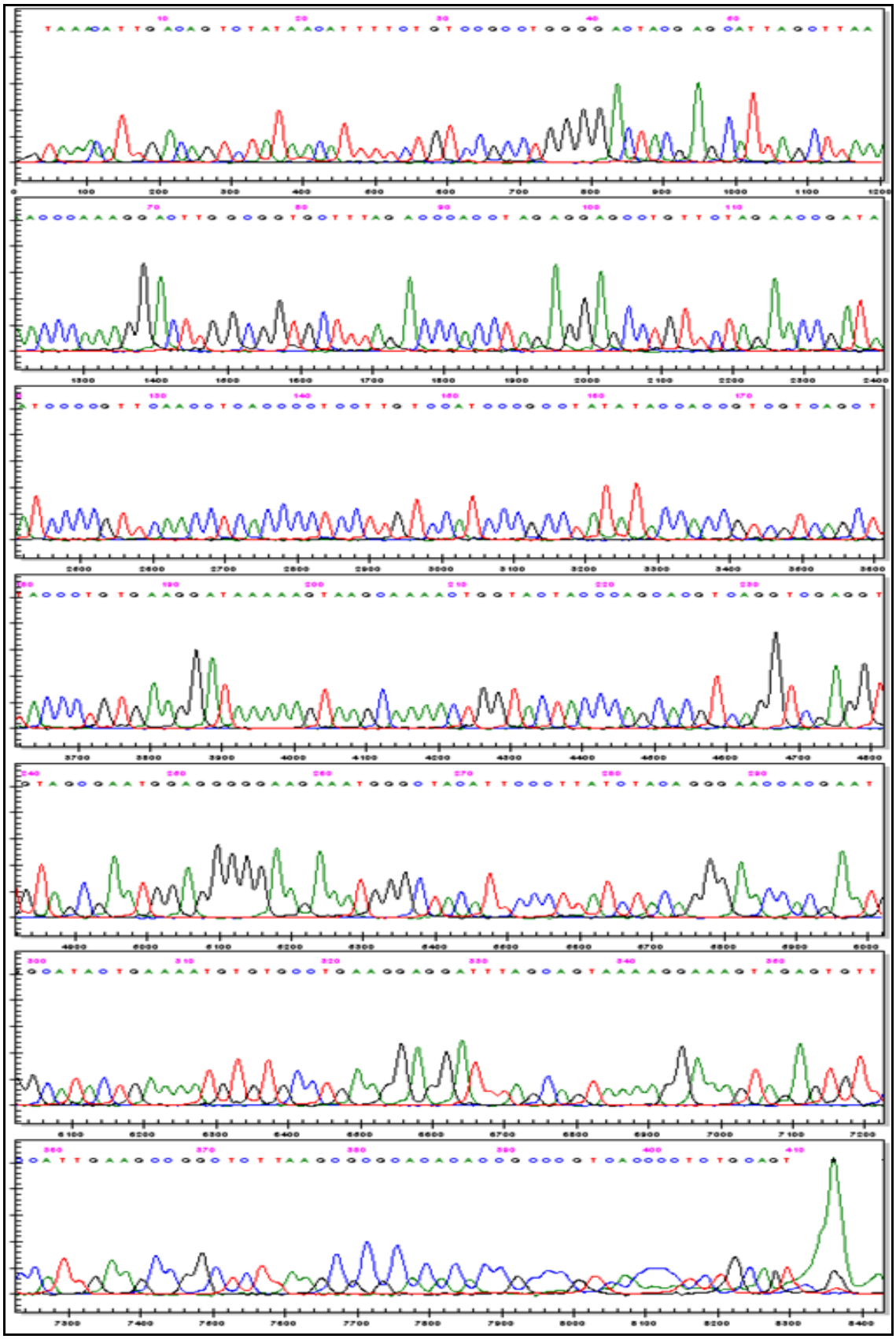
Adana kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



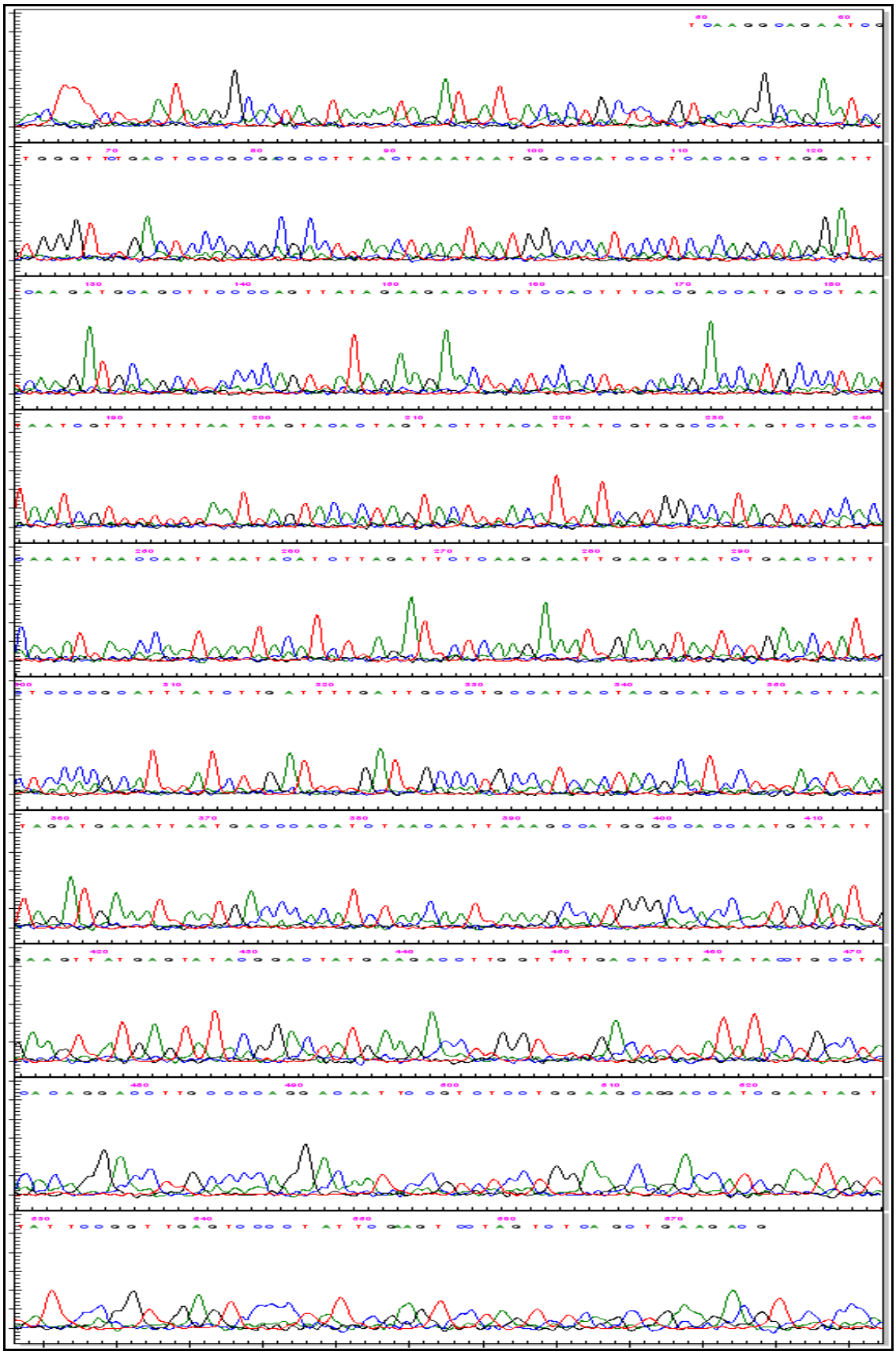
İzmir kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



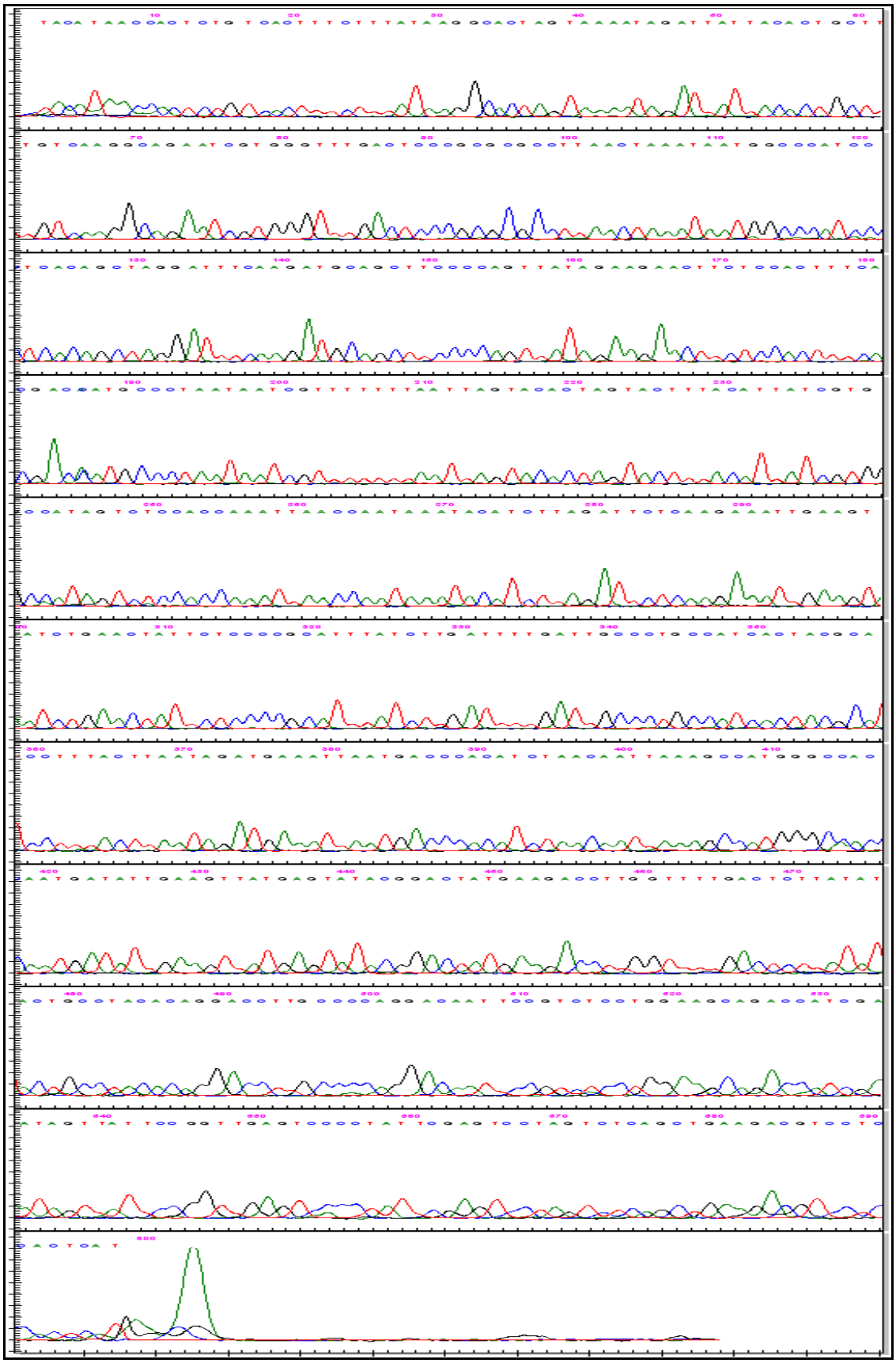
İzmir doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



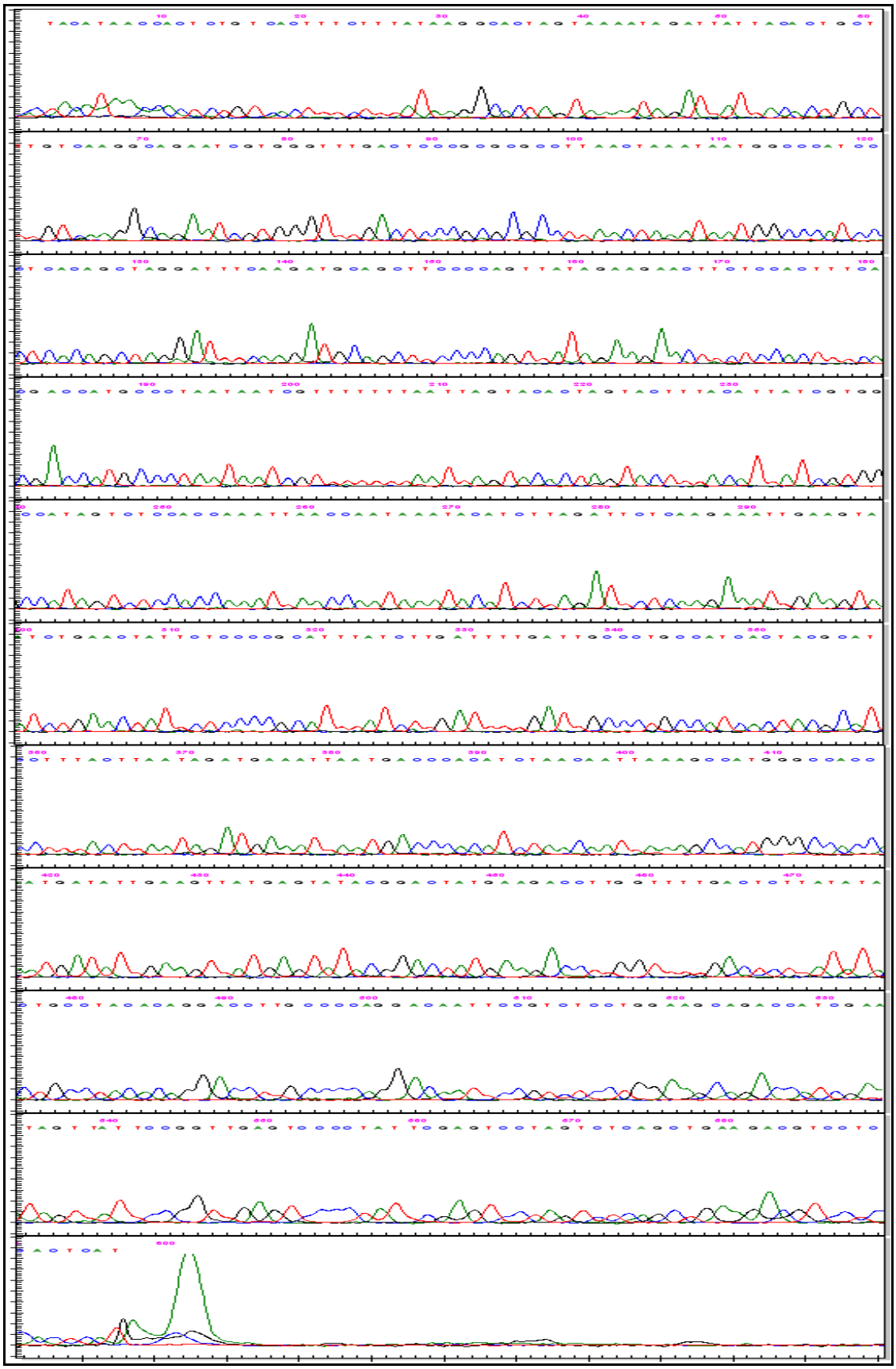
Bodrum doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait elektroferogram



