

770968

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİĞİLLİ KURBAĞA (*Bufo bufo*)'NİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER AÇIDAN  
İNCELENMESİ

Nurhayat ÖZDEMİR (YILMAZ)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"Doktor"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22.07.2005  
Tezin Savunma Tarihi : 19.08.2005

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Bilal KUTRUP

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Kurtuluş OLGUN

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2005

## ÖNSÖZ

“Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*)’nın Morfolojik ve Moleküler Açıdan İncelenmesi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konunun seçiminde gerekse çalışmaların planlanıp yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bilal KUTRUP’a, tezin geliştirilip, planlanmasında yardımcı olan tez izleme jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Sayın Prof. Dr. Mahmut EROĞLU’na, materyallerin toplanmasında yardımcı olan Stefano DOGLIO’ya, laboratuvarındaki materyallerin ölçümlerine izin veren Prof. Dr. Cristina GIACOMA’ya, filogenetik analizlerin yapımında yardımcı olan Dr. David James HARRIS’e ve tez süresince bana her konuda destek olan aileme ve eşime minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmalarımın yürütülmesi esnasında desteklerini esirgemeyen K.T.Ü. Rize Fen-Edebiyat Fakültesi dekanı Sayın Prof. Dr. Nazmi Turan OKUMUŞOĞLU’na, Biyoloji Bölümü çalışanlarına, başta Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI ve Arş. Gör. Kadriye İNAN olmak üzere tüm Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Ayrıca, tez çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan (2002.111.004.5) Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu’na teşekkür ediyorum.

Nurhayat ÖZDEMİR (YILMAZ)

TRABZON 2005

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET .....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ .....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Amfibilerin Genel Özellikleri .....	4
1.2.1. Amfibilerin Evolusyonu .....	5
1.3. Neden mitokondriyal DNA (mtDNA)?.....	6
1.3.1. Mitokondriyal DNA'nın Yapısı ve Evrimi .....	7
1.4. Moleküler Evolusyon .....	8
1.4.1. Dizi Değişiminin Miktar ve Hızı.....	9
1.4.2. Moleküler Evolusyonun Nötral Teorisi.....	9
1.5. Türleşme Mekanizmaları.....	10
1.5.1 Tür Kavramları .....	11
1.5.1.1. Biyolojik Tür Kavramı .....	11
1.5.1.2. Filogenetik Tür Kavramı .....	12
1.5.1.3. Morfolojik Tür Kavramı.....	13
1.5.1.4. Alttür Kavramı (Subspecies, ssp., subsp.).....	13
1.6. İzolasyon Mekanizmaları .....	15
1.6.1. Fiziksel İzolasyon.....	15
1.6.2. Vikaryans Yoluyla Coğrafik İzolasyon .....	15
1.6.3. Kromozomlarda Değişiklikler.....	15
1.7. Varyasyon ve Varyasyonun Nedenleri.....	16
1.7.1. Genetik Varyasyon .....	16
1.7.1.1. Kendileştirme Baskısı.....	16
1.7.1.2. Protein Polimorfizmi .....	17
1.7.1.3. Kromozomal Polimorfizm.....	17

1.7.1.4.	DNA Baz Dizisi Polimorfizmi .....	18
1.7.2.	Fenotipik Varyasyon .....	18
1.8.	DNA Dizin Analizi Sonucunda Evrimsel Ağaçların Oluşturulması .....	20
1.8.1.	Modeltest 3.6 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması .....	21
1.8.1.1.	Modeltest 3.6'daki Baz Değişim Modelleri .....	22
1.8.2.	TCS Analizi.....	22
1.8.3.	Bayesian Analizi.....	23
1.9.	Filogenetik Analizler.....	23
1.9.1.	Maksimum Parsimoni.....	23
1.9.2.	Maksimum Olasılık ve Genetik Uzaklık .....	25
1.9.3.	Ağaçların Değerlendirilmesi .....	26
1.9.3.1.	Seç-bağla Testi (Bootstrapping).....	26
2.	<b>YAPILAN ÇALIŞMALAR</b> .....	28
2.1.	Materyaller .....	28
2.1.1.	Morfolojik Karakterler .....	28
2.1.2.	Ekolojik-Biyolojik Özellikler.....	33
2.1.3.	Coğrafi Dağılışı .....	34
2.2.	Yöntem .....	36
2.2.1.	Örneklerin Toplandığı Alan .....	36
2.2.2.	Örneklerin Toplanması ve Morfolojik Ölçümler .....	36
2.2.3.	Nümerik Analizler .....	39
2.2.4.	Moleküler Analizler .....	40
2.2.4.1.	Kurbağa Parmaklarından Genomik DNA'ların İzolasyonu .....	40
2.2.4.2.	Mitokondriyal 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması ve DNA Dizin Analizi .....	40
2.3.	DNA Dizin Analizi Sonucunda Evrimsel Ağaçların Oluşturulması .....	40
2.3.1.	Modeltest 3.6 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması .....	41
2.3.2.	TCS (The Method of Templeton, Crandall and Sing) Analizi .....	41
2.3.3.	Maksimum Parsimoni.....	41
2.3.4.	Maksimum Olasılık ve Genetik Uzaklık .....	41
2.3.5.	Bayesian Analizi.....	42
2.3.6.	TreeView Programı .....	42
3.	<b>BULGULAR</b> .....	43

3.1.	Nümerik Analizler.....	43
3.1.2.	Varyans Analizi (ANOVA).....	43
3.1.3.	Faktör Analizi.....	43
3.1.4.	Ayırma (Diskriminant) Analizi .....	50
3.2.	Moleküler Analizler .....	50
3.2.1.	DNA Dizin Analizi.....	50
3.2.2.	DNA Dizilerinin Clustal X ve Clustal W Programları Kullanılarak Karşılaştırılması.....	65
3.2.3.	TCS Analizi.....	65
3.2.4.	Modeltest 3.6 Programı ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması .....	65
3.2.5.	Maksimum Parsimoni (Maksimum Tutumluluk) Analizi .....	68
3.2.6.	Maksimum Olasılık ve Genetik Uzaklık Analizleri .....	68
3.3.	Bayesian Analizi.....	69
4.	TARTIŞMA.....	74
5.	SONUÇLAR .....	83
6.	ÖNERİLER .....	85
7.	KAYNAKLAR.....	86
	ÖZGEÇMİŞ.....	94

## ÖZET

Siğilli kurbağa (*Bufo bufo*), Avrupa'nın büyük bir kısmını, kuzey Afrika'yı ve batı Asya'yı kapsayan geniş yayılış alanına sahip bir türdür. Bugüne kadar Türkiye'den 3 alttürü bildirilmesine rağmen (*B. b. bufo*, *B. b. spinosus*, *B. b. verrucosissimus*), yapılan çalışmaların çoğu morfolojik verilere dayandığı için, bu alttür durumları hakkında kesin bir hüküm vermek mümkün olmamıştır.

Bu çalışmada, Türkiye, Yunanistan ve İtalya'nın bazı bölgelerinden elde edilen 95 *Bufo bufo* bireyinin 20 farklı vücut karakteri ölçülmüş ve bazı istatistiksel analizler (Varyans, Faktör ve Ayırma analizleri) uygulanarak morfolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Sonuçta, burun deliği-burun ucu mesafesi (BD-BUA) karakteri hariç, incelenen yedi bölgedeki bireyler arasında bir farklılık olmadığı, fakat faktör analizi sonucu İtalya örneklerinin özellikle daha sivri burunlu olmaları nedeniyle, kısmi bir ayırım gösterdiği bulunmuştur.

Elde edilen *Bufo bufo* örneklerinin 29 tanesi ise mitokondriyal DNA'larının 16S rRNA geninin 936 bazlık kısmına dizin analizi yapılmış ve bazı filogenetik analizler (Maksimum Tutumluluk, Maksimum Olasılık ve Bayesian Analizi) uygulanarak incelenmiştir. Analizler sonucunda toplam 23 haplotip bulunmuş ve bu haplotipler arasında ise maksimum 17 baz (% 0,11 - % 1,85) farklılık olduğu görülmüştür. Fakat bu farklılığın bir alttür oluşturacak kadar önemli olmadığı ve bunun tür içi varyasyon olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca haplotipler arasındaki yüzde farklılıklardan yararlanıldığında, incelenen *Bufo bufo* bireylerinde yaklaşık 1 milyon yıl önceye ait Pleyistosen devri farklılaşması bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Bufo bufo*, Siğilli Kurbağa, 16S rRNA, Pleyistosen

## SUMMARY

### **Morphological and Molecular Investigation of the Common Toad (*Bufo bufo*)**

The common toad, *Bufo bufo*, is a wide-ranging species, with a distribution encompassing much of Europe, parts of northern Africa and western Asia. Although 3 subspecies (*B. b. bufo*, *B. b. spinosus*, *B. b. verrucosissimus*) were mentioned from Turkey until now, the validity of these subspecies were not clear, because the most of the studies were limited to morphology.

In this study, 20 morphological characters of 95 *Bufo bufo* specimens were measured and some statistical analyses (ANOVA, Factor and Discriminant Analyses) were performed for morphological results. As a result, although no difference was observed except the 'distance between nostril and the tip of snout' (NOSTIP) character among the individuals studied in 7 sites, partly discrimination was found in Italy specimens especially in terms of having long snout.

Twenty nine specimens of *Bufo bufo* were examined by sequencing a portion of 936 bp of the mitochondrial 16S rRNA gene and performing some phylogenetic analyses (Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Analysis). 23 haplotypes were revealed and these haplotypes show differences of up to 17 base substitutions (% 0.11 - % 1.85). But it was concluded that this difference is not significant for a concept of subspecies and regard as an intraspecific variation. Also, the divergence time estimated among the haplotypes of *Bufo bufo* specimens suggested a Pleistocene differentiation approximately 1 million years ago.

**Key Words:** *Bufo bufo*, Common Toad, 16S rRNA, Pleistocene

## ŞEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Omurgalı hayvan mitokondriyal DNA'sı.....	7
Şekil 2. 24 baz değişim modelinin karşılaştırılması .....	24
Şekil 3. Rize (Çamlıhemşin)'den yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo</i> bireyi (dorsal).....	29
Şekil 4. Rize (Çamlıhemşin)'den yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo</i> bireyi (ventral) .....	29
Şekil 5. Artvin (Borçka)'den yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo</i> bireyi (dorsal) .....	30
Şekil 6. Trabzon (Maçka)'dan yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo</i> bireyi (dorsal) .....	30
Şekil 7. Trabzon (Akçaabat)'dan yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo</i> bireyi (dorsal) .....	31
Şekil 8. Giresun'dan yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo spinosus</i> bireyi (dorsal).....	31
Şekil 9. Adapazarı'ndan yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo</i> bireyi (dorsal).....	32
Şekil 10. İtalya (Sicilya)'dan yakalanan dişi bir <i>Bufo bufo spinosus</i> bireyi (dorsal) .....	32
Şekil 11. <i>Bufo bufo</i> 'nun eski Sovyetler Birliği'deki yayılış alanı .....	35
Şekil 12. <i>Bufo bufo</i> 'nun Avrupa'daki yayılış alanı .....	35
Şekil 13. Analiz edilen 29 <i>Bufo bufo</i> bireyinin elde edildiği lokaliteler .....	36
Şekil 14. Castellano ve Giacoma (1998)'nin kullandığı temel karakterler esas alınarak ölçülen 20 morfolojik karakter .....	38
Şekil 15. Faktör analizi sonucu oluşan her bölgeye ait bireylerin birinci ve ikinci bileşen üzerindeki izdüşümleri .....	49
Şekil 16. TCS analizi sonucu oluşan ağ.....	66
Şekil 17. En parsimonik 11 ağacın strict konsensus filogramı.....	70
Şekil 18. HKY85 modeli uygulanarak Maksimum Olasılık (ML) analizi sonucu oluşan filogram.....	71
Şekil 19. Bayesian analizi sonucu oluşan % 50 majority rule konsensus ağacı ve Bayesian posterior olasılık değerleri .....	72
Şekil 20. Anadolu ile Avrupa arasında meydana gelen bağlantılar.....	81



## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Analiz edilen <i>Bufo bufo</i> bireyelerine ait bilgiler .....	37
Tablo 2. <i>Bufo bufo</i> bireyelerinin 20 farklı vücut ölçüsünün ortalama ve standart sapma (s.d.) değerleri (mm) .....	44
Tablo 3. Dişi <i>Bufo bufo</i> bireyelerinin 20 farklı vücut ölçüsünün bölgelere göre ortalama (ort.) ve standart sapma (s.d.) değerleri (mm) .....	45
Tablo 4. Faktör analizinde oluşturulan korelasyon matrisi.....	47
Tablo 5. Faktör analizi başlangıç çözüm istatistik sonuçları .....	48
Tablo 6. Faktör analizi rotasyon çözümü.....	49
Tablo 7. Dişi <i>Bufo bufo</i> bireyelerine ait standardize edilmiş ayırma fonksiyon katsayıları .....	50
Tablo 8. <i>Bufo bufo</i> bireyelerinin elde edildiği lokasyonlar ve mitokondriyal haplotiplerin listesi .....	51
Tablo 9. Dizin analizi yapılan mtDNA'nın 16S rRNA geninin 936 bazlık nükleotid sırası.....	52
Tablo 10. Modeltest 3.6 programının analiz sonuçları.....	67
Tablo 11. Bu çalışmada incelenen haplotiplerin DNA dizilerinin ikili karşılaştırılması ...	73

## SEMBOLLER DİZİNİ

AAU	: Arka ayak uzunluğu
ANOVA	: Varyans Analizi Tablosu
BDA	: Burun delikleri arası mesafe
BD-BUA	: Burun deliği-burun ucu mesafesi
BD-G	: Burun delikleri-göz arası mesafe
BG	: Baş genişliği
BU	: Baş uzunluğu
Cyt b	: Sitokrom b
D-B	: Dirsek-bilek arası mesafe
D-D	: Dirsekler arası mesafe
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FU	: Femur uzunluğu
GÇ	: Gözün çapı
GÖZ-TYM	: Göz-tympanium arası mesafe
hRLT	: Hierarchical Likelihood Ratio Tests
DMTU	: Dış metatarsal tüberkül uzunluğu
DMT-2.P	: Dış metatarsal tüberkül-2.perde arası mesafe
µl	: mikrolitre
mtDNA	: Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
MYÖ	: Milyon yıl önce
ÖNAY	: Ön ayak uzunluğu
PCA	: Temel Bileşenler Analizi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PU	: Parotoid uzunluğu
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
TAU	: Tarsus uzunluğu
TÇ	: Tympanium çapı
TU	: Tibia uzunluğu
VU	: Vücut uzunluğu
1.PARU	: 1. parmak uzunluğu

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Canlıların fenotipik benzerliklerine bakılarak yapılan sınıflandırma halen kullanılmasına rağmen, bu özellikler birbirlerine çok benzeyen organizmaların ayrılmasında ve canlıların filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında başarılı değildir. Ortaya çıkan bu tip problemlerin çözümlenmesinde, nükleik asitlerle yapılan çalışmaların kullanılmaya başlanması ile taksonomik çalışmalar daha kesin ve doğru olarak yapılabilmektedir. Sınıflandırma çalışmalarında genomik ilişkilerin kullanılması birçok faydalar sağlar. Örneğin; yapılan tür tayinleri daha kesindir, sık sık veya kökten meydana gelen değişikliklere konu olmaz. Ayrıca eldeki verilere bakılarak canlıda meydana gelen değişiklikler ve akrabalar arasındaki ilişkilerin nasıl olduğu bu yolla daha iyi ortaya çıkarılır.

Moleküler biyolojideki hızlı ilerlemeler ve DNA teknolojisinin moleküler biyolojide kullanıma girmesi ile birlikte güçlü teknikler geliştirilmiş ve bunlardan DNA ile protein, canlı nesillerini ve akrabalıklarını belirlemede kullanılmaya başlanmıştır. Bu moleküler belirleyiciler morfolojik analizlere alternatif bir yöntem olmayıp tamamlayıcı faktörlerdir. Morfolojinin cevap veremediği birçok soruya cevap verebilmektedirler (Başbüyük, vd., 2000).

Omurgalı hayvanların bir sınıfını teşkil eden amfibilerin Anura (kuyruksuz kurbağalar) takımına ait türlerin taksonomisi hakkında ülkemizde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar daha çok morfolojik, biyoakustik ve karyotipik analizlere dayanmaktadır (Yılmaz, 1984; Yılmaz ve Kumlutaş, 1995; Baran vd., 1997; Tok, 1999; Tosunoğlu ve Taşkavak, 2001). Kurbağa sistematigi alanında yapılan yeni çalışmaların çoğu da moleküler tekniklerle gelişmiş ve daha güvenli hale gelmiştir (Hertwig vd, 2004). Moleküler tekniklerin uygulanması amfibi filogenetiği çalışmalarını oldukça teşvik etmiştir (Hedges ve Maxson, 1993; Graybeal, 1997; Feller ve Hedges, 1998; Garcia-Paris ve Jockusch, 1999; Clough ve Summers, 2000; Zardoya ve Meyer, 2001).

Başta amfibi ve sürüngenler olmak üzere çeşitli canlı gruplarının mitokondriyal DNA'larının analizine dayanılarak yapılan birçok filogenetik ve moleküler sistematik çalışma bulunmaktadır. Bunlar arasında yılanlar (Heise vd., 1995), Xantusiid kertenkeleleri

(Hedges vd., 1993), amfibi familyaları (Hay vd., 1995; Sumida vd, 1999, 2000), kuşlar (Hedges 1994a, b) ve Hindistan Bufonidae türleri (Pramuk vd., 2001) bulunmaktadır.

Türkiye herpetofaunası hakkında değerli ilk eser olarak kabul edilen Bodenheimer (1944)'in çalışmasında *Bufo bufo* hakkındaki kayıtlar oldukça azdır. İzmir, Manisa, Rize, İstanbul, Keşiş Dağı ve Arifiye'ye ait eski kayıtların bahsedildiği bu çalışmaya göre türün dağılış sahası olarak bütün Avrupa (Kuzey kısımları hariç) ve Kuzeybatı Anadolu gösterilmektedir. Mertens ve Wermuth (1960)'a göre bu tür, Kuzeybatı Afrika üzerinden bütün Avrupa ve Doğu Asya'ya kadar olmak üzere geniş bir yayılış göstermektedir. Bu yayılış sahası içinde nominat alttürün (*Bufo b. bufo*) işgal ettiği saha, Akdeniz kıyısı dışındaki bütün Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgelerini içine almaktadır (Yılmaz ve Kumlutaş, 1995).

Türün diğer üç alttüründen *Bufo b. gredocicola* Orta İspanya'da yayılış gösterdiği halde *Bufo b. spinosus* Korsika, Sardunya ve Balear adaları dışında bütün Akdeniz bölgesi, Kuzey-batı Afrika ve Anadolu'da yayılmaktadır. *Bufo b. verrucosissimus* alttürünün ise Kafkasya bölgesini işgal ettiği belirtilmektedir (Yılmaz ve Kumlutaş, 1995).

Bununla beraber söz konusu türün Türkiye'deki dağılış sahaları ve buralardaki alttür durumları hakkında bugüne kadar kesin bir şey söylemek pek mümkün olmamıştır. Bugüne kadar türün Türkiye'den üç alttürü bildirilmiştir. Bodenheimer (1944), Türkiye hakkındaki kayıtlardan söz ederken buralardan elde edilen örneklerin hepsini (Kuzeybatı Anadolu, Ege Bölgesi ve Karadeniz'den) nominat alttürden (*Bufo bufo bufo*) saymıştır. Eiselt (1965), Trabzon'dan elde edilen bir örneği Kafkaslarda dağılış gösteren *B. b. verrucosissimus* olarak kabul etmiştir. Fakat son yıllara kadar alttür olarak bilinen *B. b. verrucosissimus*, Orlova ve Tuniyev (1989) tarafından ayrı bir tür olarak kabul edilmiştir (Tarkhnishvili, 1996). Başoğlu ve Özeti (1973)'ye göre Rize'den elde edilmiş Frankfurt Zooloji Müzesi'nde bir örnek ise Kuzeybatı Afrika ve Akdeniz bölgesinde yayıldığı kabul edilen *B. b. spinosus* olarak tayin edilmiştir. Clark ve Clark (1973), Hopa ve Balıkesir yakınlarındaki Mustafakemalpaşa'dan bulduğu iki örneği *B. b. spinosus* olarak kaydetmiştir. Yılmaz (1984), Trakya'dan elde ettiği örnekleri; Tok (1999), Reşadiye (Datça) Yarımadası'ndan elde edilenleri; Baran ve arkadaşları (1997) ise yaptıkları çalışmada Çamlıhemşin (Rize) den elde ettikleri örneklerin *B. b. spinosus* alttürüne dahil edilmesini uygun bulmuşlardır. Fakat bu çalışmaların hepsi morfolojik özelliklere dayanmaktadır ve Tok (1999)'un da belirttiği gibi durumun açıklığı kavuşturulması için

daha bol materyal üzerinde yapılacak morfolojik çalışmalar yanında değişik taksonomik yöntemlerden de yararlanmak gerekmektedir.

Yılmaz ve Kumlutaş (1995) Türkiye’de yaşayan *Bufo bufo*’nun taksonomik durumu hakkında yapmış oldukları incelemede Karadeniz, Trakya, Ege ve Akdeniz bölgelerinde taksonomik bakımından kullanılabilir önemli bir morfolojik farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Fakat araştırmacılar morfolojik karakterlerin ülkemizdeki *Bufo bufo*’ların alttür durumu hakkında bir hüküm vermeyeceğini vurgulamışlardır.

Yalnız Tosunoğlu ve Taşkavak (2001) Türkiye’deki *B. b. spinosus* ve *B. b. verrucosissimus* alttürlerini karşılaştırmak amacıyla Manyas (Balıkesir) ve Çamlıhemşin (Rize)’den alınan örneklerin kan-serum proteinlerini kalitatif ve kantitatif olarak incelemiş ve aralarında herhangi bir farklılık gözlemlememişlerdir. Sonuçta *B. b. verrucosissimus* ve *B. b. spinosus*’un sinonim olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca Özdemir ve Baran (2002) Murat Dağı’ndan (Kütahya-Uşak) elde ettikleri tek örneği morfolojik karakterlerine göre *B. b. spinosus* olarak değerlendirmişlerdir.

De Lange (1973) *Bufo bufo*’nun tür içi sistematığına katkıda bulunmak için yaptığı bir çalışmada *B. bufo* örneklerini morfolojik yönden incelemiş ve *B. b. spinosus*’un taksonomik durumuna çözüm bulmaya çalışmıştır. Sonuçta, derideki siğillerin farklılığının iklimsel faktörlerden kaynaklandığını, kuzey bölgelerdekilerin sivri siğillere sahip olduklarını, güneydekilerin ise sahip olmadığını görmüştür. Ayrıca ortalama ve maksimum vücut boyunun kuzeyden güneye gidildikçe arttığını fakat arka ayaklarında bir farklılık olmadığını gözlemlemiştir. Bu sonuçlara göre, De Lange Akdeniz kısmındaki popülasyonların ayrı alttürler olmadığını savunmuştur.

Macey ve arkadaşları ise (1998) Doğu Tibet bölgesinde *Bufo bufo* grubuna ait 3 türün (*B. andrewsi*, *B. gargarizans*, *B. minshanicus*) filogenetik ilişkilerini saptamak için mtDNA’sının 1063 bazlık kısmını (ND1 ile ND2 genleri arası) analiz edip *B. excul*, *B. viridis* ve *B. verrucosissimus* ile karşılaştırmışlardır. İncelenen üç türün birer monofiletik grup olduğunu ve *B. verrucosissimus*’un ise bu türlerle kardeş takson olduğunu bildirmişlerdir.

*Bufo bufo* grubunun genetik farklılıklarını ve filogenetik ilişkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan birisi, İsviçre Alp’lerindeki *Bufo bufo* türünün genetik farklılıklarını inceleyen Lüscher ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmadır. Araştırmacılar İsviçre’deki *B. b. bufo* ve *B. b. spinosus* popülasyonlarının 8 enzimini yatay nişasta jel elektroforezi ile analiz ederek iki alttür arasında net bir genetik farklılığın

gözlenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca *Bufo bufo* populasyonlarının (alttür dahil) çok düşük bir genetik farklılığa sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. Akdeniz bölgesindeki *B. b. spinosus*'un morfolojik karakterlere dayanan alttür durumu Lüscher ve arkadaşlarının (2001) yaptığı genetik çalışmalarla doğrulanmamıştır. Bu araştırmacılar Akdeniz *B. bufo* populasyonlarını kuzeydekilerden ayıran morfolojik karakterlerin ekolojik olarak ortaya çıkmış olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar morfolojik olarak *B. b. bufo* ve *B. b. spinosus* alttürleri arasındaki en büyük farklılığın vücut boyu ve ağırlık olduğunu bulmuşlardır. Bu farklılığın genetik olarak mı ekolojik olarak mı ortaya çıktığı bilinmemektedir. Bu yüzden vücut boyu ve ağırlığın filogenetik çalışmalarda kullanılmasının uygun olmadığını kaydetmişlerdir.

Ancak ülkemizde moleküler sistematığe dayalı çalışmaların oldukça az sayıda olması nedeniyle birçok canlı grubunun sınıflandırılması tam olarak belirlenememiştir. Bu tez çalışmasının amacı taksonomik durumu halen problemlili olan Bufonidae familyasına ait Türkiye, Yunanistan ve İtalya'nın bazı bölgelerinden elde edilen *Bufo bufo* örneklerini hem morfolojik hem de moleküler düzeyde incelemek ve daha önceden Türkiye'den bildirilen farklı alttürlerin varlığını test etmektir. Moleküler açıdan bireylerin mitokondriyal DNA'larının 16S rRNA geninin 936 bp'lik kısmının baz sıraları tespit edilmiş, yapılan filogenetik analizler sonucu meydana gelen filogramlar incelenmiştir. Morfolojik veriler ise ANOVA, PCA ve ayırma analizleri uygulanarak incelenmiştir.

