

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KARADENİZ'İN TÜRKİYE KIYILARINDA DAĞILIM GÖSTEREN  
MERSİN BALIĞI TÜRLERİNİN  
( *Acipenser stellatus* PALLAS, 1771, *Acipenser gueldenstaedtii* BRANDT, 1833,  
*Huso huso* LINNAEUS, 1758 )  
MİTOKONDRIAL DNA SEKANS ANALİZİ YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zir. Müh. Oğuzhan EROĞLU**

**TEMMUZ 2008  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KARADENİZ'İN TÜRKİYE KIYILARINDA DAĞILIM GÖSTEREN  
MERSİN BALIĞI TÜRLERİNİN  
( *Acipenser stellatus* PALLAS, 1771, *Acipenser gueldenstaedtii* BRANDT, 1833,  
*Huso huso* LINNAEUS, 1758 )  
MİTOKONDRIAL DNA SEKANS ANALİZİ YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI**

**Zir. Müh. Oğuzhan EROĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce  
"Balıkçılık Teknolojisi Yüksek Mühendisi"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06.06.2008  
Tezin Savunma Tarihi : 08.07.2008**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bilal KUTRUP  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hamdi ÖĞÜT**

**Enstitü Müdür V. : Pof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**Trabzon 2008**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı kapsamında yürütülmüştür. Bu çalışma TKB Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne yürütülen “Türkiye Mersin Balıklarının Populasyonlarının Mevcut Durumlarının Belirlenmesi Projesi-Genetik İşpaketi” kapsamında yürütülen çalışmaların bir kısmını içermektedir. Bu çalışma Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü imkanları ile yürütülmüştür.

Türkiye de bir çok balık türünde olduğu gibi Mersin Balığı genetiği ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile ön çalışma niteliğinde bir başlangıç yapma fırsatı bulunmuştur. Bu çalışmanın balık genetiği ve özellikle Mersin Balığı ile ilgili çalışma yapacak araştırmacılara yardımcı olmasını temenni ederim.

Tez çalışmam için yardım ve desteğini esirgemeyerek tez danışmanlığımı üstlenen değerli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ’a ve çalışmanın başından sonuna kadar hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ’ye ve bu çalışmada emeği geçen tüm proje ve Enstitü personeline teşekkürler.

Sevgili eşim Münevver hanım ve biricik oğlum ALPEREN’e ve onların nezdin de tüm aileme vermiş oldukları destek için ayrıca çok teşekkür ederim.

Oğuzhan EROĞLU

Trabzon 2008

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar (ÇİZELGELER) DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	
1.2. Taksonomi.....	3
1.3. Genel Biyolojik Özellikler .....	4
1.4. Coğrafik Dağılım .....	6
1.4.1. Türkiye Sularında Bulunan Türler ve Mevcut Durumu.....	7
1.4.1.1 Türkiye Sularında Bulunan Türler .....	7
1.4.1.1.1 Mersin Morinası ( <i>Huso huso</i> ) .....	8
1.4.1.1.2 Karaca Mersin Balığı ( <i>A. gueldenstaedtii</i> ).....	8
1.4.1.1.3 Sivrişka Mersin Balığı ( <i>A. stellatus</i> ) .....	9
1.4.1.2 Türkiye Populasyonlarının Mevcut Durumu .....	10
1.5. Hayat Döngüsü, Göç ve Üreme .....	11
1.6. Ekonomik Önemi .....	15
1.6.1. Yetiştiricilik.....	15
1.6.2. Avcılık.....	16
1.7. Filogenetik .....	17
1.8. Orijin .....	21

1.9.	Sitogenetik .....	22
1.10.	Genetik Varyasyon ve Belirlenmesi .....	24
1.10.1	Genetik varyasyonun tahmininde kullanılan teknikler .....	25
1.10.1.1	Protein Elektroforezi .....	25
1.10.1.2	DNA Belirteç Sistemleri .....	26
1.11.	Mitokondrial DNA .....	28
1.12	Filogenetik’de Kullanılan Metotlar, Model Seçimi ve Güvenirlik Testi .....	31
1.13.	Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı .....	34
1.14.	Önceki Çalışmalar .....	35
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	41
2.1.	Çalışma Sahası .....	41
2.2.	Örnekleme .....	42
2.3.	Toplam DNA’nın Elde Edilmesi. ....	43
2.4.	DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi .....	46
2.5	DNA Yoğunluğunun Ayarlanması .....	47
2.6.	DNA’nın Çoğaltılması .....	47
2.7.	PZR Ürün Bantlarının Görüntülenmesi .....	50
2.8.	Heteroplazmi ve Boy Varyasyonu .....	51
2.9	Sekans için PZR Ürününün Saflaştırılması.....	51
2.10	PZR Ürününün Sekansı.....	51
2.11	Sekans Verilerinin Analizi .....	53
2.11.1	Çoklu sekans Hizala (Alingment) .....	53
2.11.2	Sekans Profilinin Çıkarılması .....	55
2.11.2.1	Boy Varyasyonlarının Karşılaştırılması.....	55
2.11.2.2.	Haplotip ve Nükleotid Çeşitliliği .....	56
2.11.2.3.	Aminoasit Dizilimi.....	57
2.11.3	Filogenetik Analizler, Evrimsel Model Seçimi ve Topoloji Oluşturma .....	57
2.11.4	Genetik Farklılığın Belirlenmesi.....	58
2.11.5	Gen Akışının Hesaplanması.....	59
2.11.6	Moleküler Saat .....	59

2.11.7	Evrimsel Hipotezlerin Test Edilmesi .....	61
2.11.7.1	Tajima'nın Testi .....	61
2.11.7.2	McDonald-Kreitman Testi .....	62
2.12	Kesim Şekillerinin Belirlenmesi .....	62
3.	BULGULAR .....	63
3.1.	DNA Eldesi ve Gen Bölgelerinin Çoğaltılması .....	63
3.2.	Cyt-b Geni Sekans Analizi .....	65
3.2.1	Çoklu Sekans Hizalama ve Sekans Profilinin Çıkarılması .....	65
3.2.2.	Boy Varyasyonlarının Karşılaştırılması .....	67
3.2.3.	Haplotip Verilerinin Analizi .....	67
3.2.3.1	Haplotip Dağılımı .....	67
3.2.3.2	Haplotip Çeşitliliği .....	69
3.2.4	Nükleotid Verilerinin Analizi .....	70
3.2.4.1	Nükleotid Dağılımı .....	70
3.2.4.2	Nükleotid Çeşitliliği (Pi) .....	72
3.2.4.3	Nükleotid Farklılığı (k) .....	73
3.2.5	Türler İçin Ayırt Edici Restriksiyon Enzimlerin Belirlenmesi .....	77
3.2.6	Aminoasit Çeşitliliği .....	78
3.2.7	Tür İçi ve Türler Arası Genetik Farklılığın Belirlenmesi .....	80
3.2.7.1	Gen Akışının Hesaplanması .....	83
3.2.8	Moleküler Saat .....	86
3.2.9.	Evrimsel Hipotezlerin Test Edilmesi .....	88
3.2.9.1	Tajima'nın Testi .....	88
3.2.9.2	McDonald-Kreitman Testi .....	88
3.2.10.	Filogenetik Analizler .....	90
3.2.10.1.	Model Seçimi .....	90
3.2.10.2	Filogenetik Yapılanma .....	91
3.3	tRNA <sup>Pro</sup> - Dloop Geni .....	100
3.3.1	Heteroplazmi ve Boy Varyasyonu .....	100
3.3.2	Sekans Analizi .....	104

4.	TARTIŞMA .....	110
4.1.	Haplotiplerin Dağılımı ve Haplotip Çeşitliliği .....	110
4.2.	Nükleotid Verileri .....	112
4.2.1	Nükleotid Dağılımı .....	112
4.2.2	Nükleotid Çeşitliliği .....	114
4.2.3	Nükleotid Farklılığı.....	115
4.3.	Aminoasit Çeşitliliği .....	116
4.4.	Tür İçi ve Türler Arası Genetik Farklılık.....	117
4.5.	Filogenetik Analizler .....	119
4.6.	Evrimsel Senaryo ve Moleküler Saat .....	124
4.7.	Heteroplazmi ve Boy Varyasyonu .....	126
4.8.	Kesici Enzimler Kullanarak Türlerin Belirlenmesi .....	129
5.	SONUÇLAR .....	132
6.	ÖNERİLER .....	135
7.	KAYNAKLAR .....	136
	ÖZGEÇMİŞ	

## ÖZET

Mersin balıklarının Tethis Denizi kökenli olduğu ve farklılaşma merkezinin Karadeniz olduğu düşünüldüğünde Türkiye çok önemli bir yere sahiptir. Türün tehlikede olmasından dolayı son yıllarda koruma ve yetiştiricilik faaliyetleri hız kazanmıştır. Karadeniz'deki mersin balığı türleri hakkında yapılmış çalışmalar bulunmasına rağmen Türkiye kıyılarından örnekleme yapılmamıştır.

2005-2007 yılları arasında Türkiye kıyılarından örneklenen 3 türe ait (*Acipenser stellatus*, *A. gueldenstaedtii*, *H. huso*, *A. baerii*/benzeri) 82 bireyde mtDNA tRNA<sup>pro</sup>-D-loop geni boy varyasyonu ve heteroplazmi oranlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca 28 örnekte Cyt-b geni sekans verilerinden genetik mesafeler ve filogenetik dendogramlar oluşturulmuş ve kladistik analizler yapılmıştır.

Cyt-b geninde 19 haplotip ve % 81,8 - % 96,4 arasında değişen haplotip çeşitliliği belirlenmiştir. Türler arasında 7 yerde aminoasit kodlamasında değişim meydana geldiği belirlenmiştir. A+T oranı tüm türler için %52,6 ila 53,8 arasında bulunmuştur. Ti/Tv oranı *A. gueldenstaedtii*'de (9:1), *A. stellatus*'ta (7:2) ve *Huso huso* için (6:0) olarak bulunmuştur. Nükleotid çeşitliliği ve nükleotid farklılığının sırasıyla %0,167 - %0,378 ve 1,89 – 4,2 arasında değiştiği belirlenmiştir. Türler arası mesafe Kimura-2 parametresine göre % 1,258 – 5,288 arasında hesaplanmıştır. Filogenetik ağaçlar sonucunda %100'lük seç-bağla değeri ile türler ayrılmıştır.

Karadeniz'de 1 adet *A. baerii*/benzer birey tespit edilmiştir. *A. gueldenstaedtii* örneklerinin Karadeniz soy grubu içerisinde yer aldığı ve 2 farklı gruba (A ve B) ayrıldığı belirlenmiştir. Benzer olarak *A. stellatus* örneklerinin de 2 gruba (S1 ve S2) ayrıldığı tespit edilmiştir. *H. huso* örneklerinde ayrılma görülmemiştir. Tüm türlerde heteroplazmik bireyler görülmüştür (%2,17-45,45) ve her tür için tekrar bölgesinin sayısı 2-6 olarak belirlenmiştir. Tekrar bölgesinin uzunluğu 82 bp olarak belirlenmiştir. En çok görülen tekrar ise % 39,5 ile 3 tekrarlı yapı olmuştur. Boy varyasyonu (Gıp) 0,656 -0,9871 olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler** : Mersin Balığı, Türkiye, Karadeniz, mtDNA, Sekans analizi, Filogenetik, Heteroplazmi, Boy varyasyonu,



## SUMMARY

### **Characterization of Three Sturgeon Species (*A. stellatus* Pallas, 1771, *A. gueldenstaedtii* Brandt, 1833, *H. huso* Linnaeus, 1758 ) by mtDNA Sequence Analysis from Black Sea Coasts of Turkey**

It has been assumed that sturgeons originated from Tethys Sea and the Black Sea is the most important diversification center for them. Hence Turkey has a significant place through history. Recently, aquaculture and conservation activities have been increased due to being endangered species. Although there are some genetic studies about sturgeon species inhabiting the Black Sea, these studies have not included samples from Turkey.

In this study, length variation and heteroplasmy rates were determined from control region (D-loop) of mtDNA of 3 sturgeon species (n = 82), collected from Turkish coast of the Black Sea between 2005 and 2007. Besides, 28 specimen Cyt-b gene sequences were used to investigate phylogenetic relationship, and find out cladistic positions and genetic variation.

Nineteen haplotypes and haplotypes diversity ranging from 81.8% to 96.4% were detected from Cyt-b sequences. Amino acid sequence changes were determined on 7 codon among species. Studied A+T rates were found between 52.6 and 53.8% for all species. Ti/Tv rates were estimated for each species; *A. gueldenstaedtii* (9:1), *A. stellatus* (7:2), and *H. huso* (6:0). Nucleotide diversity and nucleotide differences calculated for three species varied from 0.167 % - 0.378 % and 1.89 - 4.2 respectively. Genetic distances were calculated (1.258 - 5.288 %). Each species were separated between by phylogenetic reconstruction with high bootstrap value (100%). *A. baerii*/like individual in *A. gueldenstaedtii* samples from the Black Sea were found. All our *A. gueldenstaedtii* samples replaced in the Black Sea Linage and were separated 2 clades (A and B). Similarly *A. stellatus* samples were separated into 2 clades but *H. huso* samples were not separated. In each species heteroplasmic individuals (2. 17 - 45.45 %) and repeat units ranging from 2 to 6 with 82 bp length copies were observed. The most observed repeat units rate was 41.5% in 3 repeats morph. Length variation GIP were found between 0.656 -0.9871.

**Key Words** : Sturgeon, Turkey, Black sea, mtDNA, Cyt-b, Sequence Analysis, Phylogenetics, Heteroplasmy, Length Variation

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Mevcut Acipenseriformların biyocoğrafik dağılımını gösteren harita .....	7
Şekil 1.2. Mersin Morinası ( <i>Huso huso</i> LINNAEUS, 1758).....	8
Şekil 1.3. Karaca Mersini ( <i>Acipenser gueldenstaedtii</i> BRANDT, 1833) .....	9
Şekil 1.4. Sivrişka Mersin ( <i>Acipenser stellatus</i> PALLAS, 1771) .....	10
Şekil 1.5. Mersin türlerinin ilk cinsi olgunluk yaşı (yıl) ve yumurtlama periyodu (yıl) .....	12
Şekil 1.6. Mersin Balığının hayat döngüsü (göç) modeli .....	14
Şekil 1.7. Yaşayan balıklar için Morfolojik karakterler üzerinden yapılmış sınıflandırma (Bemis vd. (1997a)'den modifiye edilmiştir). .....	18
Şekil 1.8. Morfolojik-morfometrik veriler (a) ve farklı iskelet ve kemik özellikleri (b) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar.....	19
Şekil 2.1. Örneklem alanları ve örneklerin türlere göre oransal dağılımı .....	41
Şekil 2.2. DNA eldesinde kullanılan bazı aletler .....	44
Şekil 2.3. Spektrofotometre. ....	46
Şekil 2.4. Çoğaltılan gen bölgeleri (Brown, 1992 den modifiye edilmiştir).....	47
Şekil 2.5. PZR işleminin gerçekleştirildiği termal cycler .....	49
Şekil 2.6. Jel görüntüleme ünitesi (a) ve elektroforez (b) .....	50
Şekil 3.1. Primer tutunma (annealing) sıcaklığının 54-44 °C aralığında denenmesi ile elde edilen PZR ürünün agaroz jel üzerinde yürütülmüş elektroforetik görüntüsü .....	63
Şekil 3.2. Her bir tür için çoğaltılan Cyt-b gen bölgesi (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci, 2. kolon <i>A. stellatus</i> , 3. kolon <i>A. gueldenstaedtii</i> , 4.kolon <i>H. huso</i> .....	64
Şekil 3.3. Cyt-b geni için saflaştırılarak jel üzerinde koşturulmuş sekansa hazır bazı örnekler .....	65
Şekil 3.4. Cyt-b geni sekans analizine ait görüntü .....	66
Şekil 3.5. Moleküler saat uygulamalı Maksimum olasılık dendogramı .....	87
Şekil 3.6. Tüm örneklerin cty-b gen sekans verilerinden oluşturulmuş Maksimum parsimoni (MP) dendogramı.....	92
Şekil 3.7. Tüm örneklerin Cyt-b gen sekans verilerinden oluşturulmuş UPGMA Dendogramı (nodlar üzerindeki oranlarda %50 üzeri değerler kabul edilmiştir).....	93

Şekil 3.8. Maksimum Olasılık metodu ile oluşturulmuş dendogram.....	94
Şekil 3.9. Tüm örneklerin Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş köksüz dendogram .....	95
Şekil 3.10. <i>A. gueldenstaedtii</i> örnekleri için Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş MP (a) ve UPGMA (b) dendogramları (seç-bağla değeri > %50).....	96
Şekil 3.11. <i>A.stellatus</i> örnekleri mt Cyt-b gen sekans verilerinden oluşturulmuş MP(a) ve UPGMA (b) dendogramları (seç-bağla değeri > %50) .....	97
Şekil 3.12. <i>H. huso</i> örnekleri için Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş MP (a) ve UPGMA (b) dendogramı (seç-bağla değeri > %50) .....	98
Şekil 3.13. Tüm örnekler ile genbanktan alınan mersin türlerine ait Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş UPGMA dendogramı .....	99
Şekil 3.14. Bazı <i>H. huso</i> örnekleri için görülen boy farklılığı (1. Kolon 100 bp DNA.....	100
Şekil 3.15. Bazı <i>A. stellatus</i> örnekleri için görülen boy farklılığı ve Heteroplazmi (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci).....	102
Şekil 3.16. Bazı <i>A. gueldenstaedtii</i> örnekleri için görülen boy farklılığı ve Heteroplazmi (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci) .....	102
Şekil 3.17. Her üç tür için görülen tekrar sayısı ve frekansı .....	103

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Acipenseriform türleri ve dağılım gösterdikleri 9 biyocoğrafik bölge .....	6
Tablo 1.2. Türlerin kromozom sayılarına göre dağılımı .....	23
Tablo 1.3. Genetik çalışmalarda kullanılan belirteç tipleri, özellikleri ve potansiyel uygulama sahaları.....	27
Tablo 2.1. Örneklenen türler ve örnekleme yerleri (örnek numaraları ile verilmiştir).....	42
Tablo 2.2. DNA Elde Etme Protokolü.....	45
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları.....	48
Tablo 2.4. Sitokrom b ve tRNA <sup>pro</sup> -D-loop bölgelerinin çoğaltılması için belirlenen PCR karışımının bileşenleri ve miktarları .....	48
Tablo 2.5. Çalışmada kullanılan primerler için belirlenen PCR programları.....	49
Tablo 2.6. PZR ürünün direkt ve agaroz jelden saflaştırılması protokolü.....	52
Tablo 2.7. Genbank'dan alınarak filogenetik dendogram oluşturmada kullanılan türler, lokaliteleri ve acs.numaraları.....	54
Tablo 3.1. Cyt-b Sekansında farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotid yerleri .....	68
Tablo 3.2. Tür içi ve türler arası gözlenen haplotipler ve frekansları .....	69
Tablo 3.3. Türler'e göre haplotip çeşitliliği (%), varyansı ve standart sapması .....	69
Tablo 3.4. Türler'e göre nükleotid frekansları(%) ve Transisyon/Transversiyon (ti:tv) oranı.....	70
Tablo 3.5. Çalışılan Mersin Balığı türleri örneklerine ait Cyt-b geni nükleotid frekansları .....	71
Tablo 3.6. Tür için nükleotid çeşitliliği (Pi) (Sinonim, nonsinonim, toplam ) değerleri ve Pia/Pis oranları .....	72
Tablo 3.7. Türler arası hesaplanmış Pit (toplam), Pia (sinonim), Pis (sinonim olmayan) ve Pia/Pis değerleri.....	73
Tablo 3.8. Tür içi nükleotid farklılığı, sinonim ve nonsinonim farklılık sayıları ve pozisyonları .....	73
Tablo 3.9. Türler arası karşılaştırılmalar ile oluşturulmuş kt (toplam), ks (sinonim), ka (sinonim olmayan) ve ka/ks değerleri .....	75

Tablo 3.10	Türler arası farklılık gösteren nükleotid pozisyonları ve özellikleri .....	76
Tablo 3.11.	Her bir türün belirlenmesinde kullanılabilecek kesim yerleri ve enzimler .....	77
Tablo 3.12.	Çalışılan Mersin Balığı türleri örneklerine ait Cyt-b geni sekans verilerinden elde edilen aminoasit frekansları.....	79
Tablo 3.13.	Tür içi ve türler arası amino asit varyasyonu ve özellikleri.....	80
Tablo 3.14.	Türler Arası AMOVA analizi sonuçları (Kimura 2P).....	81
Tablo 3.15.	Tür içi ve türler arası Fst değerleri ve üste P değerleri (Kimura 2P) .....	81
Tablo 3.16.	Türler arası mesafe (Kimura 2P) .....	82
Tablo 3.17.	Kimura 2 parametresine göre Gamma düzeltmesi kullanılarak türler ve dış grup ( <i>Polyodon spathula</i> ) arasındaki genetik mesafe (gamma değeri: 0,05) .....	82
Tablo 3.18.	Tür içi Kimura 2 mesafeleri (düzeltmesiz ve gamma değeri 0.05'e göre) .....	83
Tablo 3.19	Türler arası gen akış oranı .....	83
Tablo 3.20.	<i>A. gueldenstaedtii</i> türü örnekleri ve <i>Polyodon spathula</i> arası mesafeleri (K2P) (gamma düzeltmeli değer üste) .....	84
Tablo 3.21.	<i>A. stellatus</i> türü örnekleri ve <i>Polyodon spathula</i> arası mesafeleri (K2P) (gamma düzeltmeli değer üste) .....	85
Tablo 3.22.	<i>H. huso</i> türü örnekleri ve <i>Polyodon spathula</i> arası mesafeleri (K2P) (gamma düzeltmeli değer üste) .....	85
Tablo 3.23.	Farklı mutasyon hızları için hesaplanan türler arası ayrılma zamanları.....	86
Tablo 3.24.	Tajima'nın Nötralite testi sonuçları.....	88
Tablo 3.25.	McDonald ve Kreitman Testi Tablosu .....	89
Tablo 3.26.	Veriler için hesaplanan TrN+G model parametreleri.....	90
Tablo 3.27.	Her bir tür için Dloop bölgesinde görülen tekrar sayıları ve heteroplazmi (örnek numaraları ile gösterilmiştir).....	101
Tablo 3.28.	Görülen boy farklılığı, tekrar sayıları ve boy varyasyonu .....	103
Tablo 3.29	<i>H.huso</i> 'da tRNA <sub>pro</sub> -Dloop bölgesinde görülen tekrar bölgeleri ve TAS motifler .....	105
Tablo 3.30	<i>A. gueldenstaedtii</i> 'de tRNA <sub>pro</sub> -Dloop bölgesinde görülen tekrar bölgeleri ve TAS motifler .....	107

Tablo 3.31	<i>A. stellatus</i> 'da tRNA <sub>pro</sub> -Dloop bölgesinde görülen tekrar bölgeleri ve TAS motifler .....	109
Tablo 4.1.	Farklı canlılar için Cyt-b nükleotid frekansları .....	113

## SEMBOLLER DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
AIC	Akaike Bilgi Kriteri
BIC	Bayesian Bilgi Kriteri
bp	Baz çifti
$F_{ST}$	Genetik farklılık değeri
mtDNA	mitokondriyal DNA
$N_e$	Etkili popülasyon büyüklüğü
NJ	Komşu Katılım Algoritması
OD	Optik Densite
OTÜ	Operasyonel Taksonomik Ünite
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
QTL	Kantitatif Karakter Lokus
RAPD	Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
TAS	Uç Bölge İle İlgili Sekans
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Ağırlıksız Çiftli-Grup Aritmetik Ortalama
$V_a$	Gruplar arası varyans bileşeni
$V_b$	Popülasyonlar arası (gruplar içi) varyans bileşeni
$V_c$	Popülasyonlar içi varyans bileşeni

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Acipenseriform grubunun (mersin balıkları ve paddlefish) bugün yaşayan 27 türü mevcuttur ve Jurasik dönemden günümüze kadar ulaşan balıkların en eski bir grubudur (Grande ve Bemis, 1991). Karadeniz’de ise 6–7 türün yaşadığı belirtilmiştir. Mersin balıkları tatlı su balıkları içerisinde anlaşılması en güç balıklardandır. Beyaz Mersin Balığı (*Acipenser transmontanus*) Kuzey Amerika’nın, kolon balığı (*Huso huso*) ise Avrupa ve Asya’nın en büyük tatlı su balıklarındandır. Mersin balıklarının birçok türü dere ve nehirlerden, denizler ve okyanuslara akıntı ile göç ederler. Bu alanlarda beslenirler ve cinsi olgunluğa ulaştıktan sonra üremek için dere ve nehirlere dönerler (diadrom). Yalnızca birkaç mersin türü (örneğin Kuzey Amerika Göl Mersini, *Acipenser fulvescens*) anadrom değildir, fakat onlarda tatlı sularda yoğun bir göç gerçekleştirirler.

Tarih boyunca mersin balığı değerli bir balık olagelmiştir. Çin de imparatorlara hediye olarak gönderilirken (Qiwei vd.,1997), Büyük Britanya’da ise kral balığı olarak tanınmıştır. Ortaçağ İngiltere’sinde kral II. Edward “İngiltere sularında kim mersin balığı yakalarsa feodal lordlara gönderilmesi zorunludur” şeklinde ki fermanından sonra Atlantik Mersini (*Acipenser oxyrinchus*), İngiltere de “Kral Balığı” unvanını almıştır (Ludwig, 2006).

Mersin balığının eti ve yumurtası (siyah havyar) balık ürünleri arasında çok yüksek fiyata sahiptirler. Bu nedenle uzun yıllardır ticareti yapılmaktadır. Holcik (1989a,b), 1976-1983 yılları arasında dünya genelinde ortalama Mersin Balığı avcılığı 28,911 ton olduğunu belirtmiş ve bunun % 90’dan fazlası Eski Sovyetler Birliği (USSR), % 5 İran, % 2 ABD sularından ve geri kalan kısım dünyanın diğer bölgelerinde yakalanmaktadır. Ülkemizde ise 1960’lı yılların sonlarına doğru 300 tonun üzerinde karaya çıkarılan av miktarı, 1970 yılında yaklaşık 30 tona düşmüştür. 1975 yılı sonrasında yıllık karaya çıkarılan mersin balığı miktarı 10 ton civarındadır (Ustaoğlu ve Okumuş vd., 2004).



Bugün neredeyse tüm mersin türleri tehdit altında, tehlikede yada koruma altındadır (Birstein vd., 1997a). Populasyonlardaki dramatik düşüşün belirlenmesi için çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Mersin balıkları, uzun yaşam süreleri, üreme dönemine erişmeden önce çevresel bozulmalar ve av **baskısı** nedeniyle Kuzey yarım küre ekosistemi balık topluluklarının en hassas üyelerinden biridir. Mersin Balığı yavaş büyür ve geç cinsi olgunluğa ulaşır. Bu yüzden ilk üreme yaşlarından önce birçok riske karşı hassastırlar. Büyük vücutları ve bilinen göç yolları nedeni ile özellikle yumurtlayan yetişkinler insanlar tarafından kolayca avlanabilmektedirler. Aynı zamanda sığ yumurtlama alanlarına ve hızlı akan akarsulara bağımlılıkları birtakım çevresel faktörlerin etkisine maruz kalmalarına neden olmaktadır (Bemis ve Kynard, 1997; Auer, 1996). Akarsular üzerine inşa edilen barajlar balıkların göçlerini engelleyebilmekte yada akarsuların akış rejimlerinin değiştirilmesi mersin balıklarının başarılı bir şekilde üreyebilmeleri için gerekli su akış rejimini bozabilmektedir (Auer, 1996). Ülkemizde de görülen en büyük problemlerden bir tanesi doğal yumurtlama alanlarının bozulmasıdır. Mersin balığı türlerinin uzun yaşam evreleri onları “çevresel indikatör” canlı yapmaktadır. Fakat doğa bilimcileri tarafından bu balıkların toplumsal ve ekolojik önemi yeterince fark edilememiştir. Mersin balıklarının çok uzun hayat dönemlerine sahip olmasından dolayı stoklarının yönetilmesi de çok zordur. Zira bir planın uygulamaya konulduktan sonra, bu planın doğruluğu konusunda sonuç alabilmek için uzun yıllar gerekmektedir.

Bu balıklar üzerine yapılan ilk çalışmalar klasik tanımlayıcı konular üzerine odaklanmıştır. Balık stoklarının tespitinde boy-yaş dağılımı ve bazı stokların genetik tanımlanması populasyon biyologlarının yürütmüş oldukları bilimsel çalışmaları için temel teşkil eder (Ferguson ve Duckworth, 1997). Mersin Balıklarının filogenetik ve taksonomik ilişkileri üzerine çok az miktarda yapılmış çalışılma bulunmaktadır. Koruma stratejisinin geliştirilmesi için taksonomik durumun tanımlanmasına ihtiyaç vardır (Birstien vd., 1997a).

Bu çalışma tüm bu konulara destek sağlamak amacı ile yürütülmüştür. Bu bağlamda farklı Avrasya türlerinden doku örnekleri alınarak moleküler-genetik belirteçlerin kullanılmasıyla Türkiye'nin Karadeniz kıyılarındaki türlerin tanımlanması, türler arasındaki taksonomik düzeylerin ortaya konulması, özellikle literatürde ki tartışmalı konulardan mersin balığı türlerinin filogenetik yapıları hakkında problemlerin muhtemel çözümlerinin ortaya konulması ve ileride yapılacak Türkiye akarsularında üreyen bir stok olup olmadığı yönündeki bir çalışmaya temel oluşturması amaçlanmıştır.

## 1.2. Taksonomi

- Sınıf : Balıklar (Pisces)
- Alt sınıf : Tükel ağızlılar (Teleostomi)
- Takım : Kıkırdak iskeletliler (Chondrostei)
- Grup : Acipenseriformes
- Familya : Acipenseridae (Mersingiller)
- Cins : Huso (Büyük mersin balıkları)
- Türler : 2 tür
1. *Huso huso* Linnaeus, 1758 Mersin morinası
  2. *Huso dauricus* Georgi, 1775
- Cins : Acipenser ( Mersin balıkları )
- Türler : 17 tür
1. *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758 - Kolan balığı,
  2. *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 Çoka balığı,
  3. *Acipenser nudiventris* Lovetzky, 1828 - Şip balığı,
  4. *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833- Rus mersini (Karaca balığı),
  5. *Acipenser stellatus* Pallas, 1771 – Sivrişka Mersin balığı,
  6. *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836 - Adriyatik mersini,
  7. *Acipenser brovirostris* Le Sueur, 1818
  8. *Acipenser baerii* Brandt, 1869
  9. *Acipenser dahryanus*,
  10. *Acipenser fulvescens* Rafinesque, 1817
  11. *Acipenser medirostris* Ayres, 1854
  12. *Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892
  13. *Acipenser oxyrinchus* Mitchill, 1815
  14. *Acipenser persicus* Borodin, 1897
  15. *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869
  16. *Acipenser sinensis* Gray, 1834
  17. *Acipenser transmontanus* Richardson, 1836

### 1.3. Genel Biyolojik Özellikler

Mersin Balıkları kıkırdaklı iskelet yapısı, gutda bir spiral kapakçık, heteroserk kuyruk, inferior ağız ve iyi gelişmiş bir rostrum ile karakterize edilir (Sokolov ve Berdichevskii, 1989a,b). Mersin balıklarında vücut köpek balığına benzemektedir. Yüzgeçler kıkırdak ışınlarla desteklenmiştir. Genellikle sırt tarafları koyu esmer, boz veya siyaha yakın olup, yan tarafları biraz daha açık renktedir. Karın tarafları ise beyaz ve yer yer gümüş parlaklığı gösterir.

Burun uzamış, ağız yuvarlak, dişsiz, aşağı bakışlı ve bir nevi hortum şeklindedir. Ağız önünde ve burun uzantısının altında, enine bir çizgi üzerinde aşağıya sarkık dört adet bıyık bulunur. Bıyıklar bazı türlerde düz yada yuvarlak olup bazı türlerde üzerlerinde küçük püsküller (ince kıllar) taşırlar. Gerek bu özellikleri, gerekse bıyıkların yönleri türlerin ayırımında kullanılmaktadır. Baş kemiksi bir deriyle zırh şeklinde kaplanmıştır. Kuyruk yüzgecinin üst parçası uzamıştır. Sırtta bir, yanlarda birer ve karında iki sıra olmak üzere beş sıra kemik plaka bulunur.

Mersin balıkları anadrom, diadrom yada potamodrom olabilirler. Kuzey Amerika ve Avrasya (Eurasian) bölgesinde (Kuzey yarım kürede) dağılım gösterirler. Bazı türleri bütün hayatını tatlı sularda geçirirken, bazı türler belli boya ulaştıktan sonra acısı su veya denizlere göç ederler ve genellikle kıta sahanlığında kalırlar. Tuzlu okyanus sularından nehirlerle, serin göllere ve ırmaklara kadar, çok değişik su koşullarına girebilmekte ve adapte olabilmektedirler. Bu balıkların Asya, Avrupa ve Amerika'da 27 türü olduğu belirtilmektedir. Bu türlerden birkaçının türler arası melez olma ihtimali üzerinde de durulmaktadır. Nitekim doğada bazı türler arasında melez döller meydana gelebilmekte ve oldukça değişik özellik göstermektedirler (Bemis ve Kaynar 1997; Bemis vd., 1997a; b ve Chounhury ve Dick, 1998).

Mersin balıkları çoğunlukla omurgasızlar (sinek larvaları, kurtlar, yumuşakçalar ve kabuklular) ve küçük balıklar (hamsi, ringa vb.) ile beslenmektedir. Avını ağız etrafındaki bıyıkları ile ararlar ve uzayabilir ağız yapısı ile toplarlar yada Kuzey Amerikan paddlefish deki gibi solungaç dikenleri ile zooplanktonları süzerek beslenirler.

Mersin balıkları ve paddlefishlerin diğer bazı önemli hayat karakteristiklerine bakıldığında; uzun yaşam süresine sahiptirler (30–40 yıl), bazı kaynaklara göre 100 yaşına kadar yaşayabilmektedirler. Çok büyük cüseye ulaşabilecek büyüme potansiyeline sahiptirler. Mersin balıkları ekonomik balıklar içerisinde en büyük balıklardır. Bazı

türlerde uzunluk 6 m ye ve ağırlık 1,0–1,5 tona kadar ulaşmaktadır. Cinsi olgunluk yaşları çok uzun olup, dişiler doğada olgunlaşma öncesi 10–20 yıla ihtiyaç duyarlar. Ayrıca bu uzun ömürleri boyunca sürekli döl verip vermedikleri bilinmemekle birlikte mersin türlerinin birçoğu her yıl yumurta vermemektedir.

Yaşayan ve fosil bütün mersin türleri Acipenseriform grubu içerisinde sınıflandırılır (Birstein vd., 1997a). Bu grubun cinsleri ise şunlardır;

Huso; solungaç filamentleri birbiriyle birleşmiş durumdadır ve isthmus altına tutunan serbest bir şekilde yer alır. Burun kısa ve gittikçe incelen bir yapıdadır. Ağız çok geniş, hilal şeklinde ve hareket ileriye doğrudur. Bıyıklar lateral olarak düzleşmiş ve burun ucuna göre ağza daha yakın bir durumda yer almaktadır. Solungaç dikenleri çubuk benzeridir (Findeis, 1997). Huso türleri 6 metre boy ve 1.000-1.500 kg ağırlığa ulaşabilen büyük, pelajik ve avcı bir balıktır. Huso genusu 2 türe sahiptir. Bunlardan birincisi Morina (beluga) *Huso huso*, Linnaeus, 1758; bu türün anavatanı Karadeniz ve Hazar sularıdır ve diadrom bir türdür. Diğer türü ise kaluga, *Huso dauricus*, Georgi, 1775; anavatanı Amur Nehri (Çin ve Rusya) sularıdır.

Acipenser; solungaç filamentleri birbirinden kopuk ve isthmusla bağlı olması ile karakterize olurlar. Ağız küçük, enine ve hareket aşağı yöndedir. Burun türler arasında çok değişik şekillerde olabilir fakat çoğunlukla konikal, uzun yada düzleşmiş olabilir. Bıyıklar dairesel veya bazı türlerde saçaklıdır. Bu genus 17 tür içerir bunlar: *Acipenser nudiiventris*, *A. ruthenus*, *A. persicus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii*, *A. medirostris*, *A. brevirostrum*, *A. fuivescens*, *A. transmontanus*, *A. schrenkii*, *A. sinensis*, *A. dabryanus*, *A. mikadoi*, *A. stellatus*, *A. sturio*, *A. oxyrinchus* ve *A. baerii* dir (Findeis, 1997).

Pseudoscaphirhynchus; çok geniş düzleşmiş burnu ile karakterize olur. Omurgalar çoğu kez burun ucunda mevcuttur. Yalancı solungaç (pseudobranchia) mevcuttur. Kuyruk sapı hafif düzlenmiş ve kısadır. Bütün vücut yüzeyin tamamı plaka şeklinde pullarla kaplıdır. Bıyıkta iplikleşme görülmez, gözler ufaktır (Findeis, 1997). Bu genus 3 tür içerir: *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni*, *P. hennanni* ve *P. fedtschenkoi* (nesli tükenmiş).

Scaphirhynchus; birçok özelliği *Pseudoscaphirhynchus*'larla ortak olmasına rağmen kuyruk sapının çok dar, uzamış ve komple pullarla kaplı olması ile farklılaşır. Bıyıklar kalın ve çok saçaklıdır (Findeis, 1997). Bu genus 3 tür içerir: *Scaphirhynchus albus*, *S. platorynchus* ve *S. suttkusi*.

#### 1.4. Coğrafik Dağılım

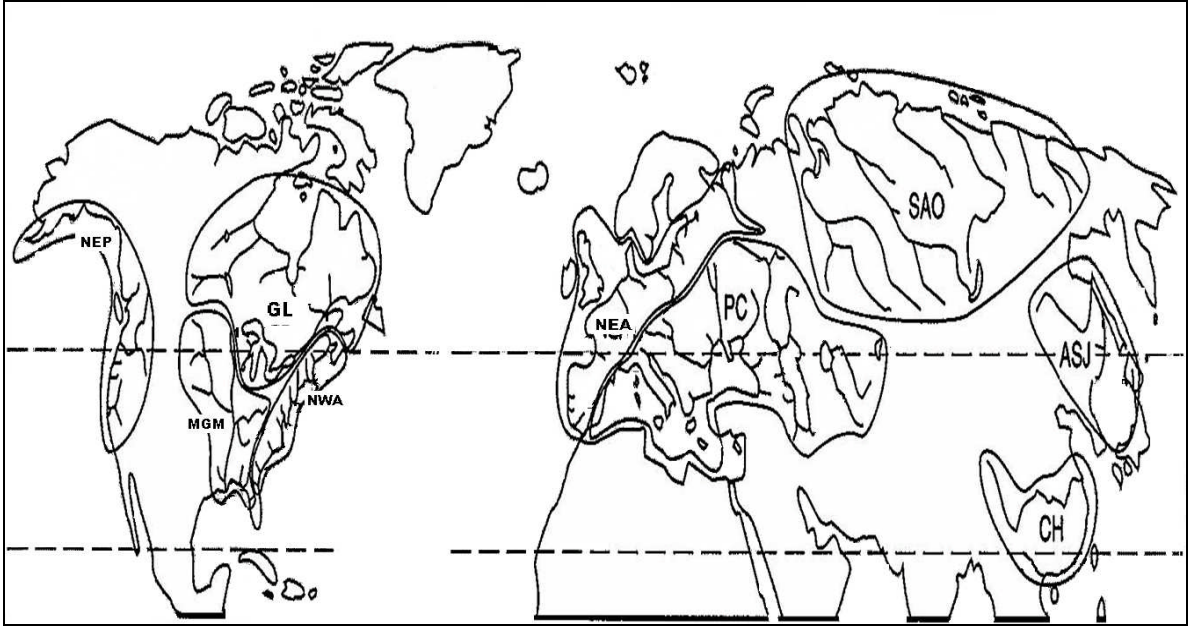
Mersin türlerinin dağılımı ile ilgili geçmişte yapılmış çalışmaların çoğunda kıtaların sürüklenmesi görüşüne öncelik verilmiştir. Acipenseriform tarafından kullanılan yumurtlama alanlarının tamamı Asya ve Avrupa'da bulunmaktadır. Az sayıda tür ise Kuzey Amerikanın Kuzey ılıman bölgesinde bulunmasına rağmen yetişkin bireylere yengeç dönencesinin güneyinde ki denizlerde de rastlamak mümkündür. Bilinen bütün Acipenseriform fosilleri bu dağılıma uygun olarak Kuzey ılıman bölgesinde bulunmuştur (Grande ve Bemis, 1991; Jin, 1995; Bemis vd., 1997a; Choudhury ve Dick, 1998; Pikitch vd., 2005). Acipenseriformların tropik nehirlerde görülmemesi muhtemelen erken gelişme ve olgunlaşma dönemi sıcaklık isteği ile ilgilidir. Mersin balıkları genellikle 20 °C nin altında ki sıcaklıkları tercih ederler (Artyukhin, 1988; Dettlaff vd., 1993). Birstein (1993), Chounhury ve Dick, (1998) ve Bemis vd. (1997a) çalışmalarında yaşayan bütün mersin balığı türlerinin dağılımını çok detaylı olarak göstermiştir. Artyukhin (1995), Acipenser türlerini dağılımına ve ekolojik isteklerine göre 4 ana bölgeye (endemik zonlar olarak) gruplandırmıştır. Bunlar Karadeniz-Hazar Bölgesi, Çin-Batı Amerika Bölgesi, Atlantik bölgesi ve Amerika Bölgesi şeklindedir.

Bemis ve Kynard (1997), yaşayan 27 mersin balığının dünya üzerindeki dağılımları, biyocoğrafik tarihinin anlaşılması ve farklı türlerin değişik hayat hikâyelerini göz önünde alarak dünya üzerinde yumurtladıkları ana akarsularla birlikte göller, denizler ve okyanuslar üzerinden mersin balıklarının dağılımını 9 bölge olarak belirlemiştir (Şekil 1.1). Bu bölgeler içerisinde *Acipenser ruthenus* çok geniş bir alanda dağılım göstermekte ve çok değişken bir türdür. *A. ruthenus* haricinde, Acipenseriform içerisinde hiçbir türün iki kıtada ki nehirlerde ürediği bilinmemektedir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Acipenseriform türleri ve dağılım gösterdikleri 9 biyocoğrafik bölge

NEP	GL	NWA	MGM	NEA	PC	SOA	ASJ	CH
<i>A. medirostris</i>	<i>A. transmontanus</i> <i>A. fulvescens</i> <i>A. o. oxyrinchus</i>	<i>A. brevirostrum</i>	<i>A. o. oxyrinchus</i> <i>P. spatula</i> <i>A. odesotoi</i> <i>S. albus</i> <i>S. platyrhynchus</i>	<i>S. sutkasi</i> <i>A. ruthenus</i> <i>A. sturio</i>	<i>P. kaufmanni</i> <i>H. huso</i> <i>A. sturio</i> <i>A. stellatus</i> <i>A. ruthenus</i> <i>A. persicus</i> <i>A. naccarii</i> <i>A. madiventris</i> <i>A. gueldenstaedtii</i>	<i>A. ruthenus</i> <i>A. baerii</i>	<i>A. mikadoi</i> <i>A. schrenckii</i> <i>H. dauricus</i>	<i>A. dabryanus</i> <i>A. sinensis</i>

Tablo 1.1 ve Şekil 1.1’ de NEP – Kuzeydoğu Pasifik; GL – Büyük Göller, Hudson Koyu ve St. Lawrence N., NWA – Kuzeybatı Atlantik, MGM – Mississippi N., ve Mexika Körfezi, NEA – Kuzeydoğu Atlantik (Beyaz, Batlık ve Kuzey Denizleri), PC – Karadeniz-Hazar Bölgesi (Akdeniz, Ege, Karadeniz, Hazar ve Aral Denizleri), SAO – Sibirya ve Arktik Okyanusu; ASJ – Amur N., Okhotsk Denizi ve Japon Denizi, CH – Çin. Olmak üzere 9 bölgede bulunan Acipenseriform türü verilmiştir.



Şekil 1.1. Mevcut Acipenseriformların biyocoğrafik dağılımını gösteren harita (Bemies ve Kynard, 1997).

#### 1.4.1. Türkiye Sularında Bulunan Mersin Türleri ve Mevcut Durumu

##### 1.4.1.1. Türkiye Sularında Bulunan Mersin Türleri

Türkiye sularında bulunan mersin balığı stoklarının günümüzdeki ve tarihsel durumu çok az araştırmacı tarafından ele alınmıştır (Ustaoglu ve Okumuş, 2004 ve Çelikkale vd., 2004). Karadeniz havzasının Türkiye kıyılarında ve akarsu sistemlerinde (Kızılırmak, Yesilirmak, Sakarya ve Çoruh) Acipenseriform’un 5-6 türü dağılım göstermektedir. Bunlar: *Huso huso* (Mersin morinası), *Acipenser sturio* (Kolan balığı), *A. ruthenus* (Çoka balığı), *A. nudiventris* (Şip balığı), *A. gueldenstaedtii* (Karaca balık, Rus mersini), *A. stellatus* (Sivrişka) dir.

#### 1.4.1.1.1. Mersin Morinası (*Huso huso*)

"Büyük mersin balığı" olarak da isimlendirilen mersin morinası Acipenseridae familyasının *Huso* cinsindedir (Şekil 1.2). Karadeniz'de bulunan ve Türkiye deniz balıkları içinde en büyük balığı oluşturan mersin morinası, 4–5 m. boy ve 1300–1600 kg ağırlığa kadar ulaşmaktadır. Sırtı siyah, yanlar daha açık ve karın beyaz renktedir. Sırtta 11–14, yanlarda 41–52, karında 9–11 plaka bulunur. Ağız büyük yarım ay şeklinde, alt dudak oyuntulu, burun oldukça kısa ve küttür. Bıyıklar yassı ve yaprak şeklinde çıkıntılıdır. Erkekler 12–14 yaşında, dişiler ise 16–18 yaşında cinsi olgunluğa ulaşırlar. Nisan-Mayıs arasında akarsuların çakıl ve kum zeminli, 2–10 m su derinliği olan ve hızlı su akıntılı yerlerinde, 12–13°C de yumurtlarlar. Yumurta çapı 3,5 – 4,0 mm olup, larvalar 7–10 gün içinde yumurtadan çıkarlar. Her yıl yumurtlama olmaz. Mersin morinası Karadeniz, Azak, Hazar, Adriyatik denizleri ile bunlara bağlı nehirlerde yaşar. Ringa, kaya ve hamsi balıkları, kabuklu su canlıları, yumuşakçalar ve çeşitli bentik canlılarla beslenir. Anadrom bir balık türüdür.



Şekil 1.2. Mersin Morinası (*Huso huso* Linnaeus, 1758)

#### 1.4.1.1.2. Karaca Mersin (*Acipenser gueldenstaedtii*)

Karaca mersini Acipenseridae familyasının *Acipenser* cinsine aittir (Şekil 1.3). Karadeniz'de bulunan bu balık azami 80–100 kg ağırlığa ve 2 metrenin üzerindeki boya ulaşmaktadır. Yakalananlarda ekseriya boy 1 metre civarında ve ağırlık 15–30 kg kadar olmaktadır. Sırtı siyah veya siyahımsı, yanlar biraz daha açık ve karın beyazdır. Alt dudağı biraz oyuk olup, burun kısa ve yuvarlaktır. Bıyıklar kısa ve düz, ağızdan çok buruna daha yakındırlar. Sırtta 10–14, yanlarda 30–43 ve karında 15–16 adet arasında değişen plakalar

bulunur. Karadeniz, Azak ve Hazar denizi ile bunlara bağlı nehirlerde dağılım gösterirler. Türkiye'de tüm Karadeniz'de mevcuttur. Erkekler 8–12 dişiler ise 10–16 yaşında cinsi olgunluğa ulaşırlar. Yumurtlama Mart sonu ıla Haziran ortası arasında olup, 2,3 mm çapında yumurta bırakırlar. Larvalar 90 gün/derecede yumurtadan çıkarlar. Yumurtlama her sene gerçekleşmez. Besinlerini, yumuşakçalar, kk balıklar, yengeç ve ıstakoz türleri ve diğer organizmalar oluşturur.



şekil 1.3. Karaca Mersini (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833)

#### 1.4.1.1.2. Sivrişka Balığı (*Acipenser stellatus*)

Sivrişka balığı Acipenseridae familyasının Acipenser cinsine mensuptur (şekil 1.4). Azami ağırlığı 40–50 kg ve uzunluğu 2 metrenin üzerine olup, yakalananlarda ekseriya ağırlık 15–20 kg ve uzunluk 100–130 cm civarındadır. Sırtı kahverengi koyu, yanlar biraz daha açık, karın sarımsı beyazdır. Sırtta 11–14, yanlarda 30–38 ve karında 15–16 plaka bulunur. Alt dudak oyuklu, burun çok uzun ince ve yassı olup baş uzunluğunun 6/10'u kadardır. Bıyıklar düz ve kısadır. Karadeniz, Azak ve Hazar denizleri ile bunlara bağlı nehirlerde bulunur. Türkiye'de tüm Karadeniz ve Marmara'da mevcuttur. Erkekleri 12–15 yaşında, dişileri ise 14–18 yaşında cinsi olgunluğa ulaşırlar. Hızlı akıntılı ve tabanı çakıllı akarsularda, 2–10 m derinliklerde, 15–25°C su sıcaklığında, Nisan-Temmuz arasında yumurta bırakırlar. Bu sıcaklıkta larvalar 2–3 günde yumurtadan çıkarlar. Hızlı büyürler ve besinlerini ıstakoz türleri, kurtlar, yumuşakçalar, balıklar ve diğer su canlıları oluşturur.





Şekil 1.4. Sivrişka Mersin (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771)

#### 1.4.1.2. Türkiye Populasyonlarının Mevcut Durumu

Halen Türkiye'nin Karedeniz kıyılarında bulunan mersin balığı türlerinin stoklarının durumunu tespit etmede kullanılacak çok az güvenilir veri mevcuttur. Resmi verilere göre 1960'lı yılların sonlarına doğru 300 tonun üzerinde karaya çıkarılan av miktarı var iken, 1970 yılında yaklaşık av miktarı 30 ton dur. 1975 yılı sonrasında yıllık karaya çıkarılan mersin balığı miktarı 10 ton civarındadır. 1975-1976'dan itibaren 15 kg dan daha küçük balıkların yakalanması yasaklanmıştır. Mersin balığı avcılığını düzenleyici tedbirler 1971 yılında alınmıştır ve bazı istisnalar ve modifikasyonlar haricinde 1979 yılından beri bazı mersin balığı türlerinin avcılığı yasaklanmıştır. Alınan tedbirlerin asıl amacı aşırı avcılığı durdurmak, hedef dışı avcılığı azaltmak, belirli boyun altındaki küçük balıkların yakalanmasını ve yumurtlama göçü esnasında avcılığı önlemek olmuştur. Morina balıkları 1997 yılında avlanması yasak mersin balıklarına dâhil edilmiş ve avcılığı tamamen durdurulmuştur. Kısıtlama ve yasaklara rağmen av dışı olarak yakalanan balıkların kaçak olarak karaya çıkarıldığı bildirilmiştir. Bu şekilde yakalanan balık miktarı 1990'lı yıllarda 15 tona ulaşmıştır, fakat 1997 yılında morina avcılığının yasaklanması ile hızlı bir şekilde düşüş göstermiştir. Bunun asıl nedeni ise yakalanan bütün türlerin morina olarak pazarlanmasıdır (Çelikkale vd., 2004).

Son 30 yıl süresince Mersin balığının korumasına yönelik yapılan düzenlemeler, beklendiği kadar etkili olmamıştır. Yinede bilerek veya bilmeyerek diğer türlerin avcılığı sırasında kaza ile yakalanmaktadır (Anonim, 1975; Edwards ve Doroshov, 1989 ve Ustaoglu ve Okumuş, 2004).

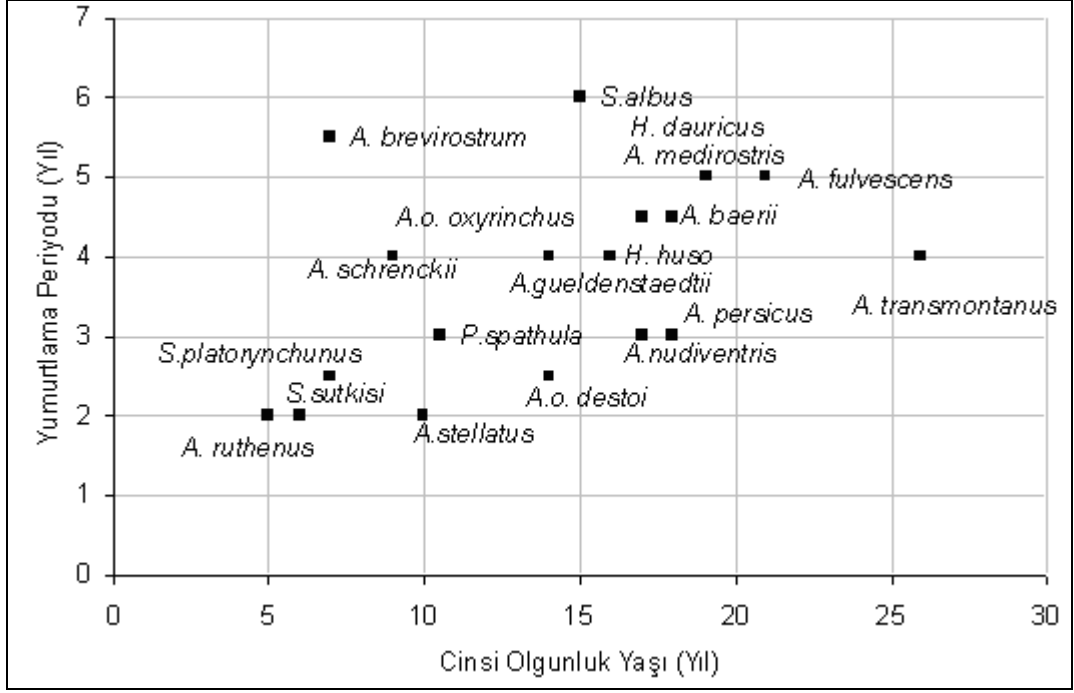
Aşırı avcılığın haricinde, kritik habitatların bozulması, akarsular üzerine baraj, bent ve kanal gibi yapıların yapılması balığın göçüne engel olmaktadır. Yeni yapılan barajların su tutma periyodu ayrıca akarsudaki su seviyesini sınırlandırmakta ve balığın göçünü

olumsuz etkilemektedir. Kızılırmak, Yeşilirmak ve Sakarya Nehirleri mersin balıklarının dağılım gösterdiği en önemli akarsulardır. Kızılırmak üzerine Altinkaya ve Derbent Barajlarının, Yeşilirmak üzerine ise Hasan Uğurlu ve Suat Uğurlu barajlarının inşasından sonra anadrom mersinlerin yumurtlama göçü engellenmiştir. Kızılırmak'ın döküldüğü yer ile Derbent Barajı arasındaki en uzun bölüm 30 km kadardır. Bu uzunluk Suat Uğurlu Barajı ile Yeşilirmak ağzı arasında 40 km civarındadır ve balık geçidi bulunmamaktadır. Eğer yeteri kadar su varsa alt kısımlarda balık serbest olarak hareket edebilmektedir, fakat barajlar yukarıya göçe engel olmaktadır. Bugün mersin balığı, Kızılırmak ve Yeşilirmak açıklarında av dışı olarak çok nadir yakalanmaktadır (Ustaoğlu ve Okumuş, 2004).

Dünyada ve Türkiye de mersin balıklarının stoklarının azalmasında, aşırı avcılık, barajların yapılması ve nehirlerin akış rejiminin değiştirilmesi gibi faktörlerin uzun süreli etkilerinin birikimi önemli derecede rol oynamıştır.