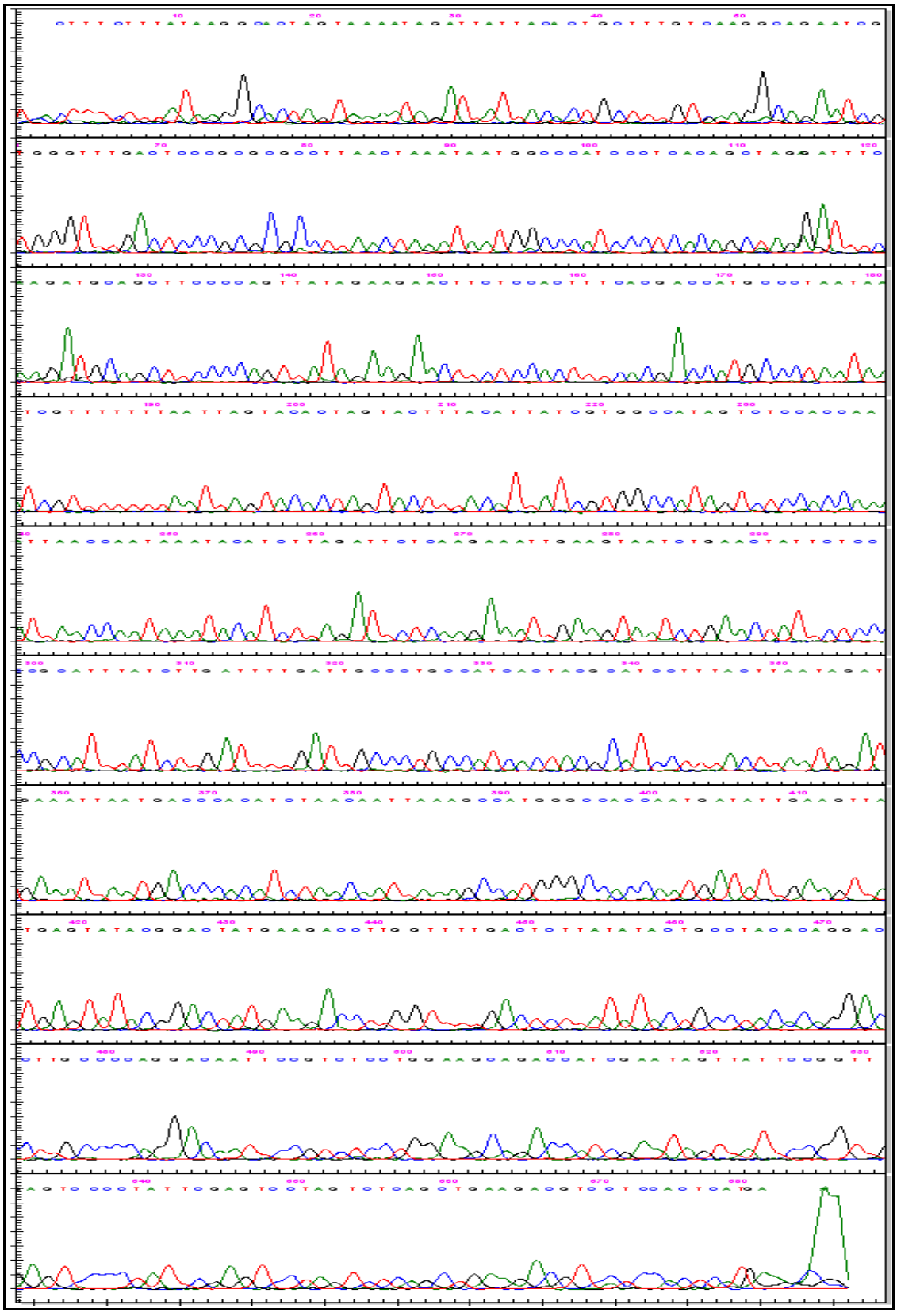
Bodrum kültür çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



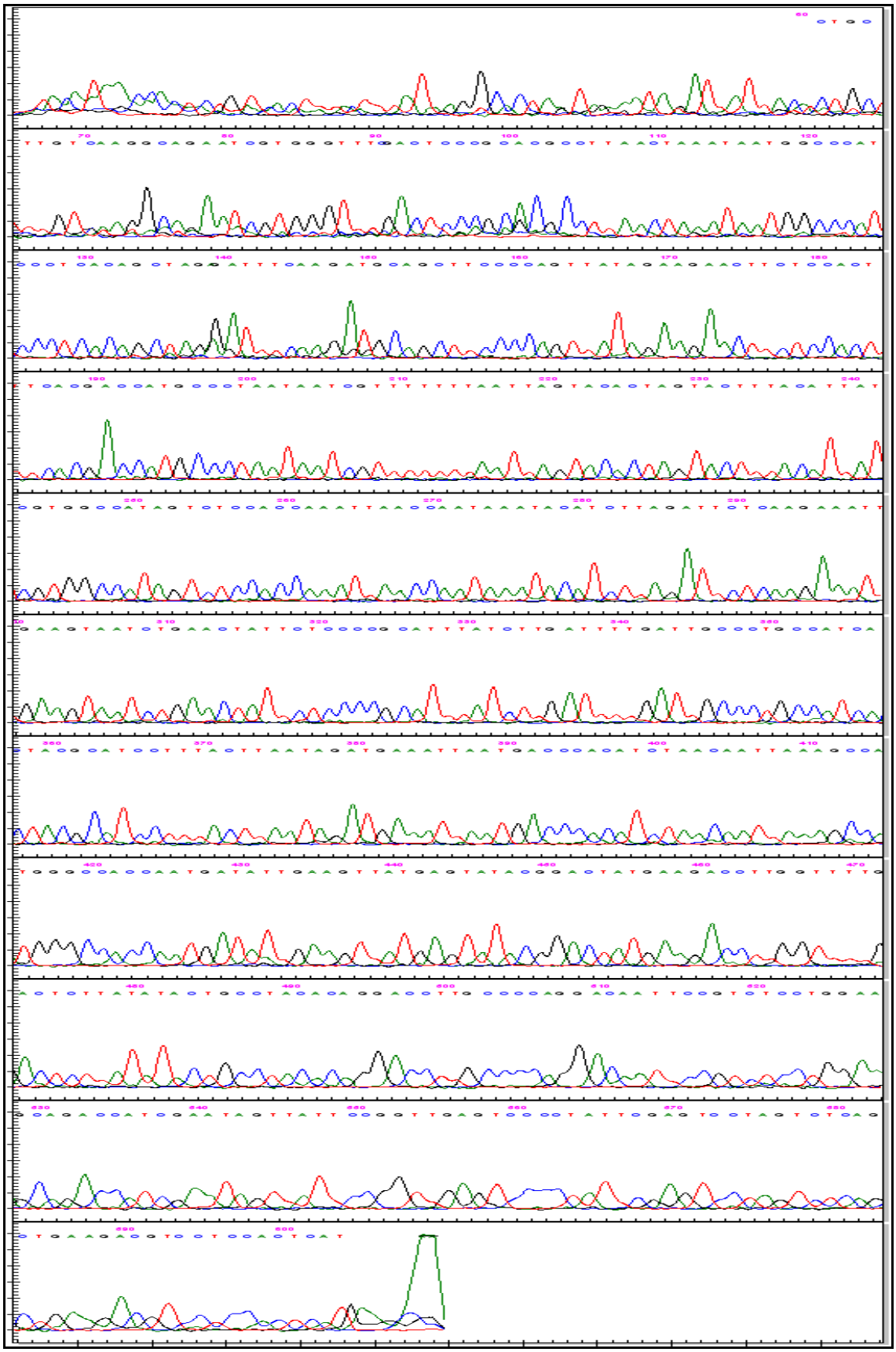
Mersin kültür çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



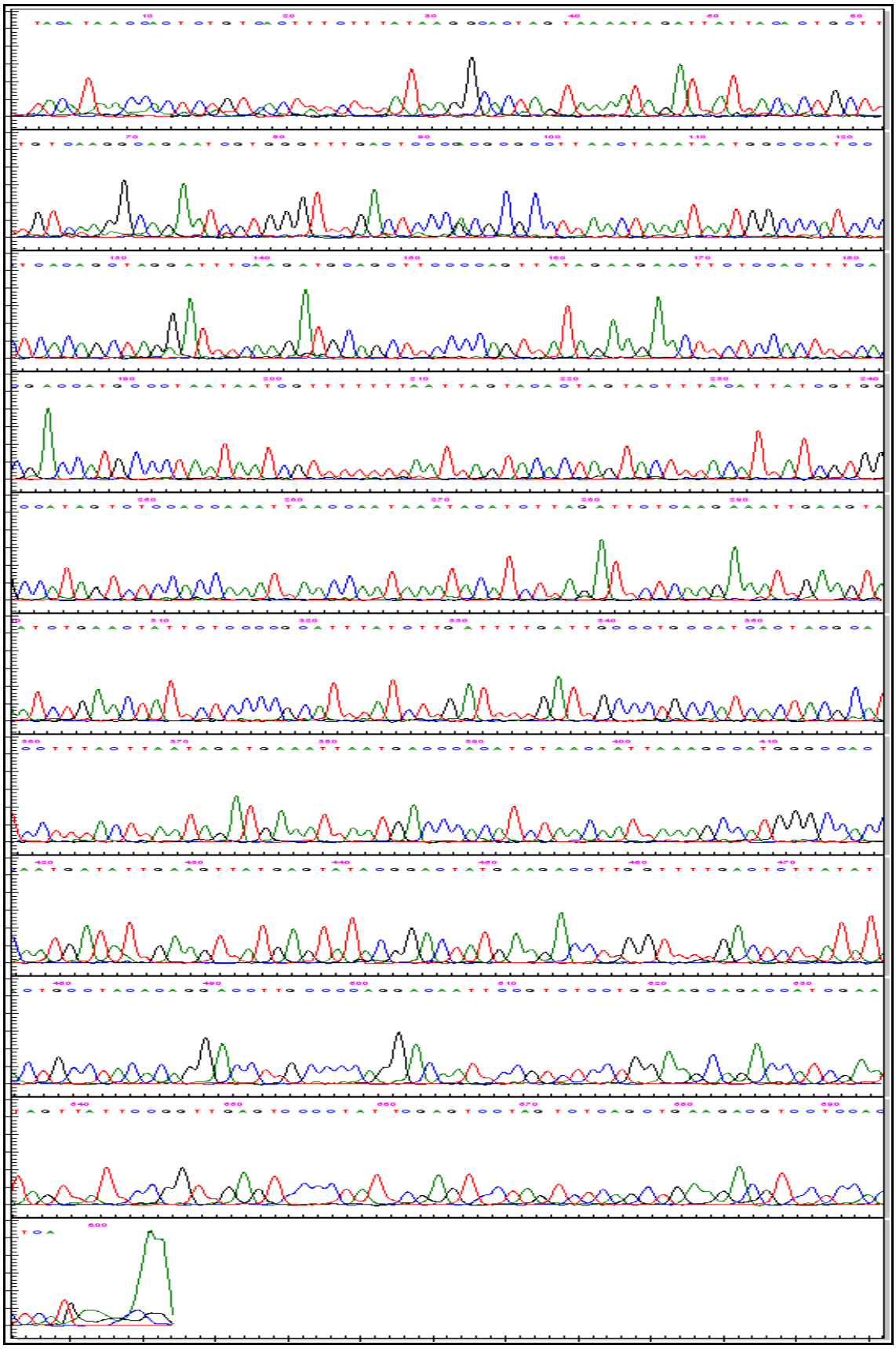
Mersin doğal çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



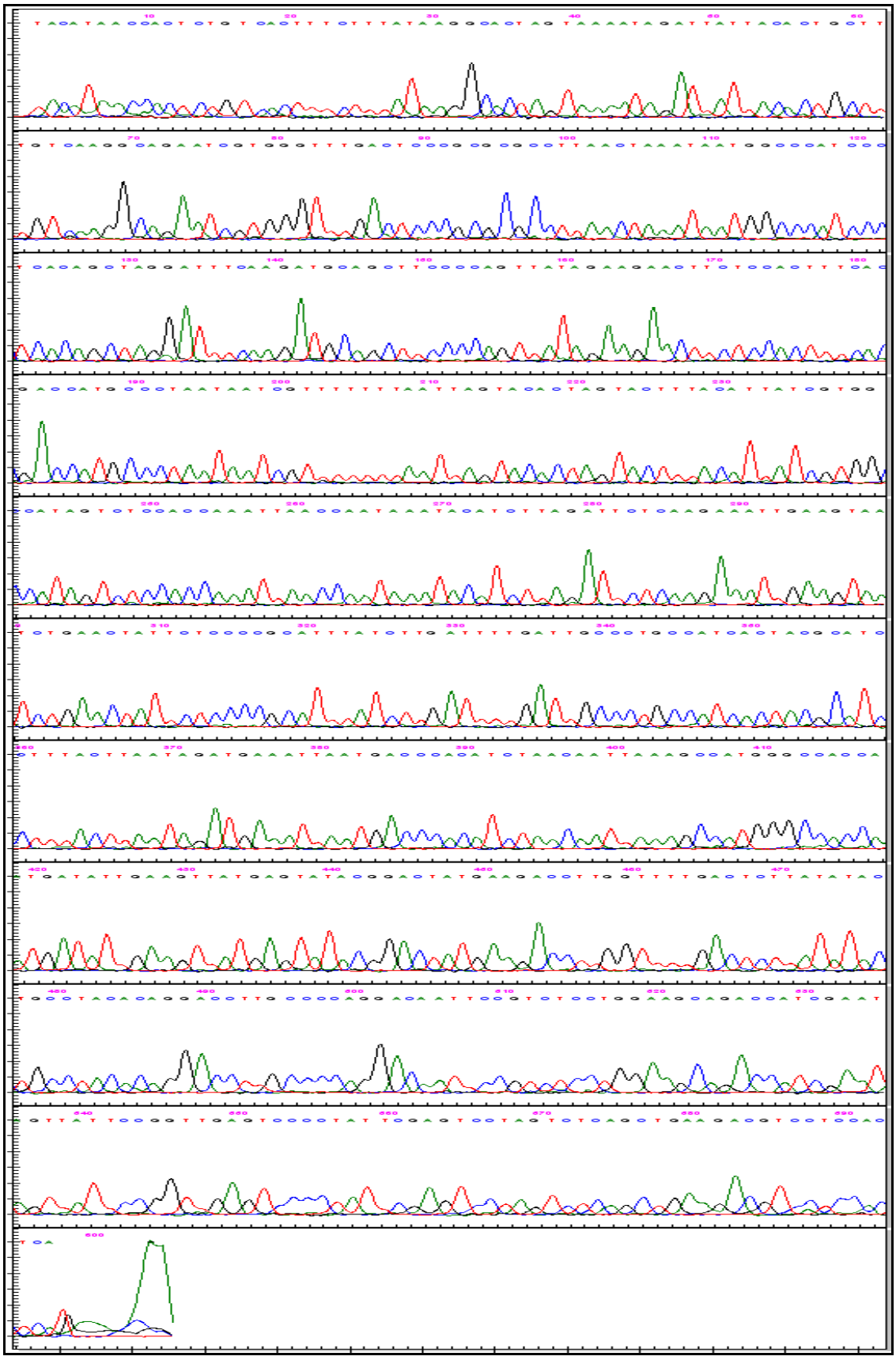
Antalya kültür çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



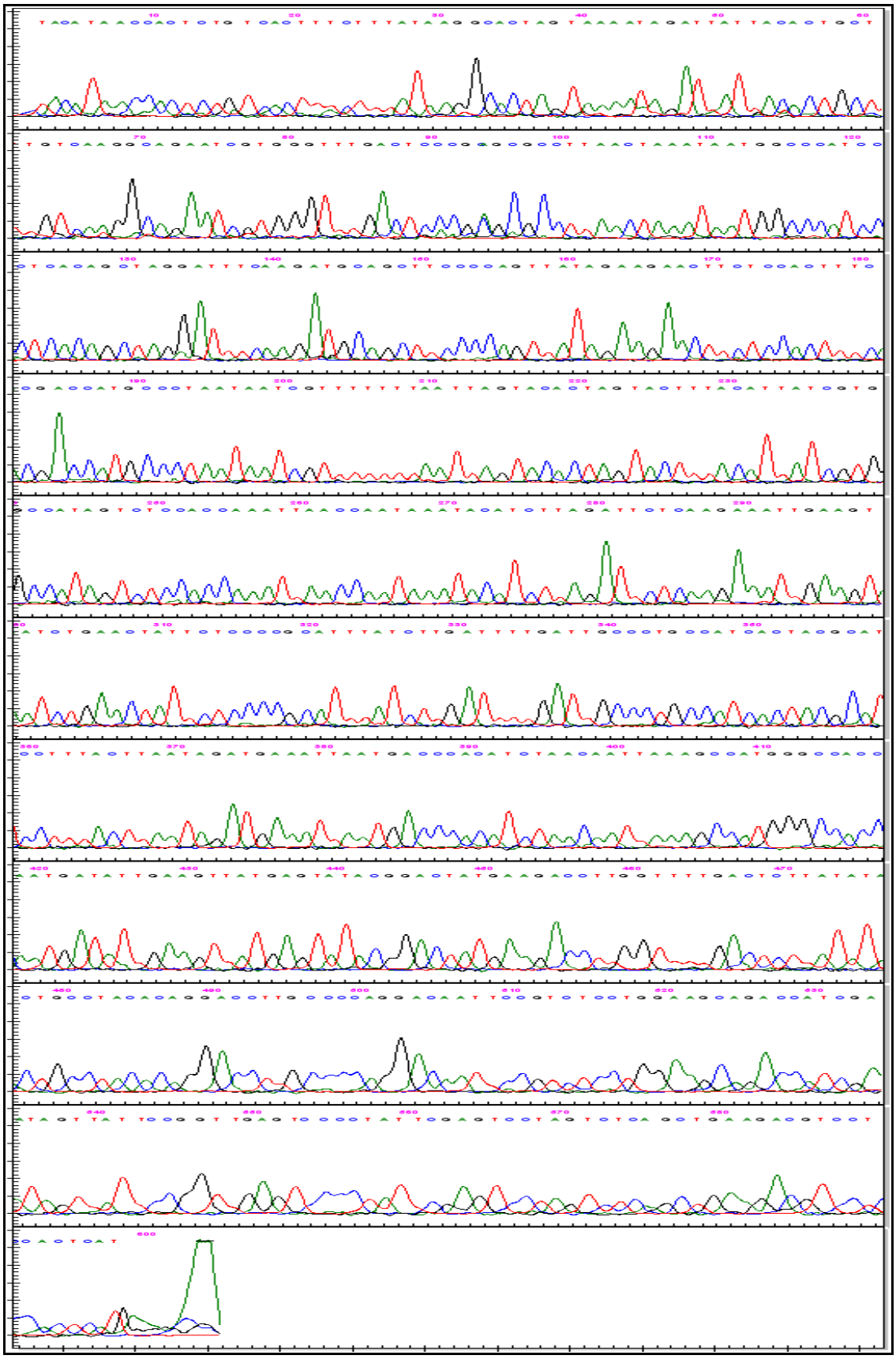
Antalya doğal çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