## 1.2. Amfibilerin Genel Özellikleri

Amfibiler (kurbağalar), balıklarla sürüngenler arasında yer alan bir omurgalı sınıfıdır. Çünkü bazı özellikleri balıklara, bazı özellikleri de daha üst gruplara benzemektedir. Nitekim embriyoları balık embriyosuna, dört ayaklarının bulunması da kara omurgalarına benzer. "Amfibia" Yunanca çift yaşamlı manasındadır. Çünkü kurbağaların bir kısmı kısmen suda, kısmen de karada yaşarlar. Gelişmeleri genellikle suya bağlıdır. Yumurtalarını genellikle suya bırakırlar, larva evreleri de genellikle suda geçer. Karada yaşayanlar da yumurta bırakmak üzere suya girerler. Balıklara benzer atadan meydana geldikleri kabul edilen amfibiler, karada yaşayabilmek için bazı değişiklikler geçirmişlerdir. Örneğin yüzgeçler yerine bacaklar, solungaçlar yerine de akciğerler meydana gelmiştir (Baran ve Atatür, 1998).

Sudan karaya geçen grup olarak tanınan amfibilerin bazı tipik özellikleri şöyle sıralanabilir; derileri çıplaktır, yani deride pul, tüy ve kıl gibi yapılar bulunmaz. Derileri bol salgı bezi içerir. Bu bezlerin salgıları ile deri devamlı olarak ıslak tutulur. Ayrıca derilerinde zehir etkisi yapan salgı bezleri de mevcuttur (Baran ve Atatür, 1998).

Ergin kurbağalar boylarına göre diğer hayvan türlerini yiyerek beslenirler. Böcekler, solucan ve salyangozlar başlıca besinlerini teşkil eder. Larva devresinde kuyruklu kurbağalar etçil, kuyruksuz kurbağalar ise bitkisel besin alırlar. Gelişmeleri genel olarak metamorfozludur, yani gelişmelerinde bir larva devresi vardır. Metamorfoz devresi türlere, sıcaklık derecesine ve diğer dış şartlara göre uzun veya kısa olabilmektedir (Baran ve Atatür, 1998).

Kuyruklu kurbağa türleri çok canlı renklerde olmasına karşılık, kuyruksuz olanlarda vücut rengi ortama uyum sağlamıştır. Örneğin, *Rana dalmatina* (çevik kurbağa) türünün yanından geçerken ancak hayvanın sıçraması sonucunda fark edilmesi mümkündür. Kurbağa türleri iki faktöre tahammül edemezler. Bunlar kuraklık ve tuzluluktur. Bu nedenle kurbağalar denizlerde bulunamazlar. Yine kurbağalar deri yapıları ve diğer özellikleri nedeniyle kurak yerlerde yaşayamazlar (Baran ve Atatür, 1998).

### 1.2.1. Amfibilerin Evolusyonu

İlk karasal omurgalılar amfibilerdir. Karada vücutlarına destek sağlayan pektoral ve pelvik bacaklarının gelişmiş olması, akciğerlerinde oksijenlenen kanı tekrar pompalamak üzere kalbe taşıyan akciğer toplar damarının meydana gelmiş olması ve yaklaşık 370 milyon yıl önce (MYÖ), Karbonifer devrinde elverişli ekolojik koşulların ortaya çıkması, bu sınıfın üyelerinin karada bol miktarda bulunmalarına olanak sağlamıştır. Bu nedendir ki, Karbonifer devrine Amfibi Çağı da denilmektedir (Bahçeci, 2000).

İlksel Amfibilerin vücutu daha çok balığa benzemektedir. Onların vücutu, su kaybını önleyen pullar ve kuru bir deri ile kaplıydı. Yaklaşık 160 MYÖ, bu ilksel amfibiler tamamen yok olmuşlardır. Çünkü Permiyenin sonu, gerek jeolojik ve gerekse biyolojik bakımından büyük değişimlerin yaşandığı bir devirdir. Bu devirde son trilobitler ve son plakodermiler ortadan kalkmış; bir zamanlar bol miktarlarda bulunan brachiopodlar azalmış; mercanların, molluskların, ekinodermilerin, kabukluların ve balıkların daha ilksel tiplerinin yerini bu grupların modern temsilcileri almıştır. Bu Permo-Triyasik krizde,

birçok amfibi grubunun nesli de tükenmiştir. Triyas'ın sonuna kadar sadece suya bağımlı olarak yaşamlarını sürdüren amfibiler kalmış ve günümüzde yaşayan az sayıdaki form bunların soyundan gelmiştir (Bahçeci, 2000).

Amfibi yumurtalarının, su kaybını önleyen iç membranları ve kabukları olmadığı için dış ortamda çok çabuk kururlar; bu nedenle yumurtalar doğrudan doğruya suya ya da ıslak yerlere bırakılır. İlk gerçek akciğerler amfibilerde gelişmiştir, fakat bu organlar tam bir solunum için yetersizdir. Solunum nemli glandular derileri ve ağızlarını çevreleyen zar vasıtasıyla da yapılır. Amfibiler, derilerinin su kaybetmesi nedeniyle, nemli habitatlardan fazla uzak kalamazlar. Amfibi larvaları ve sürekli olarak suda yaşayan türlerin erginleri, solungaçlarıyla solunum yaparlar (Bahçeci, 2000).

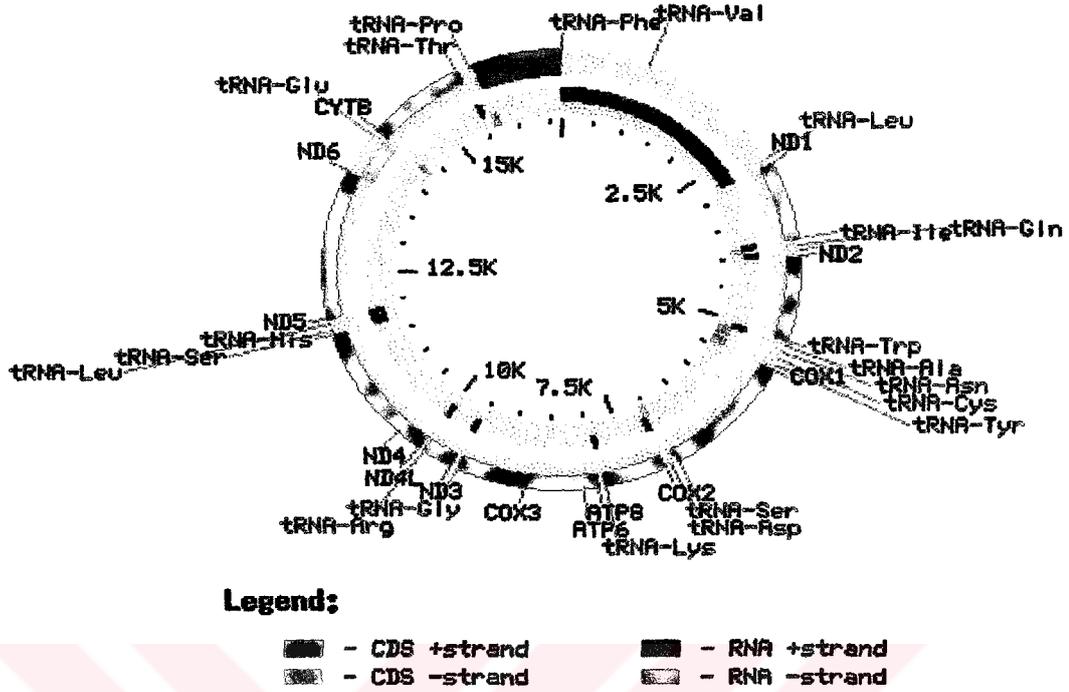
Amfibiler, her ne kadar ilkel görünseler de, gerçekte onlar başarılı hayvan gruplarıdır. Onlar dinozorlardan uzun bir süre önce evrimleşmiş olmalarına karşın, dinozorların soyunun tükenmesinden bu yana, yani 65 milyon yıldır yaşamlarını sürdürmeyi başarmışlardır (Bahçeci, 2000).

### 1.3. Neden mitokondriyal DNA (mtDNA)?

Bir filogenetik çalışmada seçilen genler, ilgili taksonomik seviyede filogenetik geçmişi yansıtan korunmuş bilgiler içermelidir. Mitokondriyal ribozomal genler, çok geniş alandaki canlı gruplarında birçok filogenetik soruyu cevaplamaktadır (Hertwig, 2004). Omurgalı hayvanların mitokondriyal DNA'sı halkasal yapıda ve çoğunda olduğu gibi 16-18000 baz çifti uzunluğundadır. Bu DNA üzerinde 13 protein kodlayan bölge, 2 rRNA geni, bir replikasyon kontrol bölgesi ve 22 tRNA geni bulunmaktadır (Şekil 1). Bunların sırası genelde omurgalılarda korunmuştur. Mitokondriyal DNA'da intronlar yoktur ve tRNA'ların splicingi mRNA kalıplarını üretir ve mtDNA kendi kendine replike olur. Sitokrom oksidaz, ATP sentetaz ve NADH sistemleri sayesinde hücre solunum sistemlerine katkıda bulunur. mtDNA'nın en önemli özelliği de anne tarafından nesilden nesile aktarılıyor olmasıdır. Böylece rekombinasyonun olmaması kalıtımının daha kolay izlenilmesini sağlar ve popülasyonların geçmişleri hakkında güçlü bir bilgi sağlar.

Nüklear ribozomal RNA genleri ve mtDNA'nın tamamı çok eskiye dayalı filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda ise popülasyon ve daha düşük seviyedeki taksonomik ilişkilerin ortaya





Şekil 1. Omurgalı hayvan mitokondriyal DNA'sı

koyulmasında bazı mtDNA genleri kullanılır. Bunlar 12S, 16S ve sitokrom b (cyt b) genleridir (Farias vd., 2001).

Mitokondriyal DNA'nın 16S rRNA, 12S rRNA ve cyt b genlerinin baz sıralarının karşılaştırılmasına dayanan çok sayıda taksonomik ve filogenetik çalışma bulunmaktadır. Bu yüzden bu genlerin çoğaltılmasında kullanılan primerler, oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Canlı gruplarındaki farklılıkları belirlemek için yapılacak en doğru iş, DNA'daki değişiklikleri de gösterdiği için mtDNA'nın baz sırasının analiz edilmesidir (Kocher, 1989).

### 1.3.1. Mitokondriyal DNA'nın Yapısı ve Evolusyonu

Mitokondrilerde, şekerlerde depolanan enerji adenozin trifosfat (ATP)'ın sentezi için güç kaynağı olarak kullanılmaktadır. Hücresel solunumda kullanılan proteinlerin çoğunluğu mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanmaktadır. Kloroplast DNA'sı gibi, mtDNA'da genellikle kromozomal proteinlerden yoksun halkasal bir çift sarmaldır.

Her bir hücre başına mitokondri sayısı, bazı tek hücreli mantarlarda olduğu gibi dörtten, omurgalıların kas hücrelerinde olduğu gibi bine kadar çok değişkenlik göstermektedir.

Hayvanların mitokondriyal DNA'ları nispeten küçüktür. Türler arasında nispeten az varyasyonlu, genellikle yaklaşık 16 kb uzunluğunda ve tümü halkasaldır. İntronları yoktur, rekombinasyon yok veya çok nadirdir, anadan kalıtılır (Freeman ve Herron, 2002).

#### 1.4.Moleküler Evolusyon

Protein ve DNA dizilerini çalışmak için geliştirilen tekniklerin keşfi evolusyon çalışmaları için yeni bir alan açmıştır. 1960'larda ilk büyük ölçekli aminoasit dizisi çıkarma çalışmaları ile başlayan ve günümüzde toplam genom dizilerini çıkarma üzerine veri patlaması şeklinde devam eden çalışmalar sonucunda, araştırmacılar zaman içinde proteinler ve nükleik asitlerin nasıl değiştikleri hakkında pek çok soruya cevap bulmuşlardır.

Moleküler evrimsel çalışmaların en temel hedeflerinden biri dört evolusyoner gücün (mutasyon, göç, sürüklenme ve seçilim) dizilerde günümüzde gözlenen çeşitliliği nasıl ürettiğini anlamaya çalışmaktır. Nötral teori bu girişimde önemlidir, çünkü uyum gücü bakımından nötr olan ve bu yüzden yalnızca sürüklenme nedeniyle frekansları değişen aleller için, sabitlenmenin hızını belirtir. Sonuç olarak, moleküler evolusyonun gözlenen hız ve modellerinden pozitif seçilimin mi yoksa sürüklenmenin mi sorumlu olduğunu sınamak için bir sıfır model sağlar. Populasyon büyüklüğünün bir fonksiyonu olarak, sürüklenme ve seçilimin nasıl etkileştiklerini belirlediğinden, yaklaşık nötral model, teorinin önemli bir uzantısıdır (Freeman ve Herron, 2002).

Sürüklenme yoluyla meydana gelen evolusyon oranı, yalancı genler çalışılarak saptanabilir. Nötral teori tarafından öngörüldüğü gibi, yalancı genler, kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan diziler arasında gözlenmiş değişimin en yüksek oranına sahiptir. Kodlayıcı dizilerin büyük bir çoğunluğunda, baz değişimleri, değiştirici baz değişimlerinden çok daha hızlı birikirler. Lokuslar arasında, moleküler evolusyon hızı, bir genin hücre için öneminin bir fonksiyonu olarak değişkenlik gösterir. Bu gözlemler, moleküler evolusyonun zararlı mutasyonlara karşı sürüklenme ve seçilim yolu ile kontrol altında tutulduğunu önermektedir. Bununla birlikte, araştırmacılar önemli örneklerde,

değiştirici baz değişimlerinin yüksek oranının, yararlı mutasyonlar üzerine seçilimin bir ürünü olarak oluştuğunu gösterebilmişlerdir (Freeman ve Herron, 2002).

Baz değişimlerinin, proteinlerin aminoasit dizilerini değiştirmeseler bile, doğal seçilime cevap olarak frekansları azalır veya artabilir. tRNA'ların bulunuş durumlarındaki varyasyon, translasyon etkinliği için seçilime neden olabilir ve kodon eğilimine yol açabilir. Avantajlı mutasyonlar üzerindeki seçim, bağlantılı suskun baz değişimlerini (bir gen tarafından kodlanan aminoasit dizisini değiştirmeyen bir DNA baz dizisi) sabitlenmeye götürebilir; zararlı mutasyonlar üzerine seçim ise bağlantılı suskun baz değişimlerinin ayıklanmasına yol açabilir (Freeman ve Herron, 2002).

Hareketli elementler ökaryotik ve prokaryotik genomların belirgin bileşenleridir. Bu lokuslar aracı RNA veya DNA'larla hareket ederler, fakat konak organizmanın uyum gücünü artıran ürünler için kodlama yapmazlar. Çünkü bunlar genomda yeni bir yere hareket ettiklerinde, zararlı mutasyonlara neden olduklarından, parazit olarak tanımlanırlar. Kloroplast ve mitokondriler endosimbiyotik bakteriler olarak ortaya çıkmışlardır ve evolusyon tarihinin en büyük yatay gen transfer olaylarını temsil ederler. Kloroplast ve mitokondriyal DNA'da gen sırası, gen organizasyonu ve dizi değişim oranı değişmekle birlikte, bu organellerin bilgi içerikleri oldukça iyi korunmuştur (Freeman ve Herron, 2002).

#### **1.4.1. Dizi Değişiminin Miktar ve Hızı**

Moleküler evolusyon sahası, 1960'ların ortasında biyokimyacıların hemoglobin, sitokrom c ve özellikle insan ve omurgalılarda bol miktarda bulunan ve iyi çalışılmış diğer proteinlerin aminoasit dizi tayininde başarılı olmalarıyla başlatıldı. Türler arasındaki moleküler değişimin hız ve miktarını karşılaştırmada evolusyoner biyologlara ilk fırsatı bu veri setleri sağladı (Freeman ve Herron, 2002).

#### **1.4.2. Moleküler Evolusyonun Nötral Teorisi**

Kimura (1968, 1983), aminoasit dizi farklılaşmasının gözlenen modellerini açıklamak amacıyla, moleküler evolusyonun Nötral teorisini formüle etmiştir. Bu teori, populasyonlarda sabitlenen baz değişimlerinin çoğunun uyum gücü açısından nötr olduğu

ve DNA dizileri düzeyindeki evolusyonda, genetik sürüklenmenin baskın olduğunu iddia eder. Kimura, türler arasında moleküler düzeyde gözlenen farklılıkların, yararlı mutasyonlar üzerine doğal seçilimin işlemesi şeklindeki bir açıklamanın büyük ölçüde geçersiz olduğuna inanmaktadır.

Kimura nötr mutasyonların evrimini aşağıdaki şekilde modelleştirir:

- Eğer diploid bir populasyonda  $N$  birey varsa, söz konusu populasyonda her bir genin  $2N$  kopyası mevcuttur.

- Şimdiki populasyonda yer alan  $2N$  kopyaların tümü geçmişte herhangi bir dönemde var olmuş olan tek bir alelden türemiştir. Buna karşın, günümüzde varlığını sürdüren  $2N$  kopyalarından yalnızca bir tanesi, gelecekte bir zaman, populasyonda bulunan bütün kopyaların atası olacaktır.

- Eğer genlerin tüm  $2N$  kopyaları seçim bakımından eşdeğere veya taşıyıcının uyum gücü üzerindeki etkileri açısından nötr iseler, her birinin populasyonda sabitlenecek alel olma bakımından şansları eşittir. Bu şans  $1/2N$ 'ye eşittir.

- Her nesilde mutasyon populasyona yeni nötr aleller katacaktır. Eğer  $v$  her bir başarılı gamet başına her bir genin mutasyon oranı ise  $2Nv$  her bir neslin populasyonuna katacağı yeni mutantları olacaktır.

- Yukarıdaki saptamalara dayalı olarak yeni nötr mutantların populasyonda sabitlenme oranları  $(2Nv)$  ( $1/2N$ ) veya basitçe  $v$ 'ye eşittir.

### 1.5. Türleşme Mekanizmaları

Bugün yaşayan tüm organizmaların ataları yaşamın ortaya çıktığı yaklaşık 3,8 milyar yıl öncesine dayanmaktadır. O günden bugüne populasyonların bölünmesi ve yeni türler oluşturmak üzere farklılaşması şeklinde, milyarlarca değilse de milyonlarca dallanma olayı meydana gelmiştir. Mutasyon, doğal seçim, göç ve genetik sürüklenme, populasyon içi alel frekanslarını değiştiren süreçlerdir ve populasyonlar arasında genetik farklılaşmaya sebep olurlar.

Türleşmeyi incelemek, yaşam tarihi çalışmalarına bir temel sağlamanın yanında, bazı önemli pratik uygulamalara da sahiptir. İnceleyeceğimiz materyalin çoğu, farklılaşmış organizma grupları arasındaki gen akışının boyutları ve nedenleri (ya da gen akışının olmaması) üzerine odaklanmaktadır. Bu konuları anlamak, biyolojik çeşitliliğin korunması

ve gen mühendisliğiyle üretilip çevreye bırakılan organizmaları yönetmek açısından önemlidir (Freeman ve Herron, 2002).

### **1.5.1 Tür Kavramları**

Pek çok tür kavramları ortaya atılmış ise de, hepsi bir türün ayırt edici karakteristiğinin evrimsel bağımsızlık olduğu konusunda uzlaşırlar. Farklı tür kavramları evrimsel bağımsızlığı belirlemek için uyguladıkları kriterler açısından farklıdırlar.

Türleşme üç aşamalı bir süreç olarak analiz edilebilir: (1) Dağılıp, vikaryans, ya da poliploidi gibi büyük çaplı kromozomal değişimler nedeniyle populasyonların izole olması. (2) Genetik sürüklenme veya seçilim sayesinde farklılaşma ve (3) İkincil temas ile farklılaşmanın eliminasyonu ya da tamamlanması. Bununla birlikte, bu sıraya uymayan çok sayıda istisna vardır. Bazı durumlarda farklılaşmayı sağlayan seçilim baskısı o kadar güçlüdür ki populasyonlar fiziksel izolasyon olmadan da farklılaşabilir. Ayrıca, ikincil temas olduktan sonra çok çeşitli sonuçların ortaya çıkması olasıdır. Bunlar kararlı hibrit zonların oluşması ve her iki atasal populasyondan genler içeren yeni bir türün oluşmasını kapsar.

Mutasyon, seçilim, göç ve genetik sürüklenme her tür üzerinde ayrı ayrı işlendiği zaman evlusioner bağımsızlık ortaya çıkar. Bu, türün kendi alellerinin yayılabileceği bir sınır oluşturması anlamına gelir. Sonuç olarak; farklı türler bağımsız evlusioner yörüngeler izler (Freeman ve Herron, 2002).

#### **1.5.1.1. Biyolojik Tür Kavramı**

Biyolojik tür kavramına göre, evrimsel bağımsızlığı tanımlayan kriter, üreme izolasyonudur. Yani, eğer populasyonlar veya organizmalar hibritleşemez veya hibritleşse bile verimli döller vermezlerse o zaman populasyonlar üreme izolasyonuna sahiptir ve geçerli bir tür olarak kabul edilir. Biyolojik tür kavramı, Ernst Mayr tarafından 1942 yılında ortaya atılmasından bu yana ders kitaplarında verilen tür tanımı olmuştur. Bu kavram pek çok zoolog tarafından pratikte kullanılmaktadır ve Birleşik Devletlerin simgesi haline gelmiş, soyu tehlike altındaki türlerin korunması için atılacak adımları düzenleyen

(Endangered Species Acts) temel biyolojik çeşitlilik yasasında uygulanan yasal bir tanımlamadır.

Üreme izolasyonu, gen akışı olmadığının kesin bir kanıtı olduğundan, tür kavramında kullanılabilir. Üreme izolasyonu evrimsel bağımsızlığın turnusol testidir. Biyolojik tür kavramının şartları kavramsal olarak zorlayıcı ve bazı durumlarda faydalı sonuçlar verse de çoğunlukla uygulanması zordur. Örneğin, eğer komşu populasyonların yayılışı çakışmıyorsa, bu populasyonlar arasında üreme izolasyonunun olup olmadığını hiçbir zaman bilemeyiz. Bu yüzden biyologlar şöyle bir somut yaklaşım içerisine girmek zorundadırlar: “Bu populasyonlar zaten yeter derecede farklılaşmış olduğundan gelecekte biraraya gelseler bile aralarında çiftleşme olmayacaktır ve bu yüzden biz farklı türler olarak adlandırırız.” Bu durumlarda, tür teşhislerini verilerle test etmek mümkün değildir. Bunun dışında, biyolojik tür kavramı fosil formlara uygulanamaz. Eşsüz üreyen populasyonlara uygulanması da zaten söz konusu değildir (Freeman ve Herron, 2002).

### 1.5.1.2. Filogenetik Tür Kavramı

Filogenetik tür kavramına göre, yakın akraba populasyonlar arasındaki filogeninin ortaya çıkartılması ve en küçük monofiletik grupların bulunmasıyla türler belirlenir. Böylesi bir filogenetik ağaçta, türler ağacın uç kısımlarını oluşturur.

Filogenetik tür kavramının arkasındaki mantığa göre, eğer populasyonlar izolasyon sonucu birbirinden ayrılmışlarsa, sadece özellikler bir filogeni üzerinde populasyonları ayırt edebilir. Bu populasyonların, karakterler yardımıyla, filogenetik olarak ayırt edilmesi mümkündür. Başka bir deyişle, filogenetik tür kavramına göre ayrı bir tür tanımlamak için, tanımlayıcı özelliklerinin ortaya çıkışına yetecek kadar uzun süre populasyonların evrimsel olarak bağımsız olmuş olmaları gerekmektedir. Bu yaklaşımın cazip tarafı, test edilebilir olmasıdır. Türler filogeninin tahmininde kullanılan özelliklerdeki önemli istatistiksel farklılıklar doğrultusunda isimlendirilirler.

Tahminler değişse de genel görüş, filogenetik tür kavramı uygulandığı takdirde bugünkü tür sayısının kolayca ikiye katlanacağı şeklindedir. Filogenetik tür kavramının önde gelen savunucuları bu durumdan rahatsız değildirler. Bu kavramın savunucuları buna “eğer tür sayısında böyle bir artış olursa bu sadece biyolojik gerçekliliği yansıtır” şeklinde cevap vermektedirler.

### 1.5.1.3. Morfolojik Tür Kavramı

Paleontologlar, türleri fosiller arasındaki morfolojik farklılıkları esas alarak tanımlarlar. Morfolojik tür kavramının en büyük avantajı, yaygın olarak uygulanabilir olmasıdır. Ancak, dikkatli bir şekilde uygulanmadığında tür tanımlamaları keyfi ve kişiye özgü olabilmektedir. En kötü durum ise, farklı araştırmacılar tarafından yapılan tanımlamaların karşılaştırılabilir olmamasıdır.

Türleri tanımlarken paleontologlar başka sıkıntılarla da uğraşmak zorundadırlar. Yumuşak doku anatomileri veya renkleri farklı olan fosil türler ayırt edilemezler. Aynı şekilde, morfolojik olarak benzer fakat ötüş, ısıya ve kuraklığa tolerans, habitat kullanımı veya kur davranışları gibi özellikleri yönünden oldukça farklılaşmış olabilirler. Bunlara kriptik türler adı verilir (Freeman ve Herron, 2002).

### 1.5.1.4. Alttür Kavramı ( *Subspecies, ssp., subsp.* )

Türün altında yer alan, bugün için kabul edilen en küçük sistematik kategoridir. Mayr'e göre alttür; türün diğer benzeri alt bölümlerinden taksonomik olarak farklı ve coğrafik olarak sınırlandırılmış olan mahalli popülasyonlara ait bir topluluktur. Bu tarife göre;

1. Alttürün coğrafik olarak tarif edilmesi gerekir ve alttürün yayılış sahası türün coğrafi yayılış sahası içinde bulunur.

2. Alttürler genellikle bir tek popülasyondan teşkil edilmeyip, popülasyon topluluklarından yapılmıştır. Çok nadir durumlarda bir alttür, hatta bir tür tek bir popülasyondan ibaret olabilir.

3. Diğer benzeri gruplardan taksonomik olarak ayrılabilmelidir. Bu sebepten, herhangi bir hayvan grubuna, bilinen bir türün yeni bir alttürüdür diyebilmek için, o türün bilinen popülasyonlarından hangi taksonomik karakterler bakımından farklı olduğu kesin ve net olarak belirtilmelidir. Ayırıcı veya farklılığı gösterici taksonomik karakterler kalitatif (nitelik olarak) ve kantitatif (sayısal olarak ölçülebilen) olarak belirtilebilecek özellikler olmalıdır. Renk ve desen özellikleri kalitatif, bütün ölçülebilen karakterler ise kantitatifir.

Alttürler taksonomik bir kaide olarak üç isimle isimlendirilirler ve bu duruma trinomial isimlendirme denilir. Mesela; *Triturus vulgaris kosswigi*, *Mertensiella luschani finikensis*, *Anguis fragilis colchicus* gibi.