### 1.5. Hayat Döngüsü, Göç ve Üreme

Acipenseriform grubu balıklarda göç, öncelikle beslenme ve üreme gibi iki temel nedene bağlıdır. Mersin balıklarında göç akarsu içerisinde iki yönde olabilmektedir. *Akıntı Yönünde Göç*; genellikle beslenme ile ilgilidir. Tatlı su ve tuzlusu arasında yada nehirler ve büyük göller arasında ki geçişler çoğunlukla besin maddesinin bolluğu ile ilgilidir. Besin maddelerinin bol olduğu yerler mersin balıkları tarafından tercih edilir ve genellikle yoğun olarak o bölgede bulunurlar. Mersin balıklarının derin denizel çevreden faydalandığı çok fazla bilinmemektedir. Bazı mersin türleri (anadrom) genellikle 100 m'den daha sığ olan verimli bölgelerde ve kıta sahanlığına yakın bölgelerde beslenirler. Denizlerde göç genellikle kıyıda çok uzak olacak şekilde gerçekleşmez (Bemis ve Kynard, 1997). *Akıntıya Karşı Göç*; bazı durumlarda böyle olmasa da, genellikle yumurtlama aktivitesi ile ilgilidir. İlk yumurtlama göçündeki yaş çoğu zaman bilinmemesine rağmen bütün mersin türleri için önemli bir parametredir (Şekil 1.5). Göç eden balıklar doğdukları nehirlere yumurtlamak için geri dönebilirler yada yeni nehir havzasında sömürgeleşebilirler (Kolonize-doğdukları yere doğru olmayan göç) (Bemis ve Kynard, 1997). Kendi habitat bölgelerini bulabilme eğilimlerinin güçlü olmasından dolayı "filopatrik" olarak sınıflandırılırlar.



Şekil 1.5. Mersin türlerinin ilk cinsi olgunluk yaşı (yıl) ve yumurtlama periyodu (yıl) (Pikitch vd., 2005). (Not: *H. dauricus* ve *A. medirostris* aynı nokta ile gösterilmiştir.)

McDowall (1982, 1987, 1992 ve 1993) yapmış olduğu çalışmalarda ilk olarak mersin balıklarının göçlerini tanımlamış ve *Acipenser ruthenus*, *A. nudiventris*, *A. fulvescens*, *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni*, *P. hermanni*, *S. albus*, *S. platyrhynchus*, *P. sutkusi* türleri haricindeki bütün mersin türlerini tuzlu su ve tatlı su arasında göç eden diadrom türler kategorisine sokmuştur. Bu balıklar zamanlarının çoğunu denizde geçirmekte, yalnızca yumurtlamak için tatlı suya girmektedirler (anadrom). Diğer bir çalışmada *Acipenser* ve *Huso* genusunun bütün türlerinin anadrom olduğu tespit edilmiştir. Acipenseriformlarda anadromi'nin altında yatan fizyolojik mekanizma hakkında yeterince bilgi yoktur. Anadrom olan bu türlerin yaşamları süresince 3 çeşit göç görülmektedir; 1) üreme için yetişkin bireylerin denizden akarsuların üst kısımlarına doğru gerçekleştirilen göç, 2) Üreme sonunda yetişkinlerin akarsuların aşağılarına, denize doğru göçleri (bu şekildeki geri dönüş göçü bahar ve kış kortları olarak iki alt bölüme ayrılabilir), 3) Yavruların (juvenillerin) yumurtadan çıktıktan sonra akarsuların aşağılarına doğru sürüklenerek yapmış olduğu pasif göçler (Holcik 1989a).

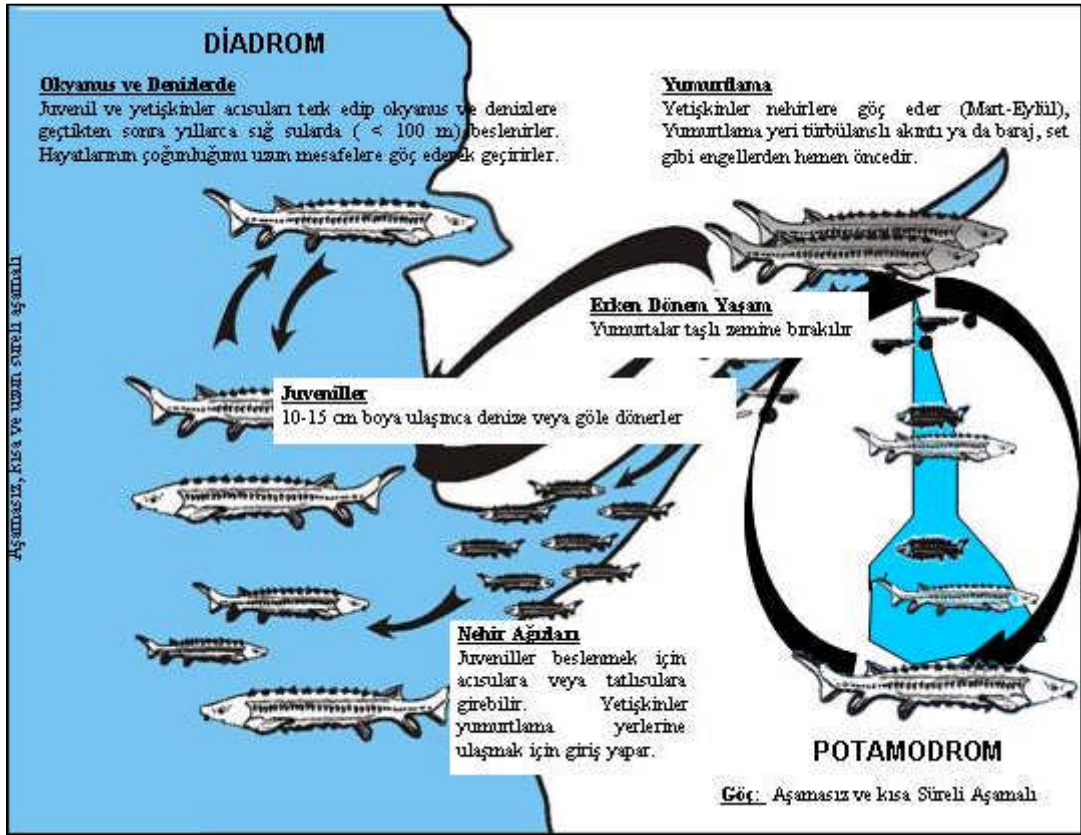
Mersin Balıklarında gözlenen diğer bir göç şeklide Potamodromi'dir. Bu göç şeklinde balıklar beslenme ve üreme için bir akarsu sistemi içerisinde göç ederler

(McDowall 1982, 1992). Bütün kürek burunlu mersinler (*Scaphirhynchini* familyası, *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus*) potamodromdur. Ayrıca Paddlefishse (*Polyodontidae*)'ler potamodromdur ve denizde görüldüğü rapor edilen çok az Polyodon bireyi vardır. Aynı zamanda bütün Polyodontids fosilleri tatlısu da bulunmuştur (Grande ve Bemis, 1991 ve Bemis vd., 1997b). Acipenser'in bazı türlerinin potamodrom olduğu düşünülse de Hensel ve Holcik (1997) tarafından yürütülen çalışmanın ışığında, *A. ruthenus* juvenillerinin genellikle Tuna Nehri ağzında tuzlu suda yakalanmalarından dolayı amphidrom olduğu desteklenmiştir.

Acipenseriform grubu balıklar tekrar tekrar yumurtlarlar fakat dişi balıkların çoğu her yıl düzenli olarak yumurtlamamaktadır. Bazı türlerin yetişkin bireyleri beslenmek için tuzlu (%35) yada acı sulara (%14–27) göç etmesine rağmen bütün Acipenseriformlar tatlı sulara yada tuzluluğun (%0–0,1) düşük olduğu sularda yumurtlarlar (Pearsa ve Gunter, 1957). Yumurtlama göçünün özelliği (göç mesafesi, tuzlu sudan yukarıya çıkma mesafesi vb.) Acipenseriform türleri arasında çok büyük farklılık gösterir. Bu balığın en uygun yumurtlama habitatının belirlenmesi üzerine çok az çalışma yürütülmüştür. Yumurtlama başarısı ve populasyonun artışı yıldan yıla değişkenlik göstermektedir (Bemis ve Kynard, 1997). Her üreme döneminde aynı üreme yeri kullanılır. Bu şekilde üreme yerine olan bağlılık, ya bu yerlerin özel karakteristliğinden yada balıktaki yuvaya dönüş özelliğinden (homing) kaynaklanmaktadır. Mersin balıklarının yuvaya dönüş hislerinin güçlü olduğuna inanılmasına rağmen, bu konuda araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu bilim adamları tarafından vurgulanmaktadır (Waldman vd., 1996; Wirgin vd., 1997).

Şekil 1.6.'de oluşturulan modelde de sunulduğu gibi, üreme amaçlı yapılan göç şeklinde, kış dönemini ılg sahil sularında geçiren mersin balıkları (anadrom ve tatlısu amphidrom türleri) Mart ayından itibaren Eylül ayına kadar nehirlerin üst kısımlarına doğru hareket ederler. İlkbahar ortalarına kadar yumurtalarını bırakmış balıklar belirli bir süre sonunda denize geri dönerler fakat daha geç giren anaçlar gelecek üreme döneminde yumurta bırakmaktadırlar. Türlerle göre değişmekle birlikte siyah ve koyu renkli ve 1–3 mm çapında olan yumurtalar nehir suyu sıcaklığının 12–13 °C olduğu zamanlarda 1–10 m derinliklerde kumlu, çakıllı veya taşlı ortamlara yapıştılır. Yumurtaların açılması su sıcaklığına bağlı olarak 3–10 gün arasında değişir. Yumurtadan çıkan larvalar ilk zamanlar planktonla beslenir ve 10–15 cm boya ulaştınca denize inerler (Akşaray, 1954). Ortalama 30 sene kadar yaşayan ve periyodik aralıklarla üreyen bu familya bireylerinin bireysel olgunluğa ulaşma yaşları ve üreme şekilleri türlere göre değişmektedir (Şekil 1.6).

Acipenseriformlarda görülen üreme göçü modelindeki varyasyon, türler, popülasyonlar ve hatta bireyler düzeyindedir. Acipenseriformların yumurtlama göçünün kalıtım özellikleri hakkında nerdeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Mersin balıklarında farklı yumurtlama göçü modellerinin oluşu birçok araştırmacı tarafından tartışılmıştır (Artyukhin, 1988; Bemis ve Kynard,1997). Berg (1934), aynı yıl (ilkbahar) yada bir sonraki yıl (kış grubu) içerisinde nehirlere yumurtlamak için göç eden anadrom balıkları bahar ve kış gurubu olarak tanımlamıştır. Bu terimler Rusya'da Avrasya mersin türlerinin korunması ile ilgili olarak uzun bir süre tartışılmıştır (Artyukhin vd., 1988).



Şekil 1.6. Mersin Balığının hayat döngüsü (göç) modeli.

Uygulamalarla ilgili olarak farklı yumurtlama göç modelleri içeren nehirlerin uzunlukları, nehrin rakımı, yumurtlama yerindeki sıcaklık ve bioenerjistik gibi verilerin çıkarılması önerilmektedir. Artyukhin (1988), Karadeniz-Hazar bölgesinde düşük rakımlı bölgedeki nehirlerde birçok mersin türü için ilkbaharda yumurtlama karakteristik iken yüksek yerlerde yaz aylarında yumurtlama olduğunu bildirmiştir. Bemis ve Kynard (1997), göç modellerinin açıklanmasında bir biyoenerjistik yaklaşım önermektedir. Yumurtlama

göçü modeli türler yada populasyonlar içerisinde değişim göstermektedir. Bunun daha iyi anlaşılabilmesi için mersin balığı hayat hikâyesinin daha iyi anlaşılması gerekir. Yumurtlama yerine dönüş ve peş peşe yumurtlama arası davranışı Acipenseriformlarda geniş bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Aynı şekilde özel nehir sistemlerinde aynı türün farklı stokları genetik temel göz önünde tutularak araştırılmalıdır (Wirgin vd., 1997).

## 1.6. Ekonomik Önemi

### 1.6.1. Yetiştiriciliği

Mersin balıkları üzerine yapılan ilk suni üretim denemesi 1869 yılın da Owsjannikow tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, *Acipenser ruthenus* yumurtaları döllenenek inkubasyonu gerçekleştirilmiş ve prelarva sağlanmıştır. Devam eden yıllarda dölleme ve inkubasyon işlemleri diğer türler için de denenmiştir. Seth Green 1875’de *A. fulvescens*, Frauen 1881’de *A. sturio*, Borodin 1884’de *A. stellatus* ve 1899 da *A. gueldenstaedtii* türlerinin suni üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bu ve benzer üretim çalışmalarının temel amacı, çeşitli çalışmalar için materyal sağlamaktır. Özellikle yetiştiricilik amaçlı ilk deneme 1886 yılında Mohr tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmalardan nispeten başarılı sonuçlar alınsa da yumurtlama bölgesinden yakalanmış olgun bireylere ulaşmanın zorluğundan dolayı, yapay döl alma çalışmalarının bir çoğu uzun süre boyunca yaygınlaşmadan kalmıştır (Burtzev, 1999; Williot vd., 2001).

Mersin balığı yetiştiriciliği son 10 yıl süresince hızlı bir şekilde gelişmiştir. Şu anki mevcut mersin balığı yetiştiriciliğine karşı olan ilgiyle birlikte, artan aktivite gereksinimi sonucunda, değişen endüstri ve teknikler nedeniyle yeni teknikler hızlı bir şekilde kullanılmaya başlanmış ve adapte edilmiştir. Mersin balıklarının kültürü ve yapay üretimi üzerine yapılan çalışmalar son zamanlarda USA, Fransa, İtalya, Macaristan, Polonya, Çin ve Japonya’yı da kapsayan birçok ülkede artmıştır. Avusturya, Azerbaycan, Belçika, Bulgaristan, Estonya, Fransa, Almanya, Letonya, Polonya, Romanya, İran, Slovenya, İspanya, Ukrayna, Rusya, Uruguay. A.B.D *A. transmontanus*, *A. oxyrhynchus* ve *A. brevirostrum* türlerinin üretimi ile ilgili başarılı denemeler yapılmışlar ve en fazla ilerlemeyi *A. transmontanus* ile elde etmişlerdir.

Paddlefish (kürek burunlu) ve Mersin balıklarının yetiştiricilik yolu ile üretimi 1987 yılında 160 ton iken 1995 yılında 1.142 tona ulaşmış ve hatta 1997 yılında 2.032 ton ile bu

rakam iki katına çıkmıştır. Buna rağmen üretilen ürünün değeri bakımından 1990 yılında 16 USD/kg iken 1997 yılında bu fiyat 8,2 USD/kg a düşmüştür. 1997 yılında Dünya mersin üretiminin %38'i Rusya Federasyonunda, % 35'i Avrupa Birliği ülkelerinde ve % 27'si ABD tarafından gerçekleştirilmiştir (Raymakers, 2002).

### 1.6.2. Avcılık

Mersin balıkları lezzetli eti ve dünyaca ünlü havyarı nedeni ile yüz yıllar boyunca avlanmıştır. Son yıllarda dünyada Mersin balığı avcılığında hızlı bir düşüş görülmektedir. Avlanan Mersin balığının % 80'i Hazar Denizi, % 14'ü Kuzey Amerika (iç su ve kıyıları), % 6'sı Tuna Nehri, Karadeniz ve Azak Denizinden sağlanmaktadır (Raymakers, 2002).

Mersin avcılığı yapan başlıca ülkeler sırasıyla: Azerbaycan, Bulgaristan, Kanada, Danimarka, Fransa, Yunanistan, Almanya, Gürcistan, Macaristan, İran, Kazakistan, Makedonya, Hollanda, Portekiz, Romanya, Rusya Federasyonu, Slovakya İspanya, Türkiye, Türkmenistan, Ukrayna, Sovyet Sosyalist Cumhuriyeti, Amerika Birleşik Devletleri olmuştur. Başlıca avcılığı yapılan mersin türleri ise, Rus mersini, Sivrişka mersini, Morina, Yeşil mersin, Mississippi Paddlefish, Çoka (Sterlet) mersini, Beyaz mersin, Göl mersini ve kürek burunlu mersindir.

Mersin balığı popülasyonlarının güvenliği için Karadeniz ve Hazar Denizi ile ilişkili bütün devletlerde mersin balığı avcılığı, işleme, satışı ve diğer konularda yasal düzenleme yapılmasına ihtiyaç duyulmuş ve 1975 yılında CITES (Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme) bünyesinde birkaç mersin türünün avcılığı, ticareti, havyar üretimi kontrol edilmeye başlanmıştır. Aynı yasal düzenleme içinde, 1998 yılında ise bütün mersin ve paddlefish türleri ve bunların uluslararası ticareti yapılan ürünleri (yumurta, et, canlı balık vb.) bu kapsama dahil edilmiştir. İlk olarak 2 mersin türünün (*A. sturio* ve *A. brevirostrum*) uluslararası ticaretinin tamamen yasak olduğu Ek-1 listesi içerisinde yer almıştır. Kalan türler ise yalnızca CITES den alınan özel izinle belirli bir devletin, belirli bir yerden, belirli miktarda, avlamasına izin veren Ek-2 listesine dahil edilmiştir (Raymakers, 2000; Raymakers, 2002; CITES, 2004).

1990'lı yıllara kadar yalnızca 2 ülkenin (SSCB ve İran) Hazar Denizine sınırı bulunduğundan, bu balığın Hazar Denizi avcılığı ve havyar ticareti bu iki ülkenin elinde bulunuyordu. Daha sonraki yıllarda, SSCB nin dağılması ile 3 yeni ülke daha Hazar

Denizine komşu olmuştur (Kazakistan, Azerbaycan ve Türkmenistan) ve sonuç olarak bu ülkelerde mersin balığı populasyonlarının avcılığına başlamışlardır. Fakat kontrolsüz yapılan avcılık bu stokların hızlı bir şekilde çökmesine neden olmuştur.

### 1.7. Filogenetik

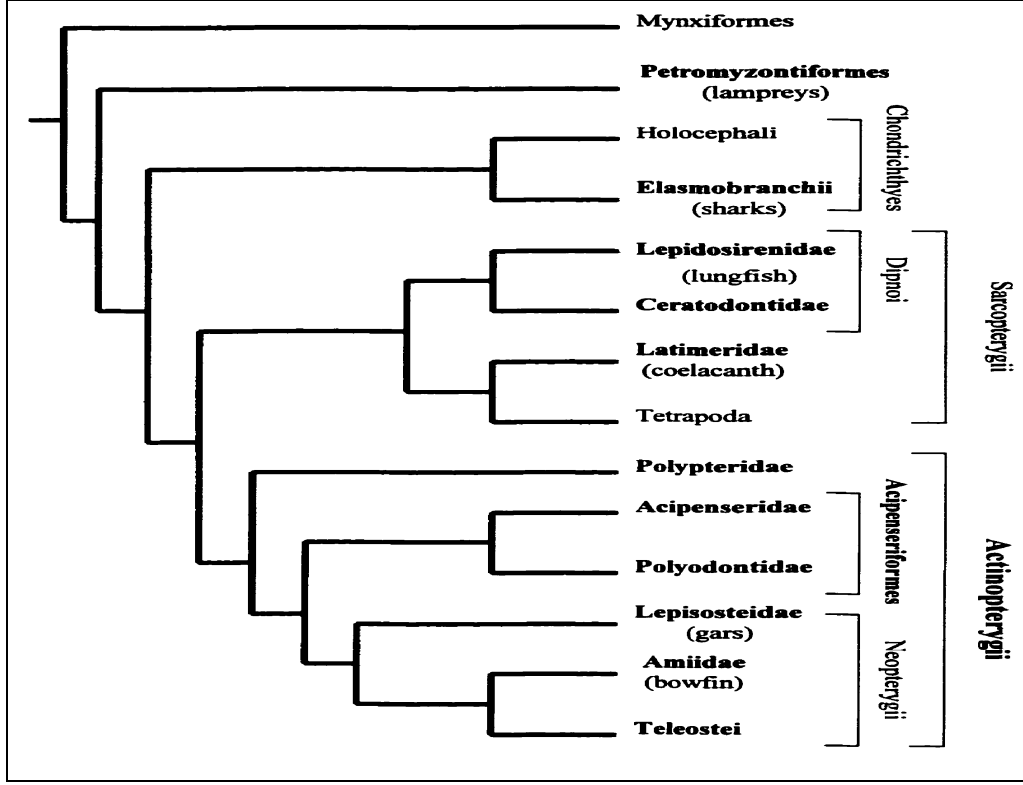
Son 20 yıl içerisinde balık sistematigi çalışmalarında kullanılan tekniklere bağlı olarak mevcut taksonlarda bir değişim söz konusudur. Bunda temel etken türlerin ordo ve familya içerisindeki ilişkilerin farklı düzeylerde ortaya konmasıdır (Fidlers, 1991). Acipenseriformların sıra dışı karaktere sahip olması önceden yapılan sınıflandırma çalışmalarında tartışmalara neden olmuştur. Bu problemin temelinde iki görüş bulunmaktadır: (1) iç iskelette azalan bir kemikleşme ile birlikte kapsamlı bir dermal iskeletin görülmesi ve (2) hiyolistik bir çene yayı görülmesi ve köpekbalığı çenesi olarak isimlendirilen uzatılabilir palatoquadrate kemiğinin bulunmasıdır.

Acipenseriformlarla yapılan sistematik çalışmalar daha ziyade son 250 yıl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Linnaeus zamanından 19. yüzyılın erken dönemlerine kadar, günümüzde de tanınan türler ve genuslar tanımlanmıştır. Bunların içerisinde *Acipenser* Linnaeus, 1758, *Polyodon* Lacépède, 1797 ve *Scaphirhynchus* Heckel, 1836 da vardır.

Traquair (1877, 1887), mevcut Acipenseriformların “paleoniseiformlardan köken aldığı” belirtmiştir. Cope (1883)’de ilk fosil paddlefishleri *Crossopholis magnicaudatus* belirlemiştir. Woodward (1891,1895a,b,c, 1909) ise günümüzde geçerliliğini halen koruyan mersin balıklarının fosil tarihi hakkında derleme yapmıştır. Aldinger (1937), mersin balıkları ve paddlefishleri erken Mesozoik dönemde ortak atadan ayrılarak orijinlenmiş olduğunu ileri sürmüştür.

Yakın zaman içinde yapılan çok az sayıdaki çalışma *Acipenser* türleri arasındaki ilişkiden bahsetmektedir. Berg (1948) yürütmüş olduğu çalışmalardan Acipenseriformların *Actinopterygii* (ışın yüzgeçli balıklar) alt sınıfının ilkel bir üyesi, diğer grubun ise teleostları kapsayan *Neopterygii* olduğu sonucuna varmış (Şekil 1.7).





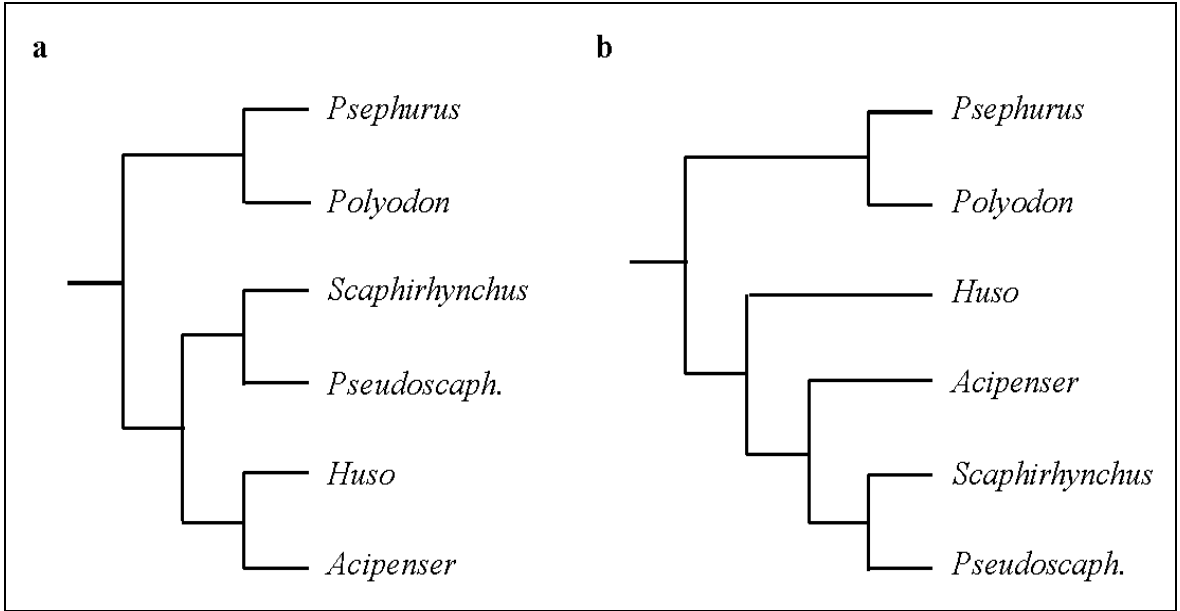
1.7. Yaşayan balıklar için morfolojik karakterler üzerinden yapılmış sınıflandırma (Bemis vd. (1997a)'den modifiye edilmiştir).

Patterson (1982), morfolojik tabanlı araştırmasında Mersin balıklarının Polypteridae ailesinin *Actinopterygii* alt sınıfı içerisinde yer almakta olduğunu göstermiştir. Bu durum 28S rRNA gen bölgesinin kısmi sekans analizi ile de doğrulanmıştır (Le vd.,1993). Fakat Patterson (1982)'a göre *Polypteriform*'lar, Acipenseriform ile yaşayan en yakın grup olmasına rağmen ortak morfolojik karakteristikleri yoktur ve ortak bir coğrafik dağılım göstermemektedirler. Yaşayan polypteriformların tropikal Afrika'da dağılımı tatlısu da sınırlıdır. Mersin balıkları şu an birçok bilim adamı tarafından Actinopterygii altında sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada mersin balıklarının *Actinopterygii*'nin mevcut diğer üyeleriyle en yakın kardeş grup olması dikkate alınmıştır ve Acipenseriform içerisinde temel grup olarak düşünülmektedir (Patterson, 1982; Lauder ve Liem, 1983; Bemis vd., 1997a).

Yapılan çalışmalarda Acipenseriformes Ordo'sunun Polyodontidae ve Acipenseridae olmak üzere iki monofiletik familyadan oluştuğunu görülmektedir (Fiedlers, 1991; Findeis vd, 1997; Bemis vd., 1997a;b;c). Bu iki ailenin bir birinden 135–200 milyon yıl öncesinden ayrıldığı kabul edilmektedir (Birstein vd., 1998). Polyodontidae familyası

*Polyodon* ve *Psephurus* olmak üzere 2 genusa ayrılmakta ve bunların her biri *Polyodon spathula* and *Psephurus gladius* olmak üzere birer tür içermektedir. Acipenseridae familyasının son zamanlarda bilinen 27 türü bulunmaktadır ve bunlar 4 genus (*Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus*) içerisinde toplanmışlardır (Bemis ve Kynard, 1997; Birstein vd., 1997a). Acipenseridae ailesi içerisindeki türlerin filogenetik ilişkisi hakkında farklı görüşler vardır, buda farklı taksonomik sınıflandırmalar oluşturmuştur (Fiedlers, 1991; Mayden ve Kuhajda, 1996; Findeis, 1997).

Birçok araştırmacı tarafından biçimsel filogenetik hipotezlerin yakın bir karşılaştırması önermiştir ki, Acipenseridae içerisinde *Huso*, *Acipenser* kadar farklılaşan ana bir kol ile ayrılmaktadır. *Acipenser* içerisindeki bu büyük ölçüde çözülmemiş ilişkiye dikkate çekilmiştir (Birstein ve DeSalle, 1998). Findeis (1997), osteolojik ve diğer morfometrik karakterlerin filogenetik analizine dayanarak *Huso*' nun diğer *Acipenseridae* türleri ile kardeş olduğunun ve Şekil 1.18 de ki gibi yer aldığını önermektedir. Birstein ve DeSalle (1998), ise moleküler özellikleri rapor etmişler ve *Huso* ile *Acipenser ruthenus* ilişkilendirmiştir.



Şekil 1.18. Morfolojik-morfometrik veriler (a) (Fiedlers, 1991; Mayden ve Kuhajda, 1996) ve farklı iskelet ve kemik özellikleri (b) (Bemis vd.,1997a; Findeis, 1997) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar.

Çoğunlukla klasik morfolojik ve morfometrik çalışmalar üzerinden yapılan sınıflandırmalarda Acipenseriformes 2 altfamilyaya ayrılmaktadır. Bunlardan Acipenserinae, *Acipenser* ve *Huso* olarak ikiye ayrılmaktadır ve ikinci altaile ise *Scaphirhynchinae*, *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus* şeklinde ikiye ayrılmaktadır (Fiedlers, 1991; Mayden ve Kuhajda, 1996). Farklı iskelet ve kemik özellikleri kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalardan elde edilen farklı sonuçlara göre ise, *Acipenseridae* familyası içerisinde iki alt familyanın bulunduğu, bunların *Husinae* (*Huso*) ve *Acipenserinae* (*Acipenser*, *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus*) olduğu sonucuna varılmaktadır (Bemis vd., 1997a; Findeis, 1997).

Günümüzde Acipenseriformların 2 familya altında 27 türü bilinmektedir (Bemis ve Kynard, 1997; Birstein vd., 1997a). Araştırmalardan ortaya çıkan soru, kaç tane Acipenser türünün doğru olarak tanımlandığı ve mersin balıkları içerisinde kaç türün bulunduğu. Bu güne kadar yürütülen çalışmalarda bu soruların yeterince açıklık kazanmadığı görülmektedir. Dahası bazı türler içerisinde karışıklıklar söz konusudur. Zor şartlar (buzul dönemi gibi) altında yaşayan türler arasında ki morfolojik ve meristik benzerlik, kesin olarak tanımlanan türlerde de görülmektedir. Özellikle juvenil dönemi uygulamalarında hata çok daha fazladır. Bireysel morfolojik farklılıklar, türleri belirlemenin morfolojik karakterizasyonu ile yapılmasını zorlaştırmaktadır (Bemis vd., 1997a; Birstein vd., 1997b).

Günümüzde mevcut tartışmalar altında *Acipenser persicus*, bağımsız bir tür olup olmadığı (Vlasenko vd., 1989a; Birstein vd., 1998b) yada *Acipenser gueldenstaedtii* nin bir alttürü olup olmadığı tartışılmaktadır (Rochard vd., 1990). Problemlerden birisi de türler arasında doğal olarak görülen hibridizasyondur. Hibrit bireyler sıklıkla kendi ebeveynlerinin türünden ayırt edilememektedir. Örnek olarak bakıldığında, *Acipenser medirostris* (Kuzey Amerikanın Batı kıyılarında dağılım göstermektedir) ve *A. mikadoi* (Okhotsk Denizi ve Japon Denizinde dağılım göstermektedir) çeşitli zamanlarda iki türün aynı olduğu düşünülmüş, fakat son moleküler genetik veriler ayrı türler olduğunu desteklemiştir (Birstein vd., 1993b; Birstein vd., 1997a). Ayrıca *A. sinensis* ve *A. kikuchii* farklı türler olarak belirlenmiş fakat her iki isimde aynı tür için sinonim olduğu tespit edilmiştir (Hochleithner, 1996).

## 1.8. Orijin

Acipenseriform'un evrimsel olarak ortaya çıkışı 200–225 milyon yılda meydana gelmiştir ve dünyanın yaşı içerisinde, bu dönem çok eski çağlarda yer almaktadır (Kedrova vd., 1980; Grande ve Bemis 1991; Cantatore vd., 1994; Bemis vd., 1997a). Karşılaştırmalı kemik bilimi, iyi korunmuş fosillerin analizlerde kullanılmasına imkân sağlamıştır. Bu fosiller üzerinden gidilerek belirlenen ilişkiler sonucunda, Acipenseriformların en azından Jurasik dönemin (yaklaşık olarak MÖ 200 milyon yıl) ilk zamanlarından günümüze kadar geldiğini ve bütün fosil ve yaşayan taksonların Holarktık dönemin bir parçası olduğu ortaya konulmuştur. Yürütülen çalışmalarda Paleozoik ve Erken Mesozoik Actinopterygianlar arasındaki filogenetik ilişkinin problemlili olduğu fakat Acipenseriform'un monofiletik olduğu, ve paleoniscifor balıklara dahil olduğu araştırmacılar tarafından kabul edilmiştir. Ayrıca üzerinde çalışılan iki fosil familyanın (+Peipiaosteidae ve +Chondrosteidae) mevcut Polyodontidae ve Acipenseridae familyalarına ilave olarak Acipenseriformlara ait olduğu belirtilmiştir (Bemis vd.,1997a;b).

Son moleküler çalışmalar da, bu ordo'nun 200 milyon yıl öncesinden köken aldığı ortaya konmuştur (Cantatore vd., 1994). Polyodontidae ve Acipenseridae Jurasik dönemde (200–135 milyon yıl) yer almakta iken (Yakovlev, 1977; Grande ve Bemis, 1991; Jin, 1995; Bristein ve DaSalle 1998), Scaphirhynchinae ve Acipenserinae Orta/Geç Jurasik döneminde yayılmıştır (Wilmosky, 1956; Grande ve Bemis, 1991; Bristein ve DaSalle 1998).

Bütün mevcut paleontolojik bilgiler Acipenseriformların Tethis havzası kökenli olduğunu işaret etmektedir (Birstein vd, 1997a). Eğer +Chondrosteidae ile Peipiaosteidae kardeş grup ise Acipenseriform ordosu Avrupa'nın Erken Jurasik döneminden köken almış ve tür çeşitlenmesi Geç Jurasik/ Erken Kretase döneminde Asya da ve daha sonrasında Kuzey Amerika da görülmüştür (Bemis ve Kynard, 1997).

Yaklaşık 15 milyon yıl önce Tethis Denizi kuzey ve güney parçalar şeklinde ikiye bölünmüştür ve bunlardan ise Akdeniz ve Paratethis Denizi oluşmuştur. Paratethis günümüzde Aral, Hazar ve Karadeniz'i kuşatmaktadır ve 6 milyon yıl devam etmiştir (Hsu, 1978). Sonrasında Amuderya ve Sirderya nehirleri oluşarak Paratethis Denizi yada Aral ve/veya Hazar denizine katılmıştır. Jeolojik olaylar Amuderyanın 5,5-0,02 milyon yıla kadar bağlı olduğunu göstermektedir (Bristein ve DeSalle, 1998). Acipenserlerin ana çeşitliliğinin Adriyatik ve Karadeniz-Hazar bölgesinde yer aldığı söylenebilir (Artyukhin,

1995). Bu bölge bu türlerin en geniş çeşitliğinin olduğu yerlerdir (Artyukhin, 1995; Bemis ve Kynard, 1997).

Bemis ve Kynard (1997), Karadeniz-Hazar bölgesi ve ilişkili bölgelerdeki mersin balıklarının bugünkü dağılımı ve kökeni hakkında çalışmıştır. Acipenseridae'nın fosil bulguları bu familyanın habitatının akarsular ve acısular olduğunu kesinleşmiştir (Choudhury ve Dick, 1998). Atasal Acipenseriformların orijinal hayat tarzlarının potamodrom yada anadrom nitelikte olması gerektiği belirtilmiştir (Bemis ve Kynard 1997).

Birkaç istisna ile birlikte, *Acipenser fulvescens*, *A. brevirostrum*, *A. baerii* türlerinin dışında geri kalan türler Karadeniz-Hazar bölgesinin yerli türüdür. Berg (1949), bu anadrom türlerin Tethis Denizinin torunlarından olan Hazar Denizi, Aral, Karadeniz, Azak Denizi ve daha sonra oluşan bölgelerinden olduğunu ileri sürmüştür. Bu türler için farazi dağılım yolları ve türleşme senaryoları açıklanmıştır. Birstein ve Desalle (1998), Kuzey Amerika türlerinin (*A. medirostris*, *A. transmontanus*, *A. schrenckii* ve *A. sinensis*) soy grubu bir okyanussal geçiş ilişkisi göstermekte ve Kuzey Amerika ve Asya arasında bir bağlantı ortaya çıkarmaktadır. Bu türler arasındaki ilişki belki de Kuzey Amerika ve Asya'nın Bering yoluyla bağlantısını yansıtmaktadır ve senozoik dönem süresince 75 milyon yıldan günümüze kadar tatlısu dağılımının muhtemel rotalarını göstermektedir.

### 1.9. Sitogenetik

Acipenseriformes türleri kromozom sayısı bakımından 2 grupta toplanabilir. Bunlardan ilki yaklaşık 120 kromozoma sahip olan türler ve diğer grup ise yaklaşık 240 – 260 ve daha fazla sayıda kromozoma sahip olan türlerden oluşmaktadır (Tablo 1.2) (Birstein vd., 1997a; Fontana, 1997). Kromozomların yaklaşık olarak yarısı, mikrokromozom olarak adlandırılır ve çok küçük boyutları ile karakterize olurlar. Acipenseriformların karyolojik değişim oranı genellikle düşüktür (Birstein vd., 1997a). Bu hipotez farklı türler arasında genomik DNA'nın nükleotidlerinin yalnızca çok az bir bölümünün moleküler hibridizasyonun tespiti ile desteklenmektedir (Kedrova vd., 1980). Genomik 18S rRNA'nın kısmi parçacık değişkenliği nadiren küçüktür, mitokondrial 12S rRNA, 16S rRNA ve sitokrom b nin parçacık değişkenliği ise düşük karyotip değişim oranı ile ilişkilidir (Birstein vd., 1997a).

Tablo 1.2. Türlerin kromozom sayılarına göre dağılımı.

Kromozomal Gruplar	Türler
120	<i>A. nudiventris</i> , <i>A. oxyrinchus</i> , <i>A. ruthenus</i> , <i>A. stellatus</i> , <i>A. sturio</i> , <i>H. dauricus</i> , <i>H. huso</i> , <i>P. kaufmanni</i> , <i>P. spathula</i> , <i>S. platorhynchus</i>
240-260	<i>A. baerii</i> , <i>A. fulvescens</i> , <i>A. gueldenstaedtii</i> , <i>A. medirostris</i> , <i>A. naccarii</i> , <i>A. persicus</i> , <i>A. schrenckii</i> , <i>A. sinensis</i> , <i>A. transmontanus</i>
ca. 360	<i>A. brevirostrum</i>
ca. 500	<i>A. mikadoi</i>

Birstein vd. (1997a) yapmış oldukları derlemede, Acipenserlerde yaklaşık 60 kromozomlu karyotipik yapı olduğu ve her bir hücre çekirdeğindeki Mikrokromozom DNA içeriğinin yaklaşık 2,0 pg olduğunu belirtmişlerdir. Sitogenetik bilgilerin Acipenser türleri arasındaki ilişkiyi anlamak için çoğunlukla yardımcı olduğu görülmüştür. Bu açıdan bakıldığında, 120 kromozoma sahip türler içerisinde DNA içeriği 3,17 ve 4,89 pg DNA/hücre olduğu, oysaki 240–260 kromozoma sahip türler içerisinde ise 7,87 – 9.46 pg DNA/hücre olduğu gözlenmiştir. Buda 120 kromozomlulardan yaklaşık iki kat daha yüksek bir rakamdır.

Acipenseriform türleri arasında hibritleşmenin sıkça görülmesi ve kromozom sayıları arasında farklılıkların olması nedeniyle, kromozom sayılarının belirlenmesinde DNA içeriğinin değerlendirilmesi yoğun olarak kullanılmaktadır. Yapılmış çalışmalarda birbirinden uzak iki türün diğer türlere göre yüksek DNA içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir. *A. brevirostrum* da DNA içeriği 13,075 pg/hücre olarak belirlenirken (Blackledge ve Bidwell 1993), diğer tür için ise (*A. mikadoi*) yaklaşık 14.2 pg/hücre bulunmuştur (Birstein vd., 1993). Eş zamanlı yapılan bu çalışmalarda türler karşılaştırılmış ve sonuç olarak *A. brevirostrum*'un yaklaşık olarak 360 kromozoma sahip olması gerektiği vurgulanmıştır. *A. mikadoi*'nin DNA içeriği 120 kromozoma sahip türlerden yaklaşık 4 kat fazla olduğu ve 240 kromozoma sahip olanlardan ise 2 kat fazla olduğu gösterilmiş ve sonuç olarak yaklaşık 500 kromozoma sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Fontana (1994), 120 kromozoma sahip türlerin diploid durumda olduğu kabul edilmesine rağmen, Acipenseriformlerin atasal olarak  $2n = 60$  kromozoma sahip bir

karyotipe sahip olduğu ve bu türlerin ise tetraploid olduğunu belirtmiştir. Fontana (1994) 'a göre bu durumdan sonra bu atada fonksiyonel diploidi yeniden düzenlenmiştir. Bunun yanında farklı yayınlarda da bu konu değerlendirilmiş ve 120 kromozoma sahip türlerin diploid ve 240 kromozoma sahip olan türlerin ise tetraploid oldukları belirtilmiştir (Blacklidge ve Bidwell, 1993).

Artyukhin (1995), Acipenserlerin tarihsel süreci içerisinde 120 kromozomdan 240 kromozoma geçiş gösterdiğini ve bunun eşsiz bir özellik olduğunu vurgulamıştır. Birstein vd. (1998a), diğer taraftan yaptıkları çalışmalarında Acipenser içerisinde 8 farklı poliploid yapının ortaya çıktığı sonucuna varmışlardır. *A. mikadoi*'in yaklaşık 500 kromozoma sahip olduğunun ortaya çıkması Acipenser içerisinde 240 kromozoma sahip bir atanın olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır (Birstein vd., 1993b; Birstein vd., 1997a; Birstein vd., 1998a). *A. brevirostrum* (yaklaşık 360 kromozom)'un gelişiminde bu türün bir tetraploid mi yoksa hibrit mi olduğu konusu hala karışık gözükmemektedir (Blacklidge ve Bidwell 1993). Bununla birlikte birçok tür ve Avrasya sazan türlerinde olduğu gibi  $2n = 50$  bir diploid yapı gösteren sazan balıklarının kromozomal durumlarında tetra, hexa ve oktaploid ve yukarı yapı görülebilmektedir (Yu vd., 1987).

### 1.10. Genetik Varyasyon ve Belirlenmesi

Bütün organizmalarda mutasyon görülmektedir. Canlılarda, normal hücresel olaylar yada çevre etkileşimi sonucunda genetik varyasyon (polimorfizm) sıkça görülmektedir. Seleksiyon ve genetik sürüklenmeyle birlikte bireyler, türler ve daha yüksek takson grupları arasında genetik varyasyonda azalmalar gözlenmektedir.

Doğal çeşitliliği korumanın temel yaklaşımı popülasyonlardaki genetik varyasyonun korunmasıdır. Aşırı avcılık ve çevresel bozulmadan kaynaklanan stokların aşırı zarar gördüğü durumda genetik varyasyonun artırılması için stoklar hem doğal bireyler hem de kültür altındaki anaçlar kullanılarak desteklenmektedir. Bu işlemde her bir aşamanın (anaç toplama, seleksiyon ve yavru balıkların doğaya bırakılmasına gibi) dikkatlice gözden geçirilmesi popülasyonun genetik yapısına zarar vermemek için önemlidir (Allendorf vd, 1987).

Moleküler tekniklerin kullanımı, popülasyon içinde bireyler arasında, aynı türün popülasyonları arasında ve taksonomik seviyede farklı türler arasında genetik varyasyonun tahminini mümkün kılmıştır. Moleküler belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalar

sonucunda lokal populasyonların ve sucul türlerin üreme farklılıkları gösteren, izole halde küçük gruplara bölünmüş olduğu gözlenmiştir. Böylece bir veya birden fazla ayrı üreme davranışı gösteren izole grupların kaybolması tür içindeki genetik varyasyonun seviyesinin düşmesine neden olmakta ve tamamıyla nadir bulunan genetik karakterlerin kaybolmasıyla sonuçlanabilmektedir (Çiftçi ve Okumuş, 2002).

Sonuç olarak, üretimin uzun süreli devamlılığını sağlamak için; gen havuzunu belirli bir düzen dahilinde paylaşan ve alt gruplara ayrılmış balık populasyonları arasındaki ve içindeki genetik farklılığın, gelişen moleküler genetik yöntemlerinin kullanımıyla belirlenmesi, ve genetik varyasyonun korunması gerekmektedir. Balıkçılık yönetiminin temel amacı stoktaki tüm genetik varyasyonu koruyabilecek şekilde hasat etmek ve yalnız kaybolan varyasyonun restorasyonu için balıklandırma yapmak olmalıdır (Okumuş ve Çiftçi, 2003; Çiftci vd., 2007).

### **1.10.1. Genetik Varyasyonun Tahmininde Kullanılan Teknikler**

#### **1.10.1.1. Protein Elektroforezi**

İlk uygulanabilir genetik belirteç sistemi 1960'lı yıllarda geliştirilen protein elektroforezi olmuştur (Buth, 1990). Yaklaşık yirmi yıldır balık genetikçileri farklı balık türlerinde populasyon düzeyinde genetik farklılıkları karakterize edebilmek için protein elektrofrezlerini ana araç olarak kullanmaktadırlar. Protein elektroforezi ile yapılan çalışmaların en büyük avantajı hızlı, ucuz olması ve çok fazla laboratuvar malzemesi istememesidir. Buna karşın kullanılan örneklerin taze olması zorunluluğu, DNA çalışmalarına göre çok sayıda örneğe ihtiyaç duyulması ve bu örneklerin genellikle öldürülmesi, en önemlisi bazı populasyon ve türlerde DNA çalışmalarına göre çok düşük seviyede polimorfik olması protein elektrofrez tekniğinin sınırlayıcı özellikleridir (Imsiridou and Zaldivar, 1999). Yalnızca 64 kodonun 20 tane aminoasit kodlaması, aminoasitlerin her birinin değişimi elektrik yükünde değişiklik meydana getirmemesi ve yalnızca nükleotidlerin %30'nun değişiminin ancak elektroforetik olarak tespit edilmesi sınırlayıcı etkenlerdendir.

Bu nedenle son dönemlerde çalışmaların çoğunluğu DNA belirteç sistemleri kullanılarak yapılmaktadır veya protein elektroforezi ikinci teknik olarak kullanılmaktadır.



### 1.10.1.2. DNA Belirteç Sistemleri

1960'lı yılların ortalarına kadar popülasyonlar arası ve popülasyon içi varyasyonun tespiti için genel olarak biyo-ekolojik özellikler, markalama, parazit dağılımı, fizyolojik ve davranış özellikleri, morfolojik veya meristik karakterleri kullanılmaktaydı (Lewontin, 1964). İlk olarak 1970 lerde alloenzim yaygın bir şekilde kullanımından sonra moleküler genetiğin gelişimi hızlı bir şekilde artmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanımı özellikle DNA çalışmalarına ayrı bir ivme kazandırmış olup, 100 yıl veya daha öncesinden saklanmış balık pulu örnekleri ile bile çalışma imkanı sağlamıştır. Ayrıca çok az miktarda ve canlıyı öldürmeden alınan doku parçasıyla bile çalışma imkanı vermesi önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Genetik varyasyonun belirlenmesinde kullanılan DNA belirteçlerinin birçoğu dolaylı yollardan farklılığı belirlemeye yönelik çalışmaları kapsar. Bununla birlikte son yıllarda DNA sekans analizinin yaygınlaşması ve bu amaç için cihazlar geliştirilmesi daha fazla örnekle çalışma fırsatı vermiştir.

Balıkçılıkta kullanılan başlıca DNA belirteçleri şunlardır; Mitokondrial DNA (mtDNA), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLPs), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPDs), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLPs), Mikrosatellit, Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNPs) ve İfade edilmiş Sekans İşaretleri (ESTs). Tüm bu belirteçlerin kullanım yerleri, tek başına yeterliliği, avantaj ve dezavantajları Tablo 1.3.'de verilmiştir. Bu belirteçler kullanılarak genetik varyasyonun tahmini, akrabalı yetiştiricilik, anne-babalık testi, tür ve hat tespiti, hibrit bireylerin belirlenmesi, genetik haritaların oluşturulması (QTL belirlenmesi ile) gerçekleştirilebilir.

Tablo 1.3. Genetik çalışmalarda kullanılan belirteç tipleri, özellikleri ve potansiyel uygulama sahaları (Liu ve Cordes, 2004).

Belirteç Tipi	Kısa adı	Önceden moleküler bilgiye ihtiyaç var mı?	Özellik	Kategori (Tip I/TIP II) <sup>2</sup>	Çalışılan lokus	Olası Allel sayısı	Polimorfizm oranı	Uygulama sahası
Alloenzim		Evet	Mendel kalıtım, Kodominant	Tip I	Tekli	2 –6	Düşük	Gen bağlantısı haritalama, Populasyon çalışmaları
Mitokondrial DNA	mtDNA	Hayır <sup>1</sup>	Maternal Kalıtım			Çoklu	Haplotipler	Maternal soy
Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	RFLP	Evet	Mendelian, Kodominant	Tip I yada Tip II	Tekli	2	Düşük	Gen bağlantısı haritalama
Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA	RAPD, AP-PZR	Hayır	Mendel kalıtım, dominant	Tip II	Çoklu	2	Orta	Populasyon çalışmaları ve Hibrit belirleme için Parmak izi tekniği
Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi	AFLP	Hayır	Mendel kalıtım, Dominant	Tip II	Çoklu	2	Yüksek	Gen bağlantısı haritalama, Populasyon çalışmaları
Mikrosatellit	SSR	Evet	Mendel kalıtım, Kodominant	Çoğunlukla Tip II	Tekli	Çoklu	Yüksek	Gen bağlantısı haritalama, Populasyon çalışmaları, Babalık analizi
İfade edilmiş Sekans İşaretleri	EST	Evet	Mendel kalıtım, Kodominant	Tip I	Tekli	2	Düşük	Gen bağlantısı haritalama, fiziksel haritalama, Karşılaştırmalı haritalama
Tek Nükleotid Polimorfizmi	SNP	Evet	Mendel kalıtım, Kodominant	Tip I Tip II	Tekli	2, fakat 4 e kadar	Yüksek	Gen bağlantısı haritalama, Populasyon çalışmaları
Ekleme/Çıkma	Indels	Evet	Mendel kalıtım, Kodominant	Tip I Tip II	Tekli	2	Düşük	Gen bağlantısı haritalama

<sup>1</sup>: Korunmuş PZR primerleri yakın türün sekans bilgisinden adapte edilmiştir.

<sup>2</sup>: Tip I belirteçler, genin bilinen fonksiyonuyla, Tip II belirteçler ise anonim genom segmenti ile alakalıdır (O'Brien, 1991)

### 1.11. Mitokondrial DNA

Populasyon ve filogenetik çalışmalarda mtDNA'nın tercih edilmesi için birçok neden bulunmaktadır. Hücrenin DNA'sından fiziksel olarak ayrılmıştır ve sirküler halde bulunur. Nispeten küçük bir moleküldür, balıklarda yaklaşık olarak 16-17 Kb büyüklüğündedir ve genomun %1'den daha küçük olduğu hesaplanmıştır (Davidson vd., 1989) ve saf olarak izole edilmesi nispeten kolaydır. En büyük mitokondrial genom (yaklaşık 39,9 kb) bir çift kabuklu türü olan tarak'da bulunmuştur ve tür içinde büyük miktarda varyasyon göstermektedir. Tür içi varyasyon genellikle sıralı dublikasyonlardan dolayı kontrol bölgesinde olmaktadır. Balıklarda, tür içi mtDNA'daki boy farklılıkları türler arasında olabilecek fark kadar büyüktür (Bentzen vd., 1988; Avise, 1986).

Yüksek omurgalılarda, kalıtım yalnızca maternal yolla olmaktadır (heteroplazmi bazı türlerde görülebilir) ve rekombinasyon görülmediği için fonksiyonel haploittir (Avise vd., 1990; Harrison, 1989; Moritz vd., 1987). Paternal mitokondrinin döllenme esnasında parçalandığı gözlenir. Bununla beraber, paternal sızıntı 1000 molekülde bir gibi düşük oranda olabilmektedir. Heteroplazmi üzerine, yani bireyde bir tipten fazla mtDNA bulunduğuna dair raporlar giderek artmaktadır. Heteroplazmi bazı balık türlerinin de içinde bulunduğu bir çok temel organizma gruplarında nadir olarak bulunmaktadır. Örnek olarak; mersin balıkları (Buroker vd., 1990); morina balıkları (Arnason ve Rand, 1992) ve midye türlerini verebiliriz. Balıklarda rapor edilmiş heteroplazmi durumlarına bakıldığında, heteroplazmik bireylerin populasyon içindeki dağılım oranları *Amia calva* (bowfins) (Birmingham vd., 1986)'da %5; Clupeidae türü olan *Alosa fallax*'da %12 (Bentzen vd., 1988) ve mersin balıklarında %41 oranına kadar ulaşmıştır (Bruker vd., 1990).

Aşılana populasyonların doğal ortama etkisinin ortaya çıkarılması (Ferris ve Berg, 1987; Gyllensten, 1985) mtDNA'yı önemli kılmaktadır. Cinsiyet oranını eşit kabul ettiğimizde etkili populasyon büyüklüğü nükleer genlerin ¼'ü kadardır ve bu durum mtDNA varyasyonunu, yakın zamanlardaki populasyon olayları ve genetik varyasyondaki azalma gibi olaylara karşı hassas kılar.

Hayvanlarda mtDNA baz değişiminin yüksek oranda olmasından dolayı mitokondrial genom, kodlanan nükleer DNA ile karşılaştırıldığında yüksek evolusyon oranına sahiptir (Meyer, 1993). Bunun muhtemel sebebi ise mtDNA polimerazın azalan doğruluğu ve daha etkisiz bir DNA tamir mekanizmasıdır (Clayton vd., 1974; Brown vd., 1979). Sekans ve kesici enzim kullanılarak mtDNA üzerine yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlara

göre evolusyon oranı tek kopyalı nükleer genlere oranla 5-10 kez daha hızlıdır (Brown vd., 1979). mtDNA'nın gözlenen bu hızlı evolusyonu nokta ve parça mutasyonunun yüksek orandaki frekansından kaynaklanmaktadır (Brown vd., 1982). Primatların tüm mitokondrial genomundaki değişim oranı  $10^6$  yılda yaklaşık olarak % 0,5-1 oranındadır (Brown vd., 1982). Bunun yanında mersin balıklarında bu oran memelilerden 2-4 kat daha düşüktür ve diğer balıklar türleri içerisinde de düşük mutasyon hızına sahiptir (Kriger ve Fuerst, 2002).

Mitokondrial genomun gen bölgeleri farklı oranlarda değişim gösterebileceğinden çalışma amacına bağlı olarak hedef gen bölgesi ve çalışma yöntemi seçilebilir. Daha hızlı değişim gösteren genler, yakın taksonların çalışılmasında daha kullanışlıdır. Birçok balık türü için komple mtDNA sekansları mevcuttur, bu bilgi ışığında çoğu gen için yeni primerler düzenlenerek o gen bölgesi çoğaltılabilir.

Omurgalıların mitokondrial genomu, proteini kodlayan 13 gen, ribozomal RNA'ları kodlayan 2 gen (küçük 12S ve büyük 16S rRNA), transfer RNA (tRNA)'yı kodlayan 22 gen ve RNA transkripsiyon ve mtDNA replikasyonu için başlangıç bölgelerini içeren kodlanmayan (kontrol bölgesi) içermektedir. Proteini kodlayan genler NADH dehidrogenase (ND1,2, 3, 4, 4L, 5, 6)'ın 7 altbirimi, Sitokrom b, Sitokrom c oksidazın 3 altbirimi (CO I, II, III) ve ATP sinthetase'in 2 altbirimi (ATPaz 6 ve 8) olarak sıralanır.

Nükleer genomun aksine, hayvanların mitokondrial genomu çok etkindir. Nadiren dublikasyon veya kodlanmayan sekans içerirler. Mitokondrial protein kodlayan genler intron içermez ve genler genellikle 10 bazdan daha az olarak ayrışırlar. İki gen, aralarında genler arası ayırıcı bölge (ITS) bulunmadan bitişik olabilir ve bazı durumlarda bir kaç baz üst üste çakışabilir. Transfer RNA genleri ve protein kodlayan genler önemli derecede çakışabilir (Clary ve Wolstenholme, 1985). Omurgalılarda ATPaz 6 ve ATPaz 8 genlerinin okunabilen kısımları 6-7 bazdan daha fazla üst üste çakışmaktadır.