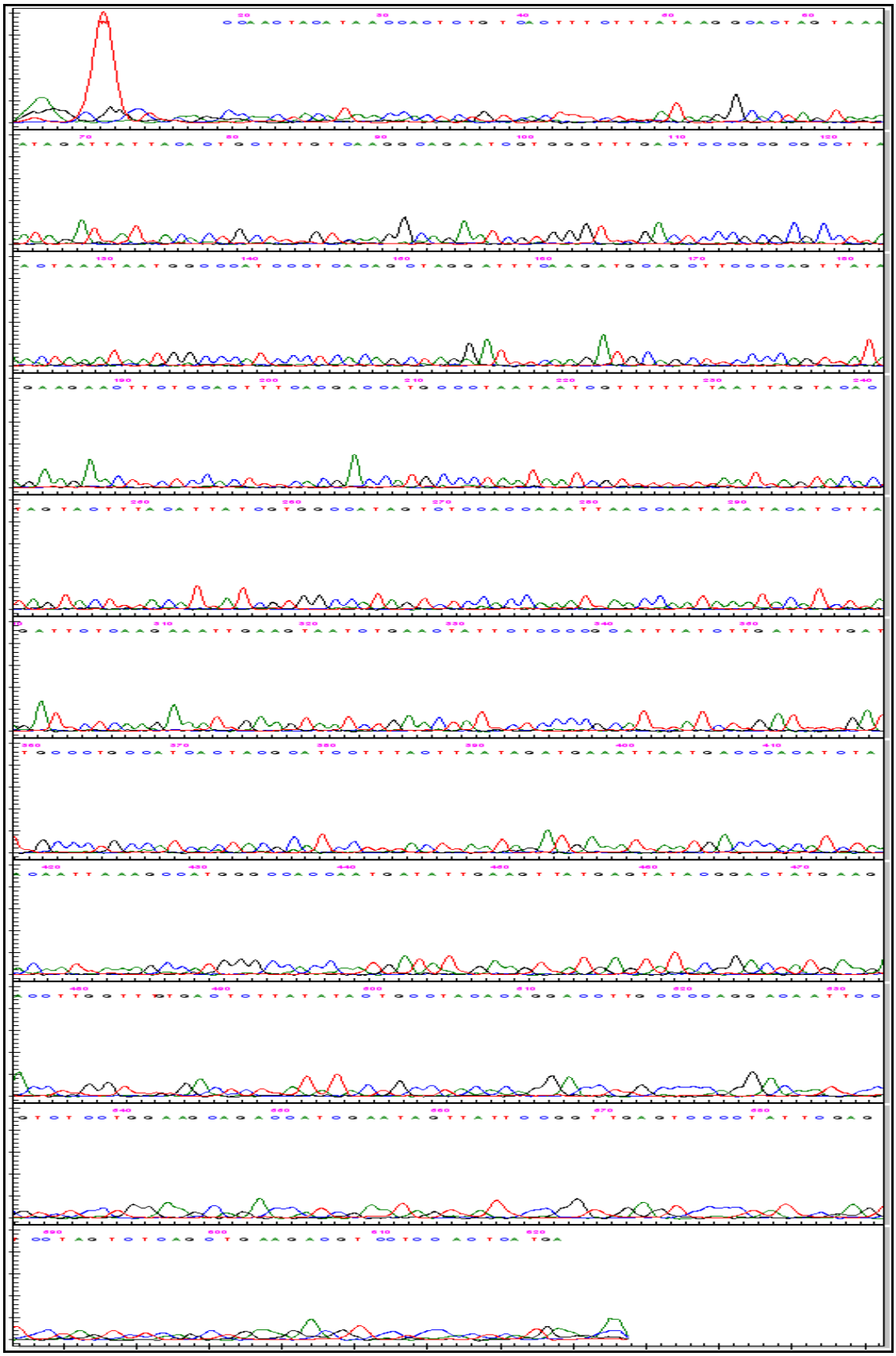
Adana kültür çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



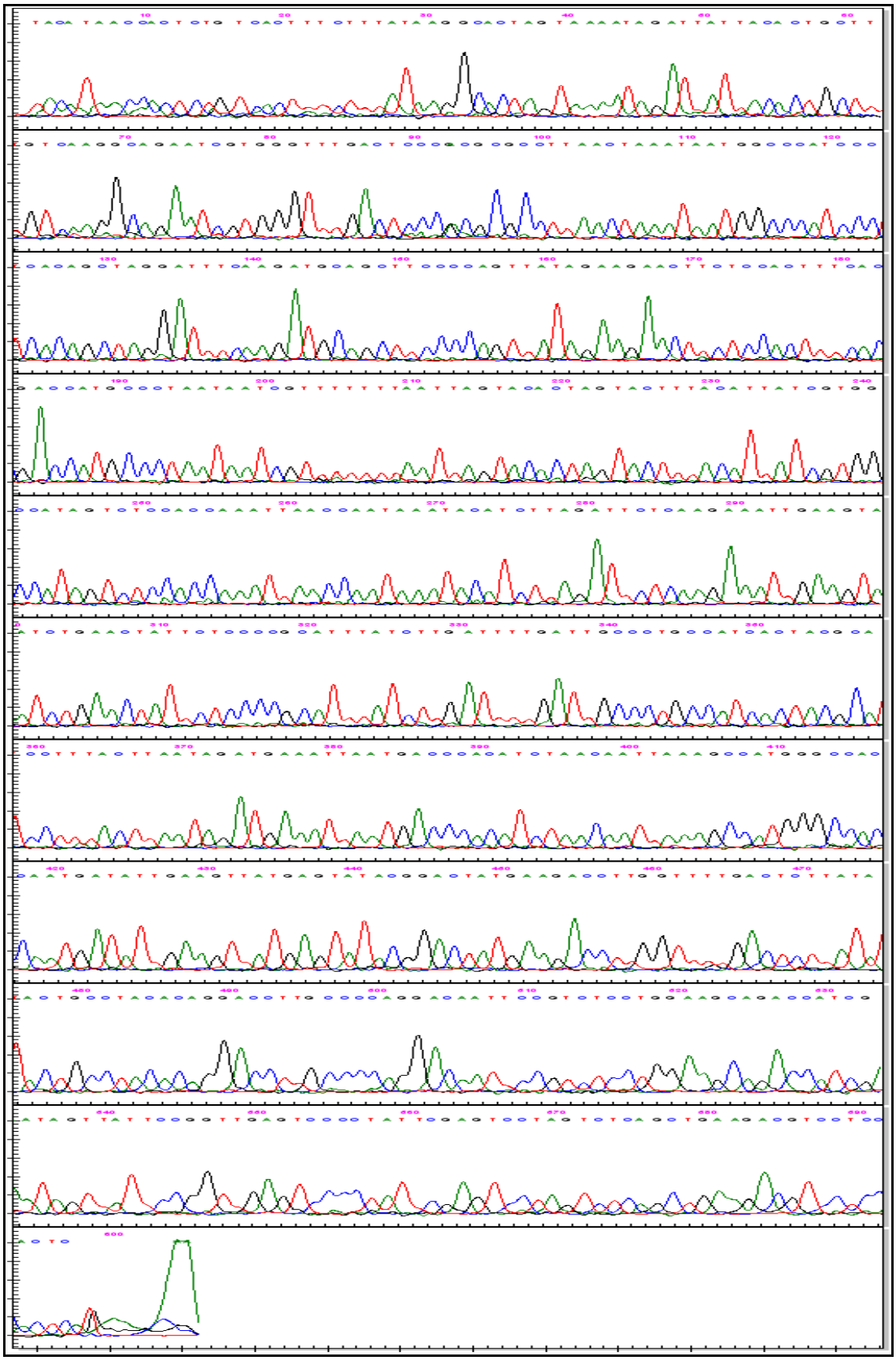
Adana doğal çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



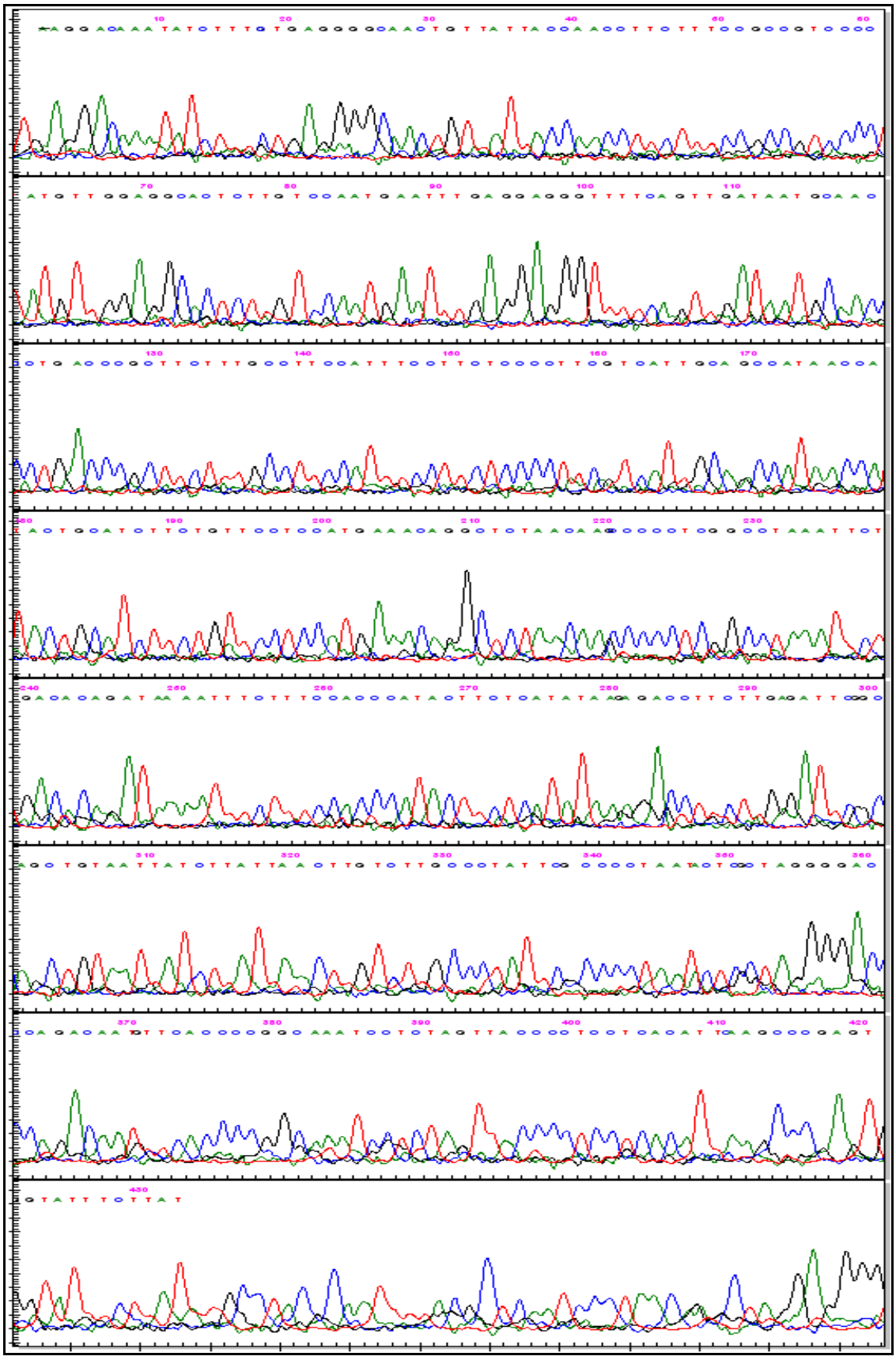
İzmir kültür çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



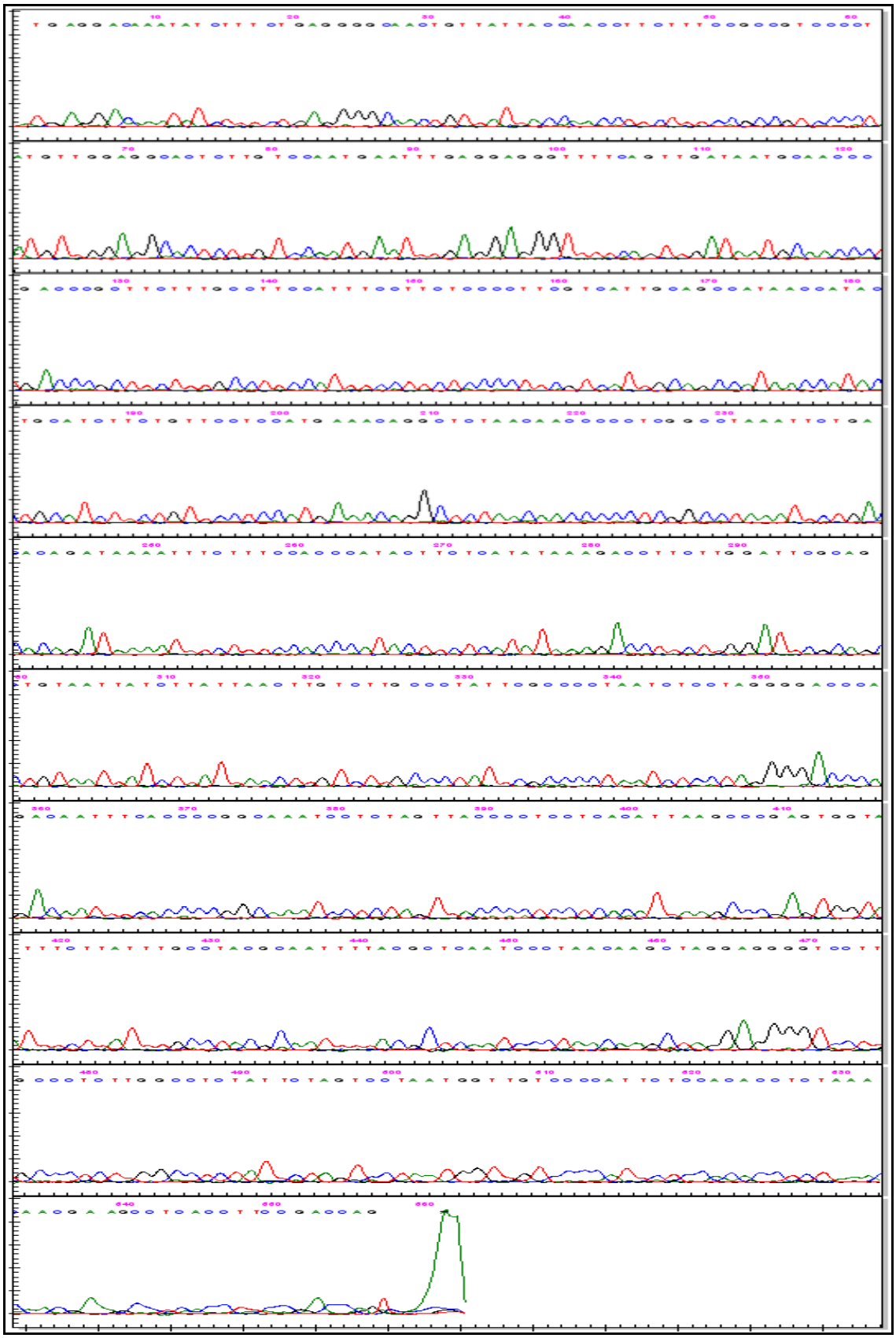
İzmir doğal çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



