

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**Deniz ERGÜDEN**

**TÜRKİYE DENİZLERİNDEKİ TİRSİLERİN (*Alosa* spp.) MOLEKÜLER  
SİSTEMATİĞİ**

**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2007**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE DENİZLERİNDEKİ TİRSİLERİN (*Alosa spp.*) MOLEKÜLER  
SİSTEMATIĞI**

**Deniz ERGÜDEN**

**DOKTORA TEZİ**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 18/04/2007 tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

İmza.....  
Yrd. Doç. Dr. Cem ÇEVİK  
DANIŞMAN

İmza.....  
Prof. Dr. Cemal TURAN  
DANIŞMAN

İmza.....  
Prof. Dr. Dursun AVŞAR  
ÜYE

İmza.....  
Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI  
ÜYE

İmza.....  
Doç. Dr. Nuri BAŞUSTA  
ÜYE

**Bu tez Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
Kod No:**

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ  
Enstitü Müdürü  
İmza ve Mühür

**Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TUBİTAK (106T149)  
tarafından desteklenmiştir.  
Proje No: SÜF2005D1**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5486 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### DOKTORA TEZİ

#### TÜRKİYE DENİZLERİNDEKİ TİRSİLERİN (*Alosa* spp.) MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ

Deniz ERGÜDEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Cem ÇEVİK

Prof. Dr. Cemal TURAN

Yıl : 2007, Sayfa: 83

Jüri : Yrd. Doç. Dr. Cem ÇEVİK

Prof. Dr. Cemal TURAN

Prof. Dr. Dursun AVŞAR

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

Doç. Dr. Nuri BAŞUSTA

Bu çalışmada Türkiye denizlerinde bulunan 5 tirsi türü (*Alosa caspia*, *Alosa fallax nilotica*, *Alosa maetotica*, *Alosa pontica*, *Alosa tanaica*) arasındaki genetik ilişkinin şekli ve derecesi mtDNA PCR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

MtDNA'nın ND 5/6 gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılarak 6 sınırlama enzimi (*Bsu*I, *Alu*I, *Ehe*I, *Hin*6I, *Rsa*I, *Xho*I) ile kesilmiştir. RFLP sonucunda 5 tirsi türünde toplam 13 haplotip saptanmıştır.

Türlerin içerisinde ortalama haplotip çeşitliliği 0.6000 ve nükleotit çeşitliliği 0.005331 olarak bulunmuştur. Türlerin kendi aralarında karşılaştırılmalarında ise ortalama nükleotit çeşitliliği 0.008024 ve ortalama nükleotit farklılığı 0.002693 olarak gözlemlenmiştir. Türler arasındaki genetik uzaklık değerlerine bakıldığında en yüksek değerin *A. pontica* ile *A. caspia* arasında 0.009599'lük bir değer olduğu, en düşük değerin ise, *A. maetotica* ve *A. tanaica* türleri 0.000007 arasında olduğu görülmektedir. Monte-Carlo ( $X^2$ ) İkili Karşılaştırma Analizi sonucu bütün türler arasında önemli derecede farklılıklar olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

UPGMA soyağacı analizine göre, *A. tanaica* ve *A. maetotica* türleri birbirine genetik olarak en yakın bulunmuş, *A. pontica* ise türler içerisinde en farklı tür olarak göze çarpmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Türkiye denizleri, Tirsi türleri, Mitokondrial DNA, PCR-RFLP, Moleküler sistematik

## ABSTRACT

### PhD. THESIS

# THE MOLECULAR SYSTEMATIC OF SHADS (*Alosa* spp.) IN TURKISH SEAS

Deniz ERGÜDEN

DEPARTMENT OF FISHERIES  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Assit. Prof. Dr. Cem ÇEVİK

Prof. Dr. Cemal TURAN

Year : 2007, Pages: 83

Jury : Assit. Prof. Dr. Cem ÇEVİK

Prof. Dr. Cemal TURAN

Prof. Dr. Dursun AVŞAR

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

Assoc. Prof. Dr. Nuri BAŞUSTA

In this study mitochondrial DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay was used to analyse the phylogenetic relationships among five shad species (*Alosa caspia*, *A. fallax nilotica*, *Alosa maeotica*, *Alosa pontica*, *Alosa tanaica*) from Turkish seas.

The complete NADH 5/6 gene region of mtDNA amplified by PCR were digested with six restriction enzymes, *Bsu*I, *Alu*I, *Ehe*I, *Hin*6I, *Rsa*I, *Xho*I respectively.

A total of 13 haplotypes were detected from five shad species. The average haplotype diversity and nucleotide diversity within species were 0.6000 and 0.005331 respectively. The average nucleotide diversity and nucleotide divergence among species were 0.008024 and 0.002693 respectively. The highest genetic divergence was observed between *A. pontica* to *A. caspia* (0.009599) and lowest, between *A. maeotica* and *A. tanaica* (0.000007). Monte Carlo ( $X^2$ ) pairwise found determined significant differences between all species, depending on the mtDNA regions examined ( $p < 0.001$ ).

In the UPGMA (Unweighed Pair Group Method) dendogram, *A. tanaica* and *A. maeotica* exhibited closest genetical similarity and *A. pontica* showed highest genetical differentiation within *Alosa* genus.

**Key Words:** Turkish seas, Shad species, Mitochondrial DNA, PCR-RFLP, Molecular systematic

## **TEŞEKKÜR**

Doktora tezimin planlanmasında ve yürütülmesinde değerli deneyim ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocalarım Sayın Prof Dr. Cemal TURAN ve Yrd. Doç. Dr. Cem ÇEVİK'e, her zaman desteğini aldığım sevgili eşim, Araş. Gör. Sibel ERGÜDEN'e, tez çalışmamın yürütülmesi sırasında önemli katkılarda bulunan çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Mevlüt GÜRLEK, Yüksek lisans öğrencisi Deniz YAĞLIOĞLU, Su Ürünleri Yüksek Mühendisi Mehmet KARCIOĞLU'na, arazi çalışmalarım sırasında gösterdikleri katkılarından dolayı değerli dostlarım; Gökhan AKDEMİR, Turgut MUŐMUL ve Sinan TOPALOĞLU'na, teyzem Yüksel İPEKÇİ'ye ve tez çalışmamın tamamlanmasında önemli maddi destek sağlayan TUBİTAK'a (106T149 no'lu proje) teşekkürlerimi bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

<b>ÖZ</b> .....	I
<b>ABSTRACT</b> .....	II
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	III
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	IV
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	VII
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	VIII
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	IX
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Tirsî Türleri ve Dağılım Alanları.....	4
1.2. Türlerin Biyolojileri ve Avcılık Durumu.....	5
1.2.1. Yumurtlama ve Beslenme Özellikleri.....	5
1.2.1.1. <i>Alosa caspia</i> .....	6
1.2.1.2. <i>Alosa maeotica</i> .....	6
1.2.1.3. <i>Alosa pontica</i> .....	6
1.2.1.4. <i>Alosa tanaica</i> .....	7
1.2.1.5. <i>Alosa fallax nilotica</i> .....	7
1.3. Tür Kavramı.....	7
1.3.1. Tür Oluşumu.....	8
1.3.2. Alt Tür Kavramı.....	10
1.4. Tür Tespitinde Kullanılan Morfolojik ve Genetik Tekniklerin Önemi... ..	10
1.5. Genetik Tekniklerin Tür Tespitinde Kullanım Alanları.....	11
1.6. Moleküler Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Genetik Teknikler... ..	12
1.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	14
1.6.2. Sınırlama Parçaları Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	14
1.7. Mitokondrial DNA.....	16
1.7.1. MtDNA Genlerinin Evrilme Hızı.....	18
<b>2.1. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	19
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	26
3.1. Materyal.....	26

3.1.1. Tirsi Türlerinin Sistematikteki Yeri.....	26
3.1.2. Tirsi Türlerinin Tayin Edilmesi ve Tayin Anahtarı.....	27
3.1.3. Tirsilerin Genel Özellikleri.....	27
3.1.3.1. Tirsilerin Morfolojik Özellikleri.....	28
3.1.3.1.(1). <i>Alosa caspia</i> .....	28
3.1.3.1.(2). <i>Alosa maeotica</i> .....	29
3.1.3.1.(3). <i>Alosa pontica</i> .....	30
3.1.3.1.(4). <i>Alosa tanaica</i> .....	31
3.1.3.1.(5). <i>Alosa fallax nilotica</i> .....	32
3.1.4. Örneklerin Toplanması ve Örnekleme Alanları.....	33
3.1.5. Laboratuar İşlemlerinde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	35
3.1.5.1. Morfolojik Ölçümlerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	35
3.1.5.2. Genetik Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler.....	35
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Örneklerin Muhafazası ve Tespiti.....	36
3.2.2. Meristik İnceleme.....	36
3.2.3. Genetik İnceleme.....	37
3.2.3.1. Uygulanan Genetik Teknikler.....	37
3.2.3.1.(1). Mitokondri DNA'nın Ekstrakte Edilmesi.....	37
3.2.3.1.(2). Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektroforezi.....	37
3.2.3.1.(3). Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle ND 5/6 Genlerinin Çoğaltılması.....	38
3.2.3.1.(4). Akrilamid Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektroforezi.....	38
3.2.3.1.(5). RFLP (Sınırlama Parçaları Uzunluk Polimorfizmi) İle Genetik Farklılığın Tespiti.....	39
3.2.3.1.(6). Haplotiplerin Tespit Edilmesi.....	40
3.2.3.2 Genetik Verilerin Analizi.....	40
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
4.1. Bulgular.....	41
4.1.1. Türlerin Eşeylere Göre Dağılımı.....	41

4.1.2. Tespit Edilen Türlerin Meristik Özellikleri.....	42
4.1.3. Genetik Bulgular.....	46
4.1.3.1. Toplam DNA'nın Elde Edilmesi.....	46
4.1.3.2. Haplotip Çeşitliliği.....	47
4.1.3.3. <i>Bsu</i> I Sınırlama Enzimi.....	54
4.1.3.4. <i>Alu</i> I Sınırlama Enzimi.....	55
4.1.3.5. <i>Ehe</i> I Sınırlama Enzimi.....	55
4.1.3.6. <i>Hin</i> 6I Sınırlama Enzimi.....	56
4.1.3.7. <i>Rsa</i> I Sınırlama Enzimi.....	57
4.1.3.8. <i>Xho</i> I Sınırlama Enzimi.....	57
4.1.3.9. Nükleotit Çeşitlilik ve Nükleotit Farklılık.....	58
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>68</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>83</b>



**ÇİZELGELER DİZİNİ****SAYFA**

Çizelge 3.1 Tirsi Türlerinin Bölgelerimizdeki Denizlere Göre Avlanma Bölgeleri ve Avlanma Yöntemleri.....	33
Çizelge 3.2.Çalışmada Kullanılan Sınırlama Enzimleri ve DNA Tanıma Dizileri.....	39
Çizelge 4.1. İncelenen Türlerin Meristik Özelliklerinin Dağılımı.....	45
Çizelge 4.2. Tüm Örneklerin ND 5/6 Bölgesinden Elde Edilen Haplotip ve Frekansları. Haplotiplerin Elde Edilmesinde Kullanılan Enzimler..	48
Çizelge 4.3. Tirsi Türleri İçerisinde MtDNA Düzeyinin mtDNA Bölgesi Değişiminde. Ölçülen Haplotip Çeşitlilik Değerleri.....	50
Çizelge 4.4. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin <i>Bsu</i> I Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri.....	54
Çizelge 4.5. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin <i>Alu</i> I, <i>Ehe</i> I Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant UzunluklarınaGöre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri.....	55
Çizelge 4.6. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin <i>Hin</i> 6I Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri.....	56
Çizelge 4.7. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin <i>Rsa</i> I ve <i>Xho</i> I Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri.....	57
Çizelge 4.8. Tirsi Türleri İçerisinde MtDNA Düzeyinin ND Bölgesi Değişiminde Ölçülen Nükleotit Çeşitlilik Değerleri.....	58
Çizelge 4.9. MtDNA ND 5/6 Genleriyle Türler Arasındaki Nükleotit Çeşitlilik Değerleri.....	60
Çizelge 4.10. MtDNA ND 5/6 Genleriyle Türler Arasındaki Nükleotit Farklılık Değerleri.....	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 1.1. RFLP Tekniği İle Canlılar Arasındaki Genetik Farklılığın Tespiti.	15
Şekil 1.2. Balık Mitokondrisinde (mtDNA) Genlerin Dizilimi.....	17
Şekil 3.1. <i>Alosa caspia</i> 'nın Genel Görünüşü.....	28
Şekil 3.2. <i>Alosa maeotica</i> 'nın Genel Görünüşü.....	29
Şekil 3.3. <i>Alosa pontica</i> 'nın Genel Görünüşü.....	30
Şekil 3.4. <i>Alosa tanaica</i> 'nın Genel Görünüşü.....	31
Şekil 3.5. <i>Alosa fallax nilotica</i> 'nın Genel Görünüşü.....	32
Şekil 3.6. Tırsi Türlerinin Örnekleme Alanları.....	34
Şekil 3.7. Çalışmada Kullanılan PCR ve Dikey Elektroforez Cihazının Görünümü.....	35
Şekil 3 8. Türlerin Tayininde Kullanılan Solungaç Kemer ve Kısımları.....	36
Şekil 4.1. Avlanan Tırsi Türlerinin Eşey Dağılımı.....	41
Şekil 4.2. Türlerin Solungaç Diken Sayıları Yönünden Karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.3. Türlerin Karina Pul Sayıları Yönünden Karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.4. Ekstrakte Edilen Total DNA'nın Agoraz Jel Üzerinde Kontrolü.....	46
Şekil 4.5. Tırsi Türlerinin ND 5/6 Genleriyle Sınırlama Enzimleri İle Kesilmesi Sonucu elde edilen PCR-RFLP Bant Profili.....	47
Şekil 4.6. Tırsi türleri arasındaki akrabalık ilişkisinin, ND 5/6 gen bölgesi için 6 sınırlama enzimi ile tespit edilen haplotiplerin asgari zincir ağı ile görünümü.	49
Şekil 4.7. Türler Arasındaki Genetik Uzaklığın UPGMA Soy Ağacı İle Gösterimi.....	65

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

<b>bç</b>	: baz çifti
<b>kb</b>	: kilo baz
<b>g</b>	: gram
<b>mg</b>	: miligram
<b>ml</b>	: mililitre
<b>mA</b>	: mili amper
<b>µl</b>	: mikrolitre

### Kısaltmalar

<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RFLP</b>	: Sınırlama Parçası Uzunluk Polimorfizmi
<b>MtDNA</b>	: Mitokondrial DNA
<b>TEMED</b>	: N,N,N, N-Tetrametiletildiamin
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>ND-5/6</b>	: Nikotin Amid Adenin Dehidrojenaz-5/6
<b>UPGMA</b>	: Tartılı Olmayan Çiftleştirilmiş Grup Metodu Aritmetik Ortalaması

**1. GİRİŞ**

Canlılar arasındaki çeşitliliği ortaya çıkaran moleküler tekniklerin son 30 yılda gelişmesiyle birlikte, türler ve populasyonlar arasında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde genetik teknikler yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Genetik çeşitliliğin korunması, türlerin ve doğal populasyonların korunmasında temel unsurdur. Herhangi bir biyolojik kaynağı etkili olarak yönetmek için, mevcut tür ve populasyonların genetik varyasyon düzeyinin mutlaka bilinmesi önemlidir. Günümüzde bazı genetik belirteçler kullanılarak, birçok tür için belirli düzeyde bilgilere ulaşılabilir olmasına rağmen, populasyon genetiği ve uzun süreli araştırmalar için genom haritalama ve kantitatif karakter lokuslarının belirlenmesi gibi ilave bilgilere de ihtiyaç duyulmaktadır.

Balıklarda filogenetik çalışmalarda, genetik tekniklerden uzun süreden beri yararlanılmaktadır (Utter, 1991). Genetik tekniklerin ilk önemli uygulamaları, geniş olarak denizlerde gözlenen davranış ve göç modellerinin araştırılmasıyla ilgilidir. Moleküler genetik çalışmaları ilk olarak uzak balık populasyonları arasında hemoglobin polimorfizminin araştırılmasıyla başlamıştır (Sick, 1961; Ward ve Grewe, 1994). Örneklerin ayırım sırasında karşılaşılan problemleri çözmek için özel histokimyasal boyama yöntemleri kullanılmıştır (Hunter ve Markert, 1957). Eldeki genetik belirteçlerin çeşitliliğini sayıca artırabilmek için araştırmacılar 1980'li yılların başında Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'dan yararlanmaya başlamışlardır. Bu alanda yapılan ilk çalışmalar Mitokondrial DNA (mtDNA) odaklı olup, RFLP analizi kullanılmıştır (Lansman ve ark., 1981). Sonraki araştırmalar genetik materyale ait belirli bölgelerin dizi analizi üzerine odaklanmıştır (Bernartchez ve ark., 1992).

Tirsiler Clupeidae familyası mensubu olan, Alosa cinsi ile temsil edilen ülkemiz denizlerinde Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz'de dağılım gösteren, ekonomik değere sahip balıklardandır (Akşiray, 1987). Bu familya temsilcileri, yanal çizgisi bulunmayan ve kısa bir sırt yüzgeçleri olan, vücutları yanlardan hafifçe yassılaştırmış pelajik balıklardır. Karın bölgesinde adeta testere dişi görünümünde iyi gelişmiş bir karina bulunur. Pulları genellikle gevşek yapılı olup, dokunulduğu

zaman kolaylıkla dökülebilen özelliktedir. Baş tarafı çıplak ve ağız bıyıklardan yoksundur. Genellikle alt çene, üst çeneden daha uzundur.

Dünyanın birçok bölgesinde çeşitli formlarda çeşitli amaçlarla, geniş çapta faydalanılan bu familya temsilcilerinin ekonomik değeri yüksektir. Genellikle, denizlerimizde sahillere oldukça yakın olarak büyük sürüler halinde dolaşırlar.

Türkiye kıyılarında önceki yıllarda yapılan çalışmalarda Alosa cinsine ait tirsilerden bir tür (*Alosa maeotica*) ve altı alt türün (*A. caspia bulgarica*, *Alosa caspia nordmanni*, *Alosa caspia palaeostomi*, *Alosa caspia tanaica*, *Alosa fallax nilotica*, *Alosa pontica pontica*) var olduğu bildirilmiştir (Slastenenko, 1955; Kuru, 1980; Geldiay ve Balık, 1996; Demirsoy, 1998; Mater ve Bilecenoğlu, 1999). Yakın bir tarihte bu cinsin sahip olduğu tür ve alttürler için morfolojik karakterlere dayalı bir revizyon yapılmış ve şu anda ülkemizde alosa cinsine ait dört tür (*A. caspia*, *A. maeotica*, *A. tanaica*, *A. pontica*) ve bir alt türün (*A. fallax nilotica*) bulunduğu belirtilmiştir (Bilecenoğlu ve ark., 2002; Kuru, 2004). Fakat henüz bu cinsin sahip olduğu tür ve alttürlerin geçerliliği üzerine büyük kuşkular bulunmaktadır. Bu da bu tür üzerine moleküler sistematik çalışmaların yapılmasının zorunluluğunu ortaya koymaktadır.

Tirsi tür ve alt türlerinin morfolojik ayrımı kolay değildir. Denizlerimizde her türün ve popülasyonların maruz kaldığı avcılık baskısı farklıdır ve yıllara göre dalgalanmalar göstermektedir. Bazı yıllarda aşırı avcılık sonucu popülasyonlarda yüksek miktarda düşüşler görülmüş ve bu düşüşler ileriki yıllarda bazı türler için daha da artış göstererek devam etmiştir. Fakat aşırı avcılığın tür ve popülasyonlar üzerine ne tip etkilerinin olduğu bilinmemektedir.