Balıklarda, çok miktarda büyük kodlanmayan bölgeler tanımlanmıştır. Johansen vd. (1990), Atlantik morina balıklarında Thr-tRNA ve Pro-tRNA arasına girmiş 74 bp baz tespit etmiştir. Xenopus genusuna dahil kurbağalarda bu kodlanmayan bölge yeri yalnızca 26 bp uzunluktadır (Roe vd., 1985) ve mersin balığında yalnızca 3 bp uzunluktadır (Gilbert vd., 1988). Bir çok familyaya bağlı balık türünde Thr-tRNA ve Pro-tRNA arasındaki baz sayısı 5 bp' den az değildir.

Sitokrom oksidaz ve sitokrom b alt birimlerini kodlayan genler en fazla korunan genlerdir. En fazla farklılık gösterenler ise bir kısım ND ve ATPaz genleridir. Bu yavaş evrimleşen protein kodlayan genler bir birlerine uzak olan Neopterygian balıklar arasındaki akrabalığı belirlemede kullanılmaktadırlar.

Tüm omurgalılar 22 adet mitokondrial tRNA içermektedir. Bunlar yaklaşık olarak sitoplazmik eşlerinden (59–75 bp uzunlukta) daha küçüktürler. Mitokondrial tRNA genleri nükleer tRNA genlerine oranla 100 kez daha hızlı evrimleşir (Brown vd., 1982; Meyer, 1993). Nükleer tRNA'yla karşılaştırıldığında evrimleşme hızlı olmasına rağmen mitokondrial genom içerisinde evrimleşme nispeten yavaş olmaktadır. Uzunlukları küçük olduğundan filogenetik çalışmalar için çok iyi bir gen seçimi olmayabilir, fakat tRNA genlerinin korunmuş yapılarından dolayı PZR primer dizaynı için çok iyi bölgelerdir.

Hayvanların mitokondrial genomunda iki adet Ribozomal (rRNA) gen bulunmaktadır. Bunlar küçük olan 12S (yaklaşık omurgalılarda 819–975 bp) rRNA geni ve büyük olan 16S (omurgalılarda yaklaşık 1571–1640 bp) rRNA genleridir. Nükleer rRNA (18S ve 28S) ve tRNA genleri mitokondrial eşlerine göre 100 kat daha yavaş evrimleşir (Dawid vd., 1972).

D-loop kontrol bölgesi memelilerde yüksek değişim oranına ve boy mutasyonuna maruz kalmasına rağmen balıklarda genellikle farklılık göstermeyebilir (Giuffra vd., 1994; Hall ve Nawrocki, 1995). Bütün mitokondrial genler içinde, kontrol bölgesi en yüksek değişim oranına sahiptir. Kontrol bölgesinin evolüsyon oranı mitokondrial protein kodlayan genlerin evolüsyon oranından 2-5 kez daha fazladır (Meyer vd., 1990). Kontrol bölgeleri sıralı dublikasyonlardan dolayı boyca 200–4100 bp arasında farklılıklar göstermektedir ve bundan dolayı omurgalıların mitokondrial genomları uzunluk farklılıklarının çalışılmasında ana neden olmaktadır. Ayrıca populasyon seviyesinde yüksek frekansta parça mutasyonlarına sahiptir. Balıklarda heteroplazmi gözleendiğinde sıralı dublikasyonlar ve farklı büyüklüklerde tekrarlar bulunmaktadır. Mutasyon burada çok hızlı biriktiği için, kontrol bölgesi çok yakın türler arası filogenetik ilişki üzerine yapılan çalışmalar ve populasyon seviyesinin de yapılan çalışmalarda tercih edilen bir moleküldür.

### 1.12. Filogenetik’de Kullanılan Metotlar, Model Seçimi ve Güvenirlik Testi

Filogeni, bir türün yada daha yüksek gruplanmış organizmaların tarihi ve evrimsel gelişimidir. Filogenlerin yapılandırılmasında çoğu çaba evrimsel ilişkilerin anlaşılmasına yöneliktir. Filogenetik çıkarımda kullanılan verinin iki geniş kategorisi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi karakter verisi, takson hakkında bilgi sunar ve ikincisi uzaklık veya benzerlik verisi, bu da taksonlar arasındaki ikili ilişkileri tanımlar.

Türler arasındaki filogenetik ilişki yada gen sekanslarından gözlenen varyasyonu en iyi anlatan evrimsel ağaç veya ağaçları bulmak için genellikle üç temel metot kullanılmaktadır. Bunlar maksimum parsimoni metodu, uzaklık metodu ve maksimum olasılık metodudur ki bu da özel verilerle (DNA sekans verisi gibi) çalışan birçok özelleşmiş metotları içermektedir (Felsenstein, 1981). Bu üç metot “ihtimal (most likely)” yada “en iyi (best)” olanı seçerek evrimsel ağacı yeniden oluşturmak için farklı algoritma, ölçüt ve yöntemlerden yararlanır. Elde edilen sonuçlar filogenetik ilişkilerin yorumlanmasında kullanılır (Saitou ve Nei, 1987).

Maksimum Parsimoni Metodu; yaygın olarak kullanılan ağaç oluşturma metotlarından biridir. Bu metot ilk olarak 1966 yılında Eck ve Dayhoff tarafından aminoasit sekans verileri için kullanılmıştır (Nei, 1987), fakat nükleotid sekans verileri içinde kullanılabilir (Fitch, 1977). Maksimum parsimoni metodunun prensibi parçacık (partiküller) topoloji yoluyla vurgulanan evrimsel olayların miktarının çıkarılması ve en az miktardaki evrimsel olay gerektiren ağacı seçmektir. Genelde bunun anlamı minimum değişime sahip olan ağacı araştırmak için çok miktardaki farklı topolojilerin incelenmesidir. Maksimum parsimoni analizleri çoğunlukla diğer uzaklık tabanlı analizlere göre daha çok tercih edilir. Bunun nedeni ise karakter tabanlı yaklaşımdır. Şöyle ki, bu yaklaşım daha çok veri çeşidini kullanılabilen ve daha çok veriyi desteklemektedir.

Uzaklık Metodu; UPGMA, en çok kullanılan metotlardan birisidir ve topolojilerin yeniden oluşturulması metotlarının en basitidir. Bilgisayar simülasyonları evrimsel oranların sabit olmadığı, yani sabit bir moleküler saat varsayımına ihtiyaç duyduğu, bunun tersi durumda ise bu metodun zayıf olduğunu önermektedir (Saitou ve Imanishi, 1989; Nei, 1991). UPGMA metodu 1973 yılında taksonomik fenogramların yada fenotipik benzerlik ile grup OTU (Operasyonel Taksonomik Ünite)’lerinden oluşan ağaçları ve yeniden oluşturulması için tanımlanmıştır. Moleküler saat varsayımı tutarlı olduğu zaman filogenilerin yeniden oluşturulmasında iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Gerçekte

moleküler saat fonksiyonları tamam (mükemmel) ise bu metot iyi bir şekilde uygulanabilir (Nei, 1991). Bu metodun diğer bir avantajı da, aşırı derecede hızlı olmasıdır. Uygun bir program ile birkaç dakikada yüzlerce türden bir ağaç oluşturulabilir. Diğer Uzaklık metodu da Komşu Bağlantı metodudur (Neighbour Joining) (Cavalli-Sforza ve Edwards, 1967; Saitou ve Imanishi, 1989; Silva ve Russo, 2000). Bu metot da, ağaç en küçük kol uzunluğu ile oluşturulur. İlk bakışta çok yoğun hesaplamalarla tanımlanmıştır, fakat metot mümkün olan bütün ağaçlar içerisinde en kısa kol uzunluğuna sahip ağacı araştırmaktadır. Açıkça OTU'lerin sayısı arttıkça ağaç sayısı da artmaktadır ve hızlı bir şekilde araştırmak imkânsız olmaktadır. Bu nedenden dolayı Saitou ve Nei (1987) ağaçlar için sezgisel algoritmayı önermişler ve buna komşu-katılımı denmiştir. Burada çatallanan tek bir ağaç üretilir. Komşu bağlantı algoritması star-ağaç topolojisi ile başlar ve sıralı olarak OTU'lerin çiftlerini (komşu) seçer, bu ise ağacın toplam uzunluğunu minimize eder. Bu işlem ağaç tamamen kararlı olana kadar devam eder. Sabit olmayan uzaklıklar kullanıldığı zaman uygulama oldukça iyi görülmektedir (Rzhetsky and Nei, 1993). Bir diğer uzaklık metodu da Fitch-Margoliash metodudur. Merit fonksiyonun minimizasyonunu içerir. Burada taksonlar arası uzaklıklar arasındaki toplam farklılaşmayı ölçer. Bu işlem ağaçtaki dal uzunlukları yoluyla tahmin edilir veya hesaplanır. Kısa dallı ağaçlar için çok doğrudur.

Maksimum Olasılık Metodu (Maximum Likelihood); yeniden yapılandırma metodudur. Varsayımlar üzerine hareket eder. Taksonlar arasındaki ilişki için en iyi olasılığı belirleyen basit testlerden biridir. Diğer bir ifade ile gözlenen farklılığı açıklamak için değişimin en az miktarı gereklidir. Maksimum olasılık metodunun temel amacı kollara ayrılan orderlar yada en olası ağaç yada ağaçların topolojisidir. Bu metoda bütün olası ağaç topolojileri ve parametreler arasında olasılığı en fazla oluşan ağacı bulur.

Bayesian çıkarımı: Hemen her alanda kullanımı oldukça yaygınlaşan bu istatistik modeli filogenetiğin en popüler metodudur. Bayesian çıkarım metodu, ağaç oluşturmada maksimum benzerlik metoduna benzer bir yöntem kullanır. Ancak öncül olasılık kullanımı ile bu metottan ayrılır. Bayesian metodu, önceki olası ağaçların dağılımlarından birini alır. Bu önceki dağılımın seçimi, Bayesian çıkarım metodlarını kullananların seçimleri arasındaki farklı noktadır.

Standart bilgisayar programlarında evrimsel modelin keyfi seçiminin yada varsayım modeller kullanımı ile filogenetik ilişkilerden sonuç çıkarmak gerçek ilişkileri göstermez. Genellikle, yanlış bir evrimsel model önerildiğinde, filogenetik modeller daha az doğru (bir çok ağaç içerisinde yanlış bir ağaç yerine geçer) olabilir yada tutarsız (verilerin

artması ile bir yanlış ağaç birleşir) olabilmektedir (Swofford vd., 1996; Felsenstein, 1973; Huelsenbeck ve Hillis, 1993; Bruno ve Halpern, 1999; Posada ve Crandall, 1998; Sullivan ve Swofford 1997; Kelchner ve Thomas, 2006). Bu nedenle evrimsel modelin seçimi için hangi parametrelerin veriye daha uygun olduğunun bilinmesi gerekmektedir (Huelsenbeck, 1995). Örneğin, mtDNA ele alındığı zaman, transisyon ile transversiyon oranında sapma olabilir (Brown vd., 1982). Bu nedenle bir modelin seçiminde eşit transisyon ve transversiyon oranı varsayımı ciddi hatalara neden olacaktır. Bu sahadaki gelişmeler model oluşturulması için yol göstermiştir, modeller transiyon ve transversiyon ikame sapmalarının her ikisini (Kimura, 1980) ve eşit olmayan nükleotid frekansları bulundurabilmektedir (Hasegawa vd.,1985; Kishino ve Hasegawa, 1989). Bu eğilim en son olarak “Genel Zaman Tersine Çevrilebilir (GTR) model ile sonuçlanmıştır. Bu model yalnızca eşit olmayan nükleotid frekansına izin vermez aynı zamanda nükleotid yerleri arasında mümkün olan 6 yer değişiminin her birin farklı oranlarda meydana gelmesine izin verir ( A-C, A-G, A-T, C-G,C-T ve G-T) (Rodriguez vd., 1990).

Daha sonraki gelişmelerle birkaç modeli kullanarak çapraz ikame için varyasyon vermek mümkün olmuştur (Churchill vd., 1992; Yang, 1993, 1994). Değişik yerler arasındaki farklı oranları izin vermek için en çok uygulanan metotlardan biri “ayrı gamma metodu” dur. Bu metot bir gamma dağılımına göre dağılmış nispi ikame oranları varsayılır. Burada gamma dağılımı 1 ve  $1/\alpha$ 'nın varyansının bir ortalamasıdır. Burada  $\alpha$ , dağılımın şeklini tanımlar.  $\alpha$  değerinin büyük olması yerler içinde ikame varyansının daha az olması olarak ifade edilir ( yani bütün yerlerdeki ikame oranları daima eşittir). Oysa düşük (0,01) L-şeklinde dağılım sonucudur (çoğu ikame oranları düşüktür, fakat bazıları yüksektir) (Lewis, 2001).

Bu farklı parametrelerin hepsi parametrece zengin modellerde iyi gelişmiştir. Fakat bu modellerin kullanımı zaman gereksinimi ve hesaplamada daha çok parametrelere ihtiyaç duyması nedeni ile her hesaplamada daha çok hata içerir (Huelsenbeck ve Crandall, 1997). Bunun yerine kullanılacak modeli belirlemede tavsiye edilebilecek yol ise veriye uygun modeli seçmektir. Bu yöntem büyük benzerlikle parametrece zengin modellerin yaptığı gibidir, fakat daha az parametre kullanarak uygulanır. En uygun modelden önemli derecede farklı olmayan en basit modeli seçerek, hata ve zaman tüketimi azaltılır (Swofford vd., 1996). Bu konu üzerine farklı istatistiksel metotlar vardır. Bu metotlardan bir tanesi Akaike bilgi kriteri kullanılarak (AIC) uygulanabilir (Akaike, 1974). Yine benzer şekilde BIC (Bayesian ) kriterine göre de uygun model seçimi yapılabilir.



Filogenetikçilerin ağaçların güvenilirliğinin hesaplanması için en yaygın kullandığı istatistiksel test “seç-bağla (bootstrap)”dır (Efron, 1982). Felsenstein (1985) tarafından geliştirilmiş olan seç-bağla tekniği, filogenetik çalışmalar için kullanılır ve yeniden örnekleme ile yerine koyma yöntemidir. Her bir tekrar için bir topoloji oluşturulur. Bütün tekrarlardan sonra ağaçlar karşılaştırılır ve gruplandırma için üretilen ağaçların oranı, ağacın iç kol ilişkisi için kullanılır ve buda seç-bağla veri setlerinin tutarlılığının bir ölçüsünü verir. Çok farklı türlerle yapılan çalışmalarda kullanılır (Silva ve Russo, 2000). Hedges (1992), 2000 tekrar uygulanması durumunda %95 seç-bağla değerinin hassasiyetinde sonsuz sayıda tekrar ile karşılaştırıldığında %1’lik bir hata olacağını hesaplamıştır.

### 1.13. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı

Özellikle Karadeniz havzasında mersin balığı (Acipenser) türü çok fazladır. Nitekim daha önceki çalışmalarda morfolojik ve meristik özelliklere dayanılarak çeşitli alt türler tanımlanmıştır. Bu çalışmanın da yürütüldüğü Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü biyo-ekolojik özellikleri ve kültüre alınabilirliği konusunda ön çalışma niteliğinde bir çalışma yapmıştır (Akbulut vd., 2005). Aynı zamanda populasyon çalışmaları, koruma planı oluşturma, yetiştiricilik, habitat ve genetik disiplinlerinden oluşan daha kapsamlı bir proje yürütülmektedir (Akbulut vd., devam ediyor). Ülkemizde mersin balığı ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok büyütme, avcılık gibi konuları içermekte ve çok az sayıdadır. Türkiye kıyılarında mersin balığı türleri ile yapılan genetik çalışma mevcut değildir. Karadeniz’den örneklenerek yapılan çalışmalar mevcut olmasına rağmen Türkiye kıyılarından örnekler içermemektedir. Gerek koruma stratejisinin geliştirtmesinde gerekse yetiştiricilik ve stok yönetim stratejilerinin belirlenmesinde filogenetik ve filocoğrafik yapılanma bilinmemektedir. Ülkemizde mersin balığı üzerine yapılan ilk moleküler çalışma olması nedeniyle bu noktalardaki bilgi eksikliğini bir ölçüde kapatarak daha sonraki çalışmalar için temel oluşturacaktır. Bu çalışmada, Karadeniz’in Türkiye kıyılarından örneklenen Mersin balığı türleri arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Genetik veri olarak mtDNA Cyt-b ve tRNA<sup>pro</sup>-Dloop gen bölgeleri sekans analizi sonuçları kullanılmıştır.

#### 1.14. Önceki Çalışmalar

Birstein ve Doukakis (2000), Avrupa Atlantik mersini (*Acipenser sturio* L., 1758) ve Amerika Atlantik mersini (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill, 1815) arasındaki mitokondrial sitokrom-b (cyt-b) , 12S ve 16S genlerinin kısmi sekans verilerinin moleküler filogenetik tabanlı analizini yaparak, bu türler arasındaki yakın ilişkiyi göstermişlerdir. *Acipenser* genusu içerisinde grup olarak biçimlenen kardeş grup bu genusun diğer türleri içerisinde daha bazal grup olarak görülmüştür. Özellikle, *A. sturio* içerisinde en az 2 farklı genetik yapı bulunmuştur (Kuzey ve Batlık Denizi), fakat bunlar alttür olarak tanımlanmamıştır. *A. oxyrinchus*, için mtDNA kontrol bölgesi ve cyt-b bölgelerinde sabitlenmiş farklılıklar bulunmuştur ve bu farklılık 2 alttürü ayırmaktadır, bunlar Atlantik mersini (*A. oxyrinchus oxyrinchus* Mitchill, 1815) ve Meksika Körfezi mersini (*A. oxyrinchus desotoi* Vladykov, 1955)'dir. *A. o. oxyrinchus*, içerisindeki haplotip çeşitliliğinin (Hd), Kuzey Amerikanın doğu kıyıları boyunca güneyden kuzeye doğru gidildikçe azaldığı görülmüştür.

Jennecknes vd. (2000), yumurtlama zamanı Volga Nehrinden yakalanan 34 yetişkin *A. gueldenstaedtii* (14 dişi ve 20 erkek), Hazar Denizinin güneyinden 3 tane ve Azak Denizinden 9 tane, Lena Nehrinden 2 yetişkin dişi *A.baerii* örneği ile gen bankasından alınan sekanslarla çalışmıştır. Volga Nehrinden yakalanan ve morfolojik olarak *A. gueldenstaedtii* olarak sınıflandırılan balıklardan mtDNA cyt-b geninin sekans verilerinden filogenetik analiz yapılmış ve bu bireylerin 11 tanesinin *A.baerii* olduğunu tespit edilmiştir. Yapılan analizde, cyt-b sekanslarında 24 adet değişken bölge belirlenmiş ve bunun sonucunda 6 haplotip tespit edilmiştir. Nükleotid Farklılığı (k) ortalama 14,7 ve Fst= 0,75 tesadüfî olmayan bir önemlilik göstermiştir. Volga Nehrinden *A.baerii* olarak tanımlanan üç haplotip ile H4-H6 4 yerli *A. gueldenstaedtii* haplotipi arasındaki genetik farklılık 13.0 +- 1,6% olarak belirlenmiştir. Jukes-Contor Uzaklığı (p-uzaklığı) dan, MJ ortalama katılım ve NJ komşu katılım algoritmasını kullanmışlar ve seç-bağla değerini %72 olarak gözlemlemişlerdir. Azak Denizi yada Hazar Denizinin güneyindeki *A. gueldenstaedtii* lerde *A.baerii* haplotipi görülmemiştir. *A. gueldenstaedtii* ile *A. baerii* yada *A. baerii* hibritleri arasında genetik kontaminasyonu gözlenmiştir. Bu türlerin yerli *A. gueldenstaedtii* ile hibritleşmesi ve geri çaprazlaması sonucunda *A. baerii*'nin morfolojik olarak tanınmasını sağlayacak özellikleri kaybolduğu belirtilmiştir. Bu bulgular havyar ticareti kontrolü yada tür tanımlaması için koruma ve yönetim programları için önemli olduğu belirtilmiştir.

Almadourave vd., (2000), İspanya’da müzede bulunan örnekler üzerine yürütmüş olduğu çalışmada, daha önce Garrido Romas vd. (1997) tarafından morfolojik olarak incelemiş olan ve *A. naccarii* olarak belirtilen ve böylece *A. sturio* ile birlikte bu iki türünde İspanya için yerli tür olduğu belirtilmesine rağmen örneklerden birinin türünü belirlemek için mtDNA Cyt-b gen bölgesinin kısmi sekansı alınmıştır. Bu verileri Adriyatik, Kuzey Denizi ve Grindo Nehri (Fransa)’den alınan canlı *A. sturio* ve balık çiftliklerinden alınan *A. naccarii* ve *A. baerii* örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik analizler cyt-b geninin kısmi dizilimlerinin (402–245 bp) karşılaştırılması ile yapılmıştır. Türler arası sekans farklılığı % 6,91 ile *A. sturio* - *A. naccarii* ve % 7,43 *A. sturio* - *A. baerii* arasında değiştiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre morfolojik çalışmalara göre *A. naccarii* olarak isimlendirilen müze örneğinin *A. sturio* olduğu ve bu türün İber Yarımadasının yerli tek türü olduğu belirtilmiştir.

Doukakis vd. (1999), iki tür mersin balığı, Sibirya (*Acipenser baerii*) ve sivrişka mersin (*A. stellatus*) balıklarında, mtDNA *D-loop*, sitokrom *b* (*Cyt-b*) ve *ND5/6* gen bölgelerinin sekanslarını almış, geleneksel olarak belirlenen alt türlerin taksonomik uyumu ve koruma yönetim birimlerini belirlemek için çalışmıştır. Hiçbir alttür için tanımlayıcı farklılıklar bulunamamıştır. *A. baerii* içerisinde haplotiplerin coğrafik yapısı gözlenmiş ve gen akışı hesaplanmıştır. Genetik verilerden *A. stellatus* için tür içi alt bölünmenin olmadığı tespit edilmiştir. Koruma birimlerinin tanımlanmasında filogenetik kriterlerin kullanımının rasyonelliği için diğer metotlarla karşılaştırmalar yapılmıştır. Sonuç olarak Acipenseridae içerisindeki alttürlerde morfolojik ve coğrafik tabanlı alttür tanımlamalarının, yönetim için direkt olarak biyolojik ayrılma yaklaşımının uygun olmayabileceğini ve genetik destek olmadan koruma programlarında kullanılmaması önerilmiştir.

Doukakis vd. (2005), *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii* ve *H. huso* türlerinin farklı popülasyonlarından örnekler ile yaptıkları çalışmada 3 mtDNA gen bölgesini (kontrol, NADH5 ve Cyt-b) çalışmışlardır. D-loop (kontrol) bölgesinin (631–646 bp) sekanslarını karşılaştırarak her bir tür için alttürler yada popülasyonlarda bulunan tanımlayıcı farklılıkların mevcut olup olmadığına bakmıştır. D-loop gen bölgesi için moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre haplotipler arasında önemli varyans olduğu görülmüştür. Bunun nedeni ise türler ve popülasyonlar içerisinde haplotipler arası farklılıktan kaynaklandığını, tür içi haplotip farklılığı (*H. huso* % 99,6, *A. stellatus* % 95,0, *A. gueldenstaedtii* % 81,0) ve popülasyonlar içerisinde ise *A. gueldenstaedtii* %76,1

ile önemli olduğunu belirtmiştir. Bütün İkili karşılaştırmalarda f-değeri önemli bulunurken yalnızca Azak ve Hazar denizleri *A. gueldenstaedtii* ve Hazar ve Karadeniz'de *A. stellatus* ve *H. huso* önemli bulunmamıştır.

Tagliavini (1999), İtalya'da yetiştirilen 6 mersin balığı türü arasında mitokondrial DNA değişkenliği üzerine çalışmıştır. Mitokondrial cyt-b ve D-loop gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve RsaI enzimi ile kesilerek oluşan parçacıklarla analiz yapılmıştır (RFLP). Bu metodun türler arası varyasyonun belirlenmesine izin verdiği ve bu nedenle türlerin belirlenmesinde uygun bir belirteç olduğu belirtilmiştir. *Cyt-b* geninin kısmi sekansından elde edilen veriler, Maksimum Parsimoni, Komşu Bağını (NJ), ve UPGMA uzaklı metotlarıyla test edilmiştir. Yapılan sınıflandırma analizine göre *Acipenser* ve *Huso* genuslarının monofiletik olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında bu ve önceki sitogenetik veriler 120 kromozoma sahip 3 tür olduğunu göstermiştir (*H. huso*, *H. dauricus* ve *A. ruthenus*).

Birstein vd. (2000), çalışmasında CITES izleme programları kapsamında yapılan mersin balığı ve havyar ticaretinde moleküler tür tespit metotların önemliliğini vurgulayarak, günümüze kadar tür tespitinde problemler yaşanan yakın ilişkili 4 Avrasya mersin türlerinin (*A. baerii*-Sibirya mersini, *A. gueldenstaedtii*-Rus mersini, *A. persicus*-İran mersini ve *A. naccarii*-İtalya mersini) havyardan tür tespiti üzerine çalışma yürütmüştür. Çalışmada yaklaşık 2,3 kb'lik mtDNA sekans (Sitokrom b, NADH5, Kontrol bölgesi) verileri kullanılmıştır. Sonuç olarak, *A. gueldenstaedtii*'nin atasal tür olduğu ve buna bağlı olarak 2 mitokondrial soy grubu bulunmuştur; bir tanesi filogenetik olarak birleşmiş olan *A. persicus* ve *A. naccarii* iken diğer soy grubunun ise *A. baerii* olduğu tespit edilmiştir.

Birstein vd. (2002), yaşayan 23 mersin türü arasındaki ilişkiyi göstermek için 5 mtDNA gen bölgelerinin sekansları (sitokrom b, NADH5, kontrol bölgesi, 16S ve 12S) üzerinden bir filogenetik hipotez oluşturmuştur. Ağaç *Acipenser* ve *Huso* türleri arasındaki ilişkiyle ilgili önceki hipotezleri desteklemiştir. *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus* genuslarının *Scaphirhynchinae* altfamilyası gibi monofiletik grup olmadığı belirtilmiştir. *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus* arasındaki morfolojik benzerlik Kuzey Amerika ve Orta Asya nehir sistemlerinin benzer çevre şartlarında farklı atasal mersin balığının bir sonucu olabileceği belirtilmiştir.

Ludwig vd. (2002), moleküler metotlar kullanarak ticareti yapılan siyah havyardan mersin balığı türlerinin tespitine yönelik çalışmışlardır. 858 bireyde 22 tür mersin balığının

tespiti için Cyt-b genindeki potansiyel, türlere özgü kesim yerleri belirlenmiştir. Bütün türlerin ayırımının tek bir endonükleaz enzimi kullanarak mümkün olmayacağı, türlere bağlı olarak 1- 4 farklı enzimin kullanılması gerektiği bildirilmiş ve tamamen 7 farklı kesici enzimin 17 *Acipenseriform* türünün, mtDNA düzeyinde türlere özgü kesici yerlerinin belirlenerek ayrılabilmesi belirtilmiştir. *Scaphirhynchus* genusu içerisinde üç tür (*S. albus*, *S. platorhynchus* ve *S. suttкуси*) ve yine *A. gueldenstaedtii* ile *A. persicus* birbirinden ayrılmamıştır. Bu çalışma sonucunda havayar üretiminin büyük bir kısmının yapıldığı üç tür olan, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus* ve *H. huso* türlerinin belirlenmesi ve kontrolü imkanı sağlanmış ve daha detaylı tanımlamalar için kombine nükleer ve mtDNA belirteçlerini kullanılmasının gerektiği ifade edilmiştir. Ayrıca çalışmada *A. gueldenstaedtii* / *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii* / *A. ruthenus* ve *A. gueldenstaedtii* yada *A. persicus* / *A. nudiventris* arasında hibritleşmeler gözlemlenmiştir.

Wolf (1999), mersin balığı türlerini havyardan tespit etmek için mitokondrial gen bölgelerinin (tRNA<sub>glu</sub>/ Cyt-b) PZR kullanarak çoğaltılmasına dayalı bir metot geliştirmiştir. Farklı tipteki havayarlar ayrılarak, çoğaltılan 462 bp uzunluğundaki PZR ürününün farklı enzimlerle kesilmesi sonucunda türe özgü kesim yerleri ile türlerin belirlenmesi sağlanmıştır. Kullanılan bu metotla Avrupa ve Asya türlerinden, *Acipenser* ve *Huso* 'dan farklı 10 türün ayrılması için uygun olduğu gösterilmiştir.

Pourkazemi (1999), Rus mersininin (*Acipenser gueldenstaedtii*) populasyon yapısı mtDNA D-loop bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve farklı kesici enzimlerle morflar oluşturulmuştur. Bütün örnekler içerisinde 7 birleşik haplotip belirlenmiş ve ortalama nükleotid ve haplotip çeşitliliği  $0,05 \pm 0,00$  ve  $0,75 \pm 0,00$  (SE) olarak hesaplanmıştır. mtDNA- D-loop bölgesinin enzimlerle kesilmesi sonucunda elde edilen iki morfun (A ve B) sırasıyla 0,5 ve 0,36 ile yüksek frekansa sahip olduğu tespit edilmiş ve Rus mersini için farklı biyolojik grupların (stok yada mevsimsel grup, yaş grubu) için potansiyel genetik belirteç olabileceğine işaret edilmiştir.

Congiu (2001), çalışmasında AFLP'nin hibrit mersin balıklarını tespit etmede kullanılabilirliğini test etmiştir. 7 adet *A. nacari* (Orzinuovi, Brescia, İtalya) ve 15 adet *A. transmontanus* (Sacramento-San Joaquin ) ve bu balıkların hibriti olan 5 birey (Orzinuovi, Brescia, İtalya) ile çalışmıştır. Çoklu lokus AFLP profillerinin sınıflandırma analizinin kullanımı ile gözlenen ve beklenen örnekler üzerinden ayırma testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bu metot ile mersin balığı hibritleri kolay bir şekilde tanımlanabileceği görülmüştür.

Comincini (2002), çalışmasında RAPD analizini kullanarak, *Huso huso*, *Acipenser naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus* ve *A. ruthenus* türleri arasındaki ilişkileri irdelemiştir. Farklı primerlerin aplifikasyonu ile çoğaltılabilir elektroforetik modeller elde edilmiş ve bu modeller üzerinden monomorfik ve polimorfik karakterlerin bir veri seti düzenlenmiştir. RAPD belirteçlerinin çalışılan türler içinde sistematik veri sağlayabilir ve mersin türlerinin ayırımında kullanılabilir olduğu tespit edilmiş ve türe özgü belirteçlerin bazıları izole edilerek klonlanmış ve bu şekilde farklı türlerin ayırımında kullanılacak etkili prop sağlanmıştır.

Jenneckens (2001), mersin balığı makrosatelliti olan LS-39 lokusunu 10 farklı *Acipenserinae* türünde denemiş ve siyah havyar üretiminde yoğun olarak kullanılan *A. stellatus*'un genomik DNA düzeyinde, belirlenmesi için potansiyel olduğunu belirtmiştir. Bunun nedenini ise çalışılan lokusun 111 bp'lik sabitlenmiş allel ürettiği ve bu allelin, bu zamana kadar çalışılan diğer türlerde bulunmamış olmasına bağlamıştır. Mersin türlerinin kaynağı ile ilgilenildiğinde, LS-39 satellit lokusunun siyah havyar örneklerinden çalışmak için geliştirilen ilk nükleer belirteçler olduğu ve ayrıca mersin balığının poliploid durumunun tartışmasına da ışık tutacağı belirtilmiştir.

Ruiz-Rejon (2000), çalışmasında Adriyatik mersini (*A. naccarii*), Sibirya mersini (*Acipenser baerii*) ve morina (*Huso huso*) türlerinin genomlarından HindIII olarak isimlendirdiği satellit DNA karakterize etmiştir. Bu satellit DNA Atlantik mersinin genomunda bulunamamıştır. HindIII satellit DNA'nın kullanımıyla diğer türler karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre; 1) *A. naccarii* ve *A. baerii* türlerinin yakın ilişkili olduğu 2) *H. huso* türünün *Acipenser* genusuna ait görüldüğü ve muhtemelen *Huso*'nun *Acipenserinae*'dan ayrı bir genus olarak ayrıldığı 3) *A. sturio* türünün, çalışılan diğer üç türden stHindIII satellit bölgesinin olmayışı ile farklılaştığı ve büyük ihtimalle *Acipenserinae* içerisinde farklı bir evrimsel soy grubu gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, stHindIII satellit DNA'sının Avrupa'nın farklı bölgelerinden yakalanan mersin örneklerinin tespitinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Ludwig vd. (2000), 19 mersin türü ve 1 adet paddlefish de toplam 1238 örnekte heteroplazmi çalışmışlardır. Merkezi tekrar bölgesinin uzunluğu türlere göre 74-83 bp aralığında değiştiğini belirtmiştir. Paddlefish türü *Polyodon spathula*'da tekrar bölgesi görülmemiştir. Bununla birlikte tekrar bölgelerinin TAS motifleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. D-loop içerisinde türler arası görülen 138 mutasyonun yaklaşık yarısı TAS motiflerinin 10 bp aşağısı veya yukarısında görülmektedir. İlginç olarak homoplazmik

türlerin çoğunda TAS motiflerini yukarısı silindiği görülmektedir. TAS bölgesinin alt kısmında silinme ise yalnızca 2 heteroplazmik türde görülmüştür ve bu olay heteroplazmik durumla ilgili değildir. Heteroplazmik bireylerin çoğunda 2 yada 3 tekrarlı yapı görülmüştür. İki tekrardan daha fazla tekrara sahip homoplazmik birey görülmemiştir. En fazla 7 tekrar görülmüştür. Görülen tekrar sayıları ve türler şöyledir; 74 bp tekrar *S.platorynchus* ve *S.albus*, 78 bp *A.mikadoi*, 79 bp *A. oxyrinchus* ve *A. medirostris*, 80 bp *A. ruthenus* ve *A. sturio*, 82 bp *A.baerii*, *A. fulvescens*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii*, *A. nudiventris*, *A. persicus*, *A. stellatus*, *A. transmontanus* ve *H. huso* ve 83 bp *A. brevirostrum*.

Brown vd. (1996), dört adet Kuzey Amerika türünde (*A. transmontanus*, *A. medirostris*, *A. fulvescens* ve *A. oxyrhynchus*) iki tane tRNA gen ve D-loop bölgesinin sekansları alınarak boy varyasyonuna ve heteroplazmik durumu belirlemek için çalışmıştır. Tekrar bölgeleri 78–82 bp olarak bulunmuştur. Boy varyasyonu ise *A. transmontanus* Gıp: 0,758, *A. medirostris* Gıp: 0,615, *A. fulvescens* Gıp: 1 ve *A. oxyrhynchus* Gıp : 1 olarak hesaplanmıştır. *A. transmontanus* ile *A. medirostris* türlerinin örnekleri (Kb) arasındaki genetik farklılık önemli bulunmamıştır (  $t=0,782$   $df=183$  ve  $p=0,44$ ).

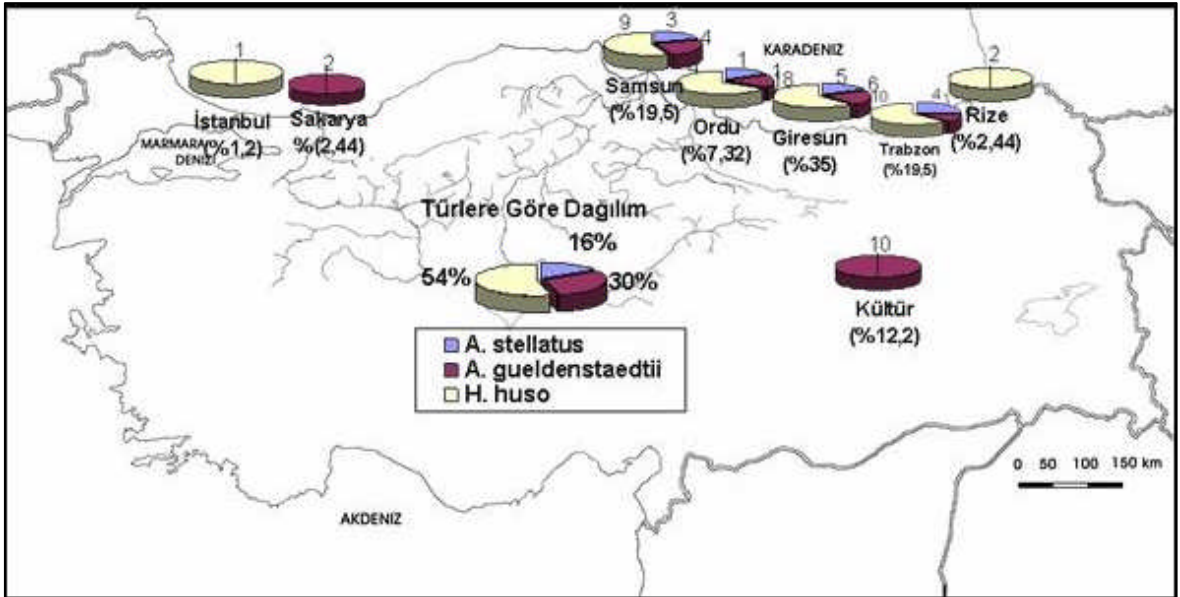
Buroker vd. (1990), *A. transmontanus* örneklerinde D-loop bölgesinde boy farklılığı ve heteroplazmi üzerine çalışmıştır. Bu tür için 82 bp'lik tekrar olduğu tespit edilmiştir. Tekrar bölgeleri arasında tam bir uyumun olmadığı görülmüştür.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1. Çalışma Sahası

Mersin balığı türleri Karadeniz'in Türkiye kıyılarının tamamında (Artvin-Hopa – Tekirdağ) zaman zaman görüldüğü bildirilmektedir ve tüm Karadeniz'de dağılım göstermektedir. Örnekleme yerleri, bu türlerin Karadeniz'in Türkiye kıyısında dağılım gösterdiği yerler ve muhtemel doğal yumurtlama alanlarını da içine alacak şekilde belirlenmiştir (Kızılırmak, Yeşilirmak gibi). Fakat bununla birlikte balıkçılığın yoğun olarak yapıldığı diğer bölgelerden de örnek temin edilmiştir. Çalışmada, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Samsun, Sakarya ve İstanbul olmak üzere toplam 7 ilden örnekleme yapılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Örnekleme alanları ve örneklerin türlere göre dağılımı (*A. baerii* / benzer örneği *A. gueldenstaedtii* Giresun örnekleri içerisinde gösterilmiştir)



### 2.1.2. Örnekleme

Örnekleme, 2005–2007 tarihleri arasında Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, Samsun, Sakarya ve İstanbul olmak üzere toplam 7 ilden yapılmış ve toplam 82 adet örnek toplanmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Örneklenen türler ve örnekleme yerleri (örnek numaraları ile verilmiştir)

Örneklenen Örnekleme Yeri	TÜRLER			TOPLAM
	<i>A. stellatus</i>	<i>A. gueldenstaedtii</i>	<i>H. huso</i>	
Rize			25–78	<b>2</b>
Trabzon	26–27–28–80	81	20–29–30–69–70– 71–72–73–74–75– 92	<b>16</b>
Giresun	48–49–57–60– 90	40–44–46*–53–54– 58	9–18–19–21–22– 23–24–41–42–43– 45–47–50–51–52– 55–56–59	<b>29</b>
Ordu		87	31–83–88–89–86	<b>6</b>
Samsun	32–66	37–61–67–91–62	35–36–38–39–65– 76–77–84–82	<b>16</b>
Sakarya		63–64		<b>2</b>
İstanbul			79	<b>1</b>
Kültür		2–3–4–5–6–8–10– 11–13–14		<b>10</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>11</b>	<b>25</b>	<b>46</b>	<b>82</b>

\**A. baerii*/benzer örneği

Birçok canlı için farklı örnekleme metotları (öldürerek, yakalayıp öldürmeden ve yakalamadan geride bıraktığı (deri, boynuz, dışkı vb.) materyallerden yapılan örnekleme) kullanılmaktadır. Bu çalışmada, balıktan kuyruk yüzgecinden doku parçası alınarak balığa zarar verilmeden uygulanan örnekleme metodu kullanılmıştır.

Örneklemede takip edilen yaklaşım iki grup altında toplamak mümkündür.

1- Tesadüfi avlanan balıklardan yapılan örnekleme; ilk olarak balıkçılarla işbirliği yapılarak av araçları ile hedef dışı av olarak takılan mersin balıklarından örnekleme

yapılmıştır. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünün yürütmüş olduğu proje kapsamında, bu bölgelerde bulunan balıkların mersin türleri hakkında bilgilendirilerek bu şekilde avlanan balıklar için kayıt formları oluşturulmuştur. Canlı balıkların kuyruk yüzgeçlerinden 1–1,5 cm<sup>2</sup>'lik bir doku parçası alındıktan sonra markalanarak kuyruk denize bırakılmıştır. Ağdan ölü çıkmış yada sonradan ölmüş olan taze balıklardan da yine aynı şekilde örnekleme yapılmıştır.

2- Yetiştiricilik havuzlarında mersin balığı besleyen (bulunduran) balıkçı ve kurumlardan yapılan örnekleme; Farklı zamanlarda yakalanmış olup da havuz ve tankları da bulunan balıklar ile yurtdışından getirilen yumurtadan elde edilen larvaların büyütülmesi ile elde edilen bireylerden örnekleme yapılmıştır.

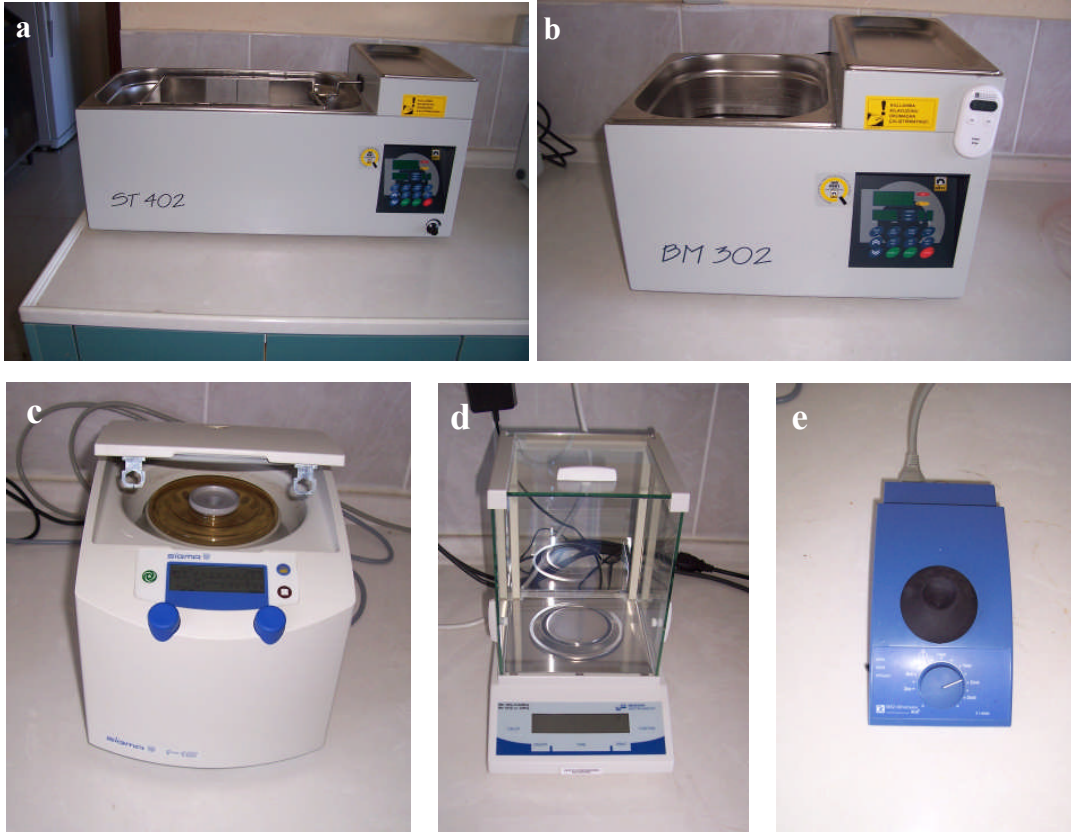
DNA elde etmek için toplanan örneklerin kaudal yüzgeçlerinden alınan yaklaşık 1–1,5 cm<sup>2</sup> doku örneği, içerisinde %98'lik etanol bulunan 1,5–2,0 ml'lik tüplere konularak laboratuara getirilmiş ve -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza altına alınmıştır.

### **2.3. Toplam DNA'nın Elde Edilmesi**

DNA izolasyonu, Karadeniz'in Türkiye kıyılarından toplanan ve %98'lik etanol de saklanan mersin balığı örneklerinin kaudal yüzgeçlerinden veya kas dokusundan yapılmıştır. DNA elde edilmesi için birçok metot kullanılabilir. Doku örneklerinden DNA elde edilmesin için fenol/kloroform-alkol çöktürme protokolü (Kocher vd., 1989; Hillis vd., 1990) kullanılabilir. Daha farklı örnek tipleri için "Chelex" protokolü (Singer-Sam vd., 1989; Walsh vd., 1991) saç örnekleri gibi dokular için uygun olabilir ve "silika" protokolü (Boom vd., 1990; Höss ve Paabo, 1993) eski (ancient) dokulardan PZR inhibitörlerinin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına izin verir. DNA elde edilmesinde ise hazır kitler ve manyetik boncuk protokolleri de kullanılmaktadır (Flagstad vd., 1999).

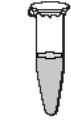







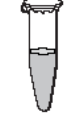
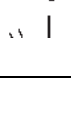
Bu çalışmada toplam DNA'nın elde edilmesinde standart ticari kitler (QIAGEN, DNeasy® Tissue kiti veya PROMEGA SV Wizard kiti) kullanılmıştır. Etanol de saklanan doku örneklerden yaklaşık olarak 2 mm<sup>3</sup> büyüklüğünde 15–20 mg doku hassas terazide (DENVAR, Şekil 2.2.d) tartılarak DNA elde edilmesi için kullanılmıştır. Alınan doku örneği 3-4 parçaya bölünerek 1,5 ml'lik tüpe konulmuş ve oda sıcaklığında tüplerin kapakları açık 5 dakika bekletilerek etanolün uçması sağlanmıştır. İlk aşama olan dokunun parçalanması için tüpe "Parçalama Çözeltisi Ana Karışımı" (Digestion Solution Master Mix) (Çekirdek Lizis çözeltisi 200 µl, EDTA 50 µl (0.5 M- pH 8), Proteinaz K 20 µl (20 mg/ml) ve RNase

A çözeltilisi 4 µl (5 mg/ml)) ilave edilerek 55°C de en az bir gece sarsaklı su banyosunda (NÜVE, ST-402, Şekil 2.2.a) inkübe edilerek dokunun tamamen parçalanması sağlamıştır. Daha sonra Wizard® SV Lizis Tamponu ilave edilerek homojenize olmuş lizat elde edilmiştir. DNA eldesinin ikinci aşaması, lizattan DNA'nın saflaştırılması aşamasıdır. Homojenize olmuş örnek mini spin kolon içine konmuş ve kısa süreli santrifüj (SİGMA, 1-15, Şekil 2.2.c) edilerek DNA'nın seçici membrana yapışması sağlanmıştır. Bu şekilde membrana tutunmuş DNA 2 sefer yıkanarak kontaminantlar uzaklaştırılmıştır. Son olarak dH<sub>2</sub>O veya TE (pH 8,0) tampon ile santrifüj işlemi yapılarak DNA'yı içeren sulu solüsyon elde edilmiştir (Tablo 2.2).



Şekil 2.2. DNA eldesinde kullanılan bazı aletler. a- Sarsaklı su banyosu, b- Sarsaksız su banyosu, c-Mikrosantrifüj, d- Hassas Terazi, e- Vorteks

Tablo 2.2. DNA elde etme protokolü

0,5 ila 1,2 cm uzunluğunda yaklaşık 15-20 mg ağırlığında doku örneği tartılarak iki yada daha fazla parçaya ayrılır ve 1,5 ml'lik tüplere transfer edilir.	
Her bir tüpe 275 µl Parçalama Çözeltisi Ana Karışımı ilave edilir.(Çekirdek Lizis çözeltisi 200 µl, EDTA 50 µl (0.5 M- pH 8), Proteinaz K 20 µl ( 20 mg/ml) ve RNaz A çözeltisi 4 µl (5 mg/ml))	
Örnek tüplerini 55°C de sıcak blokta yada sarsaklı su banyosunda bir gece (16–18 saat) inkübe edilerek dokular parçalanır.	
Her bir tüpe 250µl Wizard® SV Lizis Tamponu eklenir ve vortekslenir.	
Bu aşamada -70°C de muhafaza edilebilir fakat lizatlar bir sonraki adıma geçmeden önceden çözülür ve 55 °C de 1 saat ısıtılır, lizatlar sıcak olmalıdır.	
Her bir örnek lizatı ayrı ayrı 2 ml'lik toplama tüpüne takılan Wizard® SV Minikolonlara transfer edilir.	
13,000 × g de 3 dk. santrifüj yapılır.	
Minikolon uzaklaştırılır ve toplama tüpündeki sıvı dökülür. Minikolon toplama tüpüne yeniden takılır.	
Her bir örneğe 650µl Wizard® SV yıkama çözeltisi (95% ethanol ilave edilmiş) ilave edilir. 13,000 × g de 1 dk. santrifüj yapılır ve toplama tüpündeki sıvı dökülür. 2. yıkama için 500 µl Wizard® SV yıkama çözeltisi ilave edilir 13.000x g de 3 dk. Santrifüj edilir.	
Toplama tüpündeki sıvı dökülür, minikolon yeniden takılır ve 2 dk 13.000 × g de bağlama ortamının kuruması için santrifüj edilir.	
Wizard® SV minikolonlar yeni bir 1,5 ml'lik tüpe transfer edilir ve 250µl oda sıcaklığında Nuclease'sız saf su eklenir. Oda sıcaklığında 1 dak. inkübe edilir	
Minikolon/tüp 13,000 × g de 1 dak santrifüj yapılır. tüpte toplanan sıvı dökülmez.	
2. defa 250µl oda sıcaklığında Nuclease'sız saf su eklenir. Oda sıcaklığında 1 dak. İnkübe edilir. Minikolon/tüp 13.000 × g de 1 dk santrifüj yapılır.	
Minikolonlar atılır ve saflaştırılmış DNA alınarak -20 C° yada -70 ° de saklanır.	

Not: Üretici firmanın (Promega, Wizard® SV Genomik DNA Purifikasyon Sistemi) ürün protokolünden alınmıştır.

#### 2.4. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığının tahmini UV/visible spektrofotometre (BIO-RAD, The SmartSpec Plus, Şekil 2.3) kullanılarak, 260 ve 280 nm dalga boyunda optik yoğunluğun okunmasıyla tahmin edilmiştir. 260 nm dalga boyundaki optik yoğunluk (OD) değeri nükleik asitlerin her ikisini DNA ve RNA'nın hesaplanmasını sağlar. 280 nm dalga boyu ise örnekteki protein miktarını belirler. 260 nm'de OD değeri 1,0 olduğunda, konsantrasyon çift iplikçikli DNA için 50 µg/ml ve tek iplikçikli DNA için 40 µg/ml olarak kabul edilir (Aquadro vd., 1998).



Şekil 2.3. Spektrofotometre

260 nm ve 280 nm okumaları arasındaki oran izole edilen nükleik asitin saflığının tahminini verir. Saf olan DNA için  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı 1,8–2,0 arasındadır. Eğer protein ve/veya fenol kontaminasyonu varsa bu oran 1,8'den küçüktür. Bu durumda kontamine olmuş örneğe son konsantrasyon 200 µg/ml olacak şekilde proteinaz K ilave edilir. DNA çözeltisi 37°C'de iki saat inkübe edilir ve birer kez fenol ve kloroform:isoamil (24:1) aşamasından sonra etanolla çökeltilir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra çökelmiş DNA TE tamponu (pH: 8,0) veya ddH<sub>2</sub>O da çözündürülür. Eğer saflık kontrolünde oran 2,0'ın üstünde çıkarsa örnekte RNA bulunduğunun göstergesidir. Böyle durumda son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde RNase A enzimi ilave edilir. DNA solüsyonu 37 °C'de bir saat inkübe edilir ve DNA elde etme protokolündeki gibi saflaştırılır.

Genel olarak, 10 µl izole edilmiş DNA 490 µl TE tamponu ile karıştırılır ve 65°C'de 30 dakika inkübe edilir. Kör çözelti olarak 500 µl TE tampon Kuvartz küvete konulup okuma yapıldıktan sonra, DNA örneği spektrofotometre ye yerleştirilir. Örneğin sulandırma oranı dikkate alınarak, orijinal örnek konsantrasyonu aşağıda verildiği gibi hesaplanır:

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = \left( \frac{500\mu\text{l}}{\chi\mu\text{l}} \right) \left( \frac{50\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) OD_{260}$$

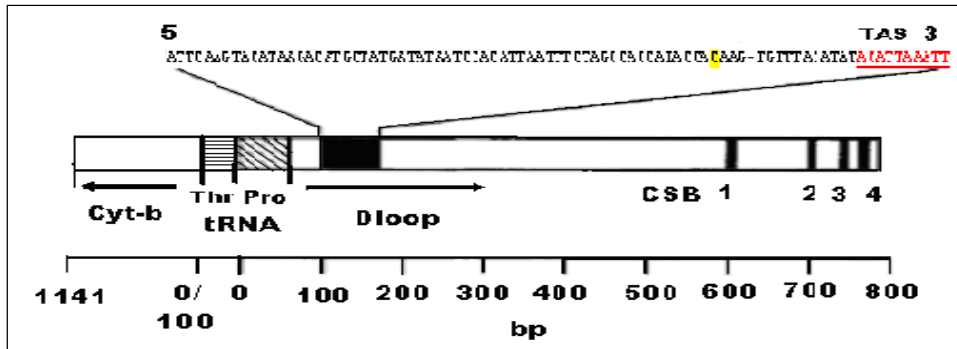
Burada  $\chi$  kullanılan DNA hacmidir.

## 2.5. DNA Yoğunluğunun Ayarlanması

DNA konsantrasyonları belirlenen tüm örneklerin yoğunlukları TE tampon (pH: 8,0) veya saf su (ddH<sub>2</sub>O) ile 100 ng/µl konsantrasyon oluşturacak şekilde seyreltilmiştir. Bu şekilde konsantrasyonları eşitlenen DNA'lar PZR çoğaltmasında kullanmak için hazır hale getirilmiştir.

## 2.6. DNA Çoğaltılması (Amplifikasyonu)

Mersin balığı örneklerinden elde edilen toplam DNA içerisinde mitokondrial DNA'nın Cyt-b ve tRNA<sup>pro</sup>-Dloop bölgeleri çoğaltılmak için seçilmiştir (Şekil 2.4). Bu bölgeler için başka araştırmacılar tarafından geliştirilen primer setleri (ileri ve geri yönlü) kullanılarak Cyt-b için 1150 bp ve tRNA<sup>pro</sup> -Dloop için 250-600 bp'lik parçacık çoğaltılmıştır (Tablo 2.3).



Şekil 2.4. Çoğaltılan gen bölgeleri (Brown, 1992a' dan modifiye edilmiştir).