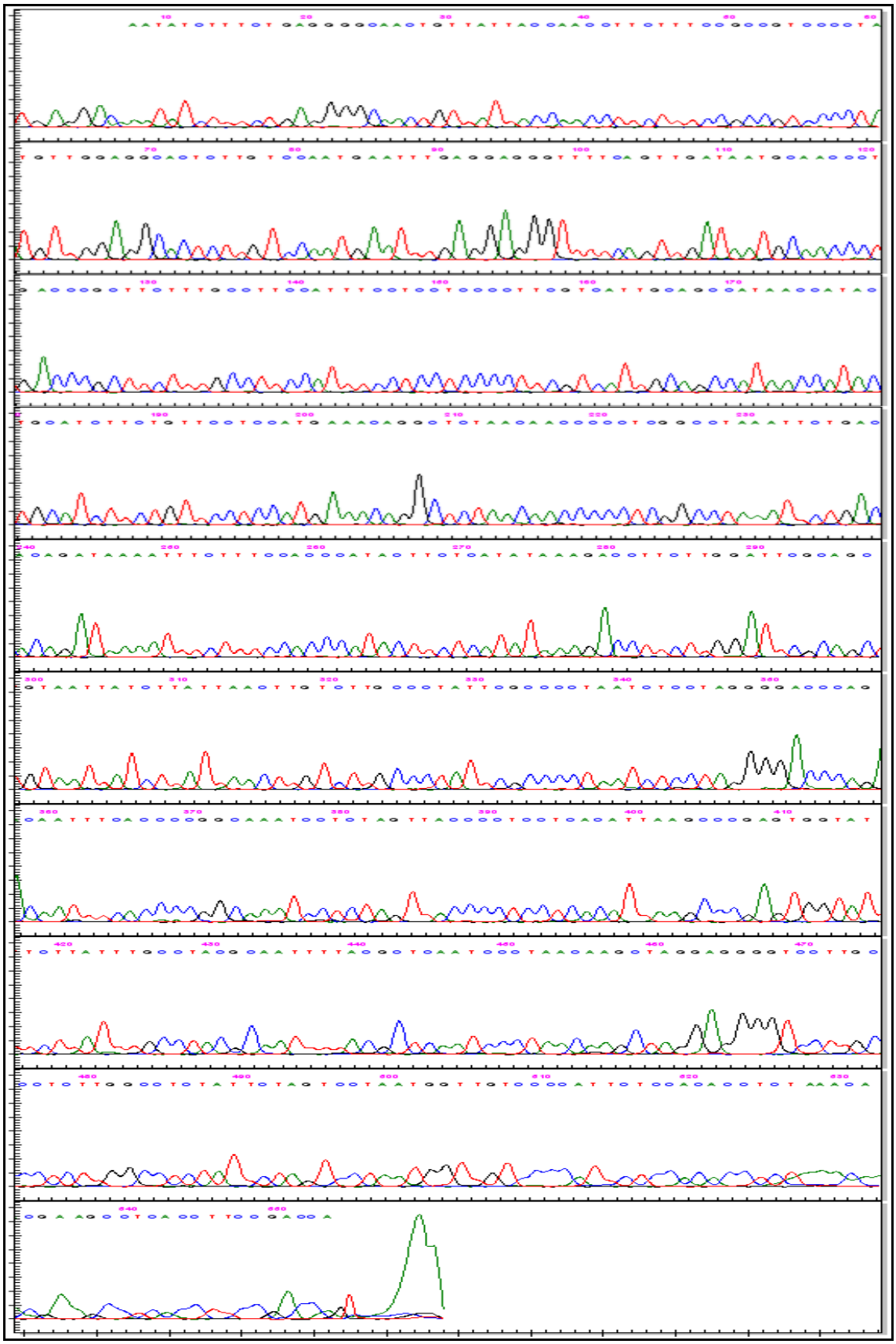
Bodrum doğal çipura Sitokrom oksidaz II gen bölgesine ait elektroferogram



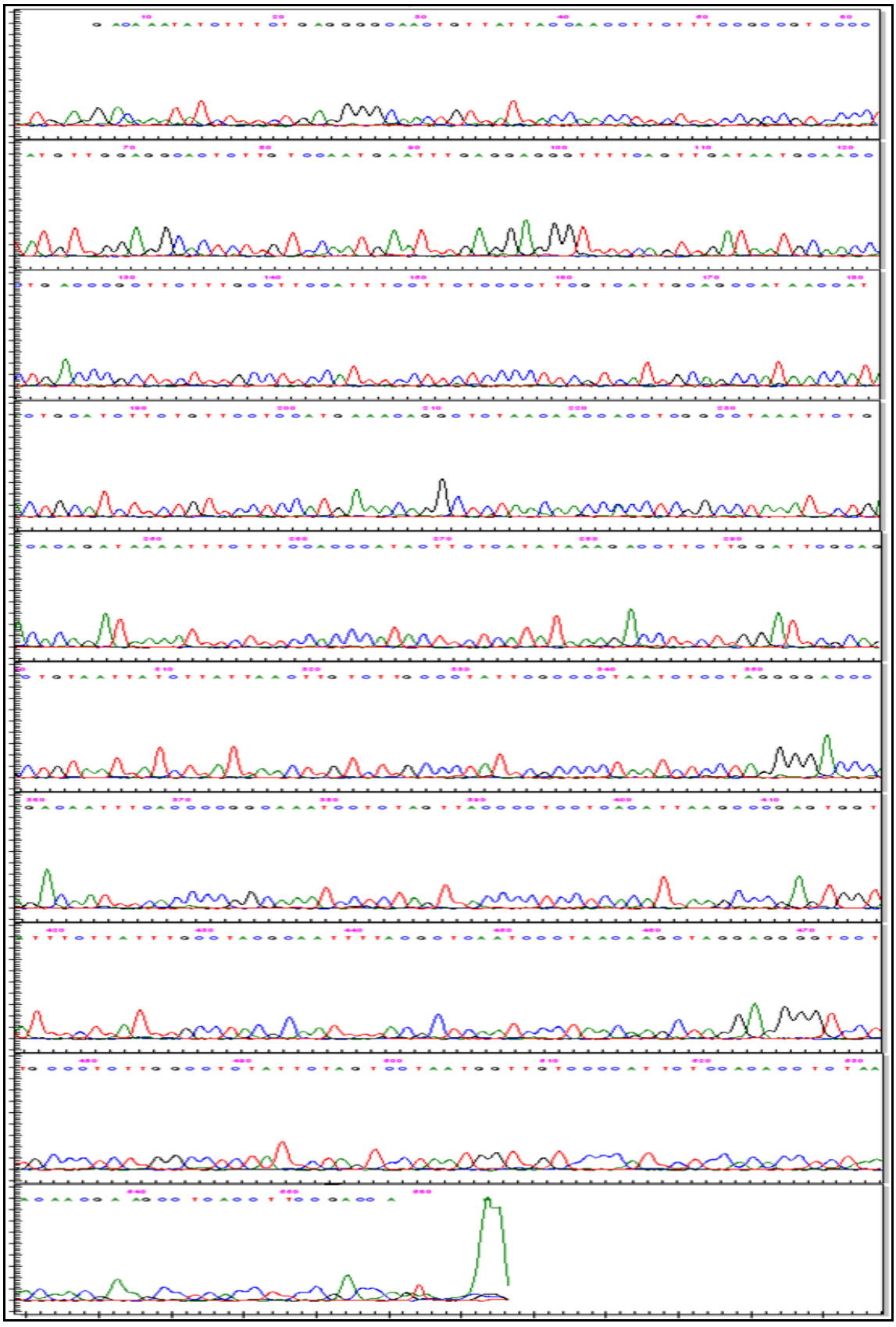
Bodrum kültür çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



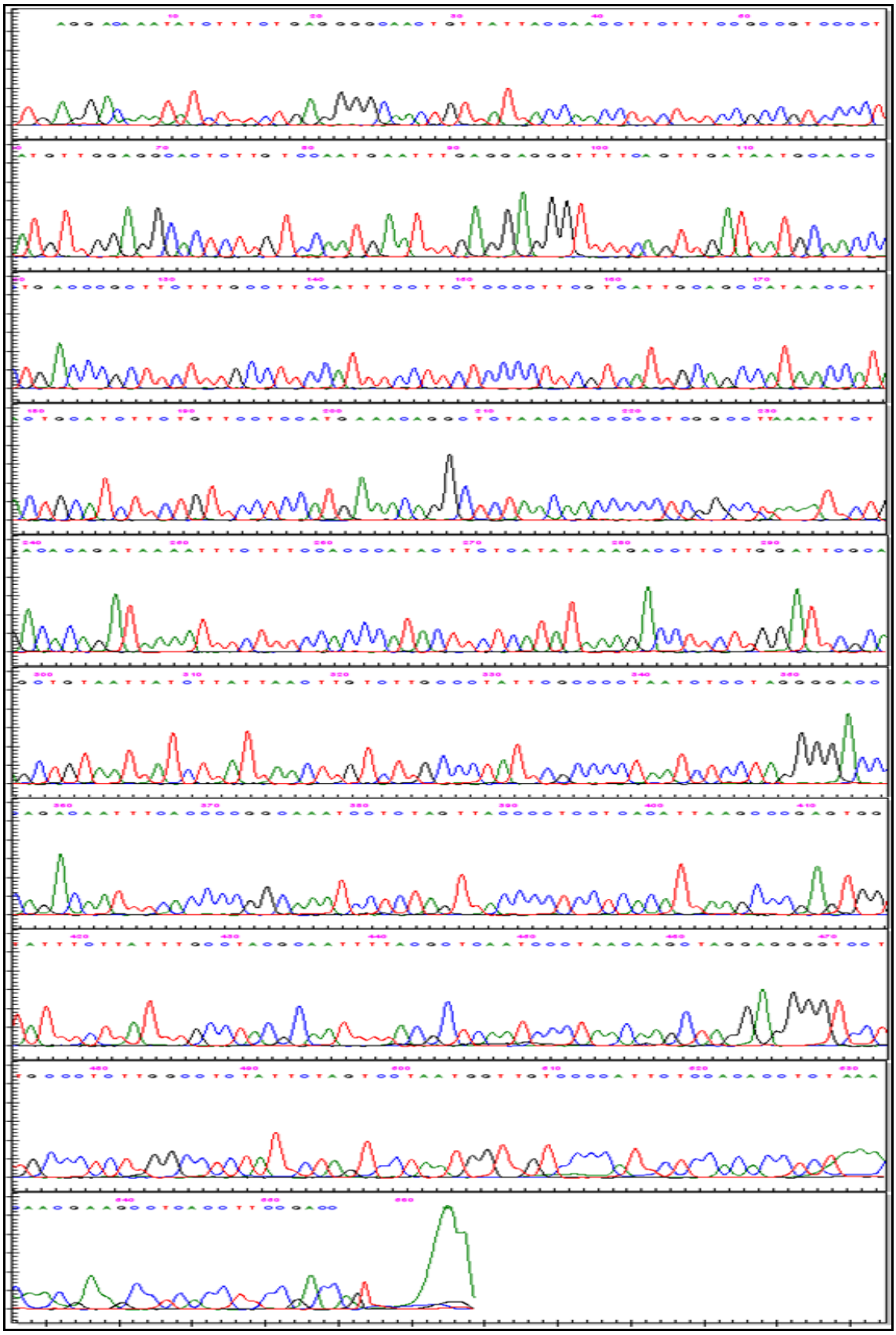
Mersin kültür çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



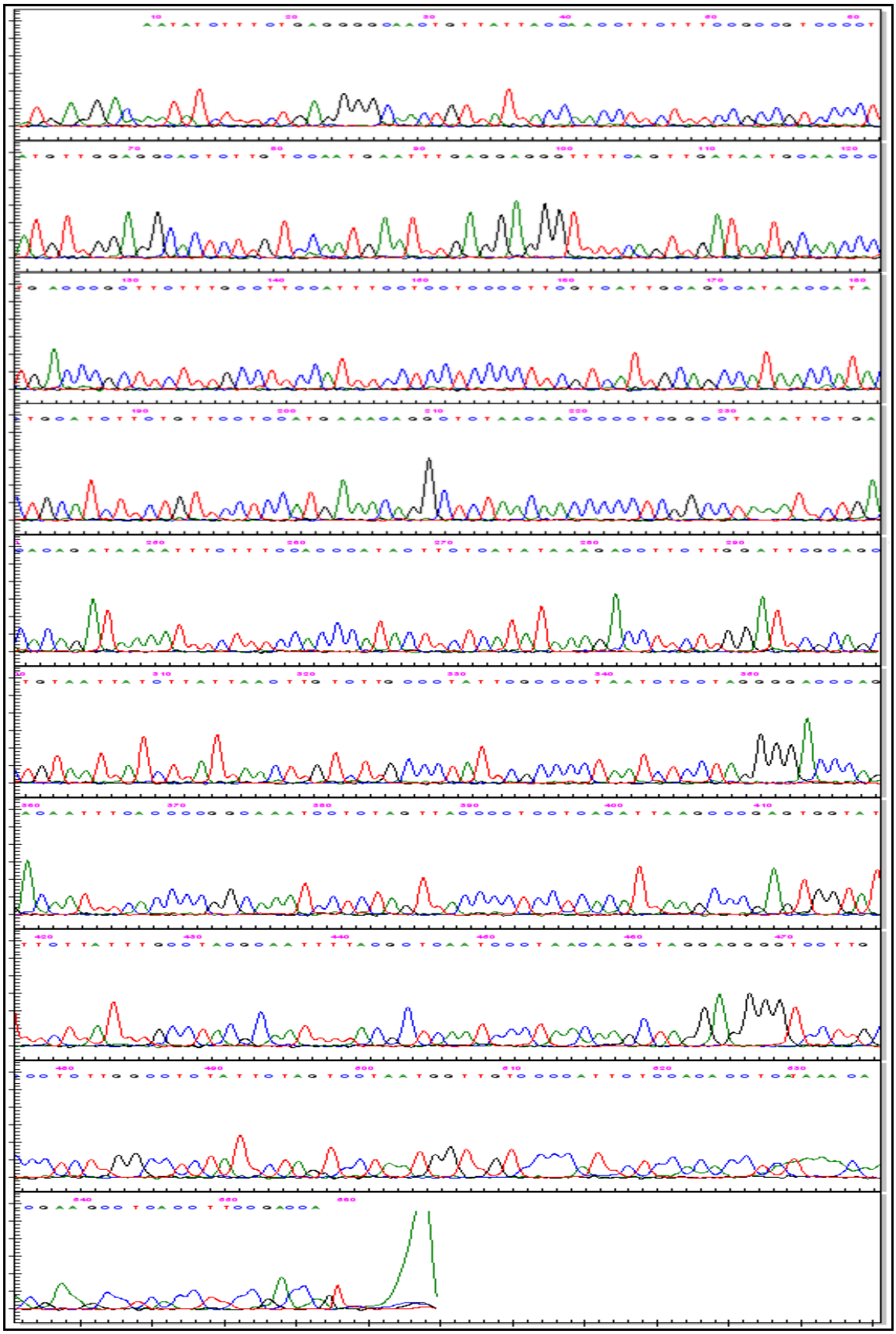
Mersin doğal çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



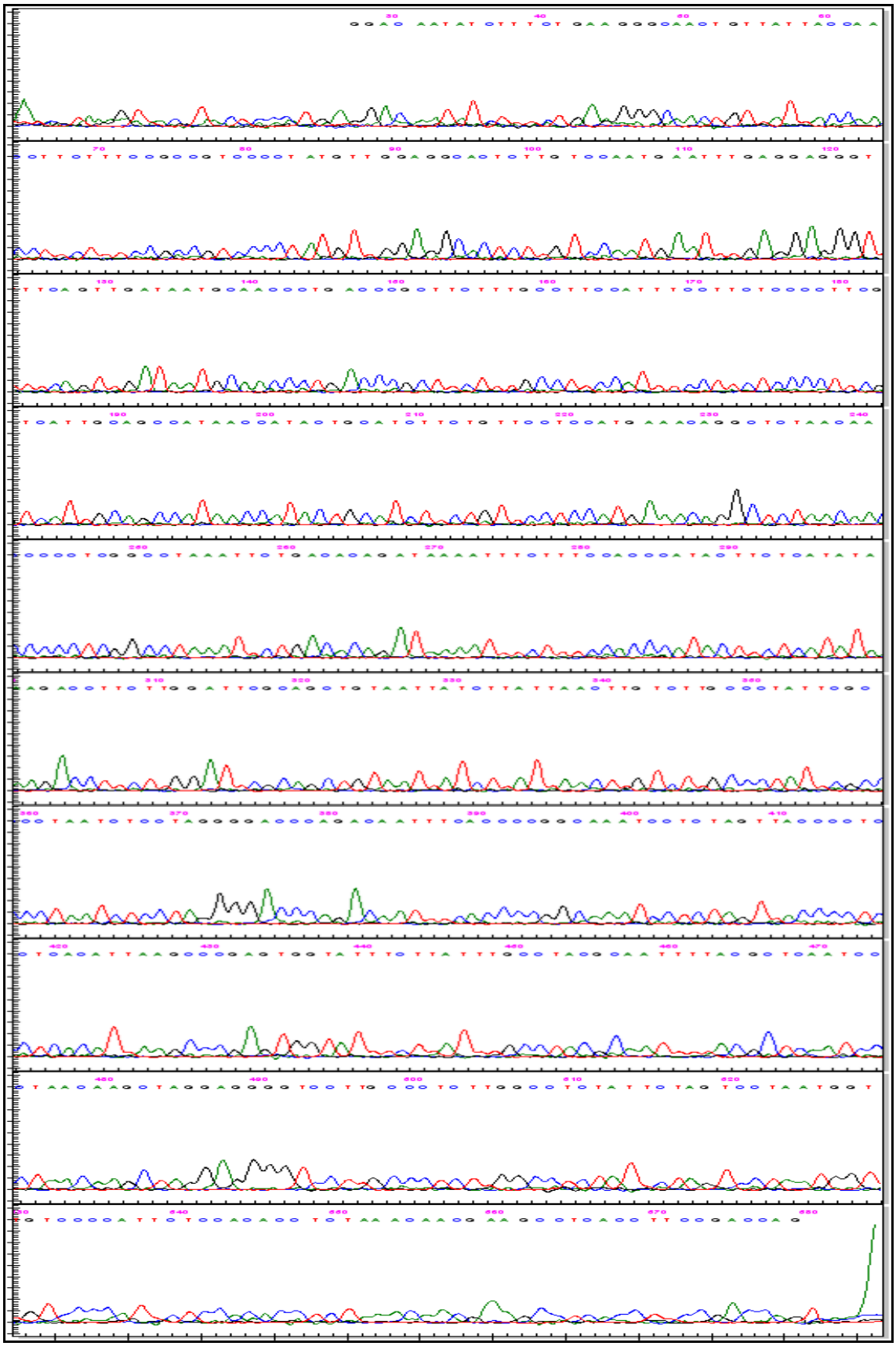
Antalya kültür çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



