

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DEKİ *DAREVSKIA RUDIS* (BEDRIAGA, 1886) VE *DAREVSKIA  
BITHYNICA* (MEHELY, 1909) TÜRLERİNİN MİKROSATELLİT  
BELİRTEÇLERİ İLE SİSTEMATİĞİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Halime KOÇ**

**NİSAN 2015**

**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DEKİ *DAREVSKIA RUDIS* (BEDRIAGA, 1886) VE *DAREVSKIA BITHYNICA*  
(MEHELY, 1909) TÜRLERİNİN MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ İLE  
SİSTEMATİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Halime KOÇ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28 / 04 / 2015**

**Tezin Savunma Tarihi : 22 / 05 / 2015**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Bilal KUTRUP**

**Trabzon 2015**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'NDA  
Halime KOÇ tarafından hazırlanan**

**TÜRKİYE'DEKİ DAREVSKIA RUDIS (BEDRIAGA, 1886) VE DAREVSKIA BITHYNICA  
(MEHELY, 1909) TÜRLERİNİN MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ İLE  
SİSTEMATİĞİNİN İNCELENMESİ**

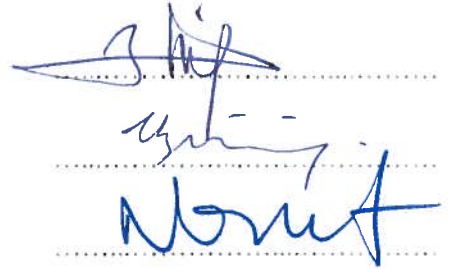
**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 28 / 04 / 2015 gün ve 1600 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Bilal KUTRUP**

**Üye : Doç. Dr. Ufuk BÜLBÜL**

**Üye : Doç. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Türkiye’deki *Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886) ve *Darevskia bithynica* (Mehely,1909) Türlerinin Mikrosatellit Belirteçleri İle Sistematığının İncelenmesi” adlı bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)’nden sağlanan destekle Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Yüksek Lisans Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmamın her aşamasında yardımlarını, desteğini ve ilgisini esirgemeyen, insani-ahlaki değerleri ile örnek aldığım ve özveriyle yapılan tüm çalışmaların başarıya ulaşacağını idrak ettiren değerli hocam Prof. Dr. Bilal KUTRUP’a, tez çalışmamın arazi aşamasında ve örneklerin temininde her türlü fedakarlığı göstererek yardımlarını benden esirgemeyen, sıklıkla bilgisine başvurduğum değerli hocam Doç. Dr. Ufuk BÜLBÜL’e, örneklerin temin edilmesi ve arazi çalışmalarındaki özverisinden ve fotoğraf çekimlerindeki yardımlarından dolayı hocam Mücahit ÇAKMAK, Ali İhsan Eroğlu ve çalışma arkadaşım Muammer KURNAZ’a bu çalışmayı yapabilmem için Trabzon, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü’nde her türlü laboratuvar imkânlarını kullanmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. İlhan AYDIN’a, tez çalışmama ait tüm deney ve analizlerin yürütülmesi ile değerlendirilmesi aşamalarında ilminden sıkça faydalandığım ve yanında çalışmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam Oğuzhan EROĞLU’na; Islah ve Genetik Laboratuvar’ında yürütülen çalışmalar süresince desteklerini asla esirgemeyen, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş oldukları hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocalarım Feridun AFAN, Şirin FİRİDİN, Zehra Duygu BAK ve İlyas KUTLU’ya, tezin düzeltme aşamasında daima yanımda olan Mustafa CÜCE’ye, tüm K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü çalışanları ile Trabzon, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü çalışanlarına, çalışmaların gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne,

Haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bugüne gelmemde büyük emeği olan ve bilime hizmet etme kararına özellikle saygı gösteren ve desteğini bir an olsun bırakmayan değerli ailemin her ferdine teşekkürlerimi sunarım.

Halime KOÇ  
Trabzon, 2015

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Türkiye'deki *Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886) ve *Darevskia bithynica* (Mehely, 1909) Türlerinin Mikrosatellit Belirteçleri İle Sistematiğinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Bilal KUTRUP sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 26/05/2015

Halime KOÇ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	XI
KISALTMALAR DİZİNİ .....	XIII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Squamata Ordosunun Genel Özellikleri .....	2
1.2.1. Lacertilia Subordosunun Genel Özellikleri.....	2
1.2.2. Lacertidae (Asıl Kertenkeleler) Familyasının Genel Özellikleri .....	3
1.2.3. <i>Darevskia</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	4
1.2.4. <i>Darevskia rudis</i> ve <i>Darevskia bithynica</i> Türleri Hakkında Genel Bilgiler .....	5
1.3. Genetik Değişimin Tespiti İçin Moleküler Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Metotlar.....	11
1.3.1. Protein Varyasyonu .....	11
1.3.2. DNA Belirteç Sistemleri .....	12
1.3.3. Mitokondriyal DNA .....	15
1.3.4. Satellit DNA Belirteçleri .....	16
1.3.5. Minisatellit DNA Belirteçleri .....	17
1.3.6. Mikrosatellit DNA Belirteçleri .....	19
1.3.6.1. Genetik Analiz Cihazlarının Veri Toplaması .....	26
1.3.6.2. RFU (Relative Fluorescence Units) (Rölatif Flöresan Birim) .....	26
1.3.6.3. DNA'nın Tespiti ve Boyutunun Bulunması .....	27
1.3.6.4. Allellerin Adlandırılması .....	28
1.3.6.5. Sonuç Tablosu .....	28
1.3.6.6. Allel Pikleri .....	29

1.3.6.7.	Allel Sayısı ve Karışık Örnek .....	30
1.3.6.8.	Yapay Pikler .....	30
1.3.6.9.	Stutter Pikler .....	31
1.3.6.10.	-A Piki .....	31
1.3.6.11.	Yansıma Pikler .....	32
1.3.6.12.	Boya Artıkları .....	32
1.3.6.13.	Pik Benzeri Atımlar .....	32
1.3.6.14.	Allel Düşmesi .....	33
1.3.6.15.	Mikroallel ve Allellik Ladder Dışı Allel .....	33
1.3.6.16.	Parçalanmış DNA .....	34
1.3.6.17.	İnhibisyon .....	34
1.3.6.18.	Genetik Anormallik .....	35
2.	MATERYAL VE METOT .....	39
2.1.	Çalışma Sahası .....	39
2.2.	Örnekleme .....	43
2.3.	Total DNA'nın Elde Edilmesi ve Görüntülenmesi .....	44
2.4.	Primerlerin Belirlenmesi ve DNA'nın Çoğaltılması (DNA Amplifikasyonu) ...	45
2.5.	PCR Ürün Bantlarının Görüntülenmesi .....	47
2.6.	Flöresanlı Primerlerin Belirlenmesi, DNA'nın Çoğaltılması (DNA Amplifikasyonu) ve PCR Ürün Bantlarının Görüntülenmesi .....	48
2.7.	PCR Örneklerinin Sulandırılması .....	49
2.8.	DNA Pürifikasyonu .....	49
2.9.	Mikrosatellit Verilerinin Belirlenme ve Değerlendirilme Aşamasında 3500 Genetik Analiz Cihazı 8ch RUO'da Allel Boylarının Analizi .....	50
2.10.	GeneMARKER (Ver. 1.95) Programında, 3500 Genetik Analiz Cihazı 8ch RUO'da Allel Boylarının Analizinde Elde Edilen Pik Boylarının Belirlenmesi ve Yorumlanması.....	51
2.11.	GenAEx(Ver. 6.501) Programında Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi ...	51
3.	BULGULAR .....	53
4.	TARTIŞMA .....	84
5.	SONUÇLAR .....	91
6.	ÖNERİLER.....	95
7.	KAYNAKLAR .....	96

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ *DAREVSKIA RUDIS* (BEDRIAGA, 1886) VE *DAREVSKIA BITHYNICA* (MEHELY, 1909) TÜRLERİNİN MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ İLE SİSTEMATİĞİNİN İNCELENMESİ

Halime KOÇ

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Bilal KUTRUP  
2015, 108 Sayfa

*Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886) Kafkaslar ve Anadolu'da yaşayan bir kaya kertenkele türüdür. 2013 yılına kadar *Darevskia rudis*'in sadece Anadolu'da 3 alttürü [*D. r. bithynica* (Mehely, 1909), *D. r. tristis* (Lantz ve Cyren, 1936), *D. r. rudis* (Bedriaga, 1886)], Anadolu ve Kafkaslarda 3 alttürü [*D. r. bischoffi* (Böhme ve Budak, 1977), *D. r. macromaculata* (Darevsky, 1967), *D. r. obscura* (Lantz ve Cyren, 1936)] ve sadece Kafkaslarda 2 alttürü [*D. r. svanetica* (Darevsky ve Eiselt, 1980) ve *D. r. chechenica* (Eiselt ve Darevsky, 1991)] adet olmak üzere 8 alttürünün varlığı kabul ediliyordu. 2013 yılında *D. r. bithynica* alttürünün *D. r. tristis* alttürü ile morfolojik olarak benzerlik gösterdiği ve *D. rudis*'e ait diğer alttürlerden yine aynı morfolojik karakterler esas alınarak farklılık gösterdiği gerekçesi ile bu türden ayrılarak *D. bithynica* ismi ile tür seviyesine yükseltilmiştir. Aynı zamanda bu türün 2 alttürü (*D. b. bithynica* ve *D. b. tristis*) tanımlanmıştır. Ayrıca *D. rudis*'e ait olduğu bildirilen Kaçkar Dağları'ndan *D. r. mirabilis* alttürü ile Niğde'den *D. r. bolgardaghika* alttürü yalnızca morfolojik karakterler esas alınarak tavsif edilmiştir. Bu çalışmada ise Mikrosatellit Belirteç Yöntemi (Fragment Analizi) kullanılarak, Türkiye'de yaşadığı bilinen *D. rudis*'e ait 5 alttür ile (*D. r. rudis*, *D. r. mirabilis*, *D. r. macromaculata*, *D. r. obscura* ve *D. r. bischoffi*) ile *D. bithynica* 'ya ait 2 alttürün (*D. b. bithynica* ve *D. b. tristis*) taksonomik durumları 59 lokaliteden toplanan 96 bireyde, 5 adet mikrosatellit lokusu kullanılarak moleküler düzeyde incelendi. Yapılan fragment analizinde, *D. bithynica*'nın ayrı bir tür olduğu moleküler seviyede desteklenmiş oldu. *D. b. tristis* olarak bilinen taksonun ise *D. rudis*'e ait olduğu açığa çıkarıldı. Ayrıca *D. r. mirabilis* taksonunun, *D. rudis*'e ait incelenen diğer tüm alttürlerin popülasyonlarından oldukça farklı bir genetik yapıya sahip olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** *D. rudis*, *D. bithynica*, sistematik, Mikrosatellit, fragment analizi



Master Thesis

SUMMARY

AN INVESTIGATION ON SYSTEMATICS OF *DAREVSKIA RUDIS* (BEDRIAGA, 1886) AND  
*DAREVSKIA BITHYNICA* (MEHELY, 1909) SPECIES IN TURKEY BY MICROSATELLITE  
MARKERS

Halime KOÇ

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Bilal KUTRUP  
2015, 108 Pages

*Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886) is a rock lizard species living in the Caucasus and Anatolia. Until 2013, *Darevskia rudis* was considered the presence of 8 subspecies that 3 subspecies [*D. r. bithynica* (Mehely, 1909), *D. r. tristis* (Lantz et Cyren, 1936), *D. r. rudis* (Bedriaga, 1886)] in only Anatolia; 3 subspecies [*D. r. bischoffi* (Böhme und Budak, 1977), *D.r. macromaculata* (Darevsky, 1967), *D.r. obscura* (Lantz et Cyren, 1936)] in Anatolia and Caucasia; 2 subspecies [*D. r. svanetica* (Darevsky und Eiselt, 1980) ve *D.r. chechenica* (Eiselt und Darevsky, 1991)] in only Caucasus. *D. r. bithynica* subspecies that living in only Anatolia as demonstrated *D. r. tristis* subspecies by morphological similarities and *D. r. bithynica* restricted *D. rudis*' s other subspecies based on the same morphological characters was raised to species level on *D. bithynica* in 2013. Therewith, 2 subspecies of this species (*D. b. bithynia*, and *D. b. tristis*) is defined. Also, *D. r. mirabilis* from Kaçkar Mountains and *D. r. bolgardaghika* from Niğde, has been characterized as the basis of morphological characters only of *D. rudis*. In this study, the taxonomic status 5 subspecies (*D. r. rudis*, *D. r. mirabilis*, *D. r. macromaculata*, *D. r. obscura* ve *D. r. bischoffi*) of *D. rudis* and 2 subspecies (*D. b. bithynica* ve *D. b. tristis*) of *D. bithynica* that collected from 59 localities from Turkey, 96 individuals were investigated at the molecular level using 5 microsatellit loci. In the fragment analysis, *D. bithynica* was introduced as a separate species at the molecular level. The taxa which known as *D. b. tristis* was revealed to belong to *D. rudis*. Also, *D. r. mirabilis* was determined to has a quite different genetic structure than other subspecies studied populations of *D. rudis*.

**Key Words:** *D. rudis*, *D. bithynica*, systematic, Microsatellite, fragment analysis

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. <i>D. bithynica</i> ve <i>D. tristis</i> 'in dağılış haritası .....	5
Şekil 2. <i>D. rudis</i> 'in tüm alttürlerinin dağılışını gösteren harita .....	6
Şekil 3. Polimeraz enziminin kayması sonucu mikrosatellitlerde oluşan mutasyon .....	20
Şekil 4. Eşit olmayan Crossing Over'in gösterimi .....	21
Şekil 5. Bir popülasyondaki homozigot ve heterozigot bireylere ait mikrosatellit lokuslarının PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen bantların jel elektroforezi yardımıyla görüntülenmesi .....	22
Şekil 6. Mikrosatellit lokuslarında tekrar sayılarına göre pik görüntüleri .....	22
Şekil 7. Homozigot bir bireye ait mikrosatellit lokusu fragment analizi sonucu .....	23
Şekil 8. Heterozigot bir bireye ait mikrosatellit lokusu fragment analizi sonucu .....	23
Şekil 9. Fragment analizinde pik boylarının belirlenmesine ait sonuç tablosu .....	29
Şekil 10. Homozigot ve heterozigot allel piklerinin gösterilmesi .....	30
Şekil 11. Yapay piklerin gösterilmesi .....	31
Şekil 12. Zaman çizelgesi: Mikrosatellit DNA 'nın keşfinden sonraki ilk 13 yılda neler yapıldı? .....	36
Şekil 13. 1990 yılından 2009 yılına kadar mikrosatellit metodunun kullanımındaki artışı gösteren grafik .....	36
Şekil 14. Bu çalışmada incelenen kertenkele örneklerinin toplandığı lokaliteler .....	40
Şekil 15. Doku örneklerinin izolasyona hazırlanma aşamasında bir gece bekletildiği etüv .....	44
Şekil 16. DNA izolasyonlarının gerçekleştirildiği cihaz .....	45
Şekil 17. PCR örneklerinin yüklendiği jel ve elektroforez sistemi .....	47
Şekil 18. PCR örneklerinin jel üzerinde görüntülediği cihaz .....	48
Şekil 19. Mikrosatellit verilerinin belirlenme ve değerlendirilme aşamasında kullanılan 3500 Genetik Analiz Cihazı 8ch RUO .....	50
Şekil 20. Kertenkele örneklerinden izole edilen dokuların DNA görüntüleri .....	53
Şekil 21. İzolasyonları gerçekleştirilen DNA örneklerinin uygun şartlar altında gerçekleştirilen PCR görüntüleri .....	54
Şekil 22. Uludağ grubuna ait pik görüntüleri .....	55
Şekil 23. Düzce grubuna ait pik görüntüleri .....	56

Şekil 24. Trabzon grubuna ait pik görüntüleri .....	57
Şekil 25. Rize-Ovit grubuna ait pik görüntüleri .....	58
Şekil 26. Şavşat grubuna ait pik görüntüleri .....	59
Şekil 27. Ardaneç grubuna ait pik görüntüleri .....	60
Şekil 28. Artvin grubuna ait pik görüntüleri .....	61
Şekil 29. Bu çalışmadaki verilere göre Rasgele Fst değerleri ve hesaplanan gözlenen Fst değerlerinin dağılımı .....	62
Şekil 30. Mikrosatellit lokuslara ait verilerin grafik üzerinde gösterimi .....	73
Şekil 31. Principal Coordinates (PCoA) analizi kullanılarak Fst değerlerine göre grupların koordinat sisteminde dağılımının gösterilmesi .....	82
Şekil 32. Principal Coordinates (PCoA) analizi kullanılarak Linear Fst değerlerine göre grupların koordinat sisteminde dağılımının gösterilmesi .....	82
Şekil 33. Grupların dendogram üzerinde gösterimi 1 .....	83
Şekil 34. Grupların dendogram üzerinde gösterimi 2 .....	94

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Genetik çalışmalarda kullanılan belirteç tipleri, özellikleri ve potansiyel uygulama sahaları.....	14
Tablo 2. 2009-2010 yıllarında Moleküler Ekoloji Dergisi'nde Mikrosatellit DNA Yöntemi kullanılarak yapılan her biri kendi içerisinde orijinal yayınlar .....	37
Tablo 3. Bu çalışma için toplanan kertenkele örneklerinin popülasyon isimleri ve lokaliteleri .....	41
Tablo 4. Doku izolasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan karışımın içeriği .....	43
Tablo 5. Bu çalışmada kullanılan mikrosatellit lokusların adları, primerler ve primerlerin çalıştığı ideal sıcaklıklar .....	46
Tablo 6. Mikrosatellit bölgeleri için çalışılan PCR kondisyonu .....	46
Tablo 7. Bu çalışma için hazırlanan flöresanlı primerler ve temsil ettikleri renkler (flöresanlı boyalar) .....	49
Tablo 8. DNA pürifikasyonu işleminde kullanılan karışımın içeriği .....	50
Tablo 9. Lokusların tamamının gruplar için polimorfik olduğunu gösteren tablo .....	54
Tablo 10. Her bir lokusa ait toplam allel sayıları ve ortalaması ile beklenen heterozigotluk- gözlenen heterozigotluk değerleri ve ortalaması .....	62
Tablo 11. Du215 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı .....	63
Tablo 12. Du215 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı .....	65
Tablo 13. Du323 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı .....	67
Tablo 14. Du418 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı .....	69
Tablo 15. Mikrosatellit lokuslara ait veriler .....	70
Tablo 16. Popülasyonların her bir lokustaki Hardy-Weinberg analizi .....	72
Tablo 17. Gruplara ait bireylerde farklılık gösteren özel allellerin adet ve isimleri .....	74
Tablo 18. Nei'nin genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler .....	78
Tablo 19. Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler .....	79
Tablo 20. Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler .....	80
Tablo 21. Linear Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler .....	81
Tablo 22. Nei'nin genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar .....	91

Tablo 23. Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar .....	92
Tablo 24. Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar .....	92
Tablo 25. Linear Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar .....	93

## KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
AMOVA	: Moleküler Varyans Analizi
ddH <sub>2</sub> O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EST	: İfade edilmiş sekans işaretleri
Fst	: Fiksasyon indeksi
Indels	: Genetik kodlamalardaki nükleotitlerin eklenmesi çıkarılmasını ifade eden mutasyon
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
PCoA	: Principal Coordinates Analizi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Pop	: Popülasyon
QTL	: Genetik haritaların oluşturulması
RAPD/AP-PCR	: Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RFU	: Rölatif Flöresan Birim
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi
SSLP s	: Tek dizi uzunluk polimorfizmi
SSRs	: Basit dizin tekrarları
STRs	: Kısa ardışık tekrarlar
UV	: Ultraviyole

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Reptil, Latince'deki "repere" (sürünmek) ve "reptum" (sürünerek hareket eden) kelimelerinden köken alan reptilia, sürüngen sınıfının bilimsel adı olarak kullanılır. Bu sınıfa yılanlar, kertenkeleler, kaplumbağalar, timsahlar ve sphenodon denen tek bir türü olan "Kalak Başlılar" grubu (Ordo: Rhynchocephalia) dahildir. Bu 5 tip hayvan bugün yaşayan sürüngenleri temsil etmektedir. Fosil grupları da dikkate alınırsa 16 sürüngen çeşidinden söz etmek gerekir. Sürüngenlerin çoğu fosil formlardır ve en bol buldukları zaman Mesozoik'tir (Kuru, 1999).

Sürüngenler, omurgalıların "Tetrapoda" denen "4 bacaklılar" yahut "kara omurgalıları" grubunun ikinci sınıfını teşkil ederler. Her bir bacakta 5 parmak ve parmak uçlarında keratin yapısındaki tırnaklar bulunur. Embriyolarında embriyoyu saran bir amnion zarına sahiptirler. Bütün amniota grubunda olduğu gibi erginlerinde boşaltım organı olarak metanefroz tip böbrek, embriyolarında ise mezonefroz tip böbrek bulunur. Kalpleri 3 gözlü ile 4 gözlü kalp arasında bir yapı gösterir. Genel olarak kalpleri 2 atrium ve kısmen ikiye bölünmüş bir ventrikulus içerir. Bu nedenle sürüngenlerin tamamı "poikilotherm" (vücut sıcaklığı çevre sıcaklığına göre değişen, soğukkanlı) hayvanlardır.

Alyuvarları nukleuslu ve oval şekillidir. Ekseriyetle ayrı eşeylidirler ve gruplara göre farklı sayılarda "kopulasyon organı" (penis, hemipenis) mevcuttur. Daima iç dölleme vardır. Kertenkelelerde çift kopulasyon organı (hemipenis) bulunur. Ekseriyetle ovipardırlar. Fakat bazı türlerde gerçek vivipari de görülür. Gelişimlerinde larva safhası, diğer bir deyişle metamorfoz yoktur. Önemli özellik olarak, derileri keratin (epidermik) pullar ve plaklar ile örtülüdür. Bunlar vücudu mekanik etkilerden korumanın yanında vücudun fazla su kaybetmesini de engeller. Derileri bez bakımından fakir ve kurudur. Salgı bezleri neredeyse yok gibidir. Kaplumbağalar hariç, sürüngenlerin hepsinde çenelerde gerçek dişler bulunur (Kuru, 1999).

## 1.2. Squamata Ordosunun Genel Özellikleri

Çok belirgin olarak kiremit gibi dizilmiş kıkırdak pullu, bazen deri kemikleri taşıy (kabuklu kertenkele). Pulların dizilişi çok defa türlere özgüdür. Kloakları enine yarıktır, erkeklerin hemipenisleri çifttir. Bazı pulların yapısı büyük ölçüde değişebilir (eşeylere göre). Bazen pullar, karina, diken ve tüberküller de taşıyabilirler. Pullar, çok defa başta ve ventral tarafta daha büyüktür. Birçok yılanda, karın tarafı, boyuna dizilmiş geniş yapılı birçok pulla örtülmüştür. Bunlar harekete yardımcı olur. Pullar, algılama görevi yapan duyu alanları ve kıl gibi ince uzantılar da taşırlar (bazı *Agama* türlerinde). Pullar periyodik olarak ya tüm olarak (yılanlarda ve bazı Geko türlerinde) ya da parça parça (kertenkelelerde) değiştirilir. Deri değiştirmeye hazırlık, gözlerin donuklaşması ile anlaşılır. Dermisteki farklı renk hücreleri yalnız başlarına ya da birlikte derinin rengini oluşturur. Renk değişimi, melaninin, melanoforlarda yer değiştirmesi ile olur. Özellikle Bukalemunda renk değiştirme çok belirgindir. Agamalarda, Iguanalarda ve birkaç gündüzcü Gekoda renk, ışıkla, sıcaklıkla ve uyarılma ile değişir. Deri bezce fakirdir. Bezlerin çoğu holokrindir. Dil genellikle çatallıdır, esas görevi koku taneciklerini, burun boşluğundan yalıtılmış ve ağız boşluğuna açılan Jacobson organına taşımadır.

Üyelerde körelme, genel bir eğilimdir; sadece yılanlarda değil, keza kertenkelelerin bazı gruplarında da üye körelmesi görülür. Pek az türü sadece sularda (denizyılanı), bir kısmı da kıyılara yakın sularda (bazı kertenkeleler ve Agamalar) yaşar. Birçok Squamata derisini ve kuyruğunu yeniler. Kuyruk, daha önce özel bir omurla belirlenmiş yerden kopar (ototomi). Yenilenen kısım eskisine nazaran daha basit yapılı oluşur ve omur taşımaz; sadece kıkırdak bi destek iskelete sahiptir. *Lacerta* türlerinde yeni kuyruk günde 2 mm kadar büyüyebilir (Demirsoy, 2003).

### 1.2.1. Lacertilia Subordosunun Genel Özellikleri

Çoğunlukla 4 bacaklı olmakla birlikte duruma göre bazen bu bacaklar körelmiştir; fakat üye kemerlerinin kalıntısı hemen her zaman mevcuttur. Kulak zarı her zaman; pariyetal göz ise oldukça yaygın olarak vardır. Çok defa hareketli göz kapakları ve üçüncü göz kapağı vardır. Alt çene sağlam bir ekleme sahiptir; kafatası kemikleri ise çok defa sıkı bir şekilde birbirlerine bağlanmıştır. Kuyruk, genellikle bir kopma çizgisine sahiptir. Kuyruğu atma yetenekleri vardır.



Çöllerden denizlere kadar değişik ortamları işgal etmişlerdir. Toprak altında yaşayanların üyeleri körelmiştir. Derileri vücuda gevşek ve esnek bir şekilde bağlanmıştır. Pullar, kiremit gibi 9. dizilidir; vücudun alt tarafındaki pullar daha küçük yapılıdır. İdrar kesesi vardır. Kloak kanalı ile dışarıya atılan idrar, katı haldedir ve kuşlarda olduğu gibi ürik asit bileşimindedir. Genellikle böcekleri ve küçük omurgalıları yerler; otçul olanları da vardır. Kural olarak erkekleri kalça porları taşır, birçoğunda deri tarak ve çıkıntılar bulunabilir ve özellikle üreme dönemlerinde daha canlı renklidirler. Ovipar, ovovivipar ve vivipar olanları (gerçek plasentalı) vardır. Erginleşme süreleri genellikle 2-4 ay sürer. Bazı türlerinde partenogenez görülür (Demirsoy, 2003).

### 1.2.2. Lacertidae (Asıl Kertenkeleler) Familyasının Genel Özellikleri

Madagaskar ve Avustralya dışında Eskidünya'ya geniş olarak yayılmış bu familyanın üyeleri tipik bir kertenkelenin vücut yapısını gösterir. Boyları nadiren 30 cm'yi aşar (en fazla bir türü, *Lacerta lepida*, 60 cm'dir). Oransal olarak küçükbaşları, büyük ve simetrik olarak düzenlenmiş boynuzumsu plaklar ile kaplıdır. Pulların altında kemik plaklar yoktur. Kuyruğun kopma noktası, 6. kuyruk omurunu 7. omura bağlayan, kıkırdağımsı bir yerdir. Kuyruğu her zaman uzundur ve kolayca kopabilir. Kopan kuyruk belirli bir süre kendi kendine hareket eder. Buradaki kasların ani kasılmasıyla kuyruk kopar. Yenilenen kuyrukta omur yoktur. Genç yaşta yenilenen kuyruk aslına daha çok benzer. Yaşlandıkça ve kopma işlemi tekrarlandıkça, yenilenen kuyruğun şekli daha bozuk olarak ortaya çıkmaya başlar. Bazen, yenilenme sırasında çok kuyrukluluk ortaya çıkar. Gözkapakları hareketli; gözbebekleri yuvarlaktır. Bazen alt göz kapağında saydam bir kısım bulunur. Kulak açıklığı her zaman bulunur. Dilleri uzun ve çatallıdır. Dişleri pleurodont ve çenelerin iç kenarına dizilmiş durumdadırlar.

Her zaman 4 bacaklıdırlar ve bacakları iyi gelişmiştir. Her ayakta 5 parmak vardır. Çok hızlı koşar ve hemen saklanabilirler. Renkleri çok değişkendir. Kurak yerlerde yaşayanları daha çok kahverengi olmalarına karşın, güneş gören ormanlık alanlarda yaşayanların çoğunluğu yeşildir. Birçoğu, boyutları ve şekli popülasyonlara göre değişen boyuna şeritler ve benekler taşır. Kumlu, taşlı ve kısa otlu arazilerde bulunurlar. Nadiren ağaçlara tırmanır; ancak pek azı ormanda bulunur. Gündüz aktiftirler; genellikle güneşli ve yarı kurak yerleri tercih ederler; nemli yerleri sevenlerin sayısı çok azdır. Hemen hepsi küçük omurgasızlarla, özellikle böceklerle beslenirler. Birkaç iri türü, genç kemirgenler

hatta yılanlarla beslenirler. Bazı meyveleri yedikleri de bilinmektedir. Sadece küçük adalarda yaşayan bazı türleri sadece bitki yer. Özellikle erkeklerin arka femur bölgelerinde bulunan porlardan çıkan bazı salgılar, çiftleşme döneminde diğer erkeklere territoryumu bildirir. Hemen hepsi ovipardır. Yalnız *Lacerta*, *Eremias* ve yüksek dağlarda yaşayan bazı bazı cinslerinin bazı türlerinde ovoviviparlık görülür. Bu familyaya ait türlerin birçoğu, lokal popülasyonlarda çok değişiklikler (varyasyon) gösterdiğinden, bir alttür olabileceklerini de her zaman göz önünde tutmak gerekir (Demirsoy, 2003).

### 1.2.3. *Darevskia* Cinsinin Genel Özellikleri

Frontal plak oldukça geniştir. Oksipital plak hemen her zaman mevcuttur. Burun deliği 2-4 bazen 6 plak arasında yer alır ve supralabial plak ile temastadır. Alt göz kapağı çoğunlukla pulludur; bazen saydam bir pencere bulunabilir. Collare (yakalık) gelişmiş durumdadır. Parmak altındaki pullarda karina bulunmaz; femoral delikler her zaman vardır. Avrupa, Batı Asya ile Orta ve Kuzey Afrika'da yaygındırlar (Demirsoy, 2003).

*Darevskia rudis* Türünün Sistematikteki Yeri (Arribas ve ark., 2013):

- Phylum : Chordata (Kordalılar)
- Grup : Craniata (Kafatası olanlar)
- Subphylum : Gnathostomata (Gerçek çeneliler)
- Superclasis : Tetrapoda (Dört üyeliler)
- Clasis : Reptilia (Sürüngenler)
- Ordo : Squamata (Pullular)
- Subordo : Lacertilia (Kertenkeleler)
- Familia : Lacertidae
- Genus : *Darevskia*
- Species : *Darevskia rudis*

Subspecies:

- *Darevskia rudis rudis*
- *Darevskia rudis mirabilis*
- *Darevskia rudis macromaculata*
- *Darevskia rudis obscura*
- *Darevskia bischoffi*

*Darevskia bithynica* Türünün Sistematikteki Yeri ve Morfolojik Özellikleri:

- Phylum : Chordata (Kordalılar)
- Grup : Craniata (Kafatası olanlar)
- Subphylum : Gnathostomata (Gerçek çeneliler)
- Superclasis : Tetrapoda (Dört üyeliler)
- Clasis : Reptilia (Sürüngenler)
- Ordo : Squamata (Kertenkeleler)
- Familia : Lacertidae
- Genus : *Darevskia*
- Species : *Darevskia bithynica*

Subspecies :

- *Darevskia bithynica bithynica*
- *Darevskia bithynica tristis*

#### 1.2.4. *Darevskia rudis* ve *Darevskia bithynica* Türleri Hakkında Genel Bilgiler

*Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886)'in yayılış alanı kuzeyde Çeçenistan'dan güneyde Azerbaycan-Karabağ Bölgesi'ne, doğuda Hazar Denizi'nin batı kıyısından batıda Niğde ili Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi boyunca uzanır (Şekil 1).



Şekil 1. *D. rudis* 'in tüm altürlerinin dağılışını gösteren harita (URL-1)

*Darevskia rudis*, dağılış alanı içerisinde 6 tanesi [*D. r. bischoffi* (Böhme ve Budak, 1977), *D. r. bolgardaghica* (Arribas, 2013), *D. r. macromaculata* (Darevsky, 1967), *D. r. mirabilis* (Arribas, 2013), *D. r. obscura*, (Lantz ve Cyren, 1936) ve *D. r. rudis* (Bedriaga, 1886)] Anadolu'da ve 2 tanesi [*D. r. chechenica* (Eiselt&Darevsky, 1991) ve *D. r. svanetica* (Darevsky&Eiselt, 1980)] Kafkaslar' da olmak üzere 8 alttüre ayrılır (URL-1-2).

*Darevskia bithynica*, yayılış alanının tamamı Türkiye'yi kapsayacak şekilde 2 alttüre [*D. b. bithynica* (Mehely, 1909) ve *D. b. tristis* (Lantz ve Cyrén, 1936)] sahiptir. *D. b. bithynica*'nın dağılış alanı Uludağ ile sınırlı iken *D. b. tristis*'in dağılış alanı Batı Karadeniz Bölgesi'dir (Şekil 2).



Şekil 2. *D. b. bithynica* ve *D. b. tristis* 'in dağılış haritası (URL-2)

*Darevskia rudis* ilk olarak 1886 yılında Bedriaga tarafından Batum örneklerinden *Lacerta depressa* var. *rudis* olarak tanımlanmıştır. Dr. Jean Valentin'in Batum ve Tiflis'ten topladığı örnekler ile Bedriaga'nın Batum'dan topladığı örneklerin, 1892 yılında Boettger tarafından karşılaştırmalı incelemesinin sonucunda *Lacerta depressa* olarak bilinen türün aslında *Lacerta muralis*'in bir varyetesi olduğu söylenmiş ve Batum ile Tiflis'ten toplanan örnekler *Lacerta muralis* var. *depressa* f. *modesta* olarak tayin edilmiştir. Boulenger (1904) *L. muralis*'in tür tanımını desteklemiştir fakat bu tür için *Lacerta muralis* var. *depressa* olarak bir ayrıma gitmiştir.

1909 yılında Mehely tarafından yapılan oldukça kapsamlı bir araştırmada, ilk olarak Eversmann tarafından 1834 yılında tavsif edilen ve o zamana kadar *Lacerta muralis* ile

konspesifik olduğu gerekçesi ile kabul görmeyen (Boetger, 1892; Boulenger, 1904, 1913) ve Camerano (1873) tarafından tavsif edilen *Lacerta depressa*'nın sinonimi olarak görülen *Lacerta saxicola* türünün varlığına işaret edilmiştir.

Mehely (1909), *L. saxicola*'nın *Lacerta muralis*'ten farklı olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca bu türün politipik bir tür olduğunu bildirmiş ve *rudis* örneklerini *Lacerta saxicola rudis* olarak isimlendirmiştir. Bu çalışmanın kabul edilmesinin ardından bu isimlendirme kabul görmüştür (Nikolskii, 1916; Lantz ve Cyren, 1936; Terentijev ve Chernov, 1940, 1949).

1967 yılına gelindiğinde Darevsky, *Lacerta saxicola* örneklerini mercek altına alarak bu tür ile ilgili geniş kapsamlı bir revizyon çalışması hazırlamıştır. Bu revizyon çalışmasına göre *Lacerta saxicola rudis, saxicola*'dan farklıdır ve ayrı bir tür olarak tanımlanması gereklidir. Bu bilgi ışığında *Lacerta saxicola rudis, saxicola*'dan ayrılmış ve tür düzeyine çıkarılmıştır. Ayrıca, 1936 yılında Lantz ve Cyren tarafından tavsif edilen *Lacerta saxicola obscura*'yı da bu türün alttürü olarak tanımlamıştır. Aynı çalışmada *Lacerta rudis* türüne ait *Lacerta rudis macromaculata* alttürü tavsif edilmiştir (Darevsky, 1967).

Böhme ve Budak, 1977 yılında *Lacerta rudis*'in Türkiye revizyonunu hazırlamış ve Rize civarından topladıkları örneklerin diğer popülasyonlardan farklı olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde olan bir araştırmada Böhme und Budak (1978) Rize ve doğusundaki popülasyonları *Lacerta rudis bischoffi* adıyla yeni bir alttür olarak rapor etmişlerdir. Bunun yanında, Lantz ve Cyren'in 1936 yılında belirttiği gibi türün ilk defa Bedriaga tarafından 1886 yılında Batum'dan toplanmadığını Camerano tarafından 1878 yılında Trabzon'dan toplandığını ortaya koyarak terra typica designata'ya gitmişlerdir.

Türün bir başka alttürü olan *tristis* ilk kez Lantz ve Cyren tarafından 1936 yılında Adapazarı'ndan toplanarak *Lacerta saxicola tristis* olarak tavsif edilmiştir. Ayrıca, bu alttürün Anadolu'da yaşayan ve bu çalışmada tavsifi yapılan *mehelyi* ve *obscura* formlarının *Lacerta saxicola*'nın iki yeni alttür ile yakın filogenetik ilişkisine dikkat çekmişlerdir. Bu alttürün varlığında Terentijev ve Chernov (1940), Bodenheimer (1944), Mertens (1952), Darevsky (1965, 1967a, 1967b) ve Başoğlu ve Baran (1977) hem fikir olmuşlardır. Mertens 1952 yılında yaptığı bir araştırmada *Lacerta saxicola tristis*'in Bolu ili civarında da bulunduğunu rapor etmiş ve bu formun bazı morfolojik özellikleri bakımından paratiplerinden farklılıklar taşıdığını bildirmiştir.

Darevsky ve Eiselt 1967 yılında, Lantz ve Cyren tarafından tavsif edilen *Lacerta saxicola mehelyi* alttürünün nomen nudum içerdiğini belirterek *mehelyi* alttürünün yayılış sahasındaki formlarını incelemiş ve Adapazarı'ndan Sinop'a kadar yayılış gösteren *mehelyi* formunu *tristis* alttürüne dahil etmişler ve bu yayılış sahasının doğu kısmında da yeni bir alttürün bulunduğunu belirtmişlerdir.