Herhangi bir tür monotipik olduğu takdirde, onun alttürü yok demektir. Alttürler ancak politipik türler için söz konusudur ve politipik bir türün belirli bir sahada birden fazla alttürü bulunamaz, çünkü aynı sahada yaşayan fertler aynı gen havuzuna sahip olduklarından üreme izolasyonu söz konusu değildir. Monotipik olarak bilinen bir türün yeni bir alttürü bulunarak politipik hale geçmesi söz konusu olduğunda monotipik tür ismi nominat alttürün ismi olur (Yılmaz, 1997).

Alttürler normal olarak kendine ait özel bir coğrafi alanı işgal ettiğine göre birçok sistematikçinin kabul ettiği şekilde bu durum aynı zamanda bir coğrafi ırk demektir. Dünyadaki ekolojik şartlar bakımından birbirinin tamamen aynısı olan iki coğrafi saha bulunmayacağından her alttür teorik olarak farklı ekolojik şartlarda yaşıyor ve oraya uyum göstermiş demektir. Bu durumu göz önünde tutan bazı sistematikçiler ekolojik ırk tabirini kullanırlar. Coğrafi ırkta esas olan mesafe olduğu halde, ekolojik ırkta esas olan farklı çevre şartlarına sahip olmadır. Sıcakkanlı ve çevre değiştirme kabiliyetleri yüksek olan hayvanlar ekolojik şartlar bakımından çok fazla sınırlandırılmayacağından bunlar coğrafi ırk kabul edilir. Ancak fazla yer değiştiremeyen, çevre şartlarına çok bağımlı soğukkanlı hayvanlar için ekolojik ırk veya ekotip tabiri daha uygun görülmektedir. Mesela; coğrafik olarak birbirine çok yakın bir bölgedeki bataklıkta, çayırdaki ve ormanlık sahada yaşayan bir *gastropod* türü *Arianta arbustorum*'un her üç biotopta farklı bir alttürü yaşar. Ekotipler özellikle habitata ait şartlar tarafından meydana geliyor ve fenotipteki değişkenliklerin genetik bir temeli yoksa bunlara ekofenotip denir. Özellikle tatlısularında yaşayan salyangoz ve midyelerde sıklıkla rastlanan bu durumun tespit edilmesiyle çok sayıdaki alttürün yanlış olduğu anlaşılmış ve sadece biyotop özelliklerine bağlı olup, genotip karşılığı olmadan meydana gelen fenotipik farklılıkların aynı tür veya alttür yapılmasının önüne geçilmiştir (Yılmaz, 1997).

Mayr ve bazı sistematikçiler ekolojik ırk yerine mikrocoğrafik ırk terimini de kullanırlar, çünkü coğrafik olarak çok fazla bir mesafe olmamakla birlikte ekolojik şartların farklı olduğu çok kısa mesafeler söz konusudur. Dolayısıyla her coğrafi ırk aynı zamanda bir ekolojik ırk ve her ekolojik ırk da mesafeye bağlı olarak coğrafi veya mikrocoğrafik ırktır (Yılmaz, 1997).

Neticede ister coğrafi ırk, ister ekolojik ırk, isterse biyolojik ırk olsun hepsi de alttür kategorisi içinde kabul edilirler. Genellikle biyolojik ve ekolojik ırklar nadir olmalarına karşılık, coğrafi ırklar çok yaygındır (Yılmaz, 1997).



## **1.6. İzolasyon Mekanizmaları**

Türleşme üç-evreli bir süreç olarak analiz edilebilir: ilk basamak popülasyonun izole olma süreci, ikinci basamak çiftleşme taktikleri ve habitat kullanımı gibi özelliklerin değişime uğramasıyla sonuçlanan süreç ve son basamak ise üreme izolasyonunu oluşturan süreçtir.

### **1.6.1. Fiziksel İzolasyon**

Fiziksel izolasyon, gen akışını durduran önemli bir bariyerdir ve şüphesiz türleşme sürecinin ikinci basamağı olan genetik ve ekolojik farklılaşmayı başlatan önemli bir tetikleyicidir. Coğrafi izolasyonun ortaya çıkışı, dağılma ve yeni bir habitata yerleşme yoluyla ya da vikaryans olayları yani mevcut bir dağılım alanının yeni bir fiziksel bariyer ile bölünmesi yoluyla olabilir (Freeman ve Herron, 2002).

### **1.6.2. Vikaryans Yoluyla Coğrafi İzolasyon**

Vikaryans türün yayılış alanını, birbirinden izole olmuş iki veya daha fazla alana bölerek aralarındaki gen akışını engelleyen olaydır. Vikaryansın pek çok mekanizması vardır, bu mekanizmalar dağların yükselmesi ve ormanlık alanların bölünmesine neden olan uzun süreli kuraklıklar gibi yavaş süreçli olabileceği gibi, bir salyangoz popülasyonunun ikiye bölünmesine neden olabilen kilometrelerce uzunluktaki lavlar gibi hızlı süreçlerde olabilir (Freeman ve Herron, 2002).

### **1.6.3. Kromozomlarda Değişiklikler**

Eğer bir mutasyon bir bireyin kromozomlarında büyük çapta değişikliğe neden olursa, bu olay mutasyona uğramış bireyin meydana getireceği döllerin ata popülasyondan hızlı ya da ani izolasyonuna sebep olabilir.

Yakın akraba türlerin karyotipleri karşılaştırıldığında, küçük çapta kromozomal değişiklikler oldukça yaygındır. Böylesine mutasyonlar, popülasyonlar arasında genetik farklılaşmaya neden olması açısından önemli olabilse de (White, 1978), bugüne kadar

kromozom farklılaşması üzerine yapılan ayrıntılı çalışmaların büyük bir kısmı nadiren korelasyon göstermektedir (Freeman ve Herron, 2002).

### **1.7. Varyasyon ve Varyasyonun Nedenleri**

Bir populasyon çok sayıdaki bireylerden meydana gelir. Her insanın kendine özgü anatomik ve fiziksel özelliklerinin olduğu, farklı yetenek ve davranışsal özelliklere sahip bulunduğu bilinmektedir. Aynı şekilde, yakından tanıdığımız köpeklerde, kedilerde ve atlarda da bu gibi bireysel varyasyonların (farklılıkların) olduğu çok iyi görülmektedir. Fakat, nar bülbülü, sincaplar, toprak solucanları, deniz yıldızları, karahindiba ve mısır bitkisi gibi uzaktan tanıdığımız türlerdeki bireysel varyasyonlara genellikle dikkat etmeyiz. Bütün bu fenotipik varyasyonlar tüm canlılarda görülür ve genellikle bireylerin genetik yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu nedendir ki, varyasyonları genetik ve fenotipik varyasyonlar diye ayırmak mümkündür (Bahçeci, 2000).

#### **1.7.1. Genetik Varyasyon**

Genetik varyasyonun meydana çıkarılması zor bir iştir; ancak çeşitli tekniklerin kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. Bu tekniklerden bazıları: kendileştirme baskısı, protein ve kromozomal polimorfizm, DNA sekansı polimorfizmi'dir.

##### **1.7.1.1. Kendileştirme Baskısı**

Genetik varyasyonu ölçmenin yollarından birisi, populasyondaki alellerin hangi fonksiyonlarının zararlı olduğunun saptanmasıdır. Zararlı aleller, kendileşmenin bir sonucu olan homozigotlukta artışın gözlenmesiyle araştırılabilir. Kendileşme ile, önceden heterozigot durumda bulunan resesif aleller homozigot duruma geçecekler ve eğer bu aleller zararlı iseler, kendileştirme baskısı olarak ifade edilen yaşama yeteneğindeki azalma, sonraki nesillerde ortaya çıkacaktır (Bahçeci, 2000).

Zararlı aleller heterozigot durumda muhafaza edildiklerine göre, elbette ki nötr ya da potansiyel olarak avantaj sağlayan aleller de heterozigot durumda muhafaza edilecek ve

populasyonları karakterize eden normal heterozigot genotipler içerisindeki gizli genetik varyasyonu temsil edeceklerdir (Bahçeci, 2000).

### **1.7.1.2. Protein Polimorfizmi**

Mendel genetiğinin kullanılmasıyla genetik varyasyonun ortaya konması hem yorucu ve hem de uzun süre gerektiren bir iştir. Bunun yerine, jel elektroforezi tekniği daha kısa zaman içerisinde, elektrik yüklerinin farklılığından yararlanılarak protein moleküllerinin birbirlerinden ayırt edilmesinde güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin yapısal bir gendeki varyasyon glutamik asit gibi yüklü bir aminoasidin glisin gibi yüksüz bir amino asidin yerini almasıyla sonuçlanıyorsa, protein üzerindeki net yük değişecektir; yükteki bu değişim ise elektroforez ile ortaya çıkarılabilecektir (Bahçeci, 2000).

Bir lokusa ait iki alel hafifçe farklı elektroforetik form meydana getirdikleri zaman, yani henüz aynı fonksiyon gerçekleştirildiği zaman meydana gelen proteinler allozimler diye isimlendirilir. İncelenen farklı türlere ait lokusların büyük bir oranı, sürpriz bir şekilde allozimleri meydana getirmektedir. Elektroforezis, muhtemelen aminoasit substitüsyonuna (aminoasitlerin birbirinin yerine geçmesi) bağlı gerçek varyasyonun sadece %30'unu ortaya koymaktadır; çünkü birçok substitüsyon olayı, molekül üzerindeki net elektrik yükünü değiştirmemektedir (Bahçeci, 2000).

### **1.7.1.3. Kromozomal Polimorfizm**

Herhangi bir canlı türü için kromozom sayısı sabit olmakla beraber, inversiyonlar ve translokasyonların meydana gelmesine bağlı olarak türün kromozom materyalinin düzenlenmesi genellikle polimorfiktir.

İnversiyonlar alel frekanslarını değiştirmedeği gibi, onun varlığı herhangi bir yeni genin oluşumuna da yol açmaz. Ancak, inversiyon krosingoverli gametlerin gözlenmesini engeller. Böyle olunca, inversiyonlar, ilgili kromozomun inversiyon yapan kısmı boyunca sıralanmış spesifik alelleri koruma eğilimi gösterirler. Bu nedenle, eğer bir türde inversiyonlar varsa, inversiyon heterozigotlarının lehine işleyen selektif bir etkinin ortaya çıktığına inanılır. Bir başka ifadeyle, inversiyon elverişli bir gen düzenlenmesini koruyarak

populasyonun spesifik bir habitata uyumunu kısmen de olsa sağlar. Bu durumda linkaj (gen bağlantısı), seleksiyon için olası bir kriter durumuna gelir.

Heterozigot translokasyonların genellikle subfertil olmaları ve %50 oranında anormal gametleri meydana getirmeleri nedeniyle, onlar genetik varyasyonu azaltırlar. Translokasyonlar hayvan populasyonlarında nadir olarak görülürlerse de, heterozigot translokasyonlar birçok bitkide bulunmaktadır (Bahçeci, 2000).

#### **1.7.1.4. DNA Baz Dizisi Polimorfizmi**

Genetik varyasyonu ortaya koymanın en kestirme yolu, bir populasyonun bireyleri arasında DNA'larının baz dizilişindeki gerçek farklılaşmayı incelemektir.

Genetik varyasyonun sebeplerine bakıldığında; eşeyssel olarak çoğalan organizmalarda varyasyonun üç temel kaynağı vardır. Bunlar mayoz bölünme sırasında ortaya çıkan krosingover, haploid gametlerin birleşmesi, yani eşeyssel rekombinasyon ve mutasyondur. Bunlardan ilk ikisinin yeni alellerin oluşumuna herhangi bir etkileri yoktur; ancak onlar var olan alellerin yeni kombinasyonlar meydana getirmesine yol açarak varyasyonlara sebep olurlar. Bunlara karşılık nokta mutasyonları ve ekzon rekombinasyonu gibi büyük ölçekli mutasyonlar yeni alellerin oluşmasını sağlayan potansiyel kaynaklardır.

Birlikte ele alındığında, bütün bu işlemler, yeni alelleri ve yeni gen kombinasyonlarını meydana getirerek yeni genetik değişkenliklere sebep olurlar ve bunların üzerine de doğal seleksiyon etki ederek evolüsyoner değişimleri başlatır (Bahçeci, 2000).

#### **1.7.2. Fenotipik Varyasyon**

Doğal seleksiyon sadece, fenotipte ifade edilen genetik varyasyonlar üzerinde etkili olabilir. Bir populasyon içerisindeki herhangi bir fenotipik varyasyon iki birey arasında reproduktif farklılaşmaya sebep olabilir. Örneğin, gelişim sırasında farklı çevresel koşullara, bir hastalığa veya kazaya maruz kalma sonucu ortaya çıkan varyasyon doğal seleksiyondan etkilenir. Eğer, küçük bir populasyonda, nadir bulunan alellerin taşıyıcısı, bir kaza sonucu ölürse, populasyonun gen frekansları değişecektir.

Buna karşılık, somatik mutasyonlar tarafından meydana getirilen varyasyonlar evolüsyoner değişimler için ham materyal olmaz. Örneğin, bir hayvanın gelişimi sırasında, erken embriyonik dönemde ektodermal bir hücrede önemli bir mutasyonun olması mümkündür. Bu mutant hücreden meydana gelecek bütün hücreler aynı mutant tipte olacaktır. Bunun sonucunda, hayvanın sinir sisteminde önemli bir değişiklik meydana gelecek, fakat bu değişim hayvanın yavrularına geçemeyecektir; çünkü ektoderm hücreleri gametleri verecek olan ana hücreler değildir. Bu nedenle, somatik mutasyonlar tarafından meydana getirilen varyasyonlar üzerinde doğal seleksiyon iş görmeyecektir.

Doğal seleksiyon yoluyla evolüsyon teorisi, 19. yüzyılda J.B. Lamarck'ın kazanılmış karakterlerin katılımı yoluyla evolüsyon görüşüne rakip olarak ortaya çıkmıştır. Lamarck, bir bireyin yaşama süresince kazanmış olduğu somatik karakterlerin kendi yavrularına aktarıldığını düşünmekteydi. O'na göre her neslin özellikleri vücut parçalarının kullanılması ve kullanılmaması sonucu ortaya çıkan modifikasyonlar tarafından belirlenmekte ve sonraki nesillere aktarılmaktaydı. Lamarck'a göre evolüsyoner değişimler, birçok nesil boyunca kazanılan bu gibi modifikasyonları tedrici olarak birikmesiyle olmaktadır ve bunun en klasik örneği uzun boyunlu zürafaların evolüsyonudur.

Lamarck'çı görüşe göre, kısa boyunlu atasal zürafalar, beslenmek amacıyla boyunlarını ağaçların yapraklarına erişecek şekilde uzatmak durumundaydılar. Boynun bu şekilde sık sık uzatılması onların yavrularının boyunlarının da azar azar uzamasına sebep olmuştur. Daha yüksekteki ve daha yeşil yapraklara ulaşmak için boynun sürekli olarak uzatılmasının sonucu olarak, her nesil kendinden önceki nesilden daha uzun boyunlu olmuştur.

Diğer taraftan, C. Darwin'in doğal seleksiyon teorisi, atasal zürafaların muhtemelen kısa boyunlu olduklarını fakat boynun uzunluğunun -farklı genotiplere sahip olmaları nedeniyle- bir bireyden diğerine değiştiğini ileri sürer. Beslenme bakımından ortam koşullarında bir olumsuzluk ortaya çıktığında, daha uzun boylu zürafalar yaşamlarını sürdürmek ve yavru vermek, yani nesillerini devam ettirmek açısından daha avantajlı bir duruma geçmişlerdir. Bu, bütün kısa boyunlu bireylerin telef olduklarını ya da bütün uzun boyunlu bireylerin yaşamlarını sürdürerek çoğaldıklarını ifade etmez; fakat uzun boyunlu olanların oransal olarak daha çok sayıda hayatta kaldıklarını ve yavru bıraktıklarını ifade eder. Sonuç olarak, uzun boyunlu olmayı sağlayan genlere sahip olan bireylerin oranı müteakip nesillerde giderek artmıştır. Ağaçlar üzerindeki besinlere ulaşma bakımından

rekabetin artması uzun boyunlu bireyler için selektif bir avantaj sağlamış ve zürafaların evolusyonu böylece devam etmiştir (Bahçeci, 2000).

### 1.8. DNA Dizin Analizi Sonucunda Evrimsel Ağaçların Oluşturulması

Bir gurubun gelişimsel tarihi onun filogenisi olarak adlandırılır. Bir filogenetik ağaç, bu tarihin grafiksel bir özetidir. Ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını kaydeder ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını belgeler.

Filogeni tahmininde ilk adım, filogenetik olarak bilgi verici karakterlerin seçimi ve ölçülmesidir. Filogenetik çalışmalarda kullanılacak moleküler ve morfolojik karakterler, bağımsız, homolog, çalışmadaki taksonlar arasında farklılık gösteren ve homoplasiye dirençli olmak zorundadırlar. Filogenetik çalışmalarda ikinci adım, eldeki verinin analizinde parsimoni, maksimum olasılık ya da uzaklık metotlarından hangisinin en uygun olduğuna karar vermektir. Parsimoni yaklaşımları, her bir karakterdeki değişme modelini oluşturmak yoluyla karakter durumu değişmez sayısı en az olan durumlara uygulanır. Bu işlem her bir aday ağaç üzerinde her bir karakter için tekrarlanır. Birkaç farklı bilgisayar algoritması oldukça çok sayıdaki olası ağaç arasında tarama yapmak ve bunları değerlendirmek için uygulanmaktadır. Parsimoni kriterine göre, örneğin en iyi ağaç, mevcut veri için değişmez sayısı en küçük olanı (tüm karakterler için) ortaya koyan ağaçtır. Daha sonra, çeşitli istatistiksel teknikler tüm ağaç ya da belli kladlar (monofiletik grup) için destek derecesini değerlendirmede kullanılır (Freeman ve Herron, 2002).

Filogenetik düşünce, evrimsel biyolojide HIV (Human Immunodeficiency Virus) bulaşmasından yaşam çeşitliliğini sınıflandırma sistemlerine kadar çok çeşitli problemlere uygulanmaktadır. Filogenlerin bilgi verici olarak kullanımları, fosil kayıtlarda iyi belgelenmemiş olayların zamanlarının saptanması, filogeni oluşturmada kullanılan karakterler dışında kalan karakterlerin evrimleşme modeli ve oranı çalışmaları ve birlikte-evrim çalışmalarını kapsamaktadır (Freeman ve Herron, 2002).

### 1.8.1. Modeltest 3.6 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması

DNA dizilerinin analizinde, özellikle filogenetik ağaçların oluşturulmasında ve evrimsel parametrelerin tahmininde baz değişim modelleri sıkça kullanılır. Bir araştırmacının genelde karşılaştığı problem, objektif olarak doğru modeli seçmesidir. Modeltest (Posada ve Crandall, 1998) iki istatistiksel yolla bu sorunu çözen bir bilgisayar programıdır. Modeltest, PAUP programı tarafından oluşturulan olasılık skor değerlerini (.scores dosyası) kullanan bir çalışma prensibine sahiptir (Posada, 2003).

En sık kullanılan baz değişim modelleri, frekans ve değişim oranlarını tanımlayan parametreleri içerir. Bazı modeller, baz frekanslarının eşit olduğunu varsayarken, bazıları da birbirinden farklı olduklarını varsayar. Bir  $i$  bazının  $j$  bazına dönüşme olasılığı,  $j$ 'nin  $i$ 'ye dönüşme olasılığına eşit olduğundan dört baz arasında altı olası değişim oranı söz konusudur (rAC, rAG, rAT, rCG, rCT, rGT). Kompleks modellerde bu altı oranın değeri birbirinden farklı olabilir (Posada 2003).

Modeltest, en uygun baz değişim modelini hesaplanan hLRT (Hierarchical Likelihood Ratio Tests) veya AIC (Akaike Information Criterion) değerlerine göre karar verir. hLRT veya AIC sonuçlarının hangisinin kullanılacağı isteğe bağlıdır.

$$LRT = 2(\ln L_1 - \ln L_0)$$

$L_1$  = daha kompleks olan modelin olasılığı (alternatif hipotez)

$L_0$  = Basit olan modelin olasılığı (sıfır hipotezi)

LRT değeri her zaman sıfıra eşit veya ondan büyüktür. LRT değeri sıfıra yaklaştıkça kompleks modelin uygunluğu azalıyor demektir. AIC (Akaike, 1974) bir modelin doğruluğu araştırılırken kaybolan bilginin ölçüsüdür. AIC değeri ne kadar küçükse model, o veri setine o kadar uygun demektir (Posada, 2003).

Modeltest'in çalışma prensibi;

model.nex

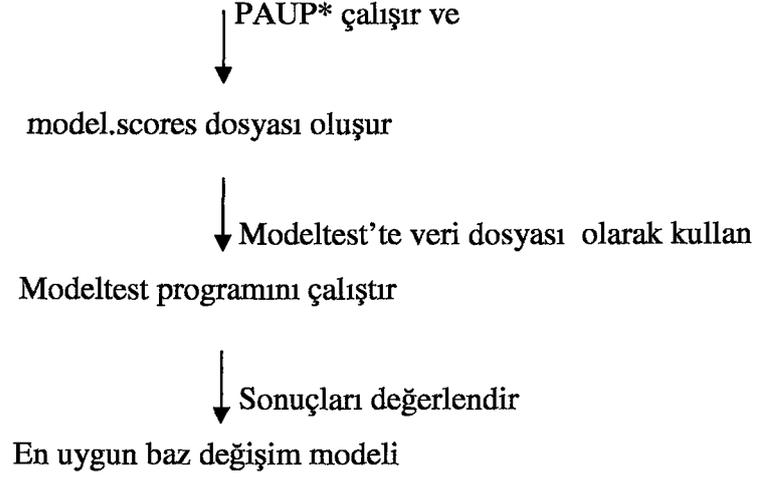


Nexus uzantılı veri dosyasını PAUP programında çalıştır



PAUP\* verileri yükler

PAUP\* programındaki modelblock dosyasını çalıştır



### 1.8.1.1. Modeltest 3.6'daki Baz Değişim Modelleri

Uygun baz modeli, olası modellerin birçok hipotezinin hiyerarşik olarak test edilmesiyle bulunur. Bu hipotezler; Baz frekansları eşit mi? Transisyon / transversiyon (ti / tv) eğilimi var mı? Transisyon oranları eşit mi? Değişmeyen (sabit) bölgeler var mı? Bölgeler arasında oransal homojenlik var mı? Örneğin; baz frekanslarının eşit olup olmadığını test etmek için JC ile F81, LRT ile karşılaştırılır. Çünkü iki model arasındaki tek fark, F81 modelinde eşit olmayan baz frekansları (alternatif hipotez) söz konusuken JC modeli eşit baz frekansları üzerine (sıfır hipotezi) kurulmuştur. Olası modellerin hiyerarşik olasılık oran testleri ile karşılaştırılması Şekil 2'de gösterilmiştir.

### 1.8.2. TCS Analizi

TCS, DNA baz dizileri dikkate alınarak genlerin soyağacını (şeceresini) tahmin etmede kullanılan bir bilgisayar programıdır (Templeton vd. , 1992). Bu metot maksimum parsimoni, maksimum olasılık, neighbour joining gibi geleneksel yöntemlerle birlikte kullanılan tür içi varyasyonu gösteren bir analizdir ve TCS adı verilen bir paket program kullanılır (Clement vd., 2000).

TCS programı Nexus (Madison vd., 1997) veya PHYLIP (Felsenstein, 1991) formatındaki DNA dizin dosyalarını açar. Haplotipleri bulur ve örnek içindeki frekanslarını hesaplayarak haplotipler arasındaki ikili uzaklık matrislerini oluşturur. Parsimoni metoduna dayanır ve haplotipleri bir ağ şeklinde birbirine bağlar. Analiz



sonucunda sekanslar, ikili uzaklık matrisleri, % 95'lik sınırın ötesindeki mutasyonel adımların parsimoni olasılıkları ve ağ şeklinde bir grafik dosyası olarak ortaya çıkar (Clement vd., 2000). TCS, Java formatında yazılmış bir programdır ve oluşturulan ağ Postscript dosyası olduğundan, görmek için başka grafik programlarına ihtiyaç duyar.

### **1.8.3. Bayesian Analizi**

MrBayes programı (Posada ve Crandall, 1998) John Huelsenbeck tarafından yazılmıştır ve Bayesian analizi olarak bilinir. Nexus formatındaki veri dosyalarını okur, Modeltest sonucunda bulunan en uygun baz değişim modelinin kullanılmasına izin veren bir programdır. Öncelikle ağaç topolojilerinin bir dağılımını oluşturur ve daha sonra Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metotlarını kullanarak ağaç topolojilerinin son dağılımını oluşturur.

## **1.9. Filogenetik Analizler**

### **1.9.1. Maksimum Parsimoni**

Evrimsel akrabalık ilişkisini belirlemenin en temel düzeydeki mantığı basittir: En yakın akraba taksonlar en fazla ortak özelliğe sahip olmalıdırlar. Üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter, kimin kimden geliştiğini ortaya koymak için bize yardım eder. Bu karakterler; DNA dizisi, belli iskelet elementleri ya da çiçek kısımlarının varlığı ya da yokluğu gibi özellikler olabilir. Tek koşul, farklı karakterlerin birbirlerinden bağımsız olmaları ve her birinin çalışılan tüm türlerde homolog bir karakter durumu olarak kodlanabilmeleridir (Freeman ve Herron, 2002).

Ancak çalışılacak karakterleri seçerken evlusioner akrabalık ilişkilerinin, sadece ortak bir atadan geldikleri için benzer olan özelliklerin yardımıyla açıklanabileceğini kavramak gerekir. Bu paylaşılan türemiş karakter durumları, grubun bütün üyelerinin ortak atasındaki karakter durumlarında bir değişime bağlı olarak ortaya çıkan benzerliklerdir. Böyle ortak bir atadan değiştikleri için paylaşılan özellikler sinapomorfi olarak bilinirler (Freeman ve Herron, 2002).



Parsimoni, olası birçokları arasından hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yaklaşım sağlar. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. Parsimoniye davet eden mantık basit ve zorlayıcıdır. Birçok durumda, konvergens ve geriye dönüşün, ortak bir atadan gelen değişime bağlı olan benzerliğe oranla daha az olacakları varsayılabilir. Öyleyse en parsimonik ağacın, veriden elde edilen homoplasi (konvergens ve geriyedönüş) miktarını azaltacağını ve bunun çalışılan türler arasındaki gerçek filogenetik akrabalığın en iyi tahmini olacağını söylemek mümkündür (Freeman ve Herron, 2002).