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları

Segment- mtDNA	Primerler	Büyük. (bp)	Yazarlar
tRAN <sup>pro</sup> - Dloop	Hetero I- 5'-ACCCTTAACTCCCAAAG-3'	250- 600	Ludwig ve Jennekens, 2000
	HeteroII- 5'-CATTTRATGGTAGATGAAAC-3'		
Cyt-b	F-5'-CGTTGTHWTTCAACTAYARRAAC-3'	1141	Ludwig ve Bernie May, 2000 *Bernatchez ve Donzman, 1993
	*F-5'-TGACTTGAAAAACCACCGTTGTTA-3'		
	R-5'-CTTCGGTTTACAAGACCG-3'		

Not: W: A yada T, M: A yada C, R: A yada G, S: G yada C, K: G yada T, Y: T yada C  
V: A, G, C, D: A, G, T, H: A, C, T, B: T, C, G ve N: A,C,G,T

Çift iplikçikli DNA'nın yükseltgeme işlemi her bir örnek DNA'sı ile birlikte toplam 50 µl'lik PZR hacminde yürütülmüştür. Bu karışım içerisinde sırasıyla; DNA, ileri ve geri yönlü primerler, PZR Master Mix, 2X (PROMEGA) (Reaksiyon bufferı (pH 8,5) ve ddH<sub>2</sub>O bulunmaktadır. 2X Reaksiyon Buffuru ise, 50 ünite/ml TaqDNA Polimeraz enzimi, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> dan oluşmaktadır. Hazırlanan karışım 0,5 ml'lik PZR tüplerine dağıtılmıştır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Sitokrom b ve tRNA<sup>pro</sup>-D-loop bölgelerinin çoğaltılması için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri	Miktar	
	Cyt-b	tRNA <sup>pro</sup> D-loop
2X Reaksiyon Buffer 50u/ml Tag DNA Polimeraz 3mM MgCl <sub>2</sub> 400µM dNTPs (dGTP, dCTP, dATP ve dTTP)	25µl	25µl
İleri yönlü Primer (10µM)	5µl	6µl
Geri yönlü Primer (10µM)	5µl	6µl
DNA (100ng/ml)	6µl	10µl
Nucleaz içermeyen saf su	9µl	3µl
Toplam	50µl	50µl

Örneklerin spesifik gen bölgelerinin çoğaltılmasında Thermal Cycler (Bio-Rad DNA-ENGINE, PTC 200, Şekil 2.5) yardımıyla yapılmış ve Tablo 2.5’de verilen PZR programları, tatmin edici sonuçlar vermiştir. İlk adımda 94°C de 1 dk.’lık bir denaturasyon işlemi yapılarak döngülere geçilmiştir. Döngü içerisinde tekrar 94°C de 1 dk.’lık denaturasyon, 47-50°C de 30 sn hibridizasyon, ve 72°C de 1,5 dk. polimerizasyon işlemi için uygulanmıştır. 30-34 döngü sonrasında 72°C de 5 dk son polimerizasyon işlemi tamamlanmış ve 4 °C de örneklerin tutulması için program yapılmıştır (Tablo 2.5).



Şekil 2.5. PZR işleminin gerçekleştirildiği termal cycler

Tablo 2.5. Çalışmada kullanılan primerler için belirlenen PZR programları

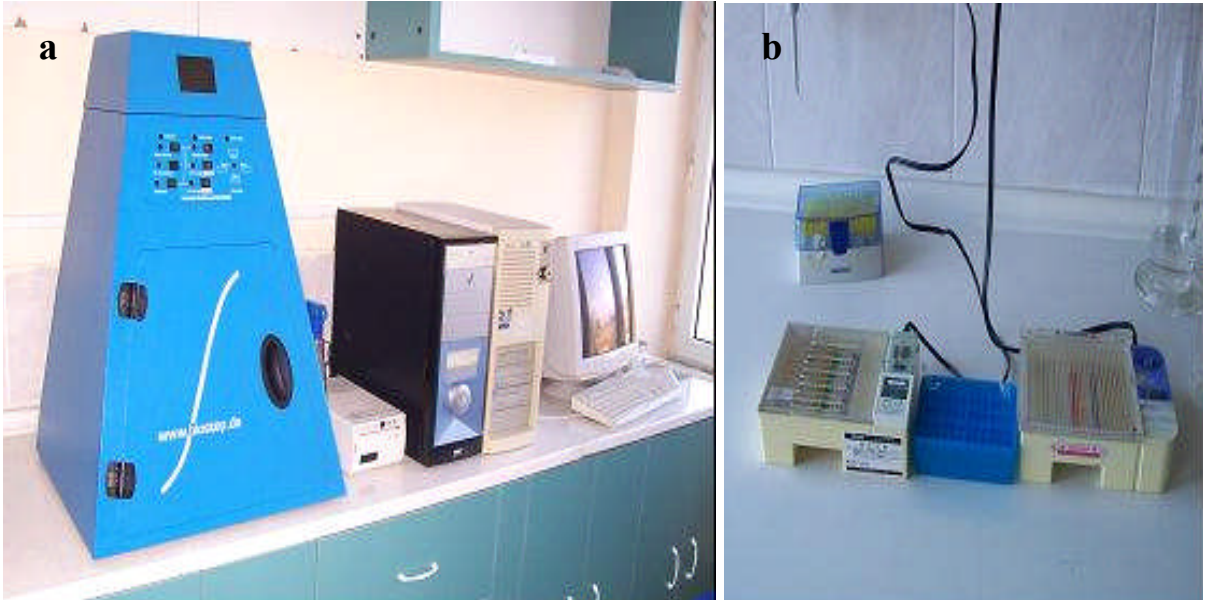
PZR Kondisyonu	mtDNA Gen Bölgesi		
	Cyt-b		
	Sıcaklık (°C)	Süre	Tekrar miktarı (döngü)
Birinci denaturasyon	94	1 dk	1
Denaturasyon	94	1	34
Bağlanma	47	30 sn	
Yeni zincir sentezi	72	1,5 dk	
Final zincir sentezi	72	5 dk	1
	tRNA <sup>pro</sup> D-loop		
Birinci denaturasyon	94	1 dk	1
Denaturasyon	94	30 sn	30
Bağlanma	50	30 sn	
Yeni zincir sentezi	72	1 dk	
Final zincir sentezi	72	4 dk	1



## 2.7. PZR Ürün Bantlarının Görüntülenmesi

PZR yükseltgemesi sonrası 5 µl PZR ürünü + 1 µl 6X yükleme boyası (Loading dye) ve 50 yada 100 bp'lik DNA boy belirteci (3 µl boy belirteci + 1 µl 6X yükleme boyası), ethidium bromid yoğunluğu 0,01 mg (1mg/100µl) olacak şekilde hazırlanan %1,5'lik agaroz jel üzerinde 1xTBE tampon sisteminde koşturulmuştur (Şekil 2.6.b). Jeller her bir fragment modeli için istenilen ayırıştırma ve jel konsantrasyonuna bağlı olarak yaklaşık olarak 10V/cm'de 40-50 dk. koşturulmuştur. Ethidium bromidle boyanan DNA parçaları UV illüminatörle görüntülenmiştir. Jel görüntüleri jel dökümantasyon sistemi (Biostep, Darkhood DH-30/32) ve termal yazıcı (Mitsubishi, P91D) kullanılarak kayıt edilmiştir (Şekil 2.6.a).

Bu görüntüler üzerinden PZR çoğaltmasının etkinliği kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Aynı zaman da PZR ürün boyu beklenen ürün boyu ile karşılaştırarak kontrol edilmiştir. Cyt-b ve tRNA<sup>pro</sup>-Dloop bölgesinin çoğaltılan yaklaşık ürün boyları sırasıyla 1150 bp, 250-600 bp arası büyüklükte olduğu bulunmuştur. Kontrol sonrası başarılı bulunan PZR ürünleri yakın zamanda kullanılmak üzere 4°C'de tutulmuş veyadaha uzun süreli kullanım için derin dondurucuya (-20 °C) konulmuştur.



Şekil 2.6. Jel görüntüleme ünitesi (a) ve elektroforez (b)

## 2.8. Heteroplazmi ve Boy Varyasyonu

D-loop bölgesi PZR ile çoğaltılarak %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek birden fazla bant oluşturan bireyler belirlenmiştir. Jel görüntülerinden aynı zamanda tüm ürünlerin yaklaşık boyları belirlenmiştir. Daha sonra, bu örneklerden bazılarının sekansları alınarak tekrar motiflerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

## 2.9. Sekans İçin PZR Ürününün Saflaştırma


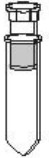


Sekansı alınacak örneklerin saflaştırılmasında iki farklı metot kullanılmıştır. Öncelikle görüntülenen PZR ürünlerinin kantitesi ve kalitesi agaroz jel elektroforezi görüntülerinden tespit edilmiştir. Jel üzerinde tek bant oluşturan ürünlerin (cyt-b bölgesi için) saflaştırılması direkt PZR ürününün saflaştırması Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System, (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İkinci metot, jel görüntülerinde birden fazla ürünün tespit edildiği durumlarda ise (tRNA<sup>pro</sup>-Dloop da heteroplazmik durum için) sekansı alınacak DNA parçacıkları yine aynı kit kullanılarak jel üzerinden saflaştırılmıştır. UV korumalı maske takılarak UV ışık altında, DNA bantları bir bisturi ile kesilerek birbirinden ayrılmıştır. Ayrılan jel parçasında DNA'nın bulunup bulunmadığı kontrol edilerek tartılmış ve 1,5 ml'lik mikrosantrifuj tüplere konulmuştur. Üzerlerine agaroz jelin çözülmesini sağlayacak tampon ilave edilerek 60 °C de inkübe edilmiştir. Jel tamamen çözüldükten sonra DNA minikolon yardımı ile tutulmuş ve 2 yıkama işleminden sonra saflaştırılan DNA serbest hale getirilerek 1,5 ml'lik tüp içerisine toplanmıştır (Tablo 2.6). Saflaştırılan ürün DNA boy belirteci ile % 1,5'lik agaroz jel elektroforezinde koşutularak ürün kaybı olup olmadığı kontrol edilmiştir.

## 2.10. PZR Ürün Sekansı

Saflaştırılan 100 µl'lik PZR ürünleri 50 µl hacim içerisinde sulandırılarak her iki gen bölgesi için ileri ve geri yönlü primerleri ile birlikte sekans analizi için ticari faaliyet gösteren bir laboratuara gönderilmiştir. PZR ürününün sekanslarının alınmasında her iki primer ayrı ayrı kullanılmıştır. Bu şekilde her bir iplikçik diğeri ile tamamlayıcı olarak karşılaştırılarak iki defa kontrol edilmiştir.

Tablo 2.6. PZR ürünün direkt ve agaroz jelden saflaştırılması protokolü

<p><b>A. Jel parçası ve PZR Ürününün hazırlanması</b></p> <p><b>1. Agaroz jel parçalarının çözülmesi</b></p> <p>1. Elektroforez sonrası DNA bantları jelden kesilir ve kesilen jel parçası darası alınmış 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe konularak ağırlıkları kaydedilir.</p> <p>2. Her 10 mg jel parçası için 10µl Membran Bağlama Çözeltisi ilave edilir. Vortekslenir ve 50–65°C de jel tamamen çözülünceye kadar inkübe edilir.</p> <p><b>2. PZR Ürününün Saflaştırılması</b></p> <p>1. PZR reaksiyonu hacmi kadar Membran Bağlama Çözeltisi ilave edilir.</p>	
<p><b>B. DNA'nın bağlanması</b></p> <p>1. SV Minikolon toplama tüplerine takılır.</p> <p>2. Çözülmüş jel karışımı yada PZR ürünü minikolona transfer edilir ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilir..</p> <p>3. 16,000 × g de 1 dk. santrifüj edilir ve toplama tüpündeki sıvı dökülerek Minikolon yeniden takılır.</p>	
<p><b>C. Yıkama</b></p> <p>1. 700µl Membran yıkama çözeltisi (ethanol ilave edilmiş) den ilave edilir ve 16.000 × g de 1 dak. santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı dökülerek minikolon yeniden takılır.</p> <p>2. 500µl Membran yıkama çözeltisi eklenerek tekrar yıkanır ve 16.000 × g de 5 dk. Santrifüj yapılır.</p> <p>3. Toplama tüpü boşaltılır ve kapak açık şekilde 1 dk. yeniden santrifüj edilir, böylece kalan ethanol uzaklaştırılmış olur.</p>	
<p><b>D. Elusyon</b></p> <p>1. Dikkatlice minikolonlar temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere transfer edilir.</p> <p>50µl of Nukleazsız Saf Su minikolon üzerine ilave edilir ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilir. Daha sonra 16.000 × g de 1 dk. Santrifüj edilir.</p> <p>2. Minikolon atılır ve DNA 4°C yada –20°C saklanır.</p>	

Not: Üretici firmanın (Promega, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System ) ürün protokolünden alınmıştır.

## 2.11. Sekans Verilerinin Analizi

Sekans verilerini değerlendirmek için yoğun olarak beş bilgisayar programı BIOEDIT (Hall, 1999), DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999), MEGA 3.0 (Kumar vd., 2004), ARLEQUIN (Schneider vd., 2000) ve PAUP (Swofford, 2003) kullanılmıştır.

### 2.11.1. Çoklu Sekans Hizalaması (Alignment)

Moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan çoklu hizalamalar; protein ailelerini karakterize eden sekans motiflerini bulmak, bilinen veya bilinmeyen sekans aileleri arasındaki benzerlikleri (homoloji) ortaya çıkarmak, ikincil veya üçüncül yapıların ön tahminlerini desteklemek, gerekirse PZR primerlerinin dizaynını desteklemek ve oluşturulacak filogenetik ağaçların hesaplanmasına yardımcı olmak için kullanılmıştır.

Bireysel sekansların hizalanması için MEGA 3.0 (Kumar vd., 2004) ve BIOEDIT (Hall, 1999) programlarının Clustel W seçeneği kullanılarak yapılmıştır. Bu aşamada farklı bölgelerden elde edilen doğal balık örnekleri ile birlikte kültür ortamından elde edilen örnekler de çalışılmıştır. Diğer tür ve bölgelere ait örneklerin sekansları biyolojik bilgilerin toplandığı merkezden (NCBI: The National Center for Biotechnology Information) alınarak çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 2.7). NCBI'den alınan örneklerin seçiminde, özellikle Karadeniz ve Hazar Denizi havzalarından çalışılan türler ile birlikte bu türlere yakın diğer türler göz önüne alınmıştır. Dış grup seçerken ise türün çalışılan taksa ile ilişkili olmasına ve bu taksa sınıflanmaya başlamadan daha önceki zamanda ortak bir ataya sahip olmasına dikkat edilmiş ve sonuçta *Polydonty spathula* türü dış grup olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.7. Genbank'dan alınarak filogenetik dendogram oluşturmada kullanılan türler, lokaliteleri ve acs.numaraları

Genbank Acs. No	Türü	Lokalite
AF238688	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Tuna Nehri
AF238694	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Azak Denizi
AF238669	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Hazar Denizi (Kuzey)
AJ249692	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Hazar Deniz (Güney)
AF238699	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Havyar
AJ563386	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Hazar Denizi
AF238679	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Hazar denizi (Güney)
AJ277594	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Volga Nehri
AJ563395	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Hazar Denizi
AJ563394	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Hazar Denizi
AF238700	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Yumurta'dan (Lot:75)
AF238705	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Yumurta
AJ277596	<i>A. gueldenstaedtii</i>	Volga Nehri- <i>A.baerii</i> hibrit
AF238620	<i>A. persicus</i>	Hazar Denizi (Güney)
AF238615	<i>A. persicus</i>	Hazar Denizi
AJ245833	<i>A. naccarii</i>	Buna Nehri
AJ245834	<i>A. naccarii</i>	Po Nehri
AF238660	<i>A. naccarii</i>	Hazar Denizi (Güney)
AF238658	<i>A. baerii</i>	Yenisey Nehri
AF238653	<i>A. baerii</i>	Ob Nehri
AF238631	<i>A. baerii</i>	Kuluçkahane
AF238640	<i>A. baerii</i>	Lena Nehri
11102385	<i>A. baerii</i>	Sibiry Nehri
AJ249693	<i>A. stellatus</i>	Hazar Denizi
AY846685	<i>A. stellatus</i>	Hazar Denizi
AY846696	<i>A. stellatus ponticus</i>	
AY846689	<i>A. stellatus</i>	
AJ245828	<i>A. brevestrum</i>	
AJ245832	<i>A. nudiventris</i>	Hazar Denizi
AJ249694	<i>A. ruthenus</i>	Tuna Nehri
AY510085	<i>A. dabryanus</i>	
AJ245830	<i>A. medirostris</i>	Kolombiya Nehri
AJ245839	<i>A. sturio</i>	Kuluçka (Grindo populasyon)
AJ245840	<i>H. huso</i>	Hazar
AJ252187	<i>H. dauricus</i>	Amur Nehri
NC005834	<i>Psephurus gladius</i>	
NC004419	<i>Polyodon spathula</i>	

Çoklu karşılaştırmada ilk olarak benzer olan sekanslar uzaklaştırılmıştır. Düzgün olan bütün sonuçlar yeniden kontrol edilerek doğrulanmıştır. Hizalanmış olan sekanslar filogenetik ağaçlar oluşturmak için kullanılmıştır.

Protein kodlayan Cyt-b geninde stop kodonlarının olmadığından emin olmak için bu gen bölgesi aminoasit kodlara çevrilmiştir. D-loop bölgesi ise ilk olarak tekrar bölgeleri uzaklaştırıldıktan sonra hizalama (alignment) yapılmıştır (Broker, 1990). Hizalama işleminde kullanılan MEGA 3.0 (Kumar vd., 2004) ve BIOEDIT (Hall, 1999) programları ile aminoasit dizilimleri, nükleotid ve her bir kodon için aminoasit frekansları da hesaplanmıştır.

### 2.11.2. Sekans Profiline Çıkarılması

Sekans profiline oluşturulması genellikle çoklu homolog sekansların hizalanmasıyla başlar ve çoklu sekans hizalamasından elde edilen bilgilerin özetinin çıkarılması için yapılır. Çıkarılan profiline analizinde iki ana adım izlenmiştir. Bunlardan birincisi profiline oluşturulması, ikincisi ise sekansların ait olduğu veri tabanı veya tek sekans ile profiline karşılaştırılması şeklinde olmuştur.

#### 2.11.2.1. Boy Varyasyonlarının Karşılaştırılması

Türler arası ve tür içi genetik farklılığın hesaplanması için Birky vd. (1989)'in istatistik yaklaşımı kullanılmıştır. Her bir balık için, örneklenen farklı gen boyunun (genin) ihtimali aşağıdaki eşitlikten yararlanarak hesaplanmıştır.

$$Kb = (1 - \sum x_i^2) \quad (2.1)$$

Burada  $x_i$ , her bir örnek (balık) için boy varyasyonunun oranıdır. Kb değeri homoplazmik örneklerde "0" alınmıştır. Her bir populasyon altkümesi için hem homoplazmik hem de heteroplazmik bireyleri içerecek şekilde Kb değerinin bir ortalaması hesaplanmıştır. Tüm bireyler için hesaplanan bu değerlerden tür içerisinde genin ihtimali (Kc) farklılık gösterebilmektedir. Bu ise aşağıdaki eşitlikte verilen yaklaşımla belirlemiştir.

$$Kc = (1 - \sum \bar{x}_i^2) \quad (2.2)$$

Burada  $\bar{x}_i$ , populasyondaki i. boy varyasyonunun ortalama frekansıdır. Kc'nin bu şekilde heteroplazmiyi içermesi sağlanmıştır (Birky vd., 1989).  $G_{IP}$  eşitliği ise bir tür içerisinde gen farklılığının oranını göstermek için kullanılmıştır ve aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır.

$$G_{IP} = (K_c - \bar{K}_b) / K_c \quad (2.3)$$

### 2.11.2.2. Haplotip ve Nükleotid Çeşitliliği

İlk olarak DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas., 1999) programı kullanılarak türler arası ve tür içi haplotipler oluşturulmuştur. Bu şekilde elde edilen haplotiplerden Haplotip çeşitliliği (Hd) değeri hesaplanmıştır. Nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ,  $\pi$ ) ve nükleotid farklılığı (k) (Tajima, 1983) değerlerinin hesaplanmasında DnaSP programı kullanılmıştır. Nei (1987), haplotip ve nükleotid çeşitliliğinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikleri geliştirmiştir;

$$Hd = (1 - \sum x_i^2) n / (n-1) \quad (2.4)$$

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij} \quad (2.5)$$

Hd: Haplotip çeşitliliği

$\pi$ : nükleotid çeşitliliği

n: test edilen sekans miktarı

$x_i$ : i'nci haplotipin populasyon frekansı

$x_j$ : j'inci haplotipin populasyon frekansı

$\pi_{ij}$ : i'nci ve j'inci haplotipler arası nükleotid farklılığının oranı

Nükleotid farklılıklarının ortalama miktarı ( $k$ ) (Tajima, 1983) ise aşağıda verildiği gibi tanımlanmıştır;

$$\hat{k} = \sum_{i < j} \sum k_{ij} / \binom{n}{2} \quad (2.6)$$

$k_{ij} = i$  ve  $j$ 'nci nükleonlar arası nükleotit farklılık miktarı

Her bir DNA sekansı için polimorfik nükleotid yerlerinin miktarı ( $\theta$ ) Tajima (1996) tarafından geliştirilen eşitlik ile hesaplanmış ve aşağıda verilmiştir;

$$\theta = s/a_1 \quad (2.7)$$

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} (1/i) \quad (2.8)$$

s: DNA sekans örnekleri arasındaki farklılık gösteren yerlerin oranı

$a_1$ : Çalışılan sekans örnekleri için düzeltme katsayısı

### 2.11.2.3. Aminoasit Dizilimi

Cyt-b gen bölgesi için belirlenen sekanslar DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) programı kullanılarak mtDNA kodlama sistemine göre aminoasit dizilimleri belirlenmiş ve her bir örnek ve tür için frekansları hesaplanmıştır.

### 2.11.3. Filogenetik Analiz, Evrimsel Model Seçimi ve Topoloji Oluşturma

Bir grubun evrimsel tarihi olarak adlandırılan filogeni tahmininde ilk adım filogenetik olarak bilgi verici karakterlerin seçimi ve ölçülmesi olmuştur. Bu çalışmada mtDNA Cyt-b gen bölgesi filogenetik çıkarsamada kullanılacak moleküler karakterlerin kaynağı olmuştur. Filogeni tahminindeki ikinci adım ise evrimsel tarihin grafik özetini veren filogenetik ağaçların oluşturulması ve bu bağlamda eldeki verilerin analizinde parsimoni, maksimum olasılık yada uzaklık metotlarından hangisinin en uygun olduğuna karar vermek olmuştur.

Bu çalışmada model seçimi PAUP (Swofford, 2003) programı altında Modeltest 3.7 (Posada ve Crandall, 1998) ve MrModetest (Johan Nylander) programları MrMTgui programı yardımı ile çalıştırılarak farklı olasılık modelleri arasından Akaike Information Criterion AIC (Akaike, 1974) ve BIC değerlerine göre model belirlenmiştir. Hesaplanan parametrik değerler sabitlenerek bulgusal (heuristik) ML araması yürütüldü. Hesaplanan gamma düzeltme katsayısı ile bir NJ topolojisi oluşturulmuştur. Bunun için türler arasındaki filogenetik ilişkiler MEGA 3.0 (Kumar vd., 2004) programı kullanılarak



Kimura 2P mesafesine göre filogenetik ağaç oluşturma algoritmaları olan UPGMA ve NJ kullanılmıştır. Aynı zamanda MP metodu kullanılarak ağaçlar oluşturulmuş ve karşılaştırılmıştır. Ağaç güvenilirliği için seç-bağla değeri 1000 olarak belirlenmiş ve ikinci defa oluşturulan ortak ağaçta nodların sahip olduğu değer %50 ve üzeri olarak belirlenmiştir. Bu şekilde elde edilen ağaçlar değerlendirilmiştir.

#### 2.11.4. Genetik Farklılığın Belirlenmesi

Populasyonların genetik yapısı ilk olarak Cockerham (1973) tarafından tanımlanan ve daha sonra Weir ve Cockerham (1984) tarafından geliştirilen varyans analizi ile araştırılmıştır. Bunun için moleküler haplotipler arasındaki mutasyon miktarını dikkate alarak, diğer gen frekanslarının varyans analizi tekniklerinden ayrılan, fakat temelde benzerlik gösteren bilgisayar programı ARLEQUIN (AMOVA, Excoffier vd., 1992)'de kullanılan moleküler varyans analizi yaklaşımı kullanılmıştır. Mersin balıklarında türler ve populasyon grupları tanımlandıktan sonra genetik yapı test edilmiştir. Varyansın hiyerarşik analizi gruplar veya populasyon arasındaki ve içindeki farklılıklardan dolayı toplam varyansı kovaryans bileşenlerine bölmüş ve bu varyans bileşenlerinin kullanımıyla fiksasyon indisleri aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır.

$$\Phi_{CT}(F_{CT}) = V_a/V_a + V_b \quad (2.9)$$

$$\Phi_{SC}(F_{SC}) = V_b/V_b + V_c \quad (2.10)$$

$$\Phi_{ST}(F_{ST}) = V_a + V_b = V_a + V_b + V_c \quad (2.11)$$

$V_a$  : Gruplar arası varyans bileşeni

$V_b$  : Populasyonlar arası (gruplar içi) varyans bileşeni

$V_c$  : Populasyonlar içi varyans bileşeni

Permutasyon metodunun kullanımıyla varyans bileşenlerinin önemliliği test edilmiştir. Verilen “p” değeri tesadüfî olarak çok ekstrem varyans bileşenlerinin sahip olduğu olasılığı tahmin için değerlendirilmiştir. Program ayrıca çift yönlü  $F_{ST}$  ve  $\Phi_{ST}$  değerlerini hesaplamıştır. Cockerham (1973) tarafından açıklandığı gibi ölçüm  $F_{ST}$ 'den türetilmiştir ve varyans bileşenlerinde olduğu gibi aynı yolla önemliliğin testinde

kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanıldığında önemliliğin tahmini için 1000 permutasyon uygulanmıştır.

### 2.11.5. Gen Akışının Hesaplanması

Genlerin oransal dağılımındaki değişimde etkili olan ve populasyonlar arası ve içindeki genlerin hareketi olarak tanımlanan gen akışı ARLEQUIN (Schneider vd., 2000) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Farklı şekillerde hesaplanabilen (etkili populasyon miktarı veya nadir ve özel allellerin kullanımı gibi) gen akışı bu çalışmada Wright (1951) tarafından geliştirilen ve doğal populasyonlar arasındaki genetik farklılığın seviyesinin göstergesi olan  $F_{ST}$  değerlerinden hesaplanmıştır. Wright (1951), gen akışının hesaplanmasında aşağıdaki eşitliği geliştirmiştir.

$$F_{ST} = 1/(1+4N_e m) \quad (2.12)$$

$F_{ST}$  : Populasyonlar arası genetik farklılık değeri

$m$  : Populasyonlar arası göç miktarı

$N_e$  : Etkin populasyon büyüklüğü

Daha sonra bu eşitlik mtDNA verileri için modifiye edilmiş ve aşağıda verildiği şekli almıştır (Takahata ve Palumbi, 1985).

$$(N_e m)_F = 1/2(1/ F_{ST} - 1) \quad (2.13)$$

$(N_e m)_F$  : Dişi balıklar için etkili göç miktarı

### 2.11.6. Moleküler Saat

Moleküler saat olarak anılan ve temel düşüncesi, fosil kayıtlarından ayrılma zamanları bilinen grupların moleküler farklılaşma oranlarını hesaplamak ve daha sonra bu kalibrasyonu kullanarak, fosil kayıtları bulunmayan grupların ayrılma zamanlarının yaşını saptamak olan bu hipotez Emile Zuckerkandl ve Linus Pauling (1962) ile ortaya çıkmış ve daha sonra farklı bilim adamları tarafından yapılan çalışmalarla desteklenmiş ve

geliştirilmiştir (Freeman and Herron, 1999). Mersin balıkları için bu işlem MEGA (Kumar vd., 2004) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Moleküler evrimin nötral teorisi, belli nükleotid değişimlerinin mutasyon oranına eşit bir oranda birikmeleri beklentisi için teorik bir temel sağlamıştır. Aminoasit sekans değişiminin bilinmesi evrimsel değişim oranının tahmininde kullanılır. Yani, veriler iki organizma grubu arasındaki ne kadar aminoasit değişimi olduğunu göstermektedir. Bilinen minimum nükleotid değişim miktarıyla milyon yıldaki nükleotid değişimini ifade eden moleküler evrimsel oranı hesaplanmaktadır. Bir bakıma bu oran bize moleküler evrimsel saatle birlikte nükleotid değişimindeki evrimsel zamanın hesaplanmasını sağlamıştır.

Bu tip bilgiler iki şekilde kullanılabilir. Birincisi çalışılan türün evrimsel tarihini veren filogenetik ağaç oluşturabilir. İkinci olarak, ortalama değişim oranının belirlenmesi için DNA veya aminoasit farklılıklarıyla ilgili verilerin kullanımınıdır. Türler arası mevcut aminoasit farklılıklarının bilinmesiyle evrimsel süreçte oluşmuş nükleotid değişiminin gerçek miktarının tahmini istatistiksel poisson dağılımının kullanımıyla mümkün olmuştur. K indeksi iki protein arasındaki ortalama aminoasit değişim miktarını ifade etmektedir.

$$K = -\ln(1-p) \quad (2.14)$$

Eşitlikteki “ln”, “e” tabanına göre doğal logaritma ve  $p=d/n$ 'dir. Bu orandaki d, farklı amino asit miktarını ve n, karşılaştırılan toplam aminoasit miktarını ifade eder. Bu hesaplama her bir yıllık oranın belirlenmesiyle bir adım daha ileri götürülebilir.

$$k=K/2T \quad (2.15)$$

Eşitlikteki “k” yılda aminoasit değişim oranıdır. “T” ise ortak atadan farklılaşan iki türün toplam yılını ifade eder. “K” değerinin 2T'ye bölünmesi ağacın her iki tarafının “T” yılda bağımsız olarak gelişmiş olduğunun düşünülmesindedir. “k” değeri bir çok türde birden fazla protein için hesaplandığında yaklaşık olarak  $10^{-9}$  değeri etrafında toplanmıştır. Eğer k değeri  $10^{-9}$  etrafında normal dağılım gösterirse,  $10^{-9}$  moleküler evrimsel saat oranı olabilir. Günümüze kadar dağılımı belirlemek için çok az miktarda veri bulunmaktadır. Özellikle soylar içerisinde Cyt-b geninde mutasyon oranının kalibrasyonu (yada diğer mtDNA genleri) çok problemlidir (Li 1997; Johns ve Avise, 1998; Willem ve Ferguson, 2002).

## 2.11.7. Evrimsel Hipotezlerin Test Edilmesi

### 2.11.7.1. Tajima's Test

DNA sekansları ve RFLP haplotipleri için uygun bir test yöntemi olan rekombinasyonun infinite site modeline dayalı Tajima'nın testi, DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Populasyondan alınan sekans örneklerine bağlı olarak Nötral mutasyon hipotezinin Tajima testi "n" sayıdaki homolog sekansların hizalanmasını dikkate almıştır. Mutasyon parametresi Teta'nın ( $\theta$ ) iki kestiricisini karşılaştırır. Her bir sekans çifti için  $\binom{n}{2}$  farklı olan pozisyonların miktarı hesaplanmıştır. Bu miktarın aritmetik ortalaması " $\Pi$ " olarak tanımlanmıştır. Bu nötral mutasyon parametresi  $\theta=4N_e\mu$ 'nin kestirimidir.  $\theta$ 'nin birinci kestirimi;

$$\theta_{\pi}=\Pi \quad (2.16)$$

olarak tanımlanır. Sekans çiftlerinin farklılıklarının ortalama miktarı gibi, farklılaşan noktaların miktarı ayrıca " $\theta$ "nın fonksiyonudur. Böylece  $\theta$ 'nin ikinci kestirimi

$$\theta_S=S/H_{n-1} \quad (2.17)$$

olarak tanımlanır. S, örnekteki farklılaşan yerlerin sayısını,  $H_n$  ise Harmonik miktarı ifade etmektedir.

$\theta$ 'nin bu açıklanan iki kestirimine bağlı olarak, Tajima'nın önermiş olduğu test istatistiği D aşağıdaki gibi tanımlanmıştır;

$$D = \frac{\theta_{\pi} - \theta_S}{\sqrt{Var(\theta_{\pi} - \theta_S)}} \quad (2.18)$$

Sıkı nötralite altında  $\theta_{\pi} = \theta_S$ 'dir ve bu nedenle  $D=0$  olur. D'nin standart sapması ise 1'dir. Önemlilik gösteren D değerleri seçici etkilerin dışındaki populasyon genişlemesi, tıkanıklık ve mutasyon oranlarının heterogenitesi gibi faktörlerden kaynaklandığı söylenebilir.

### 2.11.7.2. McDonald-Kreitman Testi

Tajima'nın D testi gibi, McDonald-Kreitman testi de DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) paket programı kullanılarak yapılmıştır. John McDonald ve Martin Kreitman doğal seçilimi saptamak için, kullanımını her geçen gün artan bu testi geliştirmişlerdir. McDonald-Kreitman veya MK testi nötral teorinin öngörüsü olan ve suskun baz değişimlerinin, değiştirici baz değişimlerinden çok daha hızlı meydana geldiğini varsayan, önemli bir önermenin doğal sonucuna dayanmaktadır (Freeman and Herron, 1999). MK testi en az iki türe ait sekans verisine bağlı kalmıştır. Bununla birlikte protein kodlayan tek lokus yeterli olmuştur. İlk olarak, veri setindeki tüm nükleotid pozisyonları, polimorfizm veya sabitlenmiş farklılıklar olarak sınıflandırılmıştır. Eğer nükleotid pozisyonu çalışılan iki tür arasında polimorfik fakat tür içinde monomorfik ise sabitlenmiş farklılıkları temsil etmiştir. Eğer nükleotid pozisyonları türün her ikisinde veya herhangi birinde değişkense polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra sabitlenmiş veya polimorfik pozisyonlar sinonim veya sinonim olmayan ikameler (substitutions) olarak sınıflandırılmıştır. Nötral teoriye göre, herhangi belli bir lokusta, değiştirici baz değişimi ile suskun baz değişimleri oranı zaman boyunca sabit olmalıdır. Bu da sabitlenmiş ve polimorfik pozisyonlar arasında sinonimlerin, sinonim olmayan ikamelere oranının eşit olduğu anlamına gelmektedir. Yani hipotez;

$$H_0: d_{nf}/d_{sf} = d_{np}/d_{sp}$$

Eşitlikteki  $d_{nf}$  ve  $d_{sf}$  sırasıyla sinonim olmayan ve sinonim sabit farklılıkların miktarını, benzer şekilde,  $d_{np}$  ve  $d_{sp}$  sinonim olmayan ve sinonim polimorfizmin miktarını açıklamaktadır.

### 2.12. Kesim Şekillerinin Belirlenmesi

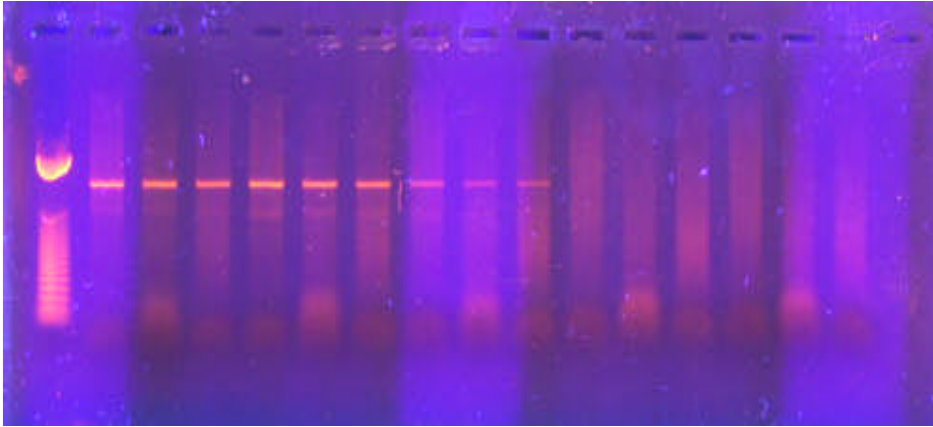
Tüm örnekler/türler için elde edilen cyt-b sekansları, BIOEDIT (Hall, 1999) programı yardımı ile 240 farklı kesici enzim ile kesilerek kesim şekilleri belirlenmiştir. Bu aşamada sanal olarak elde edilen şekiller üzerinden Cyt-b gen bölgesinde her üç tür için ayrı morf oluşturan tanımlayıcı enzimler belirlenmiştir. Belirleme işleminde parçacık uzunluğu yerine bant sayıları dikkate alınarak yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. DNA Eldesi ve Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

DNA eldesi için yalnızca kuyruk dokusu kullanılmış ve toplam 82 adet örnekten DNA elde edilmiştir. DNA yoğunlukları yapılan spektrofotometrik analiz sonucunda çok değişken bulunduğu için tüm DNA'ların yoğunluğu eşit olacak şekilde ayarlanmıştır.

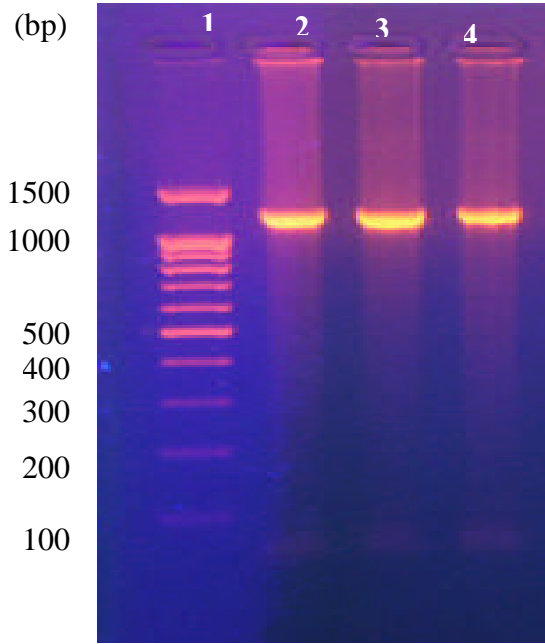
PZR çoğaltması için kullanılacak primerlere ait erime sıcaklık (TM) değerleri, primerlerin diziliminden belirlen değerlerin  $\pm 5$  °C olacak (44-54 °C) şekilde dereceli (gradientli) PZR ile denenerek tespit edilmiştir. Ürünün kalitesi ve miktarı uygun sıcaklık seçiminde asıl belirleyici etken olmuştur. Cyt-b ve tRNA<sup>pro</sup>- Dloop primerleri için uygun tutunma sıcaklıklarının sırasıyla 47 ve 50 °C olduğu tespit edilmiştir ( Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Primer tutunma (annealing) sıcaklığının 54-44 °C aralığında denenmesi ile elde edilen PZR ürünün agaroz jel üzerinde yürütülmüş elektroforetik görüntüsü

PZR için uygun reaksiyon yoğunluklarının belirlenmesinde hazır temel karışımlar (master mikslar) kullanıldığından yalnızca uygun primer ve DNA yoğunluğunun tespiti üzerinde durulmuştur. İki farklı primer yoğunluğu ve 3 farklı DNA yoğunluğundan oluşturulan toplam 6 grup elde edilmiştir ve PZR ürün kalitesi ve miktarı agaroz jel üzerinden tahmin edilerek en uygun kondisyon belirlenmiştir. PZR denemelerinde 250 ng DNA ve 2 µl (10 pmol) primerle kaliteli ürün elde edilmiştir.

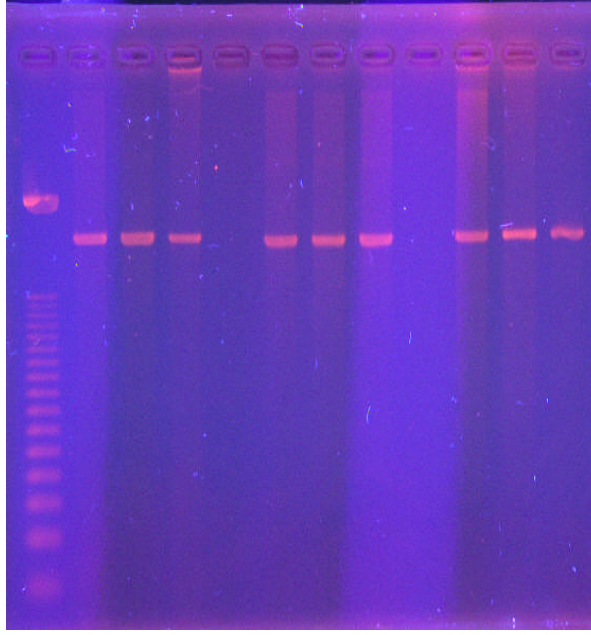
PZR optimizasyonunun son aşaması, seçilen sıcaklık ve belirlenen yoğunluklarla elde edilen ürünün kalitesinin belirlenmesidir. Elde edilen PZR ürünleri, parça boyları bilinen bir belirteçle (100bp'lik DNA boy belirteci) birlikte agaroz jel üzerinde yürütülerek gerek ethidium bromid ile boyanması gerekse parçacıkların ayrışması sağlanmıştır. Bu şekilde oluşan DNA bantları UV ışık altında görüntülenmiştir. Çoğaltılan gen bölgelerinin beklenen büyüklükleri Cyt-b için 1150 bp ve tRNA<sup>pro</sup>- Dloop için ise 250-600 bp civarındadır. Elde edilen PZR ürünlerinin büyüklüğü beklenen ürün boyutu ile uyumlu olduğu belirlenmiş ve doğru bölgelerin çoğaltıldığı kesinleştirilmiştir. Jel görüntülerinden istenmeyen ürün (ikinci yada üçüncü bant gibi) olup olmadığı, sekans okuması için PZR ürününün miktarının yeterli olup olmadığı ve kullanılan primerin her bir tür için aynı kalitede ürün verip vermediği kontrol edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Her bir tür için çoğaltılan Cyt-b gen bölgesi (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci, 2. kolon *A. stellatus*, 3. kolon *A. gueldenstaedtii*, 4.kolon *H. huso*)

Sekans analizi öncesinde her bir örnek için toplam 100 µl'lik PZR ürünü elde edilmiş ve bu ürünün 5 µl'si kalite ve miktarını belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi üzerinde koşturulmuş, zayıf yada jelde hiç görülmeyen örnekler yeniden çoğaltılmış ve son olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Saflaştırma sonrasında 50 µl ye sulandırılan saf DNA yine benzer şekilde agaroz jel üzerinde 1 µl koşturularak saflaştırma işleminin etkinliği ve elde edilen saf DNA'nın yoğunluğuna bakılmıştır (Şekil 3.3). Elde edilen son ürün ile birlikte primerler firmaya gönderilerek Cyt-b ve tRNA<sup>Pro</sup>- Dloop gen bölgeleri için her iki primer kullanılarak (ileri ve geri) çift yönlü dizilim okuması yapılmıştır.



Şekil 3.3. Cyt-b geni için saflaştırılarak jel üzerinde koşturulmuş sekansa hazır bazı örnekler (1. kolon 50 bp DNA boy belirteci)

### 3.2. Cyt-b Geni Sekans Analizi

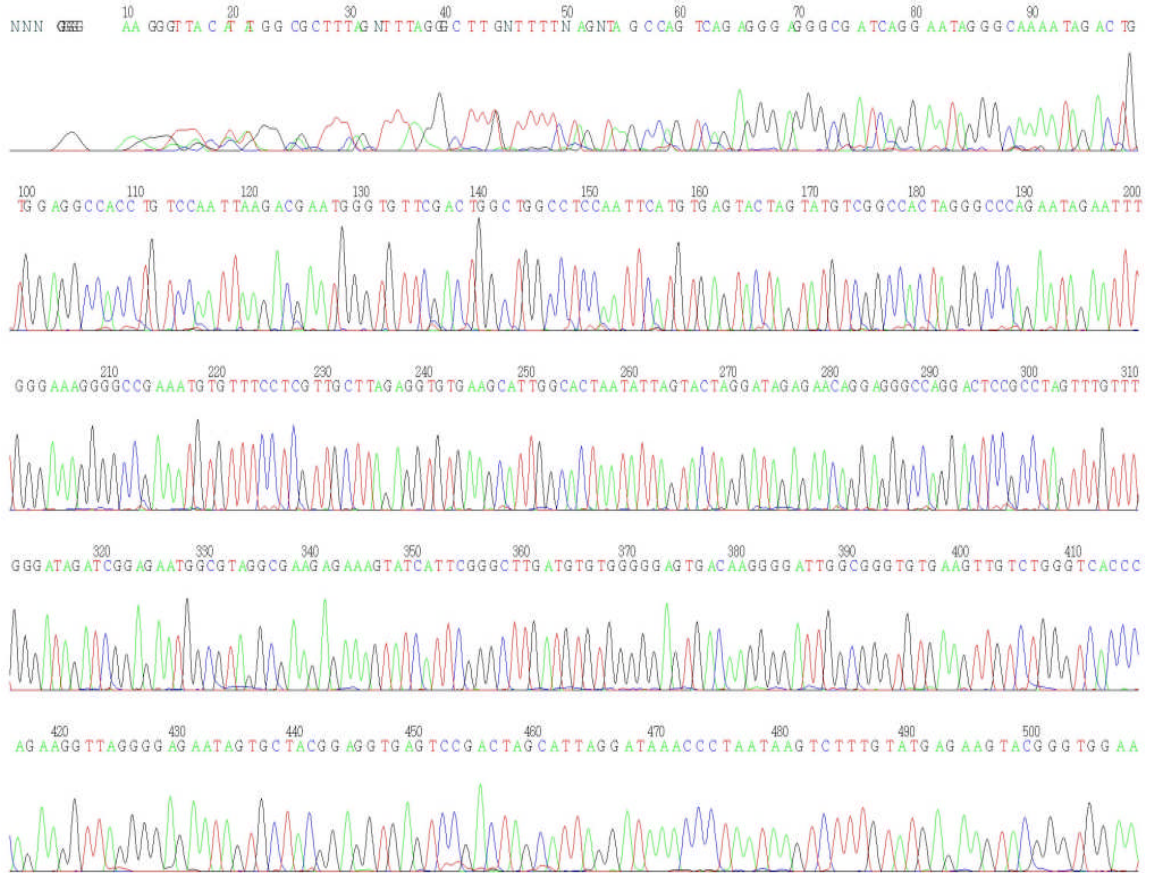
#### 3.2.1. Çoklu Sekans Hizalama ve Sekans Profilinin Çıkarılması

*A. gueldenstaedtii* (12), *A. baerii*/benzer (1), *A. stellatus* (7) ve *H. huso* (8) olmak üzere 4 farklı türe ait toplam 28 örnekten Cyt-b gen bölgesinin sekansı ileri (forwad) ve geri (revers) primerleri kullanılarak çift yönlü alınmıştır. İlk olarak dizilim okumalarına ait grafiklerin gözle kontrolü yapılarak kendi içerisinde değerlendirilmesi yapılmıştır. Her bir yöndeki bireysel sekansların hizalanması ve çoklu hizalama işlemleri MEGA 3.0 (Kumar vd., 2004) ve BIOEDIT (Hall, 1999) programlarının Clustel W seçeneği kullanılarak



yapılmıştır. Kullanılabilecek kaliteye sahip her bir yönde okunan (ileri ve geri) yaklaşık 800 bp'lik sekanslar üst üste getirilerek 1113 bp toplam uzunlukta (primer yerleri çıkarıldı) ortak bir sekans elde edilmiştir. Elde edilen her bir sekans öncelikle aynı türün diğer örnekleri ile karşılaştırılmış, daha sonra hangi türe ait olduğu ve çalışılan gen bölgesini temsil edip etmediği genbanktan nükleotid-blast uygulaması yapılarak kontrol edilmiştir. Aynı zamanda biyolojik bilgilerin toplandığı merkezden (NCBI, The National Center for Biotechnology Information) bu türe ait Cyt-b gen bölgesi sekansları, filogenetik analizlerde topoloji oluşturmada kullanılmak üzere alınmıştır (Tablo 2.7).

Sekans için hazırlanan ilk örneklerde Ludwig vd. (2000) tarafından kullanılan ileri yönlü (forward) primerle yapılan okumalardan iyi sonuç alınamamıştır. Bu nedenle Kahverengi alabalıklarda (*S. trutta*) kullanılan Cyt-b/D-loop (Bernatchez ve Danzmann, 1993) ileri yönlü (Cyt-b/Dloop-F) primeri kullanılmış ve Cyt-b gen bölgesinin başarılı bir şekilde PZR çoğaltması yapılmış ve nükleotid dizilimleri belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Cyt-b geni sekans analizine ait görüntü

### 3.2.2. Boy Varyasyonlarının Karşılaştırılması

Tüm örnekler için çoğaltılan 28 adet Cyt-b gen bölgesinin hiçbirisinde gerek sekans öncesi jel görüntülerinde gerekse sekans verilerinde boy farklılığına rastlanmamıştır.

### 3.2.3. Haplotip Verilerinin Analizi

#### 3.2.3.1. Haplotip Dağılımı

Tüm sekans verilerine bağlı olarak, DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) bilgisayar paket programı kullanılarak haplotipler belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda toplam 19 adet 100 bp'lik haplotip oluşmuştur (Tablo 3.1). Haplotiplerin türler arasında paylaşılmadığı ve türlere özgü olduğu tespit edilmiştir.

*A. gueldenstaedtii* sekansları için toplam 5 haplotip gözlenmiştir (Hap\_1, Hap\_2, Hap\_3, Hap\_4 ve Hap\_5). Bunlar içerisinde Hap\_2 haplotipi *A. gueldenstaedtii* türü içerisinde (% 33,3) ve diğer türlerin sahip olduğu haplotip frekanslarına göre (% 14,29) toplam 4 örnekle en sık görülen haplotip olduğu belirlenmiştir. *A. baerii*/benzer örneği ise Hap\_6 ile temsil edilmiştir.

*A. stellatus* örnekleri içinde Hap\_7, Hap\_8, Hap\_9, Hap\_10, Hap\_11 ve Hap\_12 olmak üzere toplam 6 haplotip görülürken, Hap\_12 % 28,6'lık (2 örnek) frekans ile bu tür için en sık görülen haplotip olmuştur.

*H. huso* örneklerinde Hap\_13, Hap\_14, Hap\_15, Hap\_16, Hap\_17, Hap\_18 ve Hap\_19 olmak üzere toplam 7 haplotip görülmüştür ve Hap\_15, % 25'lik (2 örnek) frekans ile bu tür için en sık görülen haplotip olmuştur. Türler arasındaki haplotiplerin dağılımı 1-7 arasında değişim göstermiş ve en fazla haplotip *H. huso* içerisinde (7 haplotip) görülmüştür (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Cyt-b Sekanslarında farklı haplotipler arasında gözlenen değişken nükleotid yerleri

	1111111111112222222233333333334444444444555666666666666666777777788888888888888889999999999990000000000001 2450011156777902556889902446678901122334781472334566778991222350134455667779990112334556000133445660 4813523562457845294581731256954084709284703967035749255034036297976925143791570287032783258768170581
Hap_1	TACGCATCTACGTACTTTCACTACTTCGAAAGGCCCCCTCCCTTTTGAGCCGGTCCACCCCCCCTTATATACGCAAACAAGCATAGGAATGGACATCAT
Hap_2	.....T.....C.....A.....T.T.....T.....T.....
Hap_3	.....T.....A.....T.....T.....T.....
Hap_4	.....T.....G.....A.....T.....T.....T.....
Hap_5	.....T.....
Hap_6	.....TA.....G.....C.....A.....C.....TAA.....T.....T.....A.GG.....T.....
Hap_7	CGTAT.....CG.C..T..C..C..A.G..A..TTCT..CCCCA...TA.....T.TTT.TCC.CGCG..AG.GTG.ATGCG.AG.CA.G..C.G.
Hap_8	CGTA.TCT...CG.C..T..C..C..A...A..TTCT..CCCCA...TA.....T.TTT.TCC.C.CG..AG.GTG.ATGCG.AG.CA.G..C.GC
Hap_9	CGTA.TCT...CG.C..T..C..C..A...A..TTCT..CCCCA...TTA.....T.TTT.TCC.C.CG..AG.GTG.ATGCG.AG.CA.G..C.GC
Hap_10	CGTA.....CG.C..T..C..C..A.G..A..TTCT..CCCCA...TA.....T.TTT.TCC.C.CG..AG.GTG.ATGCG.AG.CA.G..C.GC
Hap_11	CGTA.TCT...CG.C..T..C..C..A.G..A..TTCT..CCCCA...TA.....T.TTT.TCC.C.CG...G.GTG.ATGCG.AG.CA.G..C.GC
Hap_12	CGTA.TCT...CG.C..T..C..C..A.G..A..TTCT..CCCCA...TA.....T.TTT.TCC.C.CG..AG.GTG.ATGCG.AG.CA.G..C.GC
Hap_13	...AT..TCG..C.T.C..GTC.TCCTA..GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACTTGT.T...TT.CGA...T..GGG..GA...GAA.....GCT..
Hap_14	...AT..TCG..C.T.C..GTC.TCCTAG.GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACTTGT.T...TT.CGA...T..GGG..GA...GAA...A..GCT..
Hap_15	...AT..TCG..C.T.CC.GTC.TCCTAG.GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACTTGT.T...TT.CGA...T..GGG..GA...GAA.....GCT..
Hap_16	...AT..TCG..C.T.C..GTC.TCCTAG.GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACT.GT.T...TT.CGA...T..GGG..GA...GAA.....GCT..
Hap_17	...AT..TCG..C.T.C..GTC.TCCTAG.GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACTTGT.T...TT.C.A...T..GGG..GA...GAA.G.....GCT..
Hap_18	...AT..TCG..C.T.C..GTC.TCCTAG.GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACTTGT.T...TT.CGA...T..GGG..GA...GAA.....GCT..
Hap_19	...AT..TCG..C.T.C..GTC.TCCTAG.GAATTT..C..T.C.CA.A.TAACTTGT.T...TT.CGA...T..GGG..GA...GAA.G.....GCT..

Tablo 3.2. Tür içi ve türler arası gözlenen haplotipler ve frekansları

Haplotipler	Genel		<i>A. gueldenstaedtii</i> (n=12)		<i>A. baerii</i> / benzer (n=1)		<i>A. stellatus</i> (n=7)		<i>H. huso</i> (n=8)	
	Ad.	Fr. (%)	Örnek No	Fr. (%)	Ör. No	Fr. %	Örnek No	Fr. (%)	Örnek No	Fr. (%)
Hap_1	3	10,7	37-53-91	25,0						
Hap_2	4	14,3	2-11-61-62	33,3						
Hap_3	3	10,7	40-54-63	25,0						
Hap_4	1	3,6	44	8,3						
Hap_5	1	3,6	67	8,3						
Hap_6	1	3,6			46	100				
Hap_7	1	3,6					26	4,3		
Hap_8	1	3,6					27	14,3		
Hap_9	1	3,6					28	14,3		
Hap_10	1	3,6					32	14,3		
Hap_11	1	3,6					48	14,3		
Hap_12	2	7,1					60-66	28,6		
Hap_13	1	3,6							69	12,5
Hap_14	1	3,6							18	12,5
Hap_15	2	7,1							20-25	25,0
Hap_16	1	3,6							76	12,5
Hap_17	1	3,6							29	12,5
Hap_18	1	3,6							56	12,5
Hap_19	1	3,6							59	12,5

### 3.2.3.2. Haplotip çeşitliliği (Hd)

Çalışılan türler için haplotip çeşitliliği % 81,8 - 96,4 arasında bulunmuştur. Türler içerisinde en düşük haplotip çeşitlilik değeri ve standart sapması *A. gueldenstaedtii* de  $0,818 \pm 0,070$  olarak tespit edilmiştir. *A. stellatus* için bu değerler  $0,952 \pm 0,096$  olarak gerçekleşirken, en yüksek oran ise *H. huso* için  $0,964 \pm 0,077$  olarak hesaplanmıştır. *A.baerii*/benzer örnek sayısı bir tane olduğu için hesaplamalara katılmamıştır. Haplotip çeşitliliğine ait yüzde (%) frekans değerleri Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Türlere göre haplotip çeşitliliği (%), varyansı ve standart sapması

Türler	Haplotip Çeşitliliği (Hd x 100)	Varyans (V <sub>Hd</sub> )	Sd (Hd±Sd)
<i>A. gueldenstaedtii</i>	81,8	0,00495	0,070
<i>A. stellatus</i>	95,2	0,00912	0,096
<i>H. huso</i>	96,4	0,00596	0,077
<i>A.baerii</i> /benzer	-	-	-

### 3.2.4. Nükleotid Verilerinin Analizi

#### 3.2.4.1. Nükleotid Dağılımı

Her bir örnek için belirlenen ortalama nükleotid oranları ve her bir kodon için miktarı Tablo 3.5’de verilmiştir. Çalışılan türler için nükleotit dağılım frekanslarının % 14,9 - 32,0 arasında değiştiği gözlenmiştir. *A.baerii*/benzer için T-C-A-G yüzdeleri sırasıyla 27,0, 31,4, 26,8 ve 14,9 olarak bulunmuştur. *A. baerii*/benzer’de C ve G oranı diğer türlerden düşük bulunur iken A ve T oranları (% 53,8) ise diğer türlerden yüksek bulunmuştur. *A. stellatus* ve *H. huso* için benzer nükleotid frekansları (26,3, 32,0, 26,3, 15,4) ve dolayısıyla benzer A+T oranı (% 52,6) gözlenmiştir. *A. gueldenstaedtii* ‘bu iki türden farklı olarak T oranı daha fazla (% 26,9) ve G oranı daha az (% 15,0) bulunmuştur. Bu nedenle A+T (% 53,2) oranı diğer iki türden daha yüksektir. Çalışılan türler için Cyt-b gen bölgesinin C (% 31,1) bakımından zengin, G (% 15,5) bakımından ise fakir olduğu tespit edilmiştir. Tüm türler için ortalama A+T oranı ise % 53,3 olarak bulunmuştur (Tablo 3.4).