Son yıllarda tirsilerin cins ve tür adlarında değişiklikler yapılmış, bazı alt türler tür düzeyinde gösterilirken; bazı alt türlerinde buldukları türün sinonimi olduğu kanısına varılarak, tek bir tür gibi kabul edilmeye başlanmıştır. Taksonomik açıdan Avrupa ülkelerinde birçok genetik çalışma yapılmış olsa da ülkemiz gen kaynaklarının tespiti açısından herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu konuda şu ana kadar yapılmış ayrıntılı bir genetik çalışma olmadığından ülkemizdeki tirsi türlerinin adlandırılmasında büyük bir sıkıntı yaşanmaktadır. Bunun yanında bu türler arasındaki filogenetik ilişkinin bilinmesi, bu türlerin evrimsel olarak değişiminin

ortaya konması ve türler arasındaki genetik benzerliklerin bilinmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmada bu konudaki boşluğu doldurmak amacı ile denizlerimizde yaygın olarak avlanan ve ekonomik değeri yüksek olan tirsî türlerinin mtDNA ND 5/6 (Nikotin Amid Adenin Dehidrojenaz-5/6) genleri kullanılarak PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Sınırlama Parçası Uzunluk Polimorfizmi) analizi tekniği ile genetik yapılarının incelenmesi ve türler arasındaki moleküler sistematik ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

**1.1. Tirsi Türleri ve Dağılım Alanları**

Tirsi türleri dünya denizlerinde Atlantik'in doğusu, Akdeniz, Karadeniz-Azak-Hazar Denizi ve Atlantik'in batı bölgesinde farklı türler ve alt türleriyle yoğun olarak dağılım göstermektedir.

Tirsiler başlangıçta üç cins olarak (*Alosa*, *Caspiolasa*, *Pomolobus*) sınıflandırılmıştır. Svetovidov, (1964) tüm bu türleri morfolojilerini göz önüne alarak yaptığı sınıflandırmasında tirsileri tek cins olmakla (*Alosa*) birlikte iki alt cins olarak (*Alosa* ve *Pomolobus*) ifade etmiş ve *Caspiolasa*'nın farklı bir alt cins olarak geçerli olmadığını belirtmiştir. Bununla birlikte Bagliniere, (2000) ve Bobori, ve ark. (2001) Karadeniz-Azak-Hazar Denizi'nin farklı bir biyocoğrafya olarak düşünülmesi gerektiğini ve bu bölgede bulunan tirsi türlerinin morfolojik yapılarına göre farklı bir alt cins olarak değerlendirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

*Alosa* cinsine ait türlerden *A. alosa* Linnaeus, 1758) ve *A. fallax* (Lacepede, 1803), Atlantik'in doğusu ve Akdeniz'de dağılım gösterirken; *A. sapidissima* (Wilson, 1811) ve *A. alabamae* (Jordan & Evermann, 1896), kuzey batı ve orta Atlantik'te dağılım göstermektedir. Karadeniz, Azak denizi ve Hazar denizi'ni kapsayan Ponto-Caspian olarak adlandırılan bölge içerisinde, *A. pontica* (Eichwald, 1838), *A. maeotica* (Grimm, 1901), *A. caspia* (Eichwald, 1838), *A. tanaica* (Grimm, 1901), *A. brashnikovi* (Borodin, 1904), *A. saposhnikovi* (Grimm, 1887), *A. sphaerocephala* (Berg, 1913) ve *A. kessleri* (Grimm, 1887) türlerinin bulunduğu bildirilmektedir (Whitehead, 1985). *Pomolobus* cinsi ise Batı Atlantik'teki türleri kapsamakta ve bunlar *A. aestivalis*, *A. pseudoharengus*, *A. mediocris* ve *A. chrysochloris* olmak üzere dört tür olarak bilinmektedir. Atlantik'in Kuzey Batı ve Orta kısmında; *A. aestivalis* (Mitchill, 1814), *A. mediocris* (Mitchill, 1814), *A. pseudoharengus* (Wilson, 1811); Orta Batı Atlantik'te ise *A. chrysochloris* (Rafinesque, 1820) bulunmaktadır (Whitehead, 1985; Economidis ve Sinis, 1986; Bagliniere, 2000).

**1.2. Türlerin Biyolojileri İle Avcılık Durumları**

Tirsi türleri *Alosa* cinsine bağlı Clupeidae familyası içinde yer almaktadır. Alt familyaları Alosinae'dir. Pelajik olan bu familyayı temsil eden türlerin çoğu deniz formları olup; tropikal ve subtropikal denizlerde yaşarlarsa da bazı formları akarsulara ve tatlı su göllerine uyum göstermişlerdir.

Ülkemiz denizlerinde bulunan türlerden *A. fallax nilotica* Akdeniz, Ege denizi, Marmara denizi ve Karadeniz'de bulunurken; diğer tırsi türleri *A. caspia*, *A. maeotica*, *A. pontica* ve *A. tanaica* Karadeniz ve Marmara denizi sahillerinde dağılım göstermektedir. Bu türlerden özellikle *A. pontica*'nın son yıllarda Karadeniz sahillerinden sonra Marmara denizi sahillerinde de görülmeye başlandığı belirtilmiştir (Eryılmaz, 2001)

Genellikle, fazla ışıklı günleri suların berraklığına göre, alt tabakalarda (10-30 m veya daha altındaki derinliklerde), geceleri ve bulutlu günlerde ise suların üst tabakalarında geçirmektedirler. Denizlerimizde sahillere yakın sürüler halinde dolaşırlar. Anadrom türlerdir, *A. fallax nilotica* haricindeki diğer türler kış aylarını Karadeniz'in uygun bölgelerinde geçirdikten sonra yaz aylarını Azak denizi ve çevresinde geçirmektedirler. Ekim ayından Mart ayına kadar bolca avlanmaktadırlar. Formlara göre avcılığı gırgır, manyat, tarlakoz, sürütme, serpme ve orta su trolü gibi ağlarla yapılmaktadır.

Ülkemizde tırsi türleri genellikle % 76'lık bir oranla en fazla Karadeniz'de dağılım göstermektedir. Ancak bu türlerin 1980'li yıllardan sonra Karadeniz'deki stoklarında azalmalar başlamıştır. Zengin ve ark. (1998) tarafından önceki yıllarda yapılan bir araştırmada tırsilerin Karadeniz'deki ticari öneme sahip türler arasında % 0.4'lük bir paya sahip olduğu bildirilmektedir.

**1.2.1. Yumurtlama ve Beslenme Özellikleri**

Tırsiler eşeyssel olgunluğa 1-5. yaşlarından itibaren erişirler. Nisan-Mayıs aylarından Eylül'e kadar, çeşitli zamanlarda aralıklı olarak üremelerini, sahillerden



oldukça uzaklarda, büyük sürüler halinde toplanarak sürdürürler. Genellikle tirsiler 25 cm uzunluğa ulaştınca ilk yumurtalarını bırakmaya başlarlar (Slastanenکو, 1956).

Yumurtaları pelajik olup, kuluçka süreleri türlere ve suların ısı durumuna göre 8 saat ile 5 gün arasında değişmektedir. Yumurta çapları türlere ve yaş durumlarına göre 0.3-2.5 mm arasında olabilmektedir. Dişilerin yumurta verimlilikleri türlere göre değişmekle birlikte 400-700 bin civarındadır. Yumurtadan çıkan yavrular, öncelikle besin depolarını tüketinceye kadar, kendi kendilerine dibe doğru inerler; sonra yüzeyin 2-3 m altına kadar yükselerek pelajik yaşamlarını, zooplanktonik canlıları avlayarak sürdürürler (Akşiray, 1987).

#### **1.2.1.1. *Alosa caspia* (Eichwald, 1838)**

Mayıs-haziran aylarında nehir ağızlarına ve nehirlerin alt kısımlarına geçerek yumurtlarlar. Yarı pelajik olan yumurtalar 2-3 gün sonra açılır ve daha sonra genç bireyler denize göç ederler; 2-3 yıl sonra da erginleşirler. Her dişi bir defada 400-700 bin yumurta bırakır. Omurgasız hayvanlarla ve küçük balıklarla beslenirler (Whitehead, 1985; Demirsoy, 1998).

#### **1.2.1.2. *Alosa maeotica* (Grimm, 1901)**

Üreme zamanı tatlı ve acı sulara geçerler. Nehir ağızlarında çok bulunurlar. Üreme zamanları Mayıs-Temmuz arasındadır. 2-3 yıl arasında eşeyssel olgunluğa ulaşırlar. Başlıca besinini zooplanktonlar (özellikle Copepoda cinsi) ve küçük balıklar oluşturur (Geldiay ve Balık, 1996).

#### **1.2.1.3. *Alosa pontica* (Eichwald, 1838)**

Nisan-haziran aylarında nehirlerin ortalarına kadar ulaşır ve kumların, çakıl taşlarının üzerine yumurtalarını bırakırlar. Yavrular birkaç ay sonra sürüler halinde aşağılara ve sonunda denize göç ederler. Denizde ancak 2-3 yıl sonra olgunluğa ulaşırlar. En fazla 7 yıl yaşarlar. Gençlik dönemlerinde omurgasız küçük hayvanları,

ergin dönemde ise omurgasızları ve küçük balıklarla beslenirler (Whitehead, 1985; Demirsoy, 1998).

#### **1.2.1.4. *Alosa tanaica* (Grimm, 1901)**

Üreme zamanı Nisan-Haziran arası olup; bu mevsimde toplu halde liman ve deltalara girerek yumurta bırakırlar. Olgunlaşma 2-3 yaşında gerçekleşir ve bir dişi balık 400-700 bin yumurta verebilir. Yumurtadan çıkan ve belli bir boya erişen yavrular sonbaharda denize döner ve kışı orada geçirirler. Temel besinlerini planktonik omurgasız hayvanlar ve küçük balıklar oluşturur. (Geldiay ve Balık, 1996).

#### **1.2.1.5. *Alosa fallax nilotica* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1809)**

Büyüme periyodunu denizlerde ve özellikle 100 m. ye kadar olan derinliklerde geçirir. Eşeyssel olgunluğa 3-4. yaşında erişir. Üreme zamanında tatlı sulara göç ederek Mayıs-Haziran ayları arasında yumurta bırakır. Bir dişinin yumurta verimi 100-200.000 civarındadır. Yumurtadan çıkmış ve kısmen de büyümüş olan yavrular sonbaharda toplu halde denize geçerler. Omurgasızlarla özellikle pelajik kabuklularla beslenirler (Geldiay ve Balık, 1996; Demirsoy, 1998).

### **1.3. Tür Kavramı**

Tür kavramında araştırmacılar arasında, değerlendirme yöntemleri ve özelliklerin seçimi konusunda birçok fikir ayrılığı olmakla beraber, ana ilkeler açısından tam bir fikir birliğine varılmış durumdadır. Tür; Yapısal özellikleriyle genetik karakterleri birbirine benzeyen ve yine aynı genetik karakterde yeni kuşaklar (jenerasyon) verebilen bireylerin tümü şeklinde biyolojik genetik bir bütün olarak tanımlanmaktadır (Kühn, 1964; Hadorn ve Wehner, 1974). Diğer bir taraftan “Yapısal ve işlevsel özellikleri yönünden birbirine benzeyen ve aynı çevresel koşullara benzer tepki gösteren doğal koşullarda serbest olarak birbirleriyle çiftleşip

verimli yavrular oluşturabilen bireyler topluluğu” şeklinde de türün tanımı yapılmaktadır. Tür, dinamik bir varlıktır yeni dölleri oluşturarak varlığını devam ettirir. Yeni döllerin oluşumu sürecinde, gen havuzu içeriğinde değişimler olur, farklı ya da aynı alanlarda olan değişimler, türleri kendi içerisinde bir alt birimleşmeye götürür ve alt birimleşmenin tamamlanmasıyla yeni türler oluşur.

Türler genellikle kendi içerisinde fenotipik ve genetik olarak farklılaşmış gruplara veya popülasyonlara bölünmüştür. Türü meydana getiren popülasyondaki bireyler birbirinin aynısı değil benzeri olurlar. Yani, anatomik, fizyolojik özellikleri, protein yapısı ve davranışları bakımından belirli değişimler (varyasyonlar) gösterirler. Değişim faktörü türlerin temel özelliklerinden birini oluşturur. Ancak, aynı türe ait bireyler arasındaki değişimler, farklı türlere ait bireyler arasındaki değişimlere göre çok daha azdır. Başka bir ifadeyle iki farklı tür arasında gen akışı tamamen kesilmiş, yani eşeysel yalıtım (izolasyon) sağlanmış durumdadır. Bunun yanında istisnai bir durum olarak ikiz türler ve hatta bazen birbirine oldukça uzak akraba olan türler arasında karşılıklı döllenme ve yavru meydana getirme görülebilir. Fakat gen ve kromozom dağılımındaki dengesizliklerden dolayı bu yavrular hayvanlarda verimli olmazlar (Demirsoy, 1998, Kocataş, 2003).

### **1.3.1. Tür Oluşumu**

Yeni türlerin oluşumunda yalıtım (izolasyon mekanizması) en büyük etkiye sahiptir. Çünkü gen akışı devam eden popülasyonlarda tür düzeyinde farklılaşma oluşamaz. Bir popülasyon belirli bir süre birbirinden coğrafik olarak yalıtılmış alt popülasyonlara bölünürse, bir zaman sonra kendi aralarında çiftleşme yeteneklerini yitirerek, yeni tür özelliği kazanmaya başlar. Bu süre içerisinde oluşacak çiftleşme davranışlarındaki farklılaşmalar, yalıtımı çok daha etkili duruma getirmektedir. Kalıtsal yapı açısından birleşme ve döl meydana getirme yeteneklerini koruyan birçok popülasyon, sadece çiftleşme davranışlarında meydana gelen farklılaşmadan dolayı yeni tür özelliği kazanmıştır (Demirsoy, 1998).

Bir tür, ekolojik gereksinimlerine karşılık bulunduğu sürece yayılış alanını genişletir. Genişleyen yayılış alanı yeni bariyerlerin ortaya çıkmasıyla bölünebilir.

Bunun sonucunda bariyerler popülasyonu alt gen havuzlarına böler. Her bir gen havuzu, süreç içerisinde farklılaşmalar geçirerek yeni ve bağımsız gen havuzları ve de yeni türler oluşur.

Tür topluluğunu oluşturan bireyler birçok ortak özelliğe sahip olup; diğer türlerden bir veya daha fazla özellik bakımından farklılık gösterirler. Bu türün bireyleri ortak bir atadan türemişlerdir. Aralarında genetik akrabalık bulunan bu bireyler birbirleriyle çiftleşince kendilerine benzeyen ve doğurgan olan yavrular meydana getirirler.

Bir türün yaşadığı alanda bulunmasının iki nedeni vardır. Bunlar evrimsel ve ekolojik nedenlerdir. Ekolojik olarak tür yaşadığı habitatın koşullarında yaşamını sürdüreceği ve üreyebilecek uyumlara sahiptir. Evrimsel olarak ise; türün atası orada yaşamıştır ve tür orada oluşmuştur. Ya da tür önce başka yerde oluşmuş yani atası orada yaşamamış sonra oraya taşınmıştır (Demirsoy, 1996). Bir türün yaşadığı alanda mı evrimleştiği yoksa sonradan mı oraya yayıldığı, akraba türlerinin yayılışı ile tahmin edilebilir. Bu açıdan türlerin yayılışı önemlidir. Yayılışlar türleşme şekilleri hakkında, türleşme şekilleri de yayılışları hakkında fikir verir.

Türler simpatrik (aynı kökenden gelen ve aynı coğrafik bölgede bulunan türler) ve allopatrik (ayrı coğrafik bölgelerde bulunan türler) olarak iki yolla oluşabilir. Simpatrik türleşmede aynı atayı paylaşan, iki ya da daha fazla tür aynı alanda oluşmaktadır. Allopatrik türleşmede, bir atasal türün yayılışının bariyerle bölünmesi sonucu alt popülasyonlar oluşmakta ve bu alt popülasyonlar yeni türlere farklılaşmaktadır.

Morfolojik olarak birbirine benzeyen fakat çoğalma bakımından birbirlerinden ayrılan türlere sibling (ikiz), iki veya daha fazla alt türlere politipik, alt türleri olmayan türlere monotipik, dünya da geniş alanlara yayılmış türlere kozmopolit ve belirli kıtalara yayılmış türlere ise kıtasal (kontinental) türler denilmektedir (Kuru, 1999).

**1.3.2. Alt Tür Kavramı**

Bir türe ait bireyler buldukları çevrede aynı gen havuzuna sahip bir ekolojik birlik (populasyon) oluştururlar. Böylece her bir tür birçok bölgesel populasyonlardan oluşur. Bunlardan bazıları birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu bireylerin oluşturdukları tür altı gruplara alt tür (subspecies) denilmektedir. Bir türün içerisinde genellikle coğrafik yalıtım, dolayısıyla coğrafik ırklara bağımlı olarak alt türler oluşabilir. Bunlar türün diğer populasyonlarından taksonomik olarak farklıdır. Alt türler, kendi içlerinde kısmi yalıtımdan dolayı, gen bileşimi bakımından birbirlerine daha çok benzeyen gruplardan meydana gelmiştir. Böyle bir politipik tür'ün alttürleri ilke olarak gen bileşimleri bakımından farklı olmakla beraber, bir araya getirildiklerinde başarılı olarak çiftleşebilirler ve verimli döller meydana getirebilirler (Demirsoy, 1998).

**1.4. Tür Tespitinde Kullanılan Morfolojik ve Genetik Tekniklerin Önemi**

Balıklarda bulunan morfolojik karakterler çeşitli sınıflara ayrılmış gruplar arasındaki ilişki ve farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Farklı türlerin tanımlanması ve stoklar arasındaki ilişki ve farklılıkların belirlenmesinde, balıkların teşhisinde ayırt edici morfolojik özelliklerinden biri olan meristik karakterler de yaygın olarak kullanılmaktadır (Ihssen ve ark., 1981; Casselman ve ark., 1981; Bookstein, 1982; Bird ve ark., 1986; Friedland ve Reddin, 1994; Turan, 2000). Bu alanda stok ve tür farklılığını belirlemek üzere yapılmış birçok (Corti ve ark., 1988; Shepperd, 1991; Avşar, 1994; Haddon ve Willis, 1995; Bembo ve ark., 1996; Turan, 1997) çalışmaya rastlanılmaktadır.

Türler içinde meydana gelen fenotipik değişim, sadece genetik kontrol altında olmayıp, aynı zamanda çevresel etmenlerin de etkisi altındadır. Bununla birlikte balıklarda görülen fenotipik esneklik, onların davranış ve fizyolojilerinde meydana gelen modifikasyonlar sayesinde çevresel değişimlere adapte olmalarını sağlamaktadır. Bu modifikasyonlar, çevresel değişimin etkilerini azaltarak, balıkların

morfoloji, üreme ve yaşam sürelerinde değişimlere de yol açmaktadır (Stearns, 1983; Meyer, 1987).

Genetik tekniklerin kullanımından önce, morfolojik farklılığın tamamıyla genetik farklılaşmadan kaynaklandığı sanılmakta ve stokların tespiti, genellikle morfolojik özellikler kullanarak yapılmaktaydı (Marr, 1957). Fakat, fenotipik tekniklerin kullanımı, bir türe ait populasyon tespitinde fenotipik değişimin direk olarak genetik kontrolün etkisi altında olmayışı ve çevresel faktörlerin değişiminden etkilenmesinden dolayı sınırlı hale gelmiştir (Allendorf ve ark., 1987). Çünkü; genetik tekniklerin balıkçılıkta kullanımı ile daha önce fenotipik olarak farklı olan birçok populasyon veya türün genetik olarak farklı olmadığı ortaya çıkmıştır.

### **1.5. Genetik Tekniklerin Tür Tespitinde Kullanım Alanları**

Genetik tekniklerin sistematikte çeşitli amaçlarla kullanımı mümkündür (Turan, 2000; Bardakçı ve Karataş, 2005). Bunları beş maddede sıralamak mümkündür.

Belirgin ya da güvenilir morfolojik farklılıkları olmayan türlerin ayırt edilmesi. Çok uzun zaman önce farklılaşmış olan türlerin sınıflandırılmasında kullanılabilecek morfolojik homolojileri saptamak güç olduğundan, moleküler teknikler bu durumda yararlı karakterler olarak kullanılabilir.

Morfolojik özelliklerine göre pek çok türün teşhisi için oldukça deneyim sahibi olmak gerekir. Özellikle teşhisi zor olan türlere özgü teknikler geliştirilerek, teşhislerinin daha kesin olarak yapılabilmesi olanağını sağlar. Belki de yakın gelecekte türlerin teşhisinde kullanılabilecek belirteçlerle tür teşhis anahtarlarının geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Genetik verilerin diğer en önemli özelliklerden birisi de, moleküler saat kullanarak türlerin ayrılma zamanlarının tahmin edilmesine olanak vermesidir. Belli bir türün ya da taksonun genomu (mitokondri ya da çekirdek genomu) veya genomunun belli bölgeleri için mutasyon oranlarına ait bilgiler varsa, karşılaştırılan taksonlar arasındaki nükleotid farklılıklarını (divergens) hesaplayarak ne kadar zaman önce farklılaştıklarını tahmin etmek mümkün dür. Bu yolla oluşturulan

filogenetik ağaçların dal uzunluklarını hesaplamak ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerini zamansal olarak da tahmin etmeye olanak sağlar.