### 1.9.2. Maksimum Olasılık ve Genetik Uzaklık

Parsimoni metotlarının bir sakıncası bir araştırmacıya sunulan bütün bilgiyi kullanamamasıdır. Moleküler filogeniler için olasılık yaklaşımı şu soruyu sormaktadır: farklı tipteki nükleotid değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir? Bu stratejiyi hayata geçirmek için, bir bilgisayar programı her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılıkları toplamı gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak rapor edilir. Öyleyse, yarışan ağaç topolojilerinin kabul ya da reddi için kriter en yüksek olasılığı olan ağacı seçmektir. Maalesef, olasılık metotları hesaplamada yavaşlar ve bu teknikte çok büyük veri setleri, daha hızlı parsimoni metotları kullanılarak yapıldığı kadar kapsamlı analiz edilemezler (Freeman ve Herron, 2002).

Oldukça radikal bir yaklaşım, karakterler verisini (morfolojik bir özelliğin varlığı veya yokluğu ya da bir gendeki homolog bir bölgede bir nükleotidin kimliği gibi) bir uzaklık değerine dönüştürmektedir. Örneğin, iki takson arasında nükleotid pozisyonu yüzdesi farklılıkları hesaplanabilir (% 10 farklılık, 100 baz başına ortalama 10 nükleotidin değiştiği anlamına gelir). Ayrık karakterlerin tek bir uzaklık ölçüsüne dönüştürülmesi, spesifik bilginin kaybı ile sonuçlanır, fakat taksonlar arasındaki toplam benzerlik derecesini ifade edebilir (Freeman ve Herron, 2002).

Olasılık metotlarında olduğu gibi, uzaklık analizleri de, araştırmacıların çoklu karakterlerden gelen bilgiyi iki takson arasındaki tek bir bütün uzaklığın ölçümüne

çevirmek için bir karakter evrim modeli öngörmelerine gereksinim duyar. DNA dizileri için yaygın biçimde kullanılan bir formül, aynı yerdeki çoklu baz değişimleri ile transisyon ve transversiyon baz değişimlerinin frekansındaki farklılıkları düzeltir (Kimura, 1980).

Uzaklık verisinden bir filogeni tahmini yapmak için, taksonları kümeleyen bilgisayar programları kullanılır; en benzer formlu sonuçlar arasında biri diğerine yakın bulunur. Taksonları kümelemeyi benzerlikler temelinde yapan bu genel stratejiye fenetik yaklaşım adı verilir (Sneath ve Sokal, 1973). Tercih edilen ağaç, taksonlar arasında toplam mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır. Birkaç farklı kümeleme algoritması yaygın biçimde kullanılmakta olup, analiz edilen mesafenin doğası konusunda az ya da çok sınırlayıcı öngörülerde bulunabilir. Bu yaklaşım sonucunda diziler arasındaki genetik uzaklık çiftleri matrisi oluşturulur, aynı pozisyonlardaki çoklu değişiklikleri ortaya koymak için geliştirilen bir formül kullanılarak hesaplanır (Kimura, 1980). Küçük genetik uzaklık ortak atadan yakın zamanda ayrılmaya ve yakın filogenetik ilişkiye işaret etmelidir (Freeman ve Herron, 2002).

### **1.9.3. Ağaçların Değerlendirilmesi**

Birkaç (ya da tüm) olası ağaçları karşıladıktan sonra, sorulması gereken soru: en parsimonik ağacın ne kadar iyi olduğudur. Birçok araştırmacı optimal ağaca yakın ağaç topolojilerini gözle inceler ve optimalden nasıl farklı oldukları üzerine tahmini bir yargıya varırlar. Eğer, optimale yakın ağaçlar, optimal ağaçtan sadece az bakımdan farklıysalar, en optimal ağacı grubun gelişimi konusunda sonuca varmak için kullanmak daha güvenli olabilir. Buna ek olarak, bilgisayar programları çok sayıda ağacı değerlendirebilir ve optimale yakın bütün ağaçlarca desteklenen bir topolojiyi temsil eden bir uyumluluk ağacı oluşturabilirler (Freeman ve Herron, 2002).

#### **1.9.3.1. Seç-bağla Testi (Bootstrapping)**

En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir (Swofford vd., 1996; Huelsenbeck ve Rannala, 1997). Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri seç-bağla testi (bootstrapping) olarak adlandırılır. Seç-bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur.

Örneğin, çalışmada 300 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa, bilgisayar bu pozisyonlardan birini rasgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öge olarak kullanmakla seç-bağla testine başlar. Daha sonra, rasgele seçtiği bir pozisyon, yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı olma şansı  $1/300$ 'dür). Bilgisayar orijinal verinin rasgele bir örneklemesini temsil eden, 300 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlemi tekrarlamak suretiyle araştırmacı, yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesini % 50, % 80 ya da % 100 şeklinde ortaya koyabilir. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusunda ki güvenimiz artmaktadır. Eğer belli bir dal için seç-bağla desteği az ise, araştırmacı genellikle ağacın bu kısmındaki dallama modelini belirleyemediği sonucuna vararak ve bunun sonucunda da yayınladığı ağaçta bu dalı tek düğümden çok-çatallı olarak verir (Freeman ve Herron, 2002).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyaller

Bu çalışmada materyal olarak siğilli kurbağa, *Bufo bufo*, (Linnaeus, 1758) kullanılmıştır. Dünyada Bufonidae familyasına ait türlerin yarısından çoğu *Bufo* cinsine aittir ve Avustralya, Papua Yeni Gine ve Madagasgar hariç Amerika, Avrasya ve Afrika dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde yayılış göstermektedir. Kozmopolit dağılımlarından ve değişik yaşam geçmişlerinden dolayı bu kurbağalar biyocoğrafik ve canlıların gelişimleri ile ilgili çalışmalarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Pramuk vd., 2001). Bufonidae familyası içinde 33 cins ve yaklaşık 450 tür vardır (Frost, 2002). Türün sistematigi ise aşağıdaki gibidir:

Alem	: Animalia
Şube	: Chordata
Altşube	: Vertebrata
Sınıf	: Amphibia
Takım	: Anura
Aile	: Bufonidae
Cins	: Bufo
Tür	: <i>Bufo bufo</i> (Linnaeus, 1758)

#### 2.1.1. Morfolojik Karakterler

Siğilli kurbağa (*Bufo bufo*)’da vücut boyu 10-15 cm. kadar, paratoid bezler çok büyük, göz bebeği yatay, göz irisi altın veya bakır rengindedir. Derileri çok fazla kabarcıklı, sırtta sık ve bariz siğiller bulunur. Erkeklerde ses kesesi yoktur. Bazı parmak altlarında tüberküller çift sıralıdır. Sırt taraf genellikle kahverengi, bazen kırmızımsı veya grimsi olabilir. Bu renk üzerinde daha koyu lekeler vardır. Alt taraf kirli beyaz veya grimsi ve koyu lekeli (Baran ve Atatür, 1998). Vücut rengi bulunduğu çevreye göre değişir. Dişiler erkeklere göre daha kırmızımsı veya kahverengi olur (Beebe ve Griffiths, 2000). Bu çalışmada farklı bölgelerden incelenen *Bufo bufo* türüne ait bazı bireylerin fotoğrafları Şekil 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10’da verilmiştir.



Şekil 3. Rize (Çamlıhemşin)'den yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (dorsal)



Şekil 4. Rize (Çamlıhemşin)'den yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (ventral)



Şekil 5. Artvin (Borçka)'den yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (dorsal)



Şekil 6. Trabzon (Maçka)'dan yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (dorsal)





Şekil 7. Trabzon (Akçaabat)'dan yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (dorsal)



Şekil 8. Giresun'dan yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (dorsal)



Şekil 9. Adapazarı'ndan yakalanan dişi bir *Bufo bufo* bireyi (dorsal)



Şekil 10. İtalya (Sicilya)'dan yakalanan dişi bir *Bufo bufo spinosus* bireyi (dorsal)

*Bufo bufo*'da erkekler daha küçük boydadır. Bunları dişilerden ayırt eden diğer karakterler şunlardır: Ön bacaklar daha kaslı ve dolayısıyla daha kalın yapılıdır; deri çoğunlukla daha az siğillidir; üreme zamanında ön parmakların ilk üçünün iç taraflarında siyah ve dikenli kabarcıklar meydana gelir. Bu kabarcıklar bazen üreme zamanı geçtikten sonra da bir süre kaybolmaz. Normal olarak erkeklerin boyu 10 cm., dişilerin ise 15 cm. kadar olabilir (Özeti ve Yılmaz, 1994).

### 2.1.2. Ekolojik-Biyolojik Özellikler

Karasal bir türdür. Gündüzleri taş altlarında, toprak içindeki delik v.s. gizlenecek yerlerde bulunur. Böcek, solucan, sümüklü böcek gibi avlarını yakalamak için alacakaranlıktan sonra dışarıya çıkar. Avını, dilini dışarıya fırlatmak suretiyle yakalar (dil önden yapışık arkadan serbesttir). Karada hareketi yavaştır; bu hareket kısmen kısa sıçramalar yapmak şeklinde olur. Beslenme ihtiyacı daha fazla olduğundan, genç bireyler gündüzleri nemli yerlerde faaliyet gösterirler (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Karasal bir tür olmakla beraber senede bir defa üremek için suya gider. Sudaki hareketleri (yüzmesi) çeviktir. Tercih ettiği sular çoğunlukla havuz veya gölcüklerdir, bazen sığ sularda da bulunur. Bu ortamda erkekler, dişilere nazaran daha fazla sayıdadır ve ekseriyetle eş bulurken aralarında ses çıkararak kavga yaparlar. Sesleri, küçük bir köpek yavrusunun uzaktan havlamasını andırır (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Amplexus'da, erkek ön bacağıyla dişiyi koltuk bölgesinden kavrar. İki eşin çiftleşmesi bir hafta kadar devam edebilir (soğuk havalarda 15 gün kadar sürebilir). Bu devreden sonra, çiftleşme fırsatı bulamamış erkekler daha bir süre suda kalırlar ve eş edinmek amacıyla ele geçirdikleri diğer kurbağa türlerini yakalarlar (hatta balıkları, cansız objeleri bile).

Yumurtalar her biri birer oviduktan olmak üzere, iki kordon halinde çıkar. Birkaç saat süren bu olayda (kordonların dışarı çıkmasında) erkekler de arka ayaklarıyla yardımcı ederler. Kordonlar dışarı çıktıkça dişi tarafından su birikintileri veya suda bulunan kopmuş ağaç dalları v.s. üzerine sardırılır (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Yumurtalar siyah renkte olup çapları 1.5-2.00 mm. kadardır. Bir kordon içinde yumurtaların dizilişi, bırakıldıkları yere göre değişirse de genellikle 3 – 4 sıralıdır. Eğer suda bol bitki veya çalı varsa bunlara takılan jelatin kordon uzar ve yumurtalar iki sıralı görülürler. Jelatinimsi maddeden yapılmış olan bu saydam müsterek kılıftan başka her bir

yumurtanın etrafında yine jelatinimsi maddeden yapılmış ayrı bir kılıf daha vardır. Kordonların boyu normal olarak üç metreyi aşmaz (bazı yazarlara göre beş metre veya daha fazla olabilir). Bir dişi tarafından bırakılan yumurta sayısı yaklaşık olarak 5000 – 7000 kadardır (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Larvalar tam teşekkül etmeden (dış solungaçları meydana gelmeden ve kuyruk kısımları ancak belli iken) kılıftan çıkarlar. Bu esnada dış kılıf da kısmen erimiş olur. Serbest hale gelen embriyolar, henüz hareketsiz oldukları için bir süre kılıfa yapışık olarak kalırlar (bunları hareketsiz ve yapışık durumda uzun sıralar halinde görmek mümkündür).

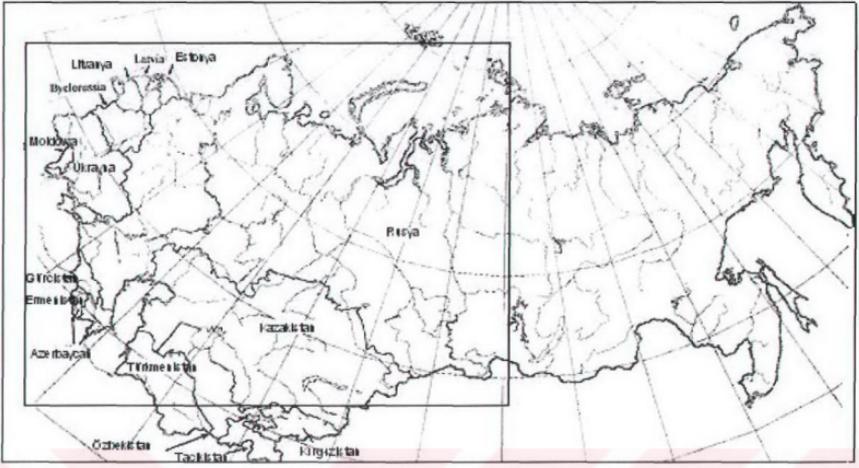
Yaşlı larvalarda bariz olarak görülen spirakulum, vücudun sol tarafında olup geriye ve yukarıya dönüktür. Anüs orta hat üzerinde bulunur. Kuyruğun uç tarafı yuvarlaktır. Ağızdaki gaga kısmı siyahtır. Sırt tarafları siyahımsı kahverengi veya siyahtır; karın tarafı siyahımsı gridir. En büyük larvaları 30 – 32 mm kadar olabilir (bunun yaklaşık 20 mm. si kuyruğa aittir). Labial diş sıraları 2/3 şeklindedir. Alt çenedeki labial dişlerin hepsi ağız genişliği kadardır (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Larvalar iki-üç ay içinde metamorfozlarını tamamlayarak genç yavrular olarak karaya çıkarlar. Kurak mevsimlerde karaya çıkan yavrular kendilerini topraktaki yarıklar içinde veya taşlar altında gizlerler ve kuvvetli bir yağmurdan sonra hepsi birden sürü halinde dışarı çıkarlar. Bazen yanlış olarak, bunların yağmurlarla beraber geldiği zannedilir (kurbağa yağmuru). Cinsi olgunluğa dört yılda erişilir. Erginlerin kış uykusu karada geçer. (Özeti ve Yılmaz, 1994).

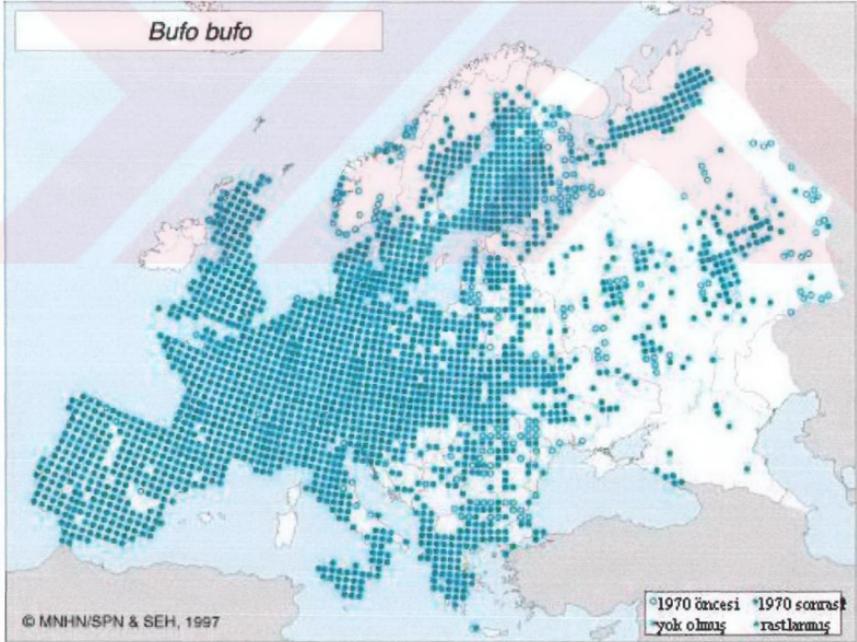
### 2.1.3 Coğrafi Dağılım

Tür, Fas'ın kuzey dağlarını, Cezayir ve Tunus'u içine alan kuzeybatı Afrika'da (Frost, 2002), kuzeyde İskandinavya'ya kadar ve Portekiz'den Sibirya'daki Baykal Gölü'ne kadar yayılmaktadır (Beebee ve Griffiths, 2000). Şekil 11 ve 12'da eski Sovyetler Birliği'ndeki ve Avrupa'daki dağılımı harita üzerinde görülmektedir. Vertikal dağılışı 3000 m.'ye kadar çıkar (Özeti ve Yılmaz, 1994; Baran ve Atatür, 1998).

Yurdumuzda bu türe ait kayıtlarda, bu zamana kadar bahsedilen yerler Kuzeybatı Anadolu, Trakya, Ege, Karadeniz sahilleri ve Akdeniz bölgesinin sahil kısımlarıdır (Özeti ve Yılmaz, 1994).



Şekil 11. *Bufo bufo*'nun eski Sovyetler Birliği'ndeki yayılış alanı (Kuzmin, 1999).



Şekil 12. *Bufo bufo*'nun Avrupa'daki yayılış alanı (Gasc vd., 1997).

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Örneklerin Toplandığı Alan

Bu çalışmada incelenen *Bufo bufo* örneklerinin toplandığı yerler; Artvin (Erenköy, Borçka), Rize (Fındıklı, Çamlıhemşin, Karasu, Gündoğdu), Trabzon (Araklı, Akçaabat, Yeşilova, Maçka), Mersin (Mezitli), Giresun ve Giresun Adası. Ayrıca İtalya'nın Matera (Garaguso), Yunanistan'ın Metsova (Pindos Dağları) kentlerinden *Bufo bufo* örnekleri ve Sicilya (İtalya)'dan *B. b. spinosus* örnekleri elde edilmiştir (Şekil 13).



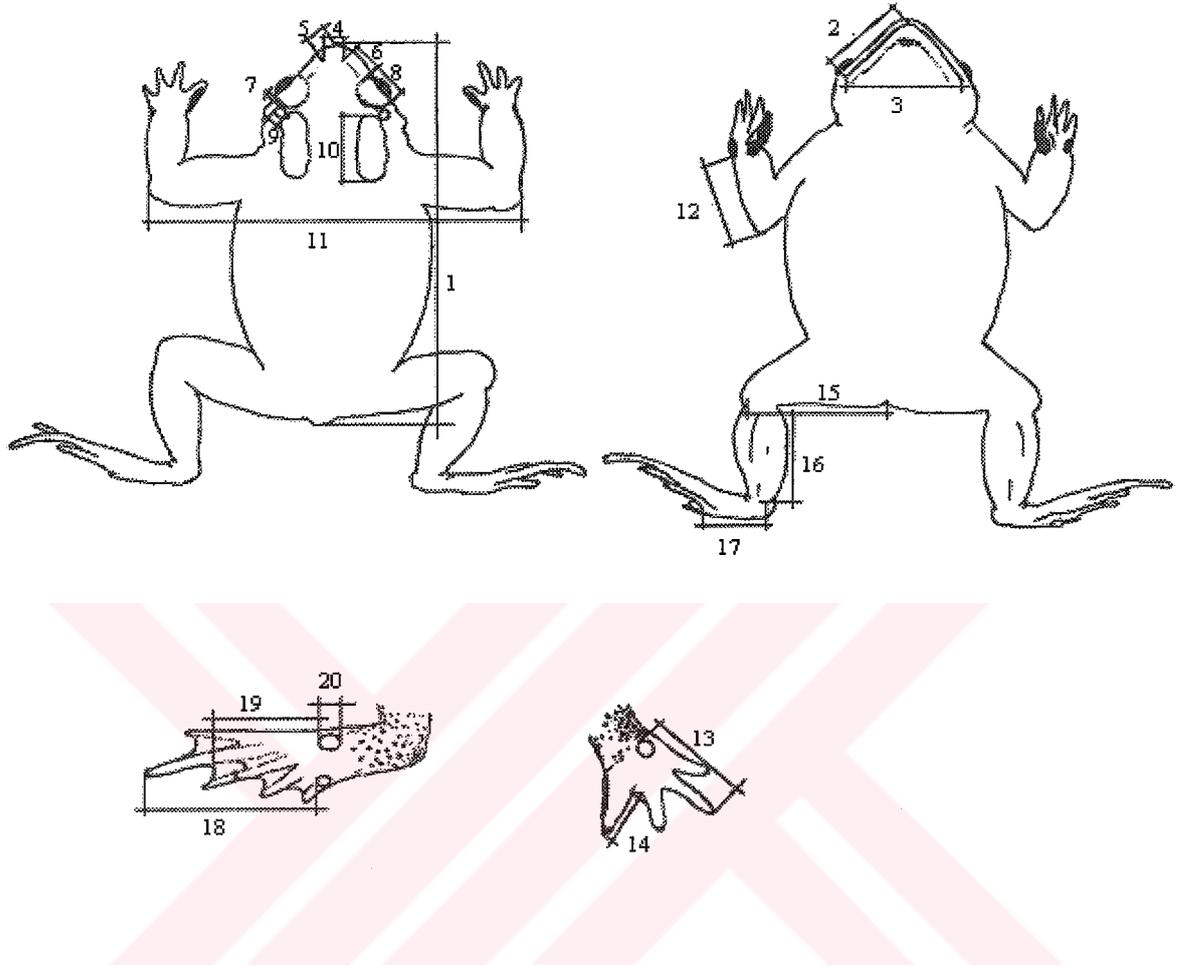
Şekil 13. Analiz edilen 29 *Bufo bufo* bireyinin elde edildiği lokaliteler (rakamlar Tablo 8'deki popülasyon numaralarıdır)

### 2.2.2. Örneklerin Toplanması ve Morfolojik Ölçümler

Çalışma süresince yakalanan ve daha önceden yakalanmış K.T.Ü. ve Torino Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Laboratuvarlarında saklanan toplam 95 (43 erkek, 52 dişi) örnek incelenmiştir. Bu örneklerle ait bilgiler ve buldukları laboratuvarlar Tablo 1'de verilmiştir. Castellano ve Giacoma (1998)'nin kullandığı temel karakterler esas alınarak her bir örnekten 20 farklı ölçüm alınmıştır (Şekil 14).

Tablo 1. Analiz edilen *Bufo bufo* bireylerine ait bilgiler

Ülke	Şehir	Lokalite	Dişi	Erkek	Larva	Laboratuvar
Türkiye	Artvin	Erenköy	2	4	-	K.T.Ü.
		Borçka	3	-	-	K.T.Ü.
	Rize	Çamlıhemşin	1	-	-	K.T.Ü.
		Fındıklı	4	1	-	K.T.Ü.
		Gündoğdu	1	-	-	K.T.Ü.
		Karasu	3	-	-	K.T.Ü.
	Trabzon	Yomra	-	1	-	K.T.Ü.
		Tonya	1	-	-	K.T.Ü.
		Çarşıbaşı	1	1	-	K.T.Ü.
		Mersin	-	1	-	K.T.Ü.
		Uzungöl	1	-	-	K.T.Ü.
		Of	1	-	-	K.T.Ü.
		Kayabaşı	1	-	-	K.T.Ü.
		Araklı	1	-	-	K.T.Ü.
		Vakfıkebir	3	-	-	K.T.Ü.
		Sis Dağı	2	-	-	K.T.Ü.
		Yeşilova	3	1	-	K.T.Ü.
		Akçaabat	1	-	-	K.T.Ü.
		Maçka	3	5	-	K.T.Ü.
		Sürmene	1	1	-	K.T.Ü.
	Giresun	Merkez	3	-	-	K.T.Ü.
	Adapazarı	Merkez	2	-	-	K.T.Ü.
	Mersin	Mezitli	3	-	-	K.T.Ü.
İtalya	Asti		1	7	-	Torino Ü.
	Mugello		1	6	-	Torino Ü
	Bergamo	S. Felice al Logo	3	2	-	Torino Ü
	Varese	Cuasso al Monte	4	7	-	Torino Ü
	Lecco	Onno	1	6	-	Torino Ü
	Matera	Garaguso	-	-	5	K.T.Ü.
	Sicilya		1	-	-	K.T.Ü.
Yunanistan	Metsova	Pindos Dağları	-	-	2	K.T.Ü.



Şekil 1. Castellano ve Giacoma (1998)'nin kullandığı temel karakterler esas alınarak ölçülen 20 morfolojik karakter. Bireylerin kaydedilen vücut ölçüleri: (1) VU, Vücut uzunluğu; (2) BU, Baş uzunluğu; (3) BG, Baş genişliği; (4) BDA, Burun delikleri arası mesafe; (5) BD-BUA, Burun deliği-burun ucu mesafesi; (6) BD-G, Burun delikleri-göz arası mesafe; (7) GÖZ-TYM, Göz-tympanium arası mesafe; (8) GÇ, Gözün çapı; (9) TÇ, Timpanium çapı; (10) PU, Parotoid uzunluğu; (11) (D-D), Dirsekler arası mesafe; (12) D-B, Dirsek-bilek arası mesafe; (13) ÖNAY, Ön ayak uzunluğu; (14) 1.PARU, 1. parmak uzunluğu; (15) FU, Femur uzunluğu; (16) TU, Tibia uzunluğu; (17) TAU, Tarsus uzunluğu; (18) AAU, Arka ayak uzunluğu; (19) DMT-2.P, DMT-2.perde arası mesafe; (20) DMTU, Dış metatarsal tüberkül uzunluğu.



### 2.2.3. Nümerik Analizler

Toplam yedi lokaliteden elde edilen 95 (43 erkek, 52 dişi) bireyin ölçülen 20 farklı karakter bakımından eşeyler ve lokaliteler arasında fark olup olmadığı Varyans Analizi Tablosu (ANOVA) kullanılarak hesaplanmıştır. İki den fazla ana kütle aritmetik ortalamasının karşılaştırılması ile ilgili testte izlenecek süreç ANOVA tablosu ile özetlenebilir. Buna göre F test istatistiği varyans analizi yardımıyla kullanılır: Farklı ana kütlelerden seçilen örnek aritmetik ortalamaları arasındaki farkların karelerinin ortalaması, her bir örneğin kendi içindeki farkların karelerinin ortalamasına bölünür. F test istatistiği belirlendikten sonra sonuca varılır.