Darevsky ve Lukina (1977) Clark ve Clark tarafından 1973 yılında toplanan örneklerle yaptığı bir araştırmada *Lacerta saxicola tristis* olarak bilinen formun; Lantz ve Cyren' in 1936 yılında belirttiği gibi *obscura* ile olan benzerliğine dikkat çekmişler ve en azından tür düzeyi bakımından bu iki formun konspesifik olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında Darevsky'nin 1967 yılında yaptığı bir revizyon çalışmasında, *obscura*' nın, *Lacerta rudis*'in alttürü olarak değerlendirilmesinin bir sonucu olarak *Lacerta saxicola tristis*' in *rudis*'in bir alttürü olarak kabul edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Böhme ve Budak (1977) Anadolu'dan topladıkları *rudis* örneklerini incelemişler ve Kızılırmak Nehri'nin *rudis* popülasyonlarında, alttür düzeyinde sınır teşkil ettiğini belirterek *tristis*' i *Lacerta rudis*' in bir alttürü olarak değerlendirmişlerdir (Tayhan, 2008).

2013 yılında Arribas ve ark. tarafından hazırlanan bir morfoloji çalışmasında, o zamana kadar *Darevskia rudis*'in bir alttürü iken tür düzeyine çıkarılan *bithynica* ilk kez Werner tarafından 1902 yılında Uludağ'dan toplanmış ve *Lacerta depressa* türüne dahil edilmiştir. *bithynica*' nın, *Lacerta depressa* türüne dahil edildiği çalışmada bu örneklerin Bedriaga tarafından 1886 yılında Tiflis ve Batum'dan toplanan *Lacerta depressa* var. *rudis* olarak betimlenen örnekler ile morfoloji açısından aşırı benzerliğine dikkat çekilmiştir. Boulenger ise 1904 ve 1913 yıllarında yaptığı araştırmalarda *Lacerta depressa* olarak bilinen türün Boettger'in 1892 yılında belirttiği gibi *Lacerta muralis*' in bir varyetesi olduğunu savunmaktadır ve bu görüşten yola çıkarak Uludağ örneklerini *Lacerta muralis* var. *chalybea* olarak tavsif etmiştir. Mehely ise 1909 yılında geniş bir sahada yürüttüğü çalışmasıyla *Lacerta saxicola* türünün varlığına dikkat çekerek Amasya ve Uludağ örneklerini *Lacerta saxicola bithynica* alttürü olarak tavsif etmiştir. Nikolskii ise 1916 yılında topladığı örnekleri değerlendirerek *chalybea* alttürünün *Lacerta saxicola*' ya dahil edilmesi gerektiğini ve Uludağ örneklerinin bu kategoride değerlendirilmesi gerektiğini savunmuştur. 20 yıl sonra Lantz ve Cyren'in kaya kertenkeleleri ile yaptığı çalışmada Mehely (1909)' i desteklemiş ve Uludağ örneklerini *Lacerta saxicola bithynica* olarak tayin etmişlerdir. İlerleyen dönemlerde de *bithynica* alttürünün varlığı desteklenmiştir (Terentijev ve Chernov, 1940; Bodeheimer, 1944; Darevsky, 1967; Başoğlu ve Baran,

1977). Böhme ve Bischoff 1984 yılında *bithynica*'nın *Lacerta rudis* ile olan morfolojik benzerliğine dikkat çekerek *bithynica* alttürünün *Lacerta rudis* türüne dahil etmişlerdir. *bithynica*, 2013 yılına kadar da *Darevskia rudis*'in alttürü olarak bilinmekteydi.

2013 yılında Arribas ve ark. tarafından morfolojik karakterlerin esas alınarak hazırlandığı çalışmada *bithynica* tür düzeyine çıkarılırken *D. b. bithynica* nominant alttür kabul edilerek, *tristis*' in de bu türün bir diğer alttürü olduğu rapor edilmiştir.

Böhme ve Budak 1977 yılında yaptıkları çalışmada Amasya örneklerini *Lacerta rudis rudis* olarak tayin etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında *bithynica* türünün yayılış sahasının yalnızca Uludağ ile sınırlı kaldığı görülmektedir. Böhme ve Budak'ın bir sene sonra yaptıkları bir araştırmada Kızılırmak Nehri'nin *tristis* ve *rudis* alttürleri arasında bariyer görevi gördüğünü bildirmişlerdir.

*Lacerta rudis* türüne ait yeni alttürlerin tavsif edildiği ve türün kapsamlı revizyonunun yapıldığı çalışmalarda *tristis* ve *bithynica* örnekleri değerlendirilmemiştir (Darevsky ve Eiselt, 1980; Eiselt ve Darevsky, 1991).

1999 yılına kadar *Lacerta rudis* olarak bilinen bu tür Arribas (1999) tarafından yapılan morfolojik, osteolojik ve karyolojik çalışma sonrasında diğer kaya kertenkeleleri ile birlikte genus ismi değiştirilerek *Darevskia* genusuna dahil edilmiştir (Derivito nominis: I.S. Darevsky, Institute of Zoology, Russian Academy of Science, St Petersburg, Russia).

Yukarıda da belirtildiği gibi 2013 yılına kadar *D. r. bithynica* ve *D. r. tristis* olarak bilinen alttürler hakkında tam bir değerlendirme çalışması yapılmamıştır ve bu alttürlerle ait kapsamlı veriler bulunmamaktadır. Bu yüzden de tür ve alttür değerlendirmeleri tamamen yorumsal olmuştur. Şayet önceden yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi *bithynica*, *tristis*'ten farklılık gösteriyorsa bu durum, *bithynica*'nın büyük bir kara parçası üzerinde bir ada popülasyonu yapısı göstermesinden kaynaklanır (Böhme ve Bischoff, 1984). 2013 yılına gelindiğinde ise Türkiye'de *D. rudis*'e ait tüm popülasyonlar morfolojik olarak incelenmiş *bithynica*'nın tür düzeyine çıkarılmasına karar verilmiştir. Bunun neticesinde *D. bithynica bithynica* nominant alttür olurken, *D. bithynica tristis* ise bu türün alttürü olmuştur.

Aynı çalışmada *D. rudis*'in 2 yeni alttürü daha tavsif edilmiştir. Bu tavsifler de morfolojik kriterlere göre yapılmıştır. İlki, *D. r. bolcardaghica*'dır ve tip lokalitesi Karagöl, Ulukışla-Niğde'dir. Söz konusu alttür, dorsalinin oldukça açık tonlarda olması, rostral ve frontonasal plaklarının ayrı olması, suprasiliyar granül serilerinin genellikle tam ve kesintisiz olması, masetterik plağın timpanik plak kadar yahut daha küçük olması,

massetterik ile timpanik plak arasındaki pul sayılarının 2 ila 4 arasında olması, plakların genellikle sert ve karınalı olması, dorsal pul sayısı ve baş üzerinde bulunan plakların sayısının benzerliği, femoral por, lamella sayısı, arka bacak uzunluğu, analı çevreleyen plak sayısı ve anal plak ölçümlerindeki düşük değerler, üst çenede bulunan diş sayısı ve dişlerin büyüklüklerindeki benzerlik, sternal frontanelin farklı oluşu, postfrontal ve postorbitalinin neredeyse eşit olması ile postorbitalin, skuamoz uzunluğunun yarısına yakın bir kısmı ile örtüşmesi özellikleriyle *D. rudis*'in alttürü kabul edilmiştir. İkincisi, *D. r. mirabilis*'tir ve tip lokalitesi Ovit Geçiti'dir. Söz konusu alttür, ise bir *D. rudis* bireyinde olduğu gibi rostral ve frontonasal plakların ya temas halinde ya da tamamen ayrı olması (örneklerin yarısında temas halinde olduğu kaydedilmiştir), suprasiliyar granüllerin neredeyse her örnekte kesintili olması, massetterik plağın timpanik plaktan daha büyük olması ve bu iki plağın arasında yalnızca bir adet pulun sınır teşkil etmesi, tibial plakların kısmen karınalı olması, dorsaldeki pul sayısının, analı çeviren plak sayılarının ve anal plak ölçümlerindeki yüksel değerler, femoral por sayısının ve arka bacak uzunluğunun neredeyse baş kadar kısa olması, postfrontal ve postorbitalinin neredeyse eşit olması ve köprücük kemiklerinin birbirlerine bakan kısımları içe doğru kavisli değil haç biçiminde olması ile *D. rudis*'in alttürü kabul edilmiştir (Arribas ve ark., 2013).

Yukarıda sözü geçen türler ve alttürlerin yayılış sahaları Türkiye'yi kapsamaktadır. *D. rudis*'in yayılışı Türkiye'yi kapsamayan 2 alttürü daha vardır. Bunlardan biri *D. r. svanetica* olup 1980 yılında Eiselt ve Darevsky tarafından kuzey Gürcistan ve kuzeybatı Abhazy'a'nın merkez bölgelerinin güney yamaçlarında *D. rudis*'ten morfolojik olarak farklılıklar gösterdiği gerekçesiyle ayrı bir alttür olarak tanımlanmıştır. Bir diğeri, *D. r. chechenica* olup, 1991 yılında Eiselt ve Darevsky tarafından Çeçenistan'tan toplanan örneklerin, türün diğer alttürlerinden morfolojik olarak gözlenen farklılıklarından dolayı ayrı bir alttür olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada *Darevskia bithynica bithynica*, *Darevskia bithynica tristis*, *Darevskia rudis rudis*, *Darevskia rudis mirabilis*, *Darevskia rudis macromaculata*, *Darevskia rudis obscura* ve *Darevskia rudis bischoffi* popülasyonlarına ait örnekler incelenmiş ve bu türlerde ilk kez Mikrosatellit DNA Belirteci yöntemi kullanılarak, moleküler seviyede popülasyonlar arası benzerlik ve farklılıklar ortaya konmuştur.



### **1.3. Genetik Değişimin Tespiti İçin Moleküler Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Metotlar**

Genetik farklılıkların belirlenmesi, popülasyonların doğru sınıflandırılmalarında temel unsurdur. Genetik varyasyonun seviyesi, seçim/üreme programlarında ve türlerin değişen çevre koşullarına adaptasyon sağlamasında önemli bir yere sahiptir. Herhangi bir biyolojik kaynağı etkili olarak yönetmek için, mevcut popülasyonların genetik varyasyon düzeyi mutlaka tanımlanmalıdır. Bazı genetik belirteçler kullanılarak bir çok tür için belirli düzeyde bilgilere ulaşılabilir olmasına rağmen, popülasyon genetiği ve uzun süreli araştırmalar için genom haritalama, kantitatif karakter lokuslarının belirlenmesi gibi ilave bilgilere de ihtiyaç duyulur (Arslan, 2006).

Kertenkele popülasyonlarını konu alan çalışmalarda genetik belirteçlerden uzun süreden beri yararlanılmaktadır.

Türler arası veya tür içi kertenkele popülasyonları arasındaki genetik farklılıkları açığa çıkarmak için moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde bu çalışmalar genel olarak protein ve DNA olmak üzere iki tür genetik belirteç sistemi kullanılarak yapılmaktadır.

#### **1.3.1. Protein Varyasyonu**

Moleküler sistematikte kullanılan ilk teknik protein elektroforezidir. Proteinle ilgili ilk çalışmalar 1960'larda hemoglobin ve transferin gibi proteinlerle başlamış ve sonraki birçok çalışmada enzim proteinleri kullanılmıştır. Her bir lokus proteini, aminoasit yüküne bağlı olarak elektriksel alanda farklı hareket etmektedir. Eğer bir proteini kodlayan lokusta birden fazla allel varsa, her bir allel tarafından kodlanan polipeptitler farklı amino asit içeriklerinden dolayı farklı elektriksel yüke ya da büyüklüğe sahip olacaklardır. Elektroforez bu gibi allelik farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Allozim belirteçleri kodominanttır; yani bir lokustaki allellerin tümü ayırt edilebilir ve Mendel kalıtımı gösterirler. Örneklerin hızlı bir şekilde analiz edilebilirliği, kullanılan kimyasalların maliyetinin düşüklüğü, tekniğin kolaylıkla öğrenilebilir olması, çalışılan lokus ürününün işlevinin bilinmesi ve birçok tür için yeterli düzeyde bilgi altyapısının olması bu yöntemin başlıca avantajlarından. Dezavantajı ise, taze ya da hemen dondurulmuş doku gereklidir. Enzim aktivitesinin dokudan dokuya farklılık gösterebilir olmasından dolayı birden çok

dokunun incelenmesi gerektirmesidir. Protein bant kalıplarının analizi özellikle poliploid durumlarda zor olabilir. Hesaplanan genetik varyasyonun miktarı gerçekte olduğundan daha az bulunabilir. Çünkü, DNA'daki mutasyon sonucu değişen aminoasit aynı elektriksel yüke sahip olabilir veya genetik kodun dejenerasyonundan dolayı oluşan bazı mutasyonlar aminoasit değişimiyle sonuçlanmayabilir. Bu yolla genomun çok küçük bir kısmı incelenebilir. Çünkü genomda bu tip enzimleri kodlayan genlerin sayısı azdır ve bunların hepsi bilinmemektedir. Bu şekilde ancak genomun %5'inden daha azının incelenebilir olmasından dolayı, yakın türler ya da popülasyonlar arasında varyasyonu saptamak zordur (Arslan, 2006).

### **1.3.2. 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 alloenzimin yaygın bir şekilde kullanımından sonra moleküler genetiğin gelişimi hızlı bir şekilde artmıştır (Eroğlu, 2008).

Protein elektroforezi ile yapılan çalışmaların en büyük avantajı kısa zaman alması ve ekonomik olmasıdır fakat dezavantajı mutlaka taze materyale ihtiyaç duyulmasıdır. Bazı popülasyon ve türlerde DNA çalışmalarına göre çok daha düşük seviyede polimorfik olması, bu yöntemin kullanılmasını sınırlandıran en önemli dezavantajdır. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda DNA belirteç sistemleri tercih edilmektedir.

DNA'ya dayalı belirteçler, DNA seviyesinde bireylerin karşılaştırılmasını sağlar. Aynı şekilde, moleküler ve biyokimyasal belirteçler, genotipler arasındaki genetik akrabalığı tam olarak çalışmaya olanak verir (Williams ve ark., 1990).

DNA belirteçleri ile tespit edilen genetik varyasyonun toplam miktarı, protein metotları ile tespit edilen miktardan oldukça fazladır. Bunun başlıca sebebi DNA zincirinin direkt olarak incelenmesidir.

Uzun yıllar boyunca, moleküler biyolojideki yavaş fakat uzun soluklu çalışmalar, moleküler sınıflandırma ve polimorfizmin gösterilmesi için gerekli oranda da pahalı olan teknikler hemen hemen her genomun çalışılmasına izin vermiştir. Karmaşık ve pahalı oluşları, popülasyon biyolojisinde hedeflenen projelerin tam olarak uygulanmasını sınırlamaktaydı. İşte tam da bu sıralarda PCR, metodoloji çalışmalarında bir devrim

niteliği kazandı (Mullis ve ark., 1987). 1988 yılında termostabil DNA polimerazın keşfi de PCR'nin kullanımını oldukça artırmıştır. Teknik, oldukça düşük miktarlarda kalıp DNA kullanarak bir veya daha fazla sayıda hedef DNA fragmentinin in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanır. Çoğaltılan DNA belirteçleri daha sonra otoradyografi veya boyama yapılarak elektroforetik olarak gözlenir (Feral, 2002).

Kertenkele sistematığını konu alan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan 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'de verilmiştir. Bu belirteçler kullanılarak genetik varyasyonun tahmini, akrabalık, ebeveyn tayini, tür tespiti, hibrit bireylerin belirlenmesi ve genetik haritaların oluşturulması (QTL belirlenmesi ile) gerçekleştirilebilir.

Tablo 1. 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, Popülasyon 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-PCR	Hayır	Mendel Kalıtım, Dominant	Tip II	Çoklu	2	Orta	Popülasyon 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, Popülasyon çalışmaları
Mikrosatellit	SSR	Evet	Mendel Kalıtım, Kodominant	Çoğunlukla Tip II	Tekli	Çoklu	Yüksek	Gen bağlantısı haritalama, Popülasyon çalışmaları, Babalık Testi
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 TipII	Tekli	2, fakat 4'e kadar	Yüksek	Gen bağlantısı haritalama, Popülasyon çalışmaları
Ekleme/Çıkma	Indels	Evet	Mendel Kalıtım, Kodominant	Tip I Tip II	Tekli	2	Düşük	Gen bağlantısı haritalama

<sup>1</sup>: Korunmuş PCR 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)

### 1.3.3. Mitokondrial DNA

Son zamanlarda moleküler biyolojideki yeni tekniklerin gelişimi DNA'daki varyasyonun incelenmesini mümkün kılmaktadır. Genomun bir parçası olan kodlanmayan kısımlardaki varyasyonun doğrudan incelenmesiyle, tüm baz değişiklikleri tespit edilebilir. DNA elementleri genel olarak farklı oranlarda evrimleştiğinden filogenetik ya da popülasyon düzeyindeki araştırmaları için uygun belirteçlerin seçilmesi mümkündür (Bektaş, 2008).

Hayvan mtDNA'sı, popülasyonlar arasındaki farklılaşmayı, evrimsel tarihi, evrimsel süreçlerin dinamiklerini ve tarihsel biyocoğrafya ile ilgili önemli verileri sağlamaktadır. Bundan dolayı popülasyon, tür ve daha üst taksonomik gruplar arasındaki genetik sınırları boyunca şecere izlerinin belirlenmesine olanak verir. Ayrıca, türün genetik yapısının belirlenmesi doğal popülasyonların yönetimi için en önemli görevlerden birisidir. Bu gibi veriler koruma biyolojisi açısından son derece önemlidir (Arslan, 2006).

Hayvan mtDNA'sı 15-20 kb uzunluğunda, 22 tRNA, 2 rRNA, 13 elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan ve 13 mRNA'yı kodlayan toplam 37 genden oluşan kapalı halkasal bir moleküldür. Yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan 'kontrol bölgesi' replikasyonun başladığı bölgedir. MtDNA'da genlerin düzeni genellikle sabittir, ancak gen organizasyonu bazı hayvan taksonlarını ayırabilir (Desjardins ve Morais, 1990). Memeli hayvanlarda mtDNA'nın, replikasyon sırasında meydana gelen mutasyonların tamir mekanizmasındaki eksiklik nedeniyle, çekirdek DNA'sından daha fazla dizi farklılığına sahip olduğu bulunmuştur (Wilson ve ark., 1985). Pont-Kingdon ve ark. (1995) omurgasız türlerden *Sarcophyton glaucum*'da tamir mekanizmasının olduğunu bulmuşlardır (Arslan, 2006).

Mitokondri genomu filogenetik çalışmalar için yararlı olan pek çok özelliklere sahiptir (Avisé, 1994). En önemli özelliği klonal kalıtımıdır. Mitokondri genomu haploittir ve rekombinasyon göstermez. İkinci olarak, mtDNA tek kopya çekirdek DNA'ya göre daha hızlı evrimleşmektedir. Bu özelliğinden dolayı, yakın akraba türler ve popülasyonların filogenetik ilişkilerini çalışmak için uygundur. mtDNA'nın anasal olarak kalıtımlanıyor olması filogenetik analizler için avantaj olarak kabul edilir. Her ne kadar mtDNA'sı çoğunlukla anasal olarak kalıtımlanıyorsa da, bazı türlerde hem anasal hem babasal kalıtım gösterebilir (Margoulas ve Zouros, 1993). Bunlar taksonomik problemleri çözmeye etkili bir şekilde kullanılabilir. Mitokondrinin protein kodlayan genleri, kodlama

yapmayan yerleri ve transkribe olmayan kontrol bölgesinin, popülasyon, tür ve cins gibi yakın geçmişte ayrılmış taksonların ilişkilerini analiz etmek için kullanılmış olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek takson gruplar çalışıldığında, genlerin kodlama yapmayan yerleri ve hızla evrimleşen bölgelerinde çok sayıda baz değişimleri olmaktadır. Bu yüzden de filogenetik ilişki belirsizleşmektedir. Üst takson gruplar için 12S ve 16S rRNA gibi daha yavaş evrimleşen bölgeler daha yararlı olabilir.

Cytb geni muhtemelen kertenkelelerde en fazla çalışılan genlerden birisidir. mtDNA'sının Cytb geni, popülasyon genetiğinde yüksek taksonomik gruplara kadar değişen ilişkileri analiz etmek için kullanılmıştır (Bermingham ve ark., 1997; Lydeard ve Roe, 1997).

Mitokondriyal ribozomal RNA genleri ile (12S ve 16S rRNA alt birimleri) çoğunlukla daha uzak taksonlar arasındaki akrabalık çalışılmıştır. Kertenkele çalışmalarında özellikle cins ve tür düzeyindeki ayrımları saptamada kullanılır. mtDNA kontrol bölgesi, mtDNA replikasyonunu sağlar ve ayrıca bu bölgeye yer değişim lobu (D-loop) adı verilir. Çünkü sarmalın iki zincirinden biri replikasyon sırasında yeni sentezlenen zincir ile yer değiştirir. mtDNA'da bulunan iki sarmalın birbirinden ayrı iki replikasyon orijini vardır. Ağır zincirin replikasyon orijini, D-loop denilen kontrol bölgesinde yer alır. Bu bölge, replikasyon orijinini ve her iki zincire ait promotor bölgelerini içerir. mtDNA'nın %5-7'sini içeren D-loop bölgesi gen içermez. Bu bölge dışında genler çok sıkı paketlenmiştir. Genler arası bölge yoktur ve genler içinde intron bölgeleri bulunmamaktadır.

#### **1.3.4. Satelit DNA Belirteçleri**

Son yıllarda DNA üzerinde yapılan araştırmalarda; DNA'daki bazların ve baz dizilişlerinin birbiri ardı sıra tekrar ettiği belirlenmiştir. DNA, sezyum klorid yoğunluk gradienti içinde santrifüj edildiğinde;  $1,701 \text{ g cm}^{-3}$  de ana bant oluşur. Bu DNA'nın esas bölümünü gösterir. Buna ek olarak; GC içeriklerinin düşük olması nedeniyle daha az yoğun olan üç ek bant daha vardır (satellitler). Bunlar; 100-6500 baz çifti (bç) tekrarlardan oluşan klasik satelit DNA, 10-20 bç tekrarlı minisatellitler (bunlar ayrıca VNTR (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar) olarak da bilinmektedir) ve 2-6 bç tekrarlı mikrosatellitlerdir. Mikrosatellitler; en sık görülen tekrarlayan DNA dizileridir (Passarge, 1995). Tekrar motifleri ise ikili, üçlü, dörtlü veya beşli şekilde olabilir ((CA) $n$  veya

(AGC)n gibi) (Çiftçi, 2003). Tekrarlayan diziler genellikle kodlanmayan (noncoding) bölgelerde bulunurlar. Tekrarlayan bu nükleotit dizileri; kromozomal sentromeri çevreledikleri için “satellit (uydu)” ismini almışlardır (Primrose, 1998; Butler, 2005).

### 1.3.5. Minisatellit DNA Belirteçleri

Minisatellitleri Wyman ve White (1980) tarafından keşfedildikten sonra Jeffreys ve ark. (1985) tarafından ilk defa moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. Birçok lokusun eş zamanlı araştırılması, çok lokuslu DNA parmak izinde olduğu gibi her birey için özgül bant kalıplarının oluşmasına neden olmaktadır. Pedigri analizlerinde çalışılan çok lokuslu parmak izi varyasyonunun Mendel kalıtımı gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Wright, 1993). Çok lokuslu parmak izi insanlarda analık-babalık tespitinde ve adli tıp uygulamalarında kullanılmıştır (Jeffreys ve ark., 1985; Burke ve Bruford, 1987). Ancak bantların hangi lokusa ait olduğu tespit edilemediği için, populasyon içinde Hardy-Weinberg dengesini test etmek mümkün değildir (Bentzen ve ark., 1991).

Çok lokus parmak izinin yorumlanmasındaki zorluklar nedeniyle tek lokus minisatellit belirteçler geliştirilmiştir (Wong ve ark., 1987). Bu belirteçleri geliştirmek için çalışılacak organizmadan DNA'nın izole edilmesi ve klonlanması zorunludur. Ferguson ve ark. (1995) diğer belirteç sistemleri ile sınırlı düzeyde varyasyonun görüldüğü darboğaz geçiren popülasyonlarda, tek lokus minisatellit problemlerinin daha faydalı olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Tek lokus minisatellitlerde yüksek varyasyonun görüldüğü diğer bir alan, yavruların ebeveynlerini belirleme çalışmalarıdır (Ferguson ve ark., 1995).

Nükleer genomda aşırı farklılık gösteren minisatellit lokuslarının ortaya çıkarılması genetik belirteç sistemleri içerisinde yeni değişikliklere neden olmuştur. Kodlama yapmayan bölgelerin farklılıklarının gözlenmesi yalnızca popülasyon ve filogenetik çalışmaları değil, ayrıca popülasyondaki familyaları, akrabalık derecelerini ve fertlerin doğru olarak tanınmasını da mümkün kılmıştır. Minisatellit veya VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) lokusları birkaç yüz tekrara kadar ulaşan kısa nükleotid dizilimlerine (9–64) sahiptir. Çok lokus problemlerinden fazla lokusta bulunan sıralı tekrar içeren nükleotid dizilimlerinin merkezinin hibridizasyonunda kullanılmaktadır. Tekrar sayılarındaki farklılıkların eşit olmayan kromatid değişikliğinden ve replikasyon sırasında DNA kaymasından meydana geldiği düşünülmektedir (Jeffreys ve ark., 1990). Düşük iyon konsantrasyon şartlarında problemler istenilen nükleotid dizilimlerinin bulunduğu çok fazla

sayıda lokusa hibridize olur ve DNA parmak izi oluşturur. Bunlar ve bunun gibi multilokus problemler (MLP) geniş bir alana yayılmış şekilde bitki, kuş ve hayvan türlerinin popülasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Burke ve Bruford, 1987; Hanotte ve ark., 1991; Hauser ve ark., 1992).

Minisatellitlerin avantajları yanında birçok dezavantajda sahiptir. Standart tek lokus minisatellit analizinde blotlama yani elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilen ve fraksiyonlarına ayrılan protein veya nükleik asitlerin bir destek tabakaya aktarıldıktan sonra özgül olarak belirlenmesi işlemi yapılması nedeniyle yüksek konsantrasyonda ve hasar görmemiş DNA'ya ihtiyaç vardır. Bu sınırlamaları aşmak için minisatellit lokuslar PCR analizine uygun hale getirilmiştir. İlgilenilen minisatellit lokusunun PCR ürünü, agaroz jelde ayrıştırılmakta ve etidyum bromid ile boyanarak alleller tespit edilmektedir. Bu yaklaşımdaki bir problem büyük allellerin çoğalmadaki zayıflık nedeniyle görülememesidir. Diğer bir problem minisatellit lokuslarında karmaşık mutasyon süreçleridir (Wright, 1993; O'Reilly ve Wright, 1995). Eğer alleller aynı büyüklükte ya da büyüklük farkları birbirine çok yakın ise allellerin jel üzerinde oluşan bant kalıpları üst üste çakışmakta ve bunların ayrımı oldukça zor olmaktadır. Aynı zamanda büyüklük farkları çok fazla olursa yine hesaplama hatalarına neden olabilmektedir. Bu problemi çözmek amacı ile araştırmacılar sadece belirli büyüklük aralığındaki fragmentlerin analizini yapmaktadır. Bir başka açıdan bakacak olursak, multilokus polimorfik belirteçler genetik çalışmalarda geniş kullanım alanına sahip olmalarına rağmen çok fazla sayıda bant oluşması nedeniyle de heterozigotluğun veya homozigotluğun tespitine olanak sağlamazlar. Ayrıca aynı lokustan gelen bantların veya farklı lokuslardan benzer büyüklükteki DNA parçalarının jel üzerinde aynı şekilde yer değiştirmesi genetik hesaplamalarda belirsizlikler yaratır. Bu yüzden allel ve genotip frekansları hesaplanamaz. Bu mevcut istatistikî analizlerin kullanımını olanaksız kılmaktadır (Lynch, 1991). Tek lokus parmak izi veya profil çıkarma yöntemi bu problemlerin üstesinden gelmektedir ve popülasyon genetiği çalışmaları için çok uygundur. Eş zamanlı olarak çok fazla lokusun merkez dizisinin hibridize edilmesinin dışında yüksek iyon konsantrasyonu şartlarında, lokusa özel problemler tek lokus veya minisatellit bölgenin tekrar göstermeyen uç kısımlarına hibridize olurlar. Bireyler aynı miktarda sıralı tekrar ile ya homozigottur ya da farklı sayıda sıralı tekrar ile iki farklı bant üreterek heterozigot olurlar. Multilokus DNA parmak izi problemlerinin aksine tek lokus probu yeter miktarda dizin benzerliğine sahip olabilmek için yakın ilişkili organizmadan veya çalışılan türün kendisinden izole edilmelidir (Wong ve



ark., 1987). Bu, türden genomik kütüphane oluşturulmasını ve klondan uygun probun izolasyonunu gerektirir. Bu uzun süreli protokol başlangıçta insan üzerine yapılan çalışmalarla sınırlıydı. Fakat son zamanlarda yaşanan moleküler protokollerdeki gelişmeler diğer canlılar üzerinde de bu çalışmaları mümkün kılmıştır ve tek minisatellit lokus varyasyonu birçok balık türünde çalışılmıştır (Bruford ve Burke, 1991; Gilbert ve ark., 1991; May ve ark., 1993). Tek lokus minisatellit verileri, izoenzim verilerinde olduğu gibi aynı yolla değerlendirilebilir ve gen akışı, genetik mesafe ve heterozigotluğun ölçülmesi gibi işlemler yapılabilir. Son zamanlarda rapor edilen çoğu çalışmadan minisatellit lokusta çok fazla sayıda 20 veya üzeri allel gözlenmiştir. Popülasyon çalışmaları için tek lokus minisatellitlerinin nötr genetik belirteç olarak kullanımlarına ilaveten, akrabalık derecesinin belirlenmesi çalışmalarında ve birey tanımlanmasında tek lokus minisatellit kombinasyonlarının kullanılması mümkündür.

### **1.3.6. Mikrosatellit DNA Belirteçler**

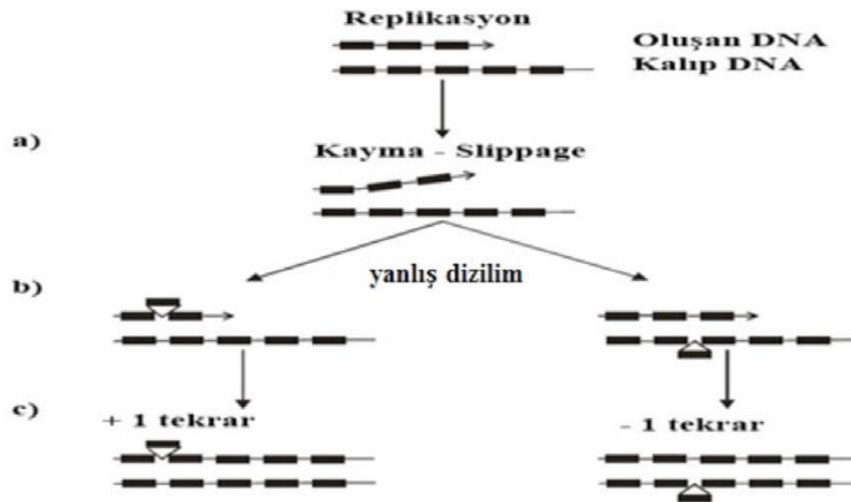
Ko-dominant belirteçlerden olan mikrosatellit DNA lokusları; 2-6 nükleotit uzunlukta kısa, tekrarlanan ve polimorfik özellikte DNA dizilerini ifade etmektedir (Butler, 2005; Freeland, 2005). Mikrosatellit DNA belirteçleri; popülasyon düzeyindeki araştırmalarda son derece kullanışlıdır. Bu bağlamda; popülasyon yapısı analizleri, genetik varyasyon tahminleri, ebeveyn tayini ve pedigrî çalışmaları, gen haritalarının çıkarılması, popülasyonlar arası genetik benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi gibi bir çok alanda kullanılmaktadır. Gelişen gen teknolojisine bağlı olarak mikrosatellit belirteçlerin hayvan genetiği alanında kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu teknolojilere ilişkin çalışmalar dikkate değerdir ve oldukça ilgi uyandırmaktadır. Hayvan genetiği alanında özellikle gen kaynakları koruma programlarında, ön moleküler tanımlama için bu belirteçlerin kullanımı büyük önem taşımaktadır.

Mikrosatellitler ilk olarak 1980'li yıllarda keşfedilmiştir (Passarge, 1995). Polimorfik bir lokusta tekrarların sayısı 5'ten 100'e kadar değişebilmektedir. Mikrosatellit polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünleri her bir lokusa göre değişen ve genel olarak 75 ile 300 baz çifti uzunluğu arasındadır (Passarge, 1995).

Basit, ard arda tekrarlanan di-, tri- nükleotit dizilerinin genomda polimorfik oldukları ortaya konulmuştur. Bu dizilerin tekrarlanma sıklıkları yani frekansları yüksek oranda polimorfizm gösterirler ve bu diziler genom boyunca rastgele dağılmışlardır. Bu özellikleri

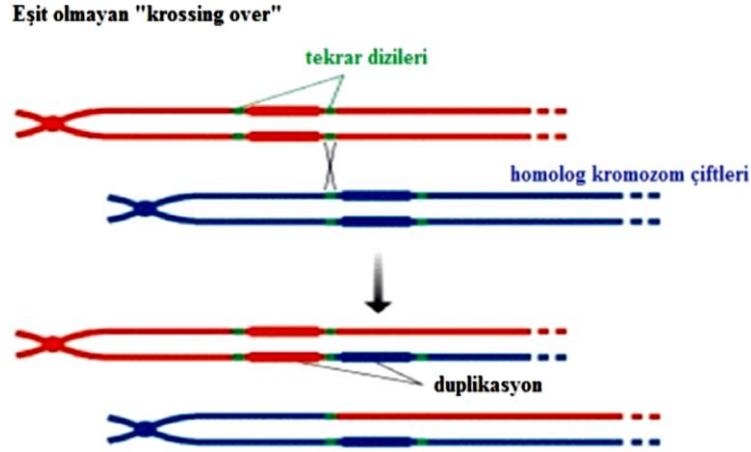
dolayısıyla mikrosatellitler gen haritalama çalışmalarında kullanılabilir (Georges, 1990). Küçük popülasyonlarda ve nesli tükenen türlerde bile yüksek derecede polimorfik olmaları, mikrosatellitlerin başlıca üstünlüklerinden biridir. Bu yüksek polimorfizm; yüksek mutasyon oranından kaynaklanmaktadır (Passarge, 1995). Genomun diğer bölgelerine göre mikrosatellitlerdeki kısa dizi tekrarları, tekrar bölgelerinin büyüklüğü, tekrar sayıları, DNA tekrar bölgelerindeki transkripsiyonun sıklığı ve varyant tekrarlarının varlığından dolayı mutasyon oranı daha yüksektir (Li ve ark., 2002; Somasundaram, 2010). Mikrosatellit lokuslarında mutasyona sebep olan önemli iki mekanizma; DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar ve mikrosatellit tekrarlarında eşit olmayan crossing-overdir (Passarge, 1995).

Maya ve *E.coli* üzerinde yapılan çalışmalarda, mikrosatellitlerde oluşan mutasyonların meydana gelme sürecinde asıl etkili olan mekanizmanın kayma (slippage) olduğu ortaya konmuştur (Henderson ve ark., 1992). Replikasyon kayması olarak bilinen bu durum tekrar bölgesinin replikasyonu sırasında oluşur. Kayma sonrası, replikasyon devam ederken oluşan DNA, kalıp DNA'ya göre ya kısa ya da uzun olur. Sonuç olarak, mikrosatellitler bir kaç tekrar kazanır ya da kaybeder (Şekil 3) (Eisen, 2000; Karhu, 2001).



Şekil 3. Polimeraz enziminin kayması sonucu mikrosatellitlerde oluşan mutasyon. a) Replikasyon sırasında DNA polimerazda oluşan kayma, b) Kalıp ya da oluşan DNA'da yanlış dizilim, c) Replikasyonun devam etmesi ve eksik ya da fazla tekrar oluşması (Eisen, 2000).

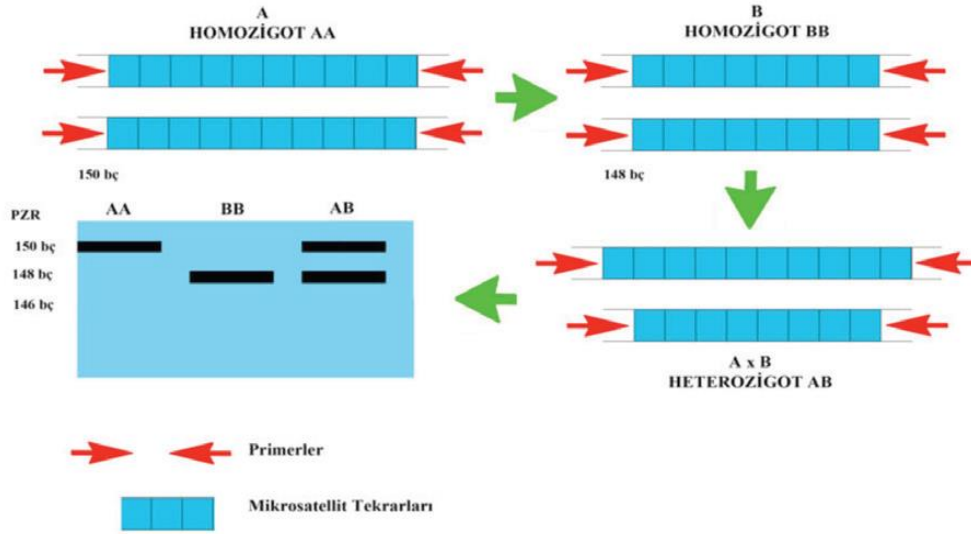
Mutasyona neden olan diğer mekanizma; homolog kromozomlardaki mikrosatellit tekrarlarında crossing-over sırasında tam olmayan bir eşleşmenin olmasıdır. Bu; homologlar arasındaki iyi olmayan eşleşmelerin; tekrar sayılarının artışından kaynaklandığını akla getirmektedir (Şekil 4) (Eisen, 2000).



Şekil 4. Eşit olmayan Crossing Over'ın gösterimi (Eisen, 2000).