Son olarak, populasyon genetikçileri moleküler teknikler kullanarak türleşme ve türleşmeye neden olan evrimsel güçler ve işleyişi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadırlar.

### **1.6. Moleküler Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Genetik Teknikler**

Populasyon genetiği çalışmalarında türlerin ve populasyonlar arası farklılıkların tespitinde fenotipik tekniklerin yanında moleküler genetik teknikler de kullanılmaktadır. Tek başına kullanılan fenotipik teknikler (ekoloji, markalama, parazitler, fizyoloji, morfometrik, meristik, kalker yapısı) genotipik dayanağı olmadığından ve çevresel etkilere göre değişiklik gösterdiğinden yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle moleküler genetik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır (Turan, 2002). Bu amaçla birçok genetik teknik geliştirilmiştir.

Populasyon genetiği çalışmalarında günümüzde yaygın olarak kullanılan teknikler; Protein elektroforez, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Sınırlama Parçalarının Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), DNA Dizileme Metodu, DNA Parmak izi Metodu, Mikrosatellite ve Polimorfik DNA'nın Rastgele Çoğaltılması (RAPD) teknikleridir.

Moleküler sistematikte kullanılan ilk teknik protein elektroforezidir. Proteinle ilgili ilk çalışmalar hemoglobin ve transferin gibi proteinlerle başlamış ve sonraki birçok çalışmada enzim proteinleri kullanılmıştır. Her bir lokus proteini, aminoasit yüküne bağlı olarak elektriksel alanda farklı hareket etmektedir. Eğer bir proteini kodlayan lokusta birden fazla allel varsa, her bir allel tarafından kodlanan polipeptitler farklı aminoasit içeriklerinden dolayı farklı elektriksel yüke ya da büyüklüğe sahip olacaklardır. Elektroforez bu gibi allelik farklılıkları ortaya çıkarmaktadır.

DNA zincirleme metodunda DNA zincirinde istenilen bölgenin nükleotid diziliminin ortaya çıkarılması ile zincir üzerinde meydana gelen değişimler tespit edilebilmektedir. Bu teknik çok fazla maliyet gerektirdiğinden kullanımı sınırlıdır.

Bu teknikte, bir adet primer hedeflenen DNA zincirinin ucuna bağlanmaktadır. Deoksiniükleotid trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) ve DNA polimeraz kalıp DNA'ya eklenmekte ve böylece DNA sentezi olmaktadır. Sentez üretimi sonrasında oluşan DNA parçaları poliakrilamit jel üzerinde elektroforez ile büyüklüğe uygun olarak ayrılmaktadır. Jel üzerinde görünen bantlar lazer tarayıcı veya bilgisayar ile okunabilmektedir (Turan, 2000).

DNA Parmak izi metodunda ise farklı DNA zincirlerine sahip canlı organizmalar birbirinden farklı görünmekte veya farklı karakteristik özelliklere sahip olmaktadır. Herhangi iki canlının DNA zincirleri DNA parmak izi metodu ile çok hızlı bir şekilde karşılaştırılmakta ve populasyonların genotipleri ve DNA'larındaki farklılıklar tespit edilmektedir. DNA parmak izi metodu, polimorfik olan büyük bir lokus sınıfını ortaya çıkarmakta ve varyasyon tespit edici bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır.

Mikrosatellit, uzunluk olarak 1'den 6'ya kadar baz çiftine kadar olan basit bir kor nükleotid zincir ünitesinden oluşmaktadır. Bu kısa zincir ünitesi, bir lokus içerisinde (G T)<sub>n</sub> veya (A T)<sub>n</sub> şeklinde arka arkaya 100 defaya kadar tekrarlanmaktadır. Mikrosatellitler, genom üzerinde çok bol miktarda dağılmış olarak görülmektedir (Royle ve ark., 1988; Jeffreys ve ark., 1991). Bir lokusta bulunan allel çiftinin her biri, kor zincir ünitesinin (mikrosatellite) tekrar sayısının farklılığıyla birbirinden ayrılırlar. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Metoduyla her bir lokustaki alleller çoğaltılabilmektedir. Bu alleller, jel elektroforez metoduyla görüntülenir ve böylece her bir balığın genotipi kolayca tespit edilir. Bu teknik ile türlerin ve populasyonların allel frekansı, nükleotid farklılığı ve ayrılığı tespit edilebilmektedir.

RAPD tekniği de, diğer tekniklerde olduğu gibi populasyonlar ve türler arası farklılığın tespiti için geliştirilmiş bir tekniktir. Bu teknik sayesinde moleküler farklılıklar genetik haritalarda saptanabilmektedir. Farklı uzunluktaki DNA'nın rastgele çoğaltılmasında genin tamamı gelişigüzel taranmakta, primer genom üzerinde gelişigüzel olarak tanıdığı bölgelere hibritleşmekte ve PCR tekniği ile bu bölgelere değişik uzunlukta kopyalanmaktadır. Bu parçaların daha sonra elektroforezde agaroz jeli üzerinde görünmesi sağlanmaktadır (Turan, 2000). Bu



görünen bantlar, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) olarak isimlendirilmektedir. RAPD belirteçleri, genleri ayıran kromozom hareketleri için başlama noktaları olarak yardım edebilmeye yarayan genleri birleştirir. Bu tekniğin kullanımı, jel üzerinde okumalar sırasında olumsuzluklar yaşanması nedeniyle pek yaygın değildir.

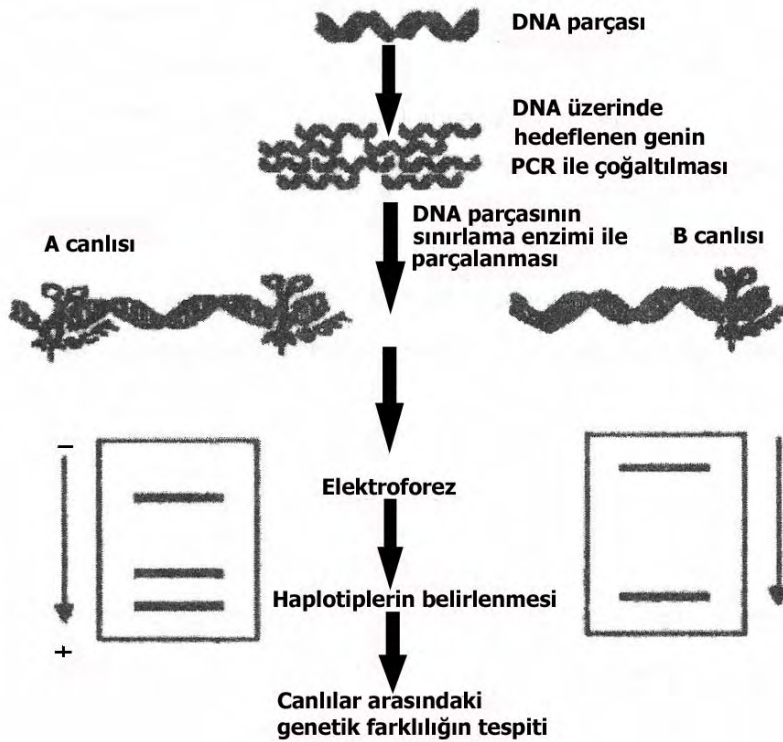
### **1.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen miktarda bir DNA bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan ve elde edilmesine olarak milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte ilk basamakta, yüksek sıcaklığın etkisiyle (92-95°C) çift sarmallı DNA'nın sarmalları birbirinden ayrılır. İkinci basamakta ise, primerler kopyalanmak istenen zincir bölgesine iki taraftan bağlanırlar. Son olarak bir DNA polimeraz olan *Taq* (*Thermus aquaticus*) adlı enzim sentez gerçekleştirir (Mullis ve Faloona, 1987). Normal olarak bu kopyalama 30 kez gerçekleşmektedir (Turan, 2000). Reaksiyonun verimliliğinin %100 olması için  $10^9$  kat kopyalama gerekmektedir. Kopyalama sonrası özel yöntemlerle çoğaltılan DNA (Agar Jel Elektrofrezisi, Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) boyanma işlemini takiben gözlenir. Primerlerin sınırladığı sekansın uzunluğu bilindiğinden, çoğaltılan ürünün hangi uzunlukta (bç) band oluşturduğu DNA büyüklük standardı ile karşılaştırarak belirlenir.

### **1.6.2. Sınırlama Parçaları Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Sınırlama (rekstriksiyon) Parçası Uzunluk Polimorfizmi Tekniği geniş ölçüde türler ve populasyonlarının genetik yapılarının belirlenmesinde en çok başvurulan tekniklerden biridir. Ayrıca bu teknik türler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bu teknik, DNA'nın rekstriksiyon enzimi ile reaksiyona sokularak parçalara ayrılmasıdır. RFLP tekniği PCR metodundan yararlanılarak, mtDNA veya nDNA'nın birkaç bölgesi (geni) içinde kullanılabilir. Sınırlama enzimlerin

tanıma dizileri 4-6 nükleotitten oluşmakta ve kendi içinde nükleotidlerin dizilimine ve nükleotid üzerindeki kesim noktasının durumuna göre farklılık göstermektedir. Sınırlama enzimleri, DNA üzerinde kendisiyle aynı yapıda olan zincir bölgesini tanımaktadır ve bu spesifik DNA zinciri, “tanınma bölgesi” olarak adlandırılmaktadır. Sınırlama enzimler, DNA üzerinde nerede ve ne kadar tanınma bölgesine rastlarsa, DNA’yı bu noktalardan keserler. Örneğin; *HindIII* enziminin tanıma dizisi, A<sup>▼</sup>AGGC dir ve DNA üzerinde aynı dizilerin olduğu bir DNA zincirine rastladığında ok işaretinin olduğu bölgeden DNA’yı keser. Enzim muamelesi sonucu oluşan sınırlama (sınırlama) parçaları, Jel Elektrofrez yoluyla jel üzerinde birbirinden ayrılır ve özel boyama metodları ile DNA parçaları arasında fark olup olmadığı tespit edilebilir (Şekil 1.1). Bu parçalar arasındaki fark, yer değiştirme veya mutasyon sonucu, DNA üzerinde tanınma bölgesinin kazanılması veya kaybedilmesi sonucudur (Turan, 2002)



Şekil 1.1. RFLP Tekniği İle Canlılar Arasındaki Genetik Farklılığın Tespiti (Turan, 2002).

**1.7. Mitokondrial DNA**

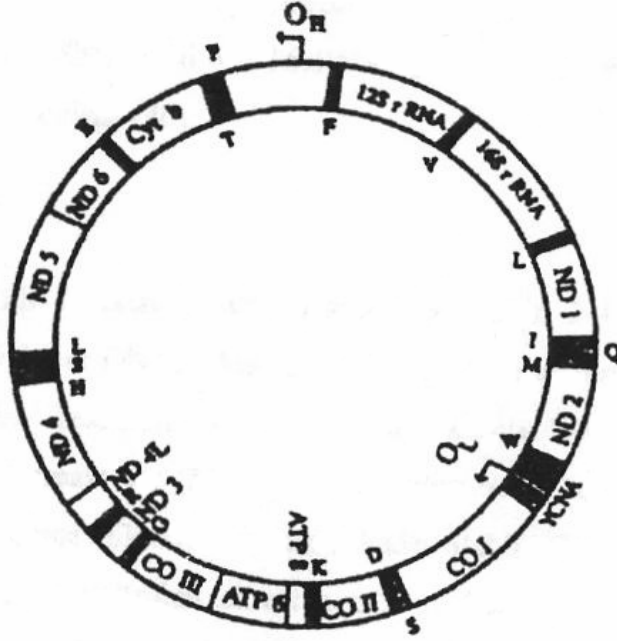
Evrin çalışmalarında genomun en çok çalışılan kısımlarından biri mtDNA'dır (Wilson, ve ark., 1985). MtDNA nispeten yüksek evrimleşme hızından dolayı, yakın akraba türler ve bir türün populasyonlarını karşılaştırmada son derece yararlı olmuştur (Harrison, 1989). Çekirdek DNA'sı ile karşılaştırıldığında, efektif büyüklüğü dörtte biri kadar olduğundan genetik populasyonların kolayca farklılaşmasına neden olur. Genetik sürüklenme çekirdek DNA'sına göre mitokondriyal genom üzerinde daha etkili mekanizma olarak işlediğinden, populasyonlara özgü mtDNA belirteçleri geliştirmek daha olasıdır. Tür üstü sistematik birimleri karşılaştırılmasında ise mtDNA genlerinin düzeni, belli sistematik birimleri birbirlerinden ayırmak için güçlü belirteçlerdir.

Mitokondri genomu, filogenetik çalışmalar için yararlı olan pek çok özelliklere sahiptir (Avisé, 1994). En önemli özelliği klonal kalıtımındır. Balık mitokondri genomu haployittir, yani her bir organizma sadece bir çeşit mtDNA içermektedir. Bununla birlikte, birkaç çalışmada heteroplazmi (bir fertte birden fazla mtDNA çeşidinin bulunması) olduğu rapor edilmiştir (Moritz ve ark., 1987; Bentzen ve ark., 1988; Moritz, 1991). Heteroplazmi, tirs balığı (Birmingham, ve ark., 1986), Atlantik ringası (Bentzen ve ark., 1988) ve hamsi (Magoulas ve Zouros, 1993) olmak üzere birkaç balık türünde görülmüştür. İkinci olarak, mtDNA pek çok çekirdek genlerinden daha hızlı evrimleşmiştir. Bu özelliğinden dolayı, yakın akraba tür ve populasyonların filogenetik ilişkilerini çalışmak için uygundur. MtDNA'nın anasal olarak kalıtımlanıyor olması, filogenetik analizler için avantaj olarak kabul edilir.

Hayvan mtDNA'sı 15-20 kb uzunluğunda. 22 tRNA, 2 rRNA, 13 elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan ve 13 mRNA'yı kodlayan toplam 37 genden oluşan kapalı halkasal bir moleküldür (Wallace, 1986); (Şekil 1.2). Yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan kontrol bölgesi replikasyonun başladığı bölgedir. MtDNA'da genlerin düzeni genellikle sabittir; ancak gen organizasyonu bazı hayvan taksonlarını ayırabilir (Desjardins ve Morais, 1990).

MtDNA'nın ND bölgesi, populasyon genetiğinde yüksek taksonomik gruplara kadar değişen ilişkileri analiz etmek için kullanılmaktadır (Bermingham ve ark., 1997; Lydeard ve Roe, 1997).

ND 5/6 geni muhtemelen balıklarda en iyi çalışılan genlerden biridir. Mitokondri tarafından kodlanan pek çok diğer proteinler gibi, hücre metabolizmasının solunum zincirinde rol alan önemli bir transmembran proteindir. Her ne kadar yaygın olarak kullanılmaktaysa da bazı araştırmacılar filogeniyi çözmede bu dizilerin özelliğine şüphe ile bakmaktadır (Martin ve ark., 1990; Graybeal, 1993).



Şekil 1.2. Balık Mitokondrisinde (mtDNA) Genlerin Dizilimi (Meyer, 1993)

MtDNA analizi, son zamanlarda yaygın olarak kullanılan DNA dizi analizi dışında, Sınırlama (Resktriksiyon) Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Metodu ile yapılmıştır. Bunun için çalışılan sistematik birimlerin filogenisi için uygun olan mtDNA bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılır ve daha sonra bir sınırlama enzimi ile kesilir. Elde edilen kesim ürünleri ya agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılarak, etidyum bromid ya da gümüş boyama ile

görüntülenir. Bu yöntem genel olarak PCR-RFLP olarak bilinir. PCR ile özgül amplifikasyon gerçekleştirildiğinden, Southern blotting ve DNA hibritleme yöntemi artık fazla kullanılmamaktadır. Mitokondri DNA'sı kapalı halkasal bir molekül olduğu için, oluşan parçacıkların sayısı ile sınırlama enzimlerinin kesim yerlerinin sayısı eşittir. Jel üzerinde oluşan bantların kalıbı karşılaştırılarak sınırlama kesim yerleri ya da sınırlama parçası verileri elde edilebilir. Bir popülasyona ait her bireyin belli bir enzimle ilgili mtDNA bölgesinin kesim sonucu oluşan bant kalıbına bir harf verilir. PCR-RFLP için kullanılan tüm sınırlama enzimlerin kalıpları, bu şekilde kullanılan enzim kadar harften oluşan bireyin kompozit genotipi belirlenmiş olur. Bunların her biri bir mtDNA haplotipidirler. Bu şekilde çalışılan popülasyon ya da taksondaki haplotipler ve sıklıkları ve de buradan hesaplanan nükleotid farklılıkları (divergence) karşılaştırılabilir. Mitokondri DNA sadece anasal olarak kalıtıldığından, haplotiplerin de nükleotid çeşitliliği (diversity) ve farklılığı (divergens) karşılaştırılarak, haplotiplerin filogenetik ilişkileri ilgili popülasyonun filogenetiği ve filocoğrafyası hakkında önemli bilgiler verir (Bardakçı ve Karataş, 2005).

### **1.7.1. MtDNA Genlerinin Evrilme Hızı**

Farklı mtDNA genleri, farklı oranlarda evrimleştikleri için, genellikle yapılan çalışmaya ve türe uygun mtDNA geni seçilmektedir. ND (Turan, 1997; Turan ve ark., 1998; Avise ve Lansman, 1983, Carr ve Marshall, 1991; Chapman ve ark., 1994) ve sitokrom b genleri (Allendorf, ve ark., 1987; Cronin ve ark., 1993; Bembo ve ark., 1995) birçok tür ve popülasyon çalışmaları için incelenmiş ve bu genlerin tür ve popülasyonlar arasındaki farklılıkların tespitinde oldukça başarılı sonuçlar verdikleri rapor edilmiştir.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Bu konuda Türkiye denizlerinde yapılan ilk çalışmalar; Erazi (1942), Kosswig-Battalgil (1943), Berg (1948-1949), Akşiray (1954), Slastenenko (1956), Svetovidov, (1963), Ladiges (1964), Kuru (1980), Geldiay ve Balık (1996)'in yaptıkları araştırmalara dayanmaktadır.

Slastenenko (1956), Karadeniz havzasında tırsiler üzerine yaptığı çalışmada, tırsilerin 3 yaş civarında üreme olgunluğuna eriştiklerini ve ilk yumurta bırakmaya başladıkları uzunluk değerinin ortalama olarak 25 cm olduğunu tespit etmiştir.

Samsun (1995), Orta Karadeniz'de yaşayan *A. pontica*'nın yaşlara göre boy ağırlık ilişkisini incelemiş, 1890 örnekle incelemiş, örneklerin 1-5 arasında yaşlara sahip olduğunu ve ortalama boy uzunluklarının ise 15.4-32.1 cm arasında olduğunu belirlemiştir.

Mater ve ark. (2000), Türkiye deniz balıkları tür listesini gözden geçirmiş ve ülkemizde *Alosa* cinsine ait bulunan türlerin, *Alosa caspia* (Eichwald, 1838), *A. caspia bulgarica* Drensky, 1934, *A. caspia nordmanni* Antipa, 1906, *A. caspia palaeostomi* (Sadowsky, 1934), *A. caspia tanaica* (Grimm, 1901), *Alosa fallax nilotica* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1808), *Alosa pontica* (Eichwald, 1838) olduğunu bildirmiştir.

Turan ve Başusta (2000), Akdeniz, Ege ve Karadeniz'den elde ettikleri yaklaşık olarak 40'ar adet tırsi *Alosa fallax nilotica* popülasyonlarının morfometrik yapılarını truss metodu kullanarak karşılaştırmışlardır. Buna göre Karadeniz ve Ege popülasyonlarının benzerlik gösterdiğini, fakat Akdeniz popülasyonunun morfolojik olarak farklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Eryılmaz (2001), 1992 ve 1995 yılları arasında Marmara denizinin güneyinde 47 dip trolü çekimi sonucunda Clupeidae familyasına ait tırsi türlerinden *Alosa fallax nilotica* ve *Alosa pontica*'yı tespit etmiş ve Karadeniz'de bilinen *Alosa pontica*'nın varlığını ilk kez Marmara denizinde yaptığı bu çalışma ile saptamıştır.