Transisyon miktarına bakıldığında en fazla *A. gueldenstaedtii*’de (9), *A. stellatus* (7) ve en az *H. huso*’da (6) görülmektedir. Transversiyon miktarı ise en fazla *A. stellatus*’da (2) görülmüştür, *H. huso*’ da hiç transversiyon görülmemiştir. Ti/Tv oranı en yüksek *A. gueldenstaedtii*’de (9:1), *A. stellatus*’da (7:2) ve *H. huso* (6:0) olarak gerçekleşmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Türler göre nükleotit frekansları(%) ve Transisyon/Transversiyon (ti:tv) oranı

Türler	T	C	A	G	%AT	ti:tv
<i>A. gueldenstaedtii</i>	26,9	32,0	26,3	15,0	53,2	9:1
<i>A. stellatus</i>	26,3	32,0	26,3	15,4	52,6	7:2
<i>H. huso</i>	26,3	32,0	26,3	15,4	52,6	6:0
<i>A.baerii</i> /benzer	27,0	31,4	26,8	14,9	53,8	-
ORTALAMA	29,2	31,1	24,1	15,5	53,3	-

Tablo 3.5. Çalışılan Mersin Balığı türleri örneklerine ait Cyt-b geni nükleotid frekansları

		T(U)	C	A	G	Top.	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos 1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos 2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos 3
<b>A.b*</b>	<b>46</b>	<b>27,0</b>	<b>31,4</b>	<b>26,8</b>	<b>14,9</b>	1113	<b>23,2</b>	<b>27,5</b>	<b>24,0</b>	<b>25,3</b>	<b>371</b>	<b>41,0</b>	<b>25,1</b>	<b>20,5</b>	<b>13,5</b>	<b>371</b>	<b>16,7</b>	<b>41,5</b>	<b>35,8</b>	<b>5,9</b>	<b>371</b>
<i>A. gueldenstaedtii</i>	37	26,7	31,6	26,6	15,1	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	16,2	42,0	35,6	6,2	371
	2	27,0	31,4	26,6	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,2	35,6	5,9	371
	11	27,0	31,4	26,6	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,2	35,6	5,9	371
	40	27,0	31,3	26,7	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,0	35,8	5,9	371
	44	27,0	31,3	26,6	15,1	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,0	35,6	6,2	371
	53	26,7	31,6	26,6	15,1	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	16,2	42,0	35,6	6,2	371
	54	27,0	31,3	26,7	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,0	35,8	5,9	371
	91	26,7	31,6	26,6	15,1	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	16,2	42,0	35,6	6,2	371
	67	26,8	31,5	26,6	15,1	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	16,4	41,8	35,6	6,2	371
	61	27,0	31,4	26,6	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,2	35,6	5,9	371
	62	27,0	31,4	26,6	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,2	35,6	5,9	371
	63	27,0	31,3	26,7	15,0	1113	22,9	27,8	23,7	25,6	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,3	41,0	35,8	5,9	371
<b>Ort</b>	<b>26,9</b>	<b>31,4</b>	<b>26,6</b>	<b>15,0</b>	1113	<b>22,9</b>	<b>27,8</b>	<b>23,7</b>	<b>25,6</b>	<b>371</b>	<b>41,0</b>	<b>25,1</b>	<b>20,5</b>	<b>13,5</b>	<b>371</b>	<b>16,9</b>	<b>41,4</b>	<b>35,6</b>	<b>6,0</b>	<b>371</b>	
<i>H. huso</i>	69	27,2	31,0	26,7	15,1	1113	23,7	27,0	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,6	6,5	371
	18	27,2	31,0	26,7	15,1	1113	23,7	27,0	24,3	25,1	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,3	6,7	371
	20	27,1	31,1	26,6	15,2	1113	23,5	27,2	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,3	6,7	371
	25	27,1	31,1	26,6	15,2	1113	23,5	27,2	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,3	6,7	371
	76	27,1	31,1	26,6	15,2	1113	23,7	27,0	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	16,7	41,2	35,3	6,7	371
	29	27,2	31,0	26,6	15,2	1113	23,7	27,0	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,3	6,7	371
	56	27,2	31,0	26,6	15,2	1113	23,7	27,0	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,3	6,7	371
	59	27,2	31,0	26,5	15,3	1113	23,7	27,0	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	17,0	41,0	35,0	7,0	371
	<b>Ort</b>	<b>27,2</b>	<b>31,0</b>	<b>26,6</b>	<b>15,2</b>	1113	<b>23,7</b>	<b>27,0</b>	<b>24,0</b>	<b>25,3</b>	<b>371</b>	<b>41,0</b>	<b>25,1</b>	<b>20,5</b>	<b>13,5</b>	<b>371</b>	<b>16,9</b>	<b>41,0</b>	<b>35,3</b>	<b>6,7</b>	<b>371</b>
<i>A. stellatus</i>	26	26,4	31,8	26,2	15,5	1113	23,2	27,5	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	15,1	42,9	34,2	7,8	371
	27	26,3	32,0	26,3	15,4	1113	23,7	27,2	23,7	25,3	371	40,7	25,3	20,5	13,5	371	14,6	43,4	34,8	7,3	371
	28	26,4	31,9	26,3	15,4	1113	23,7	27,2	23,7	25,3	371	40,7	25,3	20,5	13,5	371	14,8	43,1	34,8	7,3	371
	32	26,2	32,0	26,3	15,5	1113	23,2	27,5	24,0	25,3	371	41,0	25,1	20,5	13,5	371	14,6	43,4	34,5	7,5	371
	48	26,3	32,1	26,1	15,5	1113	23,7	27,2	23,7	25,3	371	40,7	25,3	20,5	13,5	371	14,6	43,7	34,2	7,5	371
	60	26,3	32,0	26,2	15,5	1113	23,7	27,2	23,7	25,3	371	40,7	25,3	20,5	13,5	371	14,6	43,4	34,5	7,5	371
	66	26,3	32,0	26,2	15,5	1113	23,7	27,2	23,7	25,3	371	40,7	25,3	20,5	13,5	371	14,6	43,4	34,5	7,5	371
	<b>Ort</b>	<b>26,3</b>	<b>32,0</b>	<b>26,3</b>	<b>15,4</b>	1113	<b>23,6</b>	<b>27,3</b>	<b>23,8</b>	<b>25,3</b>	<b>371</b>	<b>40,8</b>	<b>25,3</b>	<b>20,5</b>	<b>13,5</b>	<b>371</b>	<b>14,7</b>	<b>43,3</b>	<b>34,5</b>	<b>7,5</b>	<b>371</b>

\* : *A.baerii*/benzer

### 3.2.4.2. Nükleotid Çeşitliliği (Pi)

Çalışılan türler için tür içi toplam nükleotid çeşitliliği (Pit) % 0,167 – 0,378 arasında bulunmuştur. Türler içerisinde en yüksek nükleotid çeşitliliği *A. gueldenstaedtii*'de  $0,00378 \pm 0,00040$  olarak bulunurken, bu değer *A. stellatus* için  $0,00299 \pm 0,00083$  olduğu tespit edilmiştir. En düşük değer ise *H. huso* için  $0,00167 \pm 0,00025$  olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.6).

Tür içi nükleotid çeşitliliği ayrıca sinonim olmayan (Pia) ve sinonim (Pis) ikame değerleri türler için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Pia değeri ise 0,00115 - 0 arasında gözlenmiş ve *H. huso*'da 0,00030 olurken en büyük değer *A. stellatus*'da 0,00115 olarak hesaplanmıştır. Pis değeri 0,572 – 0,149 arasında değişim göstermiş, en büyük değer *A. gueldenstaedtii*'de 0,149 ve en düşük *H. huso*'da bulunmuştur. *A. gueldenstaedtii*'de sinonim olmayan nükleotid değişikliği gözlenmemiş ve 0 olarak değerlendirilmiştir. Pia/Pis değeri ise 0,135-0 aralığında değişmiş ve en büyük değer *A. stellatus*'da tespit edilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Tür için nükleotid çeşitliliği (Pi) (Sinonim, nonsinonim, toplam) değerleri ve Pia/Pis oranları

Türler	Pit	Pia (NoSin)	Pis (Sin)	Pia/Pis
<i>A. gueldenstaedtii</i>	0,00378	0	0,14900	0
<i>A. stellatus</i>	0,00299	0,00115	0,00846	0,135
<i>H. huso</i>	0,00167	0,00030	0,00572	0,052

Türler arası nükleotid çeşitliliği sinonim olmayan (Pia) ve sinonim (Pis) yerler için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sinonim olmayan yerler için Pia değerleri 0,00115 - 0 arasında değişmiş ve en yüksek değer *A. stellatus* - *A.baerii*/benzer arasında gözlenmiştir. Türler arası Pis değerleri 0,01494 - 0,00572 arasında dağılım göstermiş ve en yüksek değer *A. gueldenstaedtii* – *H. huso* türleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Sinonim ve sinonim olmayan yerler dikkate alınmadan toplam nükleotid çeşitliliğine bakıldığında en yüksek değer (0,03293) *A. stellatus* - *H. huso* arasında olduğu, en düşük değer ise (0,00511) *A. gueldenstaedtii* – *A.baerii*/benzer arasında olduğu gözlenmiştir. Türler arası Pia/Psi

oranı 0,135-0 aralığında bulunmuş ve en büyük değer (0,135) *A. stellatus* - *A.baerii*/benzer arasında olduğu görülmüştür (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Türler arası hesaplanmış Pit (toplam), Pia (sinonim), Pis (sinonim olmayan) ve Pia/Pis değerleri

Türler	Pit	Pis	Pia	Pia/Pis
<i>A. stellatus</i> - <i>A. gueldenstaedtii</i>	0,02628	0,01493	0,00000	0,000
<i>A. gueldenstaedtii</i> – <i>H. huso</i>	0,02694	0,01494	0,00000	0,000
<i>A. stellatus</i> - <i>H. huso</i>	0,03293	0,00847	0,00114	0,134
<i>H. huso</i> - <i>A.baerii</i> /benzer	0,01093	0,00572	0,00030	0,052
<i>A. stellatus</i> - <i>A.baerii</i> /benzer	0,01460	0,00846	0,00115	0,135
<i>A. gueldenstaedtii</i> – <i>A.baerii</i> /benzer	0,00511	0,01491	0,00000	0,000

### 3.2.4.3. Nükleotid Farklılığı (k)

Çalışılan türlerde, tür içi nükleotid farklılığı 1,857 – 4,212 arasında dağılım göstermiştir. Türler içerisinde en yüksek nükleotid farklılık değeri *A. gueldenstaedtii*' de görülürken bu değer *A. stellatus* için 3,33 olarak bulunmuştur. Tür içi en düşük değer ise *H. huso* da 1,857 olarak hesaplanmıştır. Tür içi farklılaşan nükleotid sayısı toplam 25 adet olmuştur (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Tür içi nükleotid farklılığı, sinonim ve sinonim olmayan farklılık sayıları ve pozisyonları

	<i>A. gueldenstaedtii</i>	<i>A. stellatus</i>	<i>H. huso</i>
Nükleotid Farklılığı (k)	4,212	3,333	1,857
Farklılaşan yer sayısı	10	9	6
	10	7	5
Sinonim farklılık sayısı ve pozisyonları	174 252 297 303 408 477 633 657 819 1041	105 115 375 657 855 879 1101	259 369 690849 1005
Sinonim olmayan farklılık sayısı ve pozisyonları	0	2 112 113	1 1036



*A. gueldenstaedtii* içerisinde görülen sekans farklılığı 10 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir (174 252 297 303 408 477 633 657 819 1041). Bunlardan 9 tanesi transisyon ve 1 tanesinin de transversiyon ( $A \leftrightarrow T$  (633)) olarak değiştiği görülmüştür. Transisyon değişimlerin 7 tanesi  $C \leftrightarrow T$  (174,303,477,657,819,1041 ve 252 ) ve 2 tanesinin  $A \leftrightarrow G$  (297 ve 408) arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu değişimlerin frekanslarına bakıldığında, 252, 297, 303, 633 ve 657 pozisyonlarındaki değişimler yalnız birer haplotipte, 477’de görülen değişim 2 haplotipte ve 174, 408, 819, 1041’nci pozisyonundaki değişim ise 3 haplotipte görülmüştür.

*A. stellatus* içerisinde görülen sekans farklılığı 9 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir. Bunlardan 7 tanesi transisyon olarak gerçekleşirken, 2 tane transversiyon (112’de  $A \leftrightarrow T$  ve 879’da  $A \leftrightarrow C$ ) değişimi görülmüştür. Transisyon değişimlerin 5 tanesi  $C \leftrightarrow T$  (115, 657 ve 105,113 1101 ) ve 2 tanesi ise  $A \leftrightarrow G$  ( 375 ve 855) değişimi olmuştur. Bu değişimlerin frekansları ise yalnızca birer haplotipte görülen değişimler 657 ve 879 pozisyonlarında, 2 haplotipte görülen değişim 375’nci pozisyonunda, 4 haplotipte görülen değişim 112, 113, 115’nci pozisyonlar da ve 5 haplotipte görülen değişim ise 105, 855, 1101’nci pozisyonlarda olduğu görülmüştür.

*H. huso* içerisinde görülen sekans farklılığı 6 farklı yerdeki baz değişimiyle oluştuğu belirlenmiştir (259 369 690 849 1005 1036). Bunların tamamı transisyon olarak gerçekleşmiş ve bu transisyonların 2 tanesi  $C \leftrightarrow T$  (259,690), 4 tanesi ise  $A \leftrightarrow G$  (369 849 1005 1036) değişimi şeklinde gerçekleşmiştir. Değişim görülen pozisyonların frekanslarına bakıldığında, 259 690 849 1036’nci pozisyonlardaki değişimler yalnızca birer haplotipte görülürken, 1005’nci pozisyonunda görülen değişim 2 haplotipte ve 369’ncü pozisyonunda görülen değişim 6 haplotipte görülmüştür.

Sinonim ikame en fazla 10 adet ile *A. gueldenstaedtii*’de görülür iken *A. stellatus*’ da 7 adet ve *H. huso*’da 1 adet görülmemiştir. Sinonim olmayan ikame ise 2 adet ile en fazla *A. stellatus*’da ve 1 adet *H. huso*’ da görülür iken *A. gueldenstaedtii*’ de hiç görülmemiştir.

Türler arası nükleotid farklılığı toplam (kt), sinonim (ka) ve sinonim olmayan (ks) yerler için ayrı ayrı hesaplanmıştır ve Tablo 3.9’da verilmiştir. Türler arası toplam nükleotit farklılığı (kt) değeri 5,692 - 36,648 aralığında değişim göstermiştir. En yüksek kt değeri *A. stellatus* - *H. huso* arasında (36,648), en düşük değer ise *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer arasında bulunmuştur (5,692). Sinonim olmayan nükleotit farklılığı değerleri (ka) ise 0,0704 - 0,00292 aralığında değişim göstermiş ve en büyük değer *A.*

*stellatus* - *A.baerii*/benzer arasında görülürken, en düşük değer *A. stellatus* - *A. gueldenstaedtii* arasında görülmüştür. Hesaplanan sinonim nükleotid farklılığı değeri (ks) ise 0,22412 - 0,03834 aralığında dağıldığı görülmüştür. En büyük ks değeri *A. stellatus* - *H. huso* arasında ve en düşük ks değeri *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer arasında hesaplanmıştır. Bunlara bağlı olarak hesaplanan ka/ks oranı 0,092 - 0,014 arasında dağılım göstermiştir. En büyük ka/ks oranı *A.gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer arasında hesaplanırken en küçük oranın ise *A. stellatus*-*A. gueldenstaedtii* arasında olduğu hesaplanmıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Türler arası karşılaştırmalar ile oluşturulmuş kt (toplam), ks (sinonim), ka (sinonim olmayan) ve ka/ks değerleri

Türler	kt	ks	ka	ka/ks
<i>A. stellatus</i> - <i>A. gueldenstaedtii</i>	29,251	0,18774	0,00292	0,014
<i>A. gueldenstaedtii</i> - <i>H. huso</i>	29,989	0,18727	0,00376	0,017
<i>A. stellatus</i> - <i>H. huso</i>	36,648	0,22412	0,00427	0,016
<i>H. huso</i> - <i>A.baerii</i> /benzer	12,167	0,15713	0,00496	0,028
<i>A. stellatus</i> - <i>A.baerii</i> /benzer	16,250	0,17468	0,00704	0,036
<i>A. gueldenstaedtii</i> - <i>A.baerii</i> /benzer	5,692	0,03834	0,00361	0,092

Türler arası çiftli farklılaşan yer sayılarına baktığımızda en düşük yer sayısı *A. stellatus* - *H. huso* (15) arasında görülürken, en yüksek değer *A. gueldenstaedtii* - *A. stellatus* (18) arasında tespit edilmiştir. Türler arası farklılık gösteren nükleotid pozisyonları ve özellikleri Tablo 3.10'de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 3.10. Türler arası farklılık gösteren nükleotid pozisyonları ve özellikleri

	<i>A. gueldenstaedtii</i> <i>A. stellatus</i>	<i>A. stellatus</i> <i>H. huso</i>	<i>H. huso</i> <i>A. gueldenstaedtii</i>
Farklılaşan yerler	18	15	16
Sinonim değişiklik miktarı ve pozisyonları	16	12	15
	105 115 174 252 297 303 375 408 477 633 657 819 855 879 1041 1101	105 115 259 369 375 657 690 849 855 879 1005 1101	174 252 259 297 303 369 408 477 633 657 690 819 849 1005 1041
Sinonim olmayan değişiklik miktarı ve pozisyonları	2	3	1
	112 113	112 113 1036	1036
Sabitleşmiş farklılıklar	47	58	48
Sinonim değişiklik miktarı ve pozisyonları	46	56	42
	24 48 51 177 198 225 264 291 321 366 429 432 438 444 513 549 576 627 630 664 669 720 726 732 759 837 846 852 861 864 891 897 900 912 927 930 933 942 957 963 1002 1008 1017 1038 1050 1068	24 48 51 156 162 198 204 225 252 264 285 288 303 342 345 384 390 414 417 420 429 432 444 480 513 576 645 672 675 685 693 714 720 723 726 732 759 807 837 852 861 864 873 900 912 918 930 933 942 1002 1008 1017 1038 1047 1065 1068	105 115 156 162 177 204 288 291 321 342 345 366 390 414 417 420 438 480 549 627 630 645 664 669 672 675 685 693 714 723 807 846 852 873 891 897 918 927 963 1047 1050 1065
Sinonim olmayan değişiklik miktarı ve pozisyonları	1	2	6
	103	895 958	103 285 384 895 957 958

### 3.2.5. Türler İçin Ayırt Edici Restriksiyon Enzimlerin Belirlenmesi

Çalışılan türler için ayırt edici kesici enzimlerin belirlenmesi işleminde BIOEDIT (Hall, 1999) programı kullanılmıştır. Cyt-b geni 240 farklı kesici enzim ile kesildikten sonra, her bir enzim için oluşan kesim morfları belirlenmiştir. Bu aşamada sanal olarak elde edilen morflar üzerinden, Cyt-b gen bölgesinde her üç tür için ayrı morf oluşturan ayırt edici enzimler belirlenmiştir. Belirleme işleminde parçacık uzunluğu yerine kesim frekansları dikkate alınmıştır.

*H. huso* için ayırt edici kesici enzimler, *BceAI* (bir kesim yeri), *BsiHKAI* (1), *BtgI* (1), *TspRI* (1), *AvaII* (1) olarak belirlenmiştir. *A. gueldenstaedtii* için *BpmI* (1), *AflIII* (1), *Eco57MI* (1) kesici enzimleri belirleyici olmuştur. *A. baerii*/benzer örneği ise bu enzimlerle *A. gueldenstaedtii* ye dahil olduğu tespit edilmiştir. Bu örnekler içerisinde *A. baeri* ile *A. gueldenstaedtii*'nin ayrılması için *BsrI*, *BfaI*, *BsaXI* ve *TatI* enzimleri ayırt edicidir. *A. stellatus* için, *Bme1580I* (1), *BmgBI* (1), *BstEII* (1), *PspOMI* (1), *SfiI* (1), *TaqI* (1), *BbvI* (1), enzimleri bu tür için ayırt edicidir. Her üç tür için birden belirleyici olan enzimler ise Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.11. Her bir türün belirlenmesinde kullanılacak kesim yerleri ve enzimler

Kesici enzimler	<i>H. huso</i>		<i>A. gueldenstaedtii</i> + <i>A. baerii</i> / benzer		<i>A. stellatus</i>	
	Kesim Sayısı	Kesim yerleri	Kesim Sayısı	Kesim yerleri	Kesim Sayısı	Kesim yerleri
Csp6I	6	262, 374, 442, 461, 851, 980	7-8	262, 286, 374, 442, 461, 646, 896, 980	4-5	374, 461, 646, 878, 980
NlaIV	2	238, 959	1	238	3	238, 935, 959
Sau96I	2	237, 957	1	237	5-4	237, 856, 933, 957, 958
BseMII	2	463, 630	4	373, 463, 630, 946	3	373, 463, 630
BsaJI	5	88, 380, 381, 727, 1044	3	88, 727, 960	1	88
HphI	2	557, 688	4	337, 409, 557, 688	5	337, 409, 557, 688, 743
RsaI	6	263, 375, 443, 462, 852, 981	7-8	263, 287, 375, 443, 462, 647, 897	4-5	375, 462, 647, 879, 981
BspCNI	2	464, 629	4	374, 464, 629, 947	3	374, 464, 629
BsrI	3		2-3		2	

Tablo 3.11'in devamı

BfaI	9		9-8		9-10	
BsaXI	2		3-2		1-2	
TatI	3		3-5		3	
BceAI	1	177	-	-	-	-
BsiHKAI	1	900	-	-	-	-
BtgI	1	1044	-	-	-	-
TspRI	1	900	-	-	-	-
AvaII	1	957	-	-	-	-
BpmI	-	-	1	570	-	-
AflIII	-	-	1	924	-	-
Eco57MI	-	-	1	570	-	-
Bme1580I	-	-	-	-	1	961
BmgBI	-	-	-	-	1	196
BstEII	-	-	-	-	1	731
PspOMI	-	-	-	-	1	957
SfiI	-	-	-	-	1	965
TaqI	-	-	-	-	1	1008
BbvI	-	-	-	-	1	961

### 3.2.6. Aminoasit Çeşitliliği

Aminoasit frekansları, toplam 20 çeşit aminoasitten 371 adet aminoasit kodlandığı ve bunların yüzde dağılımlarının 0,00 - 16,94 aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 3.12). Tür bazında *A. gueldenstaedtii* ve *A.baerii*/benzer'de triptofan hiç görülmezken, lösin % 16,94 ile en çok görülen aminoasit olmuştur. Kodonlara bakıldığında 1. kodonda 11 adet (35, 38, 39, 59, 87, 222, 229, 293, 299, 320, 346) değişim görülürken, bunlardan 7 tanesi aminoasit kodlamasını değiştirmektedir. 2. kodonda 1 (38) değişim görülür iken 3. kodonda 88 değişim görülmüş ve bunlardan 5 tanesi (35, 59, 293, 299 ve 346) aminoasit değişimi görülen kodonda gerçekleşmiştir.

*A. gueldenstaedtii* içerisinde hiçbir aminoasit kodlamasında değişiklik gözlenmemiştir. Fakat diğer türler *A. gueldenstaedtii* ile karşılaştırıldığında 7 yerde aminoasit kodlaması değişmektedir (35, 38, 59, 293, 299, 320, 346). *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer arasında 59 ve 293'üncü kodon pozisyonlarında valin-izolesin ve 299 da metiyonin-valin değişimi tespit edilmiştir.

Tablo 3.12. Çalışılan Mersin Balığı türleri örneklerine ait Cyt-b geni sekans verilerinden elde edilen amino asit frekansları

		Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Top.
<i>A.b*</i>	46	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
<i>A. gueldenstaedtii</i>	37	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	2	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	11	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	40	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	44	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	53	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	54	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	91	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	67	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	61	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	62	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	63	7,50	0,83	3,06	1,11	8,33	7,78	3,33	9,72	2,22	16,94	0,56	5,28	5,83	2,50	1,94	6,11	6,67	6,67	0,00	3,61	360
	<b>Ort.</b>	<b>7,50</b>	<b>0,83</b>	<b>3,06</b>	<b>1,11</b>	<b>8,33</b>	<b>7,78</b>	<b>3,33</b>	<b>9,72</b>	<b>2,22</b>	<b>16,94</b>	<b>0,56</b>	<b>5,28</b>	<b>5,83</b>	<b>2,50</b>	<b>1,94</b>	<b>6,11</b>	<b>6,67</b>	<b>6,67</b>	<b>0,00</b>	<b>3,61</b>	<b>360</b>
<i>H. huso</i>	69	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	18	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,67	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,63	0,55	3,59	362
	20	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	25	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	76	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	29	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	56	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	59	7,18	0,83	3,04	1,10	8,29	7,73	3,31	9,39	2,21	16,85	0,55	5,25	5,80	2,49	1,93	6,08	6,91	6,91	0,55	3,59	362
	<b>Ort.</b>	<b>7,18</b>	<b>0,83</b>	<b>3,04</b>	<b>1,10</b>	<b>8,29</b>	<b>7,73</b>	<b>3,31</b>	<b>9,43</b>	<b>2,21</b>	<b>16,85</b>	<b>0,55</b>	<b>5,25</b>	<b>5,80</b>	<b>2,49</b>	<b>1,93</b>	<b>6,08</b>	<b>6,91</b>	<b>6,87</b>	<b>0,55</b>	<b>3,59</b>	<b>362</b>
<i>A. stellatus</i>	26	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,70	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,09	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	27	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,42	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,37	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	28	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,42	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,37	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	32	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,70	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,09	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	48	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,42	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,37	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	60	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,42	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,37	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	66	7,48	0,83	3,05	1,11	8,31	7,76	3,32	9,42	2,22	16,90	0,55	5,26	5,82	2,49	1,94	6,37	6,65	6,65	0,28	3,60	361
	<b>Ort.</b>	<b>7,48</b>	<b>0,83</b>	<b>3,05</b>	<b>1,11</b>	<b>8,31</b>	<b>7,76</b>	<b>3,32</b>	<b>9,50</b>	<b>2,22</b>	<b>16,90</b>	<b>0,55</b>	<b>5,26</b>	<b>5,82</b>	<b>2,49</b>	<b>1,94</b>	<b>6,37</b>	<b>6,65</b>	<b>6,65</b>	<b>0,28</b>	<b>3,60</b>	<b>361</b>

\*: *A. baerii*/benzer

*A. stellatus* örneklerinin kendi içerisinde 2 farklı grup oluşturduğu görülmüştür. İki haplotip arasındaki farklılaşma 38'inci kodon pozisyonunda izolesin-serin) şeklinde gerçekleşmiştir. *A. gueldenstaedtii* - *A. stellatus* arasında 35'inci kodon pozisyonunda valin-izolesin farklılaşması ve 38'inci pozisyon da serin-izolesin değişimi belirlenmiştir. *H. huso* türünün kendi içinde de 2 farklı haplotip grubu olduğu gözlenmiş ve bu haplotipler birbirlerinden 346'ncı kodon pozisyonunda valin-metiyonin farklılaşmasıyla ayrılmıştır. *A. gueldenstaedtii* - *H. huso* arasında 35'inci kodon pozisyonunda valin-izolesin, 299'da metiyonin-valin, 320'de alanin-treonin ve 346'ncı kodon pozisyonunda valin-metiyonin değişimi belirlenmiştir (Tablo 3.13).

Tablo 3.13. Tür içi ve türler arası aminoasit varyasyonu ve özellikleri

TÜRLER	HAPLOTİPLER	HAPLOTİP SEKANSI							ÖRNEK NO
		3	3	5	2	2	3	3	
<i>A. gueldenstaedtii</i>	Haplotip_1	V	I	V	V	M	A	V	37-2-11-40-44-53-54-91-67-61-62-63
<i>A. baerii</i> /benzer	Haplotip_2	V	I	I	I	V	A	V	46
<i>A. stellatus</i>	Haplotip_3	I	I	V	V	M	A	V	26-32
	Haplotip_4	I	S	V	V	M	A	V	27-28-48-60-66
<i>H. huso</i>	Haplotip_5	I	I	V	V	V	T	V	69-20-25-76-29-56-59
	Haplotip_6	I	I	V	V	V	T	M	18

Not: V=Valin, I=İzolesin, M=Metiyonin, S=Serin, A=Alanin, T=Treonin.

### 3.2.7. Tür İçi ve Türler Arası Genetik Farklılığın Belirlenmesi

Tür içi ve türler arası genetik farklılığın belirlenmesinde ARLEQUIN 3.0 (Schneider vd., 2000) programında AMOVA (Excoffier vd., 1992) seçeneği kullanılarak Kimura 2 metoduna göre türler arasında AMOVA analizi yapılmış ve F değerleri elde edilmiştir. Yapılan moleküler varyans analizi sonucunda varyasyonun % 94,37'lik çok büyük bir kısmı türler arasında dağıldığı görülmüş ve bu oran çok önemli bulunmuştur (  $P < 0.001$ ). Tür içi varyasyon ise % 5,63 olarak bulunmuştur. Tüm türler arasında Fst değeri 0,94 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.14).

Tablo 3.14. Türler Arası AMOVA analizi sonuçları (Kimura 2-P)

Varyasyon Kaynağı	d.f.	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyasyonun Yüzdesi
Türler Arası	3	527,350	27,80684 Va	94,37
Türler İçi	24	39,827	1,65948 Vb	5,63
Toplam	27	567,177	29,46631	
Bağlılık İndeksi	FST :	0,94368		

Türler arası hesaplanan en küçük Fst değeri *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer arasında (Fst: 0,6978) hesaplanırken, en yüksek *H. huso* - *A. stellatus* arasında (Fst: 0,96396) hesaplanmıştır (Tablo 3.14). Fst- P değerlerine baktığımızda türler arası genetik farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (P<000001). *A.baerii*/benzer örneğinin 1 adet olmasından dolayı bu türe ait istatistiksel hesaplama tutarlı olmadığından dikkate alınmamıştır (Tablo 3.15).

Tablo 3.15. Tür içi ve türler arası Fst değerleri ve üste P değerleri (Kimura 2-P)

	<i>A. gueldenstaedtii</i>	<i>A. stellatus</i>	<i>H. huso</i>	<i>A.baerii</i> /benzer
<i>A. gueldenstaedtii</i>	-	0.00000	0.00000	-
<i>A. stellatus</i>	0.93284	-	0.00000	-
<i>H. huso</i>	0.94396	0.96396	-	-
<i>A.baerii</i> /benzer	0.69781	0.94214	0.96310	-

Türler arası genetik mesafe Kimura 2 parametresine göre MEGA (Kumar vd., 2004) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere baktığımızda en küçük genetik uzaklık değeri *A. baerii*/benzer - *A. gueldenstaedtii* arasında görülürken (0,01258), en yüksek genetik uzaklık ise *A. gueldenstaedtii* - *H. huso* arasında hesaplanmıştır (0,05288) (Tablo 3.16).



Tablo 3.16. Türler arası mesafe (Kimura 2-P)

Türler	A	B	C	D	E
<i>A. gueldenstaedtii</i> (A)	-				
<i>A. stellatus</i> (B)	0,05234	-			
<i>H. huso</i> (C)	0,05288	0,05196	-		
<i>A.baerii</i> /benzer (D)	0,01258	0,05196	0,04531	-	
<i>P. spathula</i> (E)	0,1622	0,1642	0,1605	0,1657	-

Ayrıca türler arası genetik mesafe MEGA (Kumar vd., 2004) programı ile Kimura 2 parametresine göre gamma düzeltme değeri kullanılarak yeniden belirlenmiştir. Burada kullanılan gamma değeri filogenetik analiz kısmında belirtilen model seçimi ve parametrelerin hesaplanması kısmında belirtildiği gibi PAUP (Swofford, 2003) altında MODELTEST (Posada ve Crandall, 1998) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Gamma düzeltme faktörü kullanılarak oluşturulan genetik uzaklık matrisinde, filogenetik analizlerde dendogram oluşturmada kullanılan dış grubun (*Polyodon spathula*) çalışılan türlere uzaklığı da verilmiştir. Elde edilen değerlere baktığımızda en düşük genetik uzaklık değerinin *A. baerii*/benzeri - *A. gueldenstaedtii* arasında olduğu tespit edilmiş (0,0163), en yüksek genetik uzaklık ise *A. stellatus* - *H. huso* arasında olduğu belirlenmiştir (0,2793) (Tablo 3.17).

Tablo 3.17. Kimura 2-parametresine göre Gamma düzeltmesi kullanılarak türler ve dış grup (*Polyodon spathula*) arasındaki genetik mesafe (gamma değeri: 0,05)

Türler	A	B	C	D	E
<i>A. gueldenstaedtii</i> (A)	-				
<i>A. stellatus</i> (B)	0,1722	-			
<i>H. huso</i> (C)	0,1782	0,2793	-		
<i>A.baerii</i> /benzer(D)	0,0163	0,1700	0,1259	-	
<i>P. spathula</i> (E)	4,3372	4,8568	4,6423	4,3696	-

Tür içi genetik mesafeler, türler arasında olduğu gibi Kimura 2-parametresine göre gamma düzeltilmeli ve düzeltilmesiz mesafeler MEGA (Kumar vd., 2004) programı yardımıyla hesaplanmıştır. Tür içinde en fazla genetik farklılık görülen tür 0,0042'lik değer ile *A. gueldenstaedtii* olmuştur. Bunu 0,0032'lik değer ile *A. stellatus* izlemiş ve en düşük tür içi genetik farklılık ise 0,0017 değer ile *H. huso* da görülmüştür (Tablo 3.18). Aynı şekilde her bir tür içerisinde oluşturulan çiftli karşılaştırmalar Tablo.3.20,21 ve 22'de verilmiştir.

Tablo 3.18. Tür içi (Kimura 2-P) mesafeleri (düzeltilmesiz ve gamma değeri 0,05'e göre)

Türler	Düzeltilmeli	Düzeltilmesiz
<i>A. gueldenstaedtii</i>	0,0042	0,0038
<i>A. stellatus</i>	0,0032	0,0030
<i>H. huso</i>	0,0017	0,0017
<i>A.baerii/benzer</i>	-	-

### 3.2.7.1. Gen Akışının Hesaplanması

Gen akışı ARLEQUIN 3.0 (Schneider vd., 2000) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışılan türlerde gen akışı her bir jenerasyon için 0,2165 – 0,0187 arasında değişim göstermektedir. Gen akışı *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii/benzer* türleri arasında en yüksek orana sahip iken (0,2165), *H. huso* - *A. stellatus* türleri arasında en düşük düzeyde (0,0187) olduğu bulunmuştur (Tablo 3.19).

Tablo 3.19. Türler arası gen akış oranı

	<i>A. gueldenstaedtii</i>	<i>A. stellatus</i>	<i>H. huso</i>	<i>A.baerii/benzer</i>
<i>A. gueldenstaedtii</i>	-			
<i>A. stellatus</i>	0,0360	-		
<i>H. huso</i>	0,0297	0,0187	-	
<i>A.baerii/benzer</i>	0,2165	0,0307	0,01912	-

Tablo 3.20. *A. gueldenstaedtii* türü örnekleri ve *Polyodon spathula* arası mesafeleri (K2P) (0,05 gamma düzeltmeli değer üste)

Örnek No	37	002	011	040	044	053	054	91	67	61	62	63	P. s
037		0.0059	0.0059	0.0040	0.0049	0.0000	0.0040	0.0000	0.0008	0.0059	0.0059	0.0040	4.6808
002	0.0063		0.0000	0.0032	0.0041	0.0059	0.0032	0.0059	0.0068	0.0000	0.0000	0.0032	5.5136
011	0.0063	0.0000		0.0032	0.0041	0.0059	0.0032	0.0059	0.0068	0.0000	0.0000	0.0032	5.5136
040	0.0045	0.0036	0.0036		0.0008	0.0040	0.0000	0.0040	0.0049	0.0032	0.0032	0.0000	5.1377
044	0.0054	0.0045	0.0045	0.0009		0.0049	0.0008	0.0049	0.0058	0.0041	0.0041	0.0008	5.3836
053	0.0000	0.0063	0.0063	0.0045	0.0054		0.0040	0.0000	0.0008	0.0059	0.0059	0.0040	4.6808
054	0.0045	0.0036	0.0036	0.0000	0.0009	0.0045		0.0040	0.0049	0.0032	0.0032	0.0000	5.1377
091	0.0000	0.0063	0.0063	0.0045	0.0054	0.0000	0.0045		0.0008	0.0059	0.0059	0.0040	4.6808
067	0.0009	0.0072	0.0072	0.0054	0.0063	0.0009	0.0054	0.0009		0.0068	0.0068	0.0049	4.9037
061	0.0063	0.0000	0.0000	0.0036	0.0045	0.0063	0.0036	0.0063	0.0072		0.0000	0.0032	5.5136
062	0.0063	0.0000	0.0000	0.0036	0.0045	0.0063	0.0036	0.0063	0.0072	0.0000		0.0032	5.5136
063	0.0045	0.0036	0.0036	0.0000	0.0009	0.0045	0.0000	0.0045	0.0054	0.0036	0.0036		5.1377
P. s	0.1503	0.1549	0.1549	0.1526	0.1538	0.1503	0.1526	0.1503	0.1515	0.1549	0.1549	0.1526	

Tablo 3.21. *A. stellatus* türü örnekleri ve *Polyodon spathula* arası mesafeleri (K2P) (0,05 düzeltmeli değer üste)

Örnek No	26	27	28	32	48	60	66	P. s
26		0.0010	0.0083	0.0029	0.0070	0.0060	0.0060	5,2569
27	0.0063		0.0009	0.0038	0.0018	0.0009	0.0009	5,9134
28	0.0072	0.0009		0.0049	0.0028	0.0019	0.0019	5,1986
32	0.0027	0.0036	0.0045		0.0038	0.0028	0.0028	5,0170
48	0.0063	0.0018	0.0027	0.0036		0.0009	0.0009	5,7784
60	0.0054	0.0009	0.0018	0.0027	0.0009		0.0000	5,6419
66	0.0054	0.0009	0.0018	0.0027	0.0009	0.0000		5,6419
p. s	0,1527	0,1562	0,1574	0,1516	0,1561	0,1550	0,1550	

Tablo 3.22. *H. huso* türü örnekleri ve *Polyodon spathula* arası mesafeleri (K2P) (0,05 gamma düzeltmeli değer üste)

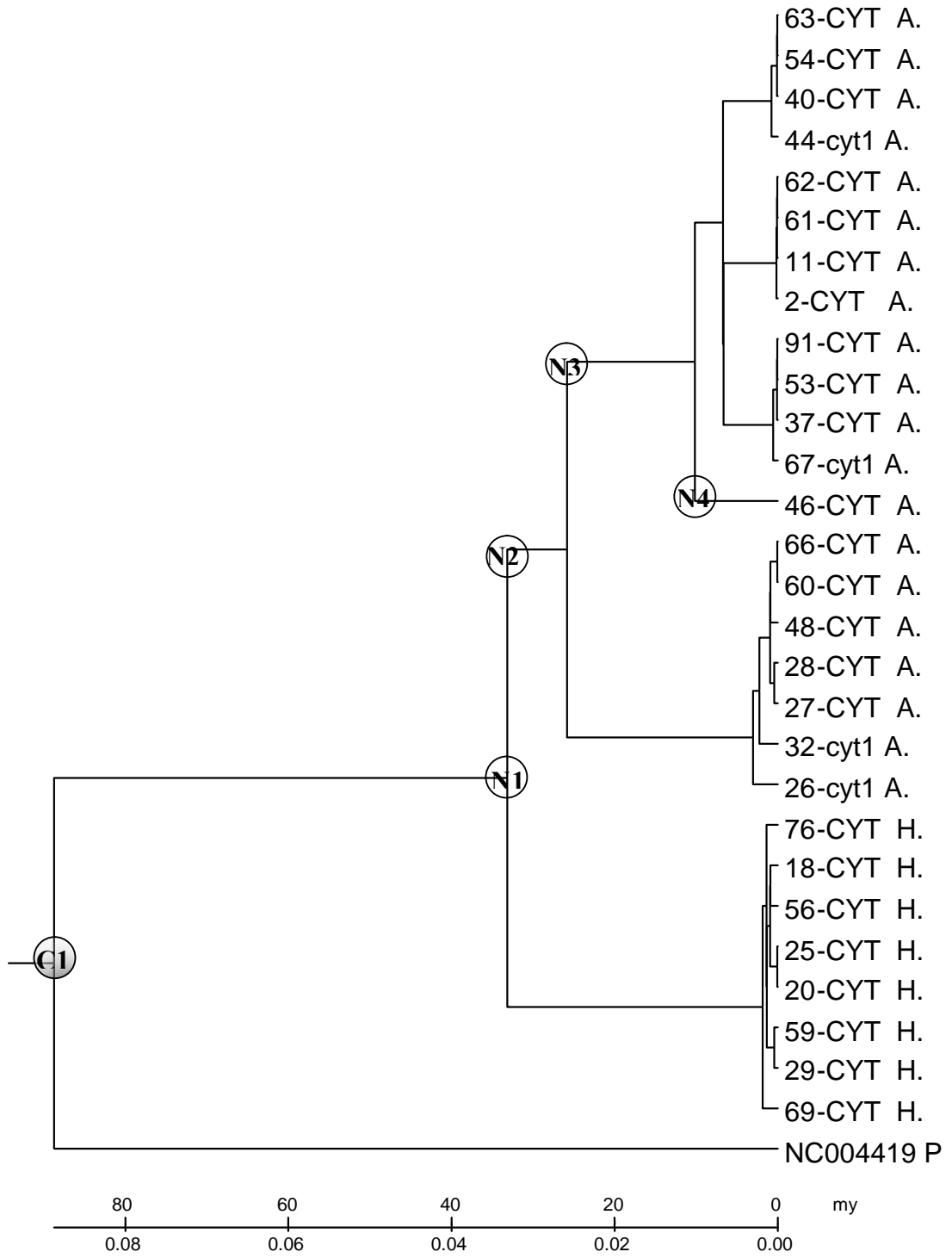
Örnek No	69	18	20	25	76	29	56	59	P. s
69		0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0029	0.0009	0.0019	4,7886
18	0.0018		0.0019	0.0019	0.0019	0.0029	0.0009	0.0019	5,2569
20	0.0018	0.0018		0.0000	0.0019	0.0029	0.0009	0.0019	4,7886
25	0.0018	0.0018	0.0000		0.0019	0.0029	0.0009	0.0019	4,7886
76	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018		0.0029	0.0009	0.0019	4,7886
29	0.0027	0.0027	0.0027	0.0027	0.0027		0.0019	0.0009	5,5089
56	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009	0.0009	0.0018		0.0009	5,0170
59	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0009	0.0009		5,2569
P. s	0,1504	0,1527	0,1504	0,1504	0,1504	0,1539	0,1516	0,1527	

### 3.2.8 Moleküler Saat

Moleküler saat uygulamasında farklılaşma zamanının hesaplanmasında ve maksimum olasılık dendogramının oluşturulmasında MEGA (Kumar vd., 2004) ve BIOEDIT (Hall, 1999) programları kullanılmıştır. Moleküler saat kalibrasyonun da dış grup olarak seçilen *P. spathula*'nın Acipenseridae türleri ile olan mesafesi ve bilinen fosil kayıtlarına dayalı ayrılma zamanı dikkate alınmıştır. Dış grup olarak kabul edilen *Polyodon spathula*'nın ayrılma zamanı 135-150 milyon yıl olduğu kabul edilmiştir (Birstein vd., 1998). Dış grup ile çalışılan diğer türler arasında görülen aminoasit değişim oranı ve bu türün ayrılma zamanından mutasyon oranı  $1,0317 \times 10^{-10}$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca aminoasit değişimi hesaba katılmadan gamma düzeltmeli ve düzeltmesiz mesafelerden dış grup kalibrasyonu ile farklı mutasyon oranları hesaplanmış ve türlerin ayrılma zamanları belirlenmiştir (Tablo 3.23). Hesaplanan ortalama mutasyon oranı ( $1 \times 10^{-9}$ ) ile oluşturulan ML dendogramın da türlerin ayrıldığı nodlar verilmiştir (Şekil 3.5).

Tablo 3.23. Farklı mutasyon hızları için hesaplanan türler arası ayrılma zamanları

Türler	Nodlar	Düzeltilmeli	Düzeltilmesiz	Ort
		$1,25 \times 10^{-8}$	$4,5 \times 10^{-10}$	
<i>P. spathula</i>	C1 (Kalibrasyon)	180,0	180,2	157
<i>H. huso</i>	N1	7,15	58,78	51,2
<i>A. stellatus</i>	N2	6,89	58,1	50,69
<i>A. baerii</i> /benzer	N3	0,65	0,5	0,5
<i>A. gueldenstaedtii</i>				



Şekil 3.5. Moleküler saat uygulamalı Maksimum Olasılık dendogramı

### 3.2.9. Evrimsel Hipotezlerin Test Edilmesi

#### 3.2.9.1 Tajima'nın Testi

DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) paket programı kullanılarak yapılan Tajima'nın nötralite testi sonucunda, *A. gueldenstaedtii* örnekleri için (n=12), belirlenen ayrılma yeri sayısı (S) ile örnek sayısının oranı (Ps) yüksek bulunmuştur. Bu türde bu yerler için belirlenen teta düzeltmesi ( $\theta$ ) ve nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ) değerlerinden hesaplanan Tajima'nın D değeri ise 1,119 olarak bulunmuş ve seleksiyon dışında bir etkinin önemsiz olduğu görülmüştür (P=0,896). Diğer türler için hesaplanan değerler Tablo 3.24'de verilmiştir.

Tablo 3.24. Tajima'nın Nötralite testi sonuçları

Türler	n	S	$p_s$ (S/n)	$\theta$	$\pi$	D	P
<i>A. gueldenstaedtii</i>	12	10	0,008985	0,002975	0,003784	1,119058	0,896
<i>H. huso</i>	8	6	0,005391	0,002079	0,001669	-0,920392	0,369
<i>A. stellatus</i>	7	9	0,008086	0,003301	0,002995	-0,492119	0,204
<i>A.baerii</i> /benzer	1	-	-	-	-	-	

#### 3.2.9.2. McDonald-Kreitman Testi

DnaSP 4.0 (Rozas ve Rozas, 1999) paket programı ile yapılan analiz sonucunda türler arasında elde edilen Nötralite indeksi en düşük 0,467'lik değer ile *A. gueldenstaedtii* - *H. huso* arasında, ve en yüksek indeks ise *A. stellatus* - *H. huso* arasında (7,000) hesaplanmıştır. Yine benzer şekilde G değerlerine bakıldığında en düşük 0,535'lik değer ile *A. gueldenstaedtii* - *H. huso* arasında ve en yüksek G değeri ise *A. stellatus* - *H. huso* arasındaki 4,048'lik değerdir. *A. stellatus* - *H. huso* arasındaki bu değer önemli görülse de (p<0,05) düzeltmeler ile birlikte değerlendirildiğinde kurulan hipotez ret edilmiş ve seleksiyonun dışında bir etkinin önemli olmadığı kabul edilmiştir (Tablo 3.25).

Tablo 3.25. McDonald-Kreitman Testi Tablosu

	<i>A. gueldenstaedtii</i> <i>A. stellatus</i>	<i>A. gueldenstaedtii</i> <i>H. huso</i>	<i>A. stellatus</i> <i>H. huso</i>	<i>A. gueldenstaedtii</i> <i>A.baerii/benzer</i>
<b>Sinonim ikameler (Substitutions)</b>				
Türler arası sabitleşmiş farklılıklar	46	42	56	8
Polimorfik yerler	16	15	12	10
<b>Sinonim olmayan ikameler</b>				
Türler arası sabitleşmiş farklılıklar	1	6	2	3
Polimorfik yerler	2	1	3	0
Neutralite İndeksi	5,750	0,467	7,000	0,000
Alfa değeri	-4,750	0,533	-6,000	1,000
Fisher's exact test. P-değeri	0,183310	0,669235	0,055544	0,214286
G testi G değeri	2,077	0,535	4.048	
P-değeri	0,14952	0,46444	0,04422*	
Williams' düzeltmesi ile G değeri	1,699	0,485	3,455	
P-değeri	0,19238	0,48638	0,06306	
G value with Yates' correction:	0,702	0,055	2,331	
P-value:	0,40202	0,81438	0,12679	
* 0.01<P<0.05; ** 0.001<P<0.01; *** P<0.001				



### 3.2.10. Filogenetik Analizler

#### 3.2.10.1. Model Seçimi

En uygun modelin belirlenmesi için PAUP ile birlikte Modeltest 3.7 (Posada ve Crandall, 1998) programı kullanılarak hem Akaike bilgi kriterleri (AIC), hem de Bayesian bilgi kriterlerine (BIC) göre 56 farklı model arasından TrN+G modeli seçilmiştir. TrN+G (Tamura ve Nei, 1993) (+ gamma (G,  $\Omega$ ) dağılımı ) modeli ikame durumunun iki tipi olan (T oranı,  $T_i/T_v$  ), eşit olmayan baz frekansları ve  $T_i/T_v$  oranı için serbest parametrelerle ilgilenmektedir. G değeri TrN modeli için ilave bir parametreyi (+G ) göstermektedir.  $T_i/T_v$  oranı, transisyon - transversiyon oranı;  $-\ln L$ , ağaç topolojinin maksimum olasılığını gösterir ve son olarak P, değişken olmayan yerlerin olasılığıdır. Seçilen TrN+G modeli kullanılarak çalışılan veri seti için tüm parametreler hesaplanmıştır (Tablo 3.26).

Tablo. 3.26 Veriler için hesaplanan TrN+G model parametreleri

Model	Baz Frekansı				-ln L	$T_i/T_v$	$\Omega$	P inv.
	A	C	G	T				
TrN+G	0,2733	0,3279	0,1402	0,2585	2634,2524	27,4749	0,0544	0

Not: TrN+G (Tamura, Nei, 1993)+ gamma dağılımı, K = 6, AIC = 5280,5049

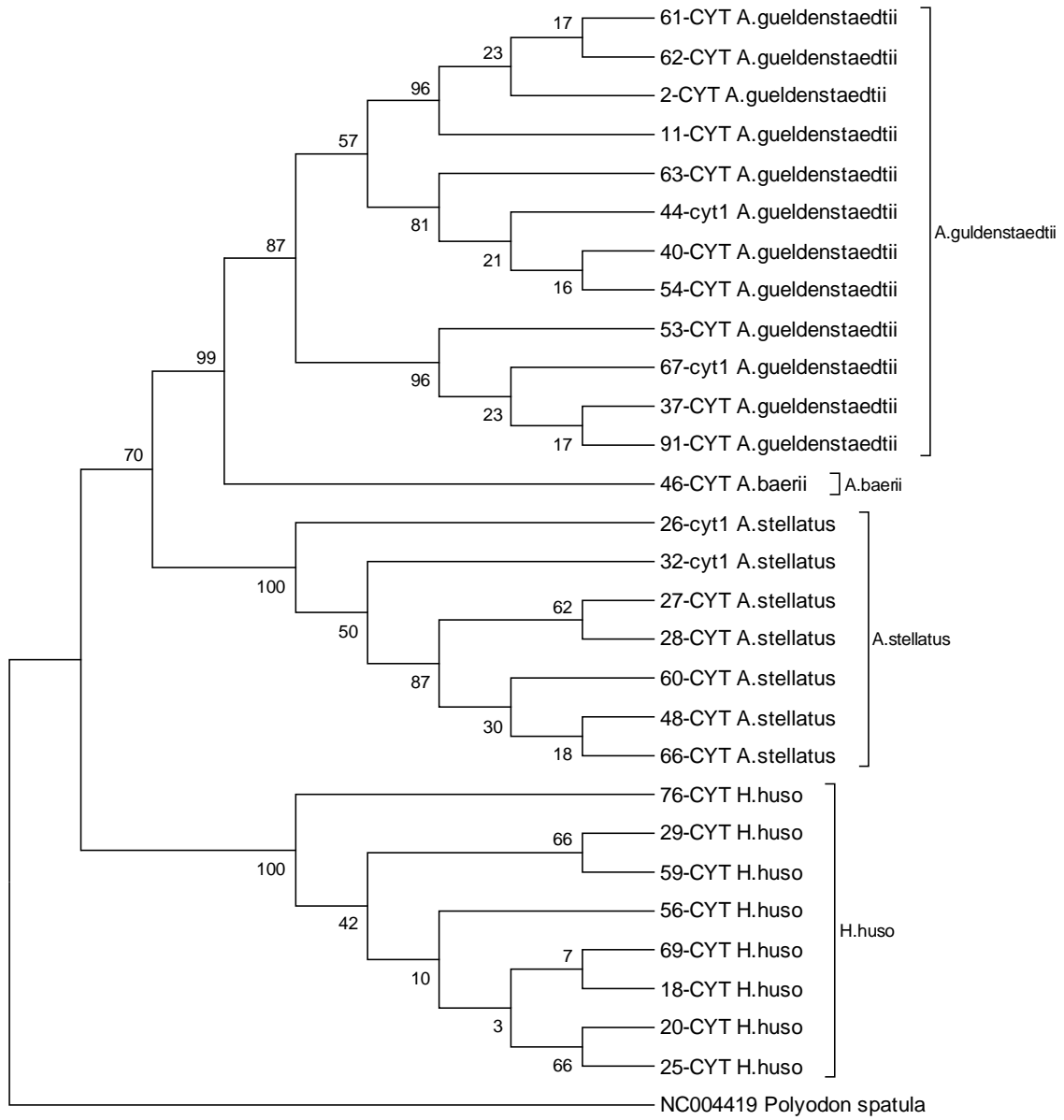
Hesaplanan gamma ( $\Omega$ ) değeri küçük bulunmuştur ve bu da değişim gözlenen yerlerin çoğunun çok yavaş değiştiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Transisyon / Transversiyon oranı (27,4749 ), transisyona doğru bir eğilimin olduğunu göstermektedir. PAUP programı kullanılarak sekanslarda, bazların herhangi birine doğru bir eğilim olup olmadığı kontrol edilmiştir. Diğer bir değişle baz frekanslarının sabitliğinin bozulması kontrol edilmiş ve bunun olmadığı görülmüştür ( $\chi^2 = 7$ , sd = 81 , P=1.00 ). Bu sonuca göre bireylerin baz frekansları arasında her hangi bir eğilim bulunmamaktadır. Bu parametrelerin hesaplanmasından sonra filogenetik ağacın oluşturulması aşamasına geçilmiştir.