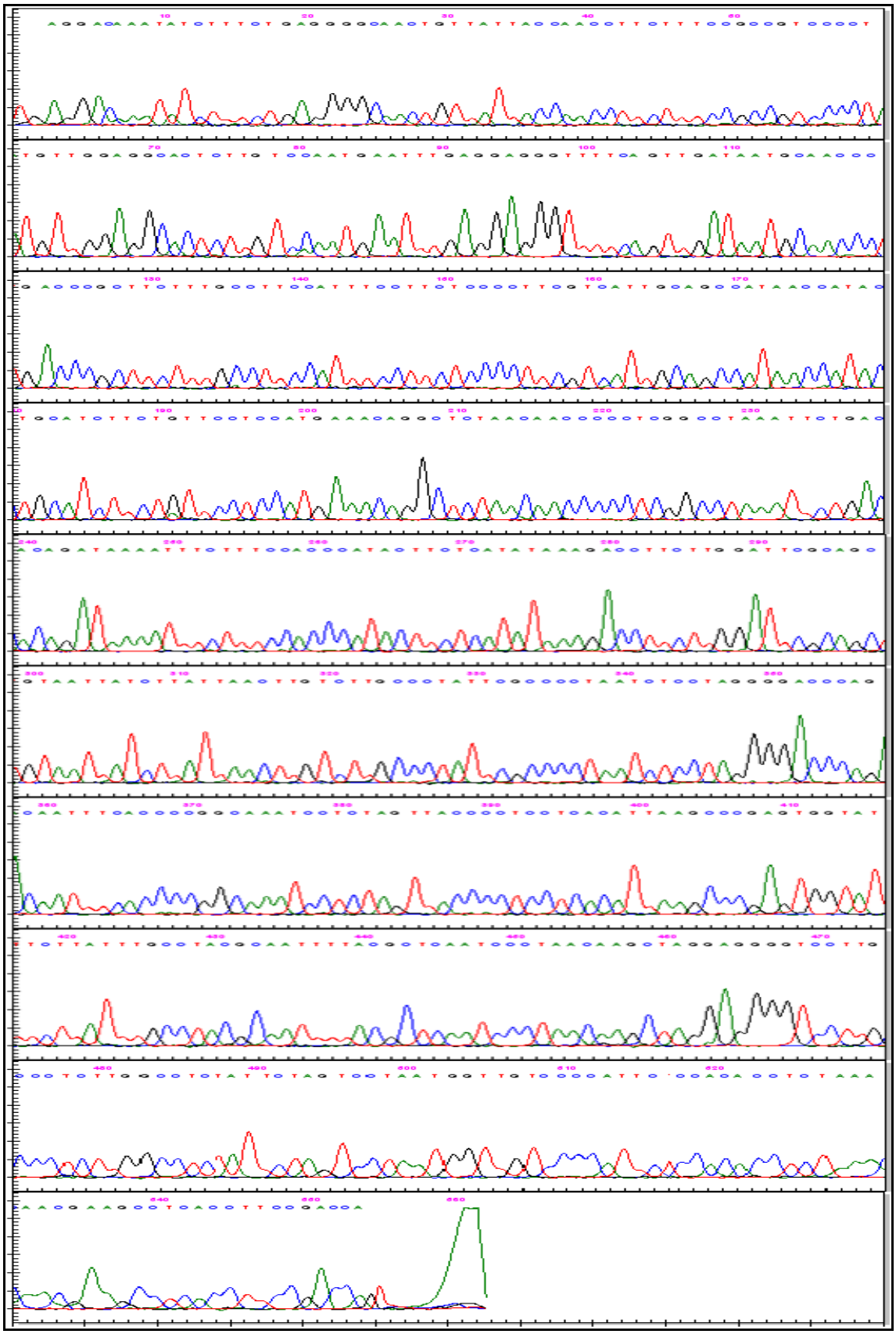
Adana kültür çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



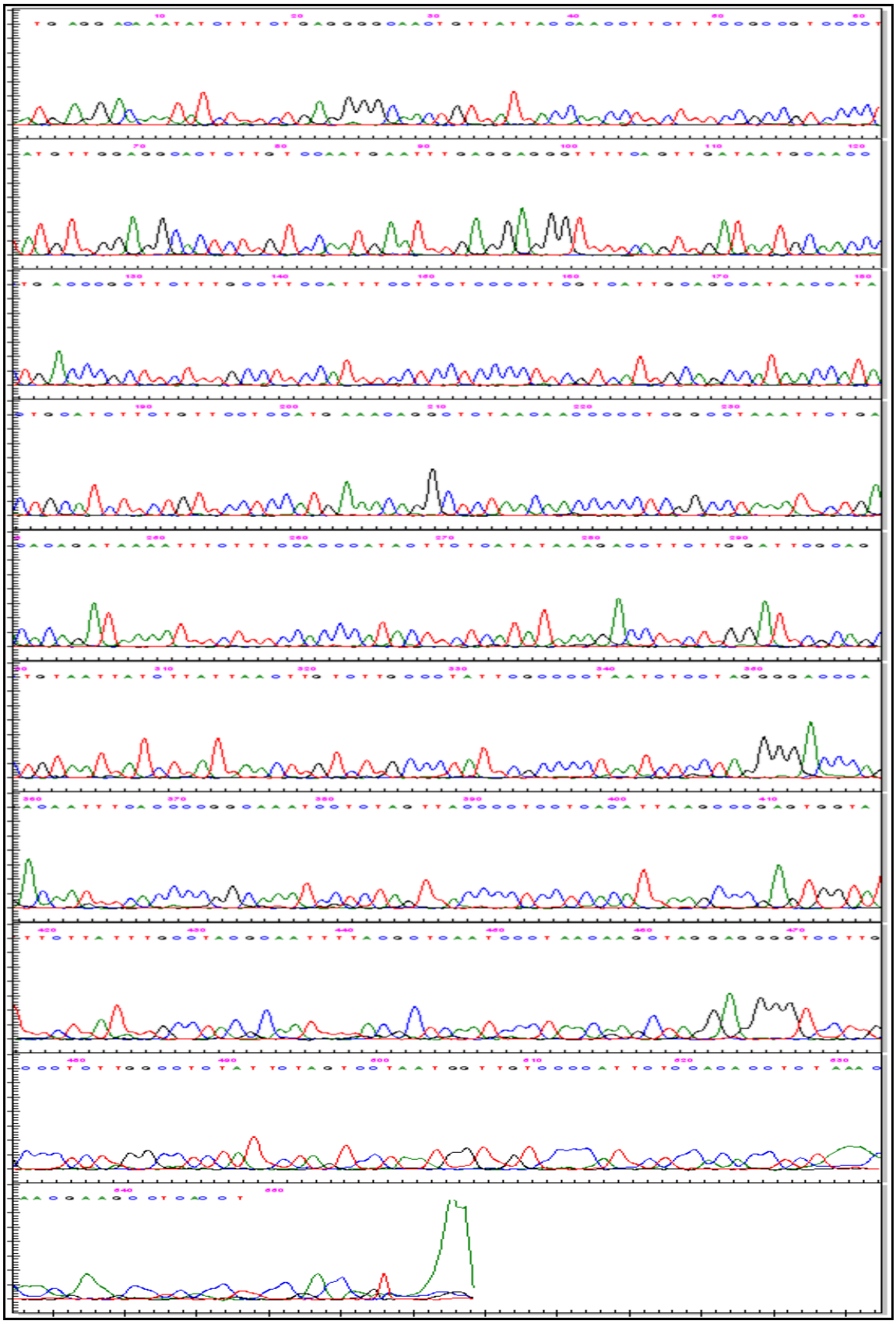
Adana doğal çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



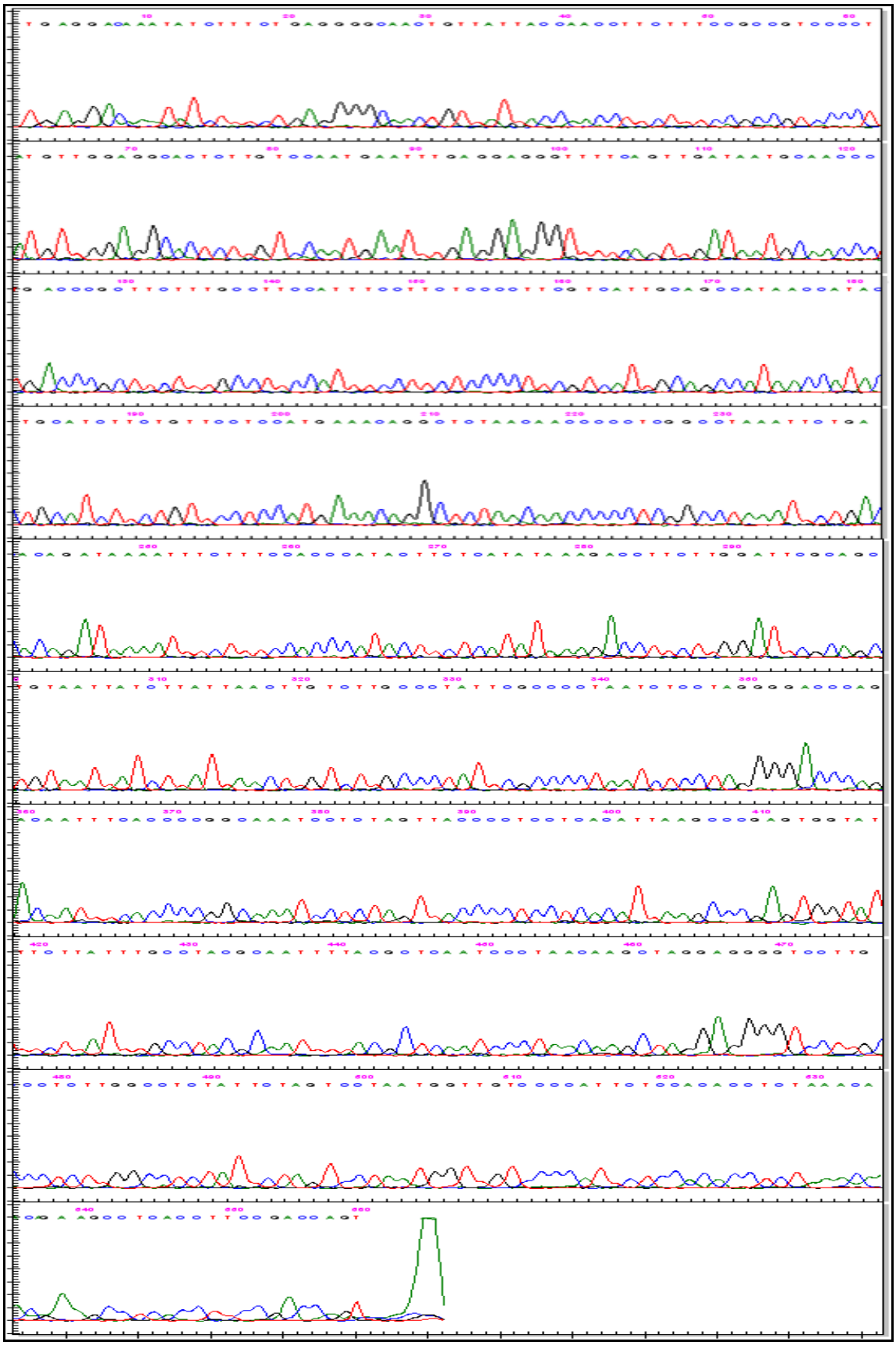
İzmir kültür çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



İzmir doğal çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



Bodrum doğal çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram



Antalya doğal çipura Sitokrom b gen bölgesine ait elektroferogram

EK 2 Beş farklı istasyondan alınan örneklerin üç farklı gen bölgesinden elde edilen nükleotid dizileri

```
1       GACAGTCTAT ATACATTTTC TGTCCGCCTG GGGACTACGA
41      GCATTAGCTT AAAACCCAAA GGACTTGGCG GTGCTTTAGA
81      CCCACCTAGA GGAGCCTGTT CTAGAACCGA TAATCCCCGT
121     TCAACCTCAC CCCTCCTTGT CCATCCCGCC TATATACCAC
161     CGTCGTCAGC TTACCCTGTG AAGGATAAAA AGTAAGCAAA
201     ACTGGTACTA CCCAGCACGT CAGGTCGAGG TGTAGCGAAT
241     GGAGGGGGAA GAAATGGGCT ACATTCCCTT ATCTACAGGG
281     AACCACGAAT GGCATACTGA AAATGTGTGC ATAGAAGAGA
321     GAGATTTAGC AGTAAAAGGA AAAGTAGAGT GTTCCATTGA
361     AGCCGGCTCT TAAGCGCGCA CACACCGCCC GTCACCCCTC
401     TGCAGTC
```

Adana kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi

```
1       TAAACATTGA CAGTCTATAA CATTTTCTGT CCGCCTGGGG
41      ACTACGAGCA TTAGCTTAAA ACCCAAAGGA CTTGGCGGTG
81      CTTTAGACCC ACCTAGAGGA GCCTGTTCTA GAACCGATAA
121     TCCCCGTTCA ACCTCACCCC TCCTTGTCCA TCCCGCCTAT
161     ATACCACCGT CGTCAGCTTA CCCTGTGAAG GATAAAAAGT
201     AAGCAAAACT GGTACTACCC AGCACGTCAG GTCGAGGTGT
241     AGCGAATGGA GGGGGAAGAA ATGGGCTACA TTCCCTTATC
281     TACAGGGAAC CACGAATGGC ATACTGAAAA TGTGTGCCTG
321     AAGGAGGATT TAGCAGTAAA AGGAAAGTAG AGTGTTCCAT
361     TGAAGCCGGC TCTTAAGCGC GCACACACCG CCCGTCACCC
401     TCTGCAG
```

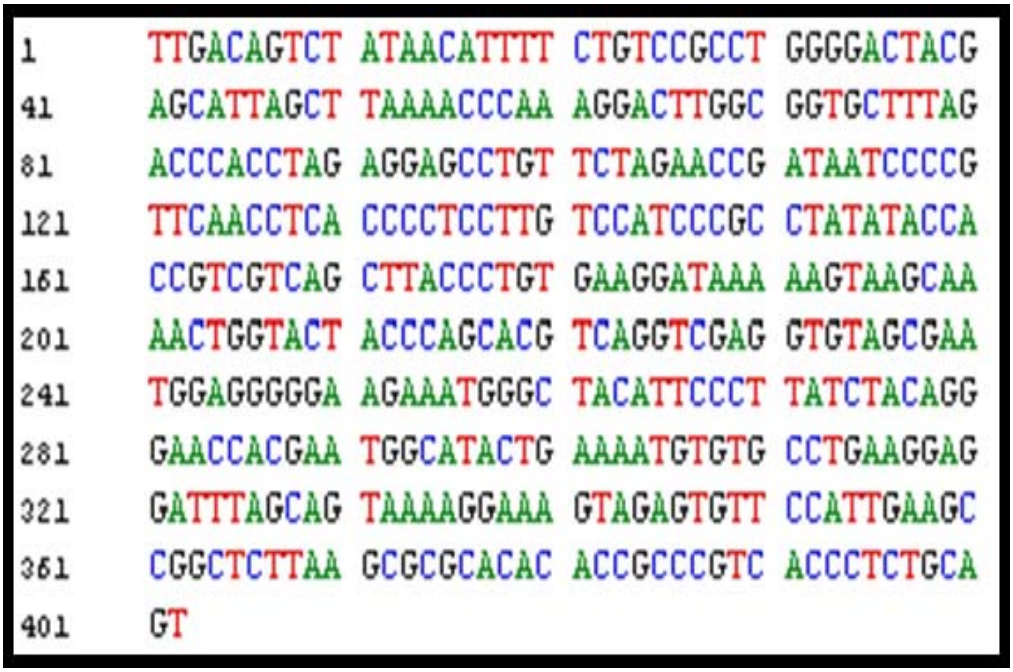
Adana doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi

```
1       TAAACATTGA CAGTCTATAA CATTTTCTGT CCGCCTGGGG
41      ACTACGAGCA TTAGCTTAAA ACCCAAAGGA CTTGGCGGTG
81      CTTTAGACCC ACCTAGAGGA GCCTGTTCTA GAACCGATAA
121     TCCCCGTTCA ACCTCACCCC TCCTTGTCCA TCCCGCCTAT
161     ATACCACCGT CGTCAGCTTA CCCTGTGAAG GATAAAAAGT
201     AAGCAAAACT GGTACTACCC AGCACGTCAG GTCGAGGTGT
241     AGCGAATGGA GGGGGAAGAA ATGGGCTACA TTCCCTTATC
281     TACAGGGAAC CACGAATGGC ATACTGAAAA TGTGTGCCTG
321     AAGGAGGATT TAGCAGTAAA AGGAAAGTAG AGTGTTCCAT
361     TGAAGCCGGC TCTTAAGCGC GCACACACCG CCCGTCACCC
401     TCTGCAG
```