Bilecenoğlu ve ark. (2002), Yeniden gözden geçirerek yayınladıkları tür listesinde son yıllarda Türkiye kıyılarında Clupeidae familyasının *Alosa* cinsine ait

toplam 3 tür ve bir alt türün (*A. pontica* (sinonim; *Alosa immaculata*), *Alosa maeotica*, *Alosa fallax nilotica*, *Alosa tanaica*) olduğunu bildirmişlerdir.

Kuru (2004), Türkiye iç su balıklarını sistematığı konusunda 1856 yılından günümüze kadar yayınlanmış çok sayıda eseri incelemiş ve bu alanda meydana gelen gelişmelerle değişiklikleri tarihsel süreç içerisinde özet şeklinde ortaya koymuştur. Çalışması sonucunda Clupeidae familyasına ait tirsi türlerinden *Alosa caspia*, *Alosa maeotica*, *Alosa tanaica*, *Alosa pontica* ve *Alosa fallax nilotica*'nın varlığını bildirmiştir.

Yılmaz ve Polat (2002), Karadeniz'de yaşayan tirsi balığı (*Alosa pontica* Eichwald, 1838)'in yaş tayininde kullanılabilir en güvenilir kemiksi yapıyı farklı tekniklerle araştırmışlardır. Bu amaçla inceledikleri 5 kemiksi yapıdan tirsi balığı ile ilgili yaş bilgilerinin en uygun şekilde omurdan yapılabileceğini belirlemişlerdir.

Önceki yıllarda ve yakın zamanlarda yabancı araştırmacılar tarafından tirsi türleriyle ilgili birçok araştırma yapılmış ve bu araştırmalardan önemli olanları yıl sırasına göre aşağıda verilmiştir.

McKenzie (1973), Kanada'da *Alosa aestivalis* ve *Alosa pseudoharengus* türleri ile yaptığı bir araştırmada, örneklerden aldığı kas dokularını elektroforez tekniği ile karşılaştırmıştır. LDH enzimi uygulayarak yaptığı çalışmasında, türler arasında herhangi bir karışımın olmadığını ve bu iki türün birbirlerinden farklı oldukları sonucuna varmıştır.

O'Maoileidigh ve ark. (1988), İrlanda'daki iki bölgeden elde ettiği iki *Alosa fallax* popülasyonunu morfometrik, meristik ve elektroforetik karakter analiz yöntemi kullanarak incelemiştir. Meristik incelemelerde *A. fallax* popülasyonlarında ilk kemerde bulunan solungaç diken sayısının birbirinden farklı olduğunu tespit etmiş fakat genetik analizler sonucunda popülasyonlar arasındaki genetik benzerlik derecesinin oldukça yüksek olduğunu gözlemlemiştir.

Bentzen ve ark. (1989), mtDNA analizi ile Amerika'daki 14 bölgeden topladıkları Amerikan tirsi popülasyonlarının genetik farklılıklarını ve popülasyon yapısını incelemişler, sonuçta mtDNA yönteminin popülasyonların incelenmesinde oldukça güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Nolan ve ark. (1991), Atlantik sahillerindeki dört önemli nehir sisteminden izole olmuş Amerikan tirsi (*Alosa sapidissima*) populasyonları arasındaki farklılıkları mtDNA sınırlama endonükleaz enzimi ile incelemişler ve 4 sınırlama (sınırlama) enzimi (*Eco*, *RI*, *Dde* ve *RsaI*) kullanarak populasyonların genetik yapılarını ortaya çıkarmışlardır.

Boisneau ve ark. (1992), *A. alosa* ve *A. fallax* türlerini hem morfolojik karakterler yönünden hemde elektroforetik polimorfizmi tekniğiyle 16 enzim kullanarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda elde ettikleri 22 loki'nin monomorfik yapıda olduklarını ve bu türlerin elektroforetik yöntemle ayırt edilmeyeceğini tespit etmişlerdir.

Melvin ve ark. (1992), Amerika'da 14 bölgeden topladıkları Amerikan tirsi (*Alosa sapidissima*), populasyonlarında 10 meristik ve 16 morfometrik karakteri doğrusal korelasyon yöntemi uygulayarak araştırmışlar ve araştırma sonucunda grupların bölgesel olarak kendi iç sınıflandırılmasında yüksek bir oran bulmuşlardır.

Bentzen ve ark. (1993), Kuzey Amerika ve Avrupa'daki *Alosa* ve *Pomolobus* cinsine ait 5 tirs türü arasındaki moleküler sistematik ilişkinin derecelerini mtDNA Metodu ile araştırmışlar ve iki grup arasındaki karışımın oldukça düşük olduğunu ( $D_a=0.065$ ) gözlemlemişlerdir.

Alexandrino ve ark. (1993), Portekiz'in üç bölgesinden elde ettikleri *Alosa alosa* ve *Alosa fallax* populasyonları arasındaki genetik farklılığı protein elektroforez tekniği ile ADA enziminde araştırmışlardır. Sonuçta ADA enziminde iki farklı lokus incelemişler ve bu lokuslardan ADA2'yi polimorfik olarak saptamışlardır. *A. alosa* ve *A. fallax* türleri arasındaki heterozigotluk derecesini 0.40 olarak bulmuşlardır.

Alexandrino (1996), Portekiz *A. alosa* ve *A. fallax* populasyonlarında daha detaylı biyokimyasal genetik araştırmalar yapmışlar ve 15 lokustan 4 tanesini polimorfik olarak tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, uyguladıkları metodun tirs populasyonlarının ayırımında kesin olarak kullanılabilceği sonucuna varmışlardır.

Alexandrino ve ark. (1996), Portekiz'in hidrografik havzasında farklı olarak bulunan *Alosa alosa* ve *Alosa fallax* populasyonları arasındaki genetik farklılığın derecesini izoelektrik odaklama yöntemiyle araştırmışlar; hemoglobin (HB) zinciri



ve ADA enziminde polimorfizm saptamışlar ve bu iki tür arasındaki gen frekans dağılımlarının önemli derecede ( $P < 0.001$ ) farklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Bentzen ve ark. (1988), RFLP tekniğini kullanarak 14 nehir sisteminden elde ettikleri Amerikan tirsisi *A. sapidissima* (244 örnek) örneklerindeki mtDNA varyasyonunu araştırmışlar ve 30 bireyde uzunluk polimorfizmi ve tek sınırlama bölgesini kapsayan iki çeşit heteroplazmi belirlemişlerdir.

Le Corre ve ark. (1998), alttür olan *Alosa fallax rhodanensis*'in diğer iki tür olan *A. fallax* ve *A. alosa*'ya olan genetik yakınlığını incelemişler ve *A. fallax rhodanensis*'in allel frekansının Portekiz'in kuzeyindeki *A. fallax* popülasyonlarına daha yakın olduğunu gözlemlemişlerdir.

Turan ve ark. (1998), Atlantik okyanusunda bulunan clupeidae familyasına ait ringa popülasyonları arasındaki genetik farklılıkları Protein elektroforezi ve mtDNA bölgesinin ND 5/6 genlerini sınırlama parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP) tekniklerini kullanarak 6 sınırlama enziminde (*AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI*, *RsaI*) incelemişlerdir. İnceleme sonucunda popülasyonların birbirinden farklı olduklarını ve popülasyonlar arasındaki farklılığı önemli olarak bulmuşlardır ( $P < 0.001$ ). Sonuç olarak ND genlerinin popülasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde iyi sonuçlar verdiğini ve ileride buna benzer yapılacak olan popülasyon çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Castro ve ark (1999), Asit fosfotaz enzimi ile genetik polimorfizmi Avrupa tirsisi *Alosa alosa*'nın 11 popülasyonunda İzoelektrik Fokus Tekniği ile araştırmışlardır. ACP1 ve ACP2 olarak iki farklı lokus incelemişler ve ACP2'yi polimorfik olarak tespit etmişlerdir.

Shaw ve ark. (1999), Norveç denizi ve Barent denizinde bulunan Atlantik tirsisi (*Clupea harengus*) ile Pasifik tirsisi (*Clupea pallasii*) arasındaki farklılıkları Mikrosatellite Yöntemi ile araştırmışlar ve tüm örneklerde 4 polimorfik lokus belirlemişlerdir. Pasifik ve Atlantik türleri için genetik benzerliği ortalama olarak sırasıyla 0.037 ve 0.032 olarak saptamışlardır. Mikrosatellite yöntemiyle elde ettikleri bu sonuçları aynı örnekleri kullanarak alloenzim ve mtDNA RFLP yöntemleri ile değerlendirmişler ve mikrosatellite yönteminin bu iki tekniğe göre

daha hassas sonuçlar verdiğini, fakat türler arasındaki karışımın büyüklüğü hakkında daha az bilgi verdiğini gözlemlemişlerdir.

Waters ve ark. (2000), dört farklı nehir sisteminden elde ettikleri Amerikan tırsısı *alosa sapidissima* populasyonları arasındaki önemli fakat ince farklılığı hem mikrosatellite DNA ve hem de mitokondrial DNA yöntemi ile analiz etmişler ve mikrosatellite yöntemiyle araştırmaları sonucunda James Nehrindeki *Alosa* populasyonu ile diğer Atlantik populasyonları arasındaki DNA çeşitliliği bakımından benzerlik gözlemlerken; mtDNA yöntemi sonucunda ise populasyonlar arasında düşüğe olsa bir farklılık bulunduğunu saptamışlardır.

Alexandrino ve ark. (2000), Atlantik'in doğusunda bulunan iki tırsi türü *Alosa alosa* ve *Alosa fallax*'ın 14 populasyonu arasındaki genetik farklılığı ve hibritlik derecesini protein elektroforezi kullanarak 32 lokus saptamışlar ve bu lokuslardan 7 tanesini polimorfik olarak tespit etmişlerdir.

Castro ve Alexandrino (2000), Avrupa tırsileri (*Alosa alosa*, *Alosa fallax*) ile yaptıkları ön çalışmalarında, mtDNA Metodunu sitokrom b dizisinde uygulamışlar ve alloenzim yöntemiyle düşük tespit ettikleri hibritlik derecesini mtDNA Metoduyla daha iyi tespit ederek iki tür arasında bir gen akışımının olduğunu ifade etmişlerdir.

Le Corre ve ark. (2000), Akdeniz'in Fransa kıyılarındaki *Alosa fallax rhodanensis*'in demografik yapısını (yaş dağılımı, cinsi olgunluk yaşı, cinsiyet oranı ve üreme sayısı, biometri vb.) araştırmışlardır. Araştırmalar sonucunda Akdeniz populasyonlarının, Atlantik populasyonlarından daha büyük yapıda ve daha uzun ömürlü olduklarını ve karakteristik açıdan *Alosa fallax rhodanensis*'in *Alosa alosa* türüne daha yakın olduğunu belirtmişlerdir.

Pravotorov (2000), Karadeniz ve Azak denizi'ndeki tırsi alt türlerinden *Alosa caspia tanaica* populasyonlarının yapısını incelemiş ve bu iki farklı denizdeki tırsi populasyonun fenotipik karakterler yönünden biraz farklı olduğunu gözlemlemiştir.

Economidis (2001), Yunanistan sularındaki tırsi türlerinin mevcut durumunu incelemiştir. Araştırmasının sonucunda *Alosa fallax*, *Alosa macedonica* ve *Alosa vistonica* olmak üzere üç türün Yunanistan sularında bulunduğunu tespit etmiştir.

Hauser ve ark. (2001), Atlantik Okyanusu'nda bulunan Atlantik ringa balığı (*Clupea harengus*) populasyonları arasındaki farklılığı ayırt etmede mtDNA

bölgesinin ND 3/4 ve ND 5/6 genlerini RFLP tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmalarının sonucunda İzlanda ringa stoklarının Kuzeydoğu Atlantik stoklarından genetik olarak farklı olduklarını ve Baltık Denizi ile İskoç Denizi ringalarının da birbirlerinden genetik olarak farklı olduklarını tespit etmişlerdir.

Veron ve ark. (2001), İki Atlantik tirsisi olan *Alosa alosa* ve *Alosa fallax* türlerinin Fransa'nın Charente Nehrindeki popülasyonları arasındaki morfolojik, biyolojik ve genetik yapılarını araştırmışlardır. Bu iki stoğun genetik yapılarının Protein Elektroforez Yöntemi ile araştırılması sonucunda 8 polimorfik lokus saptamışlar ve bu iki türün popülasyonları arasında düşük bir heterozigotluk gözlemlemişlerdir. Ayrıca *A. alosa* ve *A. fallax* popülasyonlarının Portekiz ve Fas sahillerinde bulunan popülasyonları ile karşılaştırdıklarında, genetik mesafe yönünden oldukça uzak olduklarını belirlemişlerdir.

Coad ve ark. (2003), İran'da tirsisi türleri ile yaptığı araştırmasında, Hazar denizinde bulunan *Alosa* (*Alosa brashnikovi*, *Alosa caspia*, *Alosa pontica*, *Alosa saposnikovi*, *Alosa sphaerocephala*) ve *Clupeonella* (*Clupeonella grimi*, *Clupeonella cultrivensis*, *Clupeonella engrauliformeis*) cinslerine ait türleri tespit etmiş ve 8 türün varlığını bildirmiştir.

Navodaru ve Waldman (2003), Karadeniz'den Avrupa'nın doğusuna kadar olan tirsisi türlerini yeniden gözden geçirmişlerdir. *A. pontica*, *A. caspia* ve *A. maeotica*'nın türlerini gözlemlemiş; *A. pontica*'nın Avrupa'nın doğusuna kadar yoğun olarak bulunduğunu, *A. caspia* ve *A. maeotica* stoklarının ise şiddetli bir şekilde çöktüğünü tespit etmiştir.

Olney (2003), *Alosa* cinsine ait olan tirsilerin alt familyasının "Alosinae" olduğunu; sınıflandırmada "alosiidae" ve "alosid" olarak yanlış olarak isimlendirilmesinden kaçınılması gerektiğini belirtmiştir.

Faria ve ark. (2004), Mikrosatellite yöntemi ile *Alosa alosa* ve *Alosa fallax* türleri arasındaki yakınlık derecelerini araştırmışlar ve bu türlerin gen alışverişi ile birbirleri arasında karışıma maruz kaldığını bildirmişlerdir. *A. alosa* ve *A. fallax* türleri arasında heterozigotluk oranının sırasıyla 0.267-0.926 ile 0.240-0.727 arasında olduğunu gözlemlemişlerdir.

Le Corre ve ark. (2005), Akdeniz deki üç nehir sisteminden elde ettiği Rodos tirsisi *Alosa fallax rhodanensis* populasyonlarının genetik karakteristik yapısını yedi protein belirteçle araştırmışlardır. Sonuç olarak Akdeniz'deki Rodos tirsisi populasyonlarının allel frekans dağılımı ve nisbi genetik çeşitlilik yönünden homojen bir genetik yapıya sahip olduklarını; ayrıca *Alosa fallax* türüne ait olduklarını fakat alt tür olduklarından Atlantik ve Akdeniz'deki *Alosa fallax* grupları ile karşılaştırıldıklarında, aralarındaki genetik mesafenin düşük, biyolojik karakterler yönünden de biraz daha farklı olduklarını belirlemişlerdir.

Mezhzherin ve Fedorenko (2005a), üreme döneminden önce ve üreme dönemindeki *Alosa pontica* populasyonunun genetik yapısını 3 polimorfik lokusta incelemişlerdir. Sonuçta populasyonlar arasında genetik bir karışımın olduğunu gözlemlemişlerdir.

Mezhzherin ve Fedorenko (2005b), Tuna nehrinde alt tür olan *Alosa pontica pontica* stoklarının genetik yapısını ve çeşitliliğini yumurtlama dönemi zamanında biyokimyasal genetik belirteçler aracılığıyla araştırmışlardır. Yumurtlama döneminden önce ve sonra allel frekanslarında farklılık gözlemlemişler ve aynı zamanda heterozigotluk oranını ve genetik farklılığı üreme zamanından öncekinden daha yüksek bulmuşlardır.

Alexandrino ve ark. (2006), Avrupa tirsisi türleri *Alosa alosa* ve *Alosa fallax* populasyonları arasındaki akrabalık ilişkisini alloenzim ve DNA Sekans Yöntemiyle araştırmışlardır. On dört nehir sisteminden elde ettikleri tirsisi türlerinde sekiz lokusta elde etmişler ve mtDNA'nın sitokrom b gen bölgesini 448 bp olarak saptamışlardır. Araştırmalarının sonucunda *A. alosa* ve *A. fallax* türleri arasında yoğun bir karışım olmasına rağmen; bu iki türün neslinin birbirinden oldukça uzak olduğunu (net nükleotid farklılığı: 0.011-0.03) belirtmişlerdir.

Faria ve ark. (2006), Tirsisi türlerinin tarihsel evrimi içerisinde moleküler filogenetik ilişkileri yönünden incelemişlerdir. Çalışmalarında tirsisi türlerinin birbirlerinden genetik yakınlık veya uzaklık derecesini mtDNA Sekans Yöntemiyle tespit etmişlerdir. *Alosa* ve *Pomolobus* olarak iki cinse ait nükleotid farklılığını ortalama ( $D_a = 0.056$ ) olarak tespit etmişlerdir.

**3. MATERYAL VE METOD**

Araştırma Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balıkçılık Genetiği Laboratuvarı'nda ve Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

**3.1. Materyal****3.1.1. Tirsi Türlerinin Sistematikteki Yeri**

Çalışmada kullanılan türlerin sistematik sınıflandırması Nelson (1994)'e göre aşağıda verilmiştir.

<b>ALEM</b>	: Animalia
<b>ŞUBE</b>	: Chordata
<b>ALT ŞUBE</b>	: Vertebrata
<b>ÜST SINIF</b>	: Osteichthyes
<b>SINIF</b>	: Actinopterygii
<b>ALT SINIF</b>	: Neopterygii
<b>İNFR SINIF</b>	: Teleostei
<b>ÜST TAKIM</b>	: Clupeomorpha
<b>TAKIM</b>	: Clupeiformes
<b>ALT TAKIM</b>	: Clupeoidei
<b>AİLE</b>	: Clupeidae
<b>ALT AİLE:</b>	: Alosinae
<b>CİNS</b>	: <i>Alosa</i> Link, 1790
<b>TÜR</b>	: <i>Alosa caspia</i> (Eichwald, 1838) <i>Alosa maeotica</i> (Grimm, 1901) <i>Alosa pontica</i> (Eichwald, 1838) <i>Alosa tanaica</i> (Grimm, 1901)
<b>ALT TÜR</b>	: <i>Alosa fallax nilotica</i> (E.Geoffroy Saint-Hilaire, 1808)

**3.1.2. Tirsi Türlerinin Tayin Edilmesi ve Tayin Anahtarı**

Yapılan bu çalışmada avlanan tirsi türlerinin tayin edilmesinde Akşiray (1987) ve Whitehead (1985) baz alınarak, türlerin tayin anahtarı aşağıda verilmiştir.