### 3.2.10.2. Filogenetik Yapılanma

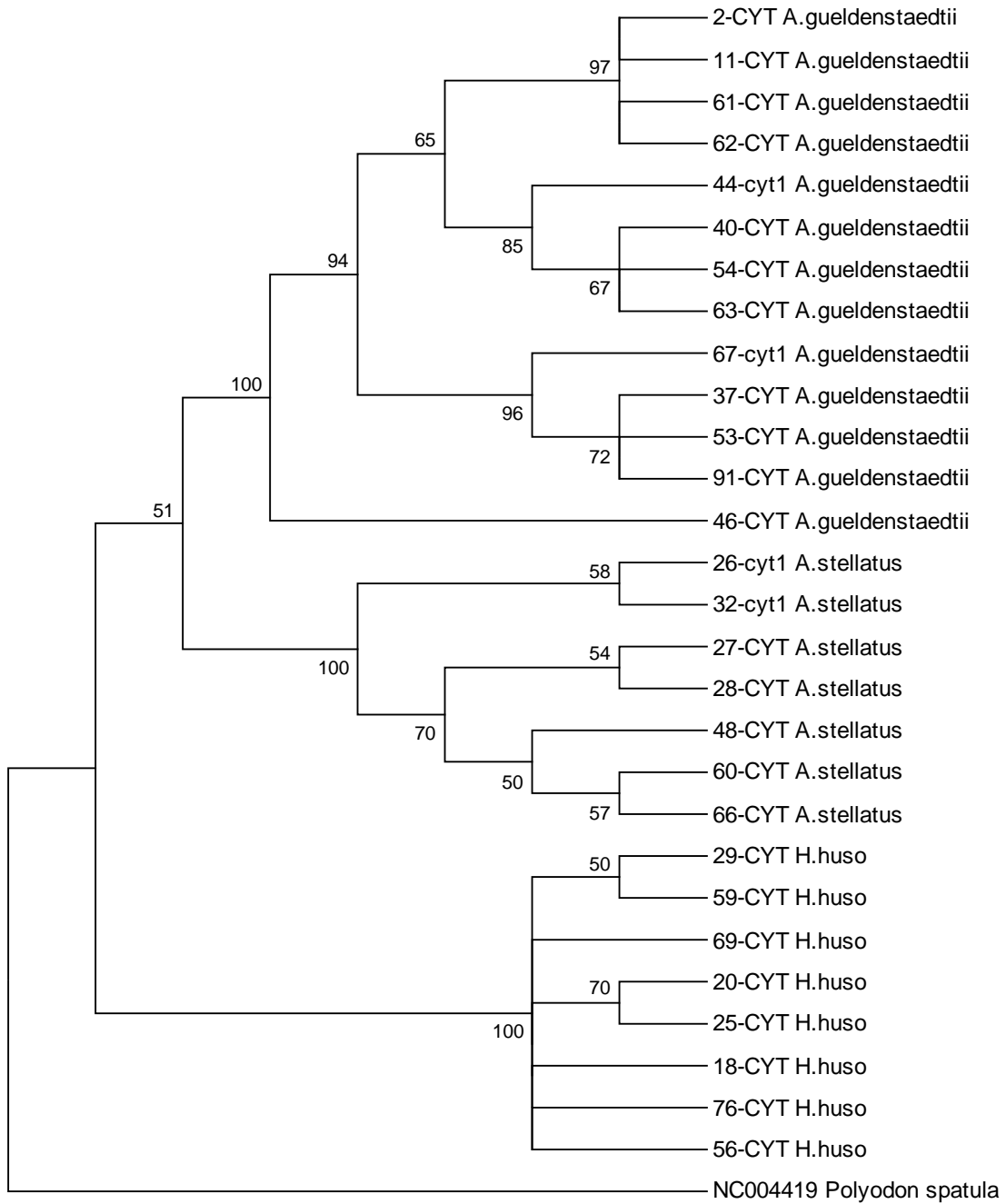
Filogenetik topolojilerin yapılandırılmasında hesaplanan gamma değeri MEGA (Kumar vd., 2004) programında kullanılarak her üç metot için ayrı ayrı uygulanmıştır. Gerek seç - bağla gerekse iç dal testi (interior branch test) yapılarak nodların tutarlılığı belirlenmiş ve seç - bağla değeri %50 den daha büyük nodlar görüntülenmiştir. Veri setinden yeniden örnekleme yöntemi ile 1000 kez ağaç oluşturulmuş ve tüm ağaçlar içerisinde ortak ağaçlar elde edilmiştir. Dendogramda ağaç içerisinde her bir kolunun üzerinde seç-bağla değerleri verilmiştir. Dış grup olarak *Polyodon spathula* kullanılmıştır.

Çalışılan tüm mersin örneklerine ait Cyt-b sekans verileri ilk olarak Maksimum parsimoni (MP) (Şekil 3.6), UPGMA (Şekil 3.7) ve Maksimum olasılık (ML) (Şekil 3.8) dendogramlarının yapılandırılmasında kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Karadeniz'den örneklenen mersin balığı türleri arasında açık bir farklılaşma olduğunu göstermektedir. Tüm dendogramlar için *Huso* ve *Acipenser* türleri birbirlerinden ayrılmışlardır. Ayrıca oluşturulan köksüz ağaca (MP) bakıldığında türlerin farklılaşması açık bir şekilde görülmüştür (Şekil 3.9).

Çok az değişiklikler hariç Bayesian analizi sonuçları ML sonuçlarıyla oldukça benzer bulunmuştur. Daha çok veri seti ile çalışıldığı durumlarda zaman tasarrufu açısından Bayesian analizinin kullanılabilir olduğu belirtilmiştir. Karadeniz'in Türkiye kıyılarından örneklenen 4 mersin balığı (*A. stellatus*, *H. huso* ve *A. gueldenstaedtii* ve *A.baerii*/benzer) türü bir birinden açık bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 3.8).



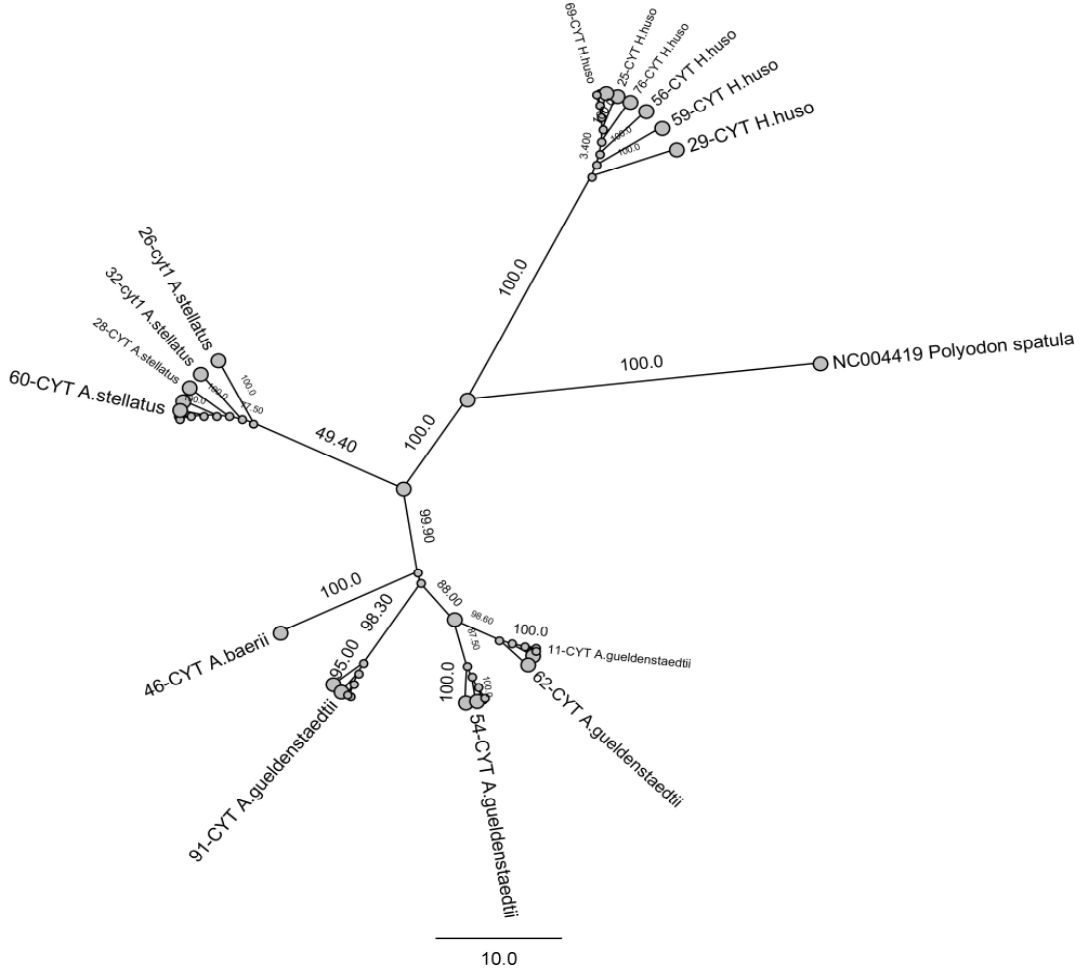
Şekil 3.6. Tüm örneklerin Cyt-b gen sekans verilerinden oluşturulmuş Maksimum parsimoni (MP) dendogramı



Şekil 3.7. Tüm örneklerin Cyt-b gen sekans verilerinden oluşturulmuş UPGMA Dendogramı (nodlar üzerindeki oranlarda %50 üzeri değerler kabul edilmiştir)



Şekil 3.8. Maksimum Olasılık metodu ile oluşturulmuş dendrogram

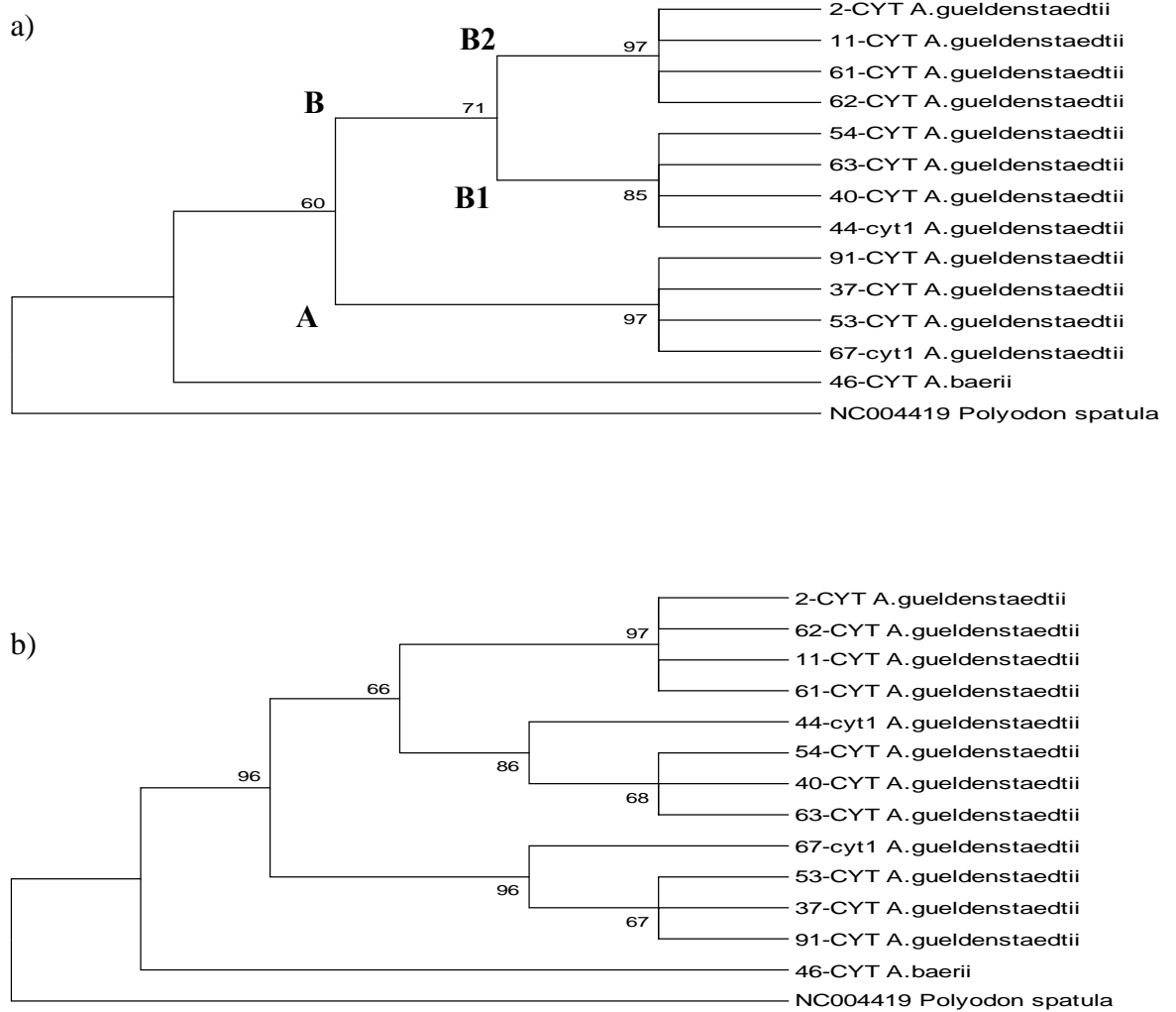


Şekil 3.9. Tüm örneklerin Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş köksüz dendrogram

*A. gueldenstaedtii* örnekleri için yapılan filogenetik analizler sonucunda oluşturulan MP ve UPGMA dendrogramların da bu türün % 60-96 gibi yüksek bir değerle A-B şeklinde iki farklı gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3.10). A grubu 37-53-67-91 no'lu örneklerden oluşurken B grubu ise kendi içerisinde B1 (2-11-61-62 no'lu örnekler) ve B2 (40-44-54-63) şeklinde ikiye ayrılmıştır. A grubu içinde yer alan örneklerden 37-67-91 no'lu örnekler Samsun'dan, 53 nolu örnek ise Giresun'dan örneklenmiştir. B grubu içerisindeki B1 grubu örneklerinden 2-11 no'lu örnekler kültür kökenli örneklerdir ve yine aynı grupta yer alan 61 ve 62 no'lu Samsun örnekleri ise kültür örneklerine yakın bulunmuştur. B2 grubu içerisinde yer alan 40-44-54 no'lu örnekler Giresun'dan ve 63 no'lu örnek ise Sakarya'dan örneklenmiştir. Bu örnekler gerek kendi içinde gerekse genbanktan alınan örneklerle

karşılaştırıldığında A grubu örneklerinin hem B grubunun 2 alt grubu B1 ve B2 den hem de genbank örneklerinden ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3.13).

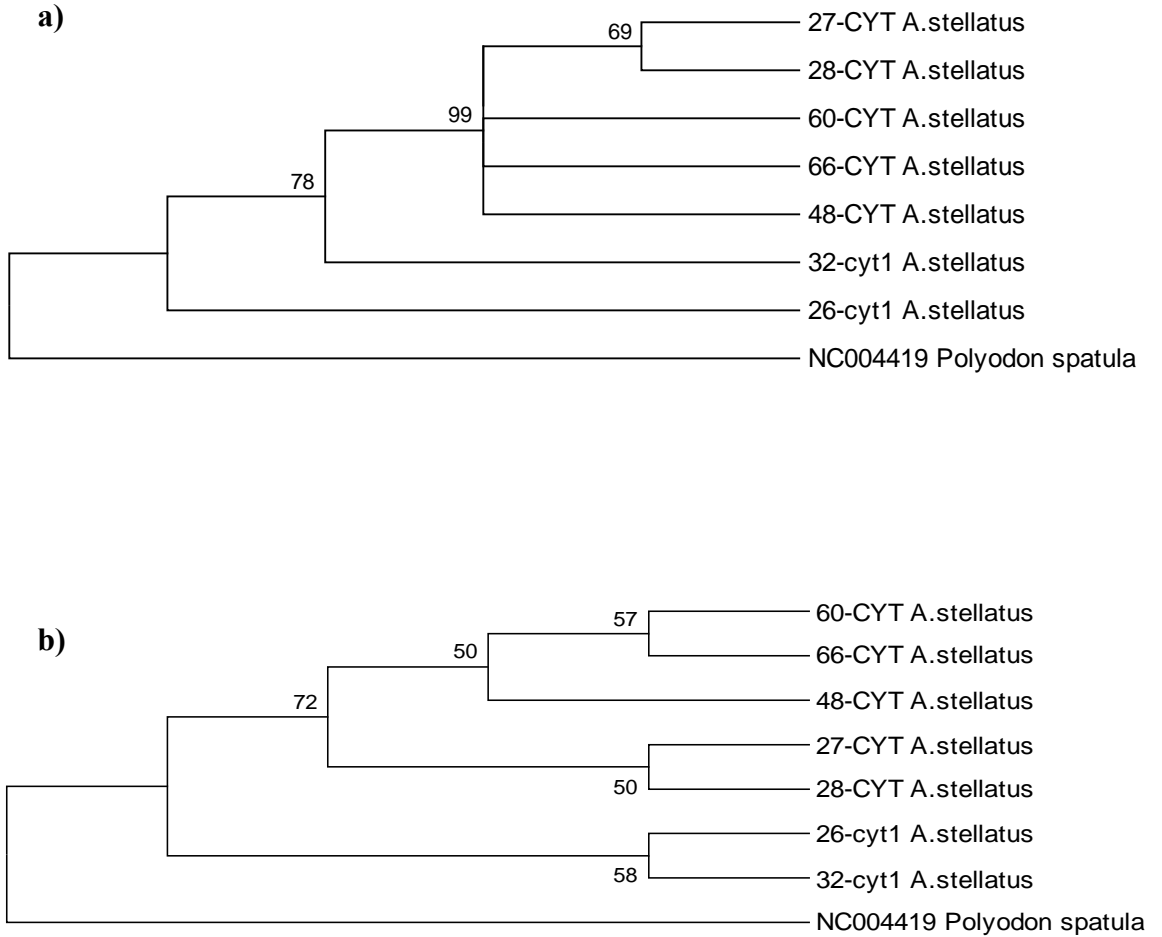
Örneklemelede *A. gueldenstaedtii* olarak belirtilen fakat sekans sonuçlarında *A.baerii*/benzere daha yakın bulunan 46 no'lu örnek *A. gueldenstaedtii* örneklerinden tamamen ayrıldığı görülmüştür.



Şekil 3.10. *A. gueldenstaedtii* örnekleri için Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş MP (a) ve UPGMA (b) dendrogramları (seç-bağla değeri > %50)

Benzer şekilde *A. stellatus* ve *H. huso* örnekleri için de MP ve UPGMA metotları kullanılarak tür içerisinde farklılaşan birimler (ESU) aranmış ve ağaçlar oluşturulmuştur.

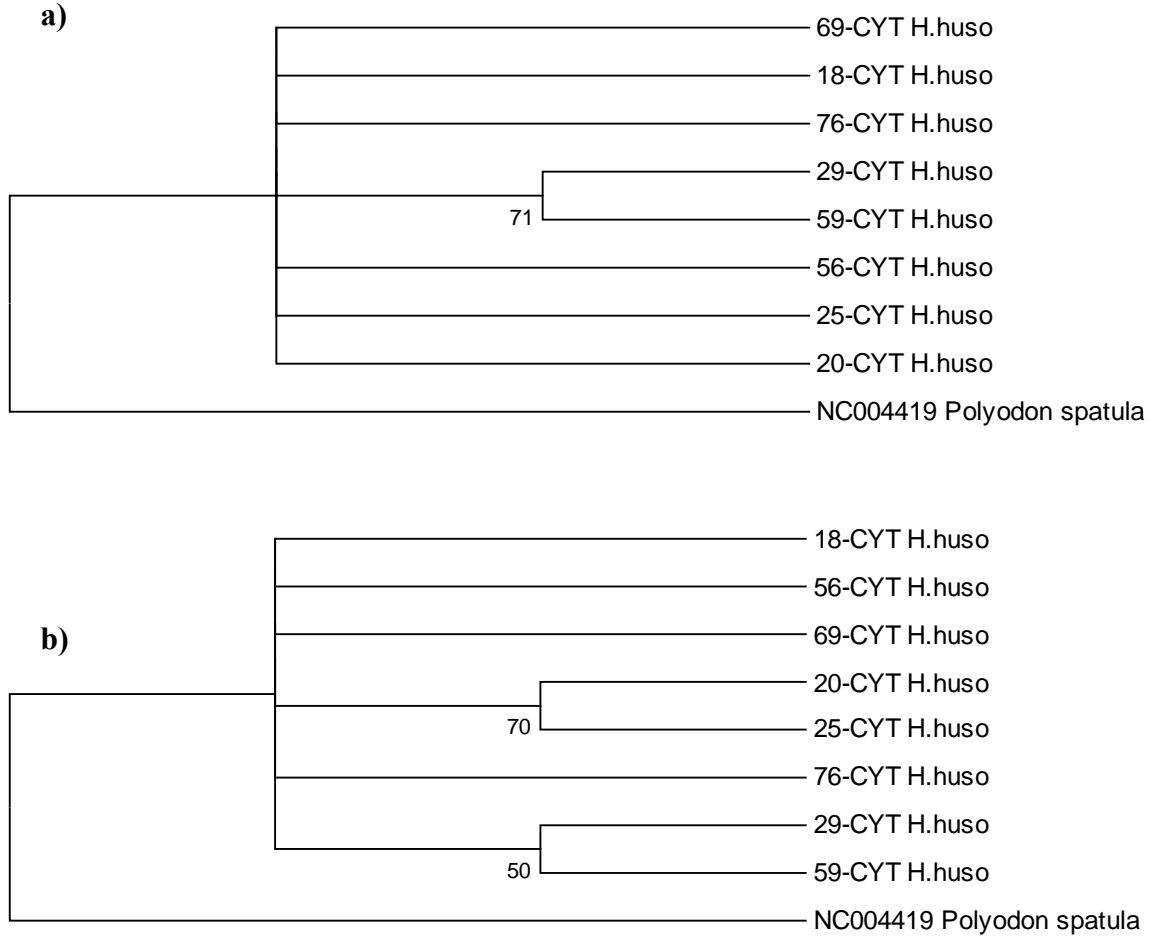
*A. stellatus* için MP dendogramına bakıldığında seç-bağla değerinin yalnızca 4 nod için % 50'nin üzerinde olduğu ve ayrıca 26 ve 32 no'lu örneklerin 27-28-48-60 ve 66 no'lu diğer örneklerden ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3.11.b). Oluşturulan UPGMA ağacına bakıldığında ise benzer şekilde gruplaşma gözlenmiş fakat 48 no'lu örnek NJ dendogramının aksine 60-66 nolu bireylere daha yakın yer almıştır (Şekil 3.11.a).



Şekil 3.11. *A.stellatus* örnekleri mt Cyt-b gen sekans verilerinden oluşturulmuş MP(a) ve UPGMA (b) dendogramları (seç-bağla değeri > %50)



*H. huso* için oluşturulan MP ağacına bakıldığında tür içersinde bir ayrılma görülmemektedir (Şekil 3.14). Benzer şekilde UPGMA dendogramında da 29-59 no'lu örnekler ile 20-25 no'lu örneklerin birbirlerine daha yakın olduğu fakat diğerlerinden ayrılmadığı görülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. *H. huso* örnekleri için Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş MP (a) ve UPGMA (b) dendogramı (seç-bağla değeri > %50).

Gen bankasından alınan örneklerin sekans verileri ile birlikte Türkiye kıyılarından örneklenen türlere ait veriler birlikte değerlendirilmiş, diğer mersin türleri ve Karadeniz-Hazar bölgesinde daha önce çalışılmış olan örneklerle göre mevcut durum ortaya konulmuştur (Şekil 3.13).



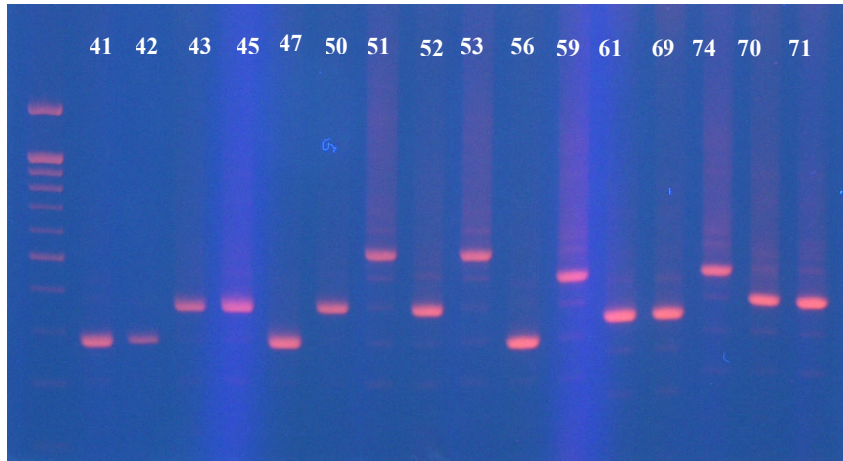
Şekil 3.13. Tüm örnekler ile genbanktan alınan mersin türlerine ait Cyt-b geni sekans verilerinden oluşturulmuş UPGMA dendrogramı

### 3.3. tRNA<sup>pro</sup> - Dloop Geni

#### 3.3.1. Heteroplazmi ve Boy Varyasyonu

Her bir tür içindeki boy varyasyonu ve heteroplazmi, tRNA<sup>pro</sup>- Dloop geni PZR ürününün agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra görüntülerin karşılaştırılması ile ortaya konulmuştur. Her bir tür içerisinde farklı ürün boyuna sahip homoplazmik bireyler sekansları alınmak üzere belirlenmiştir. Sekans verilerinin elde edilmesinden sonra tekrar motifleri ve bölgeleri belirlenmiş ve tüm türler için tekrar sayıları ve frekansları hesaplanmıştır. Boy varyasyonu ve heteroplazmi üç türe ait toplam 81 adet mersin balığında jel görüntülerinden tespit edilmiştir.

Toplam 46 adet *H. huso* örneği içerisinde boy varyasyonu ve heteroplazmi belirlenmiştir (Şekil 3.14). Bu örnekler içerisinde boy varyasyonuna bakıldığında 19 örnekte görülen 4 tekrarlı yapı en çok görülen morf olmuştur. En az tekrar sayısı 3 iken en fazla 6 tekrar tespit edilmiştir. *H. huso* içerisinde 1-2 ve 7 tekrarlı yapı görülmemiştir. *H. huso* türünde yalnızca bir bireyde (72 no'lu örnek) heteroplazmik yapı gözlenmiş ve heteroplazmi oranı % 2,17 ile tüm türler arasında en düşük olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak homoplazmi ise % 97,83 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.27). *H. huso* örnekleri için elektroforez jel görüntülerinden elde edilen her bir örnekte görülen heteroplazmi ve tekrar sayıları örnek numaraları ile birlikte gösterilerek Tablo 3.27'da verilmiştir.



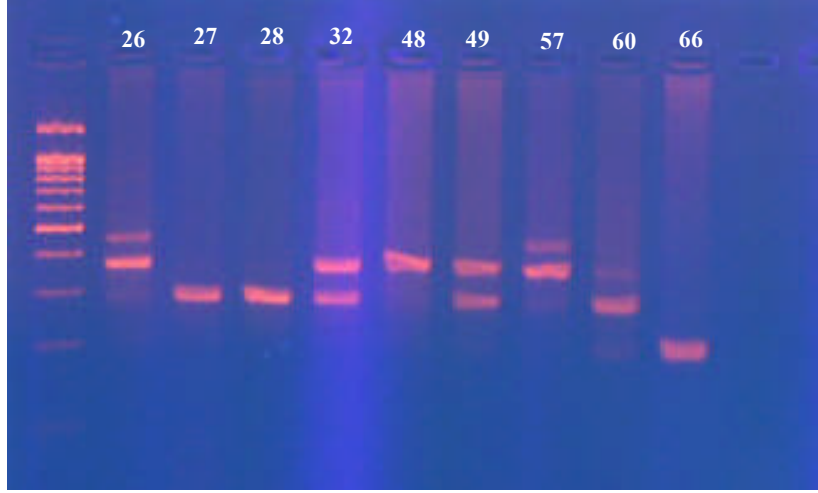
Şekil 3.14. Bazı *H. huso* örnekleri için görülen boy farklılığı (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci)

Tablo 3.27. Her bir tür için Dloop bölgesinde görülen tekrar sayıları ve heteroplazmi (örnek numaraları ile gösterilmiştir)

Türler	Tekrar Sayısı							HT	
	N	1	2	3	4	5	6		7
<i>H.huso</i>				9, 19, 21, 22, 25, 29, 30, 31, 38, 41, 42, 56, 65, *72, 75, 89	18, 20, 23, 24, 36, 43, 45, 50, 52, 70, 71, *72, 73, 76,83, 88, 82, 86 92	59, 69, 74, 78, 79	39, 35, 51, 53 77, 47		72
TOPLAM	46		0	16	19	5	6		1 (% 2,17)
<i>A.stellatus</i>			66	27, 28, 60	*32,*49,	*26,*32, 48 *49, *57, *90	*26, *57, 80, *90		26, 32, 49, 57, 90
TOPLAM	11		1	3	2	6	4		5 (% 45,45)
<i>A.gueldenst aedtii</i>	24		84 54	2, 5, 10, 13, 14, 37, 40, 44, 53, 61, 63, *64, 87	3, 4, 6, 8, 11, 58, 62, *64, *67, 81,	*67 91			64, 67
TOPLAM			2	13	10	2			2 (% 8,33)

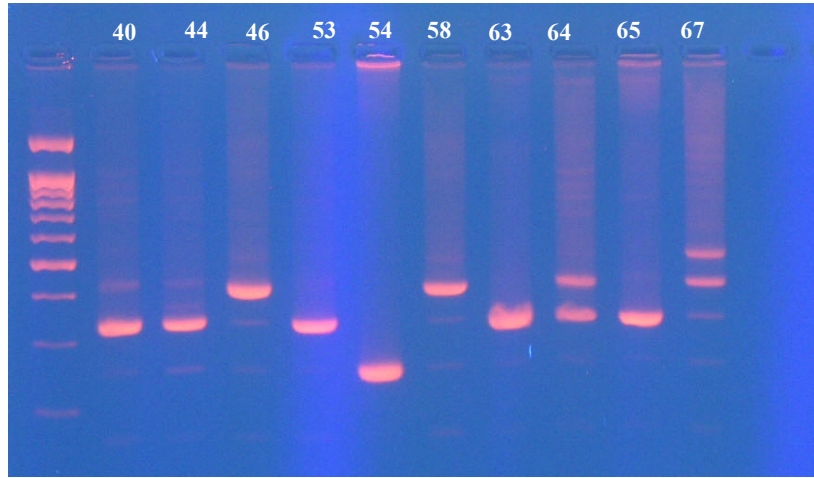
\*Heteroplazmik bireyler

Toplam 11 adet *A. stellatus* örneği içerisinde boy varyasyonu ve heteroplazmi belirlenmiştir (Şekil 3.15). Bu örnekler içinden 6 örnekte görülen 5 tekrarlı yapı en çok görülen morf olmuştur. En az tekrar sayısı 2 iken en fazla 6 tekrar tespit edilmiştir. Heteroplazmik birey sayısı 5 (26, 32, 49, 57 ve 90 no'lu örnekler) olarak gözlenmiştir. Heteroplazmi oranı % 45,45 ile en yüksek oranda bu türde görülmüştür. Buna bağlı olarak homoplazmi ise % 54,55 olmuştur (Tablo 3.27). *A. stellatus* örnekleri için elektroforez jel görüntülerinden elde edilen ve her bir örnekte görülen heteroplazmi ve tekrar sayıları örnek numaraları ile birlik de Tablo 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.15. Bazı *A. stellatus* örnekleri için görülen boy farklılığı ve Heteroplazmi (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci)

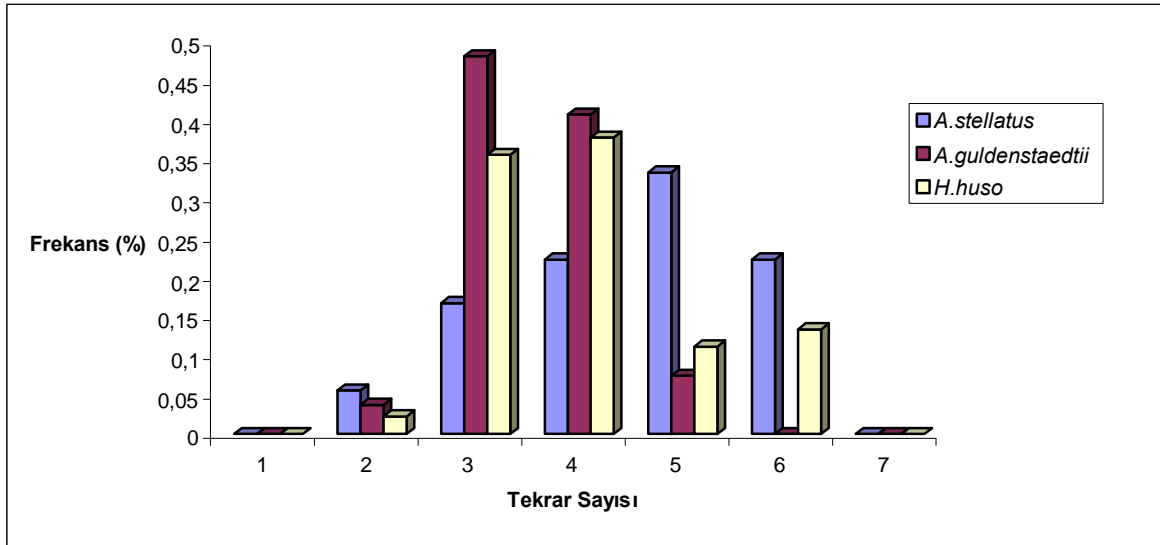
Toplam 24 adet *A. gueldenstaedtii* örneği içerisinde boy varyasyonu ve heteroplazmi belirlenmiştir (Şekil 3.16). Bu örnekler içinden 13 örnek de 3 tekrarlı yapı en çok görülen morf olmuştur. En az tekrar sayısı 2 iken en fazla 5 tekrar tespit edilmiştir. Heteroplazmik birey sayısı 2 (64 ve 67 nolu örnekler) olarak gözlenmiştir. Heteroplazmi oranı % 8,33 olarak belirlenmiştir. Buna bağlı olarak homoplazmi ise % 91,77 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 3.27). *A. gueldenstaedtii* örnekleri için elektroforez jel görüntülerinden elde edilen ve her bir örnekte görülen heteroplazmi ve tekrar sayıları örnek numaraları ile birlik de Tablo 3.27’de verilmiştir.



Şekil 3.16. Bazı *A. gueldenstaedtii* örnekleri için görülen boy farklılığı ve Heteroplazmi (1. kolon 100 bp DNA boy belirteci)

Türler arasındaki boy varyasyonuna baktığımızda türlerde görülen tekrar sayılarının frekanslarına ait grafik Şekil 3.17’de verilmiştir. En büyük  $K_b$  değeri 0,156 ile *A. stellatus*’da görülürken, *A. gueldenstaedtii* için 0,0385 ve *H. huso* için ise 0,0085 olarak hesaplanmıştır.  $G_{ip}$  değerleri ise  $K_b$  değerlerinin tersine en düşük *A. stellatus*’da 0,656, *A. gueldenstaedtii*’de 0,9303 ve en büyük değer ise *H. huso* da 0,9871 olarak bulunmuştur (Tablo 3.28).

Tüm türlerde heteroplazmik bireyler görülmüştür. Ayrıca tüm türler için ortalama boy varyasyonunun dağılım oranı sırasıyla, 2 tekrar % 3,7, 3 tekrar % 39,5, 4 tekrar % 38, 5 tekrar % 16 ve 6 tekrar % 12,3 oranında görülmüş ve en çok görülen 3 tekrarlı yapı olmuştur. Çalışılan türlerde 1 ve 7 tekrarlı yapı görülmemiştir.



Şekil 3.17. Her üç tür için görülen tekrar sayısı ve frekansı

Tablo 3.28. Görülen boy farklılığı, tekrar sayıları ve boy varyasyonu

Türler	N	Tekrar Sayısı							$K_b$	$K_c$	$G_{ip}$
		1	2	3	4	5	6	7			
<i>A. stellatus</i>	11	0	0,091	0,273	0,180	0,550	0,360	0	0,156	0,454	0,656
<i>A. gueldenstaedtii</i>	24	0	0,083	0,542	0,375	0,083	0	0	0,0385	0,5521	0,9303
<i>H. huso</i>	46	0	0	0,348	0,435	0,109	0,130	0	0,0085	0,6612	0,9871
TOPLAM	81	0	0,037	0,395	0,382	0,160	0,123	0			

### 3.3.2. Sekans Analizi

Homoplazmik bireyler içerisinde seçilen farklı ürün boyuna sahip örnekler için 100 µl'lik PZR ürünü elde edilerek bu ürünler agaroz jel elektroforez görüntülenerek kalite ve kantitesi belirlenerek saflaştırma öncesi kontrolleri yapılmıştır. Saflaştırma sonrasında 50 µl'ye sulandırılan saf DNA yine benzer şekilde agaroz jel üzerinde 1 µl koşturularak pürifikasyon işleminin etkinliği ve elde edilen saf DNA parçasının yoğunluğuna bakılmıştır. Elde edilen saf tRNA<sup>pro</sup>- D-loop bölgesi PZR ürünü her iki primer kullanılarak çift yönlü kısmi sekansları alınmıştır.

*A. gueldenstaedtii* (8), *A. stellatus* (4) ve *H. huso* (7) olmak üzere 3 farklı türe ait toplam 19 örnekten D-loop gen bölgesinin kısmi sekansı ileri ve geri olarak çift yönlü alınmıştır. Her bir yönde okunan yaklaşık 250-600 bp'lik sekanslar üst üste getirilerek 250-600 bp toplam uzunlukta (primer yerleri çıkarıldı) ortak sekans elde edilmiştir. Daha sonraki aşamada elde edilen sekans sonucu, sekanslar arası lokal benzerlik bölgelerini bulmak, uluslararası veri tabanındaki sekanslarla karşılaştırma yapmak, ayrıca çalışılan genin ait olduğu türleri için BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapılmıştır.

tRNA<sup>pro</sup>-D-loop sekansından tRNA<sup>pro</sup> gen bölgesinin sekansı belirlenerek birinci TAS (Termination Associated Sequence) bölgesi belirlenmiş ve kontrol bölgesi ile tRNA<sup>pro</sup> birbirinden ayrılmıştır. D-loop bölgesinin sonuna yakın tekrar bölgesi, boy varyasyonu ve heteroplazmiden sorumlu olduğu görülmüştür. Kontrol bölgesi tRNA<sup>pro</sup> dan birkaç nükleotid ile ayrılmaktadır. Bu tekrarlar sürekli olarak D-loop iplikçığı uç kısmı ile ilgili sekanslara (TAS) sahiptirler. TAS benzeri blok tRNA<sup>pro</sup> içerisinde belirleyici olabilir. Tekrar bölgelerinin merkezi tekrarları dikkate alınarak tekrar eden baz dizimleri belirlenmiştir. Buna göre her tür için tekrar eden baz büyüklüğü 82 bp olarak bulunmuştur. *H. huso* ve *A. stellatus* için yüksek oranda benzerlik gösterirken *A. gueldenstaedtii* için bu tekrar bölgesi sekansları değişiklik göstermektedir (Tablo 3.29-31).

1	RC ( Merkezi Tekrar )	( TAS) 82
<i>H. huso</i>	<u>ATTCAAGTACATAAGACATGCTATGATATAATCCACATTAATTTCTAGCCACCATACCACAAG-TGTTTACATATACATTAA</u>	
<i>A. stell</i>	<u>ATTCAAGTACATAAGACATGCTATGTT-TAATCCACATTAATTTCTAGCCACCATAAATTAGAATGTTTGACCTACATTAA</u>	
<i>A. guldu</i>	<u>GTTTAAGTACATAAGGCATACTATGTT-TAATCCACATTAATTTCTAGCCACCATATCATAA--TGTTTGTATGTACATTAA</u>	





Tablo 29'un devamı

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
25-DLOOP H	ACCATA--	CCATAATGTTT	-----									
56-DLOOP H	ACCATA--	CCATAATGTTT	-----									
29-DLOOP H	ACCATA--	CCATAATGTTT	-----									
54-DLOOP H	ACCATA--	CCACAATGTTT	-----									
20-DLOOP H	ACCATA--	CCACAATGTTT	TACATATA	CATTAAAT	TATTCAGG	TACATA	AAGACAT	GCTATGT	TATAAT	CCACAT	TAAATTT	C-----
59-DLOOP H	ACCATA--	CCATAATGTTT	TACATATA	CATTAAAT	TATTCAGG	TACATA	AAGACAT	GCTATGT	TATAAT	CCACAT	TAAATTT	CCTAGCC
69-DLOOP H	ACCATA--	CCATAATGTTT	TACATATA	CATTAAAT	TATTCAGG	TACATA	AAGACAT	GCTATGT	TATAAT	CCACAT	TAGTTT	CCTAGCC
	410	420	430	440	450	460						
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
25-DLOOP H	-----											
56-DLOOP H	-----											
29-DLOOP H	-----											
54-DLOOP H	-----											
20-DLOOP H	-----											
59-DLOOP H	TACATATA	CATTAAAT	TATTCAGG	TACATA	AAGACAT	GCTATGT	TATAAT	CCACAT	TAAATTT	C-----		
69-DLOOP H	TACATATA	CATTAAAT	TATTCAGG	TACATA	AAGACAT	GCGATGT	TATAAT	CCACAT	TAGTTT	C-----		





Tablo 31. *A. stellatus*'da tRNA<sup>pro</sup>-Dloop bölgesinde görülen tekrar bölgeleri ve TAS motifler

	tRNA-pro										TAS																									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																
66-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TACCC	TAACT	-CCCAA	AGCTA	AGATT	CTACAT	TAAACT	ATTCT	CTGACC	ATGCGT	ATGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----														
27-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TACCC	TAAAC	-TCCAA	AGCTA	AGATT	CTACAT	TAAACT	ATTCT	CTGACC	ATGCGT	ATGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----														
28-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TACCC	TAAAC	-TCCAA	AGCTA	AGATT	CTACAT	TAAACT	ATTCT	CTGACC	ATGCGT	ATGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----														
60-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TACCC	TAACT	-CCCAA	AGCTA	AGATT	CTACAT	TAAACT	TTTTCT	CTGACC	ATGCGT	ATGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----														
	CR																																			
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																
66-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	TAAAT	CCACAT	TAAAT	TTCTAG	CCACC	AACATA	AATG	CTTGC	ACATAC	ATAAT	TATTT	CAAGT	ACATA	AAGAC	ATGCT	ATGTT	-TAAT	CCA																
27-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	TAAAT	CCACAT	TAAAT	TTCTAG	CCACC	AACATA	AATG	CTTGC	ACATAC	ATAAT	TATTT	CAAGT	ACATA	AAGAC	ATGCT	ATGTT	-TAAT	CCA																
28-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	TAAAT	CCACAT	TAAAT	TTCTAG	CCACC	AACATA	AATG	CTTGC	ACATAC	ATAAT	TATTT	CAAGT	ACATA	AAGAC	ATGCT	ATGTT	-TAAT	CCA																
60-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	TAAAT	CCACAT	TAAAT	TTCCAG	CCACC	AACATA	AATG	CTCGC	ACATAC	ATAAT	TATTT	CAAGT	ACATA	AAGAC	ATGCT	ATGTT	-TAAT	CCA																
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																
66-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	CATTA	AATTT	CTAGC	CACC	ATAA	ATTAG	AATG	TTTGC	ACCT	ACAT	TAAAT	TAG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----															
27-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	CATTA	AATTT	CTAGC	CACC	ATAA	ATTA	AATG	CTTGC	ACAT	ACAT	TAAAT	TAG	TTAGG	TAC	ATA	AAG	AC	ATG	CC	TAT	GTT	TAA	TCC	AC	AT	TAA	TTT	CT	AG	CC					
28-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	CATTA	AATTT	CTAGC	CACC	ATAA	ATTA	AATG	CTTGC	ACAT	ACAT	TAAAT	TAG	TTAAG	TAC	ATA	AAG	AC	ATG	CC	TAT	GTT	TAA	TCC	AC	AT	TAA	TTT	CT	AG	CC					
60-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	CATTA	AATTT	CCAG	CCACC	ATAA	ATTA	AATG	CGCG	CAC	ATGC	AT	TAAAT	TAG	TTAAG	TAC	ATA	AAG	AC	ATG	CC	TAT	GTT	TAA	TCC	AC	AT	TAA	TTT	CC	AG	CC				
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400																
66-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----															
27-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ACC	ATAA	AAT	TAA	AAT	GTTT	CAT	CTAG	CGT	CAA	AT	GAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
28-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ACC	ATAA	AAT	TAA	AAT	GTTT	CAT	CTAC	CGT	CAA	AT	GAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
60-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ACC	ATAA	AAT	TAA	AAT	GTTT	CAT	CTACA	AT	CAA	AT	GAT	TTAAG	TAC	ATA	AAG	ACC	ATG	CT	AT	GTT	TAA	TCC	AC	AT	TAA	TTT	CC	AG	CC	ACC	ATA	AAT	TAG	AA
	410	420	430	440	450	460	410	420	430	440	450	460																								
66-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----																								
27-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----																								
28-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----																								
60-DLOOP A	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	TG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----																								

#### 4. TARTIŞMA

Karadeniz’de Avrasya türleri olan *Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus* ve *Huso huso* türleri ile birlikte diğer mersin balığı türleri üzerine yapılan filogenetik ve popülasyon genetiği çalışmaları bulunmaktadır (Ludwig vd., 2000,2001; Bristein vd., 1998a,b, 2005; Tranah vd., 2001; Wolf vd., 1999; Doukakis, 2000; Jennecknes vd., 2000; Stabile vd., 1996; Waldman vd., 1996, Wirgin vd., 2000; Brown vd., 1992). Fakat Türkiye’de mersin balıkları üzerine gerek moleküler gerekse morfometrik analizlere dayalı hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Türkiye’nin Karadeniz kıyılarından örnekleme yapılarak mtDNA Cyt-b ve tRNA<sup>Pro</sup>-Dloop gen bölgesi sekans analizi yapılarak hem kendi içerisinde hem de diğer çalışmalar ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

Türkiye’nin Karadeniz kıyılarından 7 farklı ilden örneklenen toplam 82 adet örnekten 12 adet *A. gueldenstaedtii*, 1 adet *A. baerii*/benzer, 7 adet *A. stellatus* ve 8 adet *H. huso* olmak üzere 4 farklı türe ait 28 örnek için her iki primer kullanılarak (ileri ve geri) çift yönlü Cyt-b gen bölgesinin sekansı alınmış ve analizleri yapılmıştır. Ayrıca 81 adet örneğin tümünde Dloop gen bölgesi için boy varyasyonu ve heteroplazmi çalışılmıştır.

##### 4.1. Haplotiplerin Dağılımı ve Haplotip Çeşitliliği

Tüm örneklerin Cyt-b sekans verileri kullanılarak 100 bp’lik 19 adet haplotip elde edilmiştir. Her bir tür içerisinde görülen haplotip sayısı 1 ile 7 arasında değişim gösterirken her bir tür için görülen ortalama haplotip sayısı 4,7 olarak gerçekleşmiştir. *A. gueldenstaedtii*’de 5, *A.baerii*/benzer’de 1, *A. stellatus*’da 6 ve *H. huso*’da 7 adet haplotip görülmüştür. Örnekler arasında en sık görülen haplotipler *A. gueldenstaedtii* içerisinde görülmüştür, dolayısıyla bu türün haplotip çeşitliliği düşük olmuştur. Örnek sayısına bağlı olarak haplotip sayısı ve frekansları değişim gösterebilmektedir. Bir türde görülen haplotip diğer bir türde görülmemiştir. Diğer bir ifade ile türlerin paylaştığı ortak haplotipler bulunmamıştır.

Jennecknes vd. (2000), Volga Nehrinden yakalanan ve morfolojik olarak *A. gueldenstaedtii* olarak sınıflandırılan örneklerinde, mtDNA Cyt-b geninin sekans analizi verilerinden filogenetik analiz yapmışlar ve bu bireylerin 11 tanesinin *A.baerii* olduğunu

tespit etmişlerdir. Tüm örnekler içerisinde 7 haplotip belirlenmiş ve bunlardan 3 haplotipin *A.baerii* 'ye ait olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında Azak Denizi yada Hazar Denizinin güneyinde *A. gueldenstaedtii* örneklerinde *A.baerii*/benzer haplotipine rastlamamışlardır. *A. gueldenstaedtii* ile *A. baerii* yada *A. baerii* hibritleri arasında genetik kontaminasyonu olabileceğini vurgulanmıştır. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada Jennecknes vd. (2000)'nin Volga nehrinde elde ettiği sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiş ve Karadeniz'den örneklenen ve morfolojik olarak *A. gueldenstaedtii* olarak sınıflandırılan örnekler içerisinde 1 adet *A. baerii*/benzer haplotipi (Hap\_6) görülmüştür. Bunun en olası nedeninin kültür ortamından bırakılan veya kaçan balıklar olabileceği düşünülmüştür. Yine benzer şekilde Voynova (2008) yapmış olduğu çalışmada Azak Denizi'nden örneklenen *A. gueldenstaedtii* türü örnekleri içerisinde *A.baerii*/benzeri mitotipler bildirmiştir. Bu örnekler ise yavrulardan oluşmaktadır, bunun nedenini ise yazar 2003-2004 yıllarında yapılan balıklandırmayla ilişkilendirmektedir. Bu çalışmalardan farklı olarak Doukakis (2000)'in Avrasya türleri üzerine yaptığı çalışmada türlerin ortak haplotiplere sahip olduğunu ve bu nedenle bu türler arasında hibrit bireylerin olabileceğini belirtmiştir. *A. gueldenstaedtii* ve *A. baerii* tür içinde en büyük sayıda özel haplotipe sahip türler iken *A. stellatus* ve *H. huso*'nun birçok haplotipi ortak paylaştıkları belirlenmiştir. Yürütülen bu çalışmada Karadeniz örnekleri içerisinde görülen *A. baerii*/benzeri haplotipinin (Hap\_6) bu türemi yada hibrit bir bireye mi ait olduğuna karar verilebilmesi için yürütülen bu çalışma yeterli değildir. Daha fazla örnekleme ile birlikte *A.baerii*/benzeri örneğinin detaylandırılması gerekmektedir. Özellikle çekirdek DNA üzerinden farklı belirteçler kullanılarak yapılacak çalışmalarla açıklığa kavuşacaktır.

Yürütülen bu çalışmada her 3 tür için % 81,8 - 96,4 arasında yüksek haplotip çeşitliliği gözlenmiştir. Türler için haplotip çeşitliliği *A. gueldenstaedtii* % 81,8, *A. stellatus* % 95,2 ve *H. huso* için % 96,4 olarak hesaplanmıştır. Örnek sayıları ile haplotip çeşitliliği karşılaştırıldığında en fazla örneğe sahip *A. gueldenstaedtii* (13 örnek) de haplotip çeşitliliği en düşük düzeyde gerçekleşirken *A. stellatus* ve *H. huso* (7 - 8 örnek) için yakın değerler bulunmuştur. *A. baerii*/benzeri örneği 1 adet olduğu için değerlendirmelere katılmamıştır. Çalışılan türler için örnek sayısı yetersizdir, ilave örnekleme ile gözlenen haplotip çeşitliliğinin değişebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte metot ve çalışılan genin özelliği de bu oranı etkileyebilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen değerler yapılan benzer çalışmalar tarafından desteklenmektedir. Şöyle ki haplotip çeşitliliği diğer kemikli balıklarda % 80 nin üzerinde bulunmaktadır (Grant ve

Bowen, 1998). Mersin balıkları ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Nitekim *A. oxyrinchus* popülasyonu için haplotip çeşitliliğinin %90'lara kadar ulaştığı tespit edilmiştir (Stabile vd., 1996; Waldman vd., 1996; Wirgin vd., 2000).

Doukakis vd. (2005), *A. stellatus*'da haplotip çeşitliliğini D-loop bölgesi sekans verilerinden, farklı popülasyonlar için >%98 olarak bulmuştur. Yine farklı popülasyonlardan *A. gueldenstaedtii* örnekleri için bu değeri en düşük % 73 en yüksek ise % 100 olarak hesaplamıştır. *H. huso* için ise yine yüksek değerler belirlenmiştir (>% 98). Başka bir çalışmada Doukakis (2000), *A. baerii* için çok az örnekle çalışmış ve düşük haplotip çeşitliliğine (%18,18) sahip olduğunu belirtmiştir.

Brown vd. (1992b), *A. transmontanus*'da mtDNA RFLP çalışmaları ile haplotip çeşitliliğini %70'in üzerinde bulmuştur. Grunwald vd. (2002), Dloop bölgesi için *A. brevirostrum* da haplotip çeşitliliğini %64,1 - 81,7 arasında hesaplamıştır. Zhang vd. (2003), Çin mersini *A. sinensis* ile yaptığı çalışmada Dloop sekans verilerinden haplotip çeşitliliğini % 94,4 olarak tespit etmiştir.

## 4.2. Nükleotit Verileri

### 4.2.1 Nükleotit Dağılımı

Farklı araştırmacılar tarafından Cyt-b (% 53-57 ) ve D-loop (% 70-80) bölgelerinin yüksek A+T değerine sahip oldukları (Apostolidis vd., 1997) ve kontrol bölgesi için %68'lik A+T oranının genel bir değer olduğu belirtilmiştir (Meyer, 1993; Jerry ve Baverstock, 1998). Bizim çalışmamızda A+T oranları *A. stellatus* ve *H. huso* için benzer %52,6, *A. gueldenstaedtii* için %53,2 ve *A.baerii*/benzeri için ise % 53,8 olarak bulunmuştur. Bu değerler yapılan diğer çalışmaları desteklemektedir. Nitekim Doukakis (2000), Cyt-b geni sekans analizi ile *A. stellatus* için % 52,46, *A. gueldenstaedtii* için % 52,95, *A. baerii* için % 53,38 ve *H.huso* için ise % 53,35 lik bir A+T oranı belirlemiştir. Kontrol bölgesinde ise *A. stellatus* için % 61.44, *A. gueldenstaedtii* için % 62.70, *A. baerii* için % 62,94 ve *H. huso* için ise % 61,27'lik daha yüksek bir A+T oranı hesaplamıştır.

Önceki çalışmalarda Cyt-b geni C, A ve T oranlarınca zengin ve G oranı olarak ise çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Cantatore vd., 1994). Beklendiği şekilde bu çalışmada da Cyt-b gen bölgesinin C (% 32) bakımından zengin, G (% 15) bakımından ise fakir olduğu bulunmuştur. Nükleotit frekansları ise *A.baerii*/benzeri için T-C-A-G sırasıyla %

27,0, % 31,4, % 26,8 ve % 14,9 olarak bulunmuştur. *A. gueldenstaedtii* 'de bu değer ortalamaları % 26,9, % 31,4, % 26,6 ve % 15,0 dir. *A. stellatus* için ortalamalar % 26,3, % 32,0, % 26,3, % 15,4 şeklindedir. *H. huso* için ise % 27,2, % 31,0, % 26,6 ve % 15,2'dir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak Duokakis (2000), Cyt-b geni ile yaptığı çalışmada *A. baerii* için T-C-A-G oranlarını sırasıyla % 26,86, % 31,81, % 26,52 ve % 14,99, *A. gueldenstaedtii* için bu değerleri % 26,37, % 32,19, % 26,58 ve % 14,86, *A. stellatus* için % 25,80, % 32,38, % 26,66, % 15,17 ve *H. huso* için ise % 26,74 , % 31,52 , % 26,61, % 15,12 olarak bulmuştur.

Yine benzer şekilde Almodovar vd. (2000), 7 mersin türünde Cyt-b gen bölgesinin sekans analizi verilerinden bu bölgelerin düşük G içeriğine (%16,2) sahip olduğunu belirtmiştir ve sırasıyla baz oranlarını A, C ve T olarak % 26,7, % 29,3 ve %27,8 belirlemiştir. Tüm bu değerlere bakıldığında Cyt-b gen bölgesinin baz kompozisyonu telostei ile benzer bulunmuştur (Perciformes) (Cantatore vd., 1994).