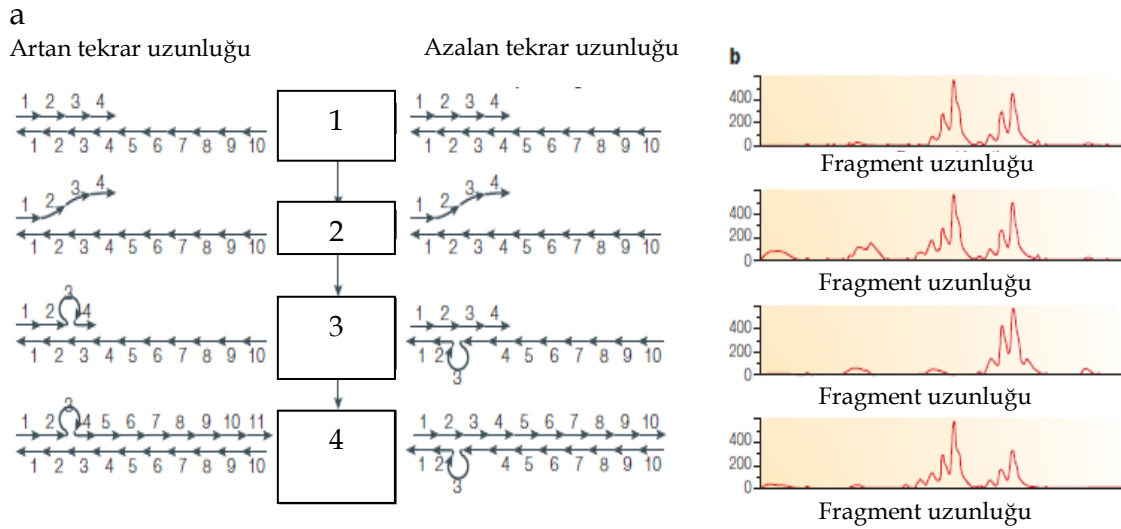
Mikrosatellitler ko-dominant kalıtım özelliği göstermeleri (Ramamoorthi ve ark., 2009), lokusa özgü olmaları (Condit ve ark., 1991), genom içinde düzgün ve geniş yayılım göstermeleri (Iamartino ve ark., 2005; Ramamoorthi ve ark., 2009), yüksek mutasyon oranı (Toro ve ark., 2009) ve genom hakkında diğer moleküler belirteçlere göre daha fazla bilgi vermeleri (Ramamoorthi ve ark., 2009) yanında PCR'a dayalı bir teknik olmasından dolayı çok tercih edilen ve bir çok türde kullanılan bir DNA belirteçidir.

Genom içerisindeki mikrosatellit lokusları; oligonukleotit primerler kullanılarak PCR aracılığıyla yükseltilebilir. Bir popülasyonda; mikrosatellit lokuslarının PCR yöntemiyle çoğaltılması ve jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda, heterozigot ve homozigot bireylere ait moleül ağırlıklarına göre yayılarak oluşan bantlar jel üzerinde görüntülenebilmektedir (Şekil 5). Heterozigot bireylere ait PCR ürünleri iki bant, homozigot bireylere ait PCR ürünleri ise tek bant olarak görüntülenirler (Fatima, 2006).



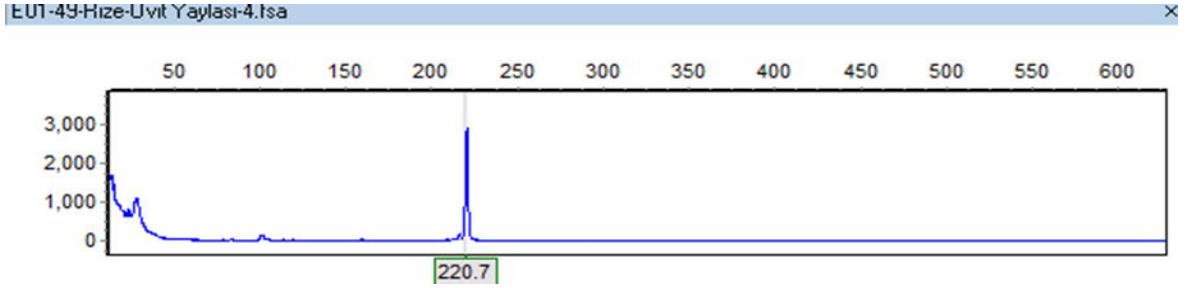
Şekil 5. Bir popülasyondaki homozigot ve heterozigot bireylere ait mikrosatellit lokuslarının PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen bantların jel elektroforezi yardımıyla görüntülenmesi.

Mikrosatellit DNA'nın replikasyonunda beklenen replikasyon durumu ile gözlenen replikasyon durumundaki tekrar sayılarında farklılık gözlenmesi sonucu oluşan pik görüntüleri (Şekil 6).

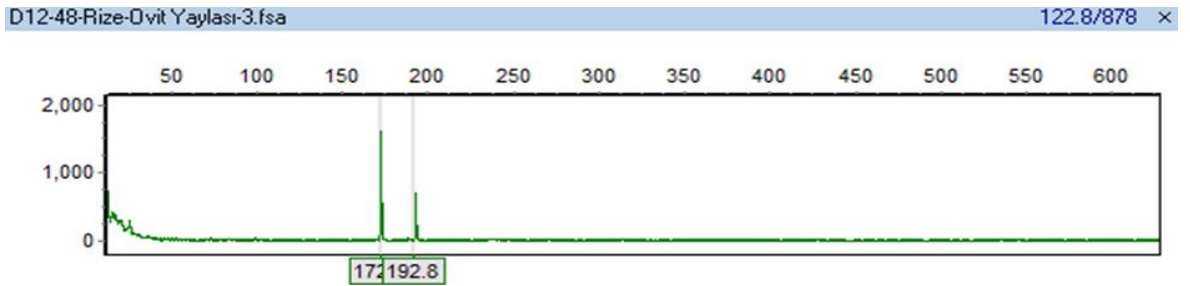


Şekil 6. Mikrosatellit lokuslarında tekrar sayılarına göre pik görüntüleri. a. Mikrosatellit lokuslarında tekrar sayılarının artması durumunda pik görüntüleri, b. Tekrar sayılarının azalması durumunda pik görüntüleri. 1. Başlama evresi, 2. Ayrılma evresi, 3. Rehibridizasyon ve hatalı hizalama evresi, 4. Ana kalıptan farklı uzunlukta yeni bir zincir oluşumu evresini göstermektedir (Ellegren, 2004).

Bir canlı; biri anneden diğeri babadan gelen kromozomlar bakımından her ikisinde de benzer sayıdaki mikrosatellit bölgelerine sahip ise yani; bu bölgeler bakımından homozigot ise (A ve B) PCR sonucunda çoğalan bu mikrosatellit bölgesi jel üzerinde tek bir bant olarak görülür (Şekil 3, AA ve BB'nin görüntüsü). Şekil 3'te A bireyi; 150 bp uzunlukta ve B bireyi ise 148 bp uzunlukta bant oluşturmaktadır. Bu bantlar jel üzerinde kalın tek bir bant olarak görülebilmektedir. Ancak heterozigot birey anne ve babadan gelen kromozomlarda farklı uzunlukta mikrosatellit bölgeleri içerdiği için; PCR ile elde edilen mikrosatellit bölgesine ait DNA bantlarının elektroforezi sonucunda iki farklı uzunlukta bant oluşur ve jel üzerinde çift bant olarak görülür (Şekil 3, AB'nin görüntüsü). Mikrosatellitler, jel elektroforezi ile görüntülenebildikleri gibi otomatik dizi analiz cihazlarında fragment analizi yapılarak bilgisayar sisteminde özel analiz programlarıyla uzunluğu bilinen standart örnek yardımıyla da analiz edilebilmektedirler. Kapiller elektroforez sisteminin kullanıldığı bu teknikte; sonuçlar allel uzunluklarını gösteren pikler şeklinde elde edilmektedir (Ağaoğlu, 2010). Şekil 7'de görülen mavi renkte görülen pikler allelleri ifade etmektedir ve homozigot (220.7) bir birey işaret edilmektedir. Şekil 8'de görülen yeşil renkte görülen pikler allelleri ifade etmektedir ve heterozigot (172.0-192.8) bir birey işaret edilmektedir.



Şekil 7. Homozigot bir bireye ait mikrosatellit lokusu fragment analizi sonucu



Şekil 8. Heterozigot bir bireye ait mikrosatellit lokusu fragment analizi sonucu.

Mikrosatellit belirteçleri; genetik haritalama (Vaiman ve ark., 1996; Batendse ve ark., 1997), ebeveyn tayini (paternity test) ve pedigrî çalışmaları (Luikart ve ark., 1999; Gao ve ark., 2005; Bolormaa ve ark., 2008), akrabalı yetiştirmelerin (inbreeding) seviyesi ve etkisinin belirlenmesi (Canon ve ark., 2000; Karhu, 2001; Mateus ve ark., 2004), popülasyonların evrim tarihi çalışmaları (Buchanan ve ark., 1994; Loftus ve ark. 1999), gen kaynaklarının korunması çalışmaları (Glowatzki-Mullis ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2009; Ligda ve ark., 2009), genetik çeşitliliğin araştırılması (Li, 2002; Sollero, 2009) ve biyolojik materyallerin adli amaçlı kimliklendirilmesinde (Padar ve ark., 2001) kullanılmaktadır.

Mikrosatellit belirteçleri birçok hayvan türünde çeşitli amaçlara yönelik olarak başarıyla ve sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrosatellit belirteçlerin belirli bir tür içerisinde polimorfik olmaları ve bireyden bireye farklılık göstermeleri moleküler genetik alanında belirteç olarak kullanılmasını uygun hale getirmektedir. Ayrıca; güvenilir olmaları ve kısa zamanda sonuç alınabilmesi bu belirteçlerin moleküler genetik çalışmalarında tercih edilme nedenleri arasında gösterilebilir.

Minisatellitler, kromozomların telomerik ve sentromerik bölgelerinde toplanma eğiliminde olmalarına rağmen mikrosatellitler ökaryotik genoma geniş bir şekilde yayılmış ve bol olarak bulunurlar. Bu bilgilerin ışığında, mikrosatellit DNA çok farklı şekillerde isimlendirilmiştir: STRs (Kısa Ardışık Tekrarlar) ve SSRs (Basit Dizin Tekrarları). Bunların hepsi mikrosatellit terimine ek olarak yaygın kullanılan isimlendirmelerdir. Ayrıca SSLPs (Tek Dizi Uzunluk Polimorfizmi) mini ve mikrosatellit lokuslar için birlikte kullanılmaktadır.

Çalışılan çoğu lokusta mikrosatellitler tekrar bölgesinin sayısında çok farklılıklar göstermesinden dolayı genetiğin birçok alanında moleküler belirteç olarak önem arz etmektedir. Bugüne kadar mikrosatellit varyasyonunun en gelişmiş çalışmaları lokusun tipi ve bilgilendirme derecesi, nükleotit diziliminin boyu ve tekrarlanan nükleotitler arası ilişkilerin araştırılması ile yapılmaktadır.

Mikrosatellitler, kusursuz, kusurlu ve bileşik motif olarak üç gruba ayrılmışlardır. Burada mikrosatellitin nükleotit diziliminde ana motifi bozan nükleotitlerin bulunması onun kusurlu dizilim gösterdiği anlamına gelir. Ayrıca, eğer birbiriyle bitişik iki farklı motif bulunuyorsa bu da bileşik motif olarak isimlendirilir. Bu tekrarlar arasında her türlü kombinasyon mümkündür. Ana motif içerisinde meydana gelen bozukluklar tekrar sıralarını korumaktadırlar ve kusursuz motiflere göre bu şekildeki bozuk motifler daha az

varyasyon gösterir. Ayrıca uzun tekrarların daha polimorfik olmaları beklenir. Mikrosatellit tekrarların bulunduğu genom bölgelerindeki genetik varyasyonlar genellikle DNA kayması sonucunda meydana gelir.

Mikrosatellit lokuslardaki mutasyonların, DNA replikasyonu sırasında, tekrarın bulunduğu kısımda yanlış eşleşme veya bir tekrarın atlanması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir. Diğer bir deyişle replikasyon sırasında DNA'nın iki iplikçisindeki tekrar kısmı beklenmedik bir eşleme yapabilir ve daha sonra bunun tamiri mikrosatellit lokusun uzaması veya kısalması ile sonuçlanır. En yaygın değişim yalnızca tek bir tekrar ünitesinin kaybı veya fazladan oluşması ile olur. Popülasyon içi varyasyonun belirlenmesinde en önemli unsur mutasyon oranıdır. Bu oranın mikrosatellit lokuslarda  $10^{-3}$  ile  $10^{-4}$  arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Goldstein ve ark., 1995). Tekrar bölgelerinin her iki tarafında bulunan bölgeler "flanking bölgesi" olarak isimlendirilir ve buralarda meydana gelecek mutasyonlar çok önemlidir. Çünkü buralar primerlerin bağlanma noktalarıdır ve null allel oluşumuna neden olur. Null alleller alloenzim ve minisatellit çalışmalarında çok iyi bilinmesine rağmen mikrosatellit lokuslarda da görülmektedir. Primer bölgelerinde meydana gelen nükleotit eklenmeleri veya çıkmaları (insertion ve deletion) mikrosatellit allellerin çoğaltılamamasına neden olacaktır.

Mikrosatellit lokuslar kodominant belirteçlerdir, yani heterozigotlar homozigotlardan ayırt edilebilir ve PCR kullanımı ve allellerin jel üzerinde yürütülmesiyle tüm genetik bilgilere ulaşmak mümkündür. Mikrosatellitler ayrıca evölüsyonla ilgili çalışmalarda, kriminolojik çalışmalarda, fertlerin akrabalık seviyelerinin ve ana ve babalarının belirlenmesinde, genomdaki genlerin haritalarının çıkarılmasında, popülasyonun genetik parametrelerinin (gen akışı ve etkili popülasyon büyüklüğü gibi) tahmini ve popülasyon farklılıklarının belirlenmesi gibi çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Queller ve ark., 1993). Bunun nedeni mikrosatellitlerin genomda yoğun bir şekilde dağılmış olmaları ve işlemlerinin kolay ve otomatik bir şekilde yapılabilmesidir. Canlıların genomunda yoğun olarak bulunan mikrosatellitlerin, son yapılan çalışmalara göre türlere bağlı olarak farklı frekanslarda farklı motiflere sahip oldukları tespit edilmiştir. İki nükleotitli tekrarlar dikkate alındığından (CA/GT) nükleotit tekrarı memelilerin genomunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu tip tekrarlar memeli genomunda her 50–150 kb'de bir olmaktadır. Memelilerdeki durumun aksine son çalışmalar yüksek yapılı bitkilerde (AT/TA) nükleotit diziliminin yaygın olduğunu göstermiştir.

SSR'ler minisatelitler ile karşılaştırıldığında daha kolay izole edilirler. DNA'nın çok az dokudan çok hızlı bir şekilde izole edilebilir olması, çok sayıda örneğin görüntüleme sistemi ve otomatik floresans dizi belirleyici ile kısa sürede genotiplerinin belirlenebilmesi, kantitatif karakter lokusların (QTL) ayrılması ve genom haritalanması gibi çok fazla lokusa ihtiyaç duyulan uygulamalarda, mikrosatelitler diğer belirteç sistemlerine göre güçlü bir alternatiftir.

Mikrosatellitler farklı genetik çalışmalar için çok güçlü tek lokus genetik belirteç olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, allellerin PCR amplifikasyonu için türe has primer geliştirilmesi çok pahalı çalışmalar gerektirmektedir. Bir diğer önemli dezavantaj ise alleller denatüre olmuş poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırıldığı zaman genellikle merdiven veya gölge şeklinde bantlar oluşturmaktadır. Bu istenmeyen bantların, amplifikasyon ürünlerinin denaturasyonunun tamamlanmamış olmasından veya PCR aşamasında oluşan yanlış eşleşmelerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu durum allellerin okunması esnasında genellikle problem yaratmaktadır. Fakat bunun yanında üç veya dört nükleotitli mikrosatellitlerde bu durum pek görülmez. Son dezavantaj ise önceden de bahsedildiği gibi null allellerin oluşmasıdır.

Mikrosatellit DNA çalışmalarının yürütülmesinde genellikle ABI 310 Genetik Analiz Cihazı, ABI 3100 Genetik Analiz Cihazı ve ABI3500 Genetik Analiz Cihazı kullanılmaktadır. Bu çalışma için ABI 3500 Genetik Analiz Cihazı kullanılmıştır. Cihazın çalışma prensipleri şu şekilde özetlenebilir:

### **1.3.6.1. Genetik Analiz Cihazlarının Veri Toplaması**

Genetik analiz cihazları veri toplamaya örneğin enjeksiyonundan sonra elektroforez işleminin tam olarak tüm koşulları ile etkin olarak başlaması ile başlar. Kapiller üzerinde bulunan cam şeffaf bölme (pencere) karşılık gelen yerde bulunan lazer ve detektör ile okuma yapılır (Semizoğlu, 2013).

### **1.3.6.2. RFU (Relative Fluorescence Units) (Rölatif Flöresan Birim)**

Kapiller penceresine gelen DNA parçacıklarına bağlı boyalar lazer tarafından uyarılarak ışımaya zorlanırlar. Her bir DNA parçası üzerinde bulunan boya lazerden



gelen ışmayı emerek kendi özelliklerine bağlı bir ışıma yapar. Bu ışımanın dalga boyu özğüldür ve ortamda bulunan DNA miktarına bağlı olarak ışıma yapan boya miktarı da artacaktır. İşte ışıma miktarının belirli bir birim baz alınarak karşılıklı olarak kıyaslanması ile elde edilen ve belirli bir anda tespit edilen ışıma birimine RFU denir. “Elde edilen ışımalar büyüklükleri RFU miktarlarına göre belirlenerek piksel veriler halinde yürütme ekranına aktarılır (Semizoğlu, 2013).

### **1.3.6.3. DNA'nın Tespiti ve Boyutunun Bulunması**

DNA analiz cihazı boyalardan gelen ışıma miktarlarını RFU cinsinden veri olarak toplar. Aynı zamanda her bir ışımanın yürütmenin hangi zamanında tespit edildiği de kayıt altındadır. DNA parçacıklarının uzunluğunun tespitinde her bir örnek cihaza yüklenirken yürütme karışımına eklenen büyüklük markırları kullanılır.

Daha önce de belirtildiği gibi büyüklük markırları sentetik olarak üretilen ve büyüklükleri bilinen DNA parçalarından oluşan bir karışımdır. Her elektroforez işleminden önce kullanılan kite göre karışımda kullanılan boya türü ve içerdiği parçacıkların boyları yürütme dosyasında belirtilir. Büyüklük markırında kullanılan boya PCR için kullanılmaz. Cihaz büyüklük markırını için verilen boya türü ve parçacık boylarına göre topladığı verileri sınıflandırır. Bu işlem için önce belirtilen boyadan elde edilen tüm parçacıkları ilk tespitten son tespit edilene kadar sıralar. Daha sonra ilk tespit edilen ışıma ile en küçük parçacık boyunu eşleştirir ve sırasıyla tüm ışımaları parça boyları ile eşleştirir. Her bir ışıma tespit süresinde tespit süresinde kayıt altındadır. İşte bu veriler ile elektroforez için bir parçacık boyu-zaman grafiği çizilmiş olur. Cihaz tüm eşleştirmeden sonra bilinmeyen örneklerin büyüklüklerini tespite başlar. Bunun için bilinmeyen örneğin önünde ve arkasında bulunan iki büyüklük markırını ve tespit süreleri alınır. Daha sonra bu süre bilinmeyen örneğin tespit süresi ile orantılanır ve bilinmeyen örneğin büyüklüğü tespit edilmiş olur. Sistem tüm bilinmeyen örnek ışımaları için aynı işlemi yapar ve sonuçları ekrana grafik olarak yansıtır. Artık her bir pikin büyüklüğü bilinmektedir (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.4. Allellerin Adlandırılması**

Her bir DNA parçacığının adlandırılması işlemi için allellik ladder kullanılır. Allellik ladder bir STR bölgesi için popülasyonda yaygın olan tüm allellerinin bulunduğu bir karışımdır. Tiplendirme programları veya manuel olarak allellik ladder ile örneklerin büyüklüklerine göre üst üste karşılaştırılması ile bilinmeyen örnekten elde edilen her pik eşleştiği allellin ismini alır. Böylece her bir pikin allel ismi belirlenmiş olur (Semizoğlu, 2013).

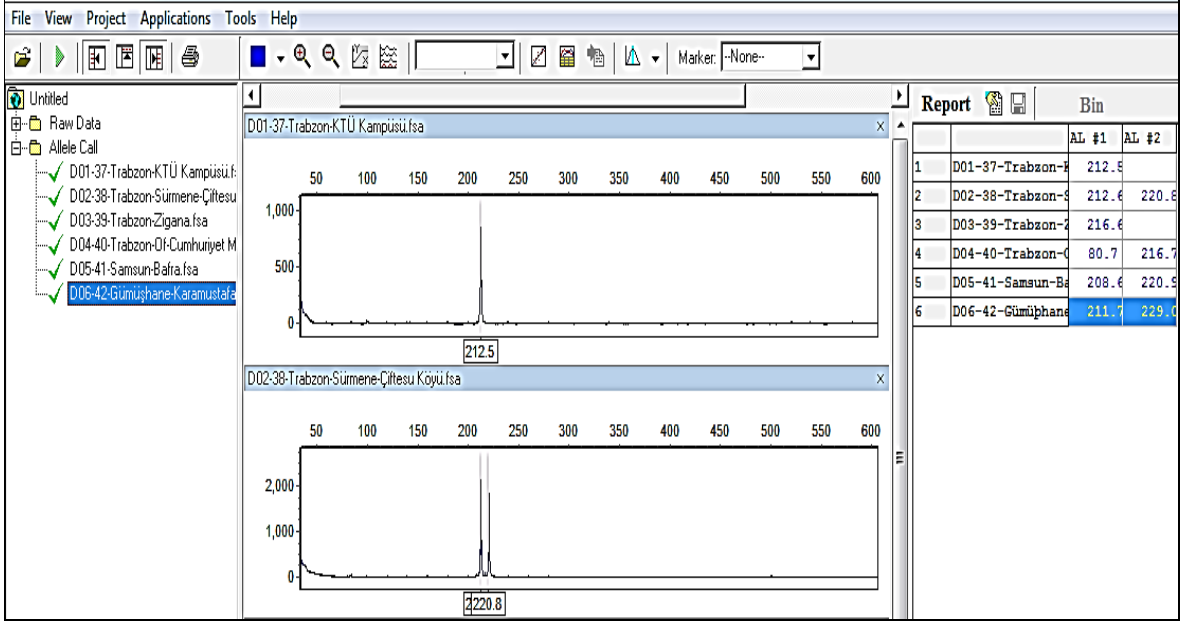
#### **1.3.6.5. Sonuç Tablosu**

Sonuç tablosu 3 bölümden oluşur; Primer öncesi, Primer ve Allellerin bulunduğu bölümdür.

Primer öncesi bölümde renk hatları düz ve 2000 RFU'nun altında olmalıdır. Bu alan aynı zamanda aynı zamanda cihaz kalibrasyonun düzgün olup olmadığı ve yürütmenin güvenilirliği ile ilgili de bilgi verir.

İkinci bölüm primer artıklarının oluşturduğu bölümdür. Burası büyük ve iç içe geçmiş piklerden oluşur. PCR neticesinde ürüne dönüşmeyen primerlerin kapiller penceresinden geçişi ile toplanan verilerdir. Ürün miktarı ne kadar çok ise artık primer o kadar az olacağından PCR ile ilgili bilgi verir.

Üçüncü ve son bölüm allellerin bulunduğu bölümdür. Bu kısımda alleller ve büyüklük markırlarına ait DNA parçaları bulunur. İdeal bir yürütmede allel piklerinin boylarının birbiri ile dengeli olması gerekir (Şekil 9). Sona doğru daha büyük allellerin piklerinin küçük allellere göre daha az sayıda çoğalması sebebi ile pik boylarının daha küçük olması beklenir (Semizoğlu, 2013).



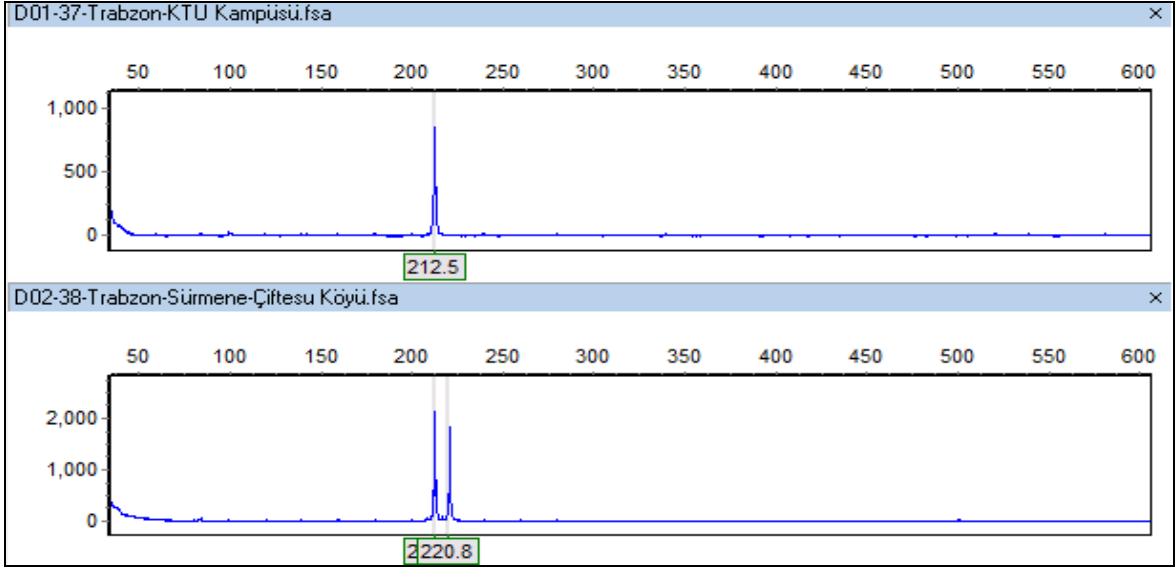
Şekil 9. Fragment analizinde pik boylarının belirlenmesine ait sonuç tablosu

### 1.3.6.6. Allel Pikleri

Allel pikleri boy ve en olmak üzere iki düzlemde değerlendirilir. Pikin boyu allellerin çoğalmış kopya sayısını sayısını verir. En ise ürünlerin detektör önünden geçiş hızını gösterir. Pikin eninin dar ve tepe noktasının belirgin olması elektroforezin sağlıklı olduğunu gösterir. Pikin tepe noktası toplam RFU miktarını gösterir. RFU miktarları ile allellerin ve karışık örnekteki DNA profillerinin birbirinden ayrımı gerçekleşmektedir.

Tepe noktası aynı zamanda allelin belirlenmesinde de kullanılır. Pikin mümkün olduğunca enden dar olması tercih edilir. Pik boyunun standardın üstünde uzun olması ise diğer boyalara yansıma yaparak bir takım tiplendirme problemlerine yol açabilir.

PCR yöntemi gereği tüm elektroferogramda piklerin boyu küçük allellerden büyüklere doğru düşüş gösterir. Dolayısı ile elektroferogramın hem genelinde hem de her bir STR bölgesinde durum bu şekilde olmalıdır (Şekil 10) (Semizoğlu, 2013).



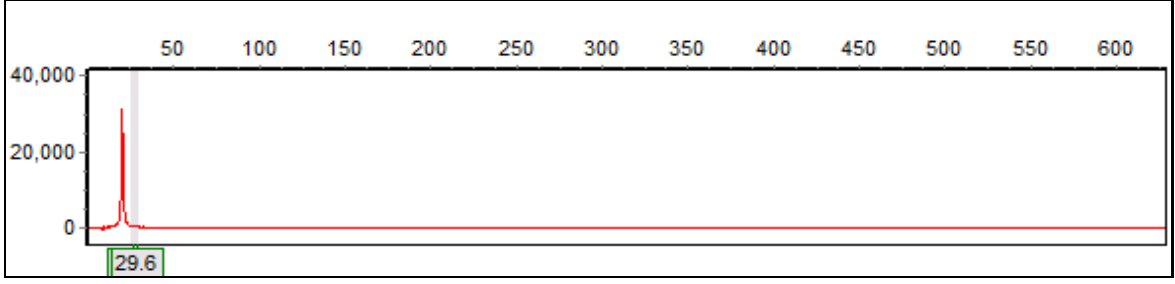
Şekil 10. Homozigot ve heterozigot allel piklerinin gösterilmesi

### 1.3.6.7. Allel Sayısı ve Karışık Örnek

Genel olarak tek bir katılımcıya ait STR bölgesi homozigot veya heterozigot olmasına göre tek veya çift allel içerir. Heterozigot bireylerde allelleri temsil eden piklerin RFU boylarının birbirine oranı %70'in altında olmaz. Genelde RFU' su büyük olan küçük alleldir. İki katılımcı bulunan durumlarda ise örnek "Karışık Örnek" olarak adlandırılır ve allel sayısı en az bir en çok dört olabilir. Katılımcı sayısı üç olduğunda en çok altı allel bulunur ve üçten fazla katılımcının bulunduğu durumlarda en yüksek allel sayısı sekiz olacağından özellikle heterozigot STR bölgelerinde katılımcıların allelleri sağlıklı bir şekilde belirleme ve DNA profilini doğrulukla ortaya çıkarma ihtimali düşük olacaktır (Semizoğlu, 2013).

### 1.3.6.8. Yapay Pikler

İdeal örneklerde tek bir katılımcıdan en çok iki allel elde edilebileceği öngörülse de bazı istisnai durumlardan kaynaklı fazladan allelleri görmek de mümkündür (Şekil 11). DNA profillemesini yapacak kişi gerçek allel pikleri ile fazladan ortaya çıkan yapay pikleri ayırmalıdır. Zira yapay pikler tespit edilemez ise örnek karışık örnek olarak tanımlanıp sonuç yanlış yorumlanabilir (Semizoğlu, 2013).



Şekil 11. Yapay piklerin gösterilmesi

### 1.3.6.9. Stutter Pikleri

Gerçek allellerin bir tekrar öncesinde olan ve gerçek pik boyunun %15'inden küçük olan piklerdir. Genelde tüm profilde bulunan allel piklerinin hepsinin öncesinde mevcuttur. Gölge bant ve DNA Polimeraz Kayma Ürünü olarak da adlandırılırlar. PCR'nin uzama bölümünde DNA Polimeraz aktivitesi sonucunda meydana gelen eksik ürünlerdir. Primer uzaması sırasında ana zincirin tekrar bölgelerinin şişme veya katlanma sebebi ile bir ünitesinin Polimerazca atlanarak çoğaltılması ile oluşurlar. Her ne kadar tüm bölgelerde görülse de büyüklük oranları bölgeden bölgeye ve allelden allele farklılık gösterebilir. Büyük olan allellerin Stutter pik oranları küçük allellere göre daha yüksektir. Tekrar ünitesi büyük olan bölgelerde Stutter oluşma oranı çok daha düşüktür (Semizoğlu, 2013).

### 1.3.6.10. –A Piki

DNA Polimeraz aktivitesi sonunda PCR ürününün 3' ucuna kalıp DNA'da eş olmayan bir baz ekler. Genelde eklenen bu baz adenozindir ve bu sebeple ekleme işlemi Adenilasyon olarak da adlandırılır. Bu işlem sonunda her bir ürün kalıp DNA'nın aynı bölgesine göre bir baz daha uzun olur.

Standart bir PCR'da adenilasyon PCR'ın döngüleri tamamlandıktan sonraki inkübasyon süresinde tamamlanır. Bu inkübasyon süresi yaklaşık 30 ila 45 dakika arası olur ve optimize ısı derecesi çoğaltılan STR bölgelerine göre değişebilir. Ancak zaman zaman standart PCR bileşenlerinin olmaması sebebi ile bir kısım ürünlerde adenilasyon eksik kalabilir. Bu durumda elde edilecek allel pikleri de varyasyon gösterebilir. Örneğin bir baz farklılıktan kaynaklı olarak çatallı ya da kamburlu pik görüntüleri oluşabilir. Bu tip

görüntülerde mutasyon ihtimali ile ya da tam tekrarlı olmayan alleller ile karıştırılabilir. Bu duruma en iyi örnek TH01' de bulunan 9.3 allelidir. 10 alleli ile bir baz farkı olan bu allellin –A mı olduğu yoksa doğal bir allel mi olduğunun ayırımında dikkat edilmelidir. Ancak eğer profilde –A pikleri var ise bu genelde her bölgede aynı anda görülebilir. Dolayısı ile profilin tamamına yayılmış veya bir kısmında bulunan bir pik anomalisi ile pikin karşılaştırılıp –A piki tanımı yapılması kolaydır (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.11. Yansıma Pikler**

Floresan boya miktarı fazla olduğunda ya da cihazın matriks ayarları ile ilgili bir aksama meydana gelmiş ise cihaz tespit ettiği dalga boyunu tam olarak sınıflandıramayabilir. Bunun sonucu olarak sanki tüm boyalardan sinyal alıyor gibi veri değerlendirip tüm boyalarda pik oluşturur. Mavi ve yeşil gibi birbirine yakın dalga boyunda ışımaya yapan boyalar özellikle ışımaya yapan özellikle ışımaya yapan ürün DNA miktarı da fazla ise diğer renk kulvarlarında yapay pikler oluşturabilir. Pikler tüm renklerin aynı bölgesinde olacağından tüm veri değerlendirilerek yansıma kaynaklı yapay pikler elenebilir. Yansımanın sebebine göre cihaza yüklenen ürün miktarının düşürülmesi veya matriksin yenilenmesi ile sorun çözülebilir (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.12. Boya Artıkları**

Primerler üzerinde bulunan boyalar zaman zaman ayrılarak veya çeşitli etkileşimler ile bağımsız bir şekilde kolon içinde hareket edip detektör önünden geçerler ise cihaz bu artıkları da pik olarak değerlendirebilir. Bu pikler küçük ve daha geniş tepeye sahiptirler. Daha çok stutter büyüklüğünde veya daha küçük olabilirler ancak karışık örnekler tiplendirilirken düşük yoğunluktaki katılımcının DNA pikleri ile karıştırılma riskleri vardır (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.13. Pik Benzeri Atımlar**

Toz, hava kabarcığı, ani elektriksel değişimler ve üre kristalleri gibi sebeplerden kaynaklanırlar. Allel piklerine benzer yapıda olsalar da genişlik olarak çok dar ve anlık

atımlar olduklarından allel piklerinden kolayca ayırt edilebilirler. Herhangi bir anda ortaya çıkabilirler. Bunların yanı sıra tekstil boya atıkları, vitaminler, aromatik bileşikler ve bir çok molekülde benzer atımlara sebep olabilir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi görüntü olarak allel piklerinden kolayca ayırt edilebilirler (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.14. Allel Düşmesi**

PCR ile çoğaltılacak bölge 3 kısımdan oluşur. Primer bağlanma bölgesi, tekrar dizi ile primer bağlanma bölgesi arasında kalan kanat kısmı ve tekrar dizisi. Eğer primer bağlanma bölgesinde bir hasar veya mutasyon meydana gelmiş ise primer etkin olarak bağlanamayacağından gen bölgesinin çoğaltılması veya yeterli miktarda ürün eldesi mümkün olmaz. Bu durumda eğer her iki kromozomda hasarlı ise hiç allel elde edilemez ya da tek kromozomda hasar var ise heterozigot olan birey homozigot olarak tiplendirilir. Bununla beraber tüm STR bölgeleri için daha önce de belirtildiği gibi büyük allel diğer allele göre daha az çoğalır ki optimize olmayan koşullarda büyük allel tespit edilemeyecek düzeyde çoğalarak yine STR bölgesinin homozigot olarak değerlendirilmesine neden olabilir. Bu sebeple özellikle homozigot gen bölgelerinin değerlendirilmesinde allel düşmesi mutlaka dikkate alınmalıdır. Allel düşmesi tek bir bölgede olabileceği gibi eğer sorun PCR şartlarından kaynaklı ise birden fazla ve özellikle de büyük STR bölgelerinde de bulunabilir. Hiç allel bulunmayan STR bölgelerinde allel düşmesi olup olmadığını tespit etmek daha kolaydır. Ancak allel bulunmamasının sebebi ise çok fazla olabilir. Allel düşmesinin tespiti ve giderilmesinde en etkili yöntem bir başka primer setinin ve kitin kullanılmasıdır. Bununla beraber kalıp DNA konsantrasyonunun ve analizin optimal şartlarda olup olmadığı da gözden geçirilmelidir (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.15. Mikroallel ve Allellik Ladder Dışı Allel**

Yapay pikler rastgele oluştuğu için tespitinde en etkili yöntem Allellik Ladder ile çakışıp çakışmadığının kontrolüdür. Ancak yapay pik olmayıp allellik ladder ile örtüşmeyen alleler de vardır. Allellik ladderlar popülasyonda yaygın olarak bulunan allellerden oluşurlar dolayısı ile popülasyonda bulunan tüm allelleri içermeyebilirler. Bu yüzden tespit edilen bir allellik ladder dışı pikin doğal mı yoksa yapay mı olduğunu

anlamak çok önemlidir. Mikroalleliler diğere allellerin aksine eksik bazlı tekrarlar içeren allellerdir. Allelik ladder ile oturmayan her allel, allelik ladder dışı alleldir ancak allel eksik baz tekrarı içeriyorsa mikroallel olarak adlandırılır. Yine aynı şekilde allelik ladder dışında kalan diğere allellerde yapay olmadıkları kanıtlanarak allel olarak değerlendirilebilir. Ladder dışı allellerin tespitinde en güvenilir yol sekans analizi yapmaktır (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.16. Parçalanmış DNA**

Elde edilen DNA genellikle fiziksel ve kimyasal etmenlere maruz kalmış haldedir. Her ne kadar DNA analizleri için biyolojik örneklerin toplanması ve saklanması için yeni teknolojiler geliştirilmiş ise de biyolojik örnekler çok çabuk bozulabilecek niteliktedirler. Özellikle su, toprak, güneş ışığı gibi fiziksel etmenler, nükleaz gibi biyolojik etmenler DNA'nın kararlı yapısını bozarlar ve DNA parçalanabilir. STR bölgeleri ile küçük hedef DNA parçacıklarının analizi sağlandığından parçalanmış DNA içinde analizlerden çok iyi sonuç alınabilmektedir. Ancak parçalanma primer bağlanma veya çoğaltılacak hedef DNA dizisinde meydana gelmiş ise çoğaltma işlemi etkin olarak gerçekleşmeyeceğinden Multipleks bir PCR'da bazı STR bölgelerinden sonuç alınamayabilir. Yapılması gereken öncelikle DNA'nın parçalanmış olup olmadığının doğrulanmasıdır. Bu doğrulama işlemi agaroz jel elektroforezi ile yapılabilir. Eğer agaroz jel elektroforezinde örnek tek bant yerine sürüntü şeklinde ise DNA parçalanmıştır. Bu durumda yapılabilecekler aynı bölgeler için başka primer setleri kullanmak veya diğere STR bölgelerini çoğaltmak olabilir (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.17. İnhibisyon**

PCR analizleri birçok bileşen içerir. PCR'ın başarı ile sonuçlanması için mutlaka tüm bileşenlerin etkin olarak rol oynamaları gerekir. Herhangi bir etkenin dahil olmaması analizin başarısız olmasına sebep olur. Elde edilen örneklerin maruz kaldıkları çevresel etmenler DNA'yı veya PCR sonucunu olumsuz etkileyebilirler. Genelde DNA izolasyonu prosedürleri ile biyolojik örneklerle transfer edilen kirliliklerin uzaklaştırılması hedeflenir. Ancak gerek artı kalan ve temizlenmeyen inhibitörler gerekse tüm analiz basamaklarında



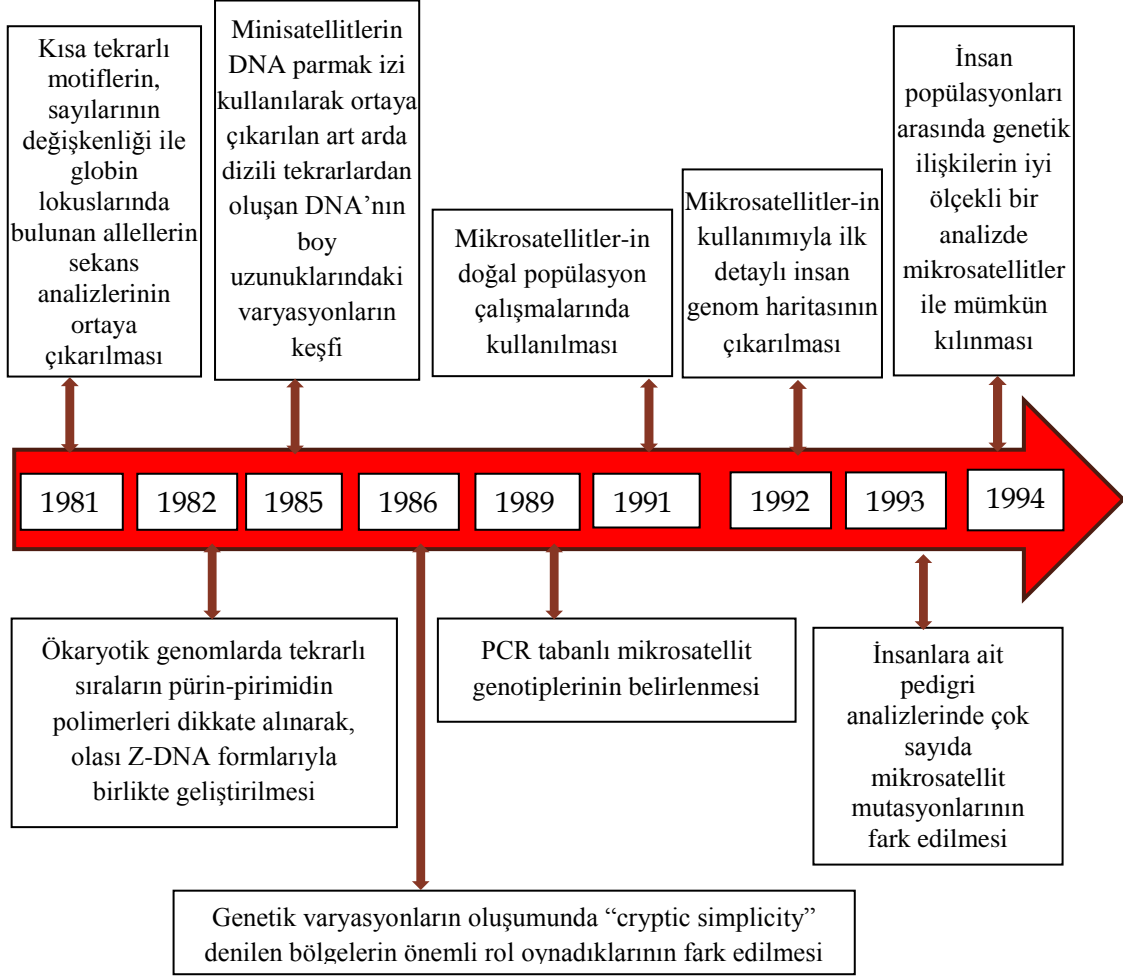
kullanılan ve PCR tüpüne taşınan inhibitörler analizi olumsuz sonuçlandırabilir. İnhibitör varlığının örnekten mi yoksa kullanılan malzemelerden mi kaynaklandığı izolasyon ve PCR yaparken çalışma grubuna eklenecek olan + ve – kontrol örneklerinden anlaşılabilir. Eğer eklenen kontrol örnekleri beklenen sonuçları vermiş ise sorun çok büyük bir olasılıkla örnekte kaynaklanıyordur. Eğer kontrol örnekleri beklenen sonuçları vermemiş ise tüm çalışma zinciri boyunca yapılan bir hata ya da inhibitör tüm analizi etkilemiştir. Sorunun kaynağını bulma için her bir basamak gözden geçirilmelidir. Örneğin sulandırılarak inhibitörün seyreltilmesi, inhibitör tespit edilmiş ise inhibitöre bağlanabilecek ajanların kullanılması ya da daha fazla DNA polimeraz eklenmesi çözüm olabilir (Semizoğlu, 2013).