Üst çenenin ortasında belirgin şekilde bir yarık bulunur. Ağız genellikle büyüktür. Alt çenenin arka kenarı, gözün arka kenarının ilerisine kadar uzanır. Nispeten büyük olan balıklardır. Ağızda Vomer dişleri bulunur..... *Alosa*

a. Solungaç filamentleri, solungaç dikenlerinden daha uzundur. Solungaç dikenleri ince ve uzundur. Solungaç dikenlerinin sayısı 50-80 arasındadır. Gövde üzerinde belirgin beş adet benek bulunur..... *Alosa caspia*

b. Vücudun yan taraflarında, başın gerisinden başlayıp, kuyruk kısmına doğru tek sıra halinde yuvarlak şekilli 6-7 adet siyah benek bulunur. Solungaç diken sayıları 24-30 arasındadır..... *Alosa fallax nilotica*

c. Solungaç dikenleri ince ve sert sık bölmeli ve noktalıdır. Solungaç dikenlerinin sayısı 33-46 arasındadır ..... *Alosa maeotica*

d. Solungaç filamentleri, solungaç dikenlerinden genellikle eşit veya daha kısadır. Solungaç dikenlerinin sayısı genellikle 47-66 arasındadır..... *Alosa pontica*

e. Birinci solungaç yayı üzerinde 59-77 solungaç dikenini bulunur. Vücut yüksekliği, genellikle baş boyuna eşittir..... *Alosa tanaica*

**3.1.3. Tirsilerin Genel Özellikleri**

Bu familya temsilcilerinin baş kısmı çıplak ve ağız bıyıklardan yoksundur. İç kulakla bağlantılı ve tek loptan oluşmuş basit yapılı uzun bir hava keseleri vardır. Genellikle alt çene, üst çeneden daha uzun olup, öne doğru hafif bir çıkıntı yapmıştır. Yanal çizgiler bulunmaz ve kısa bir dorsal yüzgeçleri vardır. Vücutları yanlardan hafifçe yassılaştırmış olup, dokunulduğu zaman kolayca dökülebilen iri sikloid pullarla örtülüdür. Üst çenenin ortasında belirgin şekilde bir yarık bulunur. Ağız genellikle büyüktür. Alt çenenin arka kenarı, gözün arka kenarının ilerisine kadar uzanır. Karın bölgesinde boğazdan başlayarak anal yüzgece kadar uzanan 30-35 adet kuvvetli ve birbirine bağlı olmayan testere dişi görünümünde karina, pulları vardır. Kuyruk

yüzgeci kaidesinin iki tarafında birer tane ala (kanat) adı verilen ve diğerlerine göre daha fazla uzamış olan tipik pullar bulunur. Basit yapılı göz kapakları üzerinde radial olarak uzanan belirgin çizgiler vardır. Damak kemiği üzerinde Vomer dişleri bulunur. Alt çenenin arka ucu, gözlerin arka kenarından indirilen düşey çizginin ilerisine kadar uzanır. Başlıca besinlerini zooplanktonik organizmalar (özellikle Copepoda genusu) ve küçük balıklar oluşturmaktadır (Geldiay ve Balık 1996).

### **3.1.3.1. Türlerin Morfolojik Özellikleri**

#### **3.1.3.1.(1). *Alosa caspia* (Eichwald, 1838)**

*A. caspia*'nın vücudu nispeten enlidir. Üst çenelerinde medyan bir çentik bulunmaktadır. Sırt tarafında 5-6 adet benek bulunmaktadır. Boyları ortalama olarak 12-20 cm arasındadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Alosa caspia*'nın Genel Görünüşü

#### **Diagnostik Özellikleri**

**D:** III-IV 12-15

**A:** II-III 16-19

**Omur sayısı:** 46-51

**Karina pulları:** 30-35

**Solungaç diken sayısı:** 50-80

**Max boy:** 32 cm

**3.1.3.1.(2). *Alosa maeotica* (Grimm, 1901)**

Vücut yanlardan yassılaşıymış olup, fazla yüksek değildir. Üzeri parlak renkli ve normal büyüklükteki pullarla örtülüdür. Vücudun genel rengi parlak beyaz sırt tarafı koyu esmerdir mavi-yeşil yansımalar gösterir. Yan tarafları ve karın kısmı gümüş beyaz, yüzgeçler esmer gri renktedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Alosa maeotica*'nın Genel Görünüşü

**Diagnostik Özellikleri**

**D:** III 12-14

**A:** II 17-18

**Omur sayısı:** 48-52

**Karina pulları:** 26-35

**Solungaç diken sayısı:** 34-46

**Max boy:** 40 cm



**3.1.3.1.(3). *Alosa pontica* (Eichwald, 1838)**

Üst çenelerinde medyan bir çentik bulunur. Solungaç (operkulum) kapağının üst kısmında siyah bir benek vardır. Renk sırt kısımlarda yeşilimsi mavidir. Karın kısımları gri renklidir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Alosa pontica*'nın Genel Görünüşü

**Diagnostik Özellikleri**

**D:** IV 13

**A:** III 16

**Omur sayısı:** 48-51

**Karina pulları:** 30-32

**Solungaç diken sayısı:** 47-69

**Max boy:** 39 cm

**3.1.3.1. (4). *Alosa tanaica* (Grimm, 1901)**

Maksimum vücut yüksekliğinin baş boyundan daha fazla oluşuyla diğer türlerden ayrılmaktadır. Vücut şekli bakımından *A. maeotica* ile benzerlik gösterir. Renk yanlarda gümüş beyaz, sırtta esmer yeşildir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Alosa tanaica*'nın Genel Görünüşü

**Diagnostik Özellikleri**

**D:** III-IV 15

**A:** III 16-19

**Omur sayısı:** 46-51

**Karina pulları:** 30-35

**Solungaç diken sayısı:** 61-75

**Max boy:** 20 cm

**3.1.3.1.(5). *Alosa fallax nilotica* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1809)**

Karın yüzgeci dorsal yüzgecin ön kısmı hizasında bağlanmıştır; solungaç kapağının arkasında, sırt tarafta operkulum'dan itibaren 6-7 siyah leke bulunur. Gözlerin ön ve arka kenarlarını örten şeffaf ve kalın bir zar mevcuttur. Sırtı maviden yeşilimsi, yanları gümüşü yeşil, karın tarafları gümüşü beyazdır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *Alosa fallax nilotica*'nın Genel Görünüşü

**Diagnostik Özellikleri**

**D:** IV 12-16

**A:** III-IV 16-22

**Omur sayısı:** 55-59

**Karina pulları:** 34-38

**Solungaç diken sayısı:** 24-29

**Max boy:** 60 cm

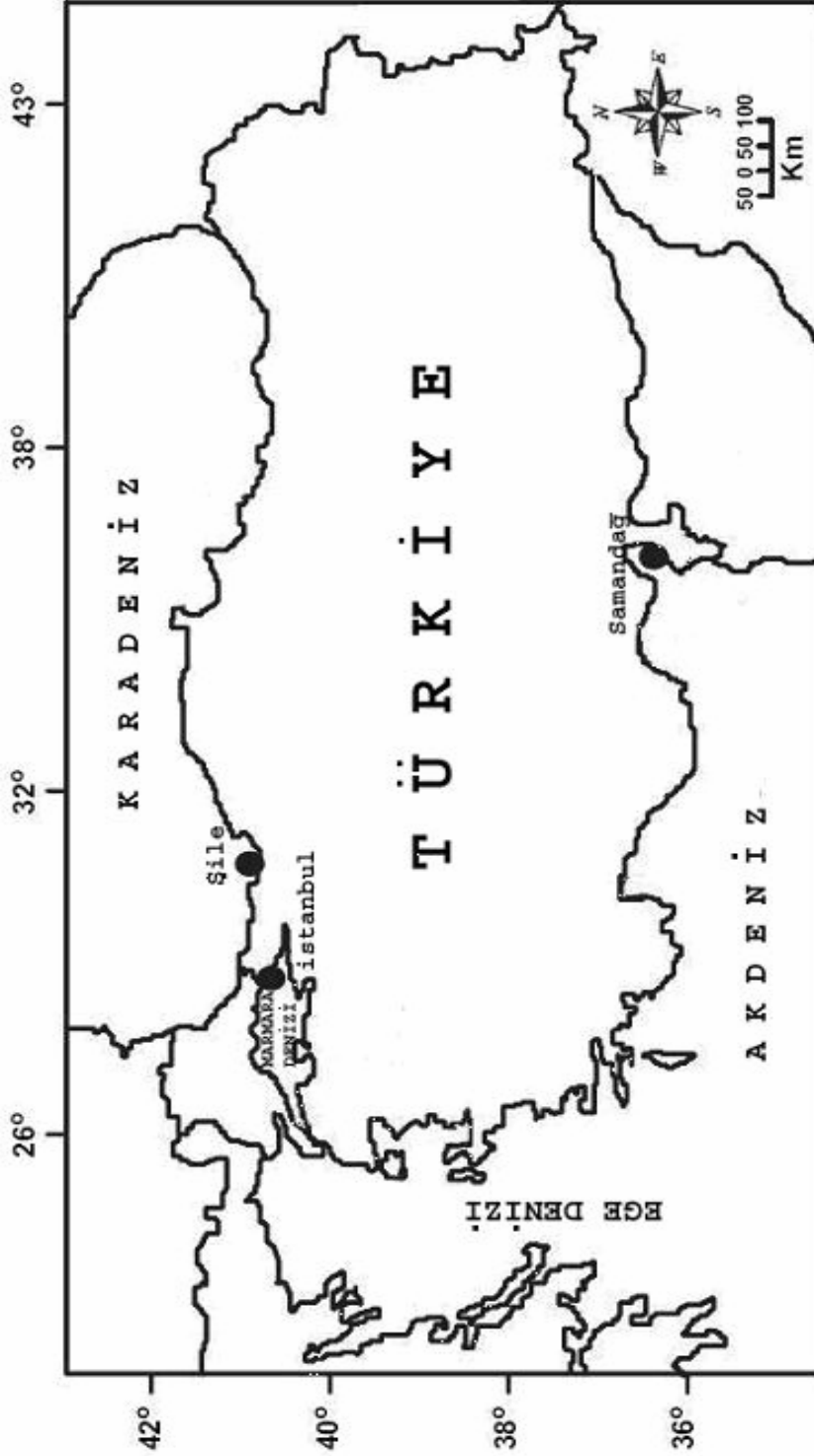
**3.1.4. Örneklerin Toplanması ve Örnekleme Alanları**

Tirsi türlerinin örnekleme, Türkiye kıyısulularında avcılığın yoğun olarak yapıldığı Batı Karadeniz kıyılarından Şile, Marmara denizi'nden İstanbul-Adalar ve Akdeniz'den İskenderun körfezi Samandağ kıyılarından olmak üzere toplam üç bölgeden 2005 ve 2006 yıllarında yapılmıştır. Örnekler uzatma ağı, serpmeye ve el oltası ile avlanmıştır (Şekil 3.6).

Örnekleme sonucu elde edilen beş türden *A. caspia*, *A. maeotica*, *A. tanaica* Şile, *A. pontica* İstanbul (Adalar), *A. fallax nilotica* ise Samandağ sahillerinden avlanmıştır. Türlerin örnekleme bölgelerine ait avlama zamanları, avlanma yöntemleri ile bulunduğu bölge denizleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Tirsi Türlerinin Bölgelerimizdeki Denizlere Göre Avlanma Bölgeleri ve Avlanma Yöntemleri

<b>Avlanılan Bölge</b>	<b>Tür</b>	<b>Bulunduğu Bölge</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Avlanma Metodu</b>
Samandağ	<i>A. fallax nilotica</i>	Akdeniz	20	Uzatma ağı
Şile	<i>Alosa maeotica</i>	Batı Karadeniz	20	Uzatma ağı, Oltta
Adalar (İst.)	<i>Alosa pontica</i>	Marmara	20	Uzatma ağı, Oltta
Şile	<i>Alosa tanaica</i>	Batı Karadeniz	20	Uzatma ağı
Şile	<i>Alosa caspia</i>	Batı Karadeniz	20	Uzatma ağı



Şekil 3.6. Tırşi Türlerinin Örnekleme Alanları, ●; Örnekleme İstasyonlarını Göstermektedir.

**3.1.5. Laboratuvar İşlemlerinde Kullanılan Araç ve Gereçler****3.1.5.1. Morfolojik Ölçümlerde Kullanılan Araç ve Gereçler**

Araştırmada kullanılan tırsi türlerinin morfolojik ölçümlerinin kaydedilmesinde, binoküler mikroskop, milimetrik cetvel, 0.01 mm hassasiyetli kumpas ve diseksiyon iğnesi kullanılmıştır.

**3.1.5.2. Genetik Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler**

Genetik çalışmada DNA elektroforezis tankı, güç kaynağı, UV transilluminator cihazı, Vorteks cihazı, İnkübatör, Mikrosantrifüj cihazı, Hassas terazi, PCR cihazı ve dikey elektorofrez kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan PCR cihazı ve dikey elektroforez cihaz seti Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Çalışmada Kullanılan PCR ve Dikey Elektroforez Cihazının Görünümü

### 3.2. Yöntem

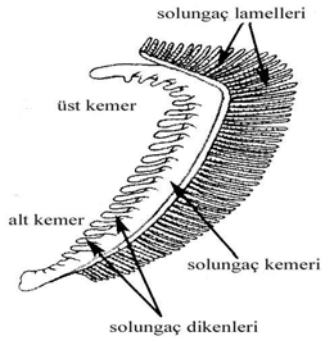
#### 3.2.1. Örneklerin Muhafazası ve Tespiti

Toplanan balık örnekleri örnekleme alanlarından yapılarının bozulmaması için ayrı ayrı etiketlenmiş polietilen torbalara yerleştirilip, teknede dondurucuya veya buza konulmuş, kıyıya geldikten sonra ise laboratuara ulaşıncaya kadar soğuk taşıma kabında (buzda) veya derin dondurucuda muhafaza edilerek laboratuara getirilmiş ve derin donduruculara yerleştirilmiştir. Türlerin tanısı, Akşiray (1954), Slastenko (1956) Whitehead (1984)'e göre, türlerin sistematik ayrımı ise, Whitehead (1985), Akşiray (1987)'e göre yapılmıştır.

Laboratuara getirilen örneklerin tür tayini yapıldıktan sonra genetik analiz için doku örnekleri alınmış ve %95'lik etilalkolde eppendorf tüpler içerisinde muhafaza edilmiştir. Doku örnekleri alınan örnekler ayrıca morfometrik ve meristik yönden incelenmiştir.

#### 3.2.2. Meristik İnceleme

Meristik karakterlerden dorsal yüzgeç (D), pektoral yüzgeç (P), Ventral yüzgeç (V) ve anal yüzgeç (A) ışınlı sayıları, Yanal çizgi sayıları (L.L), benek sayıları (BS), omur sayıları (OS), karina pulları sayıları (KP) ile tür teşhisinde genellikle önemli olan, birinci solungaç kemerinde bulunan solungaç diken sayıları (SDS) sayılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil.3 8. Türlerin Tayininde Kullanılan Solungaç Kemer ve Kısımları

**3.2.3. Genetik İnceleme****3.2.3.1. Uygulanan Genetik Teknikler****3.2.3.1.(1). Mitokondrial DNA'nın Ekstrakte Edilmesi**

MtDNA'nın elde edilmesinde Sambrook ve ark. (1989) tarafından verilen standart yöntem uygulanmıştır. Balık örneklerinin sırt kaidesindeki kas dokusundan alınan ve %95'lik etil alkolde muhafaza edilen doku örneklerden yaklaşık 50 mg doku, otoklavlanan her bir eppendorf tüpü içerisine (1,5 ml) üzerlerine sırasıyla 300 µl ACL solüsyonu ve 50 µl Proteinase K ilave edilip elde birkaç kez karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler önceden 55 °C'ye ayarlanan etüvde 2 saat bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan her bir örnek 20 dakika vorteks de karıştırılarak 12000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra her bir örnekten EZ-10 spin tüpleri içerisine 300 µl alınıp üzerlerine 300 µl ACL Solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler 4000 rpm de 2 dakika santrifüj edilerek üstteki mavi tüpün alt kısmında kalan sıvı kısım boşaltılmıştır. Örnekler üzerine 500 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerin alt kısmında kalan sıvılar boşaltılarak üzerlerine tekrar 500 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin alt kısmındaki sıvılar tekrar boşaltılarak 10000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üstteki mavi tüp çıkarılarak yeni eppendorf tüpler üzerine yerleştirilmiştir. Yeni hazırlanan tüpler içerisine 40 µl "Elution Buffer" (çözme solüsyonu) tam üstteki mavi tüpün orta kısmına gelecek şekilde ilave edilmiştir. Daha önce 50 °C' ye ayarlanan etüvde 2 dakika bekletildikten sonra 10000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üstteki mavi tüpler atılarak alt kısma süzülen DNA eppendorf tüplerde muhafaza edilmiştir.

**3.2.3.1.(2). Agaroz Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektroforezi**

DNA ekstraksiyonu için % 1'lik agarose jel hazırlanmıştır. Bunun için 0,50 gr agarose, 50 ml saf su ile karıştırılıp mikrodalga fırında köpürüp saydamlaşana kadar



bekletilmiştir. Saydamlaşan jel üzerine 1 ml seyreltilmiş 1x TBE Buffer ve 3 µl Ethidium Bromide eklenerek 60 °C' ye kadar soğutulan jel 15x6x9 cm ebatlarındaki elektroforezis küveti içerisine dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra, içerisinde seyreltilmiş 1x TBE Buffer bulunan elektroforezis tankına koyulmuş ve 3 µl DNA örnekleri 6 µl'lik loading buffer'la (yükleme çözeltisi) karıştırılarak sırasıyla jeldeki küçük haznelere yerleştirilmiştir. Elektrik akımının gerçekleşmesi için, güç kaynağı 30 dk süre ile 25 mA ve 50 V'a ayarlanmıştır.

Elektroforez tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatılarak jel elektroforez tankından uzaklaştırılmış ve UV transilluminatör cihazında, UV koruyucu maske ile örneklerin DNA yapıları gözlenmiştir.

### **3.2.3.1.(3). Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle ND5/6 Genlerinin Çoğaltılması**

Türler arasındaki genetik farklılığın derecesini belirlemek amacıyla mitokondrial DNA (mtDNA) ND 5/6 genleri kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra, universal primerler kullanarak PCR Metodu ile mtDNA ND 5/6 genleri çoğaltılmıştır (Saiki ve ark., 1988). MtDNA ND 5/6 genlerinin PCR ile uygulamasında; ilk önce 94 °C'de 4 dakika denatürasyon (35 döngü) ve bunu takiben 94°C'de 30 saniye strand DNA denatürasyonu, 52 °C'de 30 saniye Tm (tavlama) sıcaklığı, 72 °C'de 1,5 dakika ilk uzama ve 72 °C'de 7 dakika son uzama safhası izlenmiştir.

Bunun için aşağıda dizinleri verilen universal primerlerden yararlanılmıştır. Primerler İONTEK (İstanbul) firmasından sağlanmıştır.

ND5/6-a: 5'-AAC AGT TCA TCC GTT GGT CTT AGG-3'

ND5/6-b: 5'-TAA CAA CGG TGG TTC TTC AAG TCA-3'

### **3.2.3.1.(4). Akrilamid Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektroforezi**

Poliakrilamid jelin hazırlanmasında önce 3.75 ml 10 x TBE tamponu, 26.75 ml distile su ve 7.5 ml akrilamid Nuçe erlenine konularak karıştırılmıştır Vakum pompası kullanılarak 5 dk süreyle jelin yoğunlaşması sağlandıktan sonra, Jel çözeltinin 40 ml'sine 250 µl APS (%10) ve 35 µl TEMED eklenmiştir (% 8'lik jel).

Jel dökülmeden önce jel aparatı (18.3x 20 cm düz cam, 0.01 mm 20'lik tarak) çok iyi temizlenmiştir. Jel "Bio Rad Protean II Xi" jel aparatı kullanılarak dökülmüştür. Elde edilen PCR ürünü sınırlama enzimi muamelesine tabi tutularak daha sonra akrilamid jel içerisine 70 mA, 200 V'da yaklaşık 3 saat elektroforez ile akıtılmıştır.