Faktör analizi için öncelikle 52 dişi birey üzerinde ölçülen 20 morfolojik karakter kullanılarak 20 x 20 boyutunda bir veri matrisi elde edilmiş ve Temel Bileşenler Analizi (PCA) adı verilen faktör çıkartma (extraction) metodu kullanılarak yapılmıştır. Rotasyon tekniği olarak ise bir faktör üzerindeki büyük yüklerin dağıldığı değişken sayılarını minimum yapan Varimax tekniği kullanılmıştır. Faktör analizi veriler arasındaki ilişkilere dayanarak verilerin daha anlamlı ve özet bir biçimde sunulmasını sağlayan bir çok değişkenli istatistiksel analiz türüdür. Amaç esas olarak değişkenler arasındaki karşılıklı bağımlılığın kökenini araştırmaktır.

Ayrırma analizinde ise stepwise ve Mahalanobis uzaklık metodları kullanılmıştır. Bu analiz, iki veya daha fazla sayıdaki grubun ayırımı ile ilgilenen birçok değişkenli ilgi analizidir. Amaçları arasında analiz öncesi tanımlanmış iki veya daha fazla sayıda grubun ortalama nitelikleri arasında önemli farkların olup olmadığının test edilmesi, gruplar arasındaki farka her bir değişkenin katkısının saptanması ve grup içi değişime oranla gruplar arasındaki ayırımı maksimize eden tahmin değişkenleri kombinasyonunun belirlenmesi sayılabilir (Kurtuluş, 1985; Field, 2000).

Yukarıda izah edilen bütün sayısal analizler (ANOVA, PCA ve Diskriminant) SPSS bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. PCA, incelenen bireylerdeki varyasyonu en iyi açıklayan karakterleri belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bunun için ilk olarak her bir verinin on tabanına göre logaritması alınarak standardize edilmiştir. Oluşturulan korelasyon matrisinden temel bileşen analizi yoluyla her değişkeni en iyi tanımlayan özdeğerleri (Eigenvalue) belirlenmiştir. Daha sonra incelenen bireylerdeki varyasyonu en iyi açıklayan bileşenler ve bu bileşenler üzerinde en etkili olan karakterler belirlenmiş ve bu bileşenlere göre grafikleri çizilmiştir.

## 2.2.4. Moleküler Analizler

### 2.2.4.1. Kurbağa Parmaklarından Genomik DNA'ların İzolasyonu

Genomik DNA'ların izolasyonu, bireylerin parmak uçlarından alınan kas örneklerinden Promega Wizard Genomic DNA Purification ve Qiagen kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kullanılıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 2.2.4.2. Mitokondriyal 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması ve DNA Dizin Analizi

16S rRNA, saflaştırılan genomik DNA'dan 16L10 (5'- AGT GGG CCT AAA AGC AGC CA -3') forward primeri ile 16H1 (5'- CTC CGG TCT GAA CTC AGA TCA CGT AGG-3') revers primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) ile çoğaltıldı (Hay vd., 1995). Reaksiyon karışımı, 5  $\mu\text{l}$  (10X) PCR tamponu, 4,5  $\mu\text{l}$  (2 mM) dNTP'lerden, 1'er  $\mu\text{l}$  forward ve reverse primer DNA'sı (10 mM), 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), 0,5  $\mu\text{l}$  Taq DNA (2,5 u) ve 50  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanacak şekilde ddH<sub>2</sub>O ilave edilerek hazırlandı. PCR reaksiyonu ise denaturasyon için  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 15 saniye bekletildikten sonra,  $50^{\circ}\text{C}$ 'de 15 saniye,  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 45 saniye ve  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 1 dakikaya ayarlanarak 35 döngü şeklinde yapıldı. PCR reaksiyonu sonucu oluşan ürün % 1,2'lik agaroz jelde yürütüldü.

Yukarıda açıklanan primerler kullanılarak genomik DNA'dan artırılan mitokondriyal 16S rRNA genleri bir TA klonlama vektörü olan pGEM-T (Promega) vektörüne klonlandı. Doğruluğu teyit edilen klonların DNA dizin analizi, universal M13 primerleri kullanılarak Davis Sequencing ve Macrogen firmalarında gerçekleştirildi.

## 2.3. DNA Dizin Analizi Sonucunda Evrimsel Ağaçların Oluşturulması

Elde edilen baz dizileri çeşitli metotlar kullanılarak analiz edilmiştir: PAUP\* 4.0b10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, \* and other methods; Swofford, 1998) paket programı kullanılarak maksimum parsimoni, maksimum olasılık ve genetik uzaklık; TCS (Clement vd., 2000) programı kullanılarak tür içi varyasyon analizi ve MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001) kullanılarak Bayesian analizleri yapılmıştır. Ayrıca filogenetik analizler için en uygun baz değişim modelini bulmak için PAUP\* ile birlikte

Modeltest 3.6 (Posada ve Crandall, 1998), baz dizilerinin bu programlar için uygun formatlara dönüştürülmesi için Clustal X ve Clustal W (Thompson vd., 1997) programları ve ağaç dosyalarını görüntülemek için TreeView programları kullanılmıştır.

### **2.3.1. Modeltest 3.6 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması**

En uygun evrimsel baz değişim modeli Modeltest (Posada ve Crandall, 1998), programını kullanılarak, hRLT (Hierarchical Likelihood Ratio Tests) değerlerine göre karar verilmiştir.

### **2.3.2. TCS (The Method of Templeton, Crandall and Sing) Analizi**

DNA baz dizisi öncelikle Nexus formatına dönüştürülmüş, TCS (Clement vd., 2000) programı kullanılarak haplotipler belirlenmiş ve tür içi varyasyonu gösteren bir ağ oluşturulmuştur.

### **2.3.3. Maksimum Parsimoni**

Elde edilen baz dizileri, PAUP\* 4.0b10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, \* and other methods; Swofford, 1998) paket programı kullanılarak maksimum parsimoni, maksimum olasılık analizleri yapılmış ve genetik uzaklık matrisleri hesaplanmıştır.

Maksimum parsinomi analizi, hüristik (buluşsal, heuristic search) metoda göre Modeltest'te bulunan baz değişim modelini (HKY85) dikkate alarak 10000 rasgele ilave tekrarlar oluşturularak, TBR (Tree-bisection-reconnection) ve MulTree yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Seç-bağla testi (Bootstrapping) ise 1000 tekrar ile yapılmıştır.

### **2.3.4. Maksimum Olasılık ve Genetik Uzaklık**

Maksimum olasılık analizi hüristik metoda göre HKY85 modelini dikkate alarak 10000 rasgele ilave kopya, TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi ve 1000 tekrarlı seç-bağla testi ile yapılmıştır. Genetik uzaklık analizi ise yine HKY85 baz değişim modeline göre hüristik metoda göre yapılmıştır.

### **2.3.5. Bayesian Analizi**

Nexus formatına dönüştürülen DNA baz dizilerinden oluşan veri dosyası, Modeltest analizi sonucunda bulunan baz değişim modelini kullanarak MrBayes programı (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001) ile Bayesian analizi yapılmıştır. Analizde dört Markov zinciri (MCMC) kullanılmış ve her bir zincirde her 100. rnek kaydedilmiştir.

### **2.3.6. TreeView Programı**

Filogenetik analizler sonucu oluşan ağağların görüntülenmesi için TreeView programı kullanılmıştır.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Nümerik Analizler

##### 3.1.2. Varyans Analizi (ANOVA)

Nümerik analizler; İtalya, Trabzon, Giresun, Mersin, Rize, Artvin ve Adapazarı olmak üzere toplam 7 bölgeden elde edilen 95 *Bufo bufo* örneğinden ölçülen 20 farklı morfolojik karakter kullanılarak yapılmıştır. Yapılan ANOVA analizi sonucu timpanium çapı (TÇ), ön ayak uzunluğu (ÖNAY), arka ayak uzunluğu (AAU), dış metatarsal tüberkül-2. perde arası mesafe (DMT-2.P) karakterleri hariç (TÇ:  $F= 0,12$ ,  $p>0,05$ ; ÖNAY:  $F=0,91$ ,  $p>0,05$ ; AAU:  $F=6,12$ ,  $p>0,05$ ; DMT-2.P:  $F= 2,87$ ,  $p>0,05$ ) tüm karakterler bakımından dişi ve erkekler arasında fark olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Her iki eşeyin tüm karakterler bakımından ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Dişi ve erkek bireyler arasında önemli farklılıklar olduğundan diğer analizler için dişi bireyler kullanılmıştır. Dişi bireylerin ölçülen 20 karakterin bölgelere göre ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 3’de verilmiştir. Yapılan ANOVA testi sonucunda baş genişliği (BG,  $F=2,36$ ,  $p<0,05$ ), burun deliği-burun ucu mesafesi (BD-BUA,  $F=14,57$ ,  $p<0,01$ ), timpanium çapı (TÇ,  $F=3,80$ ,  $p<0,01$ ) ve tibia uzunluğu (TU,  $F=2,94$ ,  $p<0,05$ ) hariç diğer tüm karakterler bakımından bölgeler arasında fark olmadığı bulunmuştur. Yapılan Tukey testi sonucunda ise sadece BD-BUA özelliği bakımından İtalya örnekleri bir grupta, diğerleri farklı grupta yer almıştır.

##### 3.1.3. Faktör Analizi

Faktör analizi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada Varimax rotasyon çözümü metodu ile ölçülen 20 morfometrik özelliği açıklayabilmek için kaç faktörün yeterli olduğuna karar verilmiştir. Kullanılacak açıklayıcı değişkenlerin faktör analizi uygulamaya elverişli olup olmadığı Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) ve Bartlett küresellik testleriyle ölçülmüştür. Bu test sonuçlarına göre ölçülen değerlerin faktör analizi yapmaya uygun olduğu belirlenmiştir (K-M-O değeri: 0,93, Bartlett Testi’nde Khi-kare: 1105,  $p<0,01$ ).

Tablo 2. *Bufo bufo* bireylerinin 20 farklı vücut ölçüsünün ortalama ve standart sapma (s.d.) değerleri (mm) (Karakterlerin açıklaması Şekil 14’de verilmiştir)

Karakter	Erkek (N=43)		Dişi (N=52)	
	Ortalama	s.d.	Ortalama	s.d.
1. VU	76,2	5,4	93,0	16,2
2. BU	18,9	2,2	22,5	4,8
3. BG	25,3	2,4	30,2	8,2
4. BDA	5,0	0,6	5,7	1,1
5. BD-BUA	4,9	1,2	4,1	1,6
6. BD-G	4,1	0,8	5,1	1,1
7. GÖZ-TYM	2,4	0,6	3,2	1,0
8. GÇ	7,5	0,8	8,7	2,1
9. TÇ	3,6	4,1	3,8	1,5
10. PU	15,5	2,1	19,3	4,0
11. D-D	65,3	6,5	75,0	12,5
12. D-B	21,6	2,4	25,6	4,8
13. ÖNAY	22,2	21,9	25,2	4,7
14. 1.PARU	7,7	1,1	11,1	3,5
15. FU	31,0	3,6	39,4	7,2
16. TU	26,2	3,7	29,5	5,4
17. TAU	18,3	2,0	23,1	4,4
18. AAU	33,0	2,8	36,1	7,9
19. DMT-2.P	20,6	2,5	21,9	4,4
20. DMTU	3,7	0,7	4,4	1,1

Tablo 3. Dişi *Bufo bufo* bireylerinin 20 farklı vücut ölçüsünün bölgelere göre ortalama (ort.) ve standart sapma (s.d.) değerleri (mm)

Karakter	İtalya	Trabzon	Giresun	Mersin	Rize	Artvin	Adapazarı
	Ort. (s.d.)	Ort. (s.d.)	Ort. (s.d.)	Ort. (s.d.)	Ort. (s.d.)	Ort. (s.d.)	Ort. (s.d.)
VU	98,0 11,4	87,1 11,8	82,9 10,8	101,3 6,2	93,7 17,4	95,8 13,6	115,1 11,6
BU	23,6 2,7	20,3 5,8	21,8 3,6	23,5 2,3	23,6 4,9	24,2 4,0	27,0 0,2
BG	34,9 4,7	25,6 9,8	27,5 6,2	32,5 2,0	31,7 7,4	32,5 5,3	37,5 0,7
BDA	6,5 0,7	5,2 0,9	4,9 0,5	5,9 0,8	5,5 1,2	5,9 1,0	6,2 1,5
BD-BUA	6,6 0,6	3,4 1,2	3,1 0,2	3,7 0,2	3,2 0,6	3,7 0,8	4,8 1,2
BD-G	5,7 0,6	4,7 1,3	4,7 0,9	5,2 1,1	4,9 0,9	5,2 1,3	6,8 0,7
GÖZ- TYM	3,3 0,8	3,0 1,0	3,0 1,0	3,7 0,5	3,0 0,8	3,8 1,3	4,1 0,5
GÇ	7,8 2,7	9,0 1,9	9,0 1,2	6,2 3,0	9,5 1,7	9,2 1,1	9,4 1,9
TÇ	4,9 1,8	3,2 0,7	2,9 0,6	6,1 4,0	3,3 0,6	3,8 1,0	4,3 0,1
PU	18,0 2,7	18,2 4,2	19,4 2,4	24,5 1,1	19,5 5,3	19,9 3,5	22,7 2,9
D-D	81,1 12,5	69,9 14,0	70,5 10,6	74,7 4,0	75,1 11,6	79,6 8,6	86,7 3,3
D-B	26,1 2,9	23,7 5,7	24,3 4,5	26,8 2,2	26,1 4,0	28,6 4,3	32,1 0,7
ÖNAY	24,7 3,7	23,6 4,7	25,4 4,5	27,6 2,3	25,8 5,2	27,7 5,8	29,8 4,1
1.PARU	10,1 1,6	10,6 3,1	9,6 2,6	11,7 0,9	10,5 2,2	14,3 7,4	13,6 0,6
FU	40,4 7,6	37,4 8,4	37,4 6,0	41,3 0,3	39,7 7,3	40,9 4,9	47,4 3,0
TU	33,2 3,8	26,5 5,5	27,1 4,9	30,3 24,1	29,3 3,5	31,9 7,0	34,8 1,3
TAU	21,8 3,8	22,3 5,3	22,0 4,1	24,1 1,5	24,2 3,9	25,4 4,0	26,8 0,7
AAU	31,5 10,6	34,7 7,9	35,6 6,7	37,7 2,0	99,5 5,8	40,7 5,0	40,4 2,8
DMT-2.P	22,3 2,5	20,4 3,6	20,1 4,4	22,0 0,3	23,0 4,0	23,7 3,9	25,1 2,7
DMTU	4,6 0,9	4,1 1,2	4,0 0,9	4,7 0,8	4,3 0,8	4,5 1,1	6,2 0,7

Başlangıç çözümünde Temel Bileşenler Analizi (PCA) adı verilen faktör çıkartma metodu kullanılmıştır. Bu analizde ilk işlem standardize edilen ham verilerden 20 x 20 boyutunda bir simetrik korelasyon matrisinin hesaplanmasıdır (Tablo 4). Elde edilen bu matrisin faktör sayısına karar vermede kullanılan öz değerler (Eigenvalue), varyans ve eklemeli varyans değerleri hesaplanmıştır. Genel bir kural olarak, öz değeri 1'den büyük olan faktörler seçilmiştir. Faktör analizi başlangıç çözümünün istatistiki sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. Böylece 52 dişi bireye ait 20 değişken yerine bunlardan daha az sayıda olan ve bileşen olarak adlandırılan yeni değişkenler elde edilmiştir.

Buna göre öz değer, varyans ve eklemeli varyans kriterleri göz önüne alınarak 3 faktörün yeterli olduğuna karar verilmiştir. Bu 3 ana faktör varyansın % 78'ini açıklamaktadır. Birinci ana faktör toplam varyansın % 63,4'ünü, ikinci ana faktör % 9'unu ve üçüncü ana faktör ise % 5,2'sini açıklamaktadır. Tablo 6'de varimax metoduna göre faktör analizi rotasyon sonuçları ve değişkenler verilmiştir.

Faktörlerin isimlendirilmesinde değişkenlerden faktör yükü 0,5 ve üzerinde olanlar değerlendirmeye alınmıştır. Tablo 6'de ayrıca bağımlılık oranı verilmiştir. Toplum bağımlılık oranının yüksek çıkması elde edilen sonuçların istatistiki olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Örneğin belirlenen 3 faktör vücut boyu (VU) değişkeninin % 94'ünü, femur uzunluğunun (FU) ise % 89'unu açıklamaktadır.

Toplam değişimin % 63,4'ünü açıklayan birinci faktörde gözün çapı, 1. parmağın uzunluğu (1.PARU), arka ayak uzunluğu (AAU), baş uzunluğu (BU) ve genişliği (BG) değişkenleri hariç geri kalan 16 değişkenin faktör yükü yüksek çıkmıştır.

İkinci ana faktörde gözün çapı (GÇ), 1. parmağın uzunluğu (1.PARU) ve arka ayak uzunluğu (AAU) değişkenlerinin faktör yükleri yüksek çıkmıştır. Bu faktör ölçülen tüm değişkenlerin % 9'unu açıklamaktadır.

Üçüncü ana faktör ise bireylerin baş boyu ve genişliği (BU ve BG) değişkenlerini açıkladığı için baş ölçümleri ile ilgili faktördür. Toplam değişimin % 5'ini açıklayan bu faktörün bağımlılık oranı da oldukça yüksektir (% 85 ve % 78).

PCA analizi sonucu oluşan faktör skorlarından yararlanılarak oluşturulan grafikte her bölgeye ait bireylerin birinci ve ikinci bileşen üzerindeki izdüşümleri verilmiştir (Şekil 15). Grafikte görüldüğü gibi bölgeler arasında tam bir gruplaşma meydana gelmemesine rağmen, İtalya örneklerini diğerlerinden ayıran kısmi bir gruplaşma olduğu dikkati çekmektedir.



Tablo 4. Faktör analizinde oluşturulan korelasyon matrisi. (1) VU, Vücut uzunluğu; (2) BU, Baş uzunluğu; (3) BG, Baş genişliği; (4) BDA, Burun delikleri arası mesafe; (5) BD-BUA, Burun deliği-burun ucu mesafesi; (6) BD-G, Burun delikleri-göz arası mesafe; (7) GÖZ-TYM, Göz-tympanium arası mesafe; (8) GÇ, Gözün çapı; (9) TÇ, Tympanium çapı; (10) PU, Parotoid uzunluğu; (11) (D-D), Dirsekler arası mesafe; (12) D-B, Dirsek-bilek arası mesafe; (13) ÖNAY, Ön ayak uzunluğu; (14) 1.PARU, 1. parmak uzunluğu; (15) FU, Femur uzunluğu; (16) TU, Tibia uzunluğu; (17) TAU, Tarsus uzunluğu; (18) AAU, Arka ayak uzunluğu; (19) DMT-2.P, DMT-2.perde arası mesafe; (20) DMTU, Dış metatarsal tüberkül uzunluğu

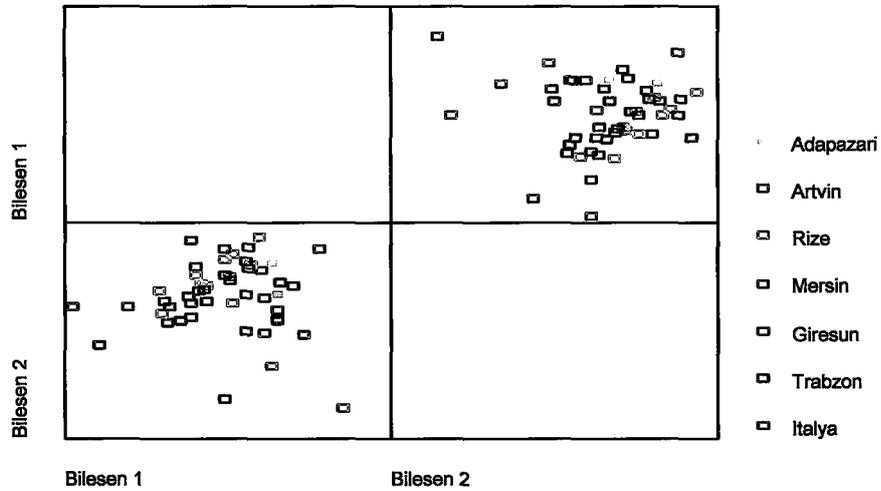
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1,000																			
2	,589	1,000																		
3	,387	,797	1,000																	
4	,871	,643	,495	1,000																
5	,620	,479	,409	,688	1,000															
6	,867	,649	,452	,780	,746	1,000														
7	,802	,546	,389	,712	,585	,845	1,000													
8	,185	-,026	-,069	,110	-,137	,092	,183	1,000												
9	,548	,464	,383	,620	,623	,626	,574	-,124	1,000											
10	,797	,493	,317	,698	,404	,665	,656	,153	,470	1,000										
11	,915	,549	,363	,827	,636	,806	,692	,173	,491	,739	1,000									
12	,905	,585	,433	,791	,616	,825	,759	,132	,512	,781	,899	1,000								
13	,899	,524	,307	,785	,394	,724	,717	,266	,417	,764	,854	,851	1,000							
14	,697	,423	,320	,559	,313	,526	,670	,109	,208	,602	,609	,659	,667	1,000						
15	,914	,538	,318	,773	,550	,768	,752	,227	,466	,773	,889	,896	,878	,660	1,000					
16	,858	,570	,440	,833	,671	,775	,709	,094	,615	,718	,859	,873	,814	,576	,832	1,000				
17	,835	,530	,345	,724	,372	,722	,748	,260	,449	,722	,841	,847	,835	,659	,840	,728	1,000			
18	,318	,223	,052	,253	,002	,247	,252	,104	,156	,433	,417	,421	,347	,330	,305	,300	,514	1,000		
19	,805	,491	,319	,689	,568	,747	,647	,176	,451	,700	,867	,873	,774	,523	,795	,770	,778	,390	1,000	
20	,916	,543	,322	,771	,588	,799	,727	,203	,513	,761	,869	,883	,854	,651	,888	,824	,789	,333	,791	1,000

Tablo 5. Faktör analizi başlangıç çözüm istatistik sonuçları

Faktör No	Öz Değer (Eigenvalue)	% Varyans	Eklemeli Varyans %
1	12,68	63,39	63,39
2	1,80	9,00	72,39
3	1,04	5,21	77,60
4	0,93	4,67	82,27
5	0,71	3,54	85,81
6	0,55	2,72	88,53
7	0,44	2,20	90,74
8	0,32	1,61	92,35
9	0,29	1,43	93,79
10	0,25	1,28	95,06
11	0,20	0,98	96,05
12	0,16	0,82	96,87
13	0,15	0,74	97,61
14	0,13	0,63	98,24
15	8,83E-02	0,44	98,68
16	7,77E-02	0,39	99,07
17	6,7E-02	0,34	99,40
18	5,41E-02	0,27	99,67
19	3,67E-02	0,18	99,86
20	2,88E-02	0,14	100

Tablo 6. Faktör analizi rotasyon çözümü

Değişken	Bileşenler			Bağımlılık Oranı
	1	2	3	
VU	0,90	0,34	0,19	0,94
BU	0,42	0,16	0,81	0,87
BG	0,24	2,27E-02	0,90	0,86
BDA	0,83	0,16	0,33	0,82
BD-BUA	0,81	-0,35	0,25	0,83
BD-G	0,87	0,10	0,29	0,84
GÖZ-TYM	0,77	0,24	0,24	0,71
GÇ	8,67E-02	0,52	-0,31	0,37
TÇ	0,68	-0,25	0,31	0,62
PU	0,69	0,45	0,19	0,71
D-D	0,86	0,36	0,16	0,89
D-B	0,84	0,38	0,24	0,91
ÖNAY	0,77	0,50	0,12	0,86
1.PARU	0,50	0,52	0,24	0,58
FU	0,85	0,40	0,11	0,89
TU	0,86	0,20	0,24	0,84
TAU	0,69	0,58	0,20	0,86
AAU	0,12	0,68	0,17	0,50
DMT-2.P	0,79	0,35	0,12	0,76
DMTU	0,86	0,35	0,12	0,87



Şekil 15. Faktör analizi sonucu oluşan her bölgeye ait bireylerin birinci ve ikinci bileşen üzerindeki izdüşümleri

### 3.1.4. Ayırma (Diskriminant) Analizi

Faktör analizi sonucu görülen kısmi ayrılığı test etmek amacıyla dişi bireyler, İtalya ve diğer bölgeler olmak üzere iki grup olarak ayırma analizine tabi tutulduğunda, tek fonksiyonla bu ayırmanın istatistiksel olarak önemli olduğu (Wilks's Lambda= 0,194, df= 4,  $p<0,001$ ) ve bireylerin % 100 doğru olarak gruplandığı görülmüştür (özdeğer: 4,144, korelasyon katsayısı: 0,90). Stepwise metodu altında uygulanan Mahalanobis uzaklık metoduna göre bu ayırma sırasında sırasıyla BD-BUA (burun deliği-burun ucu mesafesi), GÖZ-TYM (Göz-timpanium arası mesafe), D-D (dirsekler arası mesafe) ve TU (tibia uzunluğu) özelliklerinin rol oynadığı belirlenmiştir. Bu karakterlerin standardize edilmiş ayırma fonksiyon katsayıları Tablo 7'de verilmiştir. Analizde tek fonksiyon kullanıldığı için grafiksel özeti oluşturulamamıştır.

Tablo 7. Dişi *Bufo bufo* bireylerine ait standardize edilmiş ayırma fonksiyon katsayıları

	Fonksiyon 1
BD-BUA	1,737
GÖZ-TYM	-0,660
D-D	-2,110
TU	1,420
Özdeğer	4,144
Varyans (%)	100

## 3.2. Moleküler Analizler

### 3.2.1. DNA Dizin Analizi

Bu çalışmada 16 popülasyondan toplam 29 bireyin 16S ribosomal RNA geninin 936 bazlık kısmının DNA dizin analizi yapılmıştır. Kullanılan örneklerin elde edildiği lokasyonlar ve mitokondriyal haplotiplerin listesi Tablo 8'da ve gen sıraları Tablo 9'da verilmiştir. Bu gen sıraları ayrıca GenBank'da AY555020 – AY555025 ve AY840225-AY840247 numaraları arasında kayıt edilmiştir.

Tablo 8. *Bufo bufo* bireylerinin elde edildiği lokasyonlar ve mitokondriyal haplotiplerin listesi.