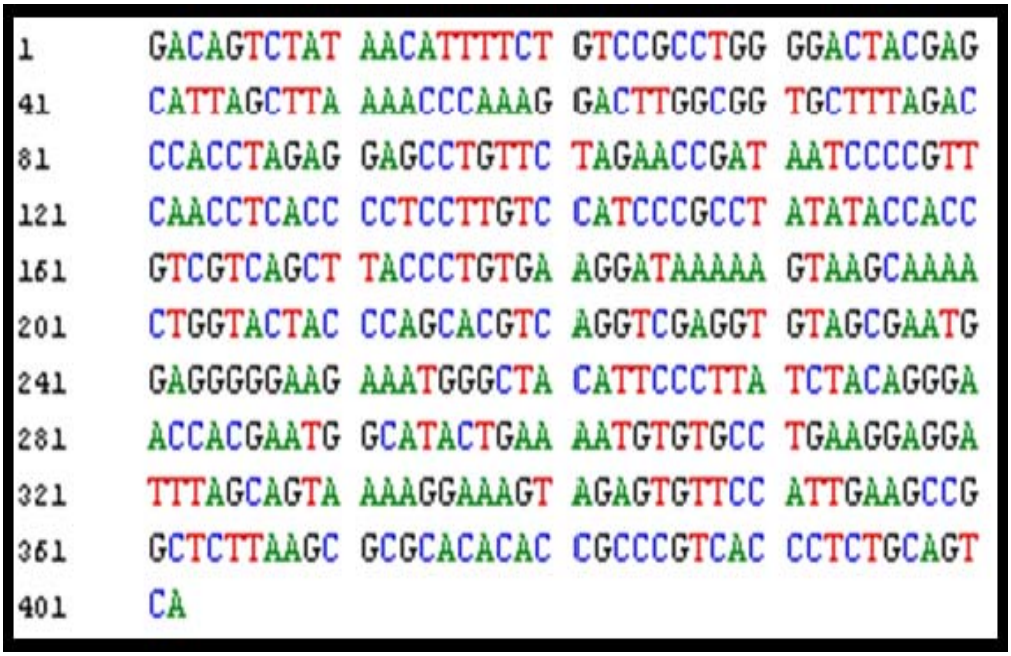
Mersin kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi

```
1       AACATTGACA GTCTATATCA TTTTCTGTCC GCCTGGGGAC
41      TACGAGCATT AGCTTAAAAC CCAAAGGACT TGGCGGTGCT
81      TTAGACCCAC CTAGAGGAGC CTGTTCTAGA ACCGATAATC
121     CCCGTTCAAC CTCACCCCTC CTTGTCCATC CCGCCTATAT
161     ACCACCGTCG TCAGCTTACC CTGTGAAGGA TAAAAAGTAA
201     GCAAAACTGG TACTACCCAG CACGTCAGGT CGAGGTGTAG
241     CGAATGGAGG GGGAAGAAAT GGGCTACATT CCCTTATCTA
281     CAGGGAACCA CGAATGGCAT ACTGAAAATG TGTGCCTGAA
321     GGAGGATTTA GCAGTAAAAG GAAAGTAGAG TGTTCCATTG
361     AAGCCGGCTC TTAAGCGCAG CACACACCGC CCGTCACCCC
401     TCTGCAGT
```

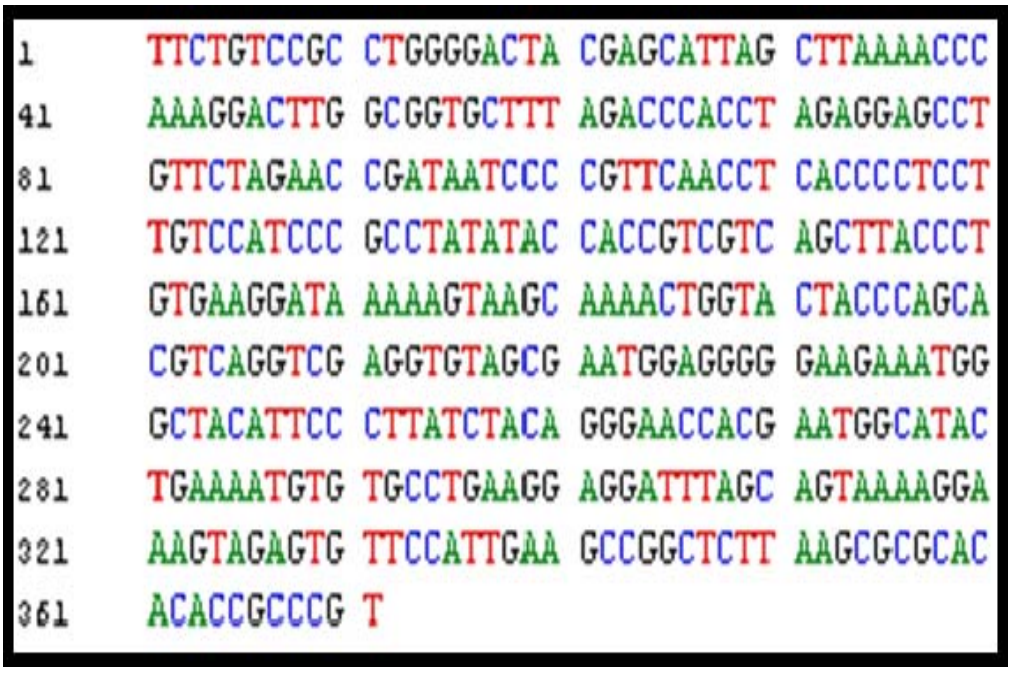
Mersin doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



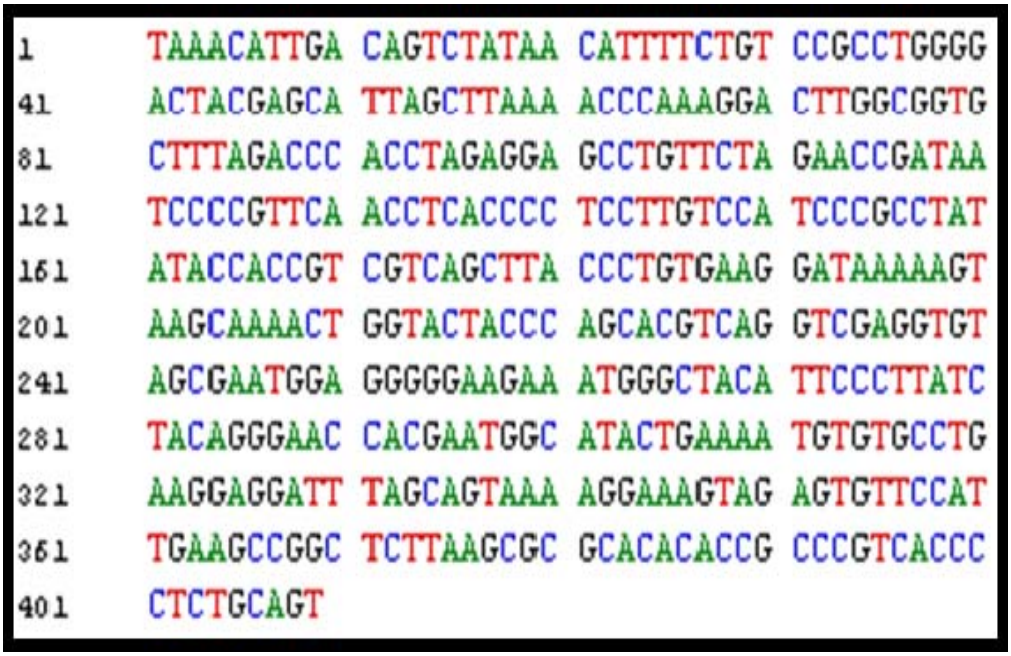
Antalya kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



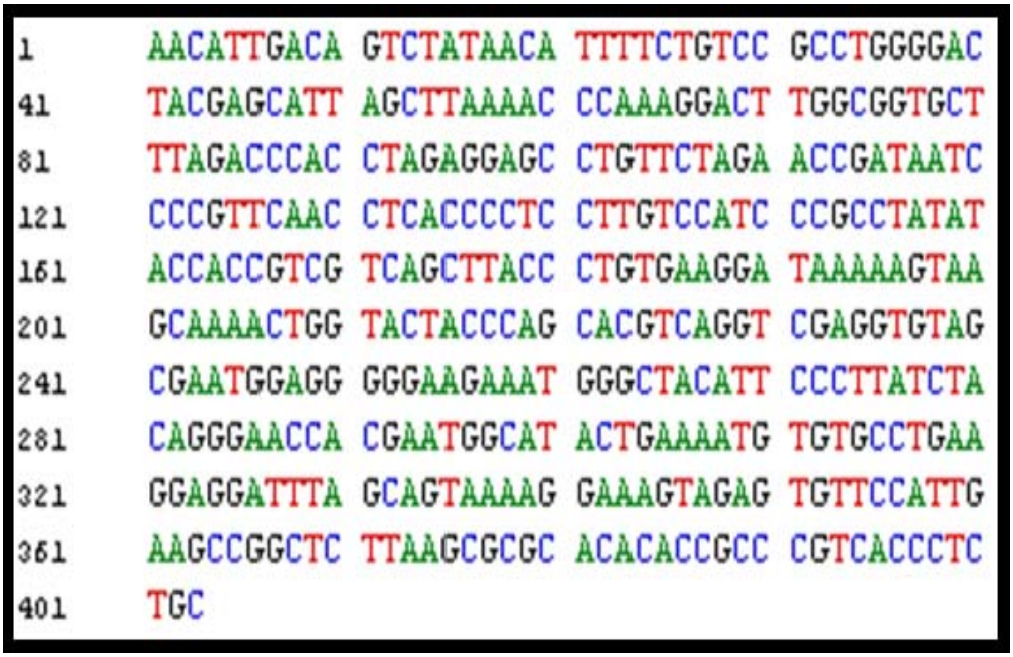
Antalya doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



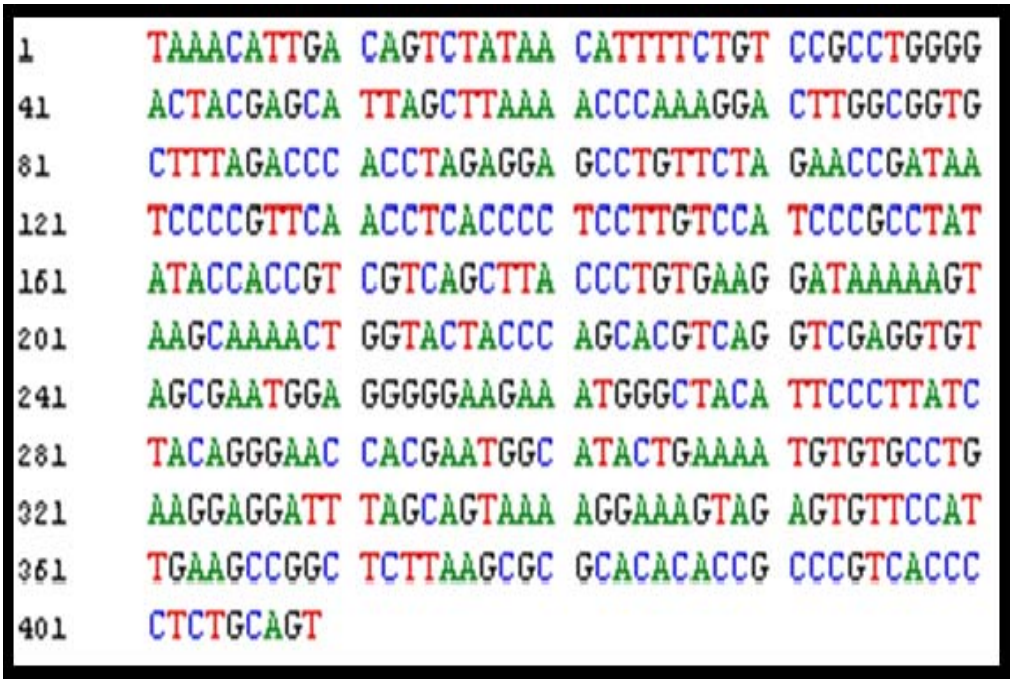
Bodrum kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



Bodrum doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



İzmir kültür çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



İzmir doğal çipura 12S rRNA bölgesine ait nükleotid dizisi



Adana kültür çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



Adana doğal çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



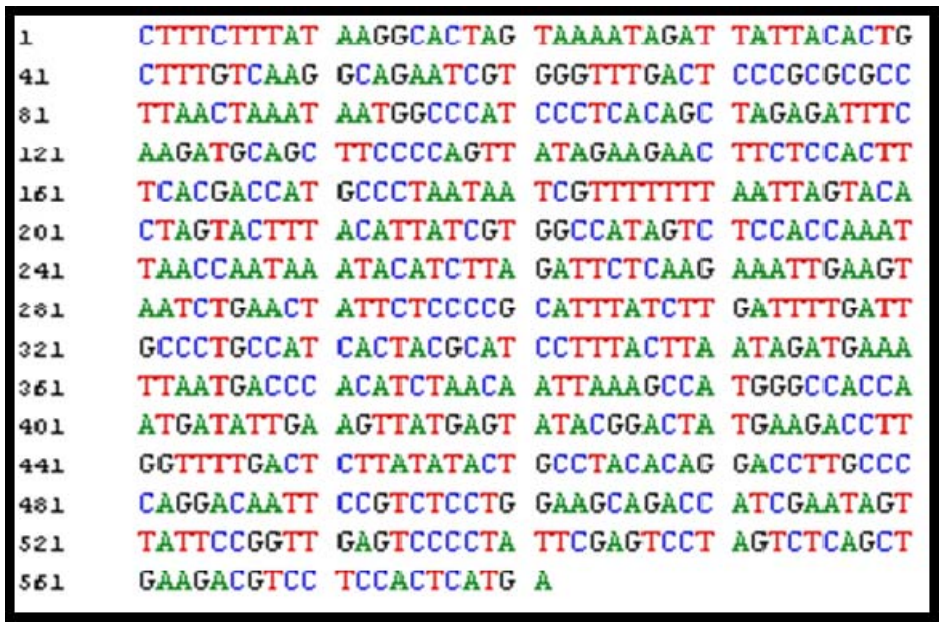
```
1       TACATAACCA CTCTGTCACT TTCTTTATAA GGCACTAGTA
41      AAATAGATTA TTACACTGCT TTGTCAAGGC AGAATCGTGG
81      GTTTGACTCC CGCGCGCCTT AACTAAATAA TGGCCCATCC
121     CTCACAGCTA GGATTTCAAG ATGCAGCTTC CCCAGTTATA
161     GAAGAACTTC TCCACTTTCA CGACACATGC CCTAATAATC
201     GTTTTTTTAA TTAGTACACT AGTACTTTAC ATTATCGTGG
241     CCATAGTCTC CACCAAATTA ACCAATAAAT ACATCTTAGA
281     TTCTCAAGAA ATTGAAGTAA TCTGAACTAT TCTCCCCGCA
321     TTTATCTTGA TTTTGATTGC CCTGCCATCA CTACGCATCC
361     TTTACTTAAT AGATGAAATT AATGACCCAC ATCTAACAAT
401     TAAAGCCATG GGCCACCAAT GATATTGAAG TTATGAGTAT
441     ACGGACTATG AAGACCTTGG TTTTGACTCT TATATACTGC
481     CTACACAGGA CCTTGCCCCA GGACAATTCC GTCTCCTGGA
521     AGCAGACCAT CGAATAGTTA TTCCGGTTGA GTCCCCTATT
561     CGAGTCCTAG TCTCAGCTGA AGACGTCCTC CACTCAT
```