#### **1.3.6.18. Genetik Anormallik**

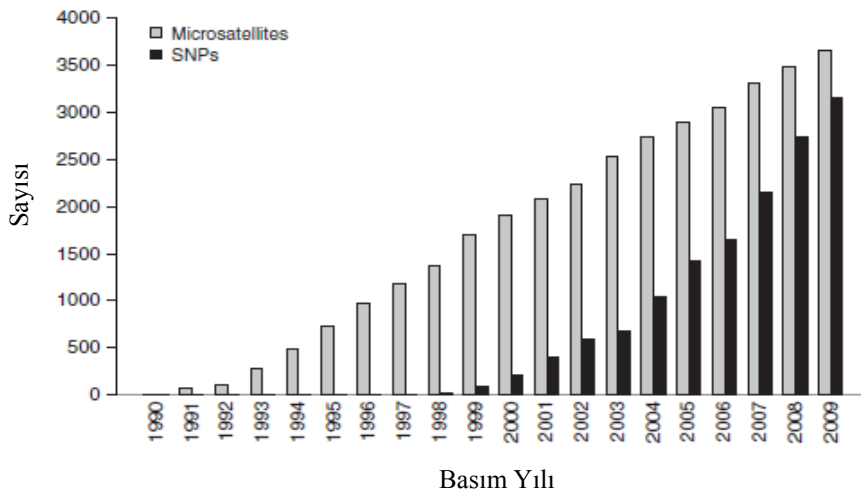
Kromozomal translokasyonlar, duplikasyonlar, delesyon, insersiyon ve trizomiler ile somatik mutasyonlar STR bölgelerinin allel sayılarını etkileyebilir. Örneğin trizomisi olan bir bireyin trizomi gösteren kromozomu için üç allel tespit edilebilir. Tiplendirme yapılırken mutlaka bu tip etkenler de göz önünde tutulmalıdır. Özellikle eşey kromozomlarındaki anormallikler allellere ait piklerin RFU boylarına bakılarak tespit edilebilir (Semizoğlu, 2013).

Mikrosatellit DNA keşfedildikten sonra birçok alanda kullanılmaya başlandı (Şekil 12). Özellikle 1990 ve 2009 yılları arasında bu yöntemin kullanılmasında ciddi bir artış yaşandı (Şekil 13). 2009 ve 2010 yılları arasında çok çeşitli canlı grupları için kullanımı yaygınlaştı (Tablo 2).

### Zaman Çizelgesi: Mikrosatellit DNA'nın Keşfinden Sonraki İlk 13 Yılda Neler Yapıldı?



Şekil 12. Zaman Çizelgesi-Mikrosatellit DNA'nın Keşfinden Sonraki İlk 13 Yılda Neler Yapıldı? (Ellegren, 2004).



Şekil 13. 1990 yılından 2009 yılına kadar mikrosatellit metodunun kullanımındaki artışı gösteren grafik (Guichoux, 2011).

Tablo 2. 2009-2010 yıllarında Moleküler Ekoloji Dergisi'nde mikrosatellit DNA yöntemi kullanılarak yapılan her biri kendi içerisinde orjinal yayınlar (Guichoux, 2011).

Araştırılan Canlılar	(%)
Memeliler	18
Omurgasızlar	16
Bitkiler	15
Arthropodlar	14
Amfibi ve Sürüngenler	12
Kuşlar	11
Mantarlar	8
Balıklar	6
Tekrar Ünitelerinin Uzunluğu	(%)
Di-nükleotit	46
Tri-nükleotit	13
Tetra-nükleotit	14
Imperfect	26
Multiplexing	(%)
1-4 markers	15
5-8 markers	19
>8 markers	8
Herhangi bir markır kullanımı olmadan	58
Null Allel Oranı	(%)
Evet	40
Hayır	60
Hata Oranları	(%)
Evet	26
Hayır	74

Herpetoloji ile ilgili mikrosatellit DNA metodu ile hazırlanan birçok çalışma mevcuttur. Özellikle *Darevskia* cinsi için yapılmış en kapsamlı çalışma 2006 yılında Korchagin ve ark. tarafından, partenogenetik bir kertenkele olan *Darevskia unisexualis* ve biseksüel ataları *Darevskia raddei* ile *Darevskia valentini*'ye ait 5 adet mikrosatellit lokusunun (Du215, Du281, Du323, Du418 ve Du47) alel frekanslarının ve sekanslarının incelenmesiyle başlamıştır. Bu çalışmada, filogenetik olarak bazı ayrımlara gidilmiş ayrıca

Du218 lokusunun *Darevskia unisexualis*'e atalarından miras kalan bir haplotip olduğu gerçeği açığa çıkarılmıştır.

2005 yılında Grechko ve ark. tarafından *Lacerta agilis* kompleksi, *Lacerta* s. str. *Podarcis*, *Darevskia*, *Zootoca*, *Eremias* ve *Ophisops* cinsleri ve söz konusu türün alttürlerinin moleküler düzeyde ayrımı için kullanılmış ve çalışmada Agi160 mikrosatellit lokusunun sekans analizi çalışılmıştır. Bu çalışmada ayrıca RAPD Metodu da kullanılmıştır.

2006 yılında Malysheva ve ark. tarafından *Darevskia armeniaca*'da Du215 lokusunun sekans analizi çalışılmıştır. Bu çalışma, 2006 yılında büyük yankı yapan Korchagin ve ark. tarafından hazırlanan çalışma referans alınmış ve bu çalışma ile karşılaştırmalı olarak hazırlanmıştır. *Darevskia armeniaca*'da Du215 lokus sekansının, *Darevskia unisexualis* ile aynı tekrarları taşıdığı fakat ilaveten farklı tekrarların da bulunduğu rapor edilmiştir. Böylelikle belirlenen lokusların isimleri aynı olsa da (Du215) içerdiği tekrar sayıları ve nükleotitlerde farklılık taşıdığı gerekçesi ile tür yahut alttür seviyesinde farklılıklara ulaşılabilceği gösterilmiştir. Türe özgü olduğu için, *Darevskia armeniaca*'da bulunan Du215 lokusu Du215 (arm) adını almıştır.

2004 yılında Ciobanu ve ark. tarafından *Lacerta agilis exigua*, *Lacerta agilis boemica* ve *Lacerta strigata*'dan temin edilen kan örneklerinde Agi160 ve CLsat tekrarlı üniteleri çalışılmıştır. Agi160 lokusunun hibridizasyon analizleri ve sekans yapıları incelenmiştir. *Lacerta strigata* ve *Lacerta agilis* türlerinin art arda dizili tekrarlı üniteleri açığa çıkarılmıştır. Ayrıca Agi160 ve CLsat lokuslarının ardışık tekrarlarının çalışılan türlerde oldukça benzer olduğu bilgisi kaydedilmiştir.

2006 yılında Hoehn tarafından hazırlanan bir çalışmada Avustralya Gekoları çalışılmıştır. Belirlenen lokuslar önceki çalışmalarda olmayan farklı Geko türlerinde denenmiş ve Geko türlerini ayırmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Çalışma Sahası

Bu çalışmada KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Araştırma Laboratuvarı personeli (Ufuk Bülbül, Muammer Kurnaz ve Ali İhsan Eroğlu) tarafından değişik zamanlarda yakalanmış ve diyagnostik özellikleri belirlenmiş *D. rudis*' in nominant alttürü olan *D. rudis rudis*' e ait Ordu-Ünye (1), Ordu-Perşembe (2), Giresun-Dereli-Alancık (1), Giresun- Görele-İsmailbeyli Köyü (1), Gümüşhane-Köse (3), Samsun-Derelisefaköyü (2), Samsun-Terme (1), Samsun-Canikli (1), Samsun-Merkez Girişi (2), Trabzon-Düzköy-Haçkalıbaşa Yaylası (1), Trabzon-Çağlayan-Okçu Mahallesi (1), Trabzon-Yıldızlı-Demirtaş Köyü (1), Trabzon-Dernekpazarı (1), Trabzon-Arsin-Fındıklı Köyü (1), Trabzon-Merkez-Tosköy Köyü (1), Trabzon-Arsin-Dilek Köyü (1), Trabzon-KTÜ Kampüsü (1), Trabzon-Sürmene-Çiftesu Köyü (1), Trabzon- Zigana (1), Trabzon-Of-Cumhuriyet Mahallesi (1), Samsun-Bafra (1), Gümüşhane-Karamustafa Köyü ( 1), Trabzon-Derecik (1), Trabzon-Akçaabat-Mersin Konutları (1), Trabzon-Yomra (1) örnekleri; diğer alttürlerinden *Darevskia rudis mirabilis*' e ait Rize-Ovit Yaylası (5) örnekleri; *Darevskia rudis macromaculata*' ya ait Artvin-Şavşat-Çamgeçiti Aşağısı (4), Artvin-Şavşat-Hocaköy Mezrası (4) örnekleri; *Darevskia rudis obscura*' ya ait Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası (4), Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası arası (3) örnekleri; *Darevskia rudis bischoffi*' ye ait Artvin-Çiftekemerköprü (1), Rize-İyidere (2), Rize-Ayder (1), Rize-Fındıklı (1), Rize-Ardeşen (1), Artvin-Borçka-Camili arası (1), Artvin- Çifteköprü (1), Artvin-Hatila Vadisi-Başyayla (1), Artvin-Hopa-Esenkıy (2), Artvin-Hopa-Kemalpaşa (1), Artvin-Murgul (2), Artvin-Murgul-Yukarı Balaban (1), Artvin-Ortacalar (1), Artvin-Merkez (1), Artvin-Hatila Vadisi (1), Artvin-Yanıklı (2), Artvin-Bespare Köyü-Orman Yolu (2), Artvin-Borçka-Lekoban Yaylası (2), Artvin-Şavşat-Cancir Yaylası (2), Artvin-Şavşat-Madenköy (1), Artvin-Barhal (1), Ardeşen-Çamlıhemşin Yolu 10. km (1), Artvin- Erenköy-Yusufeli (1) ve Artvin-Yeşilköy (1) örnekleri kullanılmıştır (Şekil 14). *D. rudis rudis* örnekleri 2012 ve 2013 yıllarında; *Darevskia rudis mirabilis*, *Darevskia rudis macromaculata*, *Darevskia rudis obscura* ve *Darevskia rudis bischoffi* örnekleri 2014 yılının yaz aylarında yapılan arazi çalışmalarıyla toplanmıştır.



Şekil 14. Bu çalışmada incelenen kertenkele örneklerinin toplandığı lokaliteler 1-Bursa-Uludağ, 2-Yığılca-Düzce, 3-Alaplı-Zonguldak, 4-Kurucaşile-Bartın, 5-Sinop-Merkez, 6-Bafra-Samsun, 7- Canik-Samsun, 8- Samsun-Merkez Girişi, 9- Sefalı Köyü-Çarşamba, 10- Terme-Samsun, 11- Ünye-Ordu, 12- Perşembe-Ordu, 13- Alancık-Dereli-Giresun, 14-Karamustafa-Gümüşhane, 15-Köse-Gümüşhane, 16- Zigana Geçidi, 17- İsmailbeyli Köyü-Görel-Giresun, 18- Haçkalıba-Düzköy, 19-Mersin Konutları-Akçaabat, 20-KTÜ Kampüs, 21- Demirtaş Köyü-Yıldızlı, 22- Derecik-Trabzon, 23- Okçu Mah.-Çağlayan, 24- Tosköy Köyü, 25- Dilekköyü-Arsin, 26- Fındıklı Köyü-Arsin, 27-Yomra, 28- Dernekpazarı, 29- Of Cumhuriyet Mahallesi, 30- Sürmene, 31- İyidere, 32- Ovit Geçidi, 33- Ardeşen, 34- Çamlıhemşin Yolu 10. Km, 35- Ayder Yaylası, 36- Fındıklı-Rize, 37-Barhal Vadisi-Yusufeli, 38-Çiftekemer Köprü-Arhavi, 39- Ortacalar-Arhavi, 40- Hatıla Vadisi, 41- Başyayla, 42- Murgul, 43- Yukarı Balaban-Murgul, 44- Arhavi-Merkez, 45- Esenkıyı-Hopa, 46-Kemalpaşa-Hopa, 47-Çifteköprü-Borçka, 48- Yeşilköy, 49- Borçka-Camili Arası, 50- Yanıklı Yaylası, 51- Erenköy-Yusufeli, 52- Beşpare Köyü, 53- Lekoban Yaylası, 54- Madenköy-Şavşat, 55- Cancir Yaylası, 56- Geçitli-Bilbilan Yaylası, 57- Geçitli Bilbilan Yaylası Arası, 58- Hocaköy Mezraası, 59- Çam Geçidi Aşağısı

Çalışmada ayrıca Bursa-Uludağ'dan yakalanmış *D. bithynica*'nın; nominant alttürü olan *D. bithynica bithynica* örnekleri (5 adet) kullanılırken; Düzce-Yığılca (1), Zonguldak-Alaplı (2), Bartın-Kurucaşile (2) ve Sinop-Merkez (5)' den yakalanmış *D. bithynica tristis* örnekler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *D. bithynica* türüne ait örneklerin tamamı 2012 yılının yaz aylarında yapılan arazi çalışmalarında yakalanmış bireyleri kapsamaktadır.

Bu çalışmada *D. rudis*'e ait alttürlerden yalnızca, Türkiye'nin Niğde ilinde dağılışı gösteren *D. r. bolkardaghica* alttürü mevcut örnek bulunmadığından dolayı kullanılmamıştır.

Tablo 3. Bu çalışmada kullanılan kertenkele örneklerinin popülasyon isimleri ve lokaliteleri

Örneğin Numarası	Popülasyonun Adı	Lokalitesi
1	<i>D. b. bithynica</i>	Bursa Uludağ1
2	<i>D. b. bithynica</i>	Bursa Uludağ2
3	<i>D. b. bithynica</i>	Bursa Uludağ3
4	<i>D. b. bithynica</i>	Bursa Uludağ4
5	<i>D. b. bithynica</i>	Bursa Uludağ5
6	<i>D. r. tristis</i>	Düzce-Yığılca
7	<i>D. r. tristis</i>	Zonguldak-Alaplı-1
8	<i>D. r. tristis</i>	Zonguldak-Alaplı-2
9	<i>D. r. tristis</i>	Bartın-Kurucaşile-1
10	<i>D. r. tristis</i>	Bartın-Kurucaşile-2
11	<i>D. r. tristis</i>	Sinop-Merkez-1
12	<i>D. r. tristis</i>	Sinop-Merkez-2
13	<i>D. r. tristis</i>	Sinop-Merkez-3
14	<i>D. r. tristis</i>	Sinop-Merkez-4
15	<i>D. r. tristis</i>	Sinop-1
16	<i>D. r. rudis</i>	Gümüşhane-Köse-2
17	<i>D. r. rudis</i>	Gümüşhane-Köse-3
18	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Derelisefaköyü-1
19	<i>D. r. rudis</i>	Ordu-Ünye
20	<i>D. r. rudis</i>	Ordu-Perşembe-1
21	<i>D. r. rudis</i>	Ordu-Perşembe-2
22	<i>D. r. rudis</i>	Giresun-Dereli-Alancık
23	<i>D. r. rudis</i>	Giresun-Görelle-İsmailbeyli Köyü
24	<i>D. r. rudis</i>	Gümüşhane-Köse-1
25	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Derelisefaköyü-2
26	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Arsin-Fındıklı Köyü
27	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Merkez-Tosköy Köyü
28	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Arsin-Dilek Köyü
29	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Terme
30	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Canikli
31	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Merkez Girişi-1
32	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Merkez Girişi-2
33	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Düzköy-Haçkalıbaşa Yaylası
34	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Çağlayan-Okçu Mahallesi
35	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Yıldızlı-Demirtaş Köyü
36	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Dernekpazarı
37	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-KTÜ Kampüsü
38	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Sürmene-Çiftesü Köyü
39	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Zigana
40	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Of-Cumhuriyet Mahallesi
41	<i>D. r. rudis</i>	Samsun-Bafra
42	<i>D. r. rudis</i>	Gümüşhane-Karamustafa Köyü
43	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Derecik
44	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Akçaabat-Mersin Konutları
45	<i>D. r. rudis</i>	Trabzon-Yomra
46	<i>D. r. mirabilis</i>	Rize-Ovit Yaylası-1
47	<i>D. r. mirabilis</i>	Rize-Ovit Yaylası-2

Tablo 3'ün devamı

48	<i>D. r. mirabilis</i>	Rize-Ovit Yaylası-3
49	<i>D. r. mirabilis</i>	Rize-Ovit Yaylası-4
50	<i>D. r. mirabilis</i>	Rize-Ovit Yaylası-5
51	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Çamgeçiti Aşağısı-1
52	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Çamgeçiti Aşağısı-2
53	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Çamgeçiti Aşağısı-3
54	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Çamgeçiti Aşağısı-4
55	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Hocaköy Mezrası-1
56	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Hocaköy Mezrası-2
57	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Hocaköy Mezrası-3
58	<i>D. r. macromaculata</i>	Artvin-Şavşat-Hocaköy Mezrası-4
59	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası-1
60	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası-2
61	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası-3
62	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası-4
63	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası arası-1
64	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası arası-2
65	<i>D. r. obscura</i>	Ardanuç-Geçitli-Bilbilan Yaylası arası-3
66	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Çiftekemerköprü
67	<i>D. r. bischoffi</i>	Rize-İyidere-2
68	<i>D. r. bischoffi</i>	Rize-İyidere-3
69	<i>D. r. bischoffi</i>	Rize-Ayder
70	<i>D. r. bischoffi</i>	Rize-Fındıklı
71	<i>D. r. bischoffi</i>	Rize-Ardeşen
72	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Borçka Camili arası
73	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Çifteköprü 1
74	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Hatila Vadisi-Başyayla 1
75	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Hopa-Esenküyü-1
76	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Hopa-Esenküyü-2
77	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Hopa-Kemalpaşa
78	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Murgul-1
79	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Murgul-2
80	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Murgul-Yukarı Balaban-17
81	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Ortacalar-2
82	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Merkez
83	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Hatila Vadisi
84	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Yanıklı 1
85	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Yanıklı-2
86	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Bespare Köyü-Orman Yolu-1
87	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Bespare Köyü-Orman Yolu-2
88	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Borçka-Lekoban Yaylası-1
89	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Borçka-Lekoban Yaylası-2
90	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Şavşat-Cancir Yaylası-1
91	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Şavşat-Cancir Yaylası-2
92	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Şavşat-Madenköy
93	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Barhal-2
94	<i>D. r. bischoffi</i>	Ardeşen-Çamlıhemşin Yolu 10. km-2
95	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Erenköy-Yusufeli
96	<i>D. r. bischoffi</i>	Artvin-Yeşilköy



*Darevskia rudis* türü için toplamda 54 ayrı lokaliteden 81 birey; *Darevskia bithynica* türü için 5 lokaliteden 15 birey olmak üzere toplamda 96 birey kullanılmıştır (Tablo 3).

Bu çalışmada 59 lokaliteye ait tür ve alttür olmaları yönünden belirlenen popülasyonlar, literatürdeki dağılış alanları dikkate alınarak 7 gruba ayrılmıştır. Buna göre; *D. b. bithynica* popülasyonu Uludağ Grubu; *D. r. tristis* popülasyonları Düzce Grubu; *D. r. rudis* popülasyonları Trabzon Grubu; *D. r. mirabilis* popülasyonu Rize Grubu (Ovit Geçitini temsil etmektedir); *D. r. macromaculata* popülasyonları Şavşat Grubu; *D. r. obscura* popülasyonları Ardanuç Grubu ve *D. r. bischoffi* popülasyonları Artvin Grubu olarak belirlenmiştir.

## 2.2. Örneklem

Belirtilen lokalitelerden Karadeniz Teknik Üniversitesi, Zooloji Lab.-1 ekibi tarafından değişik zamanlarda tutulmuş kertenkele örnekleri yaşam alanlarında elle yakalanmış ve çeşitli çalışmalar yapılmak üzere Karadeniz Teknik Üniversitesi, Zooloji Lab.-1' e getirilmiştir. Eter ile muamele edilerek bayıldıktan sonra morfolojik özelliklerinin kayıt altında tutulması için dorsal, ventral ve lateralden fotoğrafları çekilmiştir. Genomik DNA'ların eldesi için, bireylerin arka üyelerindeki en uzun parmağın ucundan doku örnekleri alınmış ve kullanılıncaya kadar %96'lık alkolün içerisinde -20° C'de saklanmıştır. Kertenkele örnekleri örneklem işleminin ardından Karadeniz Teknik Üniversitesi, Zooloji Lab.-1'de daha sonraki çalışmalarda kullanılması amacıyla %70'lik alkol içerisinde saklanmıştır. Bu tez çalışmasında doku örnekleri izolasyonları gerçekleştirilmeden önce ATL, Proteinaz K ve RNase A karışımı ile muamele edilmiş (Tablo 4) ve bu karışım 2µl'lik eppendorfların içerisinde, sıcaklığı 56° C olan etüvde bir gece bekletilmiştir (Şekil 15). Etüvden çıkarılıp izolasyonları başlatılmadan önce orta hızda vortekse tabii tutulmuşlardır.

Tablo 4. Doku izolasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan karışımın içeriği

İçerik	ATL	Proteinaz K	RNase
Miktar (µl)	180	20	4



Şekil 15. Doku örneklerinin izolasyona hazırlanma aşamasında bir gece bekletildiği etüv

### 2.3. Genomik DNA'nın Elde Edilmesi ve Görüntülenmesi

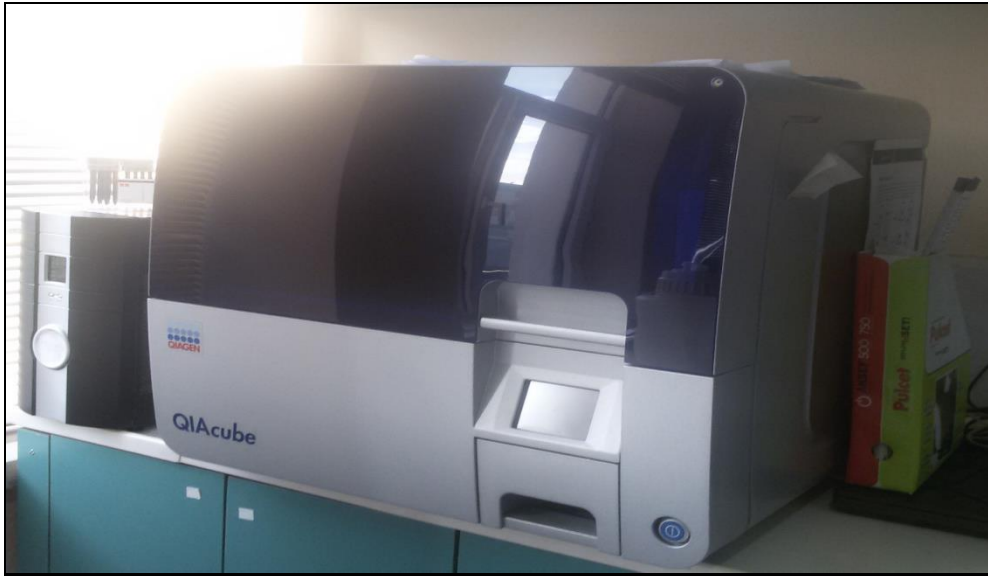
Genomik DNA izolasyonu Qiagen DNA izolasyon kitleri ile QIAcube DNA izolasyon cihazı kullanılarak üretici firmanın sağlamış olduğu protokole göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 16). Doku örnekleri, sözü geçen cihaz ile 12'şerli gruplar halinde 1'er saatte hazırlanmıştır. Cihazın içerisinde çalıştırılmadan önce doldurulması gereken 4 ayrı bölüm mevcuttur:

1. Bir gece izolasyon karışımı içerisinde, etüvde 56°C'de bekleyen doku örnekleri 12'şerli gruplar halinde ayrılmıştır. QIAcube DNA izolasyon cihazı içerisinde, izolasyona kaynaklık edecek doku örneklerinin yerleştirileceği 2µl'lik eppendorfları taşıyan 12'li bir adet doku rak'ı bulunmaktadır. Doku örnekleri arasında seçilen ilk grup belirtilen rak içerisinde numaralı yerlere yerleştirilmiştir.
2. İzolasyonun gerçekleşmesine imkan sağlayacak olan kimyasallar, Qiagen DNA İzolasyon Kitleri'nin içerisinde çıkarılarak; ilk tankta AL; ikincisinde AW1, üçüncüsünde AE, dördüncüsünde AW2 ve sonuncusunda EtOH (%100) bulunacak şekilde tanklarına yerleştirilmiştir.
3. Doku örnekleri ile kimyasalların irtibata geçmesini sağlayacak, 2 çeşit uzun uç seti kuyucukları mevcuttur. Bunlardan açık renkli olan uç setleri dar ağızlı iken koyu renkli olan uç setleri geniş ağızlıdır. Her uç setinin taşıyacağı kimyasal serileri belirlidir.
4. Cihazın içerisinde izole olacak örneklerin, sözü geçen kimyasallarla muamelelerinin ardından, filtreli mini birer spin column (her örnek için ayrı) ve izole olan ürünün en son halinin saklanacağı 1,5 µl'lik eppendorf tüpleri (her örnek için ayrı) taşıyan kasetlerin konulacağı numaralı ve geniş bir kuyu

bulunmaktadır. Numaralı örnek rak'larında bulunan dokular, buradaki numaralı kasetlerle eşleşecek şekilde yerleştirilmiştir.

Program 1 saat içerisinde parçalanma, bağlanma, yıkanma ve ayrıştırma basamağı olmak üzere toplam 4 basamaktan oluşan bir program ile çalışarak doku izolasyonlarını tamamlamıştır.

Tüm bu işlemlerin sonunda izolasyonları gerçekleştirilen örnekler, numaralandırılarak +4° C'de saklanmış ve bu işlem 8 kez tekrar edilmiştir (12\*8=96 adet doku örneğinin izolasyonu için).



Şekil 16. DNA izolasyonlarının gerçekleştirildiği cihaz

#### **2.4. Primerlerin Belirlenmesi ve DNA'nın Çoğaltılması (DNA Amplifikasyonu)**

Mikrosatelit lokusları DNA üzerinde iki, üç ya da dördü baz tekrarlarından oluşan farklı büyüklükteki nükleotit dizileridir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenen mikrosatellit lokuslarının çoğaltılmanın yapılabilmesi için gerekli olan primerler; Korchagin (2006) tarafından, *Darevskia* cinsinin bir başka türü olan *Darevskia unisexualis* için hazırlanmış olan çalışmadan alınmıştır. Bu çalışma için Du215, Du281, Du323 ve Du418 ve Du47 mikrosatelit primerleri kullanılmıştır.

Mikrosatelit lokuslarına ait primerlerin 3 tanesi (Du281, Du323 ve Du 418) aynı reaksiyon şartlarında optimize edilirken bir tanesi (Du215) farklı reaksiyon şartlarında optimize edilmiş; bir lokusa ait primer (Du47) ise hiçbir reaksiyon şartı altında

çalıştırılmamıştır. Lokuslar için primer bağlanma sıcaklıkları Tablo 5’de verilmiştir. PCR reaksiyonu toplam 20 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı her 1,5 µl’ lik örnek için; 10 µl 2X multiplex mix, 0,5 µl ileri yönlü primer, 0,5 µl geri yönlü primer ve 7,5 µl ddH<sub>2</sub>O olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyonlar PCR cihazı Applied Biosystems (Veriti, Well 96) ile her bir primer için başlangıç denatürasyonu; 95° C 15 dk, denaturasyon; 95° C 20 sn, primer bağlanma sıcaklıkları 54° C her bir lokus için 1 dk, uzama; 72° C 2 dk ve son uzama; 72° C 10 dk olarak ayarlanarak 30 döngü şeklinde gerçekleştirildi (Tablo 6).

Tablo 5. Bu çalışmada kullanılan mikrosatellit lokusların adları, primerler ve primerlerin ideal çalıştığı sıcaklıklar

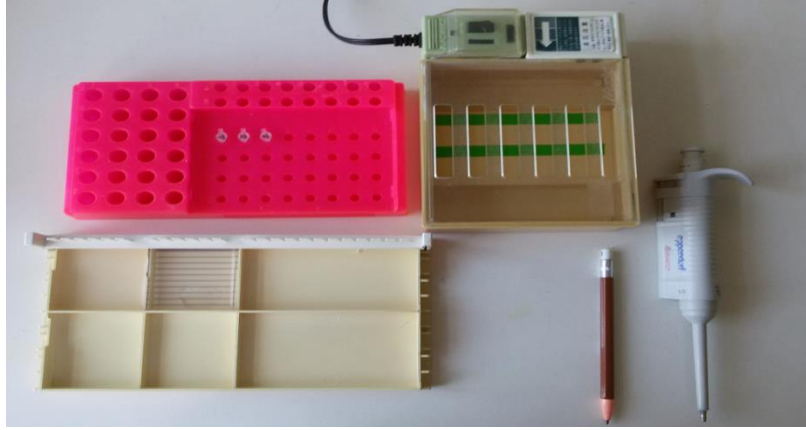
Lokus Adı	Primer (5’-3’) <sup>a</sup>	T <sub>a</sub> (°C)
Du215	F: CAACTAGCAGTAGCTCTCCAGA	54°C
	R: CCAGACAGGCCCAACTT	
Du281	F: TTGCTAATCTGAATAACTG	48°C
	R: TCCTGCTGAGAAAGACCA	
Du323	F: AAGCAGACTGTACAAAATCCCTA	48°C
	R: ACTGATCTAAAGACAAGGTAATAAT	
Du418	F: AATGCAACAGGTGGATAATACTT	48°C
	R: TCTCTAATACAGCTTGCCATAAA	
Du47	F: ATACAACCGCAATACACAATA	-
	R: TGAAGTGAAGCAGAGCACTAAATA	

Tablo 6. Mikrosatellit bölgeleri için çalışılan PCR kondisyonu

PCR Kondisyonu	Mikrosatellit Bölgeleri		
	Du215, Du281, Du323 ve Du418 Lokusları		
	Sıcaklık (°C)	Süre	Tekrar Miktarı (Döngü)
Birinci Denatürasyon	95	15 dk	1
Denatürasyon	95	20 sn	30
Bağlanma	54	1 dk	
Yeni Zincir Sentezi	72	2 dk	
Final Zincir Sentezi	72	10 dk	1

## 2.5. PCR Ürün Bantlarının Görüntülenmesi

PCR işlemlerinin tamamlanmasının ardından örnekler, etidyum bromid yoğunluğu 0,01 mg (1mg/100 $\mu$ l) olacak şekilde hazırlanan %1'lik agaroz jele, 5 $\mu$ l PCR ürünü ile 1  $\mu$ l 6X yükleme boyası (loading dye) ve 5 $\mu$ l, 100 bp'lik DNA boy belirteci (markır) yüklenmiş ve 1X TBE tampon sistemi içerisinde yürütülmüştür (Şekil 17). Jellerin yürütülme süresi, örneklerin yürüme hızı ve DNA boy belirtecinin açılmasına bağlı olarak 45 dakika, 100V/cm'de yürütülmüştür. Etidyum bromid ile boyanan DNA parçaları UV illüminatörle görüntülenmiştir (Şekil 18). Jel görüntüleri jel dökümantasyon sistemi (Biostep, Darkhood-DH30/32) ve termal yazıcı (Mitsubishi, P91D) kullanılarak kayıt altına alınmıştır.



Şekil 17. PCR örneklerinin yüklendiği jel ve elektroforez sistemi

Bu görüntüler üzerinden PCR çoğaltmasının etkinliği kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Aynı jel üzerinde PCR ürün boyunun beklenen ürün boyu ile benzerlik gösterip göstermediği kontrol edilmiştir. Du215, Du281, Du323 ve Du418 bölgelerinin çoğaltılan ürünlerinin yaklaşık boyları 200-300 bp'dir. Yapılan kontroller sonrası kuvvetli bantlaşma gösteren başarılı PCR ürünleri yakın bir zamanda kullanılmak üzere 4° C'de bekletilmiştir. Daha uzun süreli kullanımlar için ise PCR ürünleri derin dondurucuya (-20°C) konulmuştur.