Populasyon no	Lokasyon (ülke)	n	Haplotip	Tür	Genbank kodu
1	Erenköy, Artvin (Türkiye)	1	ERE	<i>B. bufo</i>	AY555023
2	Borçka, Artvin (Türkiye)	1	BOR	<i>B. bufo</i>	AY840247
3	Fındıklı, Rize (Türkiye)	1	FIN	<i>B. bufo</i>	AY555024
4	Gündoğdu, Rize (Türkiye)	1	GUN	<i>B. bufo</i>	AY840244
5	Karasu, Rize (Türkiye)	1	GUN	<i>B. bufo</i>	AY840246
6	Çamlıhemşin, Rize (Türkiye)	1	CAM	<i>B. bufo</i>	AY840245
7	Araklı, Trabzon (Türkiye)	1	ARA	<i>B. bufo</i>	AY555025
8	Sümela, Trabzon (Türkiye)	3	SUM1	<i>B. bufo</i>	AY840231
			SUM2		AY840232
			SUM3		AY840233
9	Akçaabat, Trabzon (Türkiye)	1	AKC	<i>B. bufo</i>	AY840234
10	Yeşilova, Trabzon (Türkiye)	1	AKC	<i>B. bufo</i>	AY840235
11	Giresun (Türkiye)	3	GIR1	<i>B. bufo</i>	AY840238
			GIR2		AY840237
			GIR3		AY840236
12	Adapazarı (Türkiye)	2	ADA1	<i>B. bufo</i>	AY840242
			ADA2		AY840243
13	Mersin (Türkiye)	3	MER1	<i>B. bufo</i>	AY840239
			MER2		AY840240
			MER3		AY840241
14	Metsova (Yunanistan)	3	MET1	<i>B. bufo</i>	AY555022
			MET2		AY840230
15	Matera (İtalya)	5	MAT1	<i>B. bufo</i>	AY555021
			MAT2		AY840227
			MAT3		AY840228
16	Sicilya (İtalya)	1	MAT1	<i>B. b. spinosus</i>	AY555021



















Tablo 9'un devamı;

AY325988	-----T-----	-----A-----	-----C--A	-----C--A	-----TC--AG	630
<i>B. viridis</i>	-----CT-----	-A-AC-C--T	-----C-A	-----CTTC--	-----TC--AG	
Konsensus	CAGTATGACT	GCGAGTTTTT	GGTTGGGGTG	ACCACGGAGC	ACAATACAAC	CTCCATGCTG AAAGAA..AA
AY555021	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840227	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840228	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY555022	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY555023	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY555024	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY555025	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840230	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840231	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840232	-----	-----	-----	-----	-----A-----	-----
AY840233	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----
AY840234	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840236	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840237	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840238	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----
AY840239	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840240	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840241	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----
AY840242	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840243	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840244	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840245	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY840247	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY325988	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>B. viridis</i>	-----ATA-----	-----G-----	-----T-C-----	-----T-----	-----TC-T	700









Tablo 9'un devamı;

AY840231	-----	-----	-----
AY840232	-----	-----	-----
AY840233	-----	-----	-----
AY840234	-----	-----	-----
AY840236	-----	-----	-----
AY840237	-----	-----	-----
AY840238	-----	-----	-----
AY840239	-----	-----	-----
AY840240	-----	-----	-----
AY840241	-----	-----	-----
AY840242	-----	-----	-----
AY840243	-----	-----	-----
AY840244	-----	-----	-----
AY840245	-----	-----	-----
AY840247	-----	-----	-----
AY325988	.....	.....	.....
<i>B. viridis</i>	-----	-----	-----

### 3.2.2. DNA Dizilerinin Clustal X ve Clustal W Programları Kullanılarak Karşılaştırılması

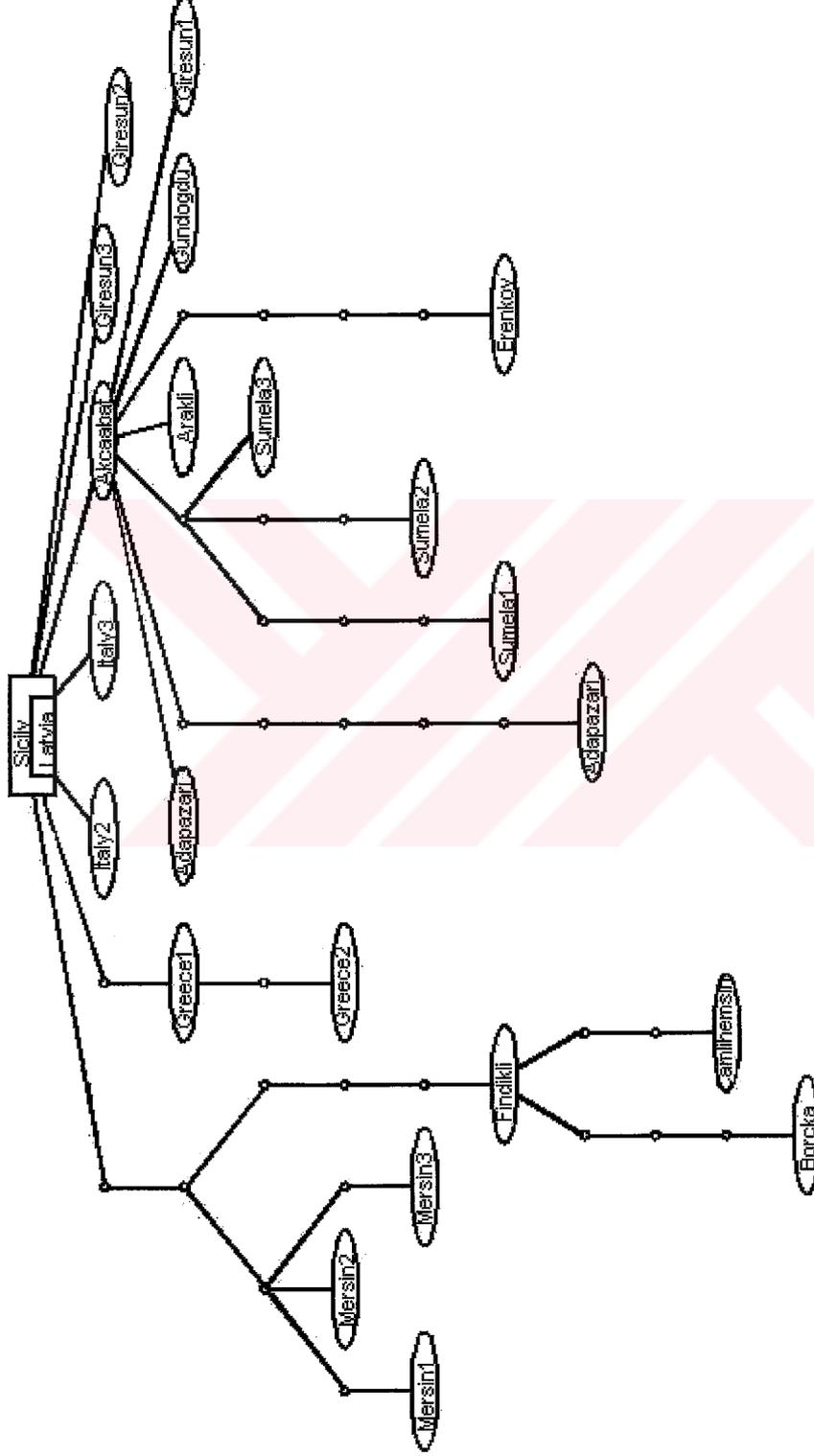
DNA dizileri Clustal X ve Clustal W programları kullanılarak karşılaştırılmış ve analizler için uygun olan Fasta, Nexus ve PHYLIP formatlarına dönüştürülmüştür.

### 3.2.3. TCS Analizi

TCS (version 1.18) analizine göre incelenen 29 DNA dizisinde 23 haplotip bulunmuştur (Tablo 8) ve bu haplotipler en fazla 17 baz farklılığıyla birbirleriyle bağlanmış bir ağ meydana getirmiştir (Şekil 16). Gündoğdu - Karasu (Rize), Akçaabat - Yeşilova (Trabzon) ve Matera – Sicilya (İtalya) örneklerinin baz sıraları arasında fark bulunamamıştır. Analiz ettiğimiz örneklere ek olarak Letonya'dan bir *Bufo bufo* (AY325988; Pauly vd., 2004) örneğinin 890 bazlık 16S rRNA geni dizisi de analize dahil edilmiştir. Şekil 16'den de görüldüğü gibi haplotipler arası gruplaşma sadece Mersin, Sümela (Trabzon) örnekleri ile Borçka (Artvin), Çamlıhemşin, Fındıklı'yı (Rize) içine alan haplotipler arasında vardır. Haplotipler arasında 17 baza kadar farklılık olmasına rağmen coğrafik olarak gruplaşma yok denecek kadar az olduğu görülmektedir. Ayrıca bu analize göre Sicilya ve Letonya haplotipleri atasal haplotipler olarak belirlenmiştir.

### 3.2.4. Modeltest 3.6 Programı ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması

TCS analizi sonucunda saptanan 23 haplotipin DNA dizisi Modeltest 3.6 programında analiz edildiğinde hiyerarşik olasılık oran testlerine (hLRTs, Tablo 10) göre en uygun baz değişim modelinin HKY85 (Hasegawa vd., 1985) olduğu görülmüştür (-lnL= 2079). Baz frekansları ise 0.33 (A), 0.2297 (C), 0.1752 (G), 0.2651 (T) ve  $T_i / T_v$  oranı 2.6892 olarak bulunmuştur. Ayrıca analiz sonucu oluşan 'scores' dosyası filogenetik analizler için PAUP\* programı tarafından kullanılmıştır.



Şekil 16. TCS analizi sonucu oluşan ağ (her iki nokta arasındaki mesafe 1 baz değişikliğini göstermektedir)

Tablo 10. Modeltest 3.6 programının analiz sonuçları

## Eşit baz frekansları

Sıfır hipotezi = JC	-lnL0 = 2153,2610
Alternatif hipotez = F81	-lnL1 = 2128,2754
$2(\ln L1 - \ln L0) = 49,9712$	df = 3
P değeri <0,000001	

## Ti=Tv

Sıfır hipotezi = F81	-lnL0 = 2128,2754
Alternatif hipotez= HKY	-lnL1 = 2079,0884
$2(\ln L1 - \ln L0) = 98,3740$	df = 1
P değeri <0,000001	

## Ti oranları eşit

Sıfır hipotezi = HKY	-lnL0 = 2079,0884
Alternatif hipotez= TrN	-lnL1 = 2077,4243
$2(\ln L1 - \ln L0) = 3,3281$	df = 1
P değeri = 0,068104	

## Tv oranları eşit

Sıfır hipotezi = HKY	-lnL0 = 2079,0884
Alternatif hipotez= K81uf	-lnL1 = 2078,0706
$2(\ln L1 - \ln L0) = 2,0356$	df = 1
P değeri = 0,153649	

## Karakterler arasında eşit oransal homojenlik

Sıfır hipotezi = HKY	-lnL0 = 2079,0884
Alternatif hipotez= HKY+G	-lnL1 = 2079,0020
$2(\ln L1 - \ln L0) = 0,1729$	df = 1
P değeri = 0,338795	

## Sabit karakterler yok

Sıfır hipotezi = HKY	-lnL0 = 2079,0884
Alternatif hipotez= HKY+I	-lnL1 = 2078,9619
$2(\ln L1 - \ln L0) = 0,2529$	df = 1

### 3.2.5. Maksimum Parsimoni (Maksimum Tutumluluk) Analizi

Parsimoni analizinde 938 karakter incelenmiş ve 796'sının sabit, 128'inin ise değişken karakter olduğu fakat parsimonik bilgi içermediği, 14'ünün ise parsimonik bilgi içerdiği görülmüştür. Hüristik inceleme sonucunda toplam 9160834 farklı ağaç topolojisi oluşturulmuş ve en iyi parsimonik ağaçların skoru 148 olarak bulunmuş ve son olarak 11 tanesi kaydedilmiştir. Bu 11 ağacın 'strict konsensus' filogramı ve 1000 tekrarlı seç-bağla testi değerleri Şekil 17'te görülmektedir. Buna göre haplotipler arasında belirli coğrafik bölgeleri birbirinden ayıracak dallanmalar meydana gelmemiştir. TCS analizi sonucu oluşan ağa benzer olarak Fındıklı, Çamlıhemşin, Borçka haplotipleri aynı grupta yer alırken Yunanistan ve Mersin haplotipleri de kendi içinde beraber gruplanmıştır.

### 3.2.6. Maksimum Olasılık ve Genetik Uzaklık Analizleri

Maksimum Olasılık analizinde hüristik inceleme sonucunda toplam 12365 farklı ağaç topolojisi oluşturulmuş ve bulunan en iyi ağaçların skor sayısı 2071,16'dır. Analiz sonucu, tek farkları AY555025 ile AY840244 no'lu haplotiplerinin yer değişimi olan 2 ağaç meydana gelmiştir (Şekil 18). ML sonucu oluşan ağaç, haplotiplerin gruplaşması bakımından MP ağacından farksız olduğu görülmüştür. 1000 tekrarlı seç-bağla testi sonucu oluşan % 50 majority rule konsensus ağacı ile Maksimum Parsimoni analizi sonucu oluşan strict konsensus ağacının birbiriyle aynı olduğu görülmüştür. ML analizi sonucundaki seç bağla testi değerleri de MP ağacının üzerinde verilmiştir (Şekil 17).

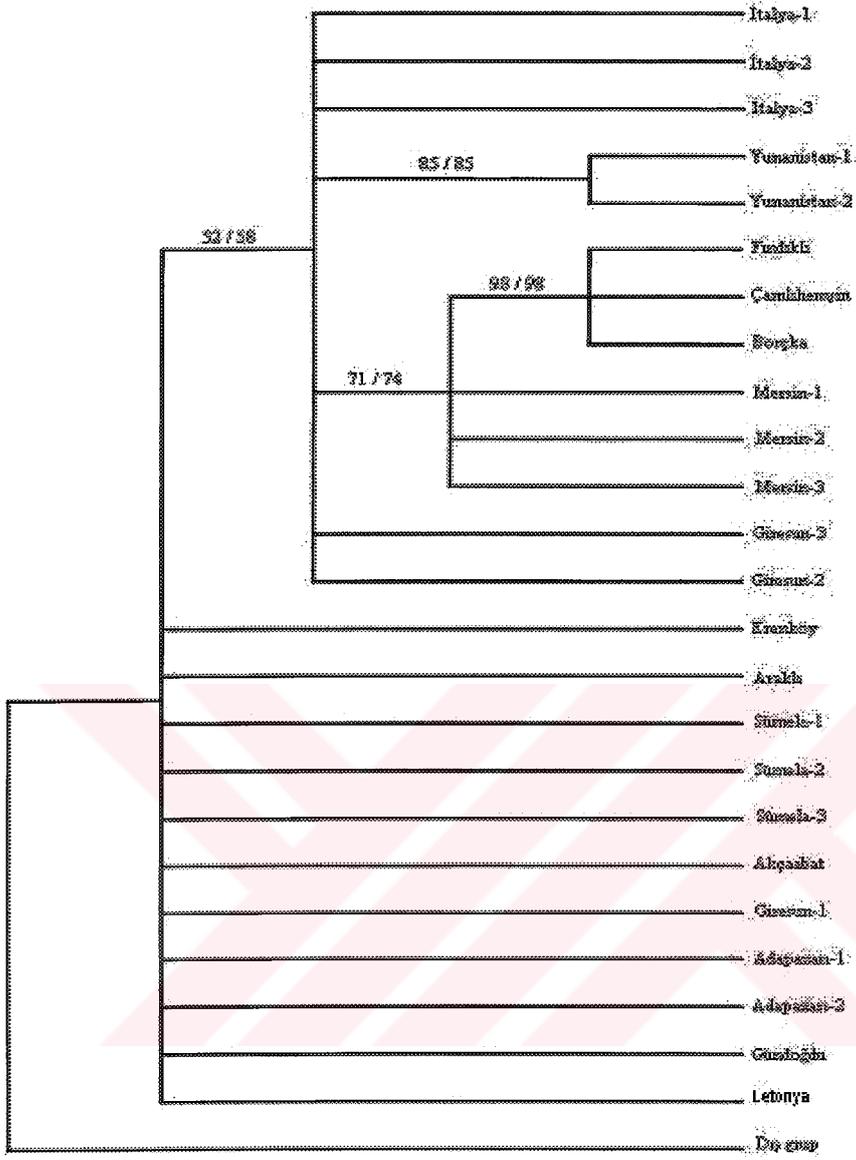
Haplotiplerin uzaklık matrisi de yine HKY85 modeli kullanılarak tespit edilmiştir (Tablo 11). Şekil 17'te de görüldüğü gibi haplotipler arasındaki genetik varyasyon oldukça düşüktür ve % 0,11-1,85 arasında değişim göstermektedir (Tablo 11). En düşük farklılık olan % 0,11, İtalya haplotipleri ile Akçaabat, Giresun haplotipleri arasında (GIR2 ve GIR3) ve Akçaabat ile Araklı, Adapazarı (ADA2) ve Gündoğdu haplotipleri arasında görülmüştür. En yüksek farklılık olan % 1,85 ise Borçka ile Adapazarı (ADA1) haplotipleri arasında bulunmuştur. İtalya haplotipleri (MAT1, MAT2, MAT3) % 0,11 farklılıkla en çok Akçaabat ve Giresun haplotiplerine (GIR2 ve GIR3) benzerlik gösterirken (1 baz farklılıkla), % 1,19'la en fazla Borçka haplotipinden (10 baz farklılıkla) farklı bulunmuştur. Yunanistan haplotipleri ise (MET1 ve MET2) % 0,32 farklılıkla en çok Akçaabat ve Giresun haplotiplerine (GIR2 ve GIR3) benzerlik gösterirken (3 baz

farklılıkla), % 1,52 ile (14 baz farklılıkla) en fazla yine Borçka haplotipinden farklı bulunmuştur.

### 3.4. Bayesian Analizi

Toplam 2 milyon ağaç içerisinde her 100. ağacın seçilmesiyle yapılan Bayesian analizi sonucu oluşan majority rule konsensus ağaç ve posterior olasılık değerleri Şekil 19’te görülmektedir. Ağacın topolijisi incelendiğinde MP ve ML ağaçları ile oluşan gruplaşmalar bakımından (Mersin, Sümela, Yunan haplotiplerinin kendi içinde gruplaşması ve Fındıklı, Çamlıhemşin, Borçka haplotiplerinin aynı grupta yer alması) büyük benzerlik göstermesine rağmen Letonya haplotipinin diğerlerinden ayrı bir dalda yer alması ile diğer ağaçlardan farklılık göstermektedir.





Şekil 17. En parsimonik 11 ağacın strict konsensus filogramı. Maksimum Parsimoni ve Maksimum Olasılık analizlerinin bootstrap (seç-bağla testi) değerleri dallar üzerinde verilmiştir (MP / ML)





Şekil 18. HKY85 modeli uygulanarak Maksimum Olasılık (ML) analizi sonucu oluşan filogram.



Şekil 19. Bayesian analizi sonucu oluşan % 50 majority rule konsensus ağacı ve Bayesian posterior olasılık değerleri

Tablo 11. Bu çalışmada incelenen haplotiplerin DNA dizilerinin ikili karşılaştırılması (Yüzde (%)) farklılıklar tablonun alt kısmında, bazı farklılıkları ise üst kısmında gösterilmiştir

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. MAT1	-	1	1	2	6	6	2	4	3	5	6	1	1	1	2	5	4	5	7	2	2	9	10
2. MAT2	0,11	-	2	3	7	7	3	5	4	6	7	2	2	2	3	6	5	6	8	3	3	10	11
3. MAT3	0,11	0,21	-	3	7	7	3	5	4	6	7	2	2	2	3	6	5	6	8	3	3	10	11
4. MET1	0,21	0,32	0,32	-	8	8	4	2	5	7	8	3	3	3	4	7	6	7	9	4	4	11	12
5. ERE	0,64	0,75	0,75	0,86	-	12	6	10	7	9	10	5	7	7	6	11	10	11	11	6	6	15	16
6. FIN	0,65	0,75	0,75	0,86	1,30	-	8	10	9	11	12	7	7	7	8	7	6	7	13	8	8	3	4
7. ARA	0,21	0,32	0,32	0,43	0,64	0,86	-	6	3	5	6	1	3	3	2	7	6	7	7	2	2	11	12
8. MET2	0,43	0,54	0,54	0,21	1,08	1,08	0,65	-	7	9	10	5	5	5	6	9	8	9	11	6	6	13	14
9. SUM1	0,32	0,43	0,43	0,54	0,75	0,97	0,32	0,75	-	4	5	2	4	4	3	8	7	8	8	3	3	12	13
10. SUM2	0,54	0,65	0,65	0,75	0,99	1,19	0,54	0,97	0,43	-	7	4	6	6	5	10	9	10	10	5	5	14	15
11. SUM3	0,64	0,75	0,75	0,86	1,08	1,30	0,64	1,08	0,54	0,75	-	5	7	7	6	11	10	11	11	6	6	15	16
12. AKC	0,11	0,21	0,21	0,32	0,54	0,75	0,11	0,54	0,21	0,43	0,54	-	2	2	1	6	5	6	6	1	1	10	11
13. GIR3	0,11	0,21	0,21	0,32	0,75	0,75	0,32	0,54	0,43	0,65	0,75	0,21	-	2	3	6	5	6	8	3	3	10	11
14. GIR2	0,11	0,21	0,21	0,32	0,75	0,75	0,32	0,54	0,43	0,65	0,75	0,21	0,21	-	3	6	5	6	8	3	3	10	11
15. GIR1	0,21	0,32	0,32	0,43	0,64	0,86	0,21	0,65	0,32	0,54	0,64	0,11	0,32	0,32	-	7	6	7	7	2	2	11	12
16. MER1	0,54	0,65	0,65	0,75	1,19	1,19	0,75	0,75	0,86	1,08	1,19	0,65	0,65	0,65	0,75	-	3	4	12	7	7	10	11
17. MER2	0,43	0,54	0,54	0,65	1,08	1,08	0,65	0,86	0,75	0,97	1,08	0,54	0,54	0,54	0,65	0,32	-	3	11	6	6	9	10
18. MER3	0,54	0,65	0,65	0,75	1,19	1,19	0,75	0,75	0,86	1,08	1,19	0,65	0,65	0,65	0,75	0,43	0,32	-	12	7	7	10	11
19. ADA1	0,75	0,86	0,86	0,97	1,19	1,19	1,41	0,75	0,86	1,08	1,19	0,65	0,86	0,86	0,75	1,30	1,19	1,30	-	7	7	16	17
20. ADA2	0,21	0,32	0,32	0,43	0,64	0,86	0,21	0,65	0,32	0,54	0,64	0,11	0,32	0,32	0,21	0,75	0,65	0,75	0,75	-	2	11	12
21. GUN	0,21	0,32	0,32	0,43	0,64	0,86	0,21	0,65	0,32	0,54	0,64	0,11	0,32	0,32	0,21	0,75	0,65	0,75	0,75	0,21	-	11	12
22. CAM	0,97	1,08	1,08	1,19	1,62	1,19	1,41	1,41	1,30	1,52	1,62	1,08	1,08	1,08	1,19	1,08	0,97	1,08	1,74	1,19	1,19	-	7
23. BOR	1,08	1,19	1,19	1,30	1,73	0,43	1,30	1,52	1,41	1,63	1,73	1,19	1,19	1,19	1,30	1,19	1,08	1,19	1,85	1,30	1,30	0,75	-

#### 4. TARTIŞMA

Siğilli kurbağa (*Bufo bufo*)'nın taksonomik durumu bugüne kadar yapılan morfolojik ve moleküler çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında ise aynı türün daha önceki çalışmalarından elde edilmiş olan morfolojik bulgulara Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Mersin, Adapazarı ve İtalya populasyonları çalışılarak, bazı ilave sonuçlar elde edilmiş ve daha önce Türkiye'de çalışılmamış olan mitokondriyal 16S rRNA geninin 936 bazlık kısmı dizin analizi yapılarak tür içi varyasyon ve filogenetik sonuçlar tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, 7 farklı bölgeden elde edilen 95 *Bufo bufo* örneğinin 20 farklı morfolojik karakterine ANOVA testi uygulandığında TÇ (timpanium çapı), ÖNAY (ön ayak uzunluğu), DMT-2.P (DMT-2.perde arası mesafe) ve AAU (arka ayak uzunluğu) özellikleri hariç tüm karakterler bakımından dişi ve erkekler arasında fark olduğu görülmüştür. Fark görülen özelliklerden BD-BUA (burun deliği-burun ucu mesafesi) ve GÖZ-TYM (göz-tympanium arası mesafe) hariç diğer tüm özellikler bakımından dişilerin erkeklerden daha büyük değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum kuyruksuz kurbağalarda görülen ve genellikle dişilerin erkeklerden daha büyük olduğu 'seksüel dimorfizm' ile ilgilidir ve daha önce kara kurbağaları ile ilgili yapılan birçok çalışmada da doğrulanmıştır (Gittins vd., 1980; Gittins, 1983; Reading, 1990).

Dişi ve erkek bireyler arasında önemli farklılıklar olduğundan, morfolojik karakterler bakımından bölgeler arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla dişi bireylere uygulanan ANOVA testi sonucunda baş genişliği (BG,  $F=2,36$ ,  $p<0,05$ ), burun deliği-burun ucu mesafesi (BD-BUA,  $F=14,57$ ,  $p<0,01$ ), tympanium çapı (TÇ,  $F=3,80$ ,  $p<0,01$ ) ve tibia uzunluğu (TU,  $F=2,94$ ,  $p<0,05$ ) hariç diğer tüm karakterler bakımından bölgeler arasında fark bulunmamıştır. Yapılan Tukey testi sonucunda ise sadece BD-BUA özelliği bakımından İtalya örnekleri bir grupta, diğerleri farklı grupta yer almıştır. Yani morfolojik karakterler bakımından bölgeleri birbirinden ayıracak veya gruplandırarak istatistiki açıdan önemli sonuçlar elde edilmemiştir. Yalnızca İtalya örneklerinin daha sivri burunlu olduğu görülmüştür.