### **3.2.3.1.(5). RFLP (Sınırlama Parçaları Uzunluk Polimorfizmi) İle Genetik Farklılığın Tespiti**

Elektroforez sonrası Jel boyanması üç farklı aşamada gerçekleşmiştir. Birinci aşamada jel tespit çözeltisi %10'luk asetik asit ve %10'luk etil alkol içerisinde iki defa olmak üzere karıştırılarak 12 dk bekletilmiş ve daha sonra çözelti boşaltılmıştır. İkinci aşamada, boyama çözeltisi (% 0.1 AgNO<sub>3</sub>) içinde 10 dk karıştırılarak bekletilmiş ve distile su ile 2 kez 2'şer dk karıştırılarak yıkanmıştır. Üçüncü ve son aşamada jel geliştirici çözelti (% 2 NaOH, 15 mg NaBH<sub>4</sub>, % 0.6 formaldehit (%37)) içerisinde bant gelişimi gözleninceye kadar karıştırılarak bekletilmiştir. Bant oluşumu tamamlandıktan sonra jel içerisindeki çözelti boşaltılarak jel 5 dk distile su ile yıkanıp kurulandıktan sonra, naylon poşetle paketlenerek değerlendirmeye bırakılmıştır. Çalışmada 6 adet sınırlama enzimleri (*BsurI* (*HaeIII*), *AluI*, *EheI* (*NarI*), *Hin6I* (*HhaI*), *RsaI*, *XhoI*) kullanılmıştır. Sınırlama enzimlerinin DNA tanıma dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Sınırlama Enzimleri ve DNA Tanıma Dizileri

<b>Sınırlama Enzimi</b>	<b>Tanıma Dizisi</b>
<i>BsurI</i> ( <i>HaeIII</i> )	5'.....GG↓CC.....3'
<i>AluI</i>	5'.....AG↓CT.....3'
<i>EheI</i> ( <i>NarI</i> )	5'....GGC↓GCC....3'
<i>Hin6I</i> ( <i>HhaI</i> )	5'.....G↓CGC'.....3'
<i>RsaI</i>	5'.....GT↓AC.....3'
<i>XhoI</i>	5'....C↓TCGAG....3'

**3.2.3.1.(6). Haplotiplerin Tespit Edilmesi**

Elektroforez sonunda jel içerisindeki sınırlama DNA parçaları, boyama çözeltisi ile boyanarak DNA ve DNA büyüklük standartları (Leader) bantları jel üzerinde görüntülenmiştir. Jellerin fotoğrafları çekilip görüntüleri dijital ortama aktarıldıktan sonra Image J (versiyon 1.37) programında DNA ve DNA büyüklük standartları bantlarının uzunlukları cm olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen uzunluklar DNA-FRAG (versiyon 3.03) Programı kullanılarak DNA uzunluk ölçü birimi olan bp'ye (baz çifti) çevrilmiştir. Elde edilen bu bantların uzunluğu, sayısı ve buldukları yere göre her enzim için referans haplotipler belirlenmiştir. Referans haplotipler belirlenirken kullanılan sınırlama enzimleri, PCR ile çoğaltılan gen bölgesi (mtDNA, ND 5/6) üzerindeki referans tanıma dizisini bulduğu her bölgeden geni kesmekte, kesilen bu gen bölgesi farklı uzunluklarda (4-6) değişen sayılarda DNA parçalarına ayrılmakta ve bu sınırlama enzimleri, genetik olarak birbirinden farklı olan her örnek için, farklı noktalardan gen bölgesini kestiğinden dolayı, farklı haplotiplerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

**3.2.3.2. Genetik Verilerin Analizi**

Haplotiplerin yapısına göre türler arasındaki genetik farklılığın ve ilişkinin derecesi tespit edilmiştir. Elde edilen genetik verilerin analizinde REAP (McElroy ve ark., 1992) ve TFGAv1.3, PHYLIP (Felsenstein, 2002) genetik paket programları kullanılmıştır.

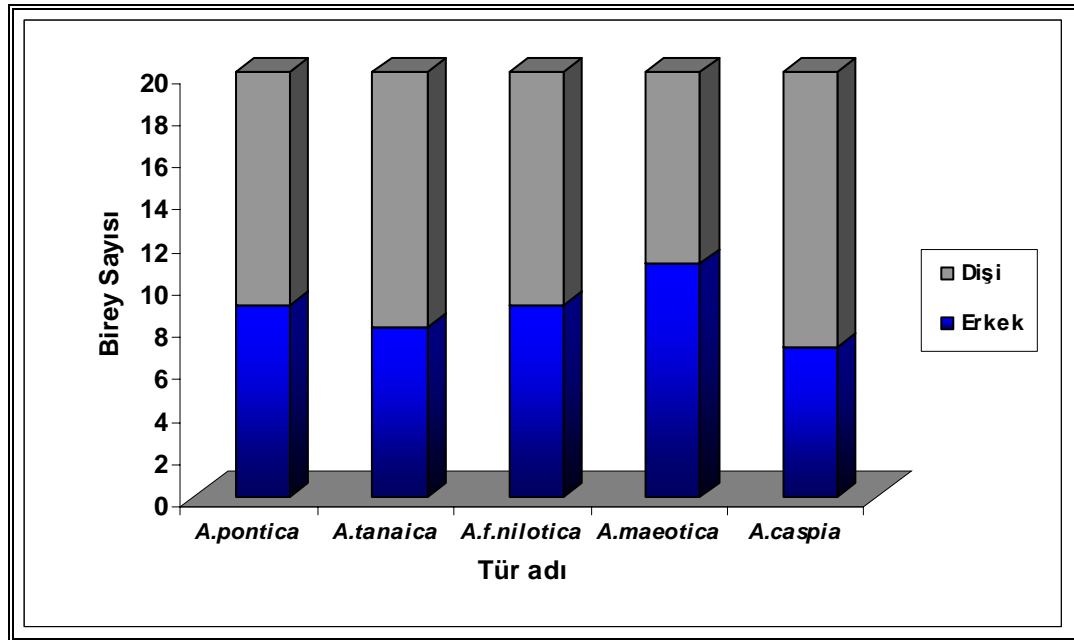
Nei (1987) ve Nei ve Tajima (1981)'e göre genetik çeşitlilik ve genetik uzaklık verileri kullanılarak türler arasındaki genetik çeşitlilik ve farklılaşmanın derecesi belirlenmiştir. Türler arasındaki ilişkiyi göstermek üzere UPGMA (Tartılı Olmayan Çiftleştirilmiş Grup Metodu Aritmetik Ortalaması) soy ağacı (dendogram) oluşturulmuştur.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

## 4.1. Bulgular

## 4.1.1. Türlerin Eşeylere Göre Dağılımı

Ülkemiz denizlerinde Karadeniz, Marmara denizi ve Akdeniz’de dağılım gösteren 5 tirsi türü tespit edilmiştir. Şile, İstanbul ve Samandağ bölgelerinden avlanan türlere ait bireylerin eşey durumlarına göre sayısal olarak dağılımları Şekil 4.1.’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Avlanan Tirsi Türlerinin Eşey Dağılımı

**4.1.2. Tespit Edilen Türlerin Meristik Özellikleri**

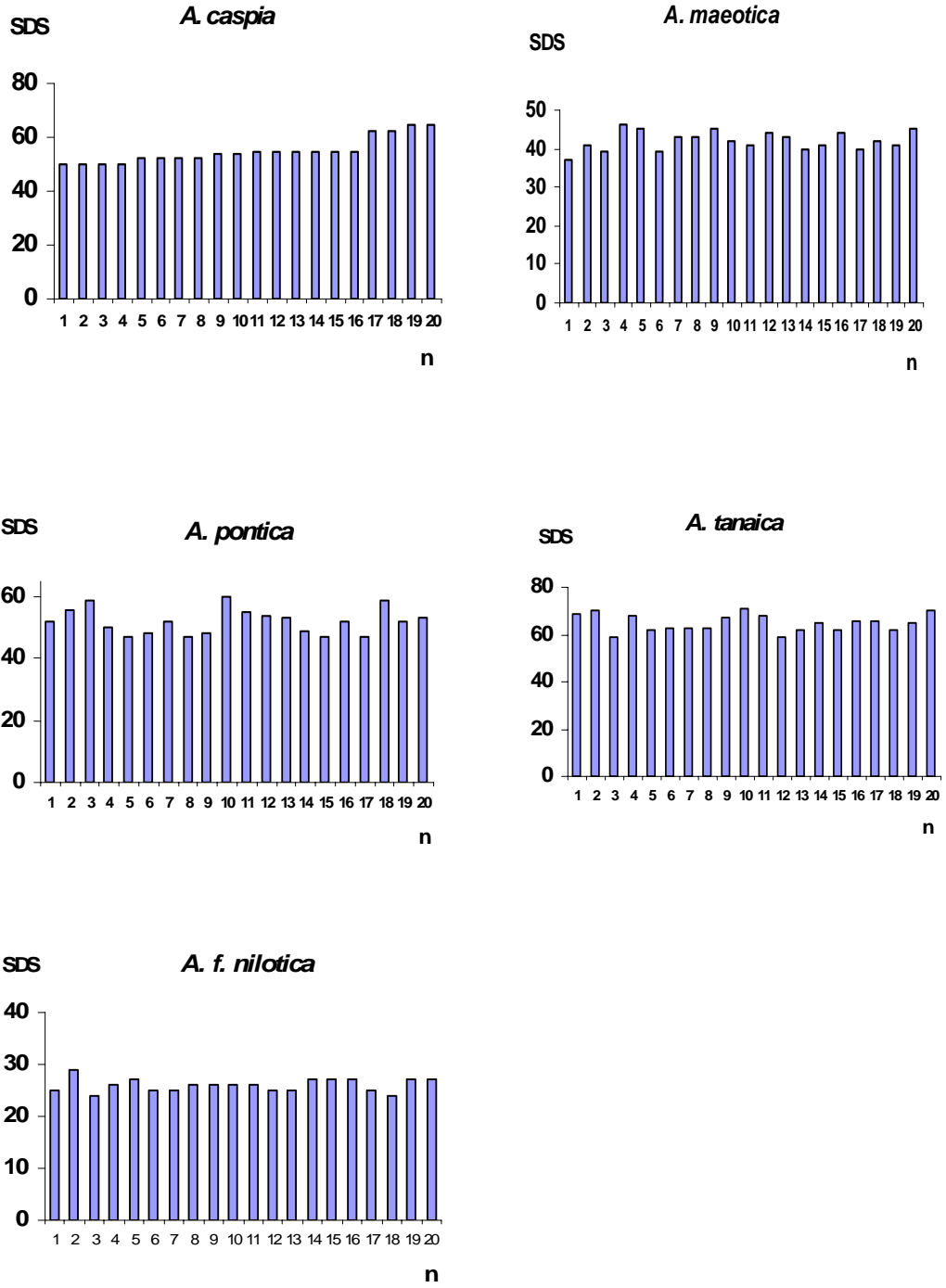
Türlerin tespitinde meristik karakterlerden yararlanılmıştır. Özellikle tirsi türlerinin ayırımında önemli olan solungaç diken sayısı, omur sayısı, yan çizgideki pul sayısı, omur sayısı ve karina pulları sayısı gibi meristik karakterler incelenmiştir (Çizelge 4.1). Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de ise tirsi türlerinin ayırımında önemli derecede rol oynayan solungaç dikenleri ve karina pul sayıları yönünden bir karşılaştırma yapılmıştır.

Şekil 4.2’de türler arasında solungaç dikenleri yönünden yapılan karşılaştırma sonucunda *A. caspia* örneklerinin 50-65, *A. fallax nilotica*’nın 25-29, *A. maeotica*’nın 37-45, *A. pontica*’nın 47-60 ve *A. tanaica*’nın 59-72 arasında dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

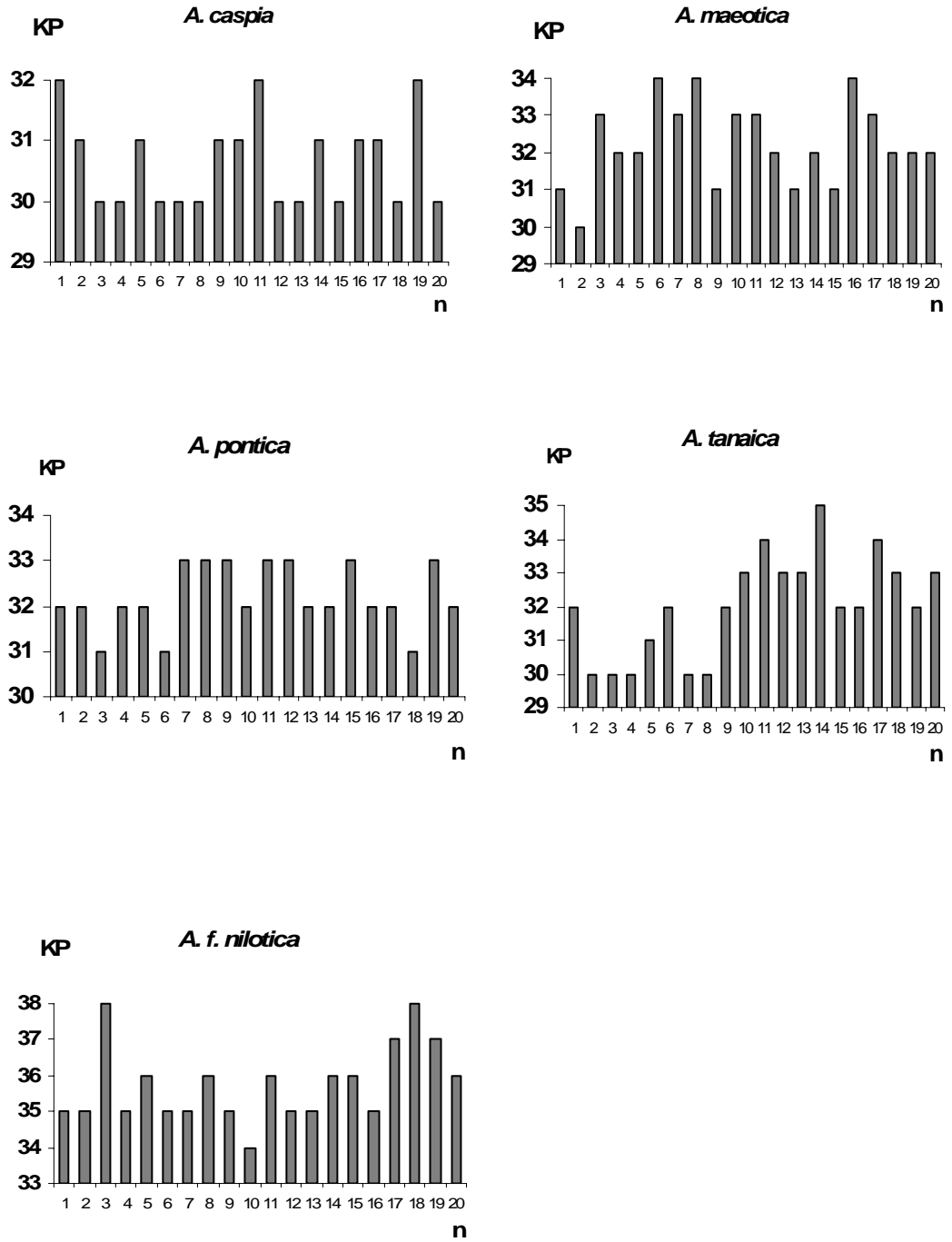
Yapılan meristik sayımlarda ise *A. fallax nilotica* örnekleri dışındaki diğer türlerin solungaç diken sayılarının bildirilen sonuçlar aralığında olduğu fakat *A. fallax nilotica*’nın solungaç diken sayılarının, birçok araştırmacı tarafından belirlenen (Whitehead 1985; Akşiray 1987; Geldiay ve Balık, 1996) 34-37 aralığında olmadığı 25-29 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Karadeniz ve Marmara da bulunan türlerin (*A. caspia*, *A. maeotica*, *A. pontica*, *A. tanaica*) birbirine morfolojik olarak çok benzemesinden dolayı *A. fallax nilotica* haricindeki diğer türlerin ayırımında solungaç diken sayılarının önemli derecede rol oynadığı ve birçok araştırmacı tarafından (Svetovidov, 1963; Whitehead 1985; Akşiray 1987) bildirildiği gibi, solungaç diken sayılarının tür tespitinde en iyi anahtar olduğu görülmektedir.

Şekil 4.3’de ise türlerin karina pulları sayısı bakımından karşılaştırması yapılmıştır. Karina pulları sayısının; *A. caspia*’da 30-32, *A. fallax nilotica*’da 34-38, *A. maeotica*’da 30-34, *A. pontica*’da 31-34, ve *A. tanaica*’da 30-35 arasında olduğu ve türlere göre çok az farklılık gösterdiği görülmektedir. Yine karina pulları sayısı bakımından da Atlantik kökenli olan *A. fallax nilotica*’nın daha farklı olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.2. Türlerin Solungaç Diken Sayıları (SDS) Yönünden Karşılaştırılması (n: örnek sayısı)



Şekil 4.3. Türlerin Karina Pul Sayıları (KP) Yönünden Karşılaştırılması (n: örnek sayısı)

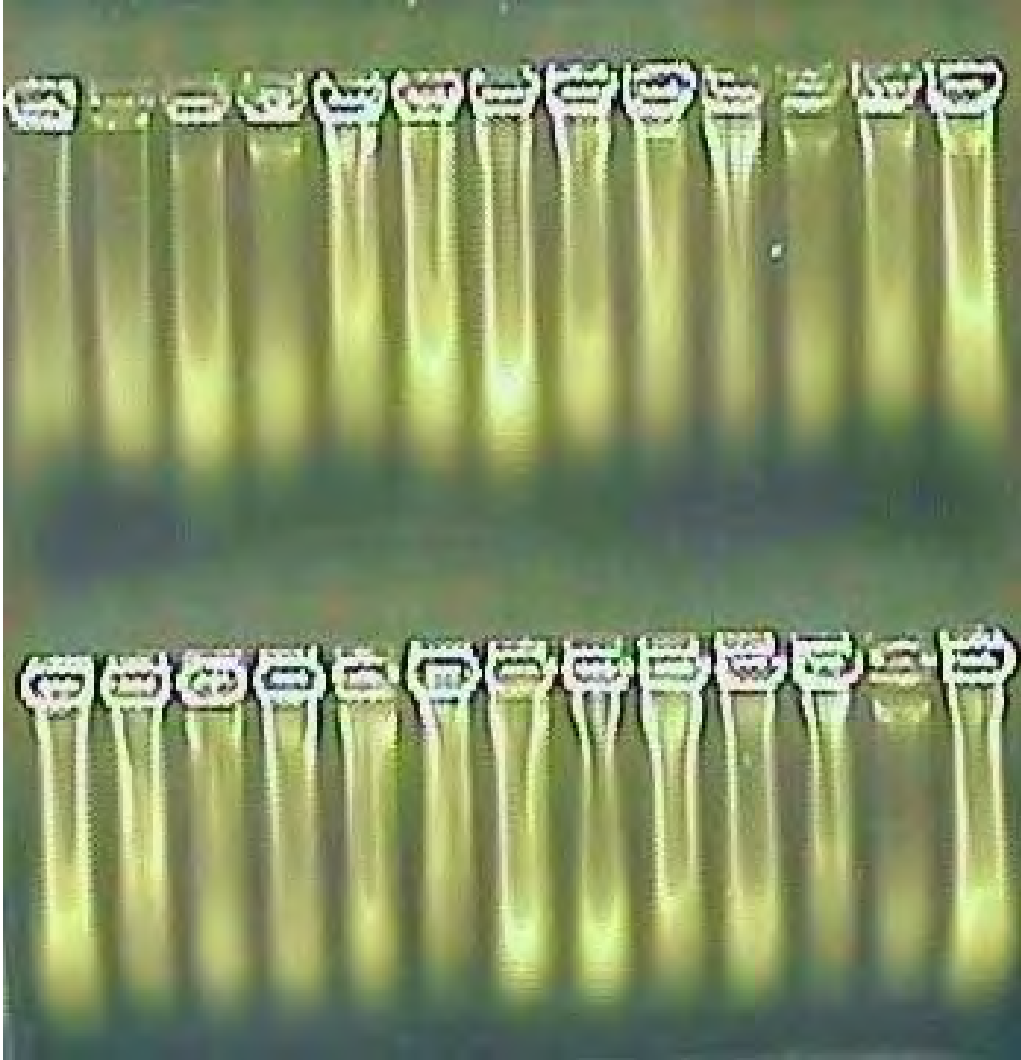
Çizelge 4.1. İncelenen Türlerin Meristik Özelliklerinin Dağılımı