Şekil 18. PCR ürünlerinin jel üzerinde görüntülediği cihaz

## 2.6. Flöresanlı Primerlerin Belirlenmesi, DNA'nın Çoğaltılması (DNA Amplifikasyonu) ve PCR Ürün Bantlarının Görüntülenmesi

Kullanılan primerler ile agaroz jelde başarılı bulunan PCR ürünlerinin hazırlanmasının ardından, başarılı bir şekilde çalışan primerler belirlenmiştir. Bu çalışmada Du215, Du281, Du323, Du418 ve Du47 lokuslarının primerleri üzerinde çalışılmıştır. Optimizasyon şartlarına bakıldığında Du281, Du323 ve Du418 lokuslarına ait primerlerin aynı reaksiyon şartları altında çalıştığı, yapılan denemelerden sonra tespit edilmiştir. Du215 lokusunun primerinin bu üç lokusa ait primerlerden farklı reaksiyon şartları altında optimize olduğu, yine yapılan denemelerden sonra tespit edilmiştir. Du47 lokusuna ait primer optimizasyon denemelerinde ise hiçbir sonuç kaydedilememiştir. Belirlenen lokusların optimizasyonu başarılı şekilde tamamlanan primerlerinin, ileri yönlü olan primerleri (forward primer) flöresanlı boyalarla işaretlenmiş şekilde temin edilmiştir. Flöresan boyalar sayesinde ürün boylarının tespiti sağlanacaktır. Bu çalışmada, belirli lokusları temsil eden ileri yönlü primerlere karşılık gelen flöresanlı boyalar Tablo 7'de verilmiştir. Flöresanlı primerlerin her biri %10 oranında sulandırılarak kullanılmış ve ışıktan korunması açısından alüminyum folyoya sarılı bir şekilde derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Tablo 7. Bu çalışma için hazırlanan flöresanlı primerler ve temsil ettikleri renkler (flöresanlı boyalar)

Lokus Adı	Flöresanlı Primer (Forward) (5'-3') <sup>a</sup>	Flöresanlı Boyalar
Marker		LIZ (Turuncu)
Du215	F: CAACTAGCAGTAGCTCTCCAGA	FAM (Mavi)
Du281	F: TTGCTAATCTGAATAACTG	VIC (Yeşil)
Du323	F: AAGCAGACTGTACAAAATCCCTA	NED (Sarı)
Du418	F: AATGCAACAGGTGGATAAATACTT	PET (Kırmızı)
Du47	F: ATACAACCGCAATACACAATA	-

Bu aşamadan sonra, daha önce agaroz jelde başarılı sonuçlar veren DNA örnekleri ile çalışılmış, PCR işlemleri bu kez flöresan boyalı olan ileri yönlü primerler kullanılarak tekrar edilmiştir. PCR reaksiyon şartları ve PCR çalışma metodunda ileri yönlü primerlerin çıkarılarak yerlerine flöresan boyalı olan ileri yönlü primerlerin eklenmesinin haricinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Tüm örnekler için PCR işlemleri tamamlandıktan sonra yukarıda bahsedildiği şekilde agaroz jele yüklenmiş ve elektroforezde yürütülmüş ve yine yukarıda bahsedildiği şekilde jel görüntüleme sistemlerinde görüntülenmiştir.

Flöresan boyalı ileri yönlü primerler ile hazırlanan PCR ürünlerine ait son jel görüntülerinde de başarılı sonuçlar elde edildikten sonra ürünler, fragment analizleri yapılmak üzere +4 °C'de bekletilmiştir.

## 2.7. PCR Örneklerinin Sulandırılması

PCR ürünlerinin fragment analizi cihazına yerleştirilmeden önce yapılması gereken 2 aşamalı bir ön çalışması mevcuttur. Bunlardan ilki örneklerin sulandırılmasıdır. Bu aşamada her bir örnekten 1µl alınarak 49µl saf su ile karıştırılmıştır.

## 2.8. DNA Pürifikasyonu

PCR ürünlerinin fragment analizi cihazına yerleştirilmeden önce yapılması gereken 2 aşamalı ön çalışmasının ikinci aşaması DNA pürifikasyonudur. Çalışılan 96 adet örneğin DNA pürifikasyonu için 100 örneklilik bir karışım hazırlanmıştır. Karışımın içerisinde

formamid, size standard ve ddH<sub>2</sub>O bulunmaktadır. DNA Pürifikasyon karışımı içerisinde bulunan bileşenlerin oranları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. DNA pürifikasyonu işleminde kullanılan karışımın içeriği

İçerik	Miktarı (µl)
Formamid	900
Size Standart	5
ddH <sub>2</sub> O	45
Sulandırılmış PCR Örneği	0.5

### 2.9. Mikrosatellit Verilerinin Belirlenme ve Değerlendirilme Aşamasında 3500 Genetik Analiz Cihazı 8ch RUO’da Allel Boylarının Analizi

PCR örneklerinin sulandırılması ve DNA pürifikasyonu işlemlerini kapsayan ön çalışma sonucunda hazırlanan ürünler, 3500 Genetic Analyser 8ch RUO isimli cihaza kendi özel plakasında hazırlanarak yerleştirilmiştir (Şekil 19). Bu sayede 96 adet örneğin okunması bir gün içerisinde tamamlanmıştır.



Şekil 19. Mikrosatellit verilerinin belirlenme ve değerlendirilme aşamasında kullanılan 3500 Genetik Analiz Cihazı 8ch RUO



### **2.10. GeneMARKER (Ver. 1.995) Programında, 3500 Genetik Analiz Cihazı-8ch RUO'da Allel Boylarının Analizi'nde Elde Edilen Pik Boylarının Belirlenmesi ve Yorumlanması**

3500 Genetic Analyser 8ch RUO'da Allel Boylarının Analizi'nde elde edilen pik boyları GeneMarker programında belirlenmiş ve okunmuştur. GeneMarker isimli program her bir lokusa karşılık getirilen flöresanlı boyaların, işaretlediği allellerin boylarını ve markırın boyunu xy desenli bir grafikte okuma esasına dayanır. Bu çalışmada FAM, VIC, NED ve PET flöresanlı boyalarının her biri bir lokusu temsil ederken; LIZ isimli flöresanlı boya, markır olarak kullanılmıştır.

### **2.11. GenAlEx (Ver. 6.501) Programında Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi**

GenAlEx (Ver. 6.501) programı, kodominant, haploid ve binary genetik lokusların kullanıldığı çalışmalarda ve sekans çalışmalarda moleküler verilerin değerlendirilme aşamasında yaygın olarak kullanılan analizlerin yer aldığı bir programdır.

Elde edilen verilerin analizi GenAlEx (Ver. 6.501) bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. İncelenen 7 grubun 4 lokusundaki allel sayıları, beklenen ile gözlenen heterozigotluk değerleri belirlendi ve popülasyonlarda belirlenen lokusların her birinin taşıdığı ortalama değerleri hesaplandı ve tüm grupların Hardy Weinberg dengesinde olup olmadıklarının analizleri yapılmıştır.

Her bir popülasyona ait allel sayıları, frekansı %5'ten fazla olan allel sayıları, genetik çeşitlilik hesaplamalarında kullanılan geçerli allel sayıları, Shannon Bilgi İndeksi, yalnızca bir popülasyonda bulunan özel allel sayıları, popülasyonların %25 ve daha fazlasında yaygın olarak bulunan allel sayıları, popülasyonların %50 ve daha fazlasında yaygın olarak bulunan allel sayıları ve beklenen heterozigotluk verileri kayıt altına alınmıştır. Ayrıca her bir grupta bulunan özel allellerin hangi lokuslara ait olduğu, boy uzunlukları ve frekanslarıyla belirtilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan 4 adet lokusa (Du215, Du281, Du323 ve Du418) ait allel boyları, incelenen popülasyonların her biri dikkate alınarak en alt ve en üst sınırdaki değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca tüm gruplar göz önünde bulundurularak, her bir lokustaki en yüksek fragment frekansına sahip olan değerler belirlenmiştir. Allel frekans grafikleri her

bir lokus için ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır. Grafiklerin en sonunda ise tüm lokuslara ait allel frekanslarının yer aldığı bir grafik de eklenmiştir.

Grupların her biri için her bir lokusta yer alan allel boylarının dağılımları hesaplanmış ve bu dağılımları gösteren grafikler hazırlanmıştır.

Gruplar arası genetik ayrışmaların incelenmesinde, farklı allellerin moleküler uzaklığını grup içerisinde ortaya koyan  $F_{IS}$  ve  $F_{IT}$  değerleri ile, farklı allellerin moleküler uzaklığını gruplar arasında ortaya koyan  $F_{ST}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmada araştırma konusu, belirlenen grupların birbirine olan farklılıklarını moleküler boyutta ortaya koymak olduğundan  $F_{ST}$  değerleri bu uzaklıkları belirlemede ilk parametre olarak kullanılmıştır.  $F_{ST}$ , popülasyon çiftleri arasında genetik uzaklık ile ayrılma zamanı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan verilerdir. Grupların tamamı ikili karşılaştırılarak popülasyon çiftleri arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olup olmadığı test edilmiştir.

Gruplararası genetik ayrışmaların incelenmesinde, farklı allellerin moleküler uzaklığını gruplar arasında ortaya koyan ve  $F_{ST}$  değerlerinden daha spesifik sonuçlar verdiği bilinen Linear  $F_{ST}$  değerleri; grupların birbirine olan benzerlik yahut farklılıklarını moleküler boyutta ortaya koyan ikinci parametre olarak kabul edilmiştir.

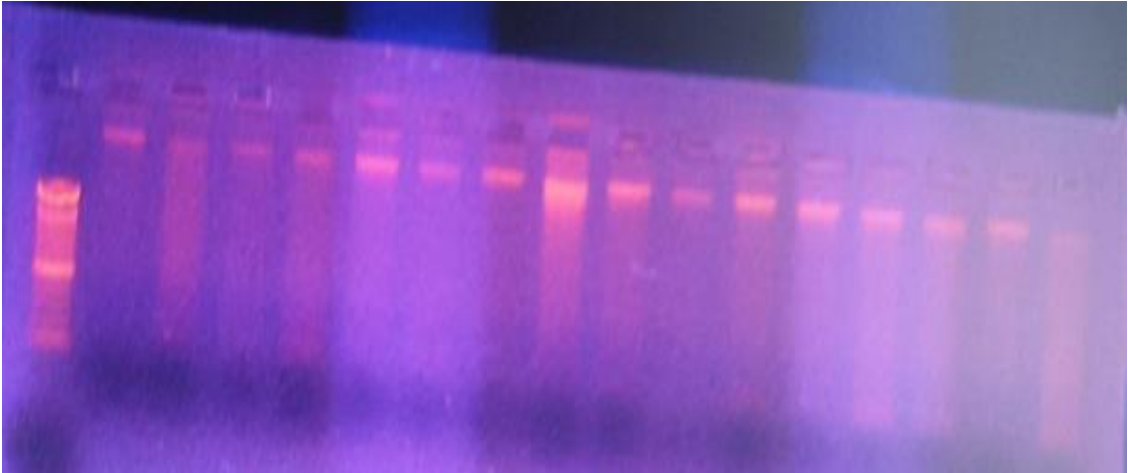
Gruplararası genetik ayrışmaların incelenmesinde, farklı allellerin moleküler uzaklığını gruplar arasında güçlü bir şekilde ortaya koyduğu bilinen bir başka parametre olan Nei'nin genetik uzaklık değerleri bu çalışmada üçüncü parametre olarak kullanılmıştır.

Gruplararası genetik ayrışmaların ortaya konmasında sonuçları desteklemesi yahut reddetmesi açısından son olarak Nei'nin tarafsız genetik uzaklık değerleri dördüncü parametre olarak kullanılmıştır.

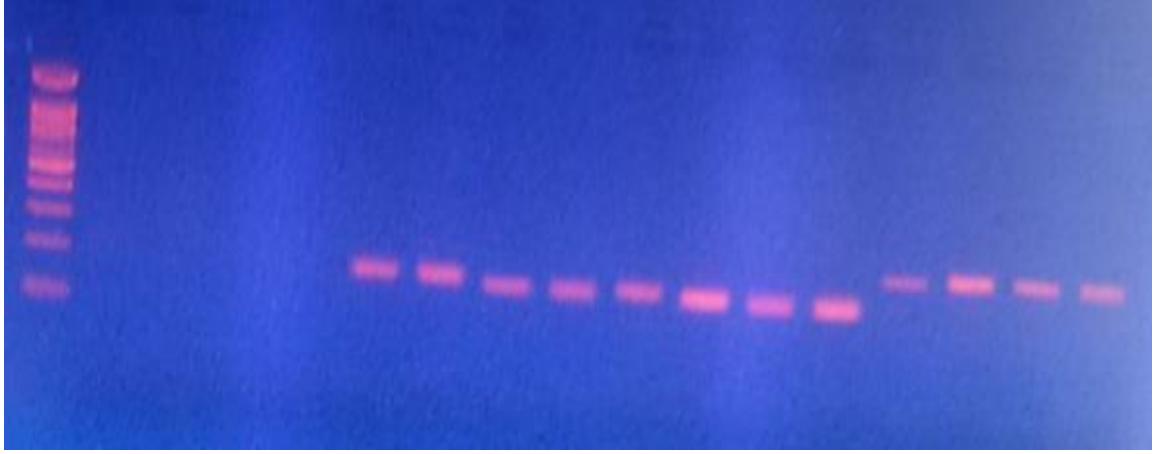
Yapılan tüm bu analizlerin ardından  $F_{ST}$  değerleri ve Linear  $F_{ST}$  değerlerine göre koordinat sistemleri oluşturulmuştur. Ayrıca  $F_{ST}$  değerleri kullanılarak POPTREE bilgisayar programında UPGMA (Unweighed pair group Method with Arithmetic Averages) ile gruplar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyan bir dendogram oluşturulmuştur. UPGMA dendogram üzerindeki dalların güvenilirliği yine aynı bilgisayar programı kullanılarak, örnekler üzerinde seç bağla testi (bootstrapping) yapılarak test edilmiştir. Hesaplama orijinal verilerin 1000 farklı seti kullanılarak yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

Türkiye’de yaşayan Trabzon ve Uludağ kertenkelelerine ait 59 farklı lokaliteden temin edilen 96 örnek ile gruplar arasındaki genetik ilişki ortaya konmaya çalışılmıştır. 96 adet örnek literatürdeki sınıflandırma göz önünde bulundurularak 7 ayrı gruba (Uludağ Grubu, Düzce Grubu, Trabzon Grubu, Rize-Ovit Grubu, Şavşat Grubu, Ardanuç Grubu, Artvin Grubu) ayrılmıştır. Bu çalışmada, PCR metodu kullanılarak 5 adet mikrosatellit lokusunun (Du215, Du281, Du323, Du418 ve Du47) çoğaltılması hedeflenmiştir. Bunun için öncelikle DNA örneklerinin dokulardan izolasyonları tamamlanmış (Şekil 20) ve tüm örneklerle ait izolasyonların başarılı oldukları jel üzerinde tespit edildikten sonra DNA’ların çoğaltımına başlanmıştır. PCR’ye ait tüm parametreler (sıcaklık, döngü sayısı vb.) sıralı bir şekilde değiştirilerek kapsamlı bir optimizasyon çalışması yapıldığı halde Du47 lokusuna ait primer, söz konusu tür ve alttürlerin hiç birinde herhangi bir sonuç vermemiştir. Agaroz jelde zayıf dahi olsa herhangi bir banda rastlanmamıştır. Diğer 4 lokusa (Du215, Du281, Du323 ve Du418) ait primerlerin optimizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 21).



Şekil 20. Kertenkele örneklerinden izole edilen dokuların DNA görüntüleri



Şekil 21. İzolasyonları gerçekleştirilen DNA örneklerinin uygun şartlar altında gerçekleştirilen PCR görüntüleri

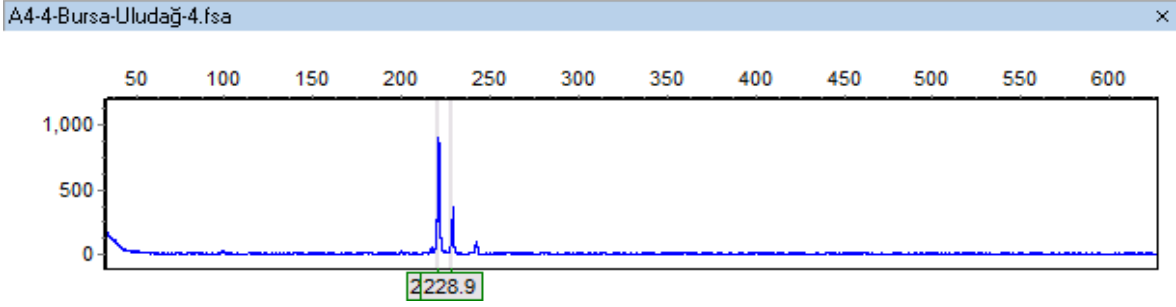
Tüm örneklerle ait ilk çoğaltma çalışmaları başarı ile tamamlandıktan sonra flöresanlı boyalarla işaretlenen PCR örnekleri, allelleri hakkında bilgi alınması üzere 3500 Genetik Analiz Cihazı 8ch RUO'da çalışılmıştır. Tüm lokuslar için gözlenen allel sayıları 40-55 arasında değişmektedir ve ortalama değeri 47'dir. Buna göre en yüksek allel sayısı 55 allel ile Du415 lokusuna; en düşük allel sayısı ise 40 allel ile Du281 lokusuna aittir. Lokusların tamamı söz konusu gruplar için polimorfiktir (Tablo 9).

Tablo 9. Lokusların tamamının gruplar için polimorfik olduğunu gösteren tablo

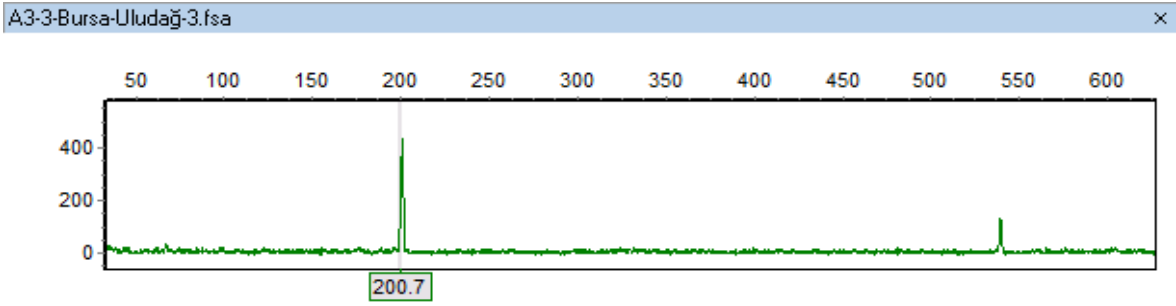
Gruplar	%P
Uludağ Grubu	100,00
Düzce Grubu	100,00
Trabzon Grubu	100,00
Rize-Ovit Grubu	100,00
Şavşat Grubu	100,00
Ardanuç Grubu	100,00
Artvin Grubu	100,00
Ortalama Değer	100,00
Standart Hata	0,00

Çalışılan 7 ayrı grubun mikrosatellit lokuslarına ait pik görüntüleri yapay, stutter vb. hatalı pikler göz ardı edilerek tespit edilmiştir (Şekil 22-28).

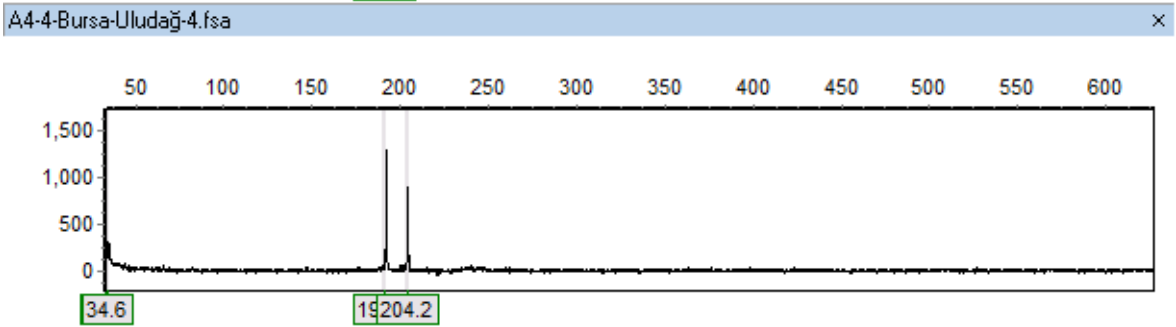
a.



b.



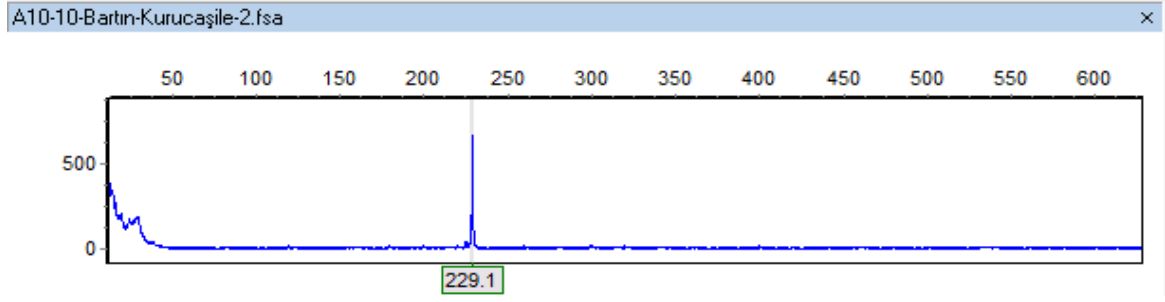
c.



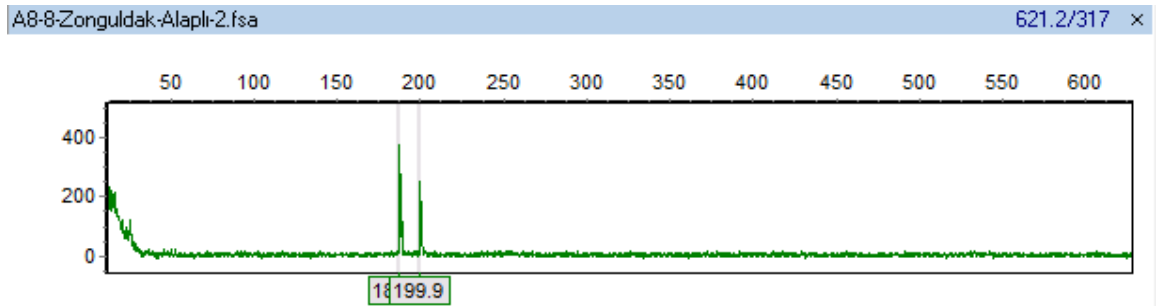
Şekil 22. Uludağ grubuna ait pik görüntüleri, a) Uludağ grubuna ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, b) Uludağ grubuna ait VIC ile işaretlenmiş Du281 lokusuna ait homozigotik pik görüntüleri, c) Uludağ grubuna ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri

Uludağ grubunda Du215 lokusu için 10 allel, Du281 lokusu için 10 allel, Du323 lokusu için 8 allel ve Du418 lokusu için 10 allel gözlenmiştir.

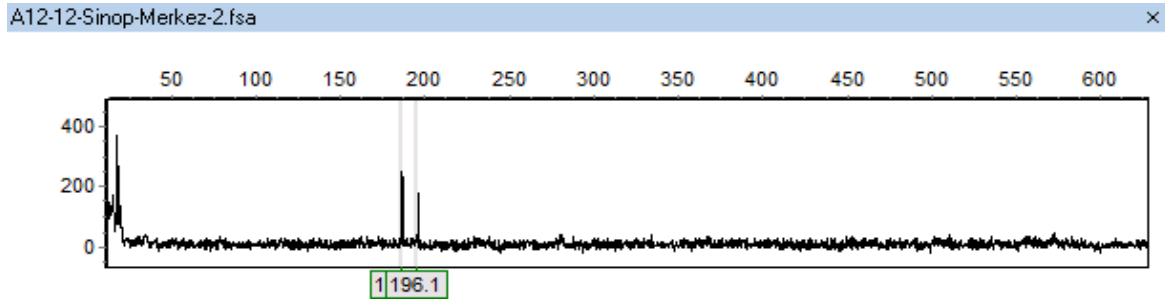
a.



b.

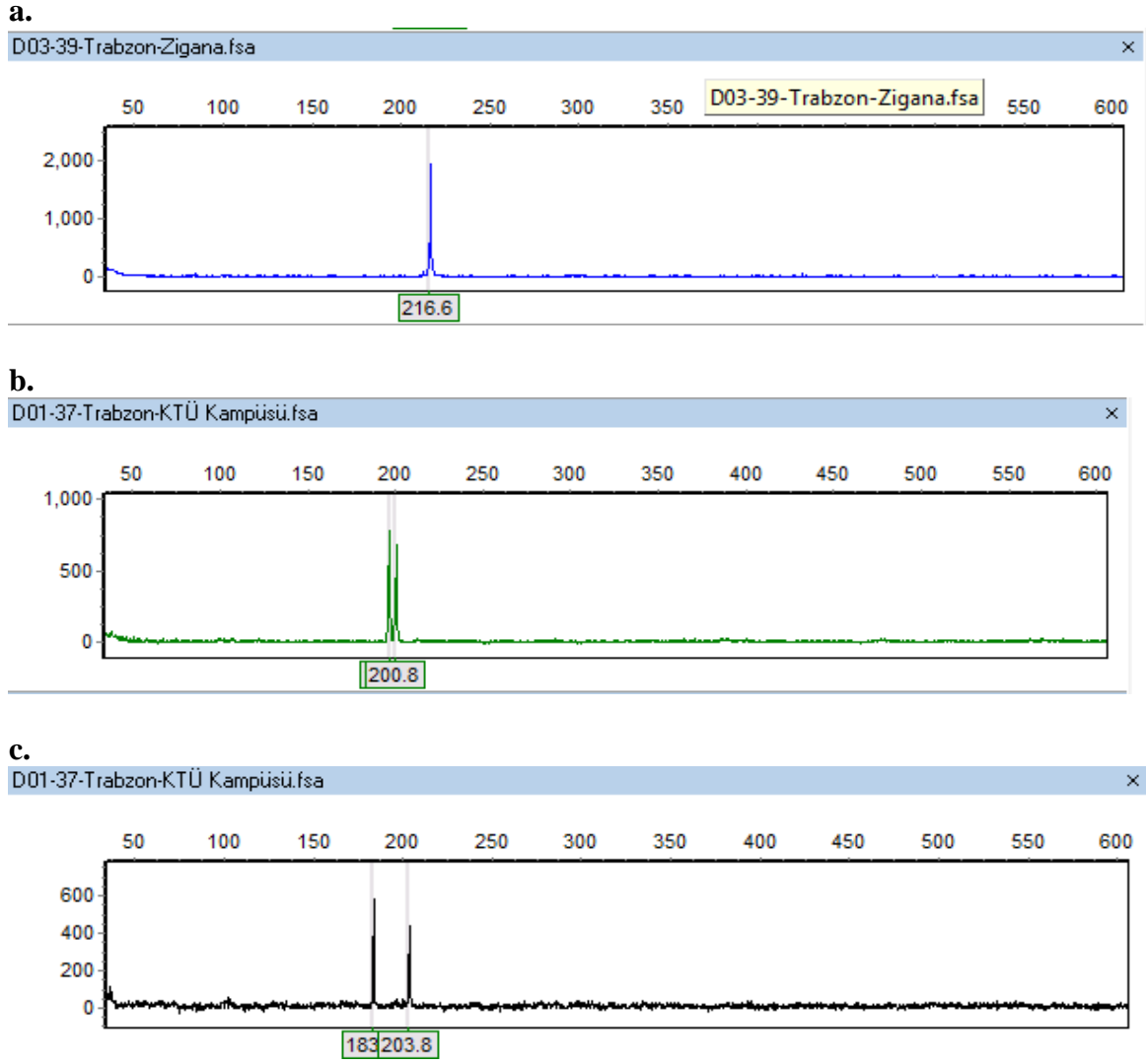


c.



Şekil 23. Düzce grubuna ait pik görüntüleri, a) Düzce grubuna ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait homozigotik pik görüntüleri, b) Düzce grubuna ait VIC ile işaretlenmiş Du281 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, c) Düzce grubuna ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait homozigotik pik görüntüleri

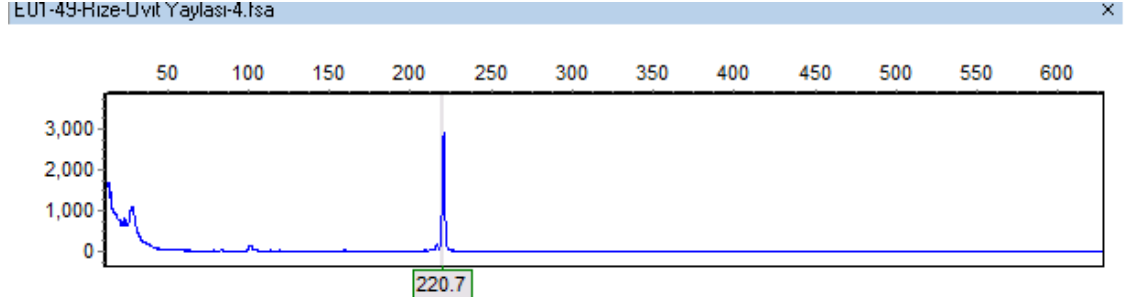
Düzce grubunda Du215 lokusu için 16 allel, Du281, Du323 ve Du418 lokusu için 20 allel gözlenmiştir.



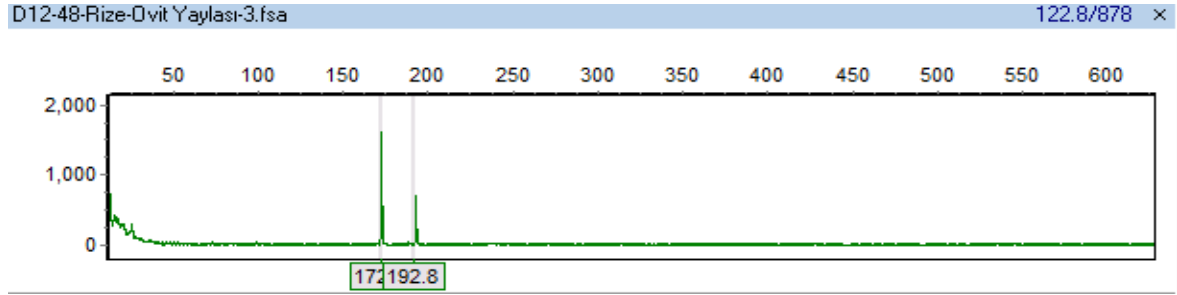
Şekil 24. Trabzon grubuna ait pik görüntüleri, a) Trabzon grubuna ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait homozigotik pik görüntüleri, b) Trabzon grubuna ait VIC ile işaretlenmiş Du281 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, c) Trabzon grubuna ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri

Trabzon grubunda Du215 lokusu için 60 allel, Du281, Du323 ve Du418 lokusu için 58 allel gözlenmiştir.

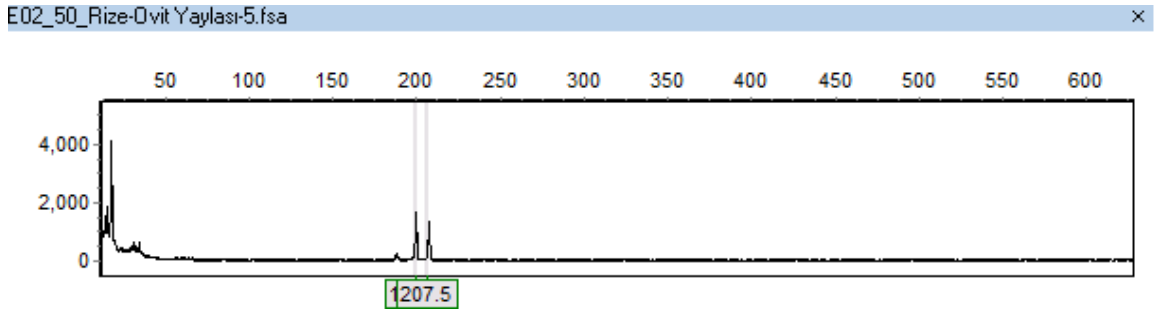
a.



b.



c.

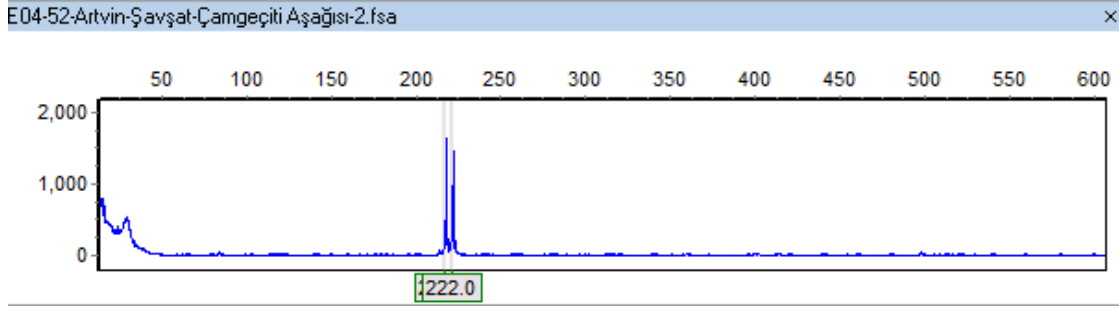


**Şekil 25.** Rize-Ovit grubuna ait pik görüntüleri, a) Rize-Ovit grubuna ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait homozigotik pik görüntüleri, b) Rize-Ovit grubuna ait VIC ile işaretlenmiş Du281 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, c) Rize-Ovit grubuna ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri

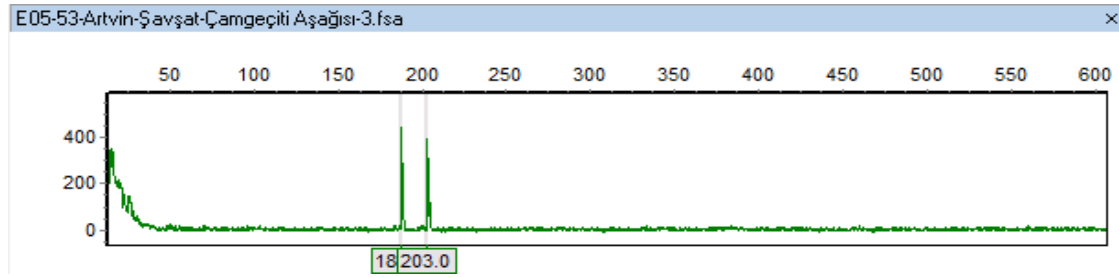
Rize-Ovit grubunda Du215 lokusu için 8 allel, Du281 lokusu için 10 allel, Du323 lokusu için 10 allel ve Du418 lokusu için 8 allel gözlenmiştir.



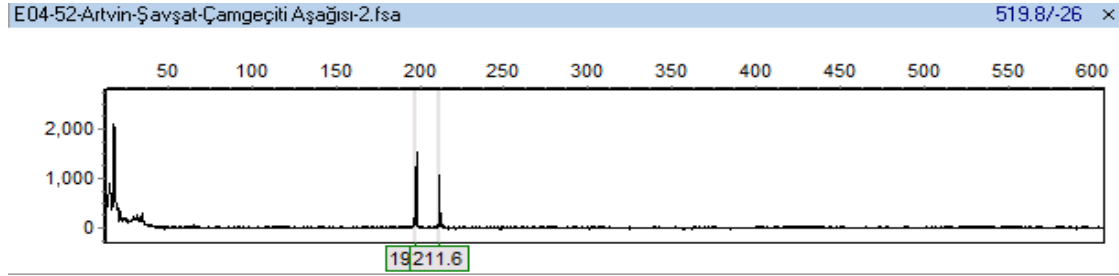
a.



b.



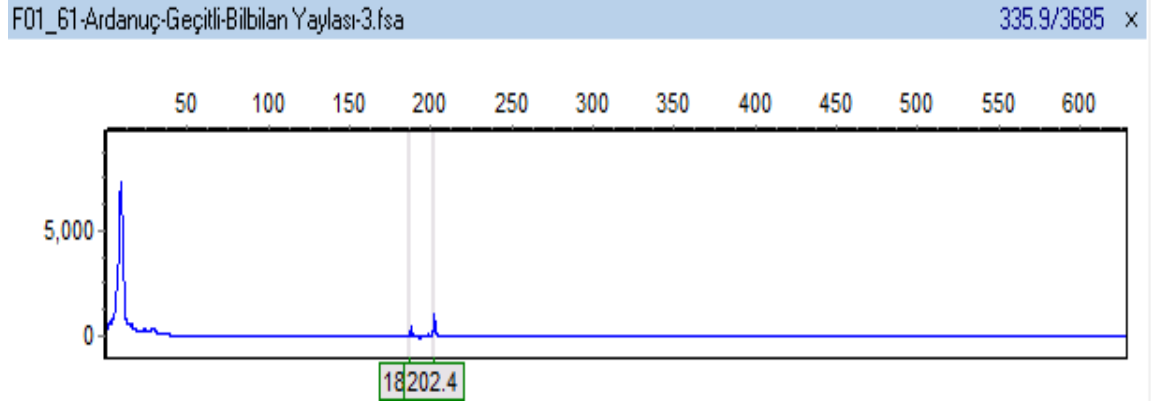
c.



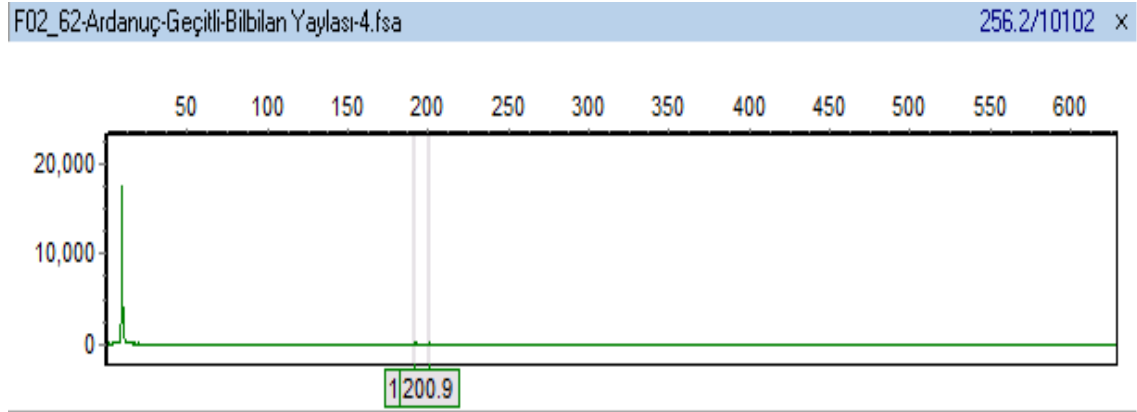
Şekil 26. Şavşat grubuna ait pik görüntüleri, a) *D. r. macromaculata*'ya ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, b) *D. r. macromaculata*'ya ait VIC ile işaretlenmiş Du281 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, c) *D. r. macromaculata*'ya ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri

Şavşat grubunda lokusların her birinde 16 allel gözlenmiştir.