Reading (1990) İngiltere'nin güneyinde birbirine çok yakın (27 km) iki lokalitedeki *Bufo bufo* populasyonlarını incelemiş ve diğerinden yaz mevsiminde % 27, kışın ise % 37 daha fazla yağmur alan bölgedekilerin daha iri vücutlu olduğunu göstermişlerdir. İki

bölgenin iklim ve habitatının sorumlu olduğu düşünüldüğünde, daha heterojen ve daha fazla yağmur alan bölgedeki kurbağaların vücut büyüklüklerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Reading (1990)'in elde ettiği bu sonuçlar *B. viridis* (Nevo, 1972; Jorgensen, 1984), *B. calamita* (Hemmer ve Kadel, 1972; Boomsma ve Arntzen, 1985) ve *B. marinus* (Zug vd., 1975)'ta bulunan sonuçlarla aynı doğrultudadır. Sonuçta kurbağaların vücut büyüklüklerinin bölgeler arasındaki çevresel şartlara ve besin bolluğuna bağlı olduğu varsayılmıştır (Reading, 1990). Bu değerlendirmeler dikkate alındığında, özellikle vücut boyu bakımından bölgeler arasında bir farkın gözlenmemesi, bizim bulgularımıza ters düşmektedir. Bunun nedeni, incelenen birey sayısının bölgelere göre az sayıda olması veya bu farklılığın gerçekten çevresel şartlara ve özellikle besin bolluğuna bağlı olduğudur.

Bu çalışmada yer alan *Bufo bufo* türünün yurdumuzdaki alttür durumu morfolojik verilere dayalı olarak araştırılmış ama kesin bir sonuç elde edilememiştir. Bu nedenle sistematik durumu halen karışıklığını korumaktadır. Bugüne kadar türün Türkiye'den üç alttürü bildirilmiştir. Bodenheimer (1944), Kuzeybatı Anadolu, Ege Bölgesi ve Karadeniz'den toplanan örnekleri nominat alttürden almıştır. Eiselt (1965), Trabzon'dan elde edilen örneği Kafkaslarda dağılışı gösteren *B. b. verrucosissimus* alttürü olarak kabul etmiştir. Fakat son yıllara kadar alttür olarak bilinen *B. b. verrucosissimus*, Orlova ve Tuniyev (1989) tarafından ayrı bir tür olarak kabul edilmiştir (Tarkhishvili, 1996). Başoğlu ve Özeti (1973)'ye göre Rize'den elde edilmiş Frankfurt Zooloji Müzesi'nde yer alan bir örnek ise Kuzeybatı Afrika ve Akdeniz bölgesinde yayıldığı kabul edilen *B. b. spinosus* olarak tayin edilmiştir. Clark ve Clark (1973), Hopa ve Balıkesir yakınlarındaki Mustafakemalpaşa'dan bulunduğu iki örneği *B. b. spinosus* olarak kaydetmiştir. Bunun nedeni ise daha iri vücutlu olmaları ve siğillerinin farklılığıdır.

Yılmaz (1984), özellikle vücut uzunluğunun büyük değerlerde olması nedeniyle Trakya'dan elde ettiği örnekleri; Sparreboom ve Arntzen (1987), Akçakoca, Akyazı ve Zonguldak'tan elde ettikleri örnekleri; Tok (1999), Reşadiye (Datça) Yarımadası'ndan elde ettiği örnekleri (vücut uzunlukları dişilerde 130,6; 125,0; 89,2 ve erkekte 65,6 mm); Baran ve arkadaşları (1997) ise yaptıkları çalışmada Çamlıhemşin (Rize)'den elde ettikleri örneklerin *B. b. spinosus* alttürüne dahil edilmesini uygun bulmuşlardır. Ayrıca Özdemir ve Baran (2002) Murat Dağı'ndan (Kütahya-Uşak) elde ettikleri tek örneği morfolojik karakterlerine göre (vücut uzunluğu: 100,7, baş uzunluğu: 27,5 ve baş genişliği: 39,6 mm) *B. b. spinosus* olarak değerlendirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise *Bufo bufo*'nun bölgelere göre ortalama vücut boyları 82,9 ile 115,1 mm arasında değişmesine rağmen daha önce de

bahsedildiği gibi vücut boyları bakımından bölgeler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Yılmaz ve Kumlutaş (1995), Türkiye’de yaşayan (Trakya, Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgesi) *Bufo bufo*’nun dağılışı ve taksonomik durumu hakkında yaptıkları incelemede vücut uzunluk ve oranlarının, dünyanın değişik bölgelerinden toplanan örneklerin bulunduğu British Museum’da Avrupa ve Asya’nın çeşitli yerlerinden elde edilmiş örneklerin incelendiği Boulenger (1898)’in eserindeki ölçümlerle hemen hemen aynı olduğu veya büyük benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, sadece morfolojik karakterlerin (siğillik, renk ve desen) yurdumuzdaki *Bufo bufo*’ların alttür durumu hakkında bir hüküm vermeyeceğini vurgulamışlardır.

Ayrıca Yılmaz ve Kumlutaş (1995), daha önceleri *Bufo bufo*’ların alttür ayrımında kullanılan siğillilik karakterinin taksonomik açıdan çok kesin ve mühim bir karakter olmadığını da belirtmişlerdir. De Lange (1973), derideki siğillerin farklılığının iklimsel faktörlerden kaynaklandığını, kuzey bölgelerdekilerin sivri siğillere sahip olduklarını, güneydekilerin ise yassı siğillere sahip olduğunu görmüştür. Nitekim Hemmer ve Böhme (1976) de bu karakteri sistematik olarak şüpheli karşılayarak, coğrafik bölge yanında mevsimsel olarak da değişen (üreme mevsimine bağlı olarak) bir karakter olduğunu vurgulamışlardır. Çünkü siğillik karakteri yaşa, mevsime ve cinsiyete bağlı olarak değişen bir özellik olup, aynı bölgede çok iri, sivri ve sık siğilli örneklerin yanında seyrek ve yassı siğillerde görülebilir (Yılmaz ve Kumlutaş, 1995). Bu nedenle siğillilik karakteri bu çalışmada kullanılmamıştır.

*Bufo bufo*’nun tür içi sistematığına katkıda bulunmak için De Lange (1973), yaptığı çalışmada bu türün örneklerini morfolojik yönden incelemiş ve *B. b. spinosus*’un taksonomik durumuna çözüm bulmaya çalışmıştır. Siğillilik özelliğine ek olarak, ortalama ve maksimum vücut boyunun kuzeyden güneye gidildikçe arttığını, Akdeniz kısmındaki populasyonların ayrı alttürler olmadığını savunmuştur ve ‘spinosus’ alttürünün karakteristik özelliği olarak varsayılan vücut büyüklüğünün sadece alttürün yayılış sahası içinde olmadığını belirtmiştir. Yapılan çalışmalarda muhtemelen rasgele büyük bireylerin toplandığını ileri sürmüştür. Bu sonuçlar bizim bulgularımızla da desteklenmektedir ve Türkiye’de *Bufo bufo* türüne ait farklı alttürlerin olmadığı şeklinde açıklanabilir. Fakat Tok (1999)’un da belirttiği gibi durumun açıklığa kavuşturulması için daha bol materyal üzerinde yapılacak morfolojik çalışmalar yanında değişik taksonomik yöntemlerden de yararlanmak gerekmektedir.

Yapılan faktör analizinde (Temel Bileşenler Analizi=PCA) öz değer, varyans ve eklemeli varyans kriterleri göz önüne alındığında 3 faktörün yeterli olduğu görülmüştür. Bu 3 ana faktör varyansın % 78'ini açıklamaktadır. Birinci ana faktör toplam varyansın % 63,4'ünü, ikinci ana faktör % 9'unu ve üçüncü ana faktör ise % 5,2'sini açıklamaktadır. Toplam değişimin % 63,4'ünü açıklayan birinci faktörde gözün çapı, 1. parmağın uzunluğu (1.PARU), arka ayak uzunluğu (AAU), baş uzunluğu (BU) ve genişliği (BG) değişkenleri hariç geri kalan 16 değişkenin faktör yükü yüksek çıkmıştır. İkinci ana faktörde gözün çapı (GÇ), 1. parmağın uzunluğu (1.PARU) ve arka ayak uzunluğu (AAU) değişkenlerinin faktör yükleri yüksek çıkmıştır. Bu faktör ölçülen tüm değişkenlerin % 9'unu açıklamaktadır. Üçüncü ana faktör ise bireylerin baş boyu ve genişliği değişkenlerini açıkladığı için baş ölçümleri ile ilgili faktördür. Toplam değişimin % 5'ini açıklayan bu faktörün bağımlılık oranı da oldukça yüksektir (% 85 ve % 78).

PCA analizi sonucu oluşan faktör skorlarından yararlanılarak oluşturulan grafikte her bölgeye ait bireylerin birinci ve ikinci bileşen üzerindeki izdüşümleri incelendiğinde bölgeler arasında ANOVA analizinde olduğu gibi İtalya örneklerini diğerlerinden ayıran kısmi bir gruplaşma olduğu dikkati çekmektedir. Bu sonuç dikkate alınıp bütün bireyler İtalya ve diğer bölgeler olmak üzere iki grup olarak ayırma analizine (Diskriminant Analizi) tabi tutulduğunda, bu ayırımın istatistiksel olarak önemli olduğu (Wilks's Lambda= 0,194,  $p < 0,001$ ) ve bireylerin % 100 doğru olarak gruplandığı görülmüştür (özdeğer: 4,14, korelasyon katsayısı: 0,90). Stepwise metodu altında uygulanan Mahalanobis uzaklık metoduna göre bu ayırımında sırasıyla BD-BUA (burun deliği-burun ucu mesafesi), GÖZ-TYM (Göz-tympanium arası mesafe), D-D (dirsekler arası mesafe) ve TU (tibia uzunluğu) özelliklerinin rol oynadığı belirlenmiştir. Böylece yukarıda da bahsedildiği gibi *Bufo bufo* türünde morfolojik olarak bölgeleri birbirinden ayıracak farklı alttürlerin olmadığı PCA analizi ile de desteklenmiştir şeklinde yorumlanabilir. Fakat ANOVA testindeki sonuca benzer olarak İtalya örnekleri özellikle BD-BUA karakteri bakımından diğerlerinden ayrıldığı yani daha sivri burunlu olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, morfolojik verilere ek olarak Artvin'den İtalya'ya kadar olan bölgede 16 populasyondan toplam 29 bireyin mitokondriyal 16S rRNA'sının incelediğimiz 936 bazlık kısmında *Bufo bufo* populasyonları arasında maksimum 17 baz farklılık bulunmuştur. Bu farklılık Macey ve arkadaşlarının (1998) Asya'daki *Bufo andrewsi* populasyonları üzerine yaptığı çalışma sonucunda bulunduğu verilere benzerdir (1063 baz çiftlik DNA dizisinde 22 baz değişimi). Coğrafik olarak oldukça uzak olan bölgelerdeki

populasyonlar arasında düşük varyasyonlar bildiren Liu ve arkadaşları (2000), Harris ve arkadaşları (1998) ve Harris (2001)'in çalışmalarıyla da benzer bir sonuç ortaya çıkmıştır. Liu vd. (2000) Asya'da birbirinden coğrafik olarak oldukça uzak olan *Bufo melanostictus* populasyonlarında 5 baz değişimi bulmuştur. Harris (2001) ise mitokondriyal 16S rRNA geninin 576 bazlık kısmı üzerinde yaptığı çalışmasında İngiltere'yi de içine alan Batı ve Orta Avrupa'da toplam 8 *Bufo calamita* populasyonunu incelemiş ve en fazla 4 baz farklılık bulmuştur. Tür içindeki bu düşük varyasyon Harris ve arkadaşları (1998) tarafından sürüngenlerde de bildirilmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında, tür içindeki genetik farklılık düşük olmasına rağmen oldukça fazla haplotip bulunmuştur (29 bireyde 23 haplotip). Riberon vd. (2001) bizim bulgularımıza benzer olarak *Salamandra atra* türünde 13 populasyonda 10 haplotip tespit etmiştir. Bunun sebebi analiz edilen mtDNA fragmentinin uzun olması (936 bp) ve hızlı bir populasyon artışı sonucu yakın zamanda meydana gelen mutasyonlar olabilir. Ayrıca çoğu taksonun etkilendiği Pleistocene dönemi de neden olmuş olabilir. Birbirine çok uzak coğrafik alanlardaki canlılarda gözlenen düşük seviyedeki moleküler farklılıklar, yakın zamanda meydana gelen değişimleri akla getirir (Riberon vd., 2001).

Bu çalışmada analiz edilen Gündoğdu - Karasu (Rize), Akçaabat - Yeşilova (Trabzon) ve Matera - Sicilya örneklerinin baz sıraları arasında fark bulunamamıştır. Bunun sebebi Gündoğdu ile Karasu'nun ve Akçaabat ile Yeşilova'nın birbirine çok yakın olması olabilir. İtalya'nun Sicilya bölgesi'nden elde edilen *Bufo bufo spinosus* olduğu varsayılan örnek ile Matera kentinden elde edilen örneğin baz sıralarının aynı olması de Lange (1973)'in Akdeniz kısmındaki populasyonların ayrı alttürler olmadığı savını desteklemektedir. Analiz ettiğimiz örneklere ek olarak Letonya'dan bir *Bufo bufo* (AY325988; Pauly vd., 2004) örneğinin 890 bazlık mitokondriyal 16S rRNA geni dizisi de analize dahil edilmiştir. TCS analizi sonucu oluşan ağda, MP ve ML analizleri sonucu oluşan filogramlardan da görüldüğü gibi haplotipler arası gruplaşma sadece Yunanistan, Mersin, Sümela örnekleri ile Borçka, Çamlıhemşin, Fındıklı'yı içine alan haplotipler arasında vardır. Yunanistan'ın Metsova bölgesi'nden elde edilen iki örneğin analiz edilen 16S rRNA geninde 2 baz farklılık bulunmuştur ve MP, ML ve Bayesian analizleri sonucu oluşan filogramlarda bir grupta yer almıştır. Mersin'den ve Sümela'dan elde edilen 3'er örneğin de TCS, ML ve Bayesian analizi sonucu oluşan filogramlarda birer grupta yer almasının nedeni aynı populasyondan olmaları ve aralarında (Mersin grubunda 3-4, Sümela grubunda 4-5 baz) az farklılık olmasıdır. Aynı şekilde Fındıklı, Borçka ve



Çamlıhemşin örnekleri de bütün filogramlarda bir grup oluşturmuştur. Çamlıhemşin ile Borçka haplotipi arasında 7 baz farklılık bulunurken, Çamlıhemşin ile Fındıklı haplotipi arasında 3 ve Borçka haplotipi arasında ise 4 baz farklılık tespit edilmiştir. Bunun nedeni de yine bu bölgelerin birbirine yakın olması ve üçünün de benzer şekilde dağ popülasyonlarına ait olması olabilir. Bu çalışmada incelen tüm haplotipler arasında 17 baza kadar farklılık olmasına rağmen coğrafik olarak gruplaşma yok denecek kadar az olduğu görülmektedir. Her ne kadar morfolojik verilere göre BD-BUA karakteri bakımından İtalyan örnekleri kısmi bir ayırım gösterse de, DNA dizin analizleri sonuçları farklı bir alttürün varlığını desteklemiyor gözükmektedir.

Diğer taraftan Hemmer (1975) *Bufo bufo bufo* ile *Bufo bufo spinosus* üzerindeki elektroforetik çalışmasıyla bu iki alttürün geniş dağılış alanındaki melez popülasyonlarına dikkat çekmekle beraber zoocoğrafik açıdan çok kesin ve ayırıcı bir netice ortaya koymamıştır. Lüscher vd. (2001) ise İsviçre’de *B. b. bufo* ve *B. b. spinosus* türlerinden oluşan toplam 24 popülasyonun genetik farklılığını allozim teknikler (10 lokus tarafından kodlanan 8 enzimin yatay nişasta jel elektroforezi) kullanarak analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda, Çek Cumhuriyeti ve kuzey Almanya’dan elde ettikleri *B. bufo* örneklerini kuzeydekilerden ayıran morfolojik karakterlerin ekolojik olarak belirlendiği veya bağımsız olarak kendiliğinden geliştiği fikrini ortaya koymuşlardır. Anadolu, İtalya ve Yunanistan’daki *B. bufo* popülasyonları üzerine yapılan bu tez çalışmasında BD-BUA karakteri dışında önemli bir morfolojik ve genetik farklılığın bulunmaması Lüscher vd (2001)’nin çalışmalarını da desteklemektedir.

Yapılan bu çalışma sonucunda *Bufo bufo* haplotipleri arasında % 0,11 ile % 1,85 arasında değişen farklılık bulunmuştur. Letonya’dan elde edilen *B. bufo* ile bizim incelediğimiz örnekler arasında da tür içi varyasyon değeri arasında bir farklılık gözlenmiştir. Bu durum Türkiye’nin farklı bölgelerinden elde edilen *B. viridis* ile Ukrayna’dan elde edilen örnek arasında aynı gen bakımından benzer (% 0,11 - % 0,91) bulunmuştur (yayınlanmamış bilgi).

*Bufo* cinsinde her 1 milyon yılda her bir nesil arasında % 0,69’luk bir moleküler değişim olduğu bilinmektedir (Macey vd., 1998). Avrupa ile bizim örneklerimiz arasında coğrafik olarak en uzak bölgeler arasındaki (İtalya-Borçka) en büyük moleküler farklılık % 1,19’dur. Bu orandan yola çıkarak yaklaşık 0,86 milyon yıl önce Pleyistosen devrinde farklılaştıkları sonucu ortaya çıkmıştır. Avrupa semenderlerinin filocoğrafyasını inceleyen Babik ve arkadaşları (2005)’nin çalışmasında da bizim bulgularımıza benzer

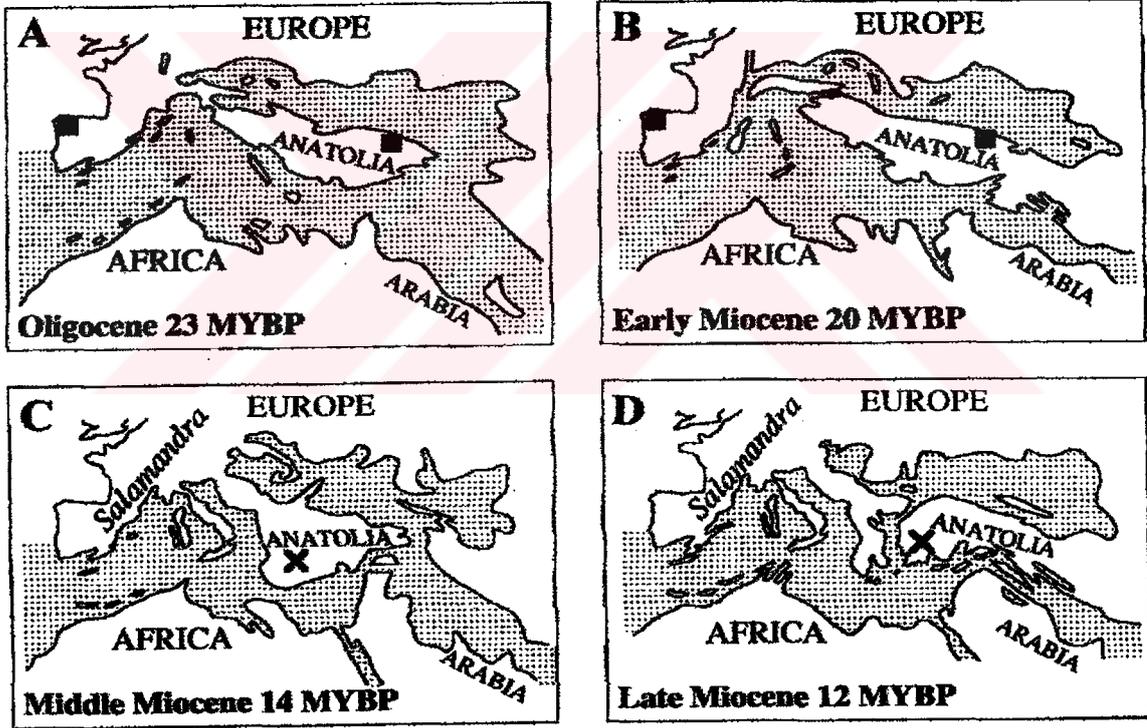
olarak tür içi genetik farklılaşmanın önemli bir bölümünün Pleyistosen'de başladığı tespit edilmiştir. Bu durum diğer kuyruklu kurbağa türlerinde Tan ve Wake (1995), Tarkhnishvili vd. (2000), Riberon vd. (2001) ve Weisrock vd. (2001) tarafından da benzer bulunmuştur. Filocoğrafik çalışmalar, Pleyistosen devrindeki buzullaşmaların tamamen bir türleşmeye sebep olmadığını fakat önemli genetiksel çeşitliliğin ortaya çıkmasında rol oynadığını göstermiştir (Babik vd., 2005).

Pleyistosen devrinde başlayan farklılaşmaları ayrıca Tetis Denizi'nin kapanmasıyla Anadolu'nun periyodik olarak orta Avrupa'dan izolasyonuna sebep olması (Steininger ve Rögl, 1984) da desteklemektedir. Çünkü bazı palearctik bölgeler canlı geçişleri için önemli koridorlar oluşturur ve Anadolu birçok kez fauna ve flora değişimlerinden etkilenmiştir. Avrupa, Asya ve Afrika kıtaları arasında yer aldığından Oligosen'in sonlarından beri birçok kez canlı geçişlerine tanık olmuştur (Steininger vd., 1985; Koswig, 1955). Bu yüzden Anadolu ile Avrupa arasında meydana gelen bağlantılar sonucunda vikaryantların olması mümkündür. Weisrock vd. (2001)'ne göre Şekil 20'da görüldüğü gibi; A) Oligosende (23 milyon yıl önce) Orta Avrupa ile Anadolu bir kara parçasıyla bağlantılıydılar, B) Erken Miyosende (20 milyon yıl önce) Orta Avrupa bir deniz yoluyla Anadolu'dan ayrılmıştır, C) Orta Miyosende (14 milyon yıl önce) Orta Avrupa ve Anadolu tekrar birleşmiştir, D) Geç Miyosende (12 milyon yıl önce) Orta Avrupa ile Anadolu tekrar deniz ile birbirinden ayrılmıştır. Son olarak Anadolu platosu, Arap Yarımadası'nın kuzeye doğru hareketi sonucu 5-10 milyon yıl önce yükselerek tamamen ortaya çıkmıştır (Quennel, 1984; Steininger ve Rögl, 1984) (Weisrock vd., 2001).

Pliyosen ve Pleyistosen'deki buzul çağların (2-4 milyon yıl önce) etkileri, genetik değişimler ve türlerin farklılaşması araştırmacıların özellikle ilgisini çekmektedir (Cooper vd., 1995; Hewitt, 1996; Klicka ve Zink, 1997; Lunt vd., 1998; Taberlet vd., 1998; Hewitt, 2000; Trewick vd., 2000; İbrahim vd., 2002). Milankovitch teorisine göre, buz tabakaları 140000 yıllık bir dönemde var olmuşlar ve sonra Arktik zirvelerinden güneye doğru giderek yok olmuşlardır. Buzul çağlar arasında sıcaklıkta ortalama 10-12°C'lik bir düşüş meydana gelmiştir (Webb ve Bartlein, 1992; Roy vd., 1996; Taberlet vd., 1998).

Biyocoğrafik olarak Pliyosen ve Pleyistosen'deki buzul çağlarda iklimde meydana gelen ani değişimler buzullaşmış bölgelerde (özellikle orta ve kuzey Avrupa) hassas popülasyonların yok olmasına veya güneye doğru yayılmalarına neden olmuştur (Hewitt, 1996). Aynı zamanda soğuk iklimleri tercih eden türlerin büyük olasılıkla buzul dönemlerde sığınak olarak gördükleri yerlerde (örneğin; İberya, İtalya, Yunanistan,

Balkanlar ve Anadolu) yaşamlarını sürdürdükleri ve daha sonra kuzeydeki kara parçalarında tekrar kolonize oldukları varsayılmaktadır (Cooper vd., 1995; Hewitt, 1996; Taberlet vd., 1998). Güney Avrupa kesiminde, Anadolu en önemli sığınak bölgedir. Hem Cooper vd. (1995) ve hem de İbrahim vd. (2002) kuzey populasyonlarının gerçekte Anadolu'dan orijinlendiklerini göstermiştir. *Bufo bufo*'lar üzerinde yaptığımız bu çalışmaya göre haplotipler arasında fazla farklılıkların olmaması, TCS analizine göre Sicilya haplotipinin atasal haplotip olarak belirlenmesi ve özellikle Avrupa'nın kuzeyinde yer alan Letonya örneği ile bu çalışmada kullanılan örnekler arasında beklenildiğinin aksine önemli bir farklılığın olmaması, Avrupa populasyonlarının çoğunun buzul çağlardan sonra Anadolu'yu da içine alan Ortadoğu Bölgesi'nden kolonize olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 20. Anadolu ile Avrupa arasında meydana gelen bağlantılar (Weisrock vd., 2001)  
 A) Oligosende (23 milyon yıl önce) Orta Avrupa ile Anadolu bir kara parçasıyla bağlantılıydılar, B) Erken Miyosende (20 milyon yıl önce) Orta Avrupa bir deniz yoluyla Anadolu'dan ayrılmıştır, C) Orta Miyosende (14 milyon yıl önce) Orta Avrupa ve Anadolu tekrar birleşmiştir, D) Geç Miyosende (12 milyon yıl önce) Orta Avrupa ile Anadolu tekrar deniz ile birbirinden ayrılmıştır (Weisrock vd., 2001)

Anadolu'nun potansiyel bir sığınak olmasının muhtemel iki sebebi vardır. Bunlardan birincisi; Anadolu'nun Akdeniz havzasındaki en güney bölge olması diğer bölgelere oranla buzul çağlardaki iklimsel değişimlerden daha az etkilenmesidir. İkincisi ise; buzul çağlarda ve ara dönemlerde topografya ve iklim özellikleri bakımından önemli bir sığınak bölgesi olmuştur. Buzul çağlarda düzlükler sığınak olarak görev yaparken yüksek kesimler ise buzul dönemler arasında soğuk iklimi tercih eden populasyonlar için benzer rolü üstlenmiştir (Çıplak, 2004).