Johns ve Avise (1998), farklı canlı grupları için Cyt-b geninin nükleotid frekanslarının göstermiştir (Tablo 4.1). Tabloda verilen değerlere bakıldığında bizim çalışmamızda elde edilen değerlerle uyumlu oldukları görülmektedir.

Tablo 4.1. Farklı canlılar için Cyt-b nükleotid frekansları

Canlı Türü	T	C	A	G	A+T
Kuşlar	25,0	33,9	27,6	13,5	52,6
Memeliler	28,8	28,4	29,6	13,3	58,4
Sürüngenler	28,6	27,6	27,7	16,1	56,3
Amphibianlar	32,7	24,3	27,0	16,0	59,7
Balıklar	29,5	29,9	25,3	15,3	54,8
Mersin (Bu çalışma)	26,83	31,45	26,52	15,18	53,36

Transisyon miktarına baktığımızda en fazla *A. gueldenstaedtii*'de (9), *A. stellatus* (7) ve en az *H. huso*'da (6) görülmektedir. Transversiyon miktarı ise en fazla *A. stellatus*'da (2) görülmüştür, *H. huso*'da hiç transisyon görülmemiştir. Ti/Tv oranı en yüksek *A. gueldenstaedtii*'de (9:1), *A. stellatus*'da (7:2) ve *H. huso* (6:0) olarak bulunmuştur. Bu değer diğer balıklarda ve mersin balığının diğer türlerinde çok farklı olabilmektedir.



Doukakis (2000), farklı türlerle yapmış olduğu çalışmasında D-loop için transisyon/transversiyon oranını 6:1 ile 25:1 arasında bulmuştur. Ayrıca Cyt-b ve ND5 için transisyon/transversiyon oranının D-loop bölgesinden daha düşük olduğunu tespit etmiştir. Brown vd. (1993), ise benzer şekilde *A. transmontanus*'da 27:1 gibi nispeten yüksek bir oran bulmuştur. Bu oranın yüksek çıkmasının muhtemel nedenini, Acipenseriform türleri arasında grup olarak görülen yavaş baz ikame oranının bir sonucu olabileceğini belirtmiştir.

Krieger vd. (2000), Kuzey Amerika mersin balığı türleri ile yaptığı bir çalışmada mtDNA sekansını çalışmıştır. Türlerin çiftli karşılaştırmaları için birleştirilmiş gen sekans verilerinden elde edilen ti/tv değeri Polypterus ve Acipenseriform türleri arasında yaklaşık 1,4 olarak bulunmuştur. Bu değer Acipenseriform türleri arasında 3,0 ila 10,3 arasında değiştiği gözlenmiş ve bu değer Acipenseriform içerisinde ki mevcut ayrılmanın nasıl meydana geldiğinin açıklanmasında kullanılabileceğinden bahsetmiştir.

Almodovar vd. (2000), 7 farklı mersin türü ile Cyt-b bölgesi için yapmış olduğu çalışmasında ts:tv oranını 7,17 olarak belirlemiştir. Mersin balıklarında ti/tv oranı nispeten yüksek oranlarda bulunur iken diğer balıklarda 2:1-3:1 gibi düşük değerler rapor edilmiştir (Bernatchez vd., 1992; Fajen ve Breden 1992; Apostolidis vd., 1997). Bu çalışmada elde edilen sonuçların yukarıda verilen çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir.

#### 4.2.2 Nükleotit Çeşitliliği

Çalışılan gen bölgesi için hesaplanan nükleotit çeşitliliği değerleri türler arasında farklı bulunmuş ve genellikle diğer balıklarda gözlenen değerler ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Nükleotit çeşitliliği, *A. gueldenstaedtii* için % 0,378, *A. stellatus* için % 0,299 ve *H. huso* için % 0,167 olarak hesaplanmıştır.

Benzer şekilde Duokakis (2000), Cyt-b ve ND5 bölgesi için nükleotit çeşitliliği değerini *A. baerii* ve *H. huso* için diğer mersin türleri ile benzer (<%0,2 ) bulmuştur ve bu değer diğer balıklardan daha düşük bir dağılım gösterdiğini belirtmiştir. Çiftçi vd. (2007), Türkiye de 30 *S. trutta* populasyonunda Cyt-b/Dloop, ND5/6 ve ND1 gen bölgelerini kullanarak yapmış olduğu RFLP çalışmasında populasyonlar arası nükleotit çeşitliliğini % 1.01 olarak hesaplamıştır. Ayrıca Horai vd. (1995), *A. stellatus* ve *A. gueldenstaedtii* için Cyt-b nükleotit çeşitliliğini insanla benzer bulmuştur. Duokakis (2005) yılında yaptığı başka bir çalışmada Dloop bölgesi için ise nükleotit çeşitliliğinin *A.*

*gueldenstaedtii* türünün farklı populasyonlarında % 2,65-3,69 aralığında değiştiğini belirtmiştir. Bu değerleri *A. stellatus* için % 1,55-2,03 ve *H. huso* için ise % 2,03-2,66 olarak belirtmiştir. Aynı şekilde *A. gueldenstaedtii*'nin en yüksek nükleotit çeşitliliğine sahip olduğu bulunmuştur.

Brown vd. (1993), tarafından yürütülen çalışmada Dloop bölgesinin nükleotit çeşitlilik değerinin diğer gen bölgelerinden 4-5 kat daha yüksek olduğu ve benzer şekilde Pourkazemi (1995), D-loop ile ND5 ve Cyt-b arasındaki nükleotit çeşitliliği farkının 9 kata kadar değişebileceğinin ve bunun sonucunda D-loop bölgesinin daha fazla evrim hızına sahip olduğunu belirtilmiştir. D-loop üzerine yapılan benzer çalışmalarda benzer şekilde yüksek değerler elde edilmiştir. Pourkazemi (1999), *A. gueldenstaedtii*'de D-loop bölgesi için nükleotit çeşitliliği değerini % 5,0 olarak hesaplamıştır. Bir başka çalışmada *A. transmontanus* için % 1,3 değeri bulunmuştur (Brown vd., 1993) ve bu oranın insan mtDNA Dloop gen bölgesi için (%1,8) benzer olduğu Kocher ve Wilson (1990) tarafından rapor edilmiştir.

#### 4.2.3. Nükleotit Farklılığı

Çalışılan türlerde tür içi nükleotit farklılığı 1,86 – 4,2 arasında hesaplanmıştır. Türler içerisinde en yüksek nükleotid farklılık değeri *A. gueldenstaedtii* de 4,2 iken bu değer *A.stellatus* için 3,3 olarak bulunmuştur. Türler için en düşük değer ise *H. huso* da 1,86 olarak hesaplanmıştır. Türler arası kt değeri 5,692 - 36,648 aralığında bulunmuştur. En yüksek kt değeri *A. stellatus* - *H. huso* arasında 36,648, en düşük değer ise *A.gueldenstaedtii* - *A.baerii/benzer* arasında bulunan 5,692 dur.

Jennenckens (2000), *A. baerii* ile *A. gueldenstaedtii* türleri arası k değerini 14,7 olarak hesaplamıştır. Bununla birlikte tür içi k değerleri *A. baerii* için 1,3 ve *A. gueldenstaedtii* için ise 6,0 olarak hesaplamıştır. Tanımlanan üç *A. baerii* haplotipi ile yerli *A. gueldenstaedtii* haplotipleri arasındaki genetik farklılık % 13,0 olarak belirlenmiştir. Bu ve diğer çalışmalardan da görüldüğü gibi türler arası hesaplanan k değeri, tür içi k değerlerinden önemli derecede farklı bulunmuştur.

### 4.3. Aminoasit Çeşitliliği

Elde edilen sekanslardan çıkarılan aminoasit profillerine göre her üç tür için toplam 371 adet aminoasit kodlandığı ve bunların yüzde dağılımları 0,00 - 16,94 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Tür bazında *A. gueldenstaedtii* ve *A.baerii*/benzer’de Trp hiç görülmez iken Leu % 16,94’le en çok görülen aminoasittir. *A. gueldenstaedtii* içerisinde hiçbir aminoasit kodlamasında değişiklik gözlenmemiştir. Fakat diğer türler *A. gueldenstaedtii* ile karşılaştırıldığında 7 yerde aminoasit kodlaması değişmektedir (35, 38, 59, 293, 299, 320, 346). *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer arasında 59 ve 293’üncü kodon pozisyonlarında valin-izolesin ve 299 da metiyonin-valin değişimi tespit edilmiştir. *A. stellatus* örneklerinin kendi içerisinde 2 farklı grup oluştuğu görülmüştür. İki haplotip arasındaki farklılaşma 38’inci kodon pozisyonunda izolesin-serin şeklinde gerçekleşmiştir. *A. gueldenstaedtii* - *A. stellatus* arasında 35’inci kodon pozisyonun da valin-izolösün farklılaşması ve 38’inci pozisyon da izolösün-serin değişimi belirlenmiştir. *H. huso* türünün kendi içinde de 2 farklı haplotip grubu oluştuğu gözlenmiş ve bu haplotipler birbirlerinden 346’ıncı kodon pozisyonunda valin-metiyonin farklılaşmasıyla ayrılmıştır. *A. gueldenstaedtii* – *H. huso* arasında 35’inci kodon pozisyonunda valin-izolösün, 299 da metiyonin-valin, 320’de alanin-treonin ve 346’ıncı kodon pozisyonunda valin-metiyonin değişimi belirlenmiştir.

Ayrıca kodonlara bakıldığında 1. kodonda 11 adet (35, 38, 39, 59, 87, 222, 229, 293, 299, 320, 346) değişim görülürken bunlardan 7 tanesi aminoasit kodlamasını değiştirmektedir. ve 2. kodonda 1 (38) değişim görülür iken 3. kodonda 88 değişim görülmüş ve bunlardan 5 tanesi (35, 59, 293, 299 ve 346) aminoasit değişimi görülen kodonda gerçekleşmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer değerler Jennecknes vd. (2000) tarafından da elde edilmiştir. *A. baerii* ile *A. gueldenstaedtii* türlerinden elde edilen farklı haplotiplerin karşılaştırmasında, ilk kodon pozisyonlarında 3 adet transiyon gözlemlenmiştir, bu değişimler 196, 898 ve 916 da pozisyonlarındaki nükleotid değişiminin bir sonucudur ve sırasıyla Val-Ile, Ile-Thr, Val-Ile, Met.-Val aminoasit değişimlerine neden oluştur. Bu pozisyonların iki tür için belirleyici olacağını belirtmiştir. Ayrıca 3. kodon pozisyonunda gözlenen ilave ikameler (306, 648, 685, 690, 693, 735 ve 912 ) daha çok türe özgü korunmuş olabileceğini belirtmiştir. Jennecknes vd. (2000), tarafından yürütülen çalışmada olduğu gibi bu çalışmadan da elde edilen benzer sonuçlardan Cyt-b geninin daha çok

korunmuş olmasından dolayı, sessiz olmayan nükleotit ikamelerinin farklı türlerin belirlenmesinde kullanılabileceği gözlenmiştir.

#### 4.4. Tür İçi ve Türler Arası Genetik Farklılık

Yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonucunda varyasyonun % 94,37'lik çok büyük bir kısmı türler arasında dağıldığı görülür iken bu oran çok önemli bulunmuştur ( $P < 0,001$ ). Tür içi varyasyon ise % 5,63 olarak bulunmuştur. Türler arası hesaplanan  $F_{st}$  değerlerine bakıldığında, en küçük değer morfolojik olarak büyük benzerlik gösteren ve çoğu zaman hibrit formlarına da rastlanan *A.baerii*/benzeri - *A. gueldenstaedtii* arasında (0,6978) gözlenirken, en yüksek *H. huso* - *A. stellatus* arasında (0,964) bulunmuştur.  $F_{st}$ -  $P$  değerleri ise *A.baerii*/benzeri örneğinin 1 adet olmasından dolayı bu türe ait hesaplamaların tutarlı olmayacağı düşünülmüştür. Türler arası  $F_{st}$  değerleri, nükleotid farklılık değerleri ile paralel sonuçlar göstermiştir.

Jennecknes vd. (2000), *A. baerii* ile *A. gueldenstaedtii* örnekleri arasında, Cyt-b geni sekanslarından hesaplamış olduğu  $F_{st}$  değeri (0,75) bu çalışmada hesaplanan değere yakın sonuç bulmuş ve tesadüfî olmayan bir önemlilik olduğunu göstermiştir. Doukakis (2000) çalışmasına bakıldığında, AMOVA analizi sonucunda en yüksek  $Q_{st}$  değerleri *A. baerii* türünde hesaplanmış (0,94-0,027) ve bu türün kendi stokları arasında büyük heterojeniteye sahip olduğu gözlenmiştir. Diğer türlerin popülasyonları arasındaki  $Q_{st}$  değerleri sırasıyla *A. gueldenstaedtii* (0,21-0,022), *H. huso* (0,037-0,031) ve *A. stellatus* (0,027-0,0035) olarak hesaplanmış ve genetik farklılaşma görülmemiştir. Aynı araştırmacının yapmış olduğu Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucunda, popülasyonlar arasında paylaşılan haplotiplerin yalnızca *A. stellatus* türü için Karadeniz ve Hazar Denizi arasında ayrıştığı gözlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

Bu çalışmada türler arası mesafe, Kimuranın 2-parametresine göre hesaplanmış ve %1,258 – 5,288 arasında arası da değerler bulunmuştur. Elde edilen değerlere bakıldığında en düşük uzaklık (%1,258) *A.baerii*/benzeri - *A. gueldenstaedtii* arasında görülürken en yüksek uzaklık değeri (%5,288) ise *A. gueldenstaedtii* – *H. huso* arasında hesaplanmıştır. Diğer türler arasında ki mesafeler ise *A.baerii*/benzeri - *H. huso* % 4,53, *H. huso* - *A. stellatus* % 5,19, *A. stellatus* - *A.baerii*/benzeri % 5,19 ve *A. gueldenstaedtii* - *A. stellatus* % 5,23 olarak bulunmuştur.

Filogenetik analiz kısmında model seçimi (TrN+G) ile hesaplanan gamma değeri kullanılarak yeniden hesaplanan Kimuranın 2-parametre değerleri arasında farklılık

görülmüştür. En küçük genetik uzaklık değeri %1,63 ile yine *A. baerii*/benzeri - *A. gueldenstaedtii* arasında görülür iken farklı olarak en yüksek genetik uzaklık *A. stellatus* - *H. huso* arasındaki % 27,93'lük değer olmuştur. Diğer türler için hesaplanan değerler sırasıyla, *A. gueldenstaedtii* - *A. stellatus* % 1,22, *A. gueldenstaedtii* - *H. huso* % 17,82, *A. stellatus* - *A.baerii*/benzeri % 17,0 ve *A.baerii*/benzeri - *H. huso* % 12,59 şeklinde bulunmuştur. Çalışılan türlerin dendogram oluşturmada kullanılan dış gruba (*Polyodon spathula*) olan uzaklıkları ise % 433-485 arasında hesaplanmıştır. Gamma düzeltmesiyle hesaplanan Kimuranın 2-parametresi değerlerinin Fst ve nükleotid farklılık değerleri ile paralel sonuç verdiği görülmüştür.

Almodovar vd. (2000), Cyt-b geninin 402 bp'lik kısmının sekansını alarak *A. sturio* - *A. naccarii* türleri arasındaki sekans farklılığını Kimura 2-parametresine göre % 6,91 ve *A. sturio* - *A. baerii* arası farklılığı ise % 7,43 arasında değiştiğini göstermiştir. Yakın ilişkili *A. oxyrinchus* ile *A. sturio* arasında % 4,2'lik bir farklılık görülmüştür. Dış grup olarak kullanılan *P. spathula* ile *A. sturio* arasında yüksek farklılık %12,9 görülür iken *A. baerii* ve *A. naccarii*'nin *A. sturio*'dan farklılıkları ise sırasıyla % 6,9 ve % 7,4'lük benzer mesafeler olarak hesaplanmıştır.

Zhang vd. (2001), Yangtze Nehrinde bulunan Çin mersin balığı populasyonlarının genetik varyasyonlarının belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, 1995-2000 yılları arasında toplanan (n=106) yetişkin mersin balıklarının mitokondrial genomunun kontrol bölgesinde (Dloop) DNA sekans analizi yapmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre en yüksek genetik farklılık değerinin (% 24,8 – 26,0) Asya Yeşil mersini ile Çin mersini arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Asya Yeşil mersini ile Amerika Yeşil Mersini arasındaki farklılık % 5,6 olarak hesaplanmıştır. Tür içi farklılık değerleri ise Çin Mersinin de % 0,9 - 2,0 aralığında değişim göstermiştir.

Krieger vd. (2000), Kuzey Amerika mersin türleri ile yaptığı 4 mtDNA (12S rRNA, COII, tRNA<sup>Phe</sup> ve tRNA<sup>Asp</sup>) gen bölgesi sekans verilerine dayalı filogenetik çalışmada *A. fulvescens*, *A. brevirostrum*, *A. medirostris*, *A. transmontanus*, *A. o. desotoi*, *A. o. oxyrinchus* türleri ile birlikte *Polyodon spathula*'yı kullanmıştır. Burada tüm sekans verileri için Kimura 2-parametre mesafesini Acipenser içersinde % 0,18 – 3,95 olarak hesaplarken bu türlerin *P. spathula* ile olan uzaklığını % 57,7 - 65,6 aralığında hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucunda Cyt-b geni için elde edilen genetik mesafe değerlerinin yürütülen diğer çalışmalarla benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ayrıca

yapılan çalışmalarda Dloop bölgesi için hesaplanan değerlerin beklendiği gibi Cyt-b gen bölgesine göre büyük sonuçlar verdiği görülmektedir.

Tür içi mesafeler ise *A. gueldenstaedtii* 0,42 ile tür içi farklılık en fazla görülen tür iken bu türü *A. stellatus* (0,32) izlemiş ve en az farklılık ise *H. huso* (0,17)'da bulunmuştur. Bu çalışmada bulunan tür içi farklılıklara benzer değerler Doukakis (2000) tarafından, yapılan çalışmada da bulunmuş ve her bir tür içerisinde haplotipler arasında gözlenen farklılık % 0,1 - 5,4 arasında belirlenmiştir. Farklı türler için kontrol bölgesi kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda *A. oxyrinchus* ve *A. transmontanus* için benzer maksimum değerler rapor edilmiştir % 5,4, % 4,29 (Ong vd., 1996; Brown vd., 1993).

Genetik farklılaşmanın bir göstergesi de popülasyonlar/tür arası gen akış miktarıdır. Çalışılan türlerde gen akışı % 21,6 – 1,869 arasında değişim göstermektedir. Gen akışı *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzer türleri arasında en yüksek orana sahip iken (% 21,6) *H. huso* - *A. stellatus* türleri arasında en düşük düzeyde (% 1,869) olduğu bulunmuştur. Bu değerlerde Fst değerleri ile birlikte seçilen modeli desteklemektedir.

#### 4.5. Filogenetik Analizler

Acipenseriformların bilinen filogenetik pozisyonlarının tersine bu order içinde ki türlerin filogenetik ilişkileri hala tartışmalıdır (Mayden ve Kuhajda 1996; Birstein vd., 1997a; Findeis, 1997; Birstein ve DeSalle, 1998; Choudhury ve Dick 1998; Ludwig, 2000).

*A. gueldenstaedtii* örnekleri için yapılan filogenetik analizler sonucunda oluşturulan MP, NJ ve UPGMA dendogramların da, bu türün A-B (B1-B2) şeklinde iki farklı gruba ayrıldığı görülmüştür. A grubu 37-53-67-91 nolu örneklerden oluşur iken, B grubu ise kendi içerisinde de B1 (2-11-61-62 nolu örnekler) ve B2 (40-44-54-63) şeklinde ikiye ayrılmaktadır. B grubu içerisindeki B1 grubu örneklerinden 2-11 nolu örneklerin kültür kökenliği olduğu bilinmektedir. Yine aynı grupta yer alan 61 ve 62 no'lu Samsun örnekleri ise kültür örneklerine yakın bulunmuştur. B2 grubu içerisindeki 40-44-54 no'lu örnekler Giresun'dan ve 63 nolu örnek ise Sakarya'dan örneklenmiştir. A grubu örnekler den 37-67-91 no'lu örnekler Samsun, 53 no'lu örnek Giresun'dan örneklenmiştir.

Tüm *A. gueldenstaedtii* örnekleri ile birlikte genbanktan alınan örnekler karşılaştırıldığında "A" grubu örneklerinin hem "B" grubundan (B1 ve B2) hem de genbanktan alınan diğer örneklerden ayrıldığı görülmektedir. "B" grubu örnekleri ise genbanktan alınan örneklerden ayrılmamıştır. Birstein vd. (2000), yapmış olduğu

çalışmada 3 mitokondrial gen bölgesinin (Cyt-b, ND5 ve Dloop) sekansların filogenetik analizleri sonucunda *A. gueldenstaedtii*'nin NPG (*A. naccarii*, *A. persicus* ve *A. gueldenstaedtii*) ve BG (*A. baerii* ve *A. gueldenstaedtii*) şeklinde 2 ana gruba ayrıldığını belirtmiştir. *A. gueldenstaedtii* içerisinde 2 mitokondrial soy grubu düşünüldüğünde, çalışılan tüm *A. gueldenstaedtii* örneklerinin “**Karadeniz Soy Grubu**” olarak isimlendirebileceğimiz (NPG) grubun içerisinde olduğu görülmüştür. Karadeniz soy grubuna dahil, *A. gueldenstaedtii* örnekleri içinde ve Türkiye kıyılarında bulunan örneklerin temsil ettiği “A” grubunun daha çok örnekle çalışılarak farklılaşmanın kesinleştirilmesi gerekmektedir.

*A. baerii* - *A. gueldenstaedtii*: Örneklemelerde *A. gueldenstaedtii* olarak belirtilen fakat sekans sonuçlarında *A. baerii* ye daha yakın bulunan 46 nolu örneğin *A. gueldenstaedtii* örnekleri ile karşılaştırılması sonucunda bu türden ayrıldığı görülmüştür. Doğal dağılım alanı olmamasına rağmen *A. baerii*'nin farklı havzalarda bulunduğu Jenneckens (2000) tarafından bildirilmiştir. Fakat Jenneckens (2000) çalışmasında bu türe ait haplotipi Volga nehrinden elde ettiği *A. gueldenstaedtii* örnekleri içerisinde rastlamış Azak denizi ve Güney Hazar Denizinde rastlamadığını rapor etmiştir. Ayrıca Ruban (1997) yapmış olduğu derleme çalışmasında *A. baerii* türünün yalnızca Sibiryakarsularında (Ob, Yenisei, Lena, yana, Indigirka, Kolyma ve küçük derelerde) bulunduğu ve Karadeniz-Hazar bölgesinde bulunmadığını belirtmiştir. Yazarın kendisiyle yapılan personel görüşme sonucunda da bu balığın tatlı su formu olduğu, Karadeniz de yaşamasının zor olduğu fakat türün morfolojik çalışmalarla özellikle solungaç diken yapısının kontrol edilmesiyle de *A. gueldenstaedtii* 'den farklı olduğunun kesinleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Fakat bütün bu görüşlerin yanında çalışılan bu örneğin Jenneckens (2000)'in çalışmasında kullandığı ve *A. baerii* haplotipi olarak gösterilen haplotipe sahip Sibiryakarsularında olması şüphelerini kuvvetlendirmektedir. Bunun en olası nedeni yetiştiricilik yolu ile üretilen birçok türün doğaya serbest bırakılması yada kaçması şeklinde olabilir.

Mersin türleri arasında kabul edilmiş hibritler literatürde rapor edilmiştir (Bristein vd., 1997). Jenneckens (2000) Volga nehrinde çok fazla miktarda *A. gueldenstaedtii* türünün salınması veya çiftliklerden kaçması sonucunda *A. baerii* ile çiftleştiği ve fertil bireyler oluşturduğunu bildirilmiştir. Berg (1948), Karadeniz ve Hazar Denizi havzasında *A. gueldenstaedtii* ile *H. huso* ve *A. gueldenstaedtii* ile *A. stellatus* arasında hibritleşmeyi rapor etmiştir (Holcik, 1989). Bu bireyin hibrit olup olmadığı hakkında çalışılan metotla karar vermemiz mümkün değildir. Nitekim mitokondrial kalıtım maternaldir ve

rekombinasyon görülmez. Bunun yerine nDNA üzerinden uygun belirteç seçilerek çalışılması gerekmektedir.

Taksonomik olarak, türler arasındaki moleküler benzerlik ile morfolojik benzerlikler paralel görülmektedir. Nitekim *A. naccarii* ve *A. gueldenstaedtii* bir birleri ile “yakın ilişkilidir” ve esasen ortalama solungaç diken sayıları farklıdır. Bu değer *A. gueldenstaedtii* de 15-31 ve *A. naccarii* de ise 30-35 dir (Tortonese, 1989; Valesenko vd., 1989a). Dahası Tortonese *A. naccarii*yi *A. gueldenstaedtii*'nin alt türü olarak tanımlamıştır. Berg (1948)'e göre *A. baerii* ile *A. gueldenstaedtii* ise yalnızca bir karakter bakımından ayrılmaktadır, buda solungaç dikenlerinin farklı şeklinde olmasıdır (Doukakis 2000). *A. baerii* ve *A. naccarii* ile *A. gueldenstaedtii* farklı dağılım alanlarına sahiptir; *A. naccarii* Adriyatik in kuzey kıyıları boyunca dağılım gösterirken (Tortonese, 1989), *A. baerii* ise birçok Sibirya nehir sisteminde ve Baykal gölünde bulunur (Ruban 1997). *A. persicus* ise tür olup olmadığı yada *A. gueldenstaedtii*'nin bir alt türü olup olmadığı tartışması süre gelmektedir. İki tür, morfolojik ve anatomik olarak çok benzerdir (Vlasenko vd., 1989a;b). Bir çok araştırmacı *A. persicus*'u tür olarak desteklememektedir.

*A.baerii*/benzeri örneğinin az olmasının nedeniyle haplotipler ve farklılaşan nükleotit yerleri detaylandırılmamıştır. Mevcut örnek üzerinden Cyt-b gen bölgesinde farklılaşan 11 (175, 285, 321, 627, 664, 696, 672, 714, 877, 891, 895) farklı nükleotit yeri belirlenmiştir. Avrasya türleri hakkında daha detaylı çalışmalar, daha çok gen bölgesi ve daha uzun sekanslar karşılaştırılarak yapılmıştır (Birstein vd., 2000; Almodovar, 2000 ve Doukakis vd.,1999; 2000; 2005). Bu çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamız da “Kardeniz soy grubu” (NPG) *A. gueldenstaedtii* örnekleri ile *A. baerii* Hazar soyu (BG) örneği karşılaştırılmış ve iki türün moleküler düzeyde ayrıldığı görülmüştür.

Birstein vd. (2000), birbirine çok yakın dört türde (*A. gueldenstaedtii* (G), *A. baerii* (B), *A. naccarii* (N) ve *A. persicus* (P)) yapmış olduğu çalışmada Dloop (725 bp) gen bölgesi içerisinde 21, ND5 (643 bp) üzerinde 9 ve cytb (850 bp) üzerinde ise yürütülen bu çalışmaya benzer olarak 11 farklılaşan pozisyon belirlemiştir. BG grubu içerisinde *A. gueldenstaedtii* ile *A. baerii*'nin Dloop geninde 432. pozisyonadaki C-T transisyonunun kullanılarak belirlenebileceğini belirtmektedir. NPG grubu içerisinde ise türlerin tek bir gen bölgesi ile belirlenmesinin mümkün olmadığını bildirmiştir. Fakat nadir DNA sekans değişimlerinin (özel alleller) kombinasyonu ile bu grupta *A. gueldenstaedtii*'nin belirlenebileceğini belirtilmiştir. *A. naccarii* için yalnızca 2 örnekle çalışarak bu türün Dloop üzerinde 194. pozisyonadaki yalnızca bir G tarafından ayrıldığını göstermiş fakat



örnek az olduğu için bu baz değişiminin türün belirlenmesinde kullanılmasının zayıf olduğu vurgulanmıştır. *A. persicus*'un ise mtDNA verilerinden pozitif olarak belirlenmesinin mümkün olmadığı belirtilmiştir.

Almodovor vd. (2000), çalışmasında *A. gueldenstaedtii*'nin 2 farklı genetik forma ayrıldığını bildirmiştir. Bunlar “tipik” ve “kriptik (gizli)” formlardır. Tipik form filogenetik olarak *A. persicus* ile *A. gueldenstaedtii* ve *A. naccarii*'yi birleştirmektedir. Bu veriler sonucunda *A. persicus*'un ayrı bir tür den daha çok *A. gueldenstaedtii* nin bir alt türü olabileceğini belirtilmiştir. *A. naccarii* içi kontrol bölgesindeki 164. pozisyondaki yalnızca bir G belirleyicidir. *A. gueldenstaedtii*'nin Kriptik formu ise genetik olarak *A. baerii*'ye çok yakındır, yalnızca *A. baerii*'den kontrol bölgesi 432. pozisyonunda C-T transisyonu ile farklılaştığını belirlemiştir.

Gerek oluşturulan sekans verilerinden gerekse gen bankasından alınan verilerle birlikte kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda elde edilen dendogramlar dan anlaşıldığı gibi (Şekil 19) *A. brevirostrum* ile *A. gueldenstaedtii* ve *A. baerii* türleri kardeş grup olarak birbirlerine yakın görülmektedir. Almodovor (2000)'un yapmış olduğu sınıflandırmada genellikle Atlantik kıyılarında bulunan Kuzey Amerikan burunsuz mersin balığının (*A. brevirostrum*), Karadeniz - Hazar (Avrasya) bölgesinde bulunan Rus Mersini (*A. gueldenstaedtii*) (Vlasenko vd., 1989b) ve Sibirya nehirleri ve Baykal gölünde bulunan Sibirya mersini (*A. baerii*) (Ruban vd., 1997) ile yakın ilişkisi olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlar Bristein ve Desalle (1998)'nin oluşturduğu filogenetik ilişkiyi desteklemektedir. Yalnız Bristein ve Desalle (1998) burada Cyt-b geninin 650 bp lik bir bölümünü karşılaştırmıştır ve 150 bp'lik 12S rDNA ve 350 bp'lik 16S rDNA ile kombine kullanmıştır. Bristein ve Desalle (1998), daha uzun bir Cyt-b bölgesi kullanmalarına rağmen onların verilerine göre *A. naccarii*, *A. persicus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii* ve *A. brevirostrum* türleri çözülmemiş bir soy olarak görülmektedir.

*A. stellatus* örnekleri oluşturulan topolojilerde % 100'lük bir seç-bağla değeri ile tür düzeyinde ayrılmıştır. Bununla birlikte gen bankası örnekleri ile birlikte değerlendirildiğinde kendi içerisinde ikiye ayrıldığı (S1 ve S2) ve *A. nudiventris* ile daha yakın olduğu görülmektedir. Tür içi farklılıkların belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalara bakıldığında, Kuz'min (1994), yapmış olduğu protein çalışmasında alttür düzeyinde bir ayırım belirleyememiştir. Benzer şekilde Doukakis (2000), Dloop ve ND5 genleri üzerine yapmış olduğu çalışmasında *A. stellatus* için hesaplanan düşük Gst değeri Ural Nehri, Volga Nehri, Hazar Denizi, Karadeniz yada Azak Denizi için klasik olarak

belirlenmiş alttürlerin genetik olarak aynı olduğunu göstermiştir. Benzer genetik yapı ise Hazar Denizi ve Karadeniz'e giren anadrom balık olan kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) üzerine yapılan bir çalışmada, alabalıklar arasında sabitlenmiş bir farklılık oluşmadığını (alttür) fakat allel frekanslarında farklılık görüldüğü bildirilmiştir (Bernatchez, 1995; Bernatchez ve Osinov, 1995; Osinov ve Bernatchez, 1996). Bu çalışmalar ışığında *A. stellatus*'un tür içi şekillenmesinde balıklandırmanın ana etken olabileceği düşünülmektedir. Devam eden balıklandırma çalışmaları bu türün Hazar, Azak ve Karadeniz'de ki populasyonlarının devamlılığını sağlamıştır (Doukakis, 2000). Fakat bu çalışmalar öncesinde genetik çalışmalar yapılmadığı için bu uygulamanın genetik yapıyı etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Bu etki ancak müze örneklerinin (eski tarihli) çalışılmasıyla belirlenebilir. Bu nokta da ise iyi yada uygun korunmamış örneklerle çalışmanın zorluğu ortaya çıkmaktadır. Tür içi farklılaşmaları ve alttürleşmeyi su kütesinin izolasyonu, gen akışının jeolojik yada insan tarafından etkilenmesi gibi olaylar belirlemektedir.

Doukakis (2000), yapmış olduğu filogenetik analizler sonucunda oluşturduğu bütün ağaçların *Pseudoscaphirhynchus* ile *A. stellatus*, *H. huso* ve *A. ruthenus* arasındaki ilişkiyi desteklediğini belirtmiştir. Bristein ve DeSalle (1998), *A. nudiventris* ile *A. dabryanus* ve *A. stellatus* çok daha yakın ilişkili olduğunu MP ve ME ağaçları ile desteklemişlerdir.

Huso genusuna ait *H. huso* türü, çalışılan örnekler içerisinde %100 lük bir seç-bağla değeri ile ayrıldığı görülmüş olsa bile gen bankasından alınan sekans verileri ile birlikte değerlendirildiğinde (Şekil 19) *A. ruthenus* ile yakın ilişkili görülmektedir. Benzer şekilde önceki moleküler çalışmalarda (Bristein vd., 1997a; Bristein ve Desalle 1998; Tagliavini vd., 1999 ve Dukakis, 2000), Huso ayrı olarak görülmemektedir, monofiletik soydur fakat Acipenser içerisinde bulunmakta ve *A. ruthenus* ile yakın ilişkilidir. Ondokuzuncu yüzyıl sistematikçilerinin çoğu Huso'nun Acipenser'in bir alt genusu (subgenus) olduğunu düşünmüşlerdir ve Huso'nun geç evrimselleşmesi için cinsle ilgili durumu o zamandan beri tartışılmıştır (Artyukhin, 1995 ve Bemis vd., 1997a). Bu bulguların tersine Findeis (1997)'e göre, Huso bütün diğer Acipenseriformlar için bazal iken, Artyukhin (1995) ve Mayden ve Kuhajda (1996)'ya göre Huso'nun Acipenser içerisinde kardeş taksa olarak yer almakta olduğunu belirtmişlerdir. Mayden ve Kuhajda (1996)'da farklı veri kullanarak moleküler ve morfoloji arasındaki çatışmayı göstermektedir. Artyukhin (1995), Huso nun Acipenser genusu içerisinde yer alabileceğini ve *A. ruthenus*, *A. nudivetris* ve *A. shrenckii* ile yakın ilişkili olabileceğini vurgulamıştır.

Ayrıca *H. huso* ve *A. ruthenus* türleri hayat hikayeleri ve morfolojik olarak büyük farklılıklar göstermelerine rağmen, kolayca hibritleşmelerinden fertil döller üretebilmelerinden dolayı açıkça bir şekilde yakın ilişkili oldukları belirtilmiştir (Birstein ve DeSalle, 1998 ve Birstein vd., 1997b).

#### 4.6. Evrimsel Senaryo ve Moleküler Saat

Acipenseriform'un evrimsel olarak ortaya çıkışı 200–225 milyon yılda Jurasik dönemden meydana gelmiştir ve bütün fosil ve yaşayan taksonların Holarktık dönemin bir parçası olduğu ortaya konulmuştur (Kedrova vd., 1980; Grande ve Bemis 1991; Cantatore vd., 1994 ve Bemis vd., 1997a). Yapılan çalışmalarda Acipenseriformes Ordo'sunun *Polyodontidae* ve *Acipenseridae* olmak üzere iki monofiletik familyadan oluştuğu görülmüştür (Fiddlers, 1991; Grande ve Bemis, 1991 ve Bemis vd., 1997a). Bu iki ailenin bir birinden 135–200 milyon yıl öncesinden ayrıldığı kabul edilmektedir (Birstein vd., 1998a).

Bütün mevcut paleontolojik bilgiler Acipenseriformların Tethis havzasından kaynaklı olduğunu işaret etmektedir (Birstein vd., 1997a). Tethis bölgesinin oluşumunun Jeolojik olayları bu bölgedeki bir çok canlı türünün çeşitliliğinde olduğu gibi mersin balıklarının dağılımı üzerine de ana etkenlerden birisidir. Yaklaşık 120 milyon yıl önce Tethis Denizi batmış ve bunun sonucunda Karadeniz, Hazar Denizi ve Aral oluşmuştur ve bunun sonucunda deniz mersin soyları oluşmuş (171 my) belki de sonraki devam eden ayrılmalar Kuzey Amerikan *A. oxyrinchus* ile Avrupa *A. sturio* 'nun ayrılması sağlandı, ikinci olarak Scaphirhynchus'un diğer mersin türlerinden ayrılması gerçekleşti (151 my), üçüncü olarak Atlantik ve Pasifik ayrılması ve her bir klad içerisinde ayrılmalar oluştu (121 my), dördüncü olarak iki paddlefish arasında karasal ayrılma meydana gelmiştir (68 my) (Peng vd., 2007). Bu iki mevcut paddlefish türü bütün fosil kayıtları tatlısular da bulunmuş olmasına rağmen bazı çok nadir bireyler kıyısal deniz ortamında bulunurlar (Bemis vd., 1997). Bunun için, yaşayan iki paddlefish türünün ayrılması esas olarak (Asya ve Amerika) Geç Kretase esnasında her iki kıta arasındaki coğrafik mesafenin artmasına bağlı olarak görülmektedir. Bununla birlikte bu senaryo diğer ihtimalleri tamamen ortadan kaldırmaz. Ayrılmada kıtalar arasındaki suların tuzluluğunun artması gibi diğer sebeplerde düşünülmelidir.

Deniz mersin balıklarının dağılımına başka bir örnek de kıtaların sürüklenmesi tabanlı desteklendiği görülen bir vikaryans senaryosudur. Gerçekten Avrupa ve Kuzey Amerika arasındaki Atlantik Okyanusunun açılması yaklaşık 100 my (da) önce oluştu, deniz mersinlerinin 2 ana soyu arasındaki farklılık bunu desteklemektedir. Deniz mersinleri anadrom balıklardır, deniz ortamına iyi adapte olurlar ve Atlantik Okyanusunun iki kıyısında görülürler. Bu soyların son ayrılması için ekolojik ve fizyolojik ip uçları üzerinden gerçekçi bir tarih sağlamak, yüksek tuzluluk değerine tolerans ve uzun mesafelere göç edebilme nedeni ile zordur (Ludwing vd., 2002). Fakat böyle bir ayrılma Tethys denizinin kapanması ve Kuzey Atlantik Dönüşünün başlangıcı ile mümkündür (15-20 my) (Smith vd., 1994). Günümüzde *A. sturio* Avrupa’da ve *A. oxyrinchus* Kuzey Amerika’da bulunur. *A. oxyrinchus* için Baltık Denizini giren bir trans-Atlantik kolonizasyonu önerilmektedir (Ludwing vd., 2002).

Peng vd., (2007) yapmış olduğu çalışmada *A. sturio* ile *A. oxyrinchus* ‘un yaklaşık 58 my önce ayrılmış olduğunu bunun ise Tethys denizinin son kapanmasından daha önce olduğunu belirtmiştir. Ayrıca Atlantik ve Pasifik mersin soyu ayrılması (121 my) Tethys Denizinin batması ve bu iki denizin ayrılması ile uyumlu olduğunu belirtmiştir (120 my). Aral, Karadeniz ve Hazar Denizi Tethys Denizini’ den oluştuğunu ve bu şekilde Atlantik soyu içerisinde ayrılma ile birkaç soy oluştuğunu belirtmiştir. Atlantik grubu Avrasya türleri ile 2 tane Kuzey Amerika (*A. brevirostrum* ve *A. fulvescens*) türlerini içerir. Avrasya ve Kuzey Amerika türlerini ayrılması Tethys Denizinin kapanması ve bu kara kütleleri arasındaki coğrafik mesafe ile çoğunlukla ilgilidir ve bu genom dublikasyonu (53 my) olduktan sonra meydana gelmiştir. Bununla birlikte bazı türlerin deniz ortamına sınırlı adaptasyonu bu ayrılmada önemli bir rol oynamıştır (*A. fulvescens*, *A. baerii* ve *A. naccarii*). Mersin balıklarının deniz ortamına adaptasyonu balıkların bu grupları için çok muhtemelen ilkel bir özelliktir. Daha sonra tatlısular da ekolojik olarak uygun yerlerin oluşmasına bağlı olarak bazı soylarda deniz ortamına girme yeteneğini kayıp yada azalma olmuştur. Farklı coğrafik olaylar Bazı soyların dağılımlarını tatlı su gölleri ile sınırlandırdığı için deniz suyuna adaptasyon azalabilir. Böyle soylar en farklı mersin soyunu (“*gueldenstaedtii*-kompleks”)(Bristein vd., 2005) içermektedir. Çalışmada kalibrasyon için 6 farklı tür kullanmış bununla birlikte poliploidi durumu göz önünde alınmıştır. Bu şekilde *H. huso* ve *A. stellatus* türlerinin *A. gueldenstaedtii*’den farklılaşma zamanı sırasıyla ortalama 86,4 my (48,2-132,6) ve 59,7my (29,4-99,8) olarak hesaplamıştır (Peng vd., 2007). Bu değerler bu çalışmada elde edilen sonuçları desteklemektedir. Şöyle ki bu

çalışmada *A. gueldenstaedtii*'nin *H.huso*'ya olan mesafesi 7,15-58,8 my ve *A. stellatusa* olan mesafesi ise 6,89-58,1 my olarak belirlenmiştir.

Bununla birlikte birkaç senaryo, *A. gueldenstaedtii* kompleksi içerisinde ki 2 farklı mtDNA soyunun oluşunu ve *A. baerii*, *A. persicus* ve *A. naccarii* ile benzerliklerini açıklayabilir. Mersin balıklarının moleküler filogenetiği üzerine yapılan önceki çalışmalara göre, bu dört tür bir monofiletikten oluşmuştur. Nispeten gençtirler ve grup içerisinde *A. gueldenstaedtii* daha temel bir taksondur. *A. gueldenstaedtii* içindeki iki farklı mtDNA soyu, diğer üç türün bu türün popülasyonlarından ortaya çıkmış olabileceğini göstermektedir (Bristein ve DeSalle, 1998). Jeolojik faktörler *A. baerii*'nin tür içi yapısının şekillenmesinde kesin bir role sahiptir. *A. gueldenstaedtii*'nin BG grubuna ait olan atasal *A. baerii* Berg (1928)'e göre büyük buzul çağ süresince yada buzul sonrası erimeler (sel) yolu ile Karadeniz - Hazar bölgesinden Sibiryaya akarsu ve göl sistemine göç etmiş olabilir (Duokakis 2000). Göllerin, Sibiryaya nehirleri ile bağlantısı yaklaşık 10.000-15.000 yıl önce görülmektedir (Arkhipov vd., 1998). Son buzul çağı süresince Sibiryaya nehirlerinin deniz ve havzalarının bir göller sistemi yolu ile bağlandığı bildirilmiştir (Arkhipov 1998; Grosswald 1998). Yaklaşık olarak son bağlanma 18.000-20.000 yıl önce meydana gelmiştir (Laukhin 1997). Nispeten yeni olan bu bağlantı süresinden günümüze, *A. baerii* nin farklı alttürlerinde nükleotid değişimlerinin sabitlenmesi için yeterince değişim zamanı geçmemiştir (Doukakis, 2000). Bu coğrafik yapılanmanın tersine Peng vd. (2007)'nin moleküler saat değerlendirmesine göre *A. baerii* (24 my) ile *A. naccarii*'nin (5,3 my) *A. gueldenstaedtii*'den bu sürelerden daha önce ayrılmış olduğu görülür. Bu değerler yine bu çalışmada elde edilen *A. baerii* 'nin ayrılma zamanını ( 0,5-12 my) desteklemektedir.

Araştırmacıların saptamalarına göre, yaklaşık olarak aynı zamanlarda 2 tür (*A. naccarii* ve *A. baerii*), *A. gueldenstaedtii*'nin farklı genetik formlarından oluşmuştur. Geçen tarihsel sürecin çok yakın olmasından dolayı türler arasında genetik ve morfolojik karakter farklılığı çok azdır.

#### 4.7. Heteroplazmi ve Boy Varyasyonu

Bu çalışmada 3 Avrasya mersin türünün (*A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus* ve *H. huso*) D-loop bölgesindeki tekrar yapısı, tekrar bölgelerinin sekans farklılıkları ve türlerdeki

heteroplazmi seviyeleri belirlenmiştir. Bu amaçla toplam 19 örneğin sekansı alınmış ve 81 örnekteki boy farklılığı ve heteroplazmi ortaya konulmuştur.

Boy varyasyonuna bakıldığında üç tür için en fazla 6 tekrarlı yapı görülmüştür. Toplam 46 adet *H. huso* örneği içerisinde 4 tekrarlı yapı % 43,4'lük frekans ile en çok görülen morf olmuştur. En az tekrar sayısı 3 iken en fazla 6 tekrar tespit edilmiştir. *H. huso* içerisinde 1-2 ve 7 tekrarlı yapı görülmemiştir. Toplam 13 adet *A. stellatus* örneği içerisinde 5 tekrarlı yapı % 55'lük oran ile en çok görülen morf olmuştur. En az tekrar sayısı 2 iken en fazla 6 tekrar tespit edilmiştir. Toplam 24 adet *A. gueldenstaedtii* örneği içerisinde 3 tekrarlı yapı % 54,2 ile en çok görülen morf olmuştur. En az tekrar sayısı 2 iken en fazla 5 tekrar tespit edilmiştir.

Çalışmada tekrar bölgeleri tespit edilirken merkezi tekrarlar dikkate alınarak tekrar eden baz dizilimleri belirlenmiştir. Buna göre her tür için tekrar eden baz büyüklüğü 82 bp olarak bulunmuştur. *H. huso* ve *A. stellatus* için yüksek oranda benzerlik gösterirken *A. gueldenstaedtii* için bu tekrar bölgesi sekansları değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte *A. gueldenstaedtii* türünde 23 bp'lik delesyon olduğu görülmüştür.

Ludwig vd. (2000), 19 mersin türü ve 1 adet paddlefish olmak üzere toplam 1238 örnekte çalışmıştır. Yürütülen bu çalışmadan farklı olarak en fazla 7 tekrar tespit edilmiştir. Fakat bu 7 tekrarlı yapı çalışmadığımız tür olan *A. ruthenus*'da rastlanmıştır. Heteroplazmik bütün mersin balıklarının % 90'nından fazlası 2 yada 3 tekrara sahip olduğu görülürken 2 tekrar dan fazla tekrara sahip homoplazmik birey görülmemiştir.

Heteroplazmik durumu irdelediğimizde, *H. huso* türünde yalnızca bir bireyde (72 no'lu örnek) heteroplazmik yapı gözlenmiş ve heteroplazmi oranı % 2,17 ile tüm türler arasında en düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu heteroplazmik birey içerisinde gözlenen iki fragmentte 3 ve 4 tekrarlı yapı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak homoplazmi ise % 97,83 olarak hesaplanmıştır. *A. stellatus* için heteroplazmik birey sayısı 5 (26, 32, 49, 57 ve 90 no'lu örnekler) olarak gözlenmiştir. Bu tür için heteroplazmi oranı % 45,45 ile en yüksek oranda gerçekleşmiştir. Heteroplazmi gösteren bireylerde 4, 5 ve 6 tekrarlı yapı görülmüştür. Buna bağlı olarak homoplazmi ise % 54,55 olmuştur (Tablo 3.27). *A. gueldenstaedtii* türü için ise heteroplazmik birey sayısı 2 (64 ve 67 nolu örnekler) olarak gözlenmiştir. Heteroplazmi oranı % 8,33 olarak belirlenmiştir. Heteroplazmi gösteren bireylerde 3, 4 ve 5 tekrarlı yapılar gözlenmiştir. Buna bağlı olarak homoplazmi ise % 91,77 olarak gerçekleşmiştir.

Grunwald vd. (2002), Dloop bölgesini çalışarak, *A. brevirostrum*'un farklı popülasyonları için heteroplazmi oranının ortalama % 0-79 arasında değiştiğini hesaplamıştır. Ludwig vd. (2000), homoplazmi oranlarını *H. huso* için % 92, *A. gueldenstaedtii* için % 85,7, *A. baerii* için % 80,1, *A. naccarii* için % 70 ve *A. stellatus* için % 74,2 oranlarında hesaplamıştır. Yürütülen bu çalışmada elde edilen homoplazmi oranları da Grunwald vd., (2002)'nin çalışma sonuçlarını desteklemektedir.

Ludwig vd. (2000), merkezi tekrar bölgesinin uzunluğunu türlere göre 74-83 bp aralığında değiştiğini belirtmiştir. Paddlefish türü *Polyodon spathula*'da tekrar bölgesi görülmemiştir. Bununla birlikte tekrar bölgelerinin TAS motifleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Dloop içerisinde türler arası görülen 138 mutasyonun yaklaşık yarısı TAS motiflerinin 10bp aşağısı veya yukarısında görülmektedir. İlginç olarak homoplazmik türlerin çoğunda TAS motiflerini yukarısı silindiği görülmektedir. TAS bölgesinin alt kısmında silinme ise yalnızca 2 heteroplazmik türde görülmüştür ve bu olay heteroplazmik durumla ilgili değildir. Görülen tekrar sayıları ve türler şöyledir; 74 bp tekrar *S. platyrhynchus* ve *S. albus*, 78 bp *A. mikadoi*, 79 bp *A. oxyrinchus* ve *A. medirostris*, 80 bp *A. ruthenus* ve *A. sturio*, 82 bp *A. baerii*, *A. fulvescens*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii*, *A. nudiventris*, *A. persicus*, *A. stellatus*, *A. transmontanus* ve *H. huso* ve 83 bp *A. brevirostrum*.

Buroker vd. (1990), *A. transmontanus* örneklerinde D-loop bölgesinde boy farklılığı ve heteroplazmi üzerine çalışmıştır. Bu tür için 82 bp'lik tekrar olduğu tespit edilmiştir. Tekrar bölgeleri arasında tam bir uyumun olmadığı görülmüştür.

Brown vd. (1996), dört adet Kuzey Amerika türünde (*A. transmontanus*, *A. medirostris*, *A. fulvescens* ve *A. oxyrinchus*) tRNA gen ve Dloop bölgesinin sekanslarını alarak boy varyasyonu ve heteroplazmik durumu belirlemek için çalışmıştır. Her bir türde 78-82 bp den oluşan çoklu tekrarların TAS'larla ilişkili olduğunu tespit etmiştir.

Mevcut çalışmada türler (*H. huso*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii*, *A. stellatus*) için tespit edilen 82 bazlık tekrar bölgesi önceki çalışmalardan elde edilen sonuçları desteklemiştir.

Ayrıca Türler arasındaki boy varyasyonuna baktığımızda, en büyük  $K_b$  değeri 0,156 ile *A. stellatus*'da görülürken, *A. gueldenstaedtii* için 0,0385 ve *H. huso* için ise 0,0085 olarak hesaplanmıştır.  $G_{IP}$  değerleri ise  $K_b$  değerlerinin tersine en düşük *A. stellatus*'da 0,656, *A. gueldenstaedtii*'de 0,9303 ve en büyük değer ise *H. huso* da 0,9871 olarak bulunmuştur.

Brown vd. (1996), çalışmış olduğu türlerde boy varyasyonunun *A. transmontanus*  $G_{IP}$ : 0,758, *A. medirostris*  $G_{IP}$ : 0,615, *A. fulvescens*  $G_{IP}$ : 1 ve *A. oxyrhychnus*  $G_{IP}$ : 1 olarak hesaplanmıştır. *A. transmontanus* ile *A. medirostris* türlerinin örnekleri ( $K_b$ ) arasındaki genetik farklılık önemli bulunmamıştır ( $t=0,782$   $df=183$  ve  $p=0,44$ ).

Brown vd. (1992b), *A. transmontanus* ile yaptığı çalışmada bu türde 174 birey ile çalışmış ve heteroplazmi oranını % 42 (73 birey) olarak belirlemiştir. İki farklı popülasyonu karşılaştıran araştırmacı kesim yeri değişkeni ( $K_b=0$ ) heteroplazmik balık kullanmamıştır. Popülasyon düzeyinde hesaplanmış olduğu  $K_c$  değerleri Fraser Nehri popülasyonu için 0,765 ve Kolombiya Nehri için 0,702 olarak belirlemiştir. Tüm verilerden ise  $K_c=0,760$  olarak bulmuştur.  $K_b$  ortalamaları ise  $0,183 \pm 0,018$ , popülasyonlar için Fraser Nehri popülasyonu için  $0,223 \pm 0,024$  ve Kolombiya Nehri popülasyonu için ise  $0,127 \pm 0,027$  olarak bulmuş bu değerleri karşılaştırdığında ( $t$  testi  $t=2,639$   $df=172$   $P<0,01$ ) bulmuştur.  $G_{IP}$  ise tüm veriler için 0,759, Fraser Nehri için 0,708 ve Kolombiya Nehri için 0,819 bulunmuştur. En çok görülen tekrarlar ise 1-2-3 (yaklaşık %80) tekrarlı yapı olmuştur ve 7 tekrar görülmemiştir.

#### 4.8. Kesici Enzimler Kullanarak Türlerin Belirlenmesi

Moleküler tekniklerin kullanılması ile birlikte tür tespiti daha kesinlik kazanmış durumdadır. Bu metotlardan bir tanesi de PZR tabanlı uygulamalardır. Tür tespitine yönelik PZR uygulaması kullanılarak yapılan çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Desalle ve Briestein, 1996; Bristein vd. 1998; 1999). mtDNA Cyt-b geninin sekans analizinin yanında daha hızlı sonuca ulaşılabilmesi için PZR-RFLP tekniği kullanılarak türler tanımlanmaya çalışılmıştır (Wolf vd., 1999).

Jennekens (1999, 2000) ve Bristein vd. (2000), yaptıkları çalışmalarda Rus mersinini ile Sibiry mersininin Cyt-b gen bölgesinin çok yakın olduğunu bu nedenle yanlışlıklar olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu iki türün Cyt-b gen bölgesi için aynı kesici enzimlerin diğer türler için ayırt edici olduğu tespit edilmiştir.

Ludwig (1998), mtDNA 12S rDNA gen bölgesi için PZR-RFLP analizi yapmış ve *A. naccarii* ile *A. sturio* arasında 400 bp'lik sekans bölgesinde 7 farklı ikame pozisyonda kesim yerlerini oluşturacak enzimler belirlemiştir. *Bsi*YI (380. pozisyon) ve *Acil* (40.) enzimlerinin tür ayırımında kullanılabileceğini fakat *Tsp*RI (315-326) enziminin ise kesim yerlerinin çok yakın olmasından dolayı kullanılmayacağını belirtmiştir.



Tagliavini (1999), İtalya'da yetiştirilen 6 mersin balığı türü (*H.huso*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii*, *A. ruthenus*, *A. baerii*, ve *A. transmontanus*) arasında mitokondrial DNA değişkenliği üzerine çalışmıştır. Mitokondrial Cyt-b ve Dloop gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve *RsaI* enzimi ile kesilerek oluşan parçacıklarla analiz yapılmıştır (RFLP). Bu metodun türler aranı varyasyonun belirlenmesine izin verdiği ve bu nedenle türlerin belirlenmesinde uygun bir belirteç olduğu belirtilmiştir.

Pourkazemi (1999), Rus mersininin (*Acipenser gueldenstaedtii*) populasyon yapısı mtDNA Dloop bölgesini PZR ile çoğaltmış ve farklı kesici enzimler kullanarak morflar oluşturulmuştur. Bütün örnekler içerisinde 7 birleşik haplotip belirlemiş ve ortalama nükleotid ve haplotip çeşitliliğini  $0,05 \pm 0,00$  ve  $0,75 \pm 0,00$  (SE) olarak hesaplamıştır. mtDNA- Dloop bölgesinin enzimlerle kesilmesi sonucunda elde edilen iki morfun (A ve B) sırasıyla 0,5 ve 0,36 ile yüksek frekansa sahip olduğunu tespit etmiş ve Rus mersini için farklı biyolojik gruplar (stok yada mevsimsel grup, yaş grubu) için potansiyel genetik belirteç olabileceğine işaret edilmiştir.