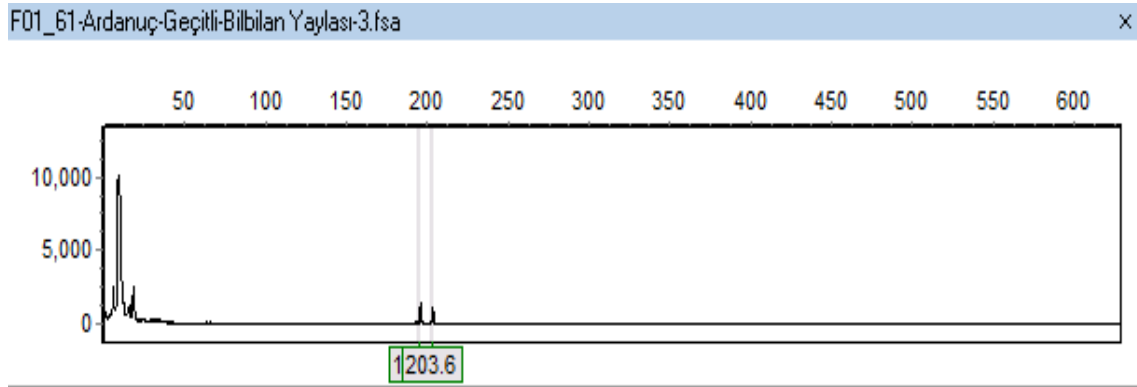
a.



b.



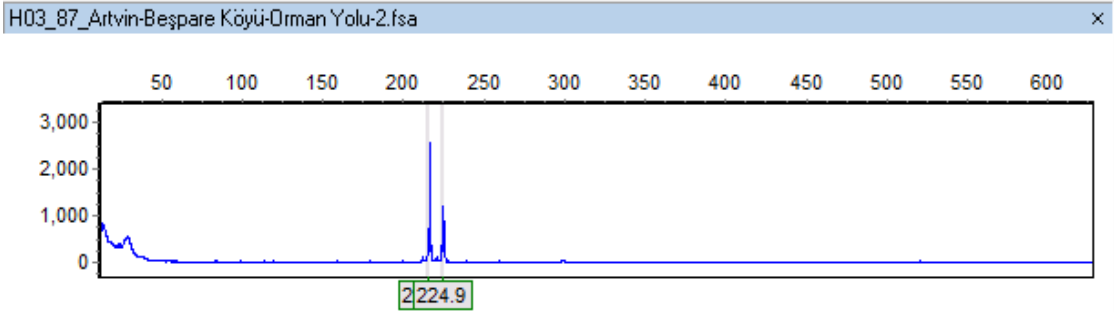
c.



Şekil 27. Ardanuç grubuna ait pik görüntüleri, a) Ardanuç grubuna ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, b) Ardanuç grubuna ait VIC ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, c) Ardanuç grubuna ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri

Ardanuç grubunda lokusların her birinde 14 allel gözlenmiştir.

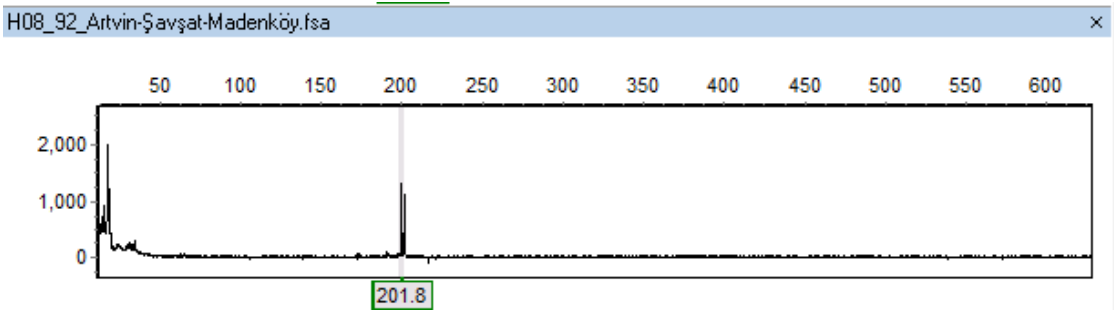
a.



b.



c.



Şekil 28. Artvin grubuna ait pik görüntüleri, a) Artvin grubuna ait FAM ile işaretlenmiş Du215 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, b) Artvin grubuna ait VIC ile işaretlenmiş Du281 lokusuna ait heterozigotik pik görüntüleri, c) Artvin grubuna ait NED ile işaretlenmiş Du323 lokusuna ait homozigotik pik görüntüleri

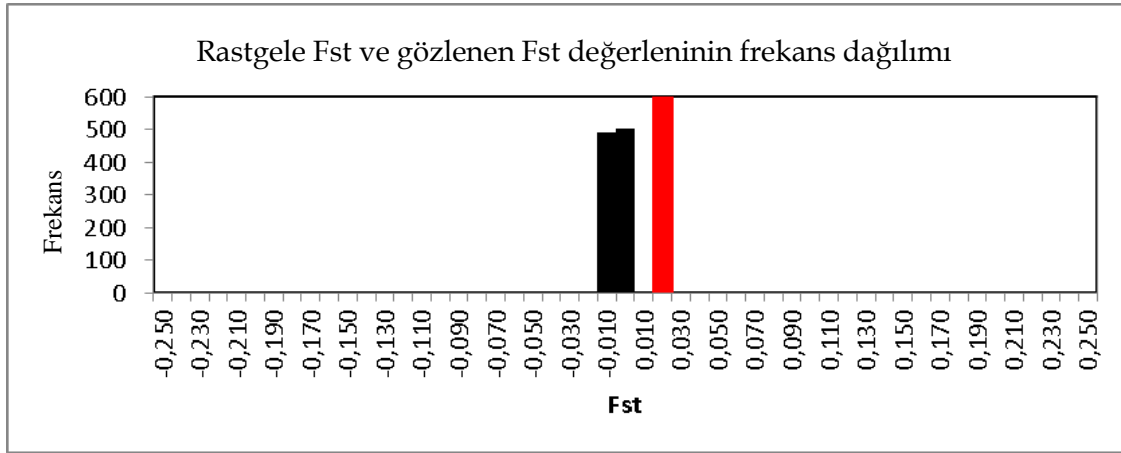
Artvin grubunda Du215 lokusu için 60 allel, Du281 lokusu için 60 allel, Du323 lokusu için 50 allel ve Du418 lokusu için 60 allel gözlenmiştir.

Her bir lokusa ait gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri hesaplanmıştır (Tablo 10). Bu verilere göre beklenen heterozigotluğu en yüksek lokus Du323, en düşük lokus Du418 lokusu olurken gözlenen heterozigotluğu en yüksek lokus Du323, en düşük lokus Du418 lokusu olmuştur. Tüm lokuslarda beklenen heterozigotluk değerleri gözlenen heterozigotluk değerlerinden oldukça yüksektir. Beklenen heterozigotluk ile gözlenen heterozigotluk arasındaki en büyük fark ise Du418 lokusuna aittir. Beklenen heterozigotluk değerlerinin ortalaması 0.845 iken gözlenen heterozigotluk değerleri ortalaması 0.572'dir.

Tablo 10. Her bir lokusa ait toplam allel sayıları ve ortalaması ile beklenen heterozigotluk-gözlenen heterozigotluk değerleri ve ortalaması

Lokus	Toplam Allel Sayısı	Beklenen Heterozigotluk (He)	Gözlenen Heterozigotluk (Ho)
Du215	55	0.849	0.569
Du281	40	0.848	0.590
Du323	46	0.851	0.684
Du413	47	0.835	0.447
Ortalama	47	0.845	0.572

Her bir lokusa ait allel frekanslar ve Wright'ın F istatistiği (1951) kullanılarak allellerin Fst (Fiksasyon İndeksi) değerleri hesaplanmıştır. Rasgele Fst değerleri ile bu çalışmadaki verilere göre hesaplanan gözlenen Fst değerleri hesaplanmıştır. Popülasyonar genetik salınımlarıyla birbirlerinden farklılaşmışsa ve aralarında gen aktarımı yoksa gözlenen Fst değerleri de 1'e o denli yakın olmaktadır (Şekil 29).



Şekil 29. Bu çalışmadaki verilere göre rasgele Fst değerleri ve hesaplanan gözlenen Fst değerlerinin dağılımı

Farklı uzunluklara sahip allellerin belirlenen gruplara göre dağılımları Tablo 11'de verilmiştir. Bazı popülasyonların kendilerine özgü alleller boylarına sahip oldukları görülmektedir. Buna göre Du215 lokusu için Uludağ grubunun allel uzunlukları 224 ile 288 arasında değişmektedir. Düzce grubunun allel uzunlukları 216 ile 292 arasında değişmektedir. Trabzon grubunun allel uzunlukları 124 ile 306 arasında değişmektedir.

Rize-Ovit grubunun allel uzunlukları 220 ile 276 arasında değişmektedir. Şavşat grubunun allel uzunlukları 138 ile 272 arasında değişmektedir. Ardanuç grubunun allel uzunlukları 108 ile 234 arasında değişmektedir. Artvin grubunun allel uzunlukları 128 ile 302 arasında değişmektedir. Du215 lokusunda 55 allel görülürken, en yüksek allel frekansı 220 allele (0.838), en düşük allel frekansı ise 133, 140, 144, 200, 204, 238, 240, 260, 278, 280, 282, 296, 302 ve 306 allellerine (0.017) aittir (Tablo 11).

Tablo 11. Du215 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı

Lokus Du215								
Allele/n	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin	Toplam
N	5	8	30	4	8	7	30	92
108	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,000	0.143
124	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,071	0,000	0.088
128	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0.033
132	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0.067
133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
136	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,017	0.083
138	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0.125
140	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
144	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
152	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0.050
156	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0.067
160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0.050
168	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,214	0,000	0.214
172	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0.071
188	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,143	0,017	0.176
192	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,067	0.083
194	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,000	0,000	0.188
196	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,143	0,033	0.210
198	0,000	0,000	0,067	0,000	0,063	0,000	0,033	0.163
200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
202	0,000	0,000	0,083	0,000	0,250	0,071	0,033	0.438
204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
206	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,071	0,033	0.121
210	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,050	0.100
214	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,033	0.083
216	0,000	0,063	0,017	0,000	0,000	0,000	0,033	0.113
218	0,000	0,000	0,017	0,000	0,063	0,000	0,000	0.079
220	0,000	0,188	0,117	0,500	0,000	0,000	0,033	0.838
222	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,033	0.096
224	0,100	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0.225
226	0,100	0,000	0,083	0,125	0,000	0,000	0,100	0.408

Tablo 11'in devamı

228	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063
230	0,200	0,063	0,050	0,125	0,125	0,000	0,000	0,563
232	0,100	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,179
234	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,171
236	0,000	0,250	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,317
238	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
240	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
246	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
252	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063
260	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
266	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033
270	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067
272	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,017	0,142
276	0,300	0,000	0,017	0,250	0,000	0,000	0,000	0,567
278	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
280	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
282	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
286	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063
288	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100
292	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063
294	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
296	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
302	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
306	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017

Farklı uzunluklara sahip allellerin belirlenen gruplara göre dağılımları Tablo 12'de verilmiştir. Bazı popülasyonların kendilerine özgü alleller boylarına sahip oldukları görülmektedir. Buna göre Du281 lokusu için Uludağ grubunun allel uzunlukları 188 ile 250 arasında değişmektedir. Düzce grubunun allel uzunlukları 168 ile 252 arasında değişmektedir. Trabzon grubunun allel uzunlukları 164 ile 256 arasında değişmektedir. Rize-Ovit grubunun allel uzunlukları 172 ile 240 arasında değişmektedir. Şavşat grubunun allel uzunlukları 156 ile 236 arasında değişmektedir. Ardaneç grubunun allel uzunlukları 164 ile 240 arasında değişmektedir. Artvin grubunun allel uzunlukları 88 ile 244 arasında değişmektedir. Du281 lokusunda 40 allel bulunmaktadır. Bu lokusta en yüksek allel frekansı 172 allele (0.755), en düşük allel frekansı ise 92, 102, 120, 140, 226, 238 ve 246 allellerine aittir (0.017) (Tablo 12).

Tablo 12. Du281 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı

Allele/n	Lokus Du281							
	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin	Toplam
N	5	10	29	5	8	7	30	94
88	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0.033
92	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
102	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
108	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0.050
112	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0.033
120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
128	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0.050
132	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0.033
140	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0.017
152	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0.033
156	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0.125
164	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,071	0,017	0.105
168	0,000	0,100	0,069	0,000	0,250	0,071	0,117	0.607
172	0,000	0,150	0,017	0,400	0,000	0,071	0,117	0.755
174	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0.133
176	0,000	0,000	0,052	0,000	0,188	0,071	0,050	0.361
180	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,214	0,067	0.315
184	0,000	0,000	0,069	0,000	0,000	0,071	0,083	0.224
188	0,200	0,150	0,121	0,200	0,188	0,000	0,017	0.875
192	0,000	0,150	0,069	0,200	0,063	0,214	0,050	0.746
196	0,100	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000	0,050	0.202
200	0,200	0,100	0,086	0,000	0,000	0,071	0,067	0.524
204	0,100	0,000	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0.203
206	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0.063
208	0,000	0,050	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0.067
212	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0.034
216	0,000	0,000	0,017	0,100	0,000	0,000	0,000	0.117
222	0,000	0,050	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0.067
226	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0.017
234	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0.034
236	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,071	0,017	0.213
238	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0.017
240	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,071	0,000	0.171
242	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0.034
244	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,017	0.034
246	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0.017
248	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0.100
250	0,400	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	0.452
252	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0.050
256	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0.034

Farklı uzunluklara sahip allellerin belirlenen gruplara göre dağılımları Tablo 13’de verilmiştir. Bazı popülasyonların kendilerine özgü alleller boylarına sahip oldukları görülmektedir. Buna göre Du323 lokusu için Uludağ grubunun allel uzunlukları 196 ile 254 arasında değişmektedir. Düzce grubunun allel uzunlukları 168 ile 262 arasında değişmektedir. Trabzon grubunun allel uzunlukları 112 ile 264 arasında değişmektedir. Rize-Ovit grubunun allel uzunlukları 182 ile 244 arasında değişmektedir. Şavşat grubunun allel uzunlukları 174 ile 258 arasında değişmektedir. Ardanoç grubunun allel uzunlukları 164 ile 258 arasında değişmektedir. Artvin grubunun allel uzunlukları 132 ile 264 arasında değişmektedir. Du323 lokusunda 46 allel bulunmaktadır. Bu lokusta en yüksek allel frekansı 192 allele (0,625), en düşük allel frekansı ise 112, 116, 166, 180, 190, 226, 242 ve 260 allellerine aittir (0,017) (Tablo 13).



Tablo 13. Du323 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı

Lokus Du323								
Allele/n	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin	Toplam
N	4	10	29	5	8	7	25	88
112	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
116	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
132	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040
134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040
136	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020
140	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040
142	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040
144	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020
152	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,040
156	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020
164	0,000	0,000	0,052	0,000	0,000	0,143	0,020	0,215
166	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
168	0,000	0,100	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,134
172	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034
174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,071	0,000	0,134
176	0,000	0,000	0,017	0,000	0,063	0,000	0,000	0,080
178	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,063
180	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
182	0,000	0,000	0,000	0,200	0,063	0,000	0,000	0,263
184	0,000	0,300	0,241	0,000	0,000	0,000	0,060	0,601
188	0,000	0,200	0,086	0,000	0,125	0,286	0,040	0,737
190	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
192	0,000	0,200	0,069	0,100	0,125	0,071	0,060	0,625
194	0,000	0,100	0,017	0,200	0,125	0,071	0,000	0,514
196	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,310
200	0,250	0,000	0,000	0,200	0,063	0,000	0,100	0,613
201	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020
204	0,000	0,000	0,086	0,000	0,000	0,071	0,080	0,238
208	0,000	0,000	0,017	0,100	0,125	0,071	0,060	0,374
212	0,000	0,000	0,017	0,000	0,063	0,071	0,000	0,151
214	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,120
216	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020
220	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020
224	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,040	0,074
226	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
230	0,000	0,000	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,103
238	0,000	0,000	0,017	0,100	0,000	0,000	0,000	0,117
240	0,375	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,375
242	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
244	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,100
246	0,000	0,000	0,017	0,000	0,063	0,000	0,000	0,080
254	0,125	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,195
258	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,143	0,000	0,205
260	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
262	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050
264	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,020	0,037

Farklı uzunluklara sahip allellerin belirlenen gruplara göre dağılımları Tablo 14’de verilmiştir. Bazı popülasyonların kendilerine özgü alleller boylarına sahip oldukları görülmektedir. Buna göre Du418 lokusu için Uludağ grubunun allel uzunlukları 292 ile 356 arasında değişmektedir. Düzce grubunun allel uzunlukları 184 ile 318 arasında değişmektedir. Trabzon grubunun allel uzunlukları 246 ile 356 arasında değişmektedir. Rize-Ovit grubunun allel uzunlukları 184 ile 320 arasında değişmektedir. Şavşat grubunun allel uzunlukları 268 ile 388 arasında değişmektedir. Ardanoç grubunun allel uzunlukları 244 ile 348 arasında değişmektedir. Artvin grubunun allel uzunlukları 188 ile 384 arasında değişmektedir. Du418 lokusunda 47 allel görülmektedir. Bu lokusa ait en yüksek allel frekansı 308 allele (0,640), en düşük allel frekansı ise 188, 204, 222, 252, 255, 300, 304, 323, 324 ve 344 allellerine (0,017) aittir (Tablo 14).

Tablo 14. Du418 lokusunda görülen allel frekanslarının gruplara göre dağılımı

Lokus Du418								
Allele/n	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin	Toplam
N	5	10	29	4	8	7	30	93
184	0,000	0,050	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,300
188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
192	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050
204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
222	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
244	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,071
245	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100
246	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,071	0,000	0,106
252	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
254	0,000	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000	0,033	0,085
255	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
262	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033
264	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,050
268	0,000	0,000	0,034	0,000	0,250	0,000	0,000	0,284
274	0,000	0,000	0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,086
278	0,000	0,100	0,103	0,000	0,000	0,143	0,033	0,380
280	0,000	0,100	0,052	0,000	0,000	0,000	0,017	0,168
282	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034
284	0,000	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000	0,083	0,135
286	0,000	0,000	0,086	0,250	0,063	0,143	0,083	0,625
288	0,000	0,100	0,069	0,000	0,063	0,000	0,083	0,315
290	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,286	0,000	0,536
292	0,400	0,150	0,034	0,000	0,063	0,000	0,050	0,697
294	0,400	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,550
296	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,063
298	0,000	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000	0,033	0,085
300	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
304	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
308	0,000	0,200	0,034	0,000	0,125	0,214	0,067	0,640
312	0,000	0,000	0,069	0,000	0,063	0,000	0,050	0,181
314	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033
316	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,150	0,213
318	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050
320	0,000	0,000	0,017	0,250	0,000	0,000	0,000	0,267
323	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
324	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
326	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,063
328	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034
338	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034
344	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
348	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,071
350	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033
352	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,063
356	0,200	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,234
376	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,063
384	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033
388	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,063

Popülasyonların genetik yapısını ortaya koymak amacıyla grup büyüklükleri, allel sayıları, her bir gruba ait beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri hesaplanmıştır (Tablo 15) ve grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 30). Bunun yanında popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıkları test edilmiştir ( $p \leq 0.05$  önemli,  $p > 0.05$  önemsiz) (Tablo 16). Du215 lokusunda Trabzon ve Artvin ( $p \leq 0.05$ ) grupları Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Bu lokusa ait diğer gruplar Hardy-Weinberg dengesindedir. Du281 lokusunda Düzce, Trabzon ve Artvin ( $p \leq 0.05$ ) grupları Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Bu lokusa ait diğer gruplar Hardy-Weinberg dengesindedir. Du323 lokusunda Düzce, Trabzon ve Artvin ( $p \leq 0.05$ ) grupları Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Bu lokusa ait diğer gruplar Hardy-Weinberg dengesindedir. Du418 lokusunda Düzce, Trabzon ve Artvin ( $p \leq 0.05$ ) grupları Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Bu lokusa ait diğer gruplar Hardy-Weinberg dengesindedir.

Tablo 15. Mikrosatellit lokuslara ait veriler

Popülasyon Adı		Du215	Du281	Du323	Du418
<i>D. b. bityhnica</i>	N	5	5	4	5
	Na	7	5	4	3
	Ne	5,556	3,846	3,556	2,778
	I	1,834	1,471	1,321	1,055
	Ho	0,800	0,200	0,250	0,000
	He	0,820	0,740	0,719	0,640
	uHe	0,911	0,822	0,821	0,711
	F	0,024	0,730	0,652	1,000
<i>D. b. tristis</i>	N	8	10	10	10
	Na	10	10	7	10
	Ne	7,111	8,696	5,128	8,333
	I	2,133	2,224	1,765	2,207
	Ho	0,500	0,300	0,800	0,400
	He	0,859	0,885	0,805	0,880
	uHe	0,917	0,932	0,847	0,926
	F	0,418	0,661	0,006	0,545
<i>D. r. rudis</i>	N	30	29	29	29
	Na	25	23	24	23
	Ne	16,822	15,720	10,072	17,521
	I	2,995	2,925	2,736	2,988
	Ho	0,567	0,724	0,655	0,414
	He	0,941	0,936	0,901	0,943
	uHe	0,956	0,953	0,917	0,959
	F	0,398	0,227	0,273	0,561

Tablo 15'in devamı

<i>D. r. mirabilis</i>	N	4	5	5	4
	Na	4	5	7	4
	Ne	2,909	3,846	6,250	4,000
	I	1,213	1,471	1,887	1,386
	Ho	0,250	0,600	1,000	0,000
	He	0,656	0,740	0,840	0,750
	uHe	0,750	0,822	0,933	0,857
	F	0,619	0,189	-0,190	1,000
<i>D. r. macromaculata</i>	N	8	8	8	8
	Na	8	7	12	12
	Ne	6,400	5,818	10,667	8,533
	I	1,960	1,841	2,426	2,339
	Ho	0,375	0,750	0,750	1,000
	He	0,844	0,828	0,906	0,883
	uHe	0,900	0,883	0,967	0,942
	F	0,556	0,094	0,172	-0,133
<i>D. r. obscura</i>	N	7	7	7	7
	Na	9	10	9	7
	Ne	7,538	7,538	6,533	5,444
	I	2,107	2,168	2,045	1,810
	Ho	0,857	0,857	0,571	0,714
	He	0,867	0,867	0,847	0,816
	uHe	0,934	0,934	0,912	0,879
	F	0,012	0,012	0,325	0,125
<i>D. r. bischoffi</i>	N	30	30	25	30
	Na	30	23	23	22
	Ne	21,951	15,789	16,667	14,876
	I	3,242	2,931	2,967	2,889
	Ho	0,633	0,700	0,760	0,600
	He	0,954	0,937	0,940	0,933
	uHe	0,971	0,953	0,959	0,949
	F	0,336	0,253	0,191	0,357

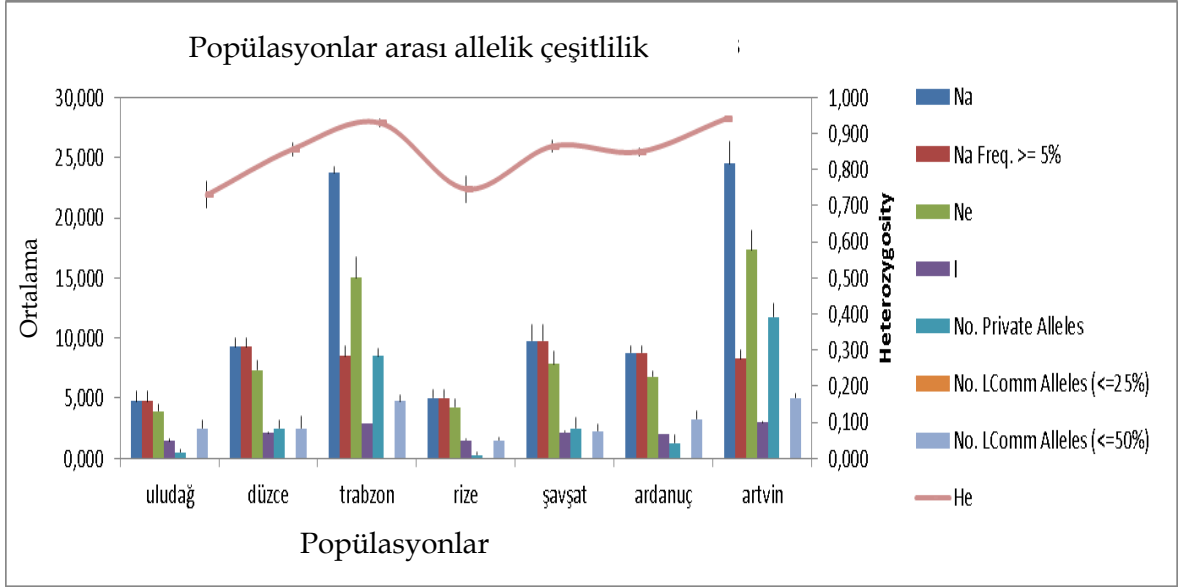
N: Örnek sayısı, Na: Allel Sayısı, Ne: Bu çalışmada kullanılan en etkili allel sayısı, I: Bilgi İndeksi, Ho: Gözlenen heterozigotluk, He: Beklenen Heterozigotluk, uHe: Beklenen güvenilir heterozigotluk, F: Sabitleme İndeksi

Tablo 16. Popülasyonların her bir lokustaki Hardy-Weinberg analizi

	Popülasyonun Adı	N	H <sub>G</sub>	H <sub>B</sub>	uH <sub>e</sub>	X <sup>2</sup>	P	Sign.
Du215	<i>D. b. bithynica</i>	10	0,800	0,820	0,911	20,556	0,486	ns
	<i>D. b. tristis</i>	16	0,500	0,859	0,917	64,889	0,028	*
	<i>D. r. rudis</i>	60	0,567	0,941	0,956	455,477	0,000	***
	<i>D. r. mirabilis</i>	8	0,250	0,656	0,750	12,000	0,062	ns
	<i>D. r. macromaculata</i>	16	0,375	0,844	0,900	42,889	0,036	*
	<i>D. r. obscura</i>	14	0,857	0,867	0,934	36,167	0,461	ns
	<i>D. r. bischoffi</i>	60	0,633	0,954	0,971	615,000	0,000	***
Du281	<i>D. b. bithynica</i>	10	0,200	0,740	0,822	20,000	0,029	*
	<i>D. b. tristis</i>	20	0,300	0,885	0,932	72,222	0,006	**
	<i>D. r. rudis</i>	58	0,724	0,936	0,953	376,929	0,000	***
	<i>D. r. mirabilis</i>	10	0,600	0,740	0,822	16,250	0,093	ns
	<i>D. r. macromaculata</i>	16	0,750	0,828	0,883	20,444	0,493	ns
	<i>D. r. obscura</i>	14	0,857	0,867	0,934	42,778	0,567	ns
	<i>D. r. bischoffi</i>	60	0,700	0,937	0,953	394,582	0,000	***
Du323	<i>D. b. bithynica</i>	8	0,250	0,719	0,821	8,444	0,207	ns
	<i>D. b. tristis</i>	20	0,800	0,805	0,847	40,694	0,006	**
	<i>D. r. rudis</i>	58	0,655	0,901	0,917	338,035	0,006	**
	<i>D. r. mirabilis</i>	10	1,000	0,840	0,933	20,000	0,521	ns
	<i>D. r. macromaculata</i>	16	0,750	0,906	0,967	76,000	0,187	ns
	<i>D. r. obscura</i>	14	0,571	0,847	0,912	43,750	0,176	ns
	<i>D. r. bischoffi</i>	50	0,760	0,940	0,959	388,306	0,000	***
Du418	<i>D. b. bithynica</i>	10	0,000	0,640	0,711	10,000	0,019	*
	<i>D. b. tristis</i>	20	0,400	0,880	0,926	81,111	0,001	***
	<i>D. r. rudis</i>	58	0,414	0,943	0,959	454,333	0,000	***
	<i>D. r. mirabilis</i>	8	0,000	0,750	0,857	12,000	0,062	ns
	<i>D. r. macromaculata</i>	16	1,000	0,883	0,942	72,000	0,286	ns
	<i>D. r. obscura</i>	14	0,714	0,816	0,879	29,750	0,097	ns
	<i>D. r. bischoffi</i>	60	0,600	0,933	0,949	420,667	0,000	***

N: Allel sayısı, H<sub>G</sub>: Gözlenen heterozigotluk, H<sub>B</sub>: Beklenen heterozigotluk, uH<sub>e</sub>: Beklenen tarafsız heterozigotluk, X<sup>2</sup>: Ki kare değeri, P: Önemlilik değeri (p ≤ 0.05 önemli, p > 0.05 önemsiz), Sign: Anlamlılık Değeri, ns: önem taşımayanlar

\*: Tek bir allelin tespit edildiği popülasyonlar-yıldız sayısı arttıkça önemlilik derecesi artmaktadır.



Şekil 30. Mikrosatellit lokuslara ait verilerin grafik üzerinde gösterimi (Na: Allel Sayısı, Na Freq. $\geq$ 5%: Allel frekansının %5'ten büyük olduğu kısım, Ne: Bu çalışmada kullanılan en etkili allel sayısı, I: Bilgi İndeksi, No. Private Alleles: Gruba özgü özel allel sayısı, No.LComm Alleles ( $\leq$ 25%): %25'ten büyük ortak allel sayısı, No.LComm Alleles ( $\leq$ 50%): %50'den büyük ortak allel sayısı, He: Beklenen Heterozigotluk)

Gruplara ait bireylerde aynı uzunluklara sahip ortak alleller olmasının yanında yalnızca belirli gruplara özgü uzunluklarda olan alleller de söz konusu olmaktadır (Tablo 17).

Tablo 17. Gruplara ait bireylerde farklılık gösteren özel allellerin adet ve isimleri

Örnek	Grup	Du215	Du215	Du281	Du281	Du323	Du323	Du418	Du418	Özel Alel Sayısı	Özel Allellerin İsimleri
<i>D. b. b.</i> Ulu3	Uludag	276	276	250	250	240	240	292	292	1	Du323
<i>D. b. b.</i> Ulu4	Uludag	276	288	250	250	240	254	292	292	2	Du215, Du323
<i>D. b. t.</i> Alap1	Düzce	228	232	192	192	184	192	308	308	1	Du215
<i>D. b. t.</i> Alap2	Düzce	292	216	222	252	188	192	292	318	3	Du215, Du281, Du418
<i>D. b. t.</i> Kurucaş2	Düzce	236	236	188	188	184	184	245	245	1	Du418
<i>D. b. t.</i> Sinop-Merk2	Düzce	224	224	172	172	188	194	184	192	1	Du418
<i>D. b. t.</i> Sinop	Düzce	252	286	248	248	254	262	278	288	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. r.</i> Ünye	Trabzon	210	226	212	212	192	192	356	356	1	Du281
<i>D. r. r.</i> Perş1	Trabzon	202	202	168	168	164	166	298	298	1	Du323
<i>D. r. r.</i> GirDerAlan	Trabzon	246	246	188	196	184	188	274	274	2	Du215, Du418
<i>D. r. r.</i> GirGörİsm	Trabzon	198	198	188	200	188	194	274	308	1	Du418
<i>D. r. r.</i> GümKöse2	Trabzon	280	296	250	256	230	264	288	288	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. r.</i> GümKöse3	Trabzon	210	210	164	172	172	176	284	284	1	Du323
<i>D. r. r.</i> SamDer1	Trabzon	136	136	188	188	190	204	268	268	1	Du323
<i>D. r. r.</i> SamDer2	Trabzon	198	202	180	196	184	192	328	328	1	Du418
<i>D. r. r.</i> SamTerme1	Trabzon	260	270	242	246	224	224	274	280	3	Du215, Du281, Du418
<i>D. r. r.</i> SamCanik	Trabzon	270	270	226	244	226	230	278	278	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. r.</i> SamMerGir2	Trabzon	236	236	234	234	230	230	280	284	2	Du281, Du323
<i>D. r. r.</i> TrDüzHaç	Trabzon	226	240	192	192	184	184	274	298	2	Du215, Du418
<i>D. r. r.</i> TrÇağOkçu	Trabzon	270	276	222	250	230	260	312	312	2	Du215, Du323
<i>D. r. r.</i> TrYılDemir	Trabzon	294	294	250	256	230	238	288	288	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. r.</i> TrDernek	Trabzon	220	230	204	208	184	204	324	323	1	Du418
<i>D. r. r.</i> TrArsFınd	Trabzon	220	220	200	204	192	212	282	282	1	Du418



Tablo 17'nin devamı

<i>D. r. r.</i> TrMerTosköy	Trabzon	124	306	238	242	242	246	338	338	4	Du215, Du281, Du323, Du418
<i>D. r. r.</i> TrSürmÇiftesu	Trabzon	216	226	204	204	184	204	246	255	1	Du418
<i>D. r. r.</i> TrOfCumhMah	Trabzon	136	136	0	0	112	116	278	286	1	Du323
<i>D. r. r.</i> SamBaf	Trabzon	188	202	184	188	164	164	320	344	1	Du418
<i>D. r. r.</i> TrDerecik	Trabzon	220	226	188	188	180	204	278	300	2	Du323, Du418
<i>D. r. r.</i> TrAkçaMersKon	Trabzon	192	206	176	176	172	188	246	254	1	Du323
<i>D. r. mir.</i> OvitYay4	Rize-Ovit	276	276	216	240	238	244	290	290	1	Du323
<i>D. r. mac.</i> ŞavÇamAş2	Şavşat	198	202	156	176	176	192	268	312	1	Du281
<i>D. r. mac.</i> ŞavÇamAş3	Şavşat	138	138	188	206	200	212	352	376	3	Du215, Du281, Du418
<i>D. r. mac.</i> ŞavÇamAş4	Şavşat	194	194	168	168	174	178	292	316	2	Du215, Du323
<i>D. r. mac.</i> ŞavHocaMez1	Şavşat	202	202	156	168	188	192	286	388	2	Du281, Du418
<i>D. r. mac.</i> ŞavHocaMez2	Şavşat	272	272	236	236	246	258	268	326	1	Du418
<i>D. r. mac.</i> ŞavHocaMez3	Şavşat	194	202	168	176	182	188	268	308	1	Du215
<i>D. r. mac.</i> ŞavHocaMez4	Şavşat	230	230	176	188	194	194	288	296	1	Du418
<i>D. r. obs.</i> ArdGeçBilYay1	Ardanuç	124	234	236	240	258	258	244	246	1	Du418
<i>D. r. obs.</i> ArdGeçBilYay2	Ardanuç	168	196	168	180	188	192	286	308	1	Du215
<i>D. r. obs.</i> ArdGeçBilYay4	Ardanuç	108	108	192	200	208	212	290	308	1	Du215
<i>D. r. obs.</i> ArdGeçBilYayAra1	Ardanuç	168	206	164	180	174	188	286	348	2	Du215, Du418
<i>D. r. obs.</i> ArdGeçBilYayAra2	Ardanuç	168	172	172	184	188	188	290	308	1	Du215
<i>D. r. bisc.</i> ArtÇiftekemer	Artvin	210	214	168	188	214	214	284	288	1	Du323
<i>D. r. bisc.</i> Rizeİyi3	Artvin	210	226	200	200	204	216	264	288	2	Du323, Du418
<i>D. r. bisc.</i> RizeAyd	Artvin	278	282	174	174	152	152	284	288	2	Du215, Du323
<i>D. r. bisc.</i> RizeFın	Artvin	272	302	168	196	201	200	288	288	2	Du215, Du323
<i>D. r. bisc.</i> RizeArd	Artvin	216	220	172	172	208	220	384	384	2	Du323, Du418

Tablo 17'nin devamı

<i>D. r. bisc.</i> RizeBorçkaCamAra	Artvin	200	216	172	172	200	214	262	262	3	Du215, Du323, Du418
<i>D. r. bisc.</i> ArtHatBaş	Artvin	132	144	88	120	0	0	286	294	2	Du215, Du281
<i>D. r. bisc.</i> ArtHopaEsen1	Artvin	152	160	128	140	142	144	286	286	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. bisc.</i> ArtHopaEsen2	Artvin	160	160	0	0	0	0	292	292	1	Du215
<i>D. r. bisc.</i> ArtHopaKemalpaşa	Artvin	198	198	168	184	224	224	188	204	1	Du418
<i>D. r. bisc.</i> ArtMur1	Artvin	136	140	168	180	0	0	284	304	2	Du215, Du418
<i>D. r. bisc.</i> ArtMur2	Artvin	222	226	168	180	208	214	294	294	1	Du323
<i>D. r. bisc.</i> ArtYukBal17	Artvin	128	132	88	92	132	132	314	314	4	Du215, Du281, Du323, Du418
<i>D. r. bisc.</i> ArtOrt2	Artvin	206	210	176	176	0	0	222	252	1	Du418
<i>D. r. bisc.</i> ArtMer	Artvin	206	238	172	196	208	214	284	284	2	Du215, Du323
<i>D. r. bisc.</i> ArtMerHatVad	Artvin	156	156	108	112	156	164	254	254	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. bisc.</i> ArtYanıklı1	Artvin	133	132	102	112	0	0	312	316	2	Du215, Du281
<i>D. r. bisc.</i> ArtYanıklı2	Artvin	266	266	236	244	254	264	308	316	1	Du215
<i>D. r. bisc.</i> ArtBeşOrmYolu2	Artvin	196	204	164	172	184	192	278	316	1	Du215
<i>D. r. bisc.</i> ArtBorçLekoban1	Artvin	192	192	152	180	188	196	308	316	1	Du281
<i>D. r. bisc.</i> ArtBorçLekoban2	Artvin	220	232	184	192	204	214	280	316	1	Du323
<i>D. r. bisc.</i> ArtŞavMadenköy	Artvin	156	156	132	132	140	142	308	316	3	Du215, Du281, Du323
<i>D. r. bisc.</i> ArdÇamlıYolu10km2	Artvin	152	152	128	128	136	140	264	264	4	Du215, Du281, Du323, Du418
<i>D. r. bisc.</i> ArtErenYusufeli	Artvin	188	196	152	184	188	196	298	298	1	Du281
<i>D. r. bisc.</i> ArtYeşilköy	Artvin	128	132	108	108	134	134	350	350	4	Du215, Du281, Du323, Du418

Grupların farklı hiyerarşik düzeylerde genetik farklılıklarını ortaya koymak amacıyla Moleküler Varyans Analizi (AMOVA) yapılmıştır.