<b>Yanal çizgi pul sayısı</b>		n	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61																								
<i>A. caspia</i>		20	5	8	6	1																															
<i>A. fallax nilotica</i>		20				1	3	3	10	1	2																										
<i>A. masotica</i>		20	1	1	3	4	6	1	3	1																											
<i>A. pontica</i>		20			1	3	2	4	9	1																											
<i>A. karnica</i>		20	1	5	8	2	1	1	1	1																											
<b>Yanal sırt pul sayısı</b>		n	8	9	10	11	12	13																													
<i>A. caspia</i>		20	13	7					20	14	6																										
<i>A. fallax nilotica</i>		20		1	5	12	2		20		4	5	11																								
<i>A. masotica</i>		20	14	6					20	7	8	5																									
<i>A. pontica</i>		20	5	15					20	2	16	2																									
<i>A. karnica</i>		20	1	13	6				20	1	5	14																									
<b>Solungaç dilen sayısı</b>		n	24	25	26	27	28	37	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	52	53	54	55	56	59	60	62	63	65	66	67	68	69	70	71	72
<i>A. caspia</i>		20																			4	2	1	3	5			2	1	2							
<i>A. fallax nilotica</i>		20	2	6	5	6	1														4	2	1	1	3	5											
<i>A. masotica</i>		20						1	2	2	4	2	3	2	3	1					4	2	1	1	1	1	1	2	1								
<i>A. pontica</i>		20																			4	2	1	1	4	2	1	1	2	1							
<i>A. karnica</i>		20																										4	3	2	2	1	2	2	2	1	1
<b>Omur Sayısı</b>		n	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58																								
<i>A. caspia</i>		20	4	8	5	3																															
<i>A. fallax nilotica</i>		20												3	10	7																					
<i>A. masotica</i>		20	1	1	7	11	1																														
<i>A. pontica</i>		20	2	4	12																																
<i>A. karnica</i>		20	5	6	9																																
<b>Karına pulları sayısı</b>		n	30	31	32	33	34	35	36	37	38																										
<i>A. caspia</i>		20	9	6	5																																
<i>A. fallax nilotica</i>		20					1	9	6	2	2																										
<i>A. masotica</i>		20	1	4	7	5	3																														
<i>A. pontica</i>		20	3	10	5	2																															
<i>A. karnica</i>		20	5	1	6	5	2	1																													



**4.1.3. Genetik Bulgular****4.1.3.1. Toplam DNA'nın Elde Edilmesi**

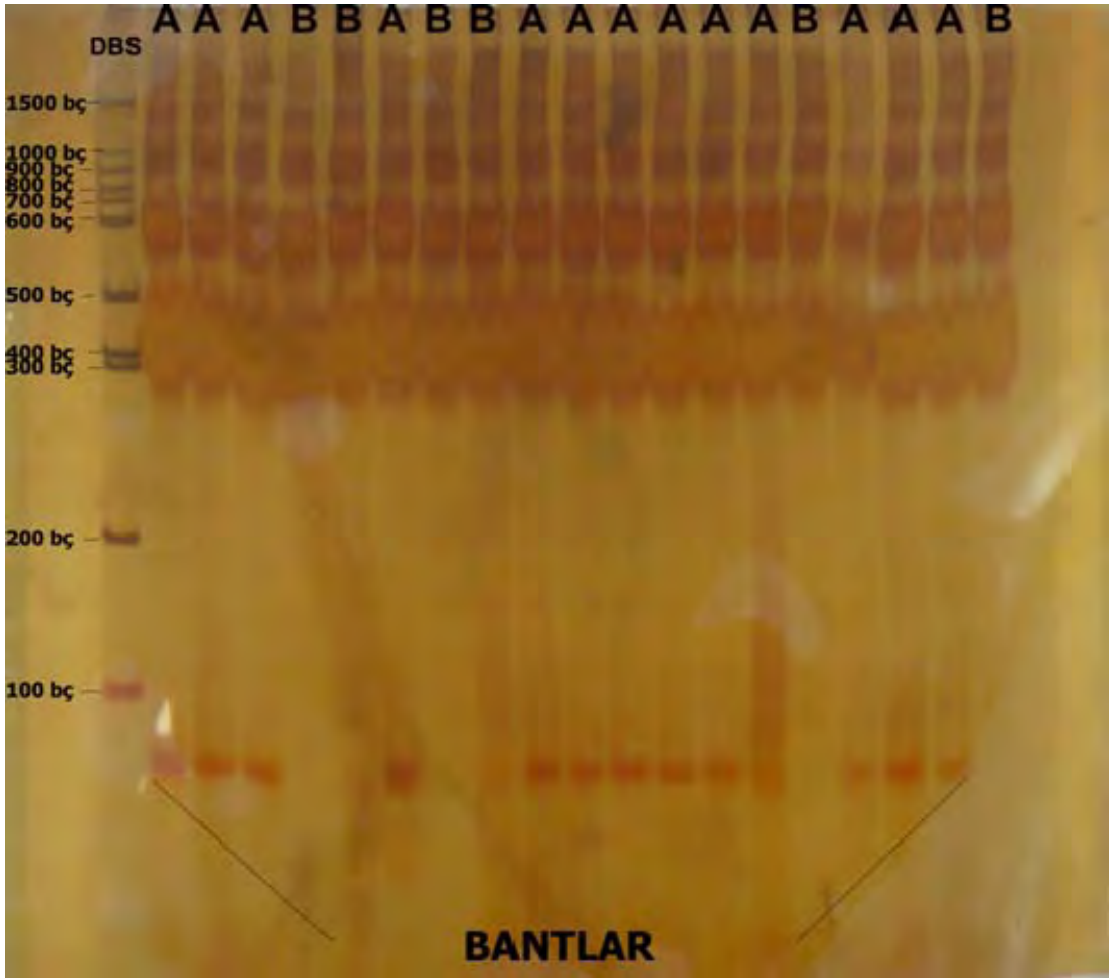
Türkiye denizlerinde bulunan *A. caspia*, *A. fallax nilotica*, *A. maeotica*, *A. pontica*, *A. tanaica* türlerinden 20'şer örnek sağlanarak toplam 100 örnek ile türler arasındaki genetik ilişkinin şekli ve derecesi belirlenmeye çalışılmıştır. İzolasyon sonunda total DNA tirsisi türlerinden başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Ekstrakte Edilen Total DNA'nın Agoraz Jel Üzerinde Kontrolü

#### 4.1.3.2. Haplotip Çeşitliliği

Çalışmada mtDNA’da bulunan ND5/6 genleri kullanılmıştır. PCR ile ND 5/6 genleri çoğaltıldıktan sonra, RFLP yöntemi ile 6 polimorfik sınırlama enzimi (*BsurI*, *AluI*, *EheI*, *Hin6I*, *RsaI*, *XhoI*) uygulanarak türlerin örneklerinde toplam 13 haplotip belirlenmiştir Şekil 4.5’de PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen bantların görünümü verilmiştir.



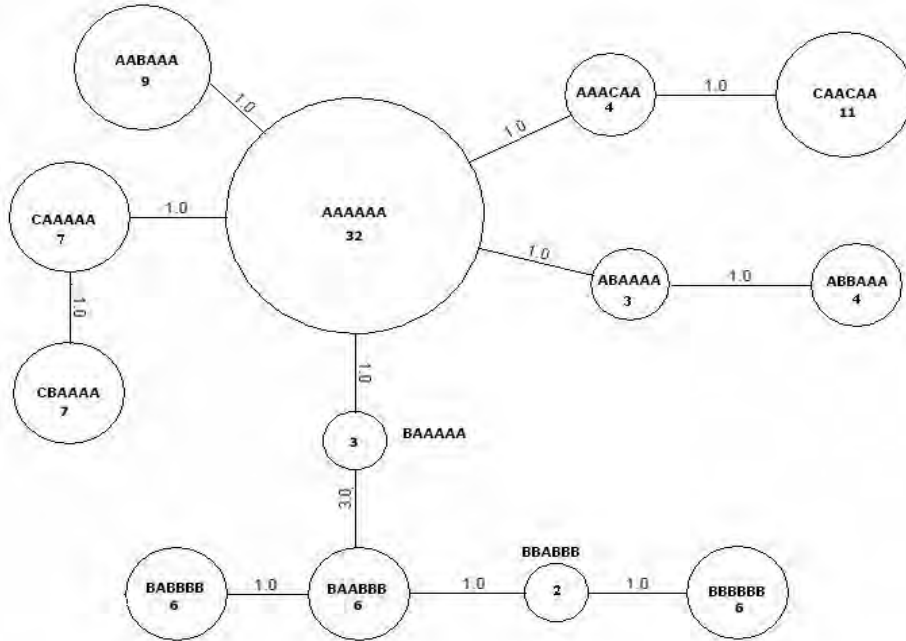
Şekil 4.5. Tirsî Türlerinin ND 5/6 Genleriyle Sınırlama Enzimleri ile Kesilmesi Sonucu Elde Edilen PCR-RFLP Bant Profili (DBS: DNA Büyüklük Standartları, A,B: Haplotipler)

Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi PCR-RFLP yöntemi ile türler arasındaki genetik çeşitliliği ve uzaklığı saptamak için 6 polimorfik sınırlama enzimi kullanılmış ve tüm türlerde toplam 13 haplotip gözlenmiştir. Haplotip çeşitliliği bakımından; *A. tanaica*'da 6, *A. fallax nilotica*'da 5, *A. pontica* ve *A. maeotica*'da 4, *A. caspia*'da ise 1 çeşit haplotip görülmüştür. Çizelge 4.2.'de 5 tirsli türünde en fazla görülen AAAAAA (32) haplotipinden farklı olarak AABAAA haplotipinden 9, CAAAAA haplotipinden 7, AAACAA haplotipinden 4, ABAAAA'dan 3, BAAAAA'dan 3, CBAAAA'dan 7, CAACAA'den 11, ABBAAA'den 4, BAABBB'den 6, BABBBB'den 6, BBABBB'den 2, BBBBBB'den 6 haplotip gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Tüm Örneklerin ND 5/6 Bölgesinden Elde Edilen Haplotip ve Frekansları. Haplotiplerin Elde Edilmesinde Kullanılan Enzimler (soldan sağa): (*BsurI*, *AluI*, *EheI*, *Hin6I*, *RsaI*, *XhoI*)

Haplotip	<i>A. pontica</i>	<i>A. tanaica</i>	<i>A. f. nilotica</i>	<i>A. maeotica</i>	<i>A. caspia</i>
1 CAACAA	11	0	0	0	0
2 AAAAAA	3	2	3	4	20
3 AAACAA	4	0	0	0	0
4 CAAAAA	2	5	0	0	0
5 BAAAAA	0	2	1	0	0
6 CBAAAA	0	7	0	0	0
7 BBBBBB	0	2	4	0	0
8 BBABBB	0	2	0	0	0
9 BAABBB	0	0	6	0	0
10 BABBBB	0	0	6	0	0
11 ABBAAA	0	0	0	4	0
12 ABAAAA	0	0	0	3	0
13 AABAAA	0	0	0	9	0
<b>Toplam</b>	20	20	20	20	20

Şekil 4.6’da ise daire içerisinde tirsi türlerinde gözlenen haplotipler ve sayısal değerleri verilmiştir. Tirsi türlerinde ilk olarak AAAAAA haplotipinin 32 bireyde bulunduğu görülmektedir. AAAAAA haplotipinin merkezde olduğu ve diğer haplotiplerin buradan oluştuğu gözlenmektedir. Merkezdeki daire içerisinde bulunan AAAAAA haplotipi *A. caspia*’nın bütün bireylerinde, *A. maeotica*’nın 4, *A. pontica*’nın 3, *A. tanaica*’nın 2 ve *A. fallax nilotica*’nın ise 3 bireyinde gözlenmiştir. Dallanmış kısımlarda gösterilen diğer haplotipler mutasyonlar sonucu oluşan haplotipleri göstermektedir. Tirsi bireylerinde gözlenen merkezdeki AAAAAA haplotipinin oluşan mutasyonlar sonucu, değişime uğrayarak AABAAA, CAAAAA, AAACAA, ABAAAA ve BAAAAA haplotiplerine dönüştüğü, CAAAAA, AAACAA, ABAAAA haplotiplerinin yine bir mutasyon daha geçirerek CBAAAA, CAACAA ve ABBAAA haplotipleriyle temsil edildiği, BAAAAA haplotipinin de mutasyon sonucu BABBBB, BAABBB, BBABBB haplotip yapısında olmak üzere 3 ayrı kısma ayrıldığı ve BBABBB haplotipinin de daha sonra tamamen BBBBBB haplotipine dönüştüğü görülmektedir.



Şekil 4.6. Tirsi türleri arasındaki akrabalık ilişkisinin, ND 5/6 gen bölgesi için 6 sınırlama enzimi ile tespit edilen haplotiplerin asgari zincir ağı ile görünümü (Daire içerisindeki alanlar, oransal haplotip frekanslarını göstermektedir).

Tirsi türleri örneklerinin ND 5/6 bölgesi için haplotip frekansları Monte Carlo  $X^2$  analizi sonucunda farklı bulunmuştur. Tüm türlerin karşılaştırılması sonucunda *A. maeotica*, *A. fallax nilotica*, *A. caspia*, *A. tanaica* ve *A. pontica* örneklerinin haplotip frekanslarının birbirlerinden farklı ve yüksek derecede önemli oldukları belirlenmiştir ( $P < 0.001$ ).

Çalışmada türlerin içerisinde haplotip çeşitliliği *A. pontica*'da 0.6579, *A. tanaica*'da 0.8158, *A. fallax nilotica*'da 0.7947, *A. maeotica*'da 0.7316 bulunurken; *A. caspia*'nın kendi popülasyonu içerisinde haplotip bakımından bir çeşitlilik gözlemlenmemiştir. Bu değerlere göre, en yüksek haplotip çeşitliliği *A. tanaica* örneklerinde gözlemlenirken, en düşük ise *A. caspia*'da görülmektedir. *A. caspia*'da tek haplotip görülmesi, bu türün bireyleri arasında bir farklılık olmadığını ortaya koymaktadır. Tüm türlerin popülasyonları arasındaki haplotip çeşitliliği ise ortalama 0.6000 ( $\pm 0.02326$ ) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Tirsi Türleri İçerisinde MtDNA Düzeyinin mtDNA Bölgesi Değişiminde Ölçülen Haplotip Çeşitlilik Değerleri

MtDNA bölgesi	
Tür	ND5/6
<i>A. pontica</i>	0.6579
<i>A. tanaica</i>	0.8158
<i>A. fallax nilotica</i>	0.7947
<i>A. maeotica</i>	0.7316
<i>A. caspia</i>	0.0000
<b>Ortalama</b>	0.6000 ( $\pm 0.02326$ )

Çalışmada belirlenen haplotiplerin incelenmesi sonucunda türler içerisinde *A. caspia* dışında yüksek genetik çeşitlilik görülmüştür. *A. caspia* türünde haplotip çeşitliliğinin görülmemesi yakın geçmişte bu türün genetik darboğaz (Genetic bottleneck) geçirmiş olabileceği, yoğun avcılık baskısına maruz kaldığını ya da çevresel faktörlerden etkilenmiş olabileceği ihtimalini vermektedir. Önceki yıllarda Carvalho ve ark., 1994; Bembo ve ark., 1995, Hauser, 1996, Turan, 1997; ND 5/6 genleriyle clupeidae familyasına ait ringa balıkları üzerine yaptıkları çalışmalar sonucunda oldukça yüksek genetik çeşitlilik saptadıklarını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda; Carvalho ve ark. (1994), 104 deniz sardalyası (*Sardina pilchardus*) bireyinde 41 haplotip saptamış ve haplotip çeşitliliğini 0.76 olarak bulmuşlardır.

Bembo ve ark. (1995), 140 hamsi (*Engraulis encrasicolus*) bireyinde 53 haplotip gözlemlemişler ve haplotip çeşitliliğini ortalama 0.760 olarak belirlemişlerdir. Hauser (1996) genellikle tatlı sularda bulunan clupeid türlerinden *Limnothrissa miodon*'nun 531 bireyinde 144 haplotip saptamış ve haplotip çeşitliliğini 0.905 gibi yüksek bir değer saptamıştır.

Turan (1997) ND 3/4 bölgesinde farklı bölgelerden topladığı ringa popülasyonlarında (*Clupea harengus*) 280 bireyde 22 haplotip gözlemlemiş ve haplotip çeşitliliğini ortalama 0.8924 olarak gözlemlemiştir. Turan ve ark., (1998) farklı bölgelerden topladığı ringa popülasyonlarında (*Clupea harengus*) 196 bireyde 96 haplotip gözlemlemiş ve haplotip çeşitliliğini ortalama 0.92 olarak hesaplamıştır.

Bu çalışmalarda türlerde yüksek haplotip çeşitliliğinin görülmesinin sonucu, örnek sayısının fazlalığı ve örnekleme belkide birçok farklı bölgelerden yapılmış olması ile açıklanabileceği söylenebilir.

Diğer gen bölgeleri ile yapılan çalışmalarda da; Hauser ve ark. (2001) tarafından daha yakın zamanlarda ringalar üzerine yaptıkları bir çalışmada ND 3/4 ve ND 5/6 genleri için haplotip çeşitliliğini ortalama 0.97 olarak oldukça yüksek bir değerde saptamışlardır.

Alexandrino ve ark. (2006) Avrupa tirsi türlerini (*A. alosa* ve *A. fallax*) mtDNA'nın sitokrom b bölgesi ile araştırmışlar ve gözlemledikleri 6 haplotip sonucunda ortalama haplotip çeşitliliğini 0.501 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bowen ve Avise, (1990), ringa (*Brevoortia tyrannus* ve *Brevoortia patronus*), Trinagali ve Wilson, (1993) sardalya (*Sardinella aurita*) Carvalho ve ark., 1994 hamsi (*Engraulis encrasicolus*), Bentzen ve ark. (1988) Amerikan tirsisi *Alosa sapidissima*, türleri üzerine yaptıkları benzer mtDNA çalışmalarında da türler içerisinde önemli derecede yüksek haplotip çeşitliliği gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Birçok araştırmacı tarafından clupeid türleri üzerinde özellikle ND gen bölgeleriyle yapılan bu çalışmalarda yüksek haplotip çeşitliliği görülmesi, bu türlerin geniş yayılım alanlarından toplanmış olabileceği, çalışılan birey sayısının fazla olabileceği ve aynı zamanda çalışılan gen bölgesininin birden fazla olmasıyla da ifade edilebilir.

MtDNA'nın farklı gen bölgeleri ve diğer deniz balıkları ile yapılan benzer çalışmalarda ise ortalama haplotip çeşitliliğinin daha çok orta seviye değerlerde gözlemlendiği görülmektedir. Nesbo ve ark. (2000) Uskumru (*Scomber scombrus*) ile yaptıkları çalışmada 29 haplotip gözlemiş ve haplotip çeşitliliğini 0.60 olarak saptamışlardır. D'amato ve Carvalho (2005) ND 5/6 genleriyle mezigit balıkları (*Macruronus magellenicus*) ile yaptıkları çalışmada ortalama haplotip çeşitliliğini 0.62 olarak belirtmişlerdir.

Kilia-Klossa ve ark. (2002) gümüş balıkları (*Atherina boyeri*) ile mtDNA'nın 12s rRNA, 16s rRNA ve D-loop genleriyle yaptıkları çalışmada, ortalama haplotip çeşitliliğini 0.1589 olarak bildirmişlerdir. Karaiskou ve ark. (2003) sitokrom b ve 16s rRNA genlerinde İstavrit türleri (*Trachurus picturatus*, *Trachurus trachurus*, *Trachurus mediterraneus*) ile yaptıkları DNA sekans çalışmasında haplotip çeşitliliğini, her tür için sırasıyla 0.64, 0.26, 0.24 olarak saptamışlardır.

Papasotiropoulos ve ark. (2002) 12s rRNA, 16s rRNA ve COI genleriyle 5 kefal türünde (*M. cephalus*, *L. aurata*, *L. ramada*, *L. saliens*, *C. labrosus*) 7 farklı haplotip gözlemlemişler ve türler içerisindeki ortalama haplotip çeşitliliğini 0.09 olarak oldukça düşük bir değerde bulmuşlardır.

ND genlerinde clupeidlerde görülen yüksek haplotip çeşitliliğinin, önceki yıllarda birçok araştırmacı tarafından salmonlar ile yapılan çalışmalarda biraz daha düşük bulunduğu bildirilmektedir. Hall, (1992) ND 5/6 bölgesi için kullandığı 7

sınırlama enzimi sonucunda *Salmo trutta* da 219 örnekte 19 haplotip bulmuştur. Cronin ve ark., (1993), Chum salmon (*Onchorhynchus keta*) örneklerinde (50 örnek) ND 5/6 ve ND 3/4 genleriyle 9 enzimle yaptıkları çalışmada 9 haplotip gözlemlemişlerdir. Cronin ve ark., (1993), Chinook salmonu *Onchorhynchus tsawyscha* (57 örnek, 7 enzim) ile ND 1, ND 5/6 ve D-loop bölgesinde yapılan başka bir çalışmada 7 haplotip saptadıklarını belirtmişlerdir

Hansen ve Loeschcke (1996) alabalıklar da mtDNA'nın tanınma bölgesiyle yaptıkları çalışmada sınırlama parçasına rastlamazken ND 1 ve ND 5/6 bölgeleriyle yaptığı çalışma da 13 haplotip bulmuşlardır. Elde edilen bu sonuçlar benzer çalışmalarda da rapor edilmiştir (Hall ve Nawrocki, 1995; Hynes ve ark., 1996).