Bu tez çalışması sırasında yapılan morfolojik ve moleküler analiz sonuçları farklı iki alttürün varlığını desteklemiyor gözükmektedir. Bu sonuca benzer olarak, en son Taşkavak ve Tosunoğlu (2001)'nin Manyas (Balıkesir) ve Çamlıhemşin (Rize)'den elde ettikleri toplam 10 *Bufo bufo* bireyi üzerinde yaptıkları çalışmada, kan-serum proteinlerini poliakrilamid-disk elektroforezi ve densitometri ile incelemiş ve iki populasyon arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Bulgularının daha çok Hemmer (1975) ve Hemmer ve Böhme (1976)'nin çalışmalarındaki *B. b. bufo*'dan ziyade *B. b. spinosus* alttürüne benzediği için Manyas ve Çamlıhemşin populasyonlarının tek bir alttürü temsil ettikleri sonucuna varmışlardır. Ayrıca *B. b. bufo* ile *B. b. verrucosissimus*'un sinonim olduklarını rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında incelenen Letonya *B. bufo* örneğinin diğer örneklerden önemli bir farklılık göstermemesi, bu türün morfolojik ve genetik varyasyonunu ortaya çıkarmak için daha geniş alanda örnekleme yapılması gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada yapılan PCA ve ayırma analizleri ile her ne kadar tek bir karakter bakımından (BD-BUA) İtalya örneklerinin morfolojik olarak farklı bir grup oluşturduğu görülse de bu sonuç, DNA dizin analizi sonucu yapılan filogenetik analiz sonuçları ile desteklenmemektedir. Sonuçta bu 7 populasyonun mitokondriyal 16S rRNA geni bakımından Türkiye'de en fazla % 1,85 farklılık gösterdiği, fakat bu farklılığın bir alttür ya da tür oluşturacak kadar olmadığı ve bunun tür içi varyasyon olduğu görülmüştür.

## 5. SONUÇLAR

Siğilli kurbağa (*Bufo bufo*)'nın morfolojik ve moleküler yönden incelendiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur:

1. İtalya, Trabzon, Giresun, Mersin, Rize, Artvin ve Adapazarı olmak üzere toplam 7 bölgeden elde edilen 95 *Bufo bufo* örneğinden ölçülen 20 farklı morfolojik karakter kullanılarak yapılan istatistiksel analiz sonucu tympanium çapı (TÇ), ön ayak uzunluğu (ÖNAY), arka ayak uzunluğu (AAU), DMT-2.perde arası mesafe (DMT-2.P) karakterleri hariç tüm karakterler bakımından dişi ve erkekler arasında fark olduğu bulunmuştur.

2. Dişi bireylere uygulan ANOVA testi sonucunda baş genişliği (BG), burun deliği-burun ucu mesafesi (BD-BUA), timpanium çapı (TÇ) ve tibia uzunluğu (TU) hariç diğer tüm karakterler bakımından incelenen bölgeler arasında fark bulunmamıştır. Yapılan Tukey testi sonucunda ise sadece BD-BUA özelliği bakımından İtalya örnekleri bir grupta, diğerleri farklı grupta yer almıştır.

3. PCA analizi sonucu ortaya çıkan 3 faktörün toplam varyansın % 78'ini açıkladığı tespit edilmiştir. Birinci ana faktör toplam varyansın % 63,4'ünü, ikinci ana faktör % 9'unu ve üçüncü ana faktör ise % 5,2'sini açıkladığı bulunmuştur. Birinci faktörde gözün çapı, 1. parmağın uzunluğu (1.PARU), arka ayak uzunluğu (AAU), baş uzunluğu (BU) ve genişliği (BG) değişkenleri hariç geri kalan 16 değişkenin faktör yükünün yüksek olduğu; ikinci ana faktörde gözün çapı (GÇ), 1. parmağın uzunluğu (1.PARU) ve arka ayak uzunluğu (AAU) değişkenlerinin faktör yüklerinin yüksek olduğu ve üçüncü ana faktörün ise bireylerin baş boyu ve genişliği değişkenlerini açıkladığı tespit edilmiştir. Ayrıca PCA analizi sonucu bölgeler arasında ANOVA analizinde olduğu gibi İtalya örneklerini diğerlerinden ayıran kısmi bir gruplaşma olduğu görülmüştür. Bireyler İtalya ve diğer bölgeler olmak üzere iki grup olarak ayırma analizine tabi tutulduğunda, bu ayırımın istatistiksel olarak önemli olduğu ve bireylerin % 100 doğru olarak gruplandığı ve bu ayırımda sırasıyla BD-BUA (burun deliği-burun ucu mesafesi), TÇ (timpanium çapı), D-D (dirsekler arası mesafe) ve TU (tibia uzunluğu) özelliklerinin rol oynadığı belirlenmiştir. Böylece ANOVA testindeki sonuca benzer olarak İtalya örneklerinin özellikle BD-BUA karakteri bakımından diğerlerinden ayrıldığı yani daha sivri burunlu olduğu görülmüştür.

4. Artvin'den İtalya'ya kadar olan bölgede 16 populyasyondan toplam 29 bireyin mitokondriyal 16S rRNA'sının 936 bazlık kısmında *Bufo bufo* popülasyonları arasında toplam 23 haplotip, ve haplotipler arasında maksimum 17 (% 0,11 - % 1,85) baz farklılık

bulunmuştur. İtalya'dan elde edilen *Bufo bufo spinosus* ile *B. bufo* örneğinin aynı gen sırasına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Latvian Cumhuriyeti'ndeki *B. bufo* ile incelenen örnekler arasında beklenilenin dışında önemli bir farklılık gözlenmiştir.

5. Bufo cinsinde her 1 milyon yılda her bir nesil arasında % 0,69'luk bir moleküler değişim olduğu bilinmektedir (Macey vd., 1998). Avrupa ile bizim örneklerimiz arasında coğrafik olarak en uzak bölgeler arasındaki (İtalya-Borçka) en büyük moleküler farklılık % 1,19'dur. Bu orandan yola çıkarak yaklaşık 0,86 milyon yıl önce Pleyistosen devrinde farklılaştıkları sonucu ortaya çıkmıştır.

6. Morfolojik (ANOVA, PCA ve ayırma analizleri) ve filogenetik (TCS, MP, ML ve Bayesian analizleri) analiz sonuçlarına göre incelenen *Bufo bufo* türünde önemli bir tür içi farklılaşmanın olmadığı anlaşılmaktadır.



## 6. ÖNERİLER

1. Kara kurbağası (*Bufo bufo*)'nın yayılış alanı dikkate alınarak (batı Avrupa'dan Baykal Gölü'ne kadar) daha geniş alanda, daha fazla sayıda birey üzerinde morfolojik ve moleküler çalışmalar yapılarak daha geniş bilgilere ulaşılabilir.

2. Mitokondriyal DNA'nın 16S rRNA genine ek olarak sitokrom b, 12S, ND ve kontrol bölgelerine ait genler de çalışılarak tür içi varyasyon ve filogenetik ilişkiler daha detaylı ve doğru olarak anlaşılabilir.

3. İtalya ile diğer bölge örnekleri arasında farklılık gösteren BD-BUA (burun deliği-burun ucu mesafesi) karakterinin, daha fazla sayıda örnek üzerinde ve daha detaylı incelenmesi, gerçekten farklı olup olmadığını ortaya koymada yararlı olacaktır.



## KAYNAKLAR

- Akaike, H., 1974. A New Look at the Statistical Model Identification, IEEE Trans. Aut. Control, 19, 716-723.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailovic, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Garcia-Paris, M. ve Arntzen, J.W., 2005. Phylogeography of two European Newt Species-Discordance Between mtDNA and Morphology, Molecular Ecology, 14, 2475-2491.
- Bahçeci, Z., 2000. Evrim, Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir, 216 s.
- Baran, I., Tosunoglu, M., Kaya, U. Ve Kumlutas, Y., 1997. Çamlıhemşin (Rize) Civarinin Herpetofaunası Hakkında, Tr. J. of Zoology. 21, 409-416.
- Baran, İ. ve Atatür, M. K., 1998. Turkish Herpetofanua (Amphibians and Reptiles), Ankara.
- Başıbüyük, H., Bardakçı, F., Belshaw, R. ve Quicke, D. L. J., Phylogenetic Systematics, First Edition, Sivas, 2000.
- Başoğlu, M. ve Özeti, N., 1973. Türkiye Amfibileri, Fen Fak. Kitaplar Serisi, No. 50, İzmir, E.Ü. Fen Fak., 85-99.
- Beebee, T. ve Griffiths, R., 2000. The New Naturalist Amphibians and Reptiles- A Natural History of the British Herpetofauna. Harper Collins Publishers, London.
- Bodenheimer, F.S., 1944. Introduction into the Knowledge of the Amphibia and Reptilia of Turkey, Rew. Fac. Sci. Istanbul. Ser. B.9. 9, 1-78.
- Boomsma, J.J. ve Arntzen, J.W., 1985. Abundance, Growth and Feeding of Natterjack Toads (*Bufo calamita*) in a 4-year old Artificial Habitat, J. Appl. Ecol., 22, 395-405.
- Boulenger, G.A., 1898. The Tailless Batrachians of Europe. Part II, 165 p., London.
- Castellano, S. ve Giacoma, C., 1998. Morphological Variation of the Green Toad, *Bufo viridis*, in Italy: A Test of Causation, Journal of Herpetology, 32(4), 540-550.
- Clark, R.J. ve Clark, E.D., 1973. Collection of Amphibians and Reptiles from Turkey. Clif. Acad. Sci.San Francisco. 104, 1-62.
- Clement, M., Posada, D. ve Crandall, K.A., 2000. TCS, a computer program to estimate gene genealogies, Molecular Ecology, 9, 1657-1659.
- Clough, M. ve Summers, K., 2000. Phylogenetic Systematic and Biogeography of the Poison frogs: Evidence from Mitochondrial DNA Sequences, Biol. J. Linnean Society, 70, 515-540.



- Cooper, S.J.B., Ibrahim, K.M. ve Hewitt, K.M., 1995. Postglacial Expansion and Genome Subdivision in the European Grasshopper *Chorthippus parallelus*, Molecular Ecology, 4, 49-60.
- Çıplak, B., 2004. Systematics, Phylogeny and Biogeography of *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae): Evolution within a Refugium, Zoologica Scripta, 33(1), 19-44.
- De Lange, L., 1973. A Contribution to the Intraspecific Systematics of *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) (Amphibia), Beaufortia, 280 (21), 99-116.
- Eiselt, J., 1965. Einige Amphibien und Reptilien aus der Nordoslichen Turkei, Gesammelt von Herrn H. Steiner. Annu.Natur Histor. Mus. Wien. 67, 387-389.
- Farias, I. P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H. ve Meyer, A., 2001. The Cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of the resolution for analyzing relationships among ciclid fishes, J. Mol. Evol, 53: 89-103.
- Feller, A.E. ve Hedges, S.B., 1998. Molecular Evidence for the Early History of Living Amphibia, Mol. Phyl. Evol., 9, 509-516.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach
- Field, A., 2000. Discovery Statistics, Sage Publications. [http://www.frekans.com.tr/tr\\_analizler.html](http://www.frekans.com.tr/tr_analizler.html). 18 Temmuz 2005.
- Freeman, S. ve Herron, J.C. / Çev. Ed.: Çıplak, B., Başibüyük, H.H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ., 2002. Evrimsel Analiz, Palme Yayıncılık, Ankara, 708 s.
- Frost, D.R., 2002. Amphibian Species of the World: An Online Reference. V2.21 (15 July 2002). <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Garcia-Paris, M. ve Jockusch, E.L., 1999. A Mitochondrial DNA Perspective on the Evolution of Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura), J. Zool. Lond., 209-218.
- Gasc J.P., Cabela A., Crnobrnja-Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martínez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T.S., Veith M. ve Zuiderwijk A., 1997. Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Collection Patrimoines Naturels, 29, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, 496 pp.
- Gittins, S.P., Parker, A.G. ve Slater, F.M., 1980. Population Characteristics of the Common Toad (*Bufo bufo*) Visiting a Breeding Site in Mid-Wales, J. Anim. Ecol., 49, 161-173.
- Gittins, S.P., 1983. The Breeding Migration of the Common Toad (*Bufo bufo*) to a Pond in Mid-Wales, J. Zool., London, 199, 555-562.

- Graybeal, A., 1997. Phylogenetic Relationships of Bufonid Frogs and Tests of Alternative Macroevolutionary Hypotheses Characterizing Their Radiation, Zool. J. Linn. Soc., 119, 9-17.
- Harris, D.J., Arnold, E.N. ve Thomas, R.H., 1998. Rapid Speciation Morphological Evolution and Adaptation to Extreme Environments in Sand Lizards (Meroles) as Revealed by Mitochondrial Gene Sequences, Mol. Phylogenet. Evol., 10, 37-48.
- Harris, D.J., 2001. Reevaluation of 16S Ribosomal RNA Variation in *Bufo* (Anura: Amphibia), Mol. Phylogenet. Evol., 2(19), 326-329.
- Harrison, T.M., Copeland, P., Kidd WSF ve Yin, A., 1992. Raising Tibet. Science, 255, 1663-1670.
- Hasegawa, M., Kishino, K. ve Yano, T., 1985. Dating the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA, Journal of Molecular Evolution, 22, 160-174.
- Hay, J.M., Ruvinsky, I., Hedges, S. B. ve Maxson, L.R., 1995. Phylogenetic Relationships of Amphibian Families Inferred from DNA Sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes, Mol. Biol. Evol., 12(5), 928-937.
- Hedges, S.B., Bezy, R.L. ve Maxson, L.R., 1991. Phylogenetic Relationships and Biogeography of Xantusiid Lizards, Inferred from Mitochondrial DNA Sequences, Mol. Biol. Evol., 8, 767-780.
- Hedges, S.B. ve Maxson, L. R., 1993. A Molecular Perspective o Lissamphibian Phylogeny, Herpetol. Monogr., 6, 27-41.
- Hedges, S. B., 1994a. Molecular Evidence for the Origin of Birds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2621-2624.
- Hedges, S. B. ve Sibley, C. G., 1994b. Molecules vs. Morphology in Avian Evolution: The Case on the "Pelecaniform" Birds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9861-9865.
- Heise, P. J., Maxon, L. N., Dowling, H. G. ve Hedges, S. B., 1995. Higher-Level snake Phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes, Mol. Biol. Evol., 12(2), 259-265..
- Hemelaar, A., 1988. Age, Growth and Other Population Characteristics of *Bufo bufo* from Different Latitudes and Altitudes, Journal of Herpetology, 4(22), 369-388.
- Hemmer, H. ve Kadel, K., 1972. Weight Condition and Growth Croissance in the Natterjack (*Bufo calamita* LAUR), Forma et Fuctio, 5, 113-120.
- Hemmer, H., 1975. Serumeiweissunterschied Zwischen *B. bufo* und *B. bufo spinosus* (Salientia, Bufonidae), Salamandra, 11, 61-63.

- Hemmer, H. ve Böhme, W., 1976. Zwischenbericht über die innerartliche Variabilität der Erdkröte (*Bufo bufo* L.) (Amphibia: Salientia, Bufonidae), Salamandra, 12, 194-201.
- Hertwig, S., De Sa, R. O. ve Haas, A., 2004. Phylogenetic signal and the Utility of 12S and 16S mtDNA in Frog Phylogeny, J. Zool. Syst. Evol. Research. 42, 2-18.
- Hewitt, G.M., 1996. Some Generic Consequence of Ice Ages, and Their Role in Diverging and Speciation, Biological Journal of the Linnean Society, 58, 247-276.
- Huelsenbeck, J.P. ve Rannala, B., 1997. Phylogenetic Methods Come of Age: Testing Hypotheses in an Evolutionary Context, Science, 276, 227-232.
- Huelsenbeck, J.P. ve Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees, Bioinformatics, 17(8), 754-755.
- Ibrahim, K.M., Cooper, S.J.B. ve Hewitt, G.M., 2002. Testing for Recombination in a Short Nuclear DNA Sequences of the European Meadow Grasshopper, *Chorthippus parallelus*, Molecular Ecology, 11, 583-590.
- Jorgensen, C.B., 1984. Ovarian Functional Patterns in Baltic and Mediterranean Populations of a Temperature Zone Anuran, the Toad *Bufo viridis*, Oikos, 43, 309-321.
- Jukes, T.H. ve Cantor, C.R., 1969. Evolution of Protein Molecules. In: ed. H.M. Munro, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-32, New York, Academic Press.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level, Nature, 217, 624-626.
- Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitution Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences, Journal of Molecular Evolution, 16, 111-120.
- Kimura, M., 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. In M. Nei and R.K. Koehn, eds. Evolution of Genes and Proteins. Sunderland, MA: Sinauer, 208-233.
- Klicka, J. ve Zink, R.M., 1997. The Importance of Recent Ice Ages in Speciation: A Failed Paradigm, Science, 277, 1666-1669.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K. , Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X. ve Wilson, A.C., 1989. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 6196-6200.
- Koswig, C., 1955. Zoogeography of the Near East, Systematic Zoology, 4, 49-73.
- Kurtuluş, K., 1985. Pazarlama Araştırmaları, İşletme İktisadi Enstitüsü, 3. Baskı. [http://www.frekans.com.tr/tr\\_analizler.html](http://www.frekans.com.tr/tr_analizler.html). 18 Temmuz 2005.

- Kuzmin, S.L., 1999. The Amphibians of the former Soviet Union, Pensoft (ed.), Sofia, Moscou, 538 p.
- Liu, W., Lathrop, W., Fu, J., Yang, D. ve Murphy, R.W., 2000. Phylogeny of the East Asian Bufonids Inferred From Mitochondrial 12S and 16S Ribosomal RNA Genes, Mol. Biol. Evol., 12, 928-937.
- Lunt, D.H., Ibrahim, K.M. ve Hewitt, G.M., 1998. mtDNA Phylogeography and Postglacial Patterns of Subdivision in a Meadow Grasshopper *Chorthippus parallelus*, Heredity, 80, 663-641.
- Lüscher, B., Grossenbacher, K. ve Scholl, A., 2001. Genetic Differentiation of the Common Toad (*Bufo bufo*) in the Swiss Alps, Amphibia-Reptilia, 22, 141-154.
- Macey, J.R., Schulte II, J. A., Larson, A., Fang Z., Wang, Y., Tuniyev, B. S. ve Papenfuss, T. J., 1998. Phylogenetic Relationships of Toads in the *Bufo bufo* Species Group from the Eastern Escarpment of the Tibetan Plateau: A Case of Vicariance and Dispersal, Molecular Phylogenetics and Evolution, 1(9), 80-87.
- Madison, D.R., Swofford, D.L. ve Maddison, W.P., 1997. NEXUS: An Extensible File Format for Systematic Information, Systematic Biology, 46, 590-621.
- Mertens, R. ve Wermuth, H., 1960. Die Amphibien und Reptilien Europas, Verlag Valdemar Kramer, Frenkfurt, XII, 264 p.
- Nevo, E., 1972. Climatic Adaptation in size of the green toad. Israel Journal of Medical Sciences, 1010
- Orlava, V. F. ve Tuniyev, B. S., 1989. In the Taxonomy of the Caucasian Common Toads Belonging to the Group *Bufo bufo verrucosissimus* (Pallas) (Amphibia, Anura, Bufonidae). Byull. Mosk. Obshch. Ispyt. Prir. Otd. Biol., 94: 13-24.
- Özdemir, A. ve Baran, İ., 2002. Research on the Herpetofauna of Murat Mountain (Kütahya-Uşak), Turk. J. Zool., 26, 189-195.
- Özeti, N., Yılmaz, İ., 1994. Türkiye Amfibileri, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 221 s.
- Pauly, G.B., Hillis, D.M. ve Cannatella, D.C., 2004. The History of a Nearctic Colonization: Molecular Phylogenetics and Biogeography of the Nearctic Toads (*Bufo*), Evolution, 58(11), 2517-2535.
- Posada, D. ve Crandall, K.A., 1998. Modeltest: Testing the Model of DNA Substitution. Bioinformatics, 14, 817-818.
- Posada, D. ve Crandall, K.A., 2001. Intraspecific Gene Genealogies: Tree Grafting into Networks, Trends in Ecology and Evolution, 16, 37-45.
- Posada, D., 2003. Selecting Models of Evolution. In the Phylogenetic Handbook. Vandamme, A.M., Salemi, M., (eds). Cambridge University Press, 256-282.

- Pramuk J. B., Hass, C. A. ve Hedges, S. B., 2001. Molecular Phylogeny and Biogeography of West Indian Toads (Anura: Bufonidae), Molecular Phylogenetics and Evolution, 2(20), 294-301.
- Reading, C. J., 1990. A Comparison of Size and Body Weights of Common Toads (*Bufo bufo*) from Two Sites in Southern England, Amphibia-Reptilia, 11, 155-163.
- Riberon, A., Miaud, C., Grossenbacher, K. ve Taberlet, P., 2001. Phylogeography of the Alpine Salamander, *Salamandra atra* (Salamandridae) and the Influence of the Pleistocene Climatic Oscillations on Population Divergence, Molecular Ecology, 10, 2555-2560.
- Roy, K., Valentina, J.W., Jablonski, D. ve Kidwell, S.M., 1996. Scales of Climatic Variability and Time Averaging in Pleistocene Biotas: Implications for Ecology and Evolution, Tree, 11, 458-463.
- Rodriguez, E., Oliver, J.F., Marin, A. Ve Medina, J.R., 1990. The General Stochastic Model of Nucleotide Substitution, Journal of Theoretical Biology, 142, 485-501.
- Salemi, M. ve Vandamme, A.M., 2003. The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny, 406 p., Cambridge University Press.
- Sneath, P.H.A. ve Sokal, R.R., 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification, San Francisco, Freeman.
- Sparreboom, M.ve Arntzen, P., 1987. Über die Amphibien in der Umgebung von Adapazarı, Türkei, Herpetofauna, 9, 27-34.
- Steininger, F.F. ve Rögl, F., 1984. Paleogeography and Palinspatic Reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and Paratethys. In 'The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean' (J. E. Dixon and A.H.F. Robertson, Eds.) pp. 659-668. Geol. Soc. Spec. Publ. No.17, Blackwell Sci., Oxford.
- Steininger, F.F., Rabeder, G. ve Rögl, F., 1985. Land Mammal Distribution in the Mediterranean Neogene: A Consequence of Geokinematic and Climatic Events, Geological Evolution of the Mediterranean Basin (eds Stanly DJ, Wezel F-C), 559-571. Springer, New York.
- Sumida, M. ve Ogata, M., 1999. Intra Differentiation in the Japanese Brown frog *Rana japonica* Inferred from mtDNA Sequences of the Cytochrome b Gene, Zoological Science, 15, 989-1000.
- Sumida, M., Ogata, M. ve Nishioka, M., 2000. Molecular Phylogenetic Relationships of Pond Frogs Distributed in the Palearctic Region Inferred from DNA Sequences of Mitochondrial 12S ribosomal RNA and cytochrome b Genes, Molecular Phylogenetics and Evolution, 16(2), 278-285.

- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J ve Hillis, D.M., 1996. Phylogenetic Inference. In D.M. Hillis, C. Moritz, and B.K. Mable, eds. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer, 407-514.
- Swofford, D.L., 1998. PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony, and other methods, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G. ve Cosson, J.F., 1998. Comparative Phylogeography and Postglacial Colonization Routes in Europe, *Molecular Ecology*, 7, 453-464.
- Tan, A.M. ve Wake, D.B., 1995. mtDNA Phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4, 383-394.
- Tarkhishvili, D., 1996. The Distribution and Ecology of the Amphibians of Georgia and the Caucasus : a biogeographical analysis, *Zeitschrift für Feld Herpetologie*, 3, 167-196.
- Tarkhishvili, D.N., Thorpe, R.S. ve Arntzen, J.W., 2000. Pre-Pleistocene Refugia and Differentiation between Populations of the Caucasian Salamander (*Mertensiella caucasica*), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 414-422.
- Tosunoğlu, M. ve Taşkavak, E., 2001. A Serological Investigation of *Bufo bufo* (Abura, Bufonidae) Populations in Southern Marmara (Manyas, Balıkesir) and Eastern Black Sea (Çamlıhemşin-Rize) Regions. *Italian Journal of Zoology*, 68 (2), 165-168.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. ve Sing, C.F., 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations with Haplotypes Inferred from Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data, III. Cladogram estimation, *Genetics*, 132, 619-633.
- Thompson J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. ve Higgins, D.G., 1997. The ClustalX Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools, *Nucleic Acids Res.*, 24, 4876-4882.
- Tok, C.V., 1999. Reşadiye (Datça) Yardımadası'nın Anura Türleri Hakkında Morfolojik bir Araştırma (Anura: Bufonidae, Hylidae, Ranidae), *Tr. J. of Zoology*, 23, Ek sayı 2, 565-581.
- Trewick, S.A., Wallis, G.P. ve Morgan-Richards, M., 2000. Phylogeographical Pattern Correlates with Pliocene Mountain Building in the Alpine Scree Weta (Orthoptera, Anostomatidae), *Molecular Ecology*, 9, 657-666.
- Webb, T. ve Bartlein, P.J., 1992. Global Changes During the Last 3 Million Years: Climatic Controls and Biotic Responses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23, 141-173.

- Weisrock, D.W., Macey, J.R., Uğurtaş, I.H., Larson, A. ve Papenfuss, T.J., 2001. Molecular Phylogenetics and Historical Biogeography among Salamandrids of the 'True' Salamander Clade: Rapid Branching of Numerous Highly Divergent Lineages in *Mertensiella luschani* Associated with the Rise of Anatolia, Molecular Phylogenetics and Evolution, 18, 434-448.
- White, M.J.D., 1978. Modes of Speciation. San Francisco, W.H. Freeman.
- Yılmaz, İ., 1984. Trakya Kuyruksuz Kurbağaları Üzerine Morfolojik ve Taksonomik Bir Araştırma (Anura: Discoglossidae, Pleobatidae, Bufonidae, Hylidae, Ranidae), Doğa Bilim Dergisi TÜBİTAK, 8, 244-264.
- Yılmaz, İ., 1997. Taksonomik Zoolojinin Prensipleri ve Metodları, Oral yayıncılık, İzmir, 209s
- Yılmaz, İ. ve Kumlutaş, Y., 1995. Türkiyede Yaşayan *Bufo bufo* (Linnaeus) 1758'nun Dağılışı ve Taksonomik Durumu Hakkında bir İnceleme. Tr. J. of Zoology, 19, 277-284.
- Zardoya, R. ve Meyer, A., 2001. On the Origin of and Phylogenetic Relationships Among Living Amphibians, PNAS, 98, 7380, 7383.
- Zharkikh, A., 1994. Estimation of Evolutionary Distances Between Nucleotide Sequences, Journal of Molecular Evolution, 39, 315-329.
- Zug, G.R., Lindgren, E. ve Pippet, J.R., 1975. Distribution and Ecology of the Marine toad, *Bufo marinus*, in Papua New Guinea, Pacific Science, 29, 31-50.

## ÖZGEÇMİŞ

25.04.1976 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu Trabzon Atatürk İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimini Trabzon Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1994 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 1998 yılında bu bölümden Biyolog unvanı ile mezun oldu. 2001 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı ve aynı yıl Doktora programına başladı. Ekim 1999'dan itibaren K.T.Ü. Rize Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