Bu çalışmada popülasyonlar arasında genetik farklılıkları ortaya çıkarmak için tüm gruplar arasında Nei'nin genetik uzaklığı, Nei'nin güvenilir genetik uzaklığı, Fst değerleri ve Linear Fst değerleri esas alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Nei'nin genetik uzaklığı parametresi kullanılarak elde edilen verilere göre Uludağ grubu diğer tüm gruplardan net bir şekilde ayrılmıştır ve Düzce grubu Trabzon grubuna daha yakın genetik benzerlik göstermiştir. Nei'nin güvenilir genetik uzaklığı parametresi kullanılarak elde edilen verilere göre de Uludağ grubu diğer tüm gruplardan net bir şekilde ayrılmıştır ve Düzce grubu Trabzon grubuna daha yakın genetik benzerlik göstermiştir. Gruplar arası Fst değerlerine göre yapılan analiz sonuçları da Nei'nin genetik uzaklığı parametresi ve Nei'nin güvenilir genetik uzaklığı parametresi kullanılarak yapılan analizlerle aynı sonuçları vermiştir. Linear Fst değerleri ile yapılan analiz sonuçlarına göre de durum diğer parametrelere göre yapılan analizlerin sonuçları ile aynıdır. Farklı olarak Linear Fst değerleriyle yapılan analiz sonuçları Rize-Ovit grubunu diğer gruplardan net bir şekilde ayırmıştır.

Gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olup olmadığını ortaya koymak için ilk olarak Nei'nin genetik uzaklık parametresi dikkate alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki değerlerin giderek büyümesi genetik farklılaşmanın arttığı; gruplar arasındaki değerlerin giderek küçülmesi ise genetik farklılaşmanın giderek azaldığı anlamına gelmektedir. Analiz sonucunda elde edilen verilere göre her grup birbirinden anlamlı bir şekilde ayrılmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değer (1,433), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerden (0,534) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Nei'nin genetik uzaklık parametresi esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir (Tablo 18).

Tablo 18. Nei'nin genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler

Grup1	Grup2	Grup1-Birey Sayısı	Grup2-Birey Sayısı	Nei'nin Genetik Uzaklık Parametresi
Uludağ	Düzce	5	10	<b>1,433</b>
Uludağ	Trabzon	5	30	1,508
Düzce	Trabzon	10	30	<b>0,534</b>
Uludağ	Rize-Ovit	5	5	1,643
Düzce	Rize-Ovit	10	5	1,021
Trabzon	Rize-Ovit	30	5	1,169
Uludağ	Şavşat	5	8	2,002
Düzce	Şavşat	10	8	1,162
Trabzon	Şavşat	30	8	1,004
Rize-Ovit	Şavşat	5	8	1,554
Uludağ	Ardanuç	5	7	<b>3,628</b>
Düzce	Ardanuç	10	7	1,112
Trabzon	Ardanuç	30	7	1,050
Rize-Ovit	Ardanuç	5	7	1,294
Şavşat	Ardanuç	8	7	1,111
Uludağ	Artvin	5	31	1,473
Düzce	Artvin	10	31	0,988
Trabzon	Artvin	30	31	0,709
Rize-Ovit	Artvin	5	31	1,237
Şavşat	Artvin	8	31	1,072
Ardanuç	Artvin	7	31	1,067

Gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olup olmadığını ortaya koymak için ikinci olarak Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresi dikkate alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki değerlerin giderek büyümesi genetik farklılaşmanın arttığı; gruplar arasındaki değerlerin giderek küçülmesi ise genetik farklılaşmanın giderek azaldığı anlamına gelmektedir. Analiz sonucunda elde ettiğimiz verilere göre her grup birbirinden anlamlı bir şekilde ayrılmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değer (1,033), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerden (0,196) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresi esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir (Tablo 19).

Tablo 19. Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler

Grup1	Grup2	Grup1-Örnek Sayısı	Grup2-Örnek Sayısı	Nei'nin Güvenilir Genetik Uzaklık Parametresi
Uludağ	Düzce	5	10	<b>1,033</b>
Uludağ	Trabzon	5	30	1,183
Düzce	Trabzon	10	30	<b>0,196</b>
Uludağ	Rize-Ovit	5	5	1,217
Düzce	Rize-Ovit	10	5	0,583
Trabzon	Rize-Ovit	30	5	0,805
Uludağ	Şavşat	5	8	1,529
Düzce	Şavşat	10	8	0,677
Trabzon	Şavşat	30	8	0,593
Rize-Ovit	Şavşat	5	8	1,043
Uludağ	Ardanuç	5	7	<b>3,150</b>
Düzce	Ardanuç	10	7	0,621
Trabzon	Ardanuç	30	7	0,633
Rize-Ovit	Ardanuç	5	7	0,777
Şavşat	Ardanuç	8	7	0,547
Uludağ	Artvin	5	31	1,112
Düzce	Artvin	10	31	0,615
Trabzon	Artvin	30	31	0,410
Rize-Ovit	Artvin	5	31	0,838
Şavşat	Artvin	8	31	0,626
Ardanuç	Artvin	7	31	0,615

Gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olup olmadığını ortaya koymak için üçüncü olarak Wright'ın F istatistiği (1951) yapılmıştır. Grupların Fst değerleri küçük olan ikili karşılaştırmalarda gruplar aralarındaki farklılaşmanın önemsiz olduğu, Fst değeri büyük olan ikişerli karşılaştırmalarda ise gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olduğu görülmektedir ( $p \leq 0.05$  önemli,  $p > 0.05$  önemsiz). Analiz sonucunda elde edilen Fst değerlerine göre Uludağ grubu diğer tüm gruplardan anlamlı bir şekilde ayrılmaktadır. Uludağ-Düzce (Fst: 0.048), Uludağ-Trabzon (Fst: 0.051), Uludağ-Rize (Ovit) (0.054), Uludağ-Şavşat (0.067), Uludağ-Ardanuç (Fst: 0.089) ve Uludağ-Artvin (Fst: 0,047) ikili grupları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken bir başka husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değer (0,048), Düzce-Trabzon grupları

arasındaki değerden (0.004) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Fst değerleri esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir (Tablo 20). Çünkü Uludağ grubu diğer tüm gruplardan ayrıdır yani ayrı bir türdür. Ayrıca Uludağ-Ardanuç grupları en yüksek Fst değerine sahiptir (0,089).

Tablo 20. Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler

Grup1	Grup2	Grup1-Örnek Sayısı	Grup2-Örnek Sayısı	Fst Değerleri
Uludağ	Düzce	5	10	<b>0,048</b>
Uludağ	Trabzon	5	30	0,051
Düzce	Trabzon	10	30	<b>0,004</b>
Uludağ	Rize-Ovit	5	5	0,054
Düzce	Rize-Ovit	10	5	0,008
Trabzon	Rize-Ovit	30	5	0,029
Uludağ	Şavşat	5	8	0,067
Düzce	Şavşat	10	8	0,023
Trabzon	Şavşat	30	8	0,015
Rize-Ovit	Şavşat	5	8	0,040
Uludağ	Ardanuç	5	7	<b>0,089</b>
Düzce	Ardanuç	10	7	0,021
Trabzon	Ardanuç	30	7	0,017
Rize-Ovit	Ardanuç	5	7	0,034
Şavşat	Ardanuç	8	7	0,021
Uludağ	Artvin	5	31	0,047
Düzce	Artvin	10	31	0,025
Trabzon	Artvin	30	31	0,012
Rize-Ovit	Artvin	5	31	0,031
Şavşat	Artvin	8	31	0,020
Ardanuç	Artvin	7	31	0,021

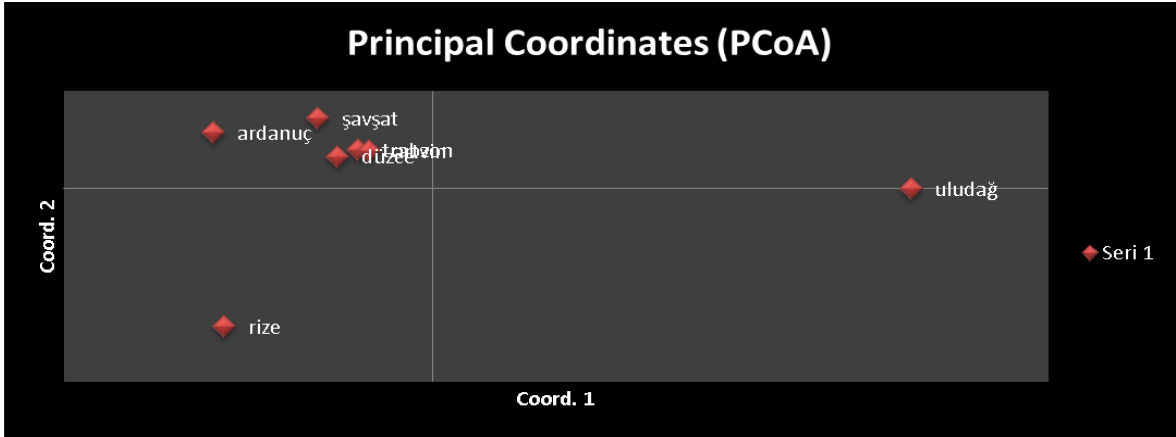
Gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olup olmadığını ortaya koymak için dördüncü olarak Linear Fst değerleri ile çalışılmıştır. Grupların Linear Fst değerleri küçük olan ikili karşılaştırmalarda gruplar aralarındaki farklılaşmanın önemsiz olduğu, Linear Fst değeri büyük olan ikişerli karşılaştırmalarda ise gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın önemli olduğu görülmektedir. Analiz sonucunda elde edilen Linear Fst değerlerine göre Uludağ grubu diğer tüm gruplardan anlamlı bir şekilde ayrılmaktadır.

Uludağ-Düzce (Linear Fst: 0,051), Uludağ-Trabzon (Linear Fst: 0,054), Uludağ-Rize (Ovit) (Linear Fst: 0,057), Uludağ-Şavşat (Linear Fst: 0,072), Uludağ-Ardanuç (Linear Fst: 0,098) ve Uludağ-Artvin (Linear Fst: 0,050) ikili grupları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken bir başka husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değer (0,051), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerden (0,004) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Fst değerleri esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir. Ayrıca, Rize-Ovit grubu ilk kez bu analizde diğer tüm gruplardan farklı değerler göstermiştir: Rize (Ovit)-Uludağ (0,057), Rize (Ovit)-Düzce (0,008), Rize (Ovit)-Trabzon (0,030), Rize (Ovit)-Şavşat (0,042), Rize (Ovit)-Ardanuç (0,035) ve Rize (Ovit)-Artvin (0,032) (Tablo 21). Ayrıca Uludağ-Ardanuç grupları en yüksek Linear Fst değerine sahiptir (Linear Fst: 0,098).

Tablo 21. Linear Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklara ait veriler

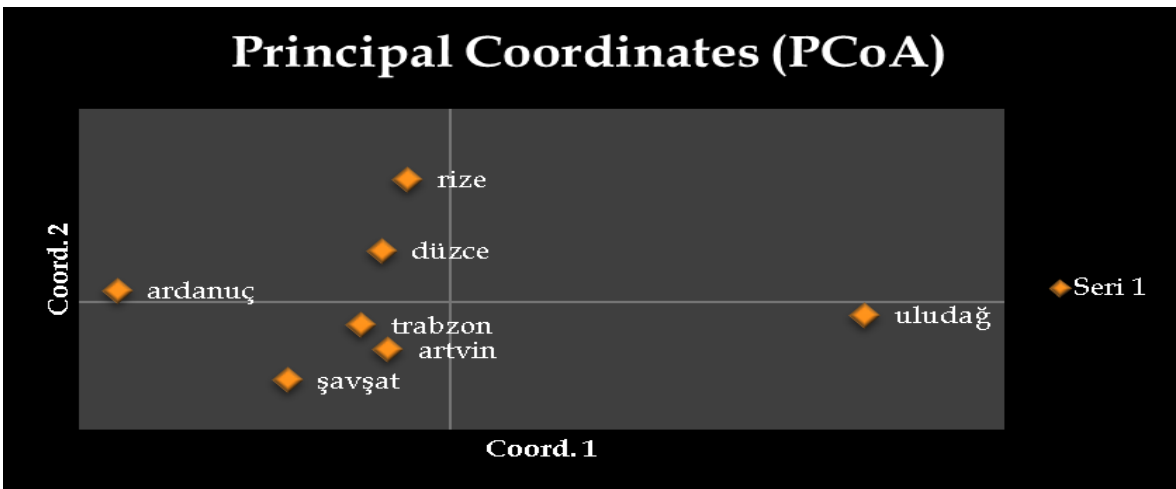
Grup1	Grup2	Grup1-Örnek Sayısı	Grup2-Örnek Sayısı	Linear Fst Değerleri
Uludağ	Düzce	5	10	<b>0,051</b>
Uludağ	Trabzon	5	30	0,054
Düzce	Trabzon	10	30	<b>0,004</b>
Uludağ	Rize-Ovit	5	5	0,057
Düzce	Rize-Ovit	10	5	0,008
Trabzon	Rize-Ovit	30	5	0,030
Uludağ	Şavşat	5	8	0,072
Düzce	Şavşat	10	8	0,024
Trabzon	Şavşat	30	8	0,016
Rize-Ovit	Şavşat	5	8	0,042
Uludağ	Ardanuç	5	7	<b>0,098</b>
Düzce	Ardanuç	10	7	0,021
Trabzon	Ardanuç	30	7	0,018
Rize-Ovit	Ardanuç	5	7	0,035
Şavşat	Ardanuç	8	7	0,021
Uludağ	Artvin	5	31	0,050
Düzce	Artvin	10	31	0,026
Trabzon	Artvin	30	31	0,012
Rize-Ovit	Artvin	5	31	0,032
Şavşat	Artvin	8	31	0,020
Ardanuç	Artvin	7	31	0,021

İncelenen gruplara ait mikrosatellit lokuslarının allel uzunlukları, Principal Coordinates (PCoA) Analizi kullanılarak Fst değerlerine göre koordinat sistemi üzerinde gösterilmiştir (Şekil 31). Buna göre Uludağ ve Rize-Ovit gruplarının, diğer gruplardan genetik olarak ayrı olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 31. Principal Coordinates (PCoA) Analizi kullanılarak Fst değerlerine göre grupların koordinat sisteminde dağılımının gösterilmesi

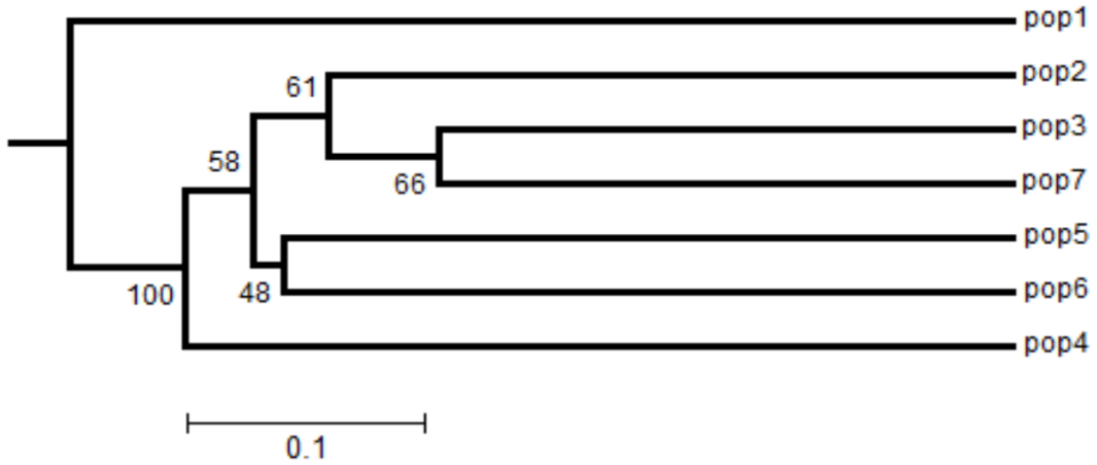
İncelenen gruplara ait mikrosatellit lokuslarının allel uzunlukları, Principal Coordinates (PCoA) Analizi kullanılarak Linear Fst değerlerine göre de koordinat sistemi üzerinde gösterilmiştir (Şekil 32). Bu analiz ile birlikte Uludağ ve Rize-Ovit gruplarının, diğer gruplardan genetik olarak ayrı olduğu bilgisi desteklenmiştir.



Şekil 32. Principal Coordinates (PCoA) Analizi kullanılarak Linear Fst değerlerine göre grupların koordinat sisteminde dağılımının gösterilmesi



En spesifik verileri taşımasından dolayı elde edilen Linear Fst değerleri esas alınarak, gruplar arasındaki genetik ilişki POPTREE bilgisayar programında analiz edilmiş ve UPGMA dendogramı oluşturulmuştur (Şekil 33). Dendogramın Türkiye’de bulunan Trabzon ve Uludağ kertenkelesi popülasyonlarını, *D. rudis* ve *D. bithynica* olmak üzere 2 ayrı dala ayırdığı gözlenmiştir. Dendogram üzerinde dalların güvenilirliğini test etmek üzere 1000 tekrarlı seç-bağla analizi yapılmış ve %48’in altında birbirini destekleyen dallar gözlemlenmemiştir. Analiz sonucu, Uludağ grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki ayrılmayı tamamen desteklerken, Rize-Ovit grubunu kalan diğer tüm gruplardan ayırarak farklı bir soy (clade) olarak belirlemiştir.



Şekil 33. Grupların dendogram üzerinde gösterimi, Pop 1: *D. b. bithynica* (Uludağ Grubu), Pop 2: *D. b. tristis* (Düzce Grubu), Pop 3: *D. r. rudis* (Trabzon Grubu), Pop 4: *D. r. mirabilis* (Rize-Ovit Grubu), Pop 5: *D. r. macromaculata* (Şavşat Grubu), Pop 6: *D. r. obscura* (Ardanuç Grubu) ve Pop 7: *D. r. bischoffi* (Artvin Grubu)

#### 4. TARTIŞMA

Mikrosatellit belirteçleri gösterdikleri varyasyon oranlarıyla özellikle mikrocoğrafik alanda yaşayan bazı hayvan popülasyonlarının (balık) genetik yapılarını başarılı bir şekilde ortaya koymuştur (Estoup ve ark., 1998; Hansen ve ark., 2000; Fritzner ve ark., 2001).

Bu çalışma, ayrımları en son 2013 yılında ve yalnızca morfolojik seviyede yapılan, Türkiye’de geniş bir alanda dağılışı gösteren *D. bithynica* ve *D. rudis* popülasyonlarının mikrosatellit belirteçler yöntemi kullanılarak, allel boylarının uzunlukları yönünden, filogenetik ayrımlarına açıklık getirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. 59 ayrı lokaliteye ait kertenkele örnekleri 7 gruba (Uludağ grubu, Düzce grubu, Trabzon Grubu, Rize-Ovit grubu, Şavşat grubu, Ardanuç grubu ve Artvin grubu) ait 4 adet mikrosatellit lokusu (Du215, Du281, Du323 ve Du418) üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen verilerle analizler hazırlanmış ve hem mikrocoğrafik hem de makrocoğrafik alanda Uludağ kertenkelesi ve Trabzon kertenkelesine ait olduğu düşünülen popülasyonların genetik yapıları hakkında önemli bilgiler kaydedilmiştir. Ayrıca söz konusu türlerin ve alttürlerin bugünkü popülasyonları arasındaki mevcut genetik farklılıklar ortaya konmuştur.

Belirtilen bölgelerde bir mutasyon olması halinde, nükleotit tekrarlarının eklenip çıkması sonucu genetik yapısı araştırılan bölgelerde, eklenen nükleotit tekrarları varsa allel uzunluklarının beklenenden uzun; kaybolan nükleotit tekrarları varsa allel uzunluklarının beklenenden kısa olması gerekmektedir. Oysa Hardy-Weinberg dengesine göre evrim mekanizmalarının var olmadığını düşündüğümüz bir popülasyonda, her bir allelin boyunun (frekansının) nesiller boyunca sabit kalması gerekir. Bazı popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olmaması, izolasyonlar nedeniyle sınırlı gen akışına sahip olmaktan kaynaklanabilir (Arslan, 2006). Bu durumun ise genellikle dışarı kapalı popülasyonlarda görülmesi beklenir. Uludağ grubu gerçekten *D. rudis*’ in diğer alttürlerinden farklılık gösteriyor ise bu, *bithynica*’nın büyük bir kara parçası üzerinde bir ada popülasyonu gibi yapısının olduğunu gösterir (Böhme ve Bischoff, 1984). Uludağ grubunun yaşadığı ortam itibarıyla izole bir grup olmasından dolayı dışarı ile olan gen alış verişinin zaman içerisinde durduğu ve bu sayede belirli genlerin yalnızca bu popülasyonda korunduğu düşünülmektedir. Uludağ grubu diğer tüm gruplardan anlamlı bir şekilde ayrılmaktadır. Uludağ-Düzce (Fst: 0,051), Uludağ-Trabzon (Fst: 0,054), Uludağ-Rize (Ovit) (Fst: 0,057),

Uludağ- Şavşat (Fst: 0,072), Uludağ-Ardanuç (Fst: 0,098) ve Uludağ-Artvin (Fst: 0,050) ikili grupları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bunun bir sonucu olarak söz konusu genler üzerindeki allellerin de aynı kaldığı ve allel boylarında fazlaca çeşitlenme olmadığı görülmektedir. Uludağ grubundaki bu dar allel çeşitliliğine rağmen Trabzon ve Artvin gruplarına ait allel boylarının çeşitliliğinde yüksek bir oran dikkat çekmektedir. Bu durum, Trabzon ve Artvin gruplarındaki popülasyonların dağılım alanlarının Uludağ grubu gibi belirli bir bölge ile sınırlı kalmadığı, geniş alanlara yayılarak belki de hibritleşmeler sonucu gen alış verişinin rahatlıkla gerçekleştiği anlamına gelebilir. Çalışmada, dikkat çeken bir başka husus ise 2013 yılında tavsifi yapılan ve bu çalışmada “Rize-Ovit” olarak adlandırılan grubun allel çeşitliliğindeki miktarın azlığıdır. Bu durum akla Rize-Ovit grubunun da Uludağ grubu gibi izole bir popülasyon olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Bu bilgi, yapılan analizlerde Rize-Ovit grubunun *D. rudis*'in diğer alttürlerinden farklı bir soy (clade) olabileceğini ortaya koymuştur.

*D. rudis* ve *D. bithynica* türlerinin genetik yapı analizi sonucu 4 mikrosatellit lokusunda ortalama 184 allel kayıt altına alınmıştır. Tüm lokuslar polimorfiktir. Uludağ grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 9,5; Düzce grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 19; Trabzon grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 58,5; Rize-Ovit grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 9; Şavşat grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 16; Ardanuç grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 14 ve Artvin grubu popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 57,5 olarak belirlenmiştir.

Popülasyonlarda gözlenen heterozigotluk değeri popülasyon içi varyasyonun önemli bir göstergesidir. Popülasyon içi varyasyonlar belirlenerek farklı boylardaki alleller her bir grup için belirlenirse, gruplar arası farklılıkları daha kolay yorumlanabilir. Örneğin bir grup içerisinde allel varyasyonu çok fazla değilse gen alış verişi zamanla durmuş bir gruptan bahsediliyor olabilir. Uludağ grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,800 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,820'dir. Düzce grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,500 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,859'dir. Trabzon grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,567 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,941'dir. Rize-Ovit grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,250 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,656'dir. Şavşat grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,375 iken beklenen heterozigotluk değeri

0,844'dir. Ardanuç grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,857 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,867'dir. Son olarak Artvin grubu popülasyonlarının Du215 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,633 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,954'dir. Ho ve He yi yan yana görmemiz durumunda aralarındaki fark dengeden sapmanın yönünü ve büyüklüğünü belirtmektedir.

Uludağ grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,200 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,740'dir. Düzce grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,300 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,885'dir. Trabzon grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,724 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,936'dir. Rize-Ovit grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,600 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,740'dir. Şavşat grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,750 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,828'dir. Ardanuç grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,857 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,867'dir. Son olarak Artvin grubu popülasyonlarının Du281 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,700 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,937'dir.

Uludağ grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,250 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,719'dir. Düzce grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,800 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,805'dir. Trabzon grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,655 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,901'dir. Rize-Ovit grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 1,000 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,840'dir. Şavşat grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,750 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,906'dir. Ardanuç grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,571 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,847'dir. Son olarak Artvin grubu popülasyonlarının Du323 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,760 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,940'dir.

Uludağ grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,000 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,640'dir. Düzce grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,400 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,880'dir. Trabzon grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen

heterozigotluk değeri 0,414 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,943'dir. Rize-Ovit grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,000 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,750'dir. Şavşat grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 1,000 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,883'dir. Ardanuç grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,714 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,816'dir. Son olarak Artvin grubu popülasyonlarının Du418 lokusunda gözlenen heterozigotluk değeri 0,600 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,933'dir.

Hardy-Weinberg dengesinde olmayan popülasyonların küçük popülasyonlar olmaları, izolasyonlar nedeniyle sınırlı gen akışının olması ve genetik kayma ile açıklanmaktadır.

*Darevskia* cinsinin mikrocoğrafik alanda yani grup içinde-popülasyonlar arasında ve popülasyon içinde önemli varyasyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada araştırılması hedeflenen konu, türlerin ve alttürlerin makrocoğrafik alandaki yani gruplar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyabilmektir. Çalışmada kullanılan tüm gruplarda kendilerine özgü allel frekansları saptanmıştır ve bu lokuslarda bulunan allel frekansları diğer gruplarda görülmemektedir. Genetik farklılık sebeplerinin, yaşadıkları alanın fiziksel olarak izole olmasından kaynaklandığı ve bu sayede gen akışının sınırlı olduğu düşünülmektedir (Arslan, 2006). Belirlenen gruplar arasında mikrosatellit belirteçler kullanılarak, Uludağ grubunun allel boylarındaki ileri düzeydeki farklılık ve frekans değerleri bu grubu diğer gruplardan tamamıyla ayırmıştır. Düzce grubunun allel boylarındaki çeşitlenme, Uludağ grubu popülasyonu ile morfolojik olarak benzerlik taşıdığı ifade edilmiş olsa da (Arribas ve ark., 2013) Trabzon grubuna yakınlık göstermektedir. Ayrıca Rize-Ovit grubunun, *D. rudis*' e ait diğer tüm gruplardan farklı bir soy (clade) olabileceği açığa çıkarılmıştır.

Bu tez çalışmasında yapılan 4 ayrı analiz sonucuna göre Uludağ grubu diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklılık göstermektedir ve bu tez çalışması *D. bithynica*'nın ayrı bir tür olduğunu desteklemektedir. Fakat literatürde belirtilenin aksine Düzce grubu Uludağ grubuna değil Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir ve bu tez çalışması, literatürde *D. b. tristis* olarak belirtilen alttürün *D. r. tristis* olarak tekrar isimlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu tez çalışması, *D. rudis*'in bir alttürü olarak tavsif edilen Rize-Ovit grubunun ayrı bir clade (soy) olabileceğini yani *D. r. mirabilis*'in belki de literatürün aksine farklı bir tür olabileceğini açığa çıkarmıştır.

Kökeni 1980’li yıllara dayanmasına rağmen mikrosatellit belirteçler ile ilgili çalışmalar, 2000’li yıllardan sonra artarak günümüze kadar gelmiştir. Bu metod ile birçok hayvan ırkının çalışılmasına rağmen eksiklikler günümüzde halen devam etmektedir. Sürüngenlerde bu metod ile yapılan sistematik çalışmalar 1990’lı yıllara dayanır. *Darevskia* cinsi için ise çalışmalar 2000’li yıllardan sonra artış kazanmıştır. Bu zaman zarfında *Darevskia unisexualis*, *Darevskia agilis* gibi *Darevskia* cinsine ait türlerde mikrosatellit DNA yöntemi başarılı bir şekilde kullanılmış (Grechko, 2006; Korchagin, 2007) ve söz konusu metod *Darevskia* cinsi için de literatüre kazandırılmıştır. Diğer bir çok canlı grubunda belirli genlerin üzerindeki allel boylarının çeşitliliği esas alınarak sistematik sınıflandırmalarda lokalitelere göre yorumlar yapılmasına rağmen (Arslan, 2006; Kükrer, 2013) bu durum *Darevskia* cinsi kertenkeleler için farklıdır. *Darevskia* cinsi kertenkelelere ait çalışmalarda allel boylarının çeşitliliğinin yanı sıra belirlenen lokusların sekansları da araştırılmaktadır (Ciobanu ve ark., 2004; Grechko ve ark., 2005; Korchagin ve ark., 2006; Malysheva ve ark., 2006). Bunun sebebi bu cinse ait farklı türlerde kertenkelelerin aynı ortamı paylaşmaları ve hibridizasyonun yaygın olabileceği düşüncesidir. Belirlenen bölgelerin sekanslarının okutulmasıyla türün ata türleri dahi belirlenebilmektedir (Korchagin, 2006; Malysheva, 2006).

Belirlenen genlerin üzerindeki allel boylarının çeşitliliği esas alınarak *Darevskia* cinsi için sistematik sınıflandırmaları kapsayan bir çalışma Petrosyan ve ark. (2003) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *Darevskia* cinsine ait 3 tür (*Darevskia dahli*, *Darevskia armeniaca* ve *Darevskia unisexualis*)’ün sınıflandırılmasında Wright’ın  $F_{st}$  istatistiğindeki çeşitli parametreler ile  $F_{st}$  değerleri kullanılmış ve M13, (GACA)<sub>n</sub>, ve (TCC)<sub>n</sub> lokuslarında popülasyonlar arası genetik çeşitlilik kaydedilmiştir. Buna göre Ermenistan’ın kuzeydoğu ve kuzeybatısında bulunan *D. dahli* popülasyonlarının birbirlerinden farklı oldukları ( $F_{st} = 0.0272$ ) ve *D. armaniaca*’nın Ukrayna popülasyonlarının tamamının aynı popülasyon ( $F_{st} = 0$ ) olduğu, bu tez çalışmasında olduğu gibi  $F_{st}$  değerleri esas alınarak açığa çıkarılmıştır (Petrosyan ve ark., 2003).

Mikrosatellit DNA belirteci kullanarak Wright’ın  $F_{st}$  istatistiği ile yapılan bir başka çalışma Arslan tarafından 2006 yılında 27 alabalık popülasyonuna ait 5 mikrosatellit lokusunun (Str15INRA, Str60INRA, Str73INRA, SsoSL417 ve Ssa171) analizleri gerçekleştirilerek yapılmıştır ve hem mikrocoğrafik hem de makrocoğrafik alanda alabalık popülasyonlarının genetik yapısı hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır. Türkiye’de

alabalık popülasyonlarının dahil oldukları soy hatları belirlenmiş ve bugünkü popülasyonlar arasında oluşan mevcut genetik farklılıklar ortaya konmuştur. Alabalık popülasyonlarının genetik yapı analizi sonucu beş mikrosatelit lokusunda toplam 37 allel saptanmıştır. Tüm lokuslar, bu tez çalışmasında olduğu gibi polimorfiktir. Türkiye alabalık popülasyonlarında, gözlenen heterozigotluk değeri 0.070 ile 0.504 arasındadeğişirken ortalama heterozigotluk 0,254' tür. Türkiye alabalık popülasyonlarında görülen allel sayısı ortalaması 7,4 olarak belirlenmiştir (Arslan, 2006). Popülasyon çiftleri arasındaki genetik farklılığın önemli olup olmadığını istatistiksel olarak ortaya koymak için bu tez çalışmasında olduğu gibi Wright'ın  $F_{st}$  analizi yapılmıştır. Popülasyonların  $F_{st}$  matrisinde  $F_{st}$  değerleri küçük olan ikişerli karşılaştırmalarda popülasyonların aralarındaki farklılaşmanın önemsiz olduğu,  $F_{st}$  değeri büyük olan ikişerli karşılaştırmalarda ise popülasyonlar arasındaki farklılaşmanın bu tez çalışmasına benzer şekilde önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır ( $p \leq 0.05$  önemli,  $p > 0.05$  önemsiz) (Arslan, 2006). Bu çalışmaya benzer şekilde, farklı havza sistemlerinde (lokalitelerde) birbirine uzak olan popülasyonların en yüksek  $F_{st}$  değerlerine sahip olduğu açığa çıkarılmıştır. Birbirine yakın popülasyonlar ya da aynı havza sisteminde (lokalitelerde) olsalar dahi popülasyonların büyük bir kısmının istatistiksel olarak önemli  $F_{st}$  değerlerine sahip oldukları bu çalışmayla paralellik gösteren bir başka bilgidir. Ayrıca Nei'nin genetik uzaklık matrisinde birbirinden uzak görülen popülasyonların  $F_{st}$  değerleri de bu tez çalışmasının sonuçlarımıza benzer şekilde büyüktür. Bu sonuçların, Türkiye coğrafyasında bulunan alabalıkların tıpkı kertenkelelerde olduğu gibi önemli bir şekilde birbirlerinden izole olduklarını destekleyen diğer bir gösterge olduğu düşünülmüş ve bu çalışmada olduğu gibi popülasyonların bir kısmının Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı belirtilmiştir. Bazı popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olmaması, örnek sayısının düşük olması nedeniyle nadir görülen allellerin tespit edilememesinden kaynaklanabilir. Ayrıca popülasyonlarda görülen heterozigot eksikliğinin null allel bulunmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Aurelle ve ark., 2002). Ancak genel olarak örnek sayısı yüksek olan popülasyonlarda da Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Bu durum, alabalıklar popülasyonlarına benzer şekilde kertenkele popülasyonlarının küçük popülasyon büyüklüğüne sahip olmaları, izolasyonlar nedeniyle sınırlı gen akışının olması ve genetik kayma ile açıklanmaktadır.

Mikrosatellit DNA belirteci kullanarak Wright'ın  $F_{st}$  istatistiği ile yapılan bir başka çalışmada 18 ilden toplanan 250 bal arısının (yerleşik yaşayan 174 birey ve göç eden 76 birey) genetik yapıları 30 adet mikrosatellit lokusu dikkate alınarak araştırılmıştır (Kükreer,

2013). Özel allel taşıyan popülasyonlar bu tez çalışmasında belirlendiği gibi özellikle belirlenmiştir. Her bir lokusun gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri hesaplanmıştır. (A079 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,69 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,74'tür. A107 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,92 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,93'tür. A(B)124 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,73 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,79'dur. AC006 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,15 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,20'dir. AC306 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,64 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,71'dir. AP218 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,06 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,13'tür. AP226 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,17 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,21'dir. AP243 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,16 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,19'dur. AP289 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,66 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,91'dir. HB-C16-02 lokusu için gözlenen heterozigotluk değeri 0,59 iken beklenen heterozigotluk değeri 0,73'tür). İlgili çalışmada, gözlenen ve beklenen değerler arasında bu çalışmada olduğu gibi büyük farklar gözlenmiştir.

Tüm bu sonuçlar ışığında mikrosatelit belirteçleri Türkiye coğrafyasında dağılışı gösteren *D. rudis* ve *D. bithynica* türlerine ait popülasyonların belirlenen genlerde allel uzunluklarını belirlemiş ve popülasyonlar arası allel uzunlukları arasındaki genetik ilişkiyi farklı istatistiksel yöntemlerle ayrıntılı bir şekilde ortaya koyabilmektedir. Ayrıca belirlenen lokusların allel uzunluklarının yanında sekanslarının da okunması durumunda türlerin evrimsel tarihini açıklayabilmek de mümkün olabilecektir.



## 5. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada *D. rudis* ve *D. bithynica* türlerinin Türkiye’de bulunan farklı lokalitelerdeki kertenkele örneklerine ait (*D. rudis* türü için 54 lokalite ve *D. bithynica* türü için 5 lokaliteden 15 kertenkele örneği olmak üzere toplamda 96 adet birey); Du215, Du281, Du323 ve Du418 lokuslarının mikrosatellit DNA belirteci kullanılarak söz konusu türler ve alttürleri arasındaki genetik ilişkilerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu genetik ilişkilerin incelenmesinde 4 farklı parametre (Nei’nin genetik uzaklık parametresi, Nei’nin güvenilir genetik uzaklık parametresi, Fst değerleri ve Linear Fst değerleri) kullanılmıştır ve tüm parametrelere ait sonuçlar birbirini desteklemektedir.
2. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar ilk olarak Nei’nin genetik uzaklık parametresine göre belirlenmiştir. Buna göre, Uludağ grubu diğer grupların tamamından bariz bir şekilde ayrılmaktadır. Bir başka dikkat edilmesi gereken husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değer (1,433), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerden (0,534) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Nei’nin genetik uzaklık parametresi esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir (Tablo 23).

Tablo 22. Nei’nin genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar

	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin
Uludağ	0,000						
Düzce	1,433	0,000					
Trabzon	1,508	0,534	0,000				
Rize-Ovit	1,643	1,021	1,169	0,000			
Şavşat	2,002	1,162	1,004	1,554	0,000		
Ardanuç	3,628	1,112	1,050	1,294	1,111	0,000	
Artvin	1,473	0,988	0,709	1,237	1,072	1,067	0,000

3. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar ikinci olarak Nei’nin güvenilir genetik uzaklık parametresine göre belirlenmiştir. Buna göre, Uludağ grubu diğer grupların tamamından bariz bir şekilde ayrılmaktadır. Bir başka dikkat edilmesi

gereken husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değerin (1,033), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerdan (0,196) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresi esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir (Tablo 24).

Tablo 23. Nei'nin güvenilir genetik uzaklık parametresine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar

	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin
Uludağ	0,000						
Düzce	1,033	0,000					
Trabzon	1,183	0,196	0,000				
Rize-Ovit	1,217	0,583	0,805	0,000			
Şavşat	1,529	0,677	0,593	1,043	0,000		
Ardanuç	3,150	0,621	0,633	0,777	0,547	0,000	
Artvin	1,112	0,615	0,410	0,838	0,626	0,615	0,000

4. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar üçüncü olarak Fst değerlerine göre belirlenmiştir. Buna göre, Uludağ grubu diğer grupların tamamından yine bariz bir şekilde ayrılmaktadır. Bir başka dikkat edilmesi gereken husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değerin (0,091), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerdan (0,026) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Nei'nin genetik uzaklık parametresi esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir (Tablo 24).