Bardakçı ve ark. (2006) alabalıklarda ND 5/6, sitokrom b genleri ve D-loop tanınma bölgesi ile yaptıkları çalışmalarında, 27 haplotip saptamışlar ve ortalama haplotip çeşitliliğini 0.1397 olarak bulmuşlardır.

Salmonlarla yapılan çalışmalarda da örnek sayısının ve gen bölgesinin fazla olması halinde haplotip sayısının daha yüksek olmasına rağmen haplotip çeşitliliğinin daha düşük olduğu görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada *Alosa* türleri içerisindeki ortalama haplotip çeşitliliğinin clupeid familyasına mensup ringa balıkları üzerine yapılan çalışmalar ile karşılaştırılan sonuçlara göre biraz daha düşük olduğu görülmektedir. Çalışmada haplotip çeşitliliğinin düşük çıkması, birey sayısının diğer çalışmalara göre daha az olması, bu türler üzerinde avcılık veya çevresel faktörlerin etkisinin daha fazla görülmesi çalışılan gen bölgesinin mtDNA'daki sadece bir gen bölgesi (ND 5/6) olması sonucuyla açıklanabilir. Ancak bu ve daha önceki yıllarda yapılan çalışmaların değerlendirmelerine bakılarak, ND genlerinin özellikle tirsi popülasyonları üzerinde yüksek haplotip çeşitliliği gösterdiği ve oldukça başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir.

Çalışmada ND 5/6 genlerinin PCR ile çoğaltılması sonucu bant uzunluğu 2080 ile 2333 arasında ortalama olarak 2175 bp (baz çifti) bulunmuştur. ND bölgesi için benzer çalışmalarda da bant uzunluğuna yakın sonuçların rapor edildiği görülmektedir (Bentzen ve ark., 1993; Cronin ve ark., 1993; D'Amato ve Carvalho, 2005).



Turan, (1997) Atlantik ringası (*Clupea harengus*) ve Pasifik ringası (*Clupea pallasii*) ile yaptığı araştırmasında, ND 5/6 genleri için bant uzunluğunu çok daha geniş (2515 bç) olarak belirlemiştir. Hauser ve ark., (2001) Atlantik ringası (*Clupea harengus*) ile yaptıkları çalışmada bant uzunluğunu ND 3/4 genleri için 2410 bç (53 haplotip), ND 5/6 genleri için ise 2514 bç (47 haplotip) olarak tespit etmiştir.

#### 4.1.3.3. *BsurI* Sınırlama Enzimi

*BsurI* enziminde mtDNA'nın ND 5/6 bölgesi için tüm tirsi türlerine ait örneklerde A,B ve C olmak üzere 3 haplotip gözlenmiştir. *A. pontica* ve *A. tanaica* örneklerinde A,B,C; haplotiplerine; *A. fallax nilotica*'da A,B; *A. maeotica*'da A,C; *A. caspia* da ise sadece A haplotipine rastlanmıştır. *BsurI* enzimi için bant uzunluğu ise 24-637 bç arasında bulunmuştur. Toplam bant uzunluğu ise 2175 bç hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Her enzim ve her haplotip için hesaplanan sınırlama parçası uzunlukları Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Buna göre "1" ile gösterilen değerler sınırlama parçasının var olduğunu "0" ile gösterilen değerler ise sınırlama parçasının var olmadığını belirtmektedir.

Çizelge 4.4. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin *BsurI* Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri

<b>BsurI</b>			
<b>Haplotipler</b>			
<b>Bantlar (bç)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
637	1	1	1
456	0	0	1
352	1	1	1
283	0	0	1
232	0	1	1
208	1	0	0
122	0	0	1
69	0	0	1
24	1	0	1

#### 4.1.3.4. *AluI* Sınırlama Enzimi

*AluI* enziminde mtDNA'nın ND 5/6 bölgesi için tüm türlerin örneklerinde A,B olmak üzere 2 haplotip görülmüştür. *A. Pontica* ve *A. caspia* örneklerinde sadece A haplotipi gözlemlenirken; diğer türlerin örneklerinde (*A. tanaica*, *A. fallax nilotica*'da, *A. maeotica*) ise A,B haplotiplerine rastlanmıştır. *AluI* enzimi için bant uzunluğu ise 61-635 bç arasında bulunmuştur. Toplam bant uzunluğu ise 2085 bç hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).

#### 4.1.3.5. *EheI* Sınırlama Enzimi

*EheI* enziminde de mtDNA'nın ND 5/6 bölgesi için *AluI* enziminde olduğu gibi tüm türlerin örneklerinde A,B olmak üzere 2 haplotip görülmüştür. *A. pontica* *A. caspia* örneklerinde A haplotipine; *A. tanaica*, *A. fallax nilotica*'da, *A. maeotica* da A,B haplotiplerine rastlanmıştır. Bant uzunluğunun 48-758 bç arasında değiştiği görülürken; toplam bant uzunluğu ise 2333 bç olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin *AluI*, *EheI* Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri

<i>AluI</i>			<i>EheI</i>		
Haplotipler			Haplotipler		
Bantlar (bç)	A	B	Bantlar (bç)	A	B
635	1	1	758	1	1
474	1	1	557	1	1
389	1	1	398	1	0
291	1	0	334	1	1
235	1	1	238	1	1
61	1	0	48	1	0

#### 4.1.3.6. *Hin6I* Sınırlama Enzimi

*Hin6I* enziminde ND 5/6 bölgesi için tüm örneklerde A,B ve C haplotipleri elde edilmiştir. *A. pontica* populasyonunda A,B ve C haplotiplerine, *A. tanaica* ve *A. fallax nilotica*'da, A,B haplotiplerine; *A. maeotica* da A,C ve *A. caspia* populasyonunda ise sadece A haplotipi gözlemlenmiştir. Bant uzunluğu 46-716 bç arasında hesaplanmıştır. Toplam bant uzunluğu ise 2265 bç olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin *Hin6I* Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri

<i>Hin6I</i>			
Haplotipler			
Bantlar (bç)	A	B	C
716	1	1	0
542	1	1	1
374	0	0	1
332	1	1	1
236	1	1	1
155	0	0	1
46	1	0	1

#### 4.1.3.7. *RsaI* Sınırlama Enzimi

*RsaI* enziminde ND 5/6 bölgesi için tüm örneklerde A,B ve C haplotipleri elde edilmiştir. *A. pontica* ve *A. caspia* örneklerinde sadece A haplotipine; *A. tanaica* ve *A. fallax nilotica*'da, A,B haplotiplerine; *A. maeotica* örneklerinde A ve C haplotiplerine rastlanmıştır. Bant uzunluğu 44-623 bç hesaplanmıştır. Toplam bant uzunluğunun ise 2080 bç olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7).

#### 4.1.3.8. *XhoI* Sınırlama Enzimi

*XhoI* enziminde ND 5/6 bölgesi için *RsaI* enziminde olduğu gibi, tüm örneklerde A,B ve C haplotipleri olmak üzere üç haplotip elde edilmiştir. Bant uzunluğu 44-623 bç olarak bulunmuş ve toplam bant uzunluğu ise 2212 bç olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. MtDNA'nın ND 5/6 Bölgesinin *RsaI* ve *XhoI* Sınırlama Enzimi İle Elde Edilen Haplotiplerde, Bant Uzunluklarına Göre Sınırlama Parçası Uzunluk Değerleri

<b>Rsa-I</b>				<b>Xho-I</b>			
<b>Haplotipler</b>				<b>Haplotipler</b>			
<b>Bantlar (bç)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Bantlar (bç)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
623	1	1	0	705	1	1	1
493	1	1	1	533	0	0	1
329	0	0	1	409	1	1	1
298	1	1	1	299	1	1	1
241	1	1	1	250	1	1	0
155	0	0	1	45	1	0	1
44	1	0	1				

## 4.1.3.9. Nükleotid Çeşitlilik ve Nükleotid Farklılık

Türler içerisinde ND 5/6 bölgesi için nükleotid çeşitliliğine bakıldığında, *A. pontica*, (0.006325), *A. tanaica* (0.006516) ve *A. fallax nilotica*'nın (0.006147), birbirine daha yakın değerlerde olduğu; *A. maeotica*'nın (0.007667) bu türlere göre daha yüksek bir değere sahip olduğu görülmektedir. *A. caspia* örneklerinde ise nükleotid çeşitliliği yönünden herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Türler içerisinde ortalama nükleotid çeşitliliği ise 0.005331 ( $\pm 0.0000018$ ) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Tirsî Türleri İçerisinde MtDNA Düzeyinin ND Bölgesi Değişiminde Ölçülen Nükleotid Çeşitlilik Değerleri

MtDNA bölgesi	
Tür	ND5/6
<i>A. pontica</i>	0.006325
<i>A. tanaica</i>	0.006516
<i>A. fallax nilotica</i>	0.006147
<i>A. maeotica</i>	0.007667
<i>A. caspia</i>	0.000000
<b>Ortalama</b>	0.005331 ( $\pm 0.0000018$ )

Bu değerlere oldukça yakın ve benzer nükleotid çeşitlilik değerlerini clupeidae familyasından ringalarda Turan (1997), ND 3/4 bölgesi için 0.008114 (0.00188), ND 5/6 bölgesi için ortalama 0.005344 (0.0004) olarak bulmuştur. Hauser ve ark. (2001), bu değerleri ringalarda ND 3/4 bölgesi için 0.0053 ( $\pm 0.0004$ ), ND 5/6 bölgesi için 0.0081 ( $\pm 0.00018$ ) olarak hesaplamışlardır.

Gharret ve ark., (2001) kayabalıkları türleri (*Sebastes* spp.) ile ND 3/4 gen bölgeleriyle yaptıkları çalışmalarında türler içerisindeki nükleotid çeşitlilik değerini ortalama 0.0024 olarak tespit etmiştir. D'Amato ve Carvalho (2005) mezgit türünde

(*Macruronus magellenicus*) ND 5/6 genleri için nükleotid çeşitlilik değerini ise 0.0104 olarak belirlemiştir.

Mamuris ve ark. (2001) Barbun türlerinde (*Mullus surmuletus*, *Mullus barbatus*) Kontrol bölgesi (D-loop), COI ve 12s-16s rRNA genlerinde nükleotid çeşitlilik değerlerini türler içerisinde 0.01880 ile 0.00460 arasında tespit etmişlerdir. Papatotiroopoulos ve ark. (2002) kefal türlerinde 12s rRNA, 16s rRNA, COI genleriyle nükleotid çeşitlilik değerini ortalama 0.00809 olarak bulduklarını rapor etmiştir. Karaïskou ve ark., (2003) sitokrom b ve 16s rRNA genleri ile istavrit türlerinde bu nükleotid çeşitlilik değerinin en düşük 0.00475 en yüksek 0.00556 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Alexandrino ve ark., (2006) mtDNA'nın sitokrom b gen bölgesi için *A. fallax* ve *A. alosa* türleri içerisinde nükleotid çeşitlilik değerlerini 0.0045 ile 0.0009 olarak bildirmişlerdir.

Bu çalışma ve diğer bölgelerdeki denizlerde yapılan çalışmalardan da görüldüğü gibi türler içerisindeki bireylerde nükleotid çeşitlilik yönünden farklılıklar olduğu görülmektedir. Türler içerisinde nükleotid çeşitliliği yönünden farklılıklar görülmesinde; çevre koşulları, yaşadıkları ortam, üreme davranışları oldukça önemli olmaktadır.

Deniz balıkları, coğrafik olarak geniş alanlarda dağılım göstermelerine rağmen, fiziksel engellerin bulunmaması nedeniyle, popülasyonlar arası yoğun gen akışına maruz kalırlar. Bu nedenle, deniz balıklarında tür içi genetik farklılaşmaya daha az rastlanılmaktadır (Ward ve ark., 1994).

Daha önceki yıllarda ND genleriyle clupeid türleri (Turan ve ark., 1998; Shaw ve ark., 1999; Hauser ve ark., 2001) ve diğer deniz balıkları (Gharret ve ark., 2001; D'Amato ve Carvalho, 2005) ile yapılan çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında tirsî türleri içerisinde nükleotid çeşitlilik açısından bildirilen sonuçlara yakın sonuçların bulunduğu görülmektedir.

Bu çalışmada bulunan değerler, daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından farklı gen bölgeleri itibarıyla (Papatotiroopoulos ve ark. 2002; Karaïskou ve ark., 2003) diğer türlerde bulunan değerlerle karşılaştırıldığında, bildirilen bu değerlere göre yakın olduğu görülmektedir.

ND 5/6 genleriyle elde edilen türler arasındaki nükleotid çeşitlilik değerlerine göre, en yüksek değer *A. pontica* ve *A. caspia* (0.012762) için bulunurken; en düşük değer ise *A. pontica* ve *A. fallax nilotica* (0.003988) arasında gözlenmiştir. *A. maeotica* ve *A. pontica* (0.006597) türleri arasında da nükleotid çeşitlilik yönünden düşük bir değer gözlemlenmiştir. Ortalama nükleotid çeşitlilik değeri ise 0.008024 ( $\pm 0.0000006$ ) olarak bulunmuştur. Çizelge 4.9'da ND 5/6 genleriyle elde edilen türler arasındaki nükleotid çeşitlilik değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.9. MtDNA ND 5/6 Genleriyle Türler Arasındaki Nükleotid Çeşitlilik Değerleri (Nei,1987)

Türler	<i>A.pontica</i>	<i>A.tanaica</i>	<i>A.f.nilotica</i>	<i>A.maeotica</i>	<i>A.caspia</i>
<i>A.pontica</i>	—				
<i>A.tanaica</i>	0.006621	—			
<i>A.f.nilotica</i>	0.003988	0.006703	—		
<i>A.maeotica</i>	0.006597	0.007098	0.006813	—	
<i>A.caspia</i>	0.012762	0.009648	0.010497	0.009515	—

Smith ve Fujio (1982), kemikli deniz balıklarını, habitat özellikleri ve her grup içerisindeki genetik çeşitliliğe dayanarak sınıflandırma yapmışlardır. Buna göre Clupiformes ordosuna ait 6 türde, gözlenen heterozigotluk değerlerinin en yüksek 0.0058 (*Clupea pallasii*) ile en düşük 0.0016 (*Clupea harengus*) arasında değiştiği ve tüm türler arasında gözlenen ortalama değerin 0.0074 olduğunu belirtmişlerdir.

Alexandrino ve ark., (2006) yakın zamanda *A. fallax* ve *A. alosa* türleri arasında yaptıkları çalışmada nükleotid çeşitlilik değerini ortalama 0.0021 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışma elde edilen sonuçlara göre tirsi türleri arasında gözlenen ortalama nükleotid çeşitlik değerinin Smith ve Fujio (1982) tarafından belirtilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Magoulas ve ark. (1996) mtDNA'nın diğer gen bölgeleriyle (12s rRNA, 16s rRNA, sitokrom b, D loop) hamsiler üzerinde yaptıkları araştırmalarında ortalama nükleotid çeşitliliğini 0.0017 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Papatropoulos ve

ark. (2002) 12s rRNA, 16s rRNA, COI gen bölgeleri ile kefal türleri arasında yaptıkları çalışma sonunda ortalama nükleotid çeşitliliğini 0.003 olarak bulduklarını ve bu değer in oldukça düşük bir değer olduğunu belirtmişlerdir.

MtDNA'nın ND bölgesi dışında farklı bölgeleriyle ve diğer deniz balıkları ile yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere türler arasındaki nükleotid çeşitlilik değerinin oldukça düşük bulunduğu belirtilmektedir.

Nükleotid farklılık yönünden türler arasındaki değerlere bakıldığında, en yüksek değer in *A. pontica* ve *A. caspia* (0.009599) arasında olduğu, en düşük değer in ise *A. maeotica* ile *A. tanaica* (0.000007) arasında olduğu görülmektedir (Çizelge 4.10). Ortalama nükleotid farklılık ise türler arasında 0.002693 ( $\pm 0.0000008$ ) olarak hesaplanmıştır.

Bentzen ve ark. (1993), morfolojik olarak, yaşam biçimi ve yumurtlama bölgesi seçimi olarak birbirinden farklı olan *A. fallax* ve *A. alosa* türlerini mtDNA sekans analiz yöntemi ile analiz etmiş ve morfolojik olarak çok farklı görünen bu iki tür arasında yakın bir akrabalık ilişkisi olduğunu tespit etmiştir. Bu iki tür arasındaki mtDNA sekans farklılığını ise 0.065 olarak belirlemişlerdir.

Çizelge 4.10. MtDNA ND 5/6 Genleriyle Türler Arasındaki Nükleotid Farklılık Değerleri (Nei, 1987)

Türler	<i>A.pontica</i>	<i>A.tanaica</i>	<i>A.f.nilotica</i>	<i>A.maeotica</i>	<i>A.caspia</i>
<i>A.pontica</i>	—				
<i>A.tanaica</i>	0.003094	—			
<i>A.f.nilotica</i>	0.004261	0.000481	—		
<i>A.maeotica</i>	0.002652	0.000007	0.000204	—	
<i>A.caspia</i>	0.009599	0.003339	0.000915	0.002788	—



Faria ve ark. (2006) ND 1 ve sitokrom b genleriyle sekiz tirsü türü ile yaptıkları mtDNA sekans analizi çalışmalarında, *Alosa* ve *Pomolobus* cinsine ait türler arasındaki genetik karışım oranını 0.056 olarak bulmuşlardır. Ayrıca *A. caspia* ve *A. pontica* arasındaki genetik uzaklığı ise yüksek (0.008 den daha fazla) olarak saptamışlardır. Türlerde görülen yüksek genetik farklılığı *A. caspia*'nın genellikle Hazar denizi ve çevresinde (Ponto-Caspian) bulunmasına, *A. pontica*'nın ise genelde Karadeniz'de yaygın bulunmasına bağlamış ve bu iki türün neslinin tam olarak karışmadığını ifade etmiştir. Ayrıca Karadeniz ve Hazar denizi'ndeki *Alosa* popülasyonlarında hızlı bir şekilde genetik çeşitliliğin ortaya çıktığını ve bu türlerin çok sayıda alt tür düzeyinde veya morfolojik olarak farklı bir şekilde tanımlanabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan çalışma da *A. caspia* türü ile *A. pontica* arasında nükleotid farklılık değeri 0.0095 olarak biraz daha yüksek bir değerde bulunmuştur. Çalışmada elde edilen değerin Faria ve ark. (2006) tarafından bulunan değerlere yakın bulunması, bu iki türün birbirinden farklı olduğu görüşünü destekler bir sonucun ortaya çıktığını göstermektedir.

*A. caspia* ve *A. pontica* türlerinin evrimsel tarihine baktığımızda bugünkü buldukları Karadeniz'in zaman zaman Aral Gölü'nü, Hazar Denizi'ni ve hatta Doğu Avrupa'nın bir kısmını içine alan, bazen tatlı su bazen acı su özelliği gösteren iç göl (Sarmatik Göl) ya da Sarmatik Deniz'i olarak adlandırılan denizden köken aldığı bilinmektedir (Demirsoy 1996). Pliosen'in ortasında Sarmatik İç Deniz'in birbirinden yalıtılmış iki havzaya ayrılması sonucunda Karadeniz Çukuru (bugünkü Karadeniz'in bulunduğu havza) ve Hazar ve Aral göllerinin (Kaspi-Aral Havza) meydana gelmesi, bu türlerin birbirlerinden ayrılarak sınırlı bir gen akışına maruz kaldıklarını işaret etmektedir. Yapılan çalışma sonucunda bu iki tür arasında yüksek oranda genetik farklılığın görülmesi bu kanıyı destekler niteliktedir.

Bagliniere (2000), tirsiler ile yaptığı çalışmasında, türler arasında görülen bu farklılığı *A. caspia* türünün uzak bir ihtimalde olsa farklı bir alt cins olarak *Caspiolasa* cinsine dahil edilebileceği şeklinde belirtmiştir. Fosil kayıtlarına göre, Sırbistan'da Miosen döneminde, Romanya, Bulgaristan ve Yunanistan'da Pliosen

döneminde