Mersin kültür çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



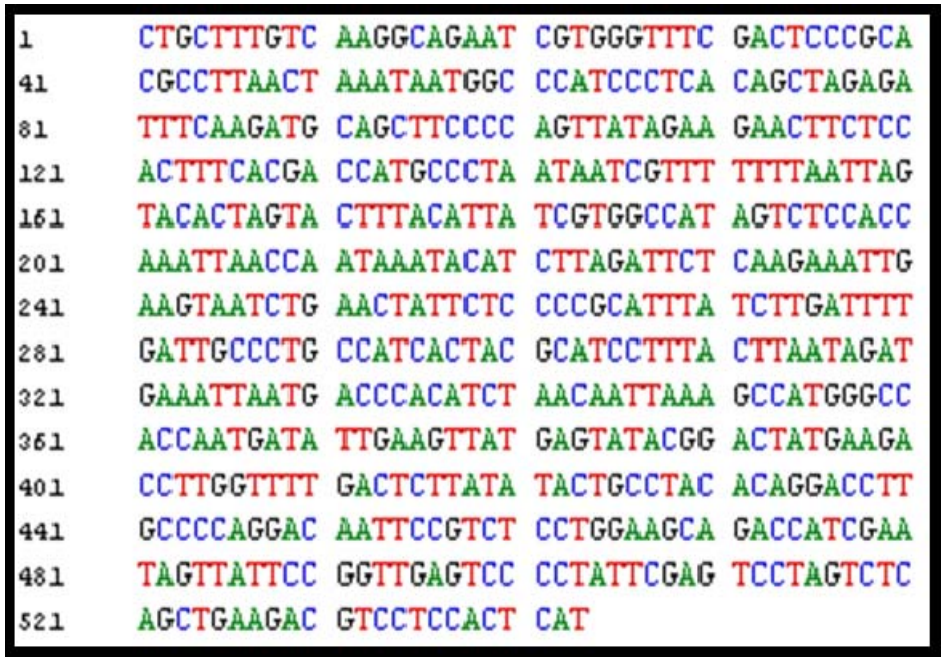
```
1       TACATAACCA CTCTGTCACT TTCTTTATAA GGCACTAGTA
41      AAATAGATTA TTACACTGCT TTGTCAAGGC AGAATCGTGG
81      GTTTGACTCC CGCGCGCCTT AACTAAATAA TGGCCCATCC
121     CTCACAGCTA GGATTTCAAG ATGCAGCTTC CCCAGTTATA
161     GAAGAACTTC TCCACTTTCA CGACCATGCC CTAATAATCG
201     TTTTTTTAAT TAGTACACTA GTACTTTACA TTATCGTGGC
241     CATAGTCTCC ACCAAATTAA CCAATAAATA CATCTTAGAT
281     TCTCAAGAAA TTGAAGTAAT CTGAACTATT CTCCCCGCAT
321     TTATCTTGAT TTTGATTGCC CTGCCATCAC TACGCATCCT
361     TTACTTAATA GATGAAATTA ATGACCCACA TCTAACAATT
401     AAAGCCATGG GCCACCAATG ATATTGAAGT TATGAGTATA
441     CGGACTATGA AGACCTTGGT TTTGACTCTT ATATACTGCC
481     TACACAGGAC CTTGCCCCAG GACAATTCCG TCTCCTGGAA
521     GCAGACCATC GAATAGTTAT TCCGGTTGAG TCCCCTATTC
561     GAGTCCTAGT CTCAGCTGAA GACGTCCTCC ACTCAT
```

Mersin doğal çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



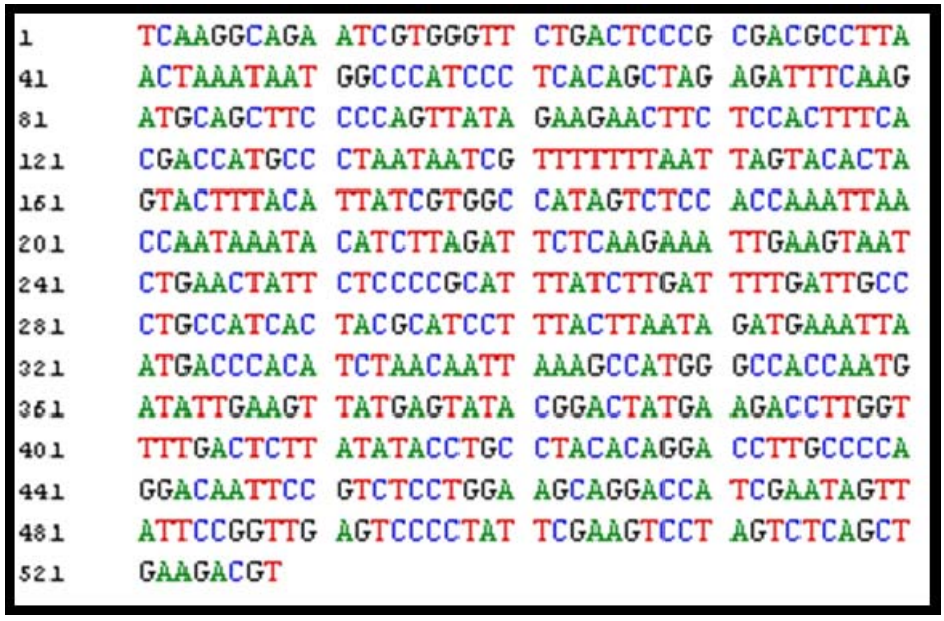
```
1       CTTTCTTTAT AAGGCACTAG TAAAATAGAT TATTACACTG
41      CTTTGTCAAG GCAGAATCGT GGGTTTGACT CCCGCGCGCC
81      TTAACTAAAT AATGGCCCAT CCCTCACAGC TAGAGATTTC
121     AAGATGCAGC TTCCCCAGTT ATAGAAGAAC TTCTCCACTT
161     TCACGACCAT GCCCTAATAA TCGTTTTTTT AATTAGTACA
201     CTAGTACTTT ACATTATCGT GGCCATAGTC TCCACCAAAT
241     TAACCAATAA ATACATCTTA GATTCTCAAG AAATTGAAGT
281     AATCTGAACT ATTCTCCCCG CATTTATCTT GATTTTGATT
321     GCCCTGCCAT CACTACGCAT CCTTTACTTA ATAGATGAAA
361     TTAATGACCC ACATCTAACA ATTAAAGCCA TGGGCCACCA
401     ATGATATTGA AGTTATGAGT ATACGGACTA TGAAGACCTT
441     GGTTTTGACT CTTATATACT GCCTACACAG GACCTTGCCC
481     CAGGACAATT CCGTCTCCTG GAAGCAGACC ATCGAATAGT
521     TATTCCGGTT GAGTCCCCTA TTCGAGTCCT AGTCTCAGCT
561     GAAGACGTCC TCCACTCATG A
```

Antalya kültür çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       CTGCTTTGTC AAGGCAGAAT CGTGGGTTTC GACTCCCGCA
41      CGCCTTAACT AAATAATGGC CCATCCCTCA CAGCTAGAGA
81      TTTCAAGATG CAGCTTCCCC AGTTATAGAA GAACTTCTCC
121     ACTTTCACGA CCATGCCCTA ATAATCGTTT TTTTAATTAG
161     TACACTAGTA CTTTACATTA TCGTGGCCAT AGTCTCCACC
201     AAATTAACCA ATAAATACAT CTTAGATTCT CAAGAAATTG
241     AAGTAATCTG AACTATTCTC CCCGCATTTA TCTTGATTTT
281     GATTGCCCTG CCATCACTAC GCATCCTTTA CTTAATAGAT
321     GAAATTAATG ACCCACATCT AACAATTAAA GCCATGGGCC
361     ACCAATGATA TTGAAGTTAT GAGTATACGG ACTATGAAGA
401     CCTTGGTTTT GACTCTTATA TACTGCCTAC ACAGGACCTT
441     GCCCCAGGAC AATTCCGTCT CCTGGAAGCA GACCATCGAA
481     TAGTTATTCC GGTTGAGTCC CCTATTCGAG TCCTAGTCTC
521     AGCTGAAGAC GTCCTCCACT CAT
```

Antalya doğal çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       TCAAGGCAGA ATCGTGGGTT CTGACTCCCG CGACGCCTTA
41      ACTAAATAAT GGCCCATCCC TCACAGCTAG AGATTTCAAG
81      ATGCAGCTTC CCCAGTTATA GAAGAACTTC TCCACTTTCA
121     CGACCATGCC CTAATAATCG TTTTTTTAAT TAGTACACTA
161     GTACTTTACA TTATCGTGGC CATAGTCTCC ACCAAATTAA
201     CCAATAAATA CATCTTAGAT TCTCAAGAAA TTGAAGTAAT
241     CTGAACTATT CTCCCCGCAT TTATCTTGAT TTTGATTGCC
281     CTGCCATCAC TACGCATCCT TTACTTAATA GATGAAATTA
321     ATGACCCACA TCTAACAATT AAAGCCATGG GCCACCAATG
361     ATATTGAAGT TATGAGTATA CGGACTATGA AGACCTTGGT
401     TTTGACTCTT ATATACCTGC CTACACAGGA CCTTGCCCCA
441     GGACAATTCC GTCTCCTGGA AGCAGGACCA TCGAATAGTT
481     ATTCCGGTTG AGTCCCCTAT TCGAAGTCCT AGTCTCAGCT
521     GAAGACGT
```

Bodrum kültür çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       TACATAACCA CTCTGTCACT TTCTTTATAA GGCACTAGTA
41      AAATAGATTA TTACACTGCT TTGTCAAGGC AGAATCGTGG
81      GTTTGACTCC CGACGCGCCT TAACTAAATA ATGGCCCATC
121     CCTCACAGCT AGGATTTCAA GATGCAGCTT CCCCAGTTAT
161     AGAAGAACTT CTCCACTTTC ACGACCATGC CCTAATAATC
201     GTTTTTTTAA TTAGTACACT AGTACTTTAC ATTATCGTGG
241     CCATAGTCTC CACCAAATTA ACCAATAAAT ACATCTTAGA
281     TTCTCAAGAA ATTGAAGTAA TCTGAACTAT TCTCCCCGCA
321     TTTATCTTGA TTTTGATTGC CCTGCCATCA CTACGCATCC
361     TTTACTTAAT AGATGAAATT AATGACCCAC ATCTAACAAT
401     TAAAGCCATG GGCCACCAAT GATATTGAAG TTATGAGTAT
441     ACGGACTATG AAGACCTTGG TTTTGACTCT TATATACTGC
481     CTACACAGGA CCTTGCCCCA GGACAATTCC GTCTCCTGGA
521     AGCAGACCAT CGAATAGTTA TTCCGGTTGA GTCCCCTATT
561     CGAGTCCTAG TCTCAGCTGA AGACGTCCTC CACTC
```

Bodrum doğal çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       TACATAACCA CTCTGTCACT TTCTTTATAA GGCACTAGTA
41      AAATAGATTA TTACACTGCT TTGTCAAGGC AGAATCGTGG
81      GTTTGACTCC CGCAGCGCCT TAACTAAATA ATGGCCCATC
121     CCTCACAGCT AGGATTTCAA GATGCAGCTT CCCCAGTTAT
161     AGAAGAACTT CTCCACTTTC ACGACCATGC CCTAATAATC
201     GTTTTTTTAA TTAGTACACT AGTACTTTAC ATTATCGTGG
241     CCATAGTCTC CACCAAATTA ACCAATAAAT ACATCTTAGA
281     TTCTCAAGAA ATTGAAGTAA TCTGAACTAT TCTCCCCGCA
321     TTTATCTTGA TTTTGATTGC CCTGCCATCA CTACGCATCC
361     TTTACTTAAT AGATGAAATT AATGACCCAC ATCTAACAAT
401     TAAAGCCATG GGCCACCAAT GATATTGAAG TTATGAGTAT
441     ACGGACTATG AAGACCTTGG TTTTGACTCT TATATACTGC
481     CTACACAGGA CCTTGCCCCA GGACAATTCC GTCTCCTGGA
521     AGCAGACCAT CGAATAGTTA TTCCGGTTGA GTCCCCTATT
561     CGAGTCCTAG TCTCAGCTGA AGACGTCCTC CACTCAT
```

İzmir kültür çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       CCAACTACAT AACCACTCTG TCACTTTCTT TATAAGGCAC
41      TAGTAAAATA GATTATTACA CTGCTTTGTC AAGGCAGAAT
81      CGTGGGTTTG ACTCCCGCGC GCCTTAACTA AATAATGGCC
121     CATCCCTCAC AGCTAGGATT TCAAGATGCA GCTTCCCCAG
161     TTATAGAAGA ACTTCTCCAC TTTCACGACC ATGCCCTAAT
201     AATCGTTTTT TTAATTAGTA CACTAGTACT TTACATTATC
241     GTGGCCATAG TCTCCACCAA ATTAACCAAT AAATACATCT
281     TAGATTCTCA AGAAATTGAA GTAATCTGAA CTATTCTCCC
321     CGCATTTATC TTGATTTTGA TTGCCCTGCC ATCACTACGC
361     ATCCTTTACT TAATAGATGA AATTAATGAC CCACATCTAA
401     CAATTAAAGC CATGGGCCAC CAATGATATT GAAGTTATGA
441     GTATACGGAC TATGAAGACC TTGGTTTGTG ACTCTTATAT
481     ACTGCCTACA CAGGACCTTG CCCCAGGACA ATTCCGTCTC
521     CTGGAAGCAG ACCATCGAAT AGTTATTCCG GTTGAGTCCC
561     CTATTCGAGT CCTAGTCTCA GCTGAAGACG TCCTCCACTC
601     ATGA
```

İzmir doğal çipura Sitokrom oksidaz II bölgesine ait nükleotid dizisi



Adana kültür çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi

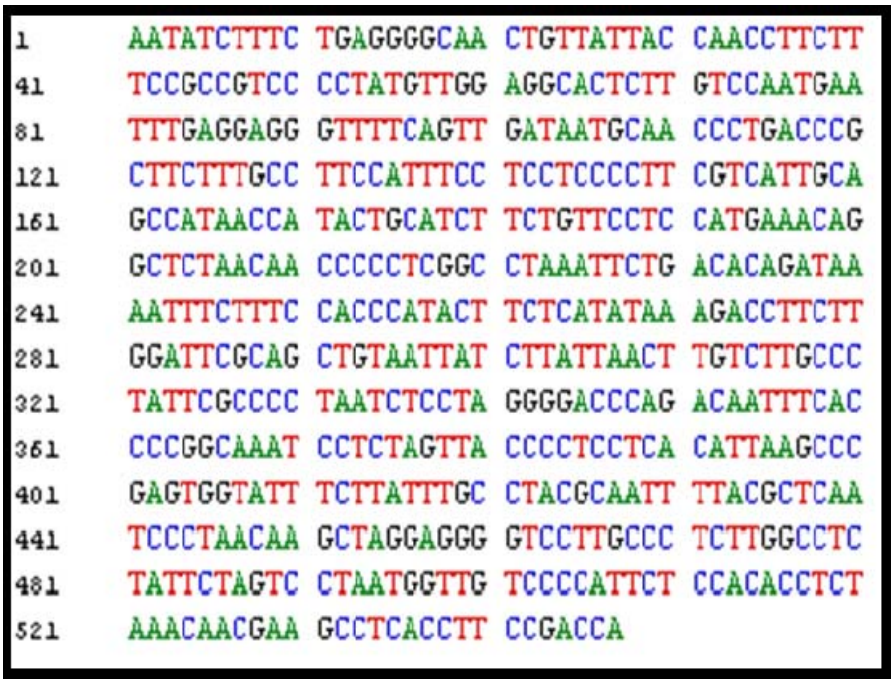


Adana doğal çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



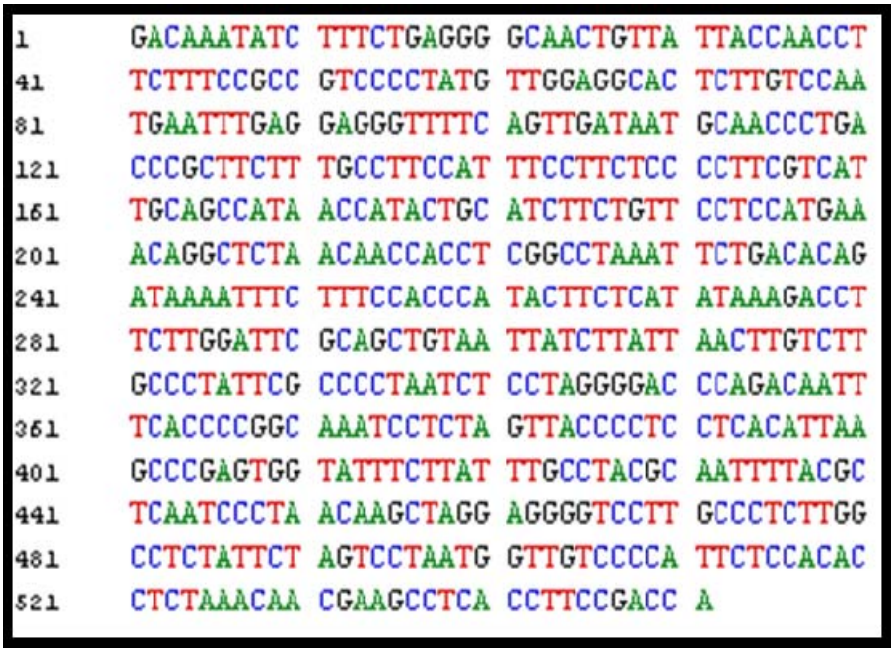
```
1      TGAGGACAAA TATCTTTCTG AGGGGCAACT GTTATTACCA
41     ACCTTCTTTC CGCCGTCCCC TATGTTGGAG GCACTCTTGT
81     CCAATGAATT TGAGGAGGGT TTTCAGTTGA TAATGCAACC
121    CTGACCCGCT TCTTTGCCTT CCATTTCCTT CTCCCCTTCG
161    TCATTGCAGC CATAACCATA CTGCATCTTC TGTTCCTCCA
201    TGAAACAGGC TCTAACAACC CCCTCGGCCT AAATTCTGAC
241    ACAGATAAAA TTTCTTTCCA CCCATACTTC TCATATAAAG
281    ACCTTCTTGG ATTCGCAGCT GTAATTATCT TATTAACTTG
321    TCTTGCCCTA TTCGCCCCTA ATCTCCTAGG GGACCCAGAC
361    AATTTCACCC CGGCAAATCC TCTAGTTACC CCTCCTCACA
401    TTAAGCCCGA GTGGTATTTC TTATTTGCCT ACGCAATTTT
441    ACGCTCAATC CCTAACAAGC TAGGAGGGGT CCTTGCCCTC
481    TTGGCCTCTA TTCTAGTCCT AATGGTTGTC CCCATTCTCC
521    ACACCTCTAA ACAACGAAGC CTCACCTTCC GACCAG
```

Mersin kültür çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1      AATATCTTTC TGAGGGGCAA CTGTTATTAC CAACCTTCTT
41     TCCGCCGTCC CCTATGTTGG AGGCACTCTT GTCCAATGAA
81     TTTGAGGAGG GTTTTCAGTT GATAATGCAA CCCTGACCCG
121    CTTCTTTGCC TTCCATTTCC TCCTCCCCTT CGTCATTGCA
161    GCCATAACCA TACTGCATCT TCTGTTCCTC CATGAAACAG
201    GCTCTAACAA CCCCCTCGGC CTAAATTCTG ACACAGATAA
241    AATTTCTTTC CACCCATACT TCTCATATAA AGACCTTCTT
281    GGATTCGCAG CTGTAATTAT CTTATTAACT TGTCTTGCCC
321    TATTCGCCCC TAATCTCCTA GGGGACCCAG ACAATTTCAC
361    CCCGGCAAAT CCTCTAGTTA CCCCTCCTCA CATTAAGCCC
401    GAGTGGTATT TCTTATTTGC CTACGCAATT TTACGCTCAA
441    TCCCTAACAA GCTAGGAGGG GTCCTTGCCC TCTTGGCCTC
481    TATTCTAGTC CTAATGGTTG TCCCCATTCT CCACACCTCT
521    AAACAACGAA GCCTCACCTT CCGACCA
```

Mersin doğal çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



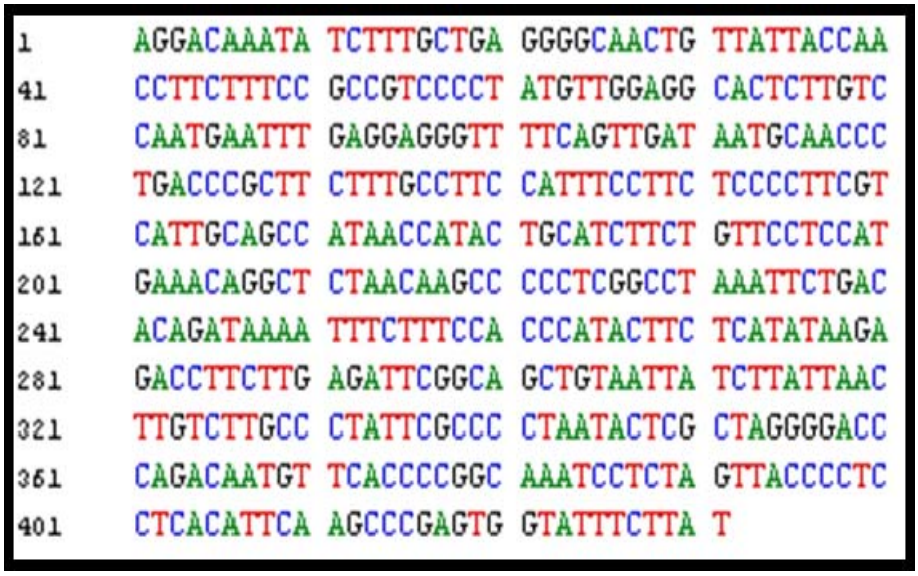
```
1      GACAAATATC TTTCTGAGGG GCAACTGTTA TTACCAACCT
41     TCTTTCCGCC GTCCCCTATG TTGGAGGCAC TCTTGTCCAA
81     TGAATTTGAG GAGGGTTTTC AGTTGATAAT GCAACCCTGA
121    CCCGCTTCTT TGCCTTCCAT TTCCTTCTCC CCTTCGTCAT
161    TGCAGCCATA ACCATACTGC ATCTTCTGTT CCTCCATGAA
201    ACAGGCTCTA ACAACCACCT CGGCCTAAAT TCTGACACAG
241    ATAAAATTTC TTTCCACCCA TACTTCTCAT ATAAAGACCT
281    TCTTGGATTC GCAGCTGTAA TTATCTTATT AACTTGTCTT
321    GCCCTATTCG CCCCTAATCT CCTAGGGGAC CCAGACAATT
361    TCACCCCGGC AAATCCTCTA GTTACCCCTC CTCACATTAA
401    GCCCGAGTGG TATTTCTTAT TTGCCTACGC AATTTTACGC
441    TCAATCCCTA ACAAGCTAGG AGGGGTCCTT GCCCTCTTGG
481    CCTCTATTCT AGTCCTAATG GTTGTCCCCA TTCTCCACAC
521    CTCTAAACAA CGAAGCCTCA CCTTCCGACC A
```

Antalya kültür çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1      TGAGGACAAA TATCTTTCTG AGGGGCAACT GTTATTACCA
41     ACCTTCTTTC CGCCGTCCCC TATGTTGGAG GCACTCTTGT
81     CCAATGAATT TGAGGAGGGT TTTCAGTTGA TAATGCAACC
121    CTGACCCGCT TCTTTGCCTT CCATTTCCTT CTCCCCTTCG
161    TCATTGCAGC CATAACCATA CTGCATCTTC TGTTCCTCCA
201    TGAAACAGGC TCTAACAACC CCCTCGGCCT AAATTCTGAC
241    ACAGATAAAA TTTCTTTCCA CCCATACTTC TCATATAAAG
281    ACCTTCTTGG ATTCGCAGCT GTAATTATCT TATTAACTTG
321    TCTTGCCCTA TTCGCCCCTA ATCTCCTAGG GGACCCAGAC
361    AATTTCACCC CGGCAAATCC TCTAGTTACC CCTCCTCACA
401    TTAAGCCCGA GTGGTATTTC TTATTTGCCT ACGCAATTTT
441    ACGCTCAATC CCTAACAAGC TAGGAGGGGT CCTTGCCCTC
481    TTGGCCTCTA TTCTAGTCCT AATGGTTGTC CCCATTCTCC
521    ACACCTCTAA ACAACAGAAG CCTCACCTTC CGACCAGT
```

Antalya doğal çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       AGGACAAATA TCTTTGCTGA GGGGCAACTG TTATTACCAA
41      CCTTCTTTCC GCCGTCCCCT ATGTTGGAGG CACTCTTGTC
81      CAATGAATTT GAGGAGGGTT TTCAGTTGAT AATGCAACCC
121     TGACCCGCTT CTTTGCCTTC CATTTCCTTC TCCCCTTCGT
161     CATTGCAGCC ATAACCATAC TGCATCTTCT GTTCCTCCAT
201     GAAACAGGCT CTAACAAGCC CCCTCGGCCT AAATTCTGAC
241     ACAGATAAAA TTTCTTTCCA CCCATACTTC TCATATAAGA
281     GACCTTCTTG AGATTCGGCA GCTGTAATTA TCTTATTAAC
321     TTGTCTTGCC CTATTCGCCC CTAATACTCG CTAGGGGACC
361     CAGACAATGT TCACCCCGGC AAATCCTCTA GTTACCCCTC
401     CTCACATTCA AGCCCGAGTG GTATTTCTTA T
```

Bodrum kültür çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi

```
1       TGAGGACAAA TATCTTTCTG AGGGGCAACT GTTATTACCA
41      ACCTTCTTTC CGCCGTCCCC TATGTTGGAG GCACTCTTGT
81      CCAATGAATT TGAGGAGGGT TTTCAGTTGA TAATGCAACC
121     CTGACCCGCT TCTTTGCCTT CCATTTCCTC CTCCCCTTCG
161     TCATTGCAGC CATAACCATA CTGCATCTTC TGTTCCTCCA
201     TGAAACAGGC TCTAACAACC CCCTCGGCCT AAATTCTGAC
241     ACAGATAAAA TTTCTTTCCA CCCATACTTC TCATATAAAG
281     ACCTTCTTGG ATTCGCAGCT GTAATTATCT TATTAACTTG
321     TCTTGCCCTA TTCGCCCCTA ATCTCCTAGG GGACCCAGAC
361     AATTTCACCC CGGCAAATCC TCTAGTTACC CCTCCTCACA
401     TTAAGCCCGA GTGGTATTTC TTATTTGCCT ACGCAATTTT
441     ACGCTCAATC CCTAACAAGC TAGGAGGGGT CCTTGCCCTC
481     TTGGCCTCTA TTCTAGTCCT AATGGTTGTC CCCATTCTCC
521     ACACCTCTAA ACAACGAAGC CTCACCT
```

Bodrum doğal çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       GGACAATATC TTTCTGAAGG GCAACTGTTA TTACCAACCT
41      TCTTTCCGCC GTCCCCTATG TTGGAGGCAC TCTTGTCCAA
81      TGAATTTGAG GAGGGTTTTC AGTTGATAAT GCAACCCTGA
121     CCCGCTTCTT TGCCTTCCAT TTCCTTCTCC CCTTCGTCAT
161     TGCAGCCATA ACCATACTGC ATCTTCTGTT CCTCCATGAA
201     ACAGGCTCTA ACAACCCCCT CGGCCTAAAT TCTGACACAG
241     ATAAAATTTC TTTCCACCCA TACTTCTCAT ATAAAGACCT
281     TCTTGGATTC GCAGCTGTAA TTATCTTATT AACTTGTCTT
321     GCCCTATTCG CCCCTAATCT CCTAGGGGAC CCAGACAATT
361     TCACCCCGGC AAATCCTCTA GTTACCCCTC CTCACATTAA
401     GCCCGAGTGG TATTTCTTAT TTGCCTACGC AATTTTACGC
441     TCAATCCCTA ACAAGCTAGG AGGGGTCCTT GCCCTCTTGG
481     CCTCTATTCT AGTCCTAATG GTTGTCCCCA TTCTCCACAC
521     CTCTAAACAA CGAAGCCTCA CCTTCCGACC AG
```

İzmir kültür çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi



```
1       AGGACAAATA TCTTTCTGAG GGGCAACTGT TATTACCAAC
41      CTTCTTTCCG CCGTCCCCTA TGTTGGAGGC ACTCTTGTCC
81      AATGAATTTG AGGAGGGTTT TCAGTTGATA ATGCAACCCT
121     GACCCGCTTC TTTGCCTTCC ATTTCCTTCT CCCCTTCGTC
161     ATTGCAGCCA TAACCATACT GCATCTTCTG TTCCTCCATG
201     AAACAGGCTC TAACAACCCC CTCGGCCTAA ATTCTGACAC
241     AGATAAAATT TCTTTCCACC CATACTTCTC ATATAAAGAC
281     CTTCTTGGAT TCGCAGCTGT AATTATCTTA TTAACTTGTC
321     TTGCCCTATT CGCCCCTAAT CTCCTAGGGG ACCCAGACAA
361     TTTCACCCCG GCAAATCCTC TAGTTACCCC TCCTCACATT
401     AAGCCCGAGT GGTATTTCTT ATTTGCCTAC GCAATTTTAC
441     GCTCAATCCC TAACAAGCTA GGAGGGGTCC TTGCCCTCTT
481     GGCCTCTATT CTAGTCCTAA TGGTTGTCCC CATTCTCCAC
521     ACCTCTAAAC AACGAAGCCT CACCTTCCGA CCA
```

İzmir doğal çipura Sitokrom b bölgesine ait nükleotid dizisi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Levent DOĞANKAYA

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi : 27/10/1977

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, İspanyolca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yenimahalle Anadolu Teknik Lisesi (1994)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü (2001)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı (2004)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü (2002-)

Bilimsel Çalışmaları

Yayınları

H.H. Atar, S. Bekcan and **L. Dogankaya** 2009. Effects Of Different Hormones on Sex Reversal of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum) and Production of All-Female Populations. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 2009, 23(4), 1509-1514

Seçer, S., S. Bekcan, A. Topçu, **L. Doğankaya**, Ö. Zencir, S. Seçer ve M. Kındır 2008. Ankara Üniversitesi Sakaryabaşı Balık Üretim ve Araştırma İstasyonu'nda Tilapya

(*Oreochromis niloticus* L.) Balıklarının Yetiştirme Olanaklarının İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi. 14 (3): 203-312

Levent Doğankaya, Süleyman Bekcan 2007. Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792) Genetik Tekniklerin Uygulanması. Ziraat Mühendisliği. 348: 10-13.

Bekcan, S., **Doğankaya, L.**, Çelik Çakıroğulları, G. 2006. Growth and Body Composition of European Catfish (*Silurus glanis* L.) Fed Diets Containing Different Percentages of Protein. The Israeli Journal of Aquaculture, BAMIDGEH. Volume 58 (2): 137-142.

Atar, H.H. ve **Doğankaya, L.** 2006. AB'ye Doğru Su Ürünleri Sektörünün Durumu. Ziraat Mühendisliği. 346: 4-9.

Yavuzcan, H., Meriç, İ., **Doğankaya, L.** 2005. Fresh Water Hatcheries Raising Rainbows in Turkey. Hatchery International. Volume 6 (3) May-June. 25-29

Yavuzcan, H., Meriç, İ., **Doğankaya, L.** 2005. Marine Fish Hatcheries in Turkey. Hatchery International. Volume 6 (2) March-April. 13-15

Proje Çalışmaları

Türkiye'de Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarının Kültür ve Doğal Populasyonları Arasındaki Filogenetik Farklılıkların Mitokondriyal Gen Bölgelerinin DNA Dizi Analizleri ile Tanımlanması Destekleyen: TÜBİTAK (2008-2009)

Ankara Üniversitesi Sakaryabaşı Balık Üretim ve Araştırma İstasyonunda Tilapya (*Oreochromis niloticus* L.) Balıklarının Yetiştirme Olanaklarının İncelenmesi Destekleyen : BAP (2006-2007)

Farklı Hormonların Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Cinsiyet Dönüşümüne Etkisi ve Dişi Populasyon Üretimi Destekleyen : TÜBİTAK (2005-2008)

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Hijran Yavuzcan, Serap Pulatsü, Nilsun Demir, Mine Kırkağaç, Süleyman Bekcan, Akasya Topçu, **Levent Doğankaya**, Nadir Başçınar. Türkiye'de Sürdürülebilir Su Ürünleri Yetiştiriciliği. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi 11-15/Ocak/2010 Ankara.

Doğankaya, L. ve Bekcan, S. 2009. Türkiye'nin Akdeniz Kıyılarındaki Kültür ve Doğal Çipura (*Sparus aurata*) Popülasyonlarının Filogenetik Analizi. XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 13-16 Aralık 2009 Antalya.

Levent Doğankaya 2009. Transgenik Organizmaların Su ürünleri Sektöründeki Yeri. XV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu "Ekosistem Yaklaşımlı Su Ürünleri Üretimi" 01-04 TEMMUZ 2009 Rize.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Levent Doğankaya, Akasya Topçu 2010. Natural Astaxanthin Sources for Organic Aquaculture. International Conference on Organic Agriculture in Scope of Environmental Problems. 03-07 February 2010 Famagusta, Cyprus Island.

B. Gómez-Gil, **L. Dogankaya**, D. Furones, N. Duncan, E. Salas, I.García de la Banda, J.P. Cañavate, A. Roque 2008. Análisis de vibrios aislados del lenguado (*Solea senegalensis*) obtenidos de tres localidades en España. VII Reunion Cientifica Microbiologia Del Medio Acuatico. 25-27 Septiembre 2008 Bilbao, España