Wolf (1999), mersin balığı türlerini havyardan tespit etmek için mitokondrial gen bölgelerini (tRNAglu/Cyt-b) PZR kullanarak çoğaltılmasına dayalı bir metod geliştirmiştir. Çoğaltılan 462 bp uzunluğundaki PZR ürününün farklı enzimlerle kesilmesi sonucunda türe özgü kesim yerleri ile türlerin belirlenmesi sağlanmıştır. Burada ilk etapta 7 enzimle (*Alu I*, *Ase I*, *Mbo II*, *Nla III*, *Rsa I*, *Ssp I*, *Tru 91*) kesim morfları belirlenmiş, sonrasında ise 4 enzim (*Nla III*, *Rsa I*, *Ssp I*, *Tru 91*) kullanarak *Acipenser* ve *Huso* cinslerine ait 10 farklı türün ayrılması için uygun olduğu gösterilmiştir.

Ludwig vd. (2002), 858 bireyde 22 tür mersin balığının tespiti için Cyt-b genindeki potansiyel, türlere özgü kesim yerlerini belirlemiştir. Türlerin ayrımının tek bir kesici enzim kullanarak mümkün olmayacağını ve türlere bağlı olarak 1- 4 farklı enzimin kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Bu bağlamda 7 farklı kesici enzimin 17 *Acipenseriform* türünün, mtDNA düzeyinde türlere özgü kesici yerlerinin belirlenerek ayrılabilmesi belirtilmiştir. Yapılan bütün bu çalışmalar sonucunda havyar üretiminin büyük bir kısmının yapıldığı üç tür olan, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus* ve *H. huso* türlerinin belirlenmesi ve kontrolü imkanı sağlanmış ve daha detaylı tanımlamalar için kombine nükleer ve mtDNA belirteçlerini kullanılmasının gerektiği ifade edilmiştir.

Ludwig (2008), Farklı DNA belirteçlerinin mersin balığı türlerinin tespitinde kullanılmasına dair bir derleme yaparak kullanılabilecek belirteçleri ve türleri belirtmiştir. DNA tabanlı metotları (sekans analizi, PZR-SSCP analizi, Türe özgü PZR, PZR-RFLP,

Nükleer DNA belirteçleri; RAPD, AFLP, makrosatellit) ve kullanıldığı çalışmaları detaylı bir şekilde vermiştir. Bu çalışmada mtDNA Cyt-b geni *MseI*, *BsII*, *RsaI*, *BsaJI*, *BsrI*, *TaqI* ve *SspI* enzimlerini sırasıyla kullanarak Acipenseriform türlerini tanımlamıştır.

Bu çalışmada türler öncelikle tek tek ele alınarak Cyt-b sekans verilerinden her bir tür için tanımlayıcı olabilecek restriksiyon enzimleri belirlenmiştir. Tür bazında belirlenen enzimler, *H. huso* için *BceAI*, *BsiHKA1*, *BtgI*, *TspRI*, *AvaII* ayırt edici kesici enzimler olarak belirlenmiştir. *A. gueldenstaedtii* ve *A. baerii/benzer* için *BpmI*, *AflIII*, *Eco57MI* kesici enzimleri belirleyici olmuştur. *A. baeri* ile *A. gueldenstaedtii* örneklerinin birbirinden ayrılmasında ise *BarI*, *BfaI*, *BsaXI* ve *TatI* enzimleri belirleyici olmuştur. *A. stellatus* için ise, *Bme1580I*, *BmgBI*, *BstEII*, *PspOMI*, *SfiI*, *TaqI*, *BbvI*, *TseI* enzimleri bu tür için ayırt edicidir. Benzer şekilde çalışılan türlerin birbirinden ayrılmasında *Csp6I*, *NlaIV*, *Sau96I*, *BseMII*, *BsaJI*, *HphI*, *RsaI*, *BspCMI* gibi enzimlerin kullanılabileceği belirlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR

1. Türkiye'nin Karadeniz kıyılarında ve Karadeniz'e dökülen büyük akarsularda dağılım gösteren Acipenseridae familyasının, *Acipenser* genusunun 2 türü (*Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser stellatus*) ve *Huso* genusunun 1 türü (*Huso huso*) ile birlikte Karadeniz için egzotik sayılabilecek *Acipenser baerii*/benzeri örneği içeren toplam 7 ilden 82 adet balık örneklenmiştir. *Acipenser gueldenstaedtii* 24, *Acipenser stellatus* 11, *Huso huso* 46 ve *Acipenser baerii*/benzeri 1 adet balık örnekleme yapılmıştır.
2. Örneklenen 82 örnek üzerinde mtDNA'nın 2 farklı bölgesi (Cyt-b ve tRNA<sup>pro</sup>- Dloop) PZR ile yükseltgenmiş ve nükleotid dizilimleri belirlenmiştir. Her bir gen bölgesi için sekansı alınan ürün boyutu, Cyt-b gen bölgesi için 1113 bp ve kısmi D-loop bölgesi için 250-600 bp'lik bir bölge çalışılmıştır.
3. Cyt-b gen bölgesinin sekans analizi sonucunda, 19 adet haplotip tespit edilmiştir. En yaygın olan haplotip (Hap\_2), 4 bireyde görülerek tüm örneklerin % 14,29 da gözlenmiştir. Bir türde görülen haplotipler diğer türlerde görülmemiştir. Her 3 tür için % 81,8 - 96,4 aralığında yüksek haplotip çeşitlilik düzeyi görülmüştür. Türler için haplotip çeşitliliği, *A. gueldenstaedtii* için % 81,8, *A. stellatus* için % 95,2 ve *H. huso* için % 96,4 olarak hesaplanmıştır.
4. Cyt-b gen bölgesinin C bakımından zengin G bakımından ise fakir olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan türler için nükleotid dağılım frekanslarının % 14,9 - 32,0 arasında değiştiği gözlenmiştir. *A.baerii*/benzerinde C ve G oranı diğer türlerden düşük bulunur iken A ve T oranları diğer türlerden yüksek bulunmuştur.
5. Ti/Tv oranı en yüksek *A. gueldenstaedtii*'de (9:1), en düşük *H. huso* (6:0)'da gözlenmiş ve *A. stellatus*'da 7:2 olarak gerçekleşmiştir.
6. Çalışılan türler için tür içi toplam nükleotid çeşitliliği (Pit) % 0,167 – 0,378 arasında bulunmuştur. Türler içerisinde en yüksek nükleotid çeşitliliği *A. gueldenstaedtii*'de bulunurken bunu *A. stellatus* ve *H. huso* izlemiştir.
7. Çalışılan türlerde tür içi nükleotid farklılığı 1,89 – 4,2 arasında hesaplanmıştır. Türler içerisinde en yüksek nükleotid farklılık değeri sırasıyla *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus* ve *H. huso* da görülmüştür. Türler arası kt değeri 5,692 - 36,648 aralığında bulunmuştur. En yüksek kt değeri *A. stellatus* - *H. huso* arasında ve en düşük değer ise *A. gueldenstaedtii* - *A.baerii*/benzeri arasında hesaplanmıştır.

8. *A. gueldenstaedtii* içerisinde hiçbir aminoasit kodlamasında değişiklik gözlenmemiştir. Fakat diğer türler *A. gueldenstaedtii* ile karşılaştırıldığında 7 yerde aminoasit kodlaması değişmektedir.
9. Yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonucunda varyasyonun % 94,37'lik çok büyük bir kısmının türler arasında dağıldığı görülmüştür ( $p < 0,001$ ). Tür içi varyasyon ise % 5,63 olarak bulunmuştur. Türler arası hesaplanan Fst değerlerine bakıldığında, en küçük değer *A.baerii/benzeri* - *A. gueldenstaedtii* arasında (0,6978) gözlenirken, en yüksek *H. huso* - *A. stellatus* arasında (0,96396) bulunmuştur.
10. Türler arası mesafe, Kimuranın 2-parametresine göre hesaplanmış ve % 1,258 – 5,288 arasında değerler bulunmuştur. En düşük uzaklık (% 1,258) *A.baerii/benzeri* - *A. gueldenstaedtii* arasında görülürken en yüksek uzaklık değeri (% 5,288) ise *A. gueldenstaedtii* – *H. huso* arasında hesaplanmıştır.
11. mtDNA Cyt-b gen bölgesi üzerinden her bir tür için tanımlayıcı olabilecek kesici (restriksiyon) enzimler belirlenmiştir.
12. *A. gueldenstaedtii*, oluşturulan MP ve UPGMA dendogramların da bu türün A-B (B1-B2) şeklinde iki farklı gruba ayrıldığı görülmüştür. Tüm *A. gueldenstaedtii* örnekleri ile birlikte genbanktan alınan örnekler karşılaştırıldığında A grubu örneklerinin hem B grubunun 2 alt grubu (B1 ve B2)'dan hem de gen bankası örneklerinden ayrıldığı gözlenmiştir. *A.gueldenstaedtii* içerisinde 2 soy grubu düşünülüğünde çalışılan tüm örnekler "Karadeniz Soy (NPG)" grubu içerisinde olduğu görülmüştür.
13. *A.baerii/benzeri* - *A. gueldenstaedtii*: Örneklemelerde *A. gueldenstaedtii* olarak belirtilen fakat sekans sonuçlarında *A.baerii* ye daha yakın bulunan 46 nolu örnek *A. gueldenstaedtii* ile karşılaştırılması sonucunda bu türden ayrıldığı görülmüştür. Bu birey hibrit olabileceği gibi Sibiryaya mersini olma ihtimali de bulunmaktadır. Doğal dağılım alanı olmamasına rağmen acı sularda da yaşayabileceği bilinen *A.baerii/benzer*'in Karadeniz havzasında görülmesinin en olası nedeni yetiştiricilik yolu ile üretilen birçok türün doğaya serbest bırakılması yada kaçmasıdır.
14. *A. stellatus* örnekleri oluşturulan topolojilerde % 100'lük bir seç-bağla değeri ile tür düzeyinde ayrılmıştır. Bununla birlikte gen bankası örnekleri ile birlikte değerlendirildiğinde kendi içerisinde ikiye ayrıldığı (S1 ve S2) ve *A. nudiventris* ile daha yakın olduğu görülmektedir.

15. *Huso* genusuna ait *H. huso* türü, çalışılan örnekler içerisinde %100 lük bir seç-bağla değeri ile ayrıldığı görülmüş olsa bile gen bankasından alınan sekans verileri ile birlikte değerlendirildiğinde (Şekil 19) *A. ruthenus* ile yakın ilişkili olduğu görülmektedir.
16. Çalışılan türlerde 1 ve 7 tekrarlı yapı görülmez iken 2 tekrarlı yapı % 3,7, 3 tekrar % 39,5, 4 tekrar % 38,2, 5 tekrar % 16 ve 6 tekrar % 12,3 oranında görülür iken 7 tekrarlı yapı görülmemiştir. En çok görülen tekrar is % 39,5 ile 3 tekrarlı yapı olmuştur.
17. Çalışılan türlerin tamamında heteroplazmik bireyler görülür iken bunların dağılımları *H. huso*'da. % 2,17, *A. stellatus*'da % 45,45 ve *A. gueldenstaedtii* için heteroplazmi oranı % 8,33 olarak belirlenmiştir.
18. Türler arasındaki boy varyasyonuna bakıldığında en küçük varyasyona 0,656 ile *A. stellatus* sahiptir, *H. huso* için ise 0,9871 olarak en büyük boy varyasyonu görülür iken, bu değer *A. gueldenstaedtii* de 0,9303 olarak bulunmuştur.
19. Tekrar bölgeleri merkezi tekrarlar dikkate alınarak belirlenmiş ve buna göre her tür için tekrar eden birim 82 bp olarak bulunmuştur.

## 6. ÖNERİLER

Dünya genelinde olduğu gibi Ülkemizde de moleküler teknikler su ürünlerinin çok değişik konularında kullanılmaya başlanmıştır. Sistemli bir şekilde elde edilen bilgilerin daha sonraki çalışmalar için bir temel oluşturabilmesi, gerek kaynak, gerekse zaman israfından kaçınmak için bu tür çalışmaların belirli bir disiplin içerisinde yapılması gerekmektedir. Ülkemizde farklı birkaç balık türünde yapılmış filogenetik çalışmalar mevcut iken detaylandırılmış populasyon çalışmaları çok daha sınırlıdır. Özellikle ülkesel çapta yürütülecek ve yöntem birliği oluşturacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Günümüzde mersin balıkları üzerine farklı moleküler metotlar kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (mtDNA-RFLP analizi, sekans analizi, mikrosatellit vb.). Bu çalışmada Türkiye'nin Karadeniz kıyılarında örneklenen türlerle çalışılarak önemli sonuçlar elde edilmiştir. Mersin balığı hakkında artan bilgi birikimi doğal populasyonların ve türlerin korunmasına yönelik çalışmalarda değerli girdiler sağlayacaktır ve ayrıca yetiştiriciliğinin gelişimi için de temel teşkil edecektir.

İlk etapta daha fazla örnekle daha çok gen bölgesinin sekans analizi yapılarak tür içi ve türler arası yapılanma detaylı olarak ortaya konulabilir. Bunun için de Türkiye'de örneklenen tüm bireyler markalanarak doğaya bırakılabilir ve genetik yapılarının ortaya konularak etkili bir izleme oluşturulabilir. Bu şekilde bu çalışmada belirtilen *A. baerii* /benzeri gibi egzotik türlerin takibi yapılabilir. Yine *A. gueldenstaedtii* türü içerisinde görülen farklılaşma detaylandırılabilir.

Türkiye'de Karadeniz'e dökülen akarsulardan daha fazla örnekleme yapılarak karşılaştırmalarda kullanılması gerekmektedir. Ayrıca kurutulmuş ve muhafaza edilmiş örnekler genetik çalışmalarda kullanılarak bu türlerin zaman içerisindeki değişimi ortaya konulabilir.

Türler arası hibritleşmenin ortaya konulması ile örneklenen bireylerin türü mü yoksa hibrit bir oluşumunu temsil ettiği belirlenebilir.

Ayrıca, Bulgaristan, Romanya, Ukrayna ve Rusya Federasyonu kıyılarında da örnekleme yapılarak Türkiye sularına özgü bir genetik yapılanmanın söz konusu olup olmadığı açıklığa kavuşturulabilir.

Tüm türlere ait populasyonların mtDNA ile birlikte nDNA belirteçleri ile çalışılması mersin balığı toplumlarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Akaike, H., 1974. A New Look at The Statistical Model Identification, IEEE Trans Autom Contr., 19, 716–723.
- Akbulut, B., Kurtoğlu, İ.Z., Çakmak, E., Çavdar, Y., Savaş, H., Aksungur, N. ve Ergün H., 2005. Karadeniz Bölgesinde Mersin Balığı Üretim İmkanlarının Araştırılması, PROJE NO: TAGEM/HAYSÜD-2001-07-01-04, Trabzon.
- Akşiray, F., 1954. Türkiye Deniz Balıkları Tayin Anahtarı [A Key To Marine Fishes of Turkey]. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü Yayınları, İstanbul, 277 pp.
- Allendorf, F.W., Ryman, N. ve Utter, F. M., 1987. Genetics and Fishery Management: Post, Present and Future. In: Population Genetics & Fishery Management. Seattle, University of Washington Pres, 2nd, Ed. 1-19 pp.
- Almodovar, A., Machordom, A. ve Suarez, J., 2000. Preliminary Results from Characterization of The Iberian Peninsula Sturgeon Based on Analysis of the mtDNA Cytochrome b, Boletín Instituto Español De Oceanografia, 16, 17–27.
- Anonymous, 1975. Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Su Ürünleri Genel Müdürlüğüne Yayınlanan Su Ürünleri Avcılığını Düzenleyen 1975-1976 Av Mevsimine Ait 3 Numaralı Sirküler.
- Apostolidis, A.P., Triantaphyllidis, C., Kouvatzi, A. ve Economidis, P.S., 1997. Mitochondrial DNA Sequence Variation and Phylogeography Among *Salmo trutta* L. (Greek Brown Trout) Populations, Mol. Ecol., 6, 531-542.
- Aquadro, C.F., Noon, W.A., Begun, D.J. ve Danforth, B.N., 1998. RFLP Analysis Using Heterologous Probes, In: Molecular Genetic Analysis of Populations, Ed: Hoelzel, A.R., Second Ed., Irl Press, Oxford, 151-200.
- Arkhipov, S.A., 1998. Stratigraphy and Palaeogeography of the Sartan glaciation in west Siberia, Quat. Int., 45, 29–42.
- Arnason, E. ve Rand, D.M., 1992. Heteroplasmy of Short Tandem Repeats in Mitochondrial DNA of Atlantic Cod, *Gadus morhua*, Genetics, 132, 211-220.
- Artyukhin, E.N., 1988. The Nature and Origin of Summer Spawning in Sturgeons, J. Ichth., 5, 116–123.
- Artyukhin, E.N., 1995. On The Biogeography and Relationships within the Genus *Acipenser*, Sturg. Quart., 3, 6-8.
- Auer, N.A., 1996. Response of Spawning Lake Sturgeons Tochange in Hydroelectric Facility Operation, Tran. American Fish. Soc., 125, 66–77.

- Avise, J.C., 1986. Mitochondrial DNA and Evolutionary Genetics of Higher Animals, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 312, 325-342.
- Avise, J.C., Akney, C.D. ve Nelson, W.S., 1990. Mitochondrial Gene Trees and the Evolutionary Relationship of Mallard and Black Ducks, Evolution, 44, 1109-1119.
- Bemis, W.E. ve Kynard, B., 1997. Sturgeon Rivers: An Introduction to Acipenseriform Biogeography and Life History, Env. Biol. Fish., 48, 167-183.
- Bemis, W.E., Findeis, E.K. ve Grande, L., 1997a. An overview of Acipenseriformes, Env. Biol. Fish., 48, 25-71.
- Bemis, W.E., Birstein, V.J. ve Waldman, J.R., 1997b. Sturgeon Biodiversity and Conservation: an Introduction, Env. Biol. Fish., 48, 13-14.
- Bentzen, P., Leggett, W.C. ve Brown, G.G., 1988. Length and Restriction Site Heteroplasmy in the Mitochondrial DNA of American Shad (*Alosa sapidissima*), Genetics, 118, 509-518.
- Birmingham, E. ve Avise, J.C., 1986. Molecular Zoogeography of Freshwater Fishes in the Southeastern United States, Genetics, 113, 939-965.
- Bernatchez, L., Guyomard, R. ve Bonhomme, F., 1992. DNA Sequence Variation of the Mitochondrial Control Region Among Geographically and Morphologically Remote European Brown Trout *Salmo trutta* Populations, Mol. Ecol., 1, 161-173.
- Bernatchez, L. ve Danzmann, R.G., 1993. Congruence in Controlregion Sequence and Restriction-Site Variation in Mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill), Mol. Biol. Evol., 10, 1002-1014.
- Bernatchez, L. ve Osinov, A., 1995. Genetic Diversity of Trout (Genus *Salmo*) from its Most Eastern Native Range Based on Mitochondrial DNA and Nuclear Gene Variation, Mol. Ecol., 4, 285-297.
- Birky, C.W., Paul, Jr., Fuerst, P., and Maruyamat, T., 1989. Organelle Gene Diversity Under Migration, Mutation, and Drift: Equilibrium Expectations, Approach to Equilibrium, Effects of Heteroplasmic Cells, and Comparison to Nuclear Genes, Genetics, 12, 613-627.
- Birstein, V.J., 1993. Sturgeons and Paddlefishes: Threatened Fishes in the Need of Conservation, Cons. Biol., 7, 773-787.
- Birstein, V.J., Poletaev, A.I. ve Goncharov, B.F., 1993. The DNA Content in Eurasian Sturgeon Species Determined by Flow Cytometry, Cytometry, 14, 377-383.
- Birstein, V.J. ve Bemis, W.E., 1997. How Many Species are There Within the Genus Acipenser?, Env. Biol. Fish., 48, 157-163.



- Birstein, V.J., Hanner, R. ve Desalle, R., 1997a. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In: Sturgeon Biodiversity and Conservation. ( V.J. Birstein, J.R. Waldman ve W Bemis eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 127-155.
- Birstein, V.J., Bemis, W.E. ve Waldman, J.R., 1997b. The Threatened Status of Acipenseriform Species: A Summary, Env. Biol. Fish., 48, 427-435.
- Birstein, V.J. ve Desalle, R., 1998. Molecular Phylogeny of Acipenserinae, Mol. Phylogen. Evol. 9, 141-155.
- Birstein, V.J., Betts, J. ve Desalle, R., 1998a. Molecular Identification of *Acipenser sturio* Specimens: A Warning Note for Recovery Plans, Biol. Conserv., 84, 97-101.
- Birstein, V.J., Doukakis, P., Sorkin, B. ve Desalle, R., 1998b. Population Aggregation Analysis of Three Caviar-Producing Species of Sturgeons and Implications for the Species Identification of Black Caviar, Cons. Biol., 12, 766-775.
- Birstein, V.J., Doukakis, P. ve Desalle, R., 2000. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and Evolutionary implications, Cons. Gen., 1, 81-88.
- Birstein, V.J., Doukakis, P. ve DeSalle, R., 2002. Molecular phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphirhynchinae, Copeia, 2, 287-302.
- Blackledge, K.H. and Bidwell, C.A., 1993. Three Ploidy Levels Indicated by Genome Quantification in Acipenseriformes of North America, J. Hered., 84, 427-430.
- Boom, R., Sol, J. A., Salimans, M. M., Jansen, C. L. , Wertheim-Van Dillen, M. E. ve Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and Simple Methods for Purification of Nucleic Acids, J. Clin. Mic., 28, 495-503.
- Brown, W.M., George, M.Jr ve Wilson, A.C., 1979. Rapid Evolution of Mitochondrial DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 1967-1971.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. ve Wilson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution, J. Mol. Evol., 18, 225-239.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T. ve Smith, M.J., 1992a. Influence of Pleistocene Glaciations and Human Intervention Upon Mitochondrial DNA Diversity in White Sturgeon (*Acipenser Transmontanus*) Populations, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 49, 358-367.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T. ve Smith, M.J., 1992b. Mitochondrial DNA Length Variation and Heteroplasmy in Populations of White Sturgeon (*Acipenser Transmontanus*), Genetics, 132, 221-228.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T. ve Smith, M.J., 1993. Intraspecific DNA Sequence Variation of the Mitochondrial Control Region of White Sturgeon (*Acipenser Transmontanus*), Mol. Biol. Evol., 10, 326-341.

- Brown, J.R., Beckenbach, K., Beckenbach, A. T. and Smith, M. J., 1996. Length Variation, Heteroplasmy and Sequence Divergence in the Mitochondrial DNA of Four Species of Sturgeon (Acipenser), Genetics, 142, 525–535.
- Bruno W. J. ve Halpern, A. L., 1999. Topological Bias and Inconsistency of Maximum Likelihood Using Wrong Models, Mol. Biol. Evol., 16, 564-566.
- Buroker, N.E., Brown, J.R., O'hara, P.J., Beckenbach, A.T., Thomas W.K. ve Smith, M.J., 1990. Length Heteroplasmy of Sturgeon Mitochondrial DNA: An Illegitimate Elongation Model, Genetics, 124, 157-163.
- Burtzev, I.A., 1999. The History of Global Sturgeon Aquaculture, J. App. Icht., 15, 325.
- Buth, D.G., 1990. Genetic Principles and the Interpretation of Electrophoretic Data, In: Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management (D. H. Whitmore, Eds.), CRC Press Inc, Boca Raton, 1-21.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta M.N. ve Saccone, C., 1994. Evolutionary Analysis of Cytochrome b Sequences in Some Perciformes: Evidence for a Slower Rate of Evolution than in Mammals, J. Mol. Evol, 39, 589-597.
- Cavalli-Sforza, L.L. ve Edwards, A.W.F., 1967. Phylogenetic Analysis: Models and Estimation Procedures, Am. J. Hum. Gen. 19, 233-257.
- Çelikkale, M.S., Okumus, I. ve Memis, D., 2004. Contemporary Status of Turkish Sturgeon (Acipenseridae) Stocks, Conservation Measures and Recent Studies, Symposium On Aquaculture Development – Partnership Between Science and Producer Associations, European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC), Wierzba, Poland, 26 – 29.
- Choudhury, A. ve Dick, T.A., 1998. The Historical Biogeography of Sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): A Synthesis of Phylogenetics, Palaeontology and Palaeogeography, J. Biogeogr. 25, 623-640.
- Churchill, G.A., 1992. Hidden Markov Chains and the Analysis of Genome Structure, Computers and Chemistry, 16, 107–115.
- Çiftci, Y. ve Okumuş, İ., 2002. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers To Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics, Tur. J. Fish. and Aq. Sc., 2, 145-155.
- Çiftçi, Y., Eroğlu, O., Firidin Ş. ve Ertekin A., 2007. Türkiye Kahverengi Alabalık (*Salmo trutta* L.) Populasyonlarının Genetik Yapısının Belirlenmesi, PROJE NO:TAGEM/HAYSÜD/2001/09/03/08, Trabzon.
- CITES, 2004. The CITES Appendices. ([www.Cites.Org/Eng/Append/Appendices.Shtml](http://www.Cites.Org/Eng/Append/Appendices.Shtml)).
- Clary, D.O. ve Wolstenholme, D.R., 1985. The Mitochondrial DNA Molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide Sequence, Gene Organization, and Genetic Code, J. Mol. Evol. 22, 252-271.

- Clayton, D. A., Doda, J. N. ve Friedberg E. C., 1974. The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria, Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 2777-2781.
- Cockerham C.C., 1973. Analysis of Gene Frequencies, Genetics, 74, 679-700.
- Congiu, L., Dupanloup, I., Paternello, T., Fontana, F., Rossi, R., Arlatis, G. ve Zane, I., 2001. Identification of Interspecific Hybrids by Amplified Fragment Length Polymorphism: The Case of Sturgeon, Mol. Ecol., 10, 2355-2359.
- Congiu, L., Fontana, F., Patarnello, T., Rossi, R. and Zane, L., 2002. The Use of AFLP in Sturgeon Identification, J. App. Ich., 18, 286-289.
- Dawid, I.B. ve Blackler, A.W., 1972. Maternal and Cytoplasmic Inheritance of Mitochondrial DNA in *Xenopus*, Dev. Biol., 29, 152-161.
- Desalle, R., ve Birstein, V., 1996. PCR Identification of Black Caviar, Nature, 381, 197-198.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S. ve Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes, Developmental Biology and Aquaculture, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 300 p.
- Davidson, W.S., Birt, T.P. ve Green, J.M., 1989. Organization of the Mitochondrial Genome from Atlantic Salmon (*Salmo salar*), Genome, 32, 340-342.
- Doukakis, P., Birstein, V.J. ve DeSalle, R., 1999. Molecular Genetic Analysis among Subspecies of two Eurasian Sturgeon Species, *Acipenser baerii*, and *A. stellatus*, Mol. Ecol., 8, 117-129.
- Doukakis, P., 2000. Systematics and Conservation Genetics of Surgeons (Order Acipenseriformes), PhD Thesis, Yale University.
- Doukakis, P., Birstein, V.J., Desalle, R., Ludwig, A.N., Ludwig, A., Machordom, A., Almodovar, A. ve Elvira, B., 2000. Failure to Confirm Previous Identification of two Putative Museum Specimens of Adriatic Sturgeon, *A. naccari*, Marn. Biol., 136, 373-377.
- Doukakis, P., Birstein, V. J. ve De Salle, R., 2005. Intraspecific Structure Within Three Caviar-producing Sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, and *Huso huso*) based on Mitochondrial DNA Analysis, J. App. Ich., 21, 457-460.
- Edwards, D. ve Doroshov, S., 1989. Appraisal of the Sturgeon and Seatrout Fisheries and Proposals For A Rehabilitation Programme. Technical Cooperation Programme, FAO: 37 p.
- Efron, B., 1982. The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia.

- Excoffier, L., Smouse, P.E. ve Quattro, J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data, Genetics, 131, 479-491.
- Felsenstein, J., 1973. Maximum-Likelihood Estimation of Evolutionary Trees From Continuous Characters, Amer. J. Human Genetics, 25, 471-492.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary Trees From Gene Frequencies and Quantitative Characters: Finding Maximum Likelihood Estimates, Evolution, 35, 1229-1242.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap, Evolution, 39, 783-791.
- Ferguson, M.M. ve Duckworth, G.A., 1997. The Status and Distribution of Lake Sturgeon *Acipenser fulvescens* in the Canadian Provinces of Manitoba Ontario and Quebec: A Genetic Perspective, Env. Biol. Fish. 48, 299-309.
- Ferris, S.D. ve Berg, W., 1987. The Utility of Mitochondrial DNA in Fish Genetics and Fishery Management, In: Population Genetics and Fishery Management (N. Ryman ve F. Utter, Eds.), University of Washington Press, Seattle, 277-299.
- Fiedler, K., 1991. System Des Gradus Pisces. In: Lehrbuch Der Speziellen Zoologie (A. Kaestner, Begr.) Bd. II - Teil 2: Fische (Strack D., Hrsg.), Gustav Fischer Verlag Jena, 212-402.
- Findeis, E.K., 1997. Osteology and Phylogenetic Interrelations of Sturgeons (Acipenseridae), Env. Biol. Fish., 48, 73-126.
- Fitch, W., 1977. Phylogenies Constrained by Cross-Over Process as Illustrated by Human Hemoglobins in a Thirteen Cycle, Eleven Amino-acid Repeat in Human Apolipoprotein A-I, Genetics, 86, 623-644.
- Flagstad, O., Røed, K., Stacy, J.E. ve Jakobsen, K.S., 1999. Reliable Noninvasive Genotyping Based on Excremental PCR of Nuclear DNA Purified with a Magnetic Bead Protocol, Mol. Ecol., 8, 879-883.
- Fontana, F., 1994. Chromosomal Nuclear Organizer Regions in Four Sturgeon Species As Markers of Karyotype Evolution in Acipenseriformes (Pisces), Genome, 37, 888-892.
- Fontana, F., 1997. Chromosomes of The Acipenseriformes. <http://Dns.Unife.it:/Geneweb/Sturgeon.Html>.
- Freeman, S. ve Herron, J.C., 1999. Evolutionary Analysis, New York: Prentice Hall, Inc.pp.
- Gilbert, T.L., Brown, J.R. ve O'Hara, P.J., 1988. Sequence of Trna-Thr and Trna-Pro From White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) Mitochondria, Nucleic Acids Res., 16, 11825.

- Giuffra, E., Bernatchez, L. ve Guyomard, R., 1994. Mitochondrial Control Region and Protein Coding Genes Sequence Variation Among Phenotypic forms of Brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy, Mol. Ecol., 3, 161 -172.
- Grande, L. ve Bemis, W.E., 1991. Osteology and Phylogenetic Relationships of Fossil and Recent Paddlefishes (Polyodontidae) with Comments on the Interrelationships of Acipenseriformes, J. Vertebr. Paleo., 11, 1-121.
- Grant, W.S. ve Bowen, B.W., 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights from Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation, J. Hered., 89, 415-426.
- Grosswald, M.G., 1998. Late-Weichselian ice sheets in Arctic and Pacific Siberia, Quaternary International, 45-46, 3-18.
- Grunwald, C., Stabile, J., Waldman, J.R., Gross, R., and Wirgin. I.I., 2002. Population Genetics of Shortnose Sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Based on Sequencing of the Mitochondrial DNA Control Region, Mol. Ecol., 11, 1885-1898.
- Gyllensten U., 1985. The Genetic Structure of Fish: Differences In The Intraspecific Distribution of Biochemical Genetic Variation Between Marine, Anadromous, and Freshwater Species, J. Fish Biol., 26, 691-699.
- Hall, H.J. ve Nawrocki, L.W., 1995. A Rapid Method for Detecting Mitochondrial DNA Variation in The Brown Trout, *Salmo trutta*, J. Fish Biol., 46, 360-364.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Nalysis Program For Windows 95/98/NT, Nucl. Acids. Symp. Ser., 41, 95-98.
- Harrison, R.G., 1989. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology, Tren. Evol. and Ecol., 4, 6-11.
- Hasegawa, M., Kishino, H. ve Yano, T., 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA, J. Mol. Evol., 22, 160-174.
- Hedges, S.B., 1992. The Number of Replications Needed for Accurate Estimation of the Bootstrapa P Values in Phylogenetic Studies, Mol. Biol. Evol., 9, 366-369.
- Hensel, K. ve Holcík J., 1997. Past and Current Status of Sturgeons in the Upper and Middle Danube River, Env. Biol. Fish., 48,185-200.
- Hillis, D.M., Larson, A., Davis S.K. ve Zimmer, E.A., 1990. Nucleic Acids III: Sequencing, *In: Molecular Systematics* (D.M.. Hillis, ve C. Mortiz, Eds.) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 318-370.
- Hillis, D. M. ve Bull, J.J., 1993. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis, Syst. Biol., 42, 182-192.
- Hochleithner, M., 1996. Störe - Verbreitung Lebensweise Aquakultur (M. Hochleithner, Hrg.), Österreichischer Agrarverlag Klosterneuburg, 202 p.

- Holcík, J., 1989a. General Introduction To Fishes - Acipenseriformes. In: The Freshwater Fishes of Europe (J. Holcík, Hrsg.), Vol. 1/II. AULA-Verlag GmbH, Wiesbaden, 48-443.
- Holcík, J., R. Kinzelbach, L.I. Sokolov ve V.P. Vasil'ev, 1989. *Acipenser sturio* Linnaeus 1758. In: The Freshwater Fishes of Europe (J. Holcík., Hrsg.), Vol. 1/II Aulaverlag GmbH Wiesbaden, 367-394.
- Holcík J., Banarescu, P. and Evans D., 1989. A. General Introduction to Fishes; The Freshwater Fishes of Europe(Holcík J. Ed.), Vol.1, Part II. General Introduction to Fishes. Acipense riformes, AULA-Verlag; Wiesbaden., 18-147.
- Horai, S., Hayasaka, K., Kondo, R., Tsugane, K. ve Takahata, N., 1995. Recent African Origin of Modern Humans Revealed by Complete Sequences of Hominoid Mitochondrial DNAs, Proc Natl Acad Sci , 92, 532–536.
- Höss, M. ve Pääbo, S., 1993. DNA Extraction From Pleistocene Bones by a Silica-Based Purification Method, Nuc. Acid. Res., 21, 3913-3914.
- Hsu, K.J., 1978. When the Black Sea was Drained?, Sci. Amer., 238, 53–63.
- Huelsenbeck, J.P. ve Hillis, D.M., 1993. Success of Phylogenetic Methods in the for-Taxon Case, Systematic Biology, 42, 247-264.
- Huelsenbeck, J.P., 1995. Performance of Phylogenetic Methods in Simulation, Systematic Biology, 44, 17-48.
- Huelsenbeck, J.P. ve Crandall K.A., 1997. Phylogeny Estimation and Hypothesis Testing Using Maximum Likelihood, An. Rev. Ecol. and Syst., 28, 437-466.
- Imisiridou, A., and Zaldivar, J.M., 1999. Methodology and Formats for Stock Identification of Fish Species. European Commission. Joint Research Center, Institute for Systems, Informatics and Safety Tech. Note I.99.16.
- Jennecknes, I.M., 1999. Untersuchungen über die Eignung biochemischer und molekulargenetischer Marker für eine Identifizierung von verschiedenen Störarten und deren Hybriden, Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität, Göttingen, PhD.
- Jenneckens, I., Meyer, J.N., Debus, L., Pitra C. ve Ludwig A., 2000. Evidence of Mitochondrial DNA Clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, Ecol. Lett. 3, 503–508.
- Jenneckens, I., Meyer, J.N., Hörtsen-Schwark, G., May, B., Debus, L., Wedekind, H. ve Ludwig, A., 2001. A Fixed Allele at Microsatellite Locus LS-39 Exhibiting Species-specificity for the Black Caviar Producer *Acipenser stellatus*, J. App. Ich., 17, 39-42.
- Jerry, D.R. ve Baverstock, P.R., 1998. Consequences of a Catadromous Life-Strategy for Levels of mtDNA Differentiation Among Populations of the Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, Mol. Ecol. 7, 1003-1013.

- Jin, H., 1995. Late Mesozoic Acipenseriformes (Osteichthyes: Actinopterygii) in Central Asia and Their Biogeographical Implications. In: Sixth Symposium on Mesozoic Terrestrial Ecosystems and Biota. (eds. Sun, A. ve Wang, Y.), China Ocean Press: Beijing., 15-21.
- Johansen, S., Guddal, P.H. ve Johansen, T., 1990. Organisation of The Mitochondrial Genome of Atlantic Cod, *Gadus Morhua*, Nucleic Acids. Res., 18, 411-419.
- Johns, G.C. ve Avise, J.C., 1998. A comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene, Mol. Biol. Evol., 15, 1481-1490.
- Kedrova, O.S., Vladychenskaya N.S. ve Ntonov, A.S., 1980. Divergence of Unique and Repetitious Sequences in Fish Genomes, Mol. Biol. 14, 787-797.
- Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences, J. Mol. Evol. 16, 111-120.
- Kishino, H. ve Hasegawa, M., 1989. Evolution of The Maximum Likelihood Estimate of The Evolutionary Tree Topologies from DNA Sequence Data, and the Branching Order of The Hominoidae, J. Mol. Evol., 29, 170-179.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. ve Wilson, A.C., 1989. Dynamics of Mitochondrial DNA Sequence Evolution in Animals, Proc.Na. Ac. Sc., USA, 86, 6196-6200.
- Kocher, T.D. ve Wilson, A.C., 1990. Sequence Evolution of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees Control Region and a Protein-Coding Region. In : Evolution of Life: Fossils, Molecules, and Culture; International Symposium on Evolution of Life, Tokyo, Japan. (eds. Osawa, S. ve Honjo, T.), Springer-Verlag, Tokyo, 391-414.
- Krieger, J., Fuerts, P.A. ve Cavender T.M., 2000. Phylogenetic Relationships of the North American Sturgeons (Order Acipenseriformes) Based on Mitochondrial DNA Sequences, Molecular Phylogenetic and Evolution, 16, 64-72.
- Krieger, J., 2000. Molecular phylogenetics and Evolution the North American Sturgeon and Paddlefish ( Order Acipenseriformes), PhD thesis, Ohio State University, USA.
- Krieger, J. ve Fuerts, P.A., 2002. Evidence for a Slowed Rate of Molecular Evolution in the Order Acipenseriformes, Mol. Biol. Evol., 19, 891-897.
- Kumar, S., Tamura, K. ve Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. Briefings in Bioinformatics 5, 150-163.
- Kuz'min, Y.V., 1994. Comparative Analysis of the Fractional Composition of Sarcoplasmic Muscle Proteins of Different Representatives of Sturgeon (Acipenseridae), J. Icht., 34, 111-124.

- Lauder, G.V. ve Liem, K.F., 1983. The Evolution and Interrelationships of the Actinopterygian Fishes, Bull. Mus.Comp. Zoo., 150, 95-197.
- Laukhin, S.A., 1997. The Late Pleistocene Glaciation in the Northern Chukchi Peninsular, Quaternary International, 41-42, 33-41.
- Le, H.L.V., Lecontre, G. ve Perasso, R., 1993. A 28S rRNA Based Phylogeny of The Gnathostomes: First Steps in the Analysis of Conflict and Congruence With Morphological Based Cladograms, Mol. Phylogen. Evol., 2, 31-51.
- Lewis, P.O., 2001. Phylogenetic Systematic Turns Over a New Leaf, Tren.Ecol. and Evol., 16, 30-37.
- Lewontin, R., 1964. The interaction of Sselection and Linkage. II. Optimum Models, Genetics, 50, 757-782.
- Li, W.H., 1997. Molecular Evolution, Sinaure, Sunderland, MA, 487 p.
- Liu, Z.J. ve Cordes, J.F., 2004. DNA Marker Technologies and Their Applications in Aquaculture Genetics, Aquaculture, 238, 1-37.
- Ludwig, A. ve Kirschbaum, F., 1998. Comparison of Mitochondrial DNA Sequences Between the European and Adriatic Sturgeon, J. Fish Biol., 52, 1289-1291.
- Ludwig, A., May, B., Debus, L.ve Jenneckens, I., 2000. Heteroplasmy in the mtDNA Control Region of Sturgeon (*Acipenser*, *Huso*, and *Scaphirhynchus*), Genetics, 156, 1933-1947.
- Ludwig, A., Belfiore, N.M., Pitra, C., Svirsky V. ve Jenneckens I., 2001. Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels In Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*), Genetics, 158, 1203-1215.
- Ludwig, A., Debus, L., Lieckfeldt, D., Wirgin, I., Benecke, N., Jenneckens, I., Williot, P., J.R., Waldman, and Pitra, C., 2002a. When The American Sea Sturgeon Swam East, Nature, 419, 447-448.
- Ludwig, A., Debus, L. ve Jenneckens, I., 2002b. A Molecular Approach to Control the International Trade in Black Caviar, Internat. Rev. Hydrobiol., 87, 661-674.
- Ludwig, A., 2006. A Sturgeon View on Conservation Genetics, Eur J. Wildl. Res., 52, 3-8.
- Ludwing, A., 2008. Identification of *Acipenseriformes* Species in Trade, J. App. Ichth., 24, 2-19.
- Mayden, R.L. ve Kuhajda, B.R., 1996. Systematics Taxonomy and Conservation Status of the Endangered Alabama Sturgeon *Scaphirhynchus suttkusi* Williams and Clemmer (*Actinopterygii*, *Acipenseridae*), Copeia 2, 241-273.
- McDowall, R. M., 1987. The Occurrence and Distribution of Diadromy Among Fishes, American Fisheries Society Symposium, 1, 1-13.



- McDowall, R. M., 1988. Diadromy in Fishes. Migrations Between Freshwater and Marine Environments- Croom Helm, London. 308 pp.
- McDowall, R. M., 1992. Diadromy: Origins and Definition of Terminology, Copeia 19, 248-251.
- McDowall, R.M., 1993. A Recent Marine Ancestry for Diadromous Fishes? Sometimes Yes But Mostly No!, Env. Biol. Fish., 37, 329-335.
- Meyer, A, Kocher, T.D., Basasibwaki, P. ve Wilson, A.C., 1990. Monophyletic Origin of Lake Victoria Cichlid Fishes Suggested by Mitochondrial DNA Sequences, Nature, 347, 550–553
- Meyer, A., 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in Fishes, Bioc. and Mol. Biol. Fish., 2,1-38.
- Moritz C., Dowling, T.E. ve Brown, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics, Annu. Rev. Ecol. Syst., 18, 269-292.
- Nei, M., 1991. Relative Efficiencies of Different Tree-making Methods for Molecular Data. In Miyamoto, M.M and Cracraft, J.(eds), Phylogenetic Analysis of DNA Sequences, Oxford University Press, New York, 90-128.
- Nei, M.,1987. Molecular Evolutionary Genetic, Columbia University Press, New York.
- Okumuş, İ. ve Çiftci, Y., 2003. Fish Population Genetics and Molecular Markers: II- Molecular Markers and their Applications in Fisheries and Aquaculture, Turk. J. Fish. and Aq. Sc., 3, 51-79.
- Ong, T., Stabile, J., Wirgin, I. ve Waldman, J.R., 1996. Genetic Divergence between *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* and *A. o. desotoi* as assessed by Mitochondrial DNA Sequencing Analysis, Copeia, 2, 464-469.
- Osinov, A.G., 1984. Zoogeographical origins of Brown Trout, *Salmo trutta* (Salmonidae): data from biochemical genetic markers, Journal of Ichthyology, 24, 10-23.
- Osinov, A.G. ve Bernatchez, L., 1996. Atlantic And Danubian Phylogenetic Groupings of Brown Trout *Salmo trutta* Complex: Genetic Divergence, Evolution, and Conservation, J. Ichth., 36, 723-746.
- Patterson, C., 1982. Morphology and Interrelationships of Primitive Actinopterygian Fishes, Am. Zool. 22, 241-259.
- Pearse, A.S. ve Gunter, G., 1957. Salinity, Geol. Soc. Amer. Mem., 67, 129–158.
- Peng, Z., Ludwig, A., Wang, D., Diogo, R., Wie, Q. ve He, S., 2007. Age and Biogeography of Major Clades in Sturgeons and Paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes), Mol. Phyl. Evol., 42, 854-862.

- Pikitch, E., Doukakis, P., Lauck, L., Chakrabarty, P. ve Ericson, D., 2005. Status, Trends and Management of Sturgeon and Paddlefish Fisheries, Fish and Fisheries, 6, 233-265.
- Posada, D. ve Crandall, K.A, 1998. Modeltest: Testing The Model of DNA Substitution. Bioinformatics, 14, 817-818.
- Pourkazemi, M., Sikibinsky, D.O.F. ve Beardmore, J.A., 1995. Population Structure of Stallete Sturgeon, *Acipenser stellatus* Pallas, in Southern part of the Caspian Sea Studied Using mtDNA and Allosyme Analysis, Sturgeon Quarterly, 3,7.
- Pourkazemi, M., Sikibinsky, D.O.F. ve Beardmore, J.A., 1999. Application of mtDNA d-loop Region for the Study of Russian Sturgeon population Structure from Iranian Coastline of the Caspian Sea, J.App. Icht., 15, 23-28.
- Qiwei, W., Ke, F., Zhang, J., Zhuang, P., Luo, J., Zhou, R. and Yang, W., 1997. Biology, Fisheries, and Conservation of Sturgeons and Paddlefish in China, Env. Biol. Fish., 48, 241 -255.
- Raymakers, C., 2000. Assesment of the Implementation of CITES Listing of Acipenseriformes, Traffic Europe, IUCN: 51 p.
- Raymakers, C., 2002. International Trade in Sturgeon and Paddlefish Species – The Effect of CITES Listing. Internat Rev. Hydrobiol., 87, 525– 537.
- Rochard, E., Castelnaud, G. ve Lepage, M., 1990. Sturgeons (Pisces: Acipenseridae); Threats and Prospects, J. Fish Biol., 37A,123-132.
- Rodriguez, F., Oliver, J.F., Marin, A. ve Medina, J.R., 1990. The General Time Stochastic Model of Nucleotid Substitutions, J. Theoretical Biology, 142, 485-501.
- Roe, B.A., Ma, D.-P., Wilson, R.K. ve Wong, F.-H. 1985. The Complete Nucleotide Sequence of the *Xenopus laevis* Mitochondrial Genome, J. Biol. Chem., 260, 9759-9774.
- Rozas, J. ve Rozas, R., 1999. DNAsp Version 3: An Integrated Program for Molecular Population Genetics and Molecular Evolution Analysis, Bioinformatics, 15, 174-175.
- Ruban, G.I, 1997. Species Structure, Contemporary Distributiona and Status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, Environ. Biol. Fish., 48, 221–230.
- Ruban, G.I., 1998. On the species structure of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brant (Acipenseridae), J. Icht., 38, 345-365.
- Ruiz-Rejon, M., de la Herran, R., Ruiz-Rejon, C. ve Garrido-Ramos, M.A., 2000. Genetic Characterization of *Acipenser sturio* L., 1758 in Relation to Other Sturgeon Species Using Satellite DNA, Bol. Inst. Esp. Ocea., 16, 231-236.
- Rzhetsky, A. ve Nei, M., 1993. Theoretical Foundation of the Minimum-Evolution Method of Phylogenetic Inference, Mol. Biol. and Evol., 10, 1073-1095.

- Saitou, N. ve Nei, M., 1987. The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Pphylogenetic Trees, Mol. Biol. Evol., 4, 406-425.
- Saitou, N. ve Imanishi, T., 1989. Relative Efficiencies of the Fitch–Margoliash, Maximum-parsimony, Maximum-likelihood, Minimum-evolution, and Neighborjoining methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree, Mol. Biol. and Evol., 6, 514–525.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. ARLEQUN: Software for Population Genetics Data Analysis (version 2.000). <http://lgb.unige.ch/arlequin/>.
- Silva, E.P. ve Russo, C.A.M., 2000. Techniques and Statistical Data Analysis In Molecular Population Genetics, Hydrobiologia, 420, 119-135.
- Singer-Sam, J., Tanguay, R.L. ve Riggs, A.D., 1989. Use of Chelex to improve the PCR Signal from a Small Number of Cells. Amplifications: A Forum for PCR Users, 11.
- Sokolov, L.I. ve Berdichevskii, L.S., 1989a. Acipenseridae Bonaparte 1831. In: The Freshwater Fishes of Europe (J. Holcík Hrsg.), Vol. 1/II. AULA-Verlag GmbH, Wiesbaden, 150-153.
- Sokolov, L.I. ve Berdichevskii, L.S., 1989b. Acipenseriformes Berg 1940. In: The Freshwater Fishes of Europe (J. Holcík Hrsg.), Vol. 1/II. AULA-Verlag GmbH, Wiesbaden, 148-149.
- Stabile, J., Waldman, J.R., Parauka, F. ve Wirgin, I., 1996. Stock Structure and Homing Fidelity of Gulf Sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) Based on Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of Mitochondrial DNA, Genetics, 144, 767-775.
- Sullivan, J. ve Swofford, D.L., 1997. Are Guinea Pigs Rodents? The Importance of Adequate Models in Molecular Phylogenetics, J. Mamm. Evol., 4, 77–86.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods), Version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J, Waddell, P.J. ve Hillis D.M., 1996. Phylogenetic Inference. In: Molecular Systematics 2. Eds. (eds. Hillis, D.M, Moritz, C. ve Mable, B.K), Sinauer Associates, MA., 407-514,
- Tagliavini, J., Conterio, F., Gandolfi, G. ve Fontana, F., 1999. Mitochondrial DNA Sequences of Six Sturgeon Species and Phylogenetic Relationships Within Acipenseridae, J. App. Ich., 15, 17-22.
- Tajima, F., 1983 Evolutionary Relationship of DNA Sequences in Finite Populations, Genetics, 105, 437-460.
- Tajima, F., 1996. The Amount of DNA Polymorphism Maintained In a Finite Population When the Neutral Mutation Rate Varies Among Sites, Genetics, 143, 1457-1465.

- Takahata, N. ve Palumbi, S.R., 1985. Extranuclear Differentiation and Gene Flow in The Finite Island Model, Genetics, 109, 441–457.
- Tamura K. ve Nei, M., 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of the Mitochondrial DNA in Human and Chimpanzees, Mol. Biol. and Evol., 10, 512-526.
- Tortonese, E., 1989. *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836. In: J. Holcík □ (ed) The Freshwater Fishes of Europe, Vol. 1, Pt. II, General Introduction to Fishes, Acipenseriformes., AULA-Verlag, Wiesbaden., 284– 293.
- Tranah, G.J., 2001. Molecular Genetic Analysis of Hybridization and Population Structure in Endangered Sturgeon and Sucker Species, University of California, PhD Thesis, USA.
- Ustaoglu, S. ve Okumuş, İ., 2004. The Sturgeons: Fragile Species Need Conservation, Turk. J. Fish. and Aq. Sc., 4, 49-57.
- Vecsei, P., 2000. Sexual Dimorphism Of North American Sturgeons (Acpenser Species), MSC Thesies, The University of Guelph.
- Vlasenko, A.D., A.V. Pavlov ve Vasil'ev, V.P., 1989a. *Acipenser persicus* Borodin 1897. In: The Freshwater Fishes of Europe (Holcík J. Hrsg.), Vol. 1/II., AULA-Verlag GmbH, Wiesbaden, 345-366.
- Vlasenko, A.D., Pavlov, A.V., Sokolov, L.I. ve Vasil'ev, V.P., 1989b. *Acipenser gueldenstaedti* Brandt 1833. In: The Freshwater Fishes of Europe (Holcík J. Hrsg.), Vol. 1/II, pp.294-344.. AULA-Verlag GmbH, Wiesbaden.
- Voynova, N.V., Mirzoyan, A.V, Timoshkina, N.N ve Rynza, E.T., 2008. Occurrence of Non-native Specimens of Caspian Origin within the Sea of Azov population of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), J. App. Icht., 24, 50-51.
- Waldman, J.R., Nolan, K., Hart, J. ve Wirgin, I.I., 1996. Genetic Differentiation of Three Key Anadromous Fish Populations of The Hudson River, Estuaries, 19, 759-768.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. ve Higuchi, R., 1991. ChelexÒ 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing from Forensic Material, BioTechniques, 10, 506-513.
- Weir, B.S. ve Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the Analysis of Population Structure, Evolution, 38, 1358–1370.
- Williot, P., Sabeau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T. ve Berni, P., 2001. Sturgeon Farming in Western Europe: Recent Developments and Perspectives, Aquat. Living Resour, 14, 367-374.
- Willem, J. ve Ferguson, H., 2002. On the Use of Genetic Divergence for Identifying Species, Biol. J. Linnean Soc., 75, 59-516.

- Wilmosky, N.J., 1956. *Protoscaphirhynchus squamosus*, a new Sturgeon from the Upper Cretaceous of Montana, Journal of Paleontology, 30, 1205-1208.
- Wirgin, I., Stabile, J.E. ve Waldman, J.R., 1997. Molecular Analysis in The Conservation of Sturgeons and Paddlefish, Env. Biol. Fish. 48, 385-398.
- Wirgin, I., Waldman, J.R., Rosko, J., Gross, R., Collins, M.R., Gordon, S. ve Stabile, J., 2000. Genetic Structure of Atlantic Sturgeon Populations Based On Mitochondrial DNA Control Region Sequences, Tran. Am. Fish. Soc., 129, 476-486.
- Wolf, C., Hübner, P. ve Lüthy, J., 1999. Differentiation of Sturgeon Species by PCR-RFLP, Food Research Intern., 32, 699-705.
- Wright, S., 1951. The Genetical Structure of Populations, Ann. Eugenics, 15, 323-354.
- Yakovlev, V.N., 1977. Phylogenesis of Acipenseriformes. In: Essay on Phylogeny and Systematics of Fossil Fishes and Agnathans, (ed. Menner V.V.), USSR Academy of Sciences, Moscow (in Russian), 116-143.
- Yang, Z., 1993. Maximum-likelihood Estimation of Phylogeny from DNA Sequences When Substitution Rates Differ Over Sites, Mol. Biol. and Evol., 10, 1396-1401.
- Yang, Z., 1994. Maximum-Likelihood Estimation of Phylogeny From DNA Sequences With Variable Rates Over Sites: Approximate Methods, J. Mol. Evol., 10, 1396-1401.
- Yu, X., Zhou, T., Li K. ve Zhou, M., 1987. On The Karyosystematics of Cyprinid Fishes and A Summary of Fish Chromosome Studies in China, Genetica, 72, 225-236.
- Zhang, S.M, Wu, Q.J, Zhang, Y-P, 2001. On The Taxonomic Status of the Yangtze Sturgeon, Asian and American Green Sturgeons Inferred from Mitochondrial Control Region Sequences, Acta Zool. Sin., 47, 632-639.
- Zhang, S.M., Wang, D.Q. ve Zhang, Y.P., 2003. Mitochondrial DNA Variation, Effective Female Population Size and Population History of The Endangered Chinese Sturgeon, *Acipenser sinensis*, Cons. Genetics, 4, 673-683.
- Zubakov, V.A., 1988. Climatostratigraphic Scheme of the Black Sea Pleistocene and its Correlation with the Oxygen-isotope Scale and Glacial events, Quaternary Research, 29, 1-24.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Yozgat ili Boğazlıyan ilçesi A.Sarıkaya köyünde doğdu. İlk ve orta öğretim tahsilini Yozgat'ta tamamladı. 1996 yılında Çumra Ziraat Meslek Lisesinden Ziraat Teknisyeni olarak mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1998 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Gümüşhane Tarım İl Müdürlüğü, Proje ve İstatistik Şubesinde Ziraat Teknisyeni olarak çalışmaya başladı. 2000 yılında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 2002 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsüne Mühendis olarak atandı.

Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Genetik Bölüm başkanlığında araştırmacı olarak çalışmakta ve yürütülen çeşitli projelerde görev almaktadır. Orta derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.