Tablo 24. Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar

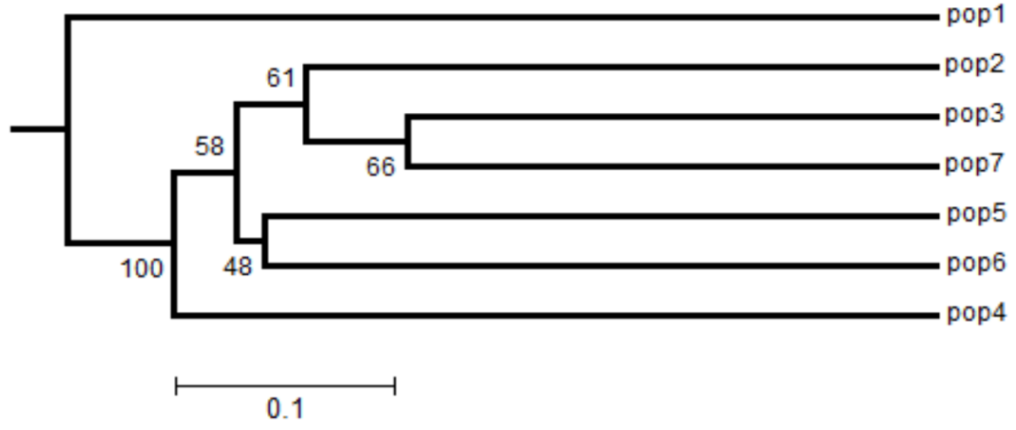
	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin
Uludağ	0,000						
Düzce	0,091	0,000					
Trabzon	0,078	0,026	0,000				
Rize-Ovit	0,125	0,074	0,067	0,000			
Şavşat	0,100	0,052	0,036	0,088	0,000		
Ardanuç	0,116	0,054	0,040	0,085	0,053	0,000	
Artvin	0,076	0,036	0,017	0,067	0,035	0,039	0,000

5. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar dördüncü olarak Linear Fst değerlerine göre belirlenmiştir. Buna göre, Uludağ grubu diğer grupların tamamından yine bariz bir şekilde ayrılmaktadır. Bir başka dikkat edilmesi gereken husus Uludağ-Düzce grupları arasındaki değer (0,051), Düzce-Trabzon grupları arasındaki değerden (0,004) daha yüksek olduğu bilgisidir. Bu demektir ki Düzce grubu Nei'nin genetik uzaklık parametresi esas alınarak yapılan analizlerde Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir. İlâveten, burada dikkat çeken bir başka husus da Rize-Ovit popülasyonunun diğer gruplardan anlamlı bir farklılık göstermesidir (Tablo 25).

Tablo 25. Linear Fst değerlerine göre gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar

	Uludağ	Düzce	Trabzon	Rize-Ovit	Şavşat	Ardanuç	Artvin
Uludağ	0,000						
Düzce	0,051	0,000					
Trabzon	0,054	0,004	0,000				
Rize-Ovit	0,057	0,008	0,030	0,000			
Şavşat	0,072	0,024	0,016	0,042	0,000		
Ardanuç	0,098	0,021	0,018	0,035	0,021	0,000	
Artvin	0,050	0,026	0,012	0,032	0,020	0,021	0,000

6. Linear Fst değerlerine göre Uludağ grubu diğer tüm gruplardan bariz bir şekilde ayrılmaktadır. Rize-Ovit grubunun ise kalan gruplar içerisinde farklı bir soy olabileceği belirlenmiştir (Şekil 34).
7. Bu tez çalışmasında kullanılan 4 ayrı parametreye göre Uludağ grubu diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklılık göstermektedir ve bu tez çalışması *D. bithynica*'nın ayrı bir tür olduğunu desteklemektedir. Fakat literatürde belirtilenin aksine Düzce grubu Uludağ grubuna değil Trabzon grubuna genetik olarak daha fazla yakınlık göstermektedir ve bu tez çalışması, literatürde *D. b. tristis* olarak belirtilen alttürün *D. r. tristis* olarak isimlendirilebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu tez çalışması, *D. rudis*'in bir alttürü olarak tavsif edilen Rize-Ovit grubunun ayrı bir clade (soy) olabileceğini yani *D. r. mirabilis*'in belki de literatürün aksine *D. rudis*'in bir alttürü değil farklı bir tür olabileceğini açığa çıkarmıştır.



Şekil 34. Grupların dendrogram üzerinde gösterimi, Pop 1: *D. b. bithynica* (Uludağ Grubu), Pop 2: *D. b. tristis* (Düzce Grubu), Pop 3: *D. r. rudis* (Trabzon Grubu), Pop 4: *D. r. mirabilis* (Rize-Ovit Grubu), Pop 5: *D. r. macromaculata* (Şavşat Grubu), Pop 6: *D. r. obscura* (Ardanuç Grubu) ve Pop 7: *D. r. bischoffi* (Artvin Grubu)

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışma, dağılışı Türkiye içerisinde bulunan *Darevskia rudis* ve *Darevskia bithynica* türlerini alttürleriyle birlikte moleküler düzeyde incelenmeleri ve karşılaştırılmaları hedeflenerek hazırlanmıştır. Bu kapsamda *D. rudis* türü için 5 alttür [*D. r. rudis* (Trabzon Grubu), *D. r. mirabilis* (Rize-Ovit Grubu), *D. r. macromaculata* (Şavşat Grubu), *D. r. obscura* (Ardanuç Grubu) ve *D. r. bischoffi* (Artvin Grubu)]; *D. bithynica* türü için ise 2 alttür [(*D. b. bithynica* (Uludağ Grubu) ve *D. b. tristis* (Düzce Grubu)] incelenmiştir. Fakat *D. rudis*' in Türkiye'de (Niğde) yayılış gösteren *D. r. bolcardaghica* alttürü mevcut örnek bulunmadığından dolayı bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Söz konusu lokaliteden örneklerin temin edilmesi halinde türün tüm alttürlerinin yer aldığı daha kapsamlı bir revizyon çalışması, türün sistematığıne katkıda bulunacaktır. Ayrıca, çalışmanın bir sonucu olarak Düzce grubu, literatürde belirtilenin aksine Uludağ grubundan ziyade Trabzon grubuna moleküler düzeyde daha fazla yakınlık göstermektedir. Söz konusu mikrosatellit bölgelerinin artırılması ve/veya türlere ait yavaş evrimleşen bir gen ile hızlı evrimleşen bir genin sekanslarının okunmasıyla elde edilecek sonuçların, popülasyonlar arası genetik farklılıkları yorumlamada kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Afsar, M., Ayaz D., Afsar B., Çiçek, K. ve Tok, C. V., 2012. Camili Biyosfer Rezerv Alanı'nın (Borçka, Artvin, Türkiye) Herpetofaunası, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji, 2,1, 41-49.
- Ağaoğlu, Ö. K. ve Ertuğrul, O., 2010. Mikrosatellitlerin Önemi ve Kullanım Alanları, Veteriner Hekim Dergisi, 81,1, 39-43.
- Arnold E. N., Arribas O. ve Carranza S., 2007. Systematics of the Palaeartic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera, Zootaxa, 1430, 1–86.
- Arribas O., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Durmuş, S. H., Avcı, A. ve Üzüm N., 2013. External Morphology and Osteology of *Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886), with A Taxonomic Revision of the Pontic and Small-Caucasus Populations (Squamata: Lacertidae), Zootaxa, 3626,4, 401–428.
- Arribas, O., J., 1999. Phylogeny and relationships of the Mountain lizards of Europe and Near East (Archaeolacerta MERTENS, 1921 sensu lato) and their relationships among the Eurasian lacertid radiation, Russian Journal of Herpetology, 1-22.
- Arslan, S., 2006. Türkiye'de Doğal Alabalık (*Salmo trutta* L.,1758) Popülasyonlarında Mikrocoğrafik ve Makrocoğrafik Mikrosatellit DNA Varyasyonu, Doktora Tezi, C.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Atatür, M. K. ve Baran, İ., 1988. Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler), Türkiye Cumhuriyeti Çevre Bakanlığı, Ankara.
- Aurelle, D., Cattaneo-Berrebi, G. and Berrebi, P. 2002. Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) in the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites, Heredity, 89, 171–183.
- Avise, J. C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution, 511, Chapman and Hall, New York, USA.
- Baran, İ., 2005. Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri, Birinci Basım, Tübitak Popüler Bilim Kitapları, Ankara.
- Baran İ. ve Atatür M. K., 1998. Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler). T.C. Çevre Bakanlığı Yay., Ankara.
- Başoğlu, M. ve Baran, İ., 1977. Türkiye Sürüngenleri-Kaplumbağa ve Kertenkeleler, 272, İlker Matbaası, İzmir.

- Batendse, W., Vaiman, D. ve Kemp, S. L., 1997. A medium density Genetic linkage map of the bovine genome, Mamm Genome, 8, 21-28.
- Bedriaga, J. V., 1886. Beiträge zur Kenntnis der Lacertiden-Familie. (Lacerta, Algiroides, Tropidosaura, Zerzunia und Bettaia), Abhandlungen der senckenbergischen naturforschenden Gesellschaft, Frankfurt/Main, 14, 17-443.
- Bektaş, Y., 2003. Karadeniz'in Türkiye Kıyılarındaki Mezgit (*Merlangius merlangus* Euxinus Nordmann, 1840)'in RAPD Tekniği ile Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bektaş, Y., 2008. Türkiye Kıyısal Sularındaki İstavrit (*Trachurus mediterraneus* Steindachner, 1868, *Trachurus trachurus* Linnaeus, 1758 ve *Trachurus picturatus* Bowdich, 1825) Popülasyonlarının Genetik ve Morfolojik Analizi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bermingham, E., McCafferty, S. S. ve Martin, A. P., 1997. Fish biogeography and molecular clocks: Perspectives from the panamanian \_sthumus. In 'Molecular systematics of fishes' (T. D. Kocher and C. A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego.
- Bentzen, P., Harris, A. S. ve Wright, J. M., 1991. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprinting of important aquacultural species of salmonids and tilapia. In Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J. and Wolf, R., EDS. DNA Fingerprinting Approaches and Application, Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 243-262.
- Bischoff, W., 1974. Echsen des Kaukasus 6. Die Kielschwanz- Felseidechse *Lacerta rudis* Bedriaga 1886, Aquarien Terrarien, Leipzig, 21, 8, 274-278.
- Bodenheimer, F. S., 1944. Introduction into the Knowledge of the Amphibia and Reptilia of Turkey, 78, Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Ser. B. 9.
- Boettger, O., 1892. Wissenschaftliche Ergebnisse der Reise Dr. Jean Valentins im Sommer 1890. I. Kriechtiere der Kaukasusländer, gesammelt durch die Radde-Valentin'sche Expedition nach dem Karabagh und durch die Herren Dr. J. Valentin und P. Reibisch, Berichte der senckenbergischen naturforschenden Gesellschaft, Frankfurt/Main, 131-150.
- Bolormaa, S., Ruvinsky, A., Walkden-Brown, S. ve Van Der Werf, J., 2008. DNA-based parentage verification in two Australian goat herds, Small Rumin Res, 80, 95-100.
- Bonas, U., Ganal, M. ve Gebhardt, C., 2000. Isolation, characterization and mapping of microsatellites from the tomato genome and their application in molecular analysis of centromeric regions, Doktora Tezi, Kiev.
- Bosch, H. A. J. ve Bischoff, W. (2004). Remarks on the herpetofauna of the Caucasian Republic of Georgia, with special reference to the Lacertidae. - Pod@rcis, 5 (2): 28-57.

- Boulenger, G., A., 1904. On the *Lacerta depressa* of Camerano, Proc. Zool. Soc., 2, 22, 332-339.
- Boulenger, G. A., 1913. Second contribution to our knowledge of the varieties of Wall Lizard (*Lacerta muralis*), Trans. zool. Soc. London, 20, 3, 135-216.
- Böhme, W. ve Bischoff, W., 1984. *Lacerta rudis* Bedriaga 1886 – Kielschwanz-Felseidechse. – In: Böhme, W. (Hrsg.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 2/I Echsen II (Lacerta).
- Böhme, W. ve Budak A., 1977. Über die rudis-Gruppe des *Lacerta saxicola* Komplexes in der Türkei, I (Reptilia: Sauria: Lacertidae). Salamandra, 13, 3-4, 141-149.
- Böhme W., 2010. A list of the herpetological type specimens in the Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Bonn, Bonn Zoological Bulletin, 59, 79–108.
- Bruford, M. W. ve Burke, T., 1991. Hypervariable DNA markers and their applications in the chicken, In: DNA Fingerprinting: Approaches and Applications (T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys ve R. Wolff, Eds.), Basel, Birkhauser Verlag, 230–242.
- Buchanan, F. C., Adams, L. J. ve Little John, R. P., 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites, Genomics, 22, 2, 397-403.
- Budak, A. ve Böhme W., 1978. Über die rudis-Gruppe des *Lacerta saaeicola*-Komplexes in der Türkei, I (Reptilia: Sauria: Lacertidae), Ann. Naturhistor. Mus. Wien, 81, 273-281.
- Budak, A. ve Göçmen, B., 2008. Herpetoloji, 2. Baskı, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Burke, T. ve Bruford, M. W., 1987. DNA fingerprinting in birds, Nature, 327, 149- 152.
- Butler J. M., 2005. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, 2. Baskı, Elsevier Academic Press, New York.
- Camerano, 1878. Descrizione di una nuova specie del genere podarcis Wagl. Atti Academ., 13, 538-541.
- Canon, J., Checa, M. L., Carleos, C., Vega-Pla, J. L., Vallejo, M. ve Dunner, S., 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. Anim Genet, 31, 39-48.
- Chambers, E. W., Meece, J. K., McGowan, J. A., Lovin, D. D., Hemme, R. R., Chadee, D. D., McAbee, K., Brown, S. E., Knudson, D. L. ve Severson, D. W., 2007. Microsatellite Isolation and Linkage Group Identification in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*, Journal of Heredity, 98,3, 202–210.



- Chen, K. C., 2012. Microsatellite DNA: Population Genetics and Forensic Applications, Tested Studies for Laboratory Teaching Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education, 33, 8-30.
- Chiobanu, D. G., Grechko V. V. ve Darevsky I. S., 1973. Molecular Evolution of Satellite DNA CLsat in Lizards from the Genus Darevskia (Sauria: Lacertidae): Correlation with Species Diversity, *Russian Journal of Genetics*, 39, 11 (2003) 1292–1305.
- Clark, R. J. ve Clark, E. D., 1973. Report on a Collection of Amphibians and Reptiles from Turkey, Calif. Acad. Sci. San Francisco, 104, 1-62.
- Chiobanu, D. G., Grechko V. V. ve Darevsky I. S., 2003. Molecular Evolution of Satellite DNA CLsat in Lizards from the Genus Darevskia (Sauria: Lacertidae): Correlation with Species Diversity, *Russian Journal of Genetics*, 39,11, 1292–1305.
- Chiobanu, D., Roudykh, I. A., Ryabinina, N. L., Grechko, V. V., Kramerov, D. A. ve Darevsky, I. S., 2002. Reticulate Evolution of Parthenospecies of the Lacertidae Rock Lizards: Inheritance of CLsat Tandem Repeats and Anonymous RAPD Markers, *Molecular Biology*, 36,2, 223–231.
- Ciobanu, D., Grechko, V. V., Darevsky, I. S. ve Kramerov, D. A., 2004. New Satellite DNA in *Lacerta* s. str. Lizards (Sauria: Lacertidae): Evolutionary Pathways and Phylogenetic Impact, *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, 302B, 05–516.
- Condit, R., ve Hubbell, S. P., 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes, *Genome*, 34, 66-71.
- Darevsky I. S. ve Eiselt J., 1980. Neue Felseneidechsen (Reptilia: Lacertidae) aus dem Kaukasus und aus der Türkei, *Amphibia-Reptilia*, 1, 29-40.
- Darevsky, I. S., 1967. Rock lizards of the Caucasus. (Systematic, ecology and phylogeneis of the polymorphic groups of rock lizards of the subgenus *Archaeolacerta*), 276, Leningrad, Nauka Press.
- Darevsky, I. S., 1972. Zur Verbreitung einiger Felseidechsen des Subgenus *Archaeolacerta* in der Türkei, *Bonner zool. Beitr.*, 23,4, 347-351.
- Darevsky, I. S. ve Eiselt J., 1967. Ein neuer Name für *Lacerta saxicola mehelyi*, Lantz und Cyrén, 1936, *Annalen des Naturhistorischen Museum Wien*, 70, 107.
- Darevsky, I. S., Kupriyanova, L. A. ve Uzzel, T., 1985. Parthenogenesis in Reptiles, *Biology of the Reptilia*, 15, 413–526.
- Darevsky, I. S. ve Lukina, G. P., 1977. Rock lizards of the *Lacerta saxicola* Eversmann group (Sauria, Lacertidae) collected in Turkey by Richard and Erica Clark (in Russian), Proceedings of the Zoological Institute of the Academy of Sciences, U.S.S.R. 74, 60.

- Darevsky, I. S. ve Eiselt, J., 1980. Neue Felseneidechsen (Reptilia: Lacertidae) aus dem Kaukasus und aus der Türkei, Amphibia-Reptilia, 1, 29-40.
- Darevsky, I. S., 1972. Zur Verbreitung Einiger Felseidechsen des Subgenus *Archaeolacerta* in der Turkei, Heft, 4, 23.
- Degnan, P. H. ve Arévalo, E., 2004. Isolation of Microsatellite Loci in *Sceloporus grammicus* (Squamata, Phrynosomatidae), *American Journal of Undergraduate Research*, 2,4.
- Demirsoy, A., 2003. Yaşamın Temel Kuralları Omurgalılar/Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar, Memeliler), 3.Cilt, 5. Baskı, Meteksan A.Ş. Baskı Tesisleri, Ankara.
- Demirsoy, A., 2006. Türkiye Omurgalıları-Türkiye Omurgalı Faunasının Sistematik ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması ve Koruma Önlemlerinin Saptanması-Sürüngenler, 2. Baskı, Meteksan A.Ş. Baskı Tesisleri, Ankara.
- Desjardins, P. ve Morais, R., 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome, Journal of Molecular Biology, 212, 599-634.
- Eiselt, V. J. ve Darevsky, I.S., 1991. *Lacerta rudis checkenica* ssp. n. aus dem Kaukasus (Reptilia: Lacertidae), Ann. Naturhist. Mus. Wien, 92 B, 15-29.
- Eiselt, J., Darevsky, I.S. ve Schmidtler, J., 1992. Untersuchungen an Felseneidechsen (*Lacerta saxicola* komplex in der oetlichen Türkei, 1. *Lacerta valentini* Boettger, Ann. Naturhist. Mus. Wien, 93, 1-18.
- Eisen, J. A., 2000. Mechanistic basis for microsatellite instability (in:Microsatellites Evolution and Applications, 34–36. In: DB Goldstein, C Schlotterer (ed), Oxford University Press, Newyork.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution, Genetics, 5, 435-445.
- Eroğlu, O., 2008. Karadeniz'in Türkiye Kıyılarında Dağılım Gösteren Mersin Balığı Türlerinin (*Acipenser stellatus* PALLAS, 1771, *Acipenser gueldenstaedtii* BRANDT, 1833, *Huso huso* LINNAEUS, 1758) Mitokondrial DNA Sekans Analizi Yöntemiyle Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Estoup, A. ve Angers, B., 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations, Advances in Molecular Ecology, 55-86.
- Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J. M., Adriamanga, M. ve Guyomard, R., 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in Brown trout (*Salmo trutta*), Molecular Ecology, 7, 339-354.

- Eversmann, E., 1834. *Lacertae imperii Rossici variis in itineribus meis observatae*, Mém. Soc. nat. Moskau, 3,2, 337-369.
- Fatima, S., 2006. Study of genetic variability among Gohilwadi, Surti and Zalawadi Goats using microsatellite analysis. Master of Veterinary Science in Animal Genetics and Breeding, Yüksek Lisans Tezi, Department of Animal Genetics and Breeding, College of Veterinary Science & Animal Husbandry Anand Agriculture University, Anand.
- Feral, J. P., 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity, Journal of Exp. Mar. Biol. And Ecology, 268, 121-145.
- Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodöhl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. ve Hynes, R. A., 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*, Journal of Fish Biology, 47, 103-126.
- Freeland, J. R., 2005. *Molecular ecology*. John Wiley&Sons, Ltd., England.
- Fritzner, N. G., Hansen, M. M., Madsen, S. ve Kristiansen, K., 2001. Use of microsatellite markers for identification of indigenous brown trout. *Salmo trutta* L. in a geographical region heavily influenced by stocked domesticated trout, Journal of Fish Biology, 58, 1197–1210.
- Gao, A. B. ve Wu, D. J., 2005. Microsatellite marker for paternity testing of Liangshan semi-fine wool sheep, Hereditus (Beijing), 27,1, 85–90 .
- Georges, M., Mishra, A., Sargeant, L., Steele, M. ve Zhao, X., 1990. Progress towards a primary DNA marker map in cattle. 4th World Congress Genetics Applied Livestock Production 13, 107–112.
- Gilbert, D. A., Packer, C., Pusey, A. E., Stephans, J. C. ve O'Brien, S. J., 1991. Analytical DNA fingerprinting in lions: Parantage, genetic diversity and kinship, J. Heredity, 82, 378–386.
- Glowatzki-Mullis, M.L., Muntwyler, J., Baumle, E. ve Gaillard, C., 2008. Genetic diversity measures of Swiss goat breeds as decision-making support for conservation policy. Small Rumin Res, 74, 202–211.
- Grechko, V. V., Bannikova, A. A., Kosushkin, S. A., Ryabinina, N. L. Milto, K. D., Darevsky, I. S. ve Kramerov, D. A., 2007. Molecular Genetic Diversification of the Lizard Complex *Darevskia raddei* (Sauria: Lacertidae): Early Stages of Speciation, Molecular Biology, 41,5, 764–775.
- Grechko, V. V., Ciobanu, D. G., Darevsky, I. S., Kosushkin, S. A. ve Kramerov D. A., 2006. Molecular evolution of satellite DNA repeats and speciation of lizards of the genus *Darevskia* (Sauria: Lacertidae), Genome, 49, 1297–1307.

- Grechko, V. V., Fedorova, L. V., Ryabinin, D. M., Ryabinina N. L., Ciobanu D. L., Kosushkin, S. A. ve Darevsky, I. S., 2006. The Use of Nuclear DNA Molecular Markers for Studying Speciation and Systematics as Exemplified by the “*Lacerta agilis* complex” (Sauria: Lacertidae), Molecular Biology, 40,1, 51–62.
- Goldstein, D. B. ve Pollock, D. D., 1997. Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference, Journal of Heredity, 88:335-342, 0022-1503.
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L. ve Feldman, M. W., 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci, Genetics, 139, 463–471.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Le’ger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malaue, T., Revardel, E., Salin, F. ve Petit, R. J., 2011. Current trends in microsatellite genotyping, Molecular Ecology Resources, 11, 591–611.
- Gullberg, A., Tegelstrom, H. ve Olsson, M., 1997. Microsatellites in the Sand Lizard (*Lacerta agilis*): Description, Variation, Inheritance, and Applicability, Biochemical Genetic, 35, 7-8.
- Hanotte, O., Burke, T., Armour, J. A. L. ve Jeffreys, A. J., 1991. Cloning characterisation and evolution of Indian peafowl *Pavo christatus* minisatellite loci, In: DNA fingerprinting: Approaches and Applications (T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys ve R. Wolff, Eds.), Birkhauser Verlag, Boston, 193–216.
- Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Nielsen, E. E. ve Mensberg, K. L. D., 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery trout and wild brown trout (*Salmo trutta* L.), Molecular Ecology, 9, 583-594.
- Harris, D. J. ve Carretero, M. A., 2003. Comments on the taxonomic value of (sub)genera within the family Lacertidae (Reptilia), Amphibia-Reptilia, 24, 119-122.
- Hauser, L., Carvalho, G., Hughes, R. ve Carter, R., 1992. Clonal structure of the introduced freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* as revealed by DNA fingerprintings, Proceed. of the Roy. Soc., 249B, 19–25.
- Henderson, S. T. ve Petes, T. D., 1992. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 12, 2749-2757.
- Hoehn, M. ve Sarre, S. D., 2006. Microsatellite DNA markers for Australian geckos, Conservation Genetics, 7, 795–798.
- Iamartino, D., Bruzzone, A., Lanza, A., Blasi, M. ve Pilla, F., 2005. Genetic diversity of Southern Italian goat populations assessed by microsatellite markers, Small Rumin Res, 57, 249-255.

- Ilgaz, Ç., 2004. Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki (Trabzon, Rize, Artvin ve Ardahan) Kaya Kertenkelelerinin Sistematik Durumu, Yayılışı ve Ekolojisi Üzerine Araştırmalar (Sauria: Lacertidae), Doktora Tezi, E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. ve Thein, S. L., 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, Nature, 316, 76-9.
- Jeffreys, A. J., 1990. Neumann, R. ve Wilson, V., Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis, Cell, 60, 473-485.
- Karhu, A., 2001. Evolution and applications of pine microsatellites, Academic Dissertation, Faculty of Science, University of Oulu, Finland.
- Khidr, S. K., Hardy, C. W., Zaviez, T. ve Mayes, S., 2013. Development of microsatellite markers and detection of genetic variation between *Goniozus* wasp populations, Journal of Insect Science, 14.
- Korchagin, V. I., Badaeva, T. N., Tokarskaya, O. N., Martirosyan, I. A., Darevsky, I. S. ve Ryskov, A. P., 2007. Molecular characterization of allelic variants of (GATA)<sub>n</sub> microsatellite loci in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis* (Lacertidae), Gene, 392, 126-133.
- Korchagin, V. I., Vergun, A. A., Godakova, S. A. ve Tokarskaya, O. N., 2013. Intra and Interspecific Polymorphism of (AAT)<sub>n</sub> in Microsatellite Locus Du47D in Parthenogenetic Species of the Genus *Darevskia*, Russian Journal of Genetics, 49, 3, 367-370.
- Korchagin, V. I. ve Tokarskaya, O. N., 2010. Molecular Structure of the Allelic Variants of (AAT)<sub>n</sub> Microsatellite Locus Du47D in the Parthenogenetic Species *Darevskia unisexualis* and Bisexual Parental Species *D. valentini* and *D. raddei*, Russian Journal of Genetics, 46, 5, 630-632.
- Kosushkin, S. A. ve Grechko, V. V., 2013. Molecular Genetic Relationships and Some Issues of Systematics of Rock Lizards of the Genus *Darevskia* (Squamata: Lacertidae) Based on Locus Analysis of SINE\_Type Repeats (Squam1), Russian Journal of Genetics, 49,8, 857-869.
- Kuru, M., 1999. Omurgalı Hayvanlar, 5.Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kumar, S., Dixit, S. P., Verma, N. K., Singh, D. K., Pande, A., Kumar, S., Chander, R. ve Singh, L. B., 2009. Genetic Diversity Analysis of the Gohilwari Breed of Indian Goat (*Capra hircus*) Using Microsatellite Markers. American J. Animal & Vet. Sci., 4,3, 49-57.
- Kürker, M., 2013. Türkiye'deki Bal Arısı Popülasyonlarının Mikrosatellit Belirteçler ile Genetik Çeşitliliği: Arıcılıkta Sabit ve Göçmen Kovanlardaki Arılar ile Açık Bölgeler ve İzole Bölgelerdeki Arılarının Karşılaştırılması Yüksek Lisans Tezi, O.D.T.Ü., Fen Bilimler Enstitüsü, Ankara.

- Lame P. ve Lagoda, P. J. L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back, Elsevier Science, 10049-5.
- Lantz, L. A. ve Cyrén O., 1936. Contribution à la connaissance de *Lacerta saxicola* Eversmann, Bulletin de la Societé Zoologique de France, Paris, 61, 159-181.
- Lewontin, R., 1964. The interaction of Selection and Linkage, II. Optimum Models, Genetics, 50, 757-782.
- Li, M-H., Zhao, S-H., Bian, C., Wang, H-S., Wei, H., Liu, B., Yu, M., Fan, B., Chen, S-L., Zhu, M-J., Li, S-J., Xiong, T-A. ve Li, K., 2002. Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis, Genet Sel Evol, 34, 729–744.
- Li, Q., Liu, S. ve Kong, L., 2009. Microsatellites within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their transferability in five other *Crassostrea* species, Electronic Journal of Biotechnology, 12,3.
- Ligda, C., Altarayrahb, J. ve Georgoudisb, A., 2009. the Econogene Consortium Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities, Small Rumin Res, 83 42–48.
- Liu, Z. J. ve Cordes, J. F., 2004. DNA Marker Technologies and Their Applications in Aquaculture Genetics, Aquaculture, 238, 1–37.
- Loftus, R. T., Ertugrul, O., Barbar, A. H., El-Barody, M. A. A., Machugh, D. E., Park, S. D. E. ve Bradley, D. G., 1999. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East., Mol Ecol, 8, 2015–2022.
- Luikart, G., Biju-Duval, M-P., Ertugrul, O., Zagdsuren, Y., Maudet, C. ve Taberlet, P., 1999. Power of Microsatellite Markers in Fluorescent Multiplexes for Parentage Analysis in Goats (*Capra hircus*), Anim Genet, 30, 431-438.
- Lydeard, C. ve Roe, K. J., 1997. The Phylogenetic utility of the Mitochondrial Cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. In 'Molecular systematics of fishes' (T.D. Kocher and C.A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego.
- Lynch, M., 1991. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting, In: DNA fingerprinting: Approaches and Applications (T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys ve R. Wolff, Eds.), Birkhauser Verlag, Basel, 113–126.
- MacCulloch, R. D., Fu, J., Darevsky, I. S. ve Murphy R. W., 2000. Genetic evidence for species status of some Caucasian rock lizards in the *Darevskia saxicola* group, Amphibia-Reptilia, 21, 169-176.

- MacCulloch, R. D., Darevsky I. S., Murphy, W. ve Fu, J., 1997. Allozyme Variation and Population substructuring in the Caucasian Ground Lizard, Russian Journal of Herpetology, 4,2, 115 – 119.
- Malysheva, D. N., Vergun, A. A., Tokarskaya, O. N., Sevast'yanova, G. A., Darevsky, I. S. ve Ryskov, A. P., 2006. Nucleotide Sequences of the Microsatellite Locus Du215(arm) Allelic Variants in the Parthenospecies *Darevskia armeniaca* (Lacertidae), Russian Journal of Genetics, 43,2, 116–120.
- Margoulas, A. ve Zouros, E., 1993. Restriction site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA, Molecular Biology and Evolution, 10, 319-325.
- Mateus, J. C., Penedo, M. C., Alves, V. C., Ramos, M. ve Rangel-Figueiredo, T., 2004. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites, Anim Genet, 35, 106-113.
- May, C. A., Wetton, J. H., Davis, P. E., Brookfield, J. F. Y. ve Parkin, D. T., 1993. Single locus profiling reveals loss of variation in inbred populations of the red kite (*Milvus milvus*), Proceed. of the Roy. Soc., 251B, 165–170.
- Méhely, L.V., 1909. Materialien zu einer Systematik und Phylogenie der muralis-ähnlichen Lacerten. – Annales Historico-Naturales Musei Nationales Hungarici, Budapest, 3, 409-621.
- Mertens, R., 1952. Amphibien und Reptilien aus der Türkei, Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Ser. B. 17, 41-75.
- Molnar, R. I., Witte, H., Dinkelacker, I., Villate, L. ve Sommer, R. J., 2012. Tandem-Repeat Patterns and Mutation Rates in Microsatellites of the Nematode Model Organism *Pristionchus pacificus*, Genes, 2.
- Mullis, K. B. ve Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction, Methods Enzymol., 155, 335-350.
- Murphy, R. W., Darevsky, I. S., MacCulloch, R. D., Fu, J. ve Kupriyanova, L. A., 1996. Evolution of the Bisexual Species of Caucasian Rock Lizards: A Phylogenetic Evaluation of Allozyme Data, Russian Journal of Herpetology, 3,1, 18 - 31.
- Murphy R. W., Fu, J. , Macculloch R. D., Darevsky, I. S. ve Kupriyanova L. A., 2000. A fine line between sex and unisexuality: the phylogenetic constraints on parthenogenesis in lacertid lizards, Zoological Journal of the Linnean Society, 130, 527–549.
- Nei, M., 1991. Relative Efficiencies of Differnet Tree-making Methods for Molecular Data. In Miyamoto, M.M and Cracraff, J.(eds), Phylogenetic Analysis of DNA Squences, 90-128, Oxford University Press, New York.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetic, Columbia University Press, New York.

- Nikolskii, A. M., 1916. Fauna of Russia: Reptiles. Petrograd (Israel Programme of Translations, Jerusalem), 2, 349.
- O'Brien, S. J., ve Graves, J. A. M., 1991. Report of the committee on comparative gene mapping. *Cytogenet., Cell. Genet.*, 58, 1124-1151.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. ve Vieira, M. L. C., 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites, *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 294-307.
- O'Reilly, P. ve Wright, J.M., 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture, *Journal of Fish Biology*, 47, 29-55.
- Özeti, N. ve Yılmaz, İ., 1994. Türkiye Amfibileri, 2.Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Padar, Z., Angyal, M., Egyed, B., Furedi, S., Woller, J., Zoldag, L. ve Fekete, S., 2001. Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Gardens, *Int J Legal Med*, 115, 79-81.
- Passarge E., 1995. Color Atlas of Genetics, 2. Baskı, Thieme Press, New York.
- Petrosyan, V. G., Tokarskaya, O. N., Malysheva, D. N. ve Ryskov, A. P., 2003. Quantitative Assessment of Gene Diversity and Between-Population Differentiation of Parthenogenetic Lizard of the Genus *Darevskia* Using Miniand Microsatellite DNA Markers, *Russian Journal of Genetics*, 39,10, 1201-1207.
- Pont-Kingdon, G. A., Okada, N. A., Macforlane, J. L., Beagley, C. T., Wolstenholme, D. R., Cavalier-Smith, T. ve Clark-Walker, G. D., 1995. A coral mitochondrial MutS gene, *Nature*, 375, 109-111.
- Primrose S. B., 1998. Principles of Genome Analysis. A Guide to Mapping and Sequencing DNA from Different Organisms, Blackwell, Oxford.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E. ve Hughes, C. R., 1993. Microsatellites and kinship, *Trends Ecol. Evol.*, 8,8, 285-288 .
- Queney, G., Fewand, N., Weiss, S., Mougel, F. ve Monnerot M., 2001. Stationary Distributions of Microsatellite Loci Between Divergent Population Groups of the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), *Society for Molecular Biology and Evolution*, 18,12, 2169-2178.
- Ramamoorthi, J., Thilagam, K., Sivaselvam, S.N. ve Karthickeyan, S.M.K., 2009. Genetic characterization of Barbari goats using microsatellite markers, *J. Vet Sci*, 10,1, 73-76.
- Ryabinina, N. L., Bannikova, A. A., Kosushkin, S. A., Ciobanu, D. G., Milto, K. D., Tuniyev, B. S., Orlova, V. F., Grechko, V. V ve Darevsky I. S., 2002. Estimation of the Subspecific Level of Differentiation in Caucasian Lizards of the Genus *Darevskia* (SYN. "*Lacerta saxicola* complex," Lacertidae, Sauria) Using Genome DNA Markers, *Russian Journal of Herpetology*, 9,3, 185 - 194.



- Schlotterer, C. ve Harr, B., 2001. Microsatellite Instability, *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Sindaco, R., Venchi, A. , Carpaneto, G. M. ve Bologna, M., 2000. The reptiles of Anatolia: A checklist and zoogeographical analysis, *Biogeographia*, 21, 441- 554.
- Szczerbac, N. N., 2003. Guide to the Reptiles of the Eastern Palearctic, First Edition, Krieger Publising Company, Florida.
- Selkoe, K. A. ve Toonen, R. J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers, *Ecology Letters*, 9, 615–629.
- Semizoğlu, İ., 2013. Adli DNA Analizleri, 1. Basım, Adalet Yayınevi, Ankara.
- Sollero, B. P., Paiva, S. R., Faria, D. A., Guimaraes, S. E. F., Castro, S. T. R., Egito, A.A., Albuquerque, M.S.M., Piovezan, U., Bertani, G.R. ve Mariante, A., 2009. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers, *Livestock Science*, 123, 8–15.
- Somasundaram, S., ve Kalaiselvam, M., Molecular Tools for Assessing Genetic Diversity. UN University Course. Erişim: [http://ocw.unu.edu/international-network-on-waterenvironment-and-health/unu-inweh-course-mangroves/Molecular-Tools\\_for\\_Assessing\\_Genetic\\_Diversity.pdf](http://ocw.unu.edu/international-network-on-waterenvironment-and-health/unu-inweh-course-mangroves/Molecular-Tools_for_Assessing_Genetic_Diversity.pdf). 13.05.2010.
- Tayhan, Y., 2008. “*Darevskia rudis bithynica* (Mehely, 1909) ile *Darevskia rudis tristis* (Lantz et Cyren, 1936) (Reptilia: Sauria: Lacertidae) Alttürlerinin Taksonomik Durumlarının İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Terentijev, P. V. ve Chernov. S. A., 1949. Key to the amphibians and reptiles, Isreal Programme of Translations, Jerusalem, 3. Baskı, 1-315.
- Toro, M. A., Fernandez, J. ve Caballero, A., 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation, *Livestock Science*, 120, 174–195.
- Tuniyev, B. S., 1990. On the Independence of the Colchis Center of Amphibian and Reptile Speciation, *Asiatic Herpetological Research*, 3, 67-84.
- URL-1, <http://www.lacerta.de/AS/Taxon.php?Genus=33&Species=136>, 12.04.2015.
- URL-2, <http://www.lacerta.de/AS/Taxon.php?Genus=33&Species=339>, 12.04.2015.
- Vaiman, D., Schibler, L., Bourgeois, F., Oustry, F., Amigues, Y. ve Crihiu, E. P., 1996. A genetic linkage map of the male goat genome, *Genetics*, 144, 279-305.
- Werner, F., 1902. Die Reptilien und Amphibienfauna von Kleinasien, SB. Akad. Wiss. Wien, *Math. Nat. KL.*, 111, 1, 1057-1121.

- Williams, J. G. K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Refalski, J.A. ve Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D. ve Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics, Biological Journal of the Linnean Society, 26, 375-400.
- Wright, J. M., DNA fingerprinting in fishes. In Hochachka, P.W. ve Mommsen, T., 1993. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Elsevier, 2, 58-91.
- Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S. ve Jeffries, A. J., 1987. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA, Annual Human Genetic, 51, 269-288.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul'un Kartal ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Öğretmen İbrahim Öztürk İlköğretim Okulu'nda, liseyi Pendik Süper Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimini 2013 yılının Haziran ayında bitirdi. Aynı yılın Eylül ayında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimine halen devam etmektedir. Yabancı dili İngilizce'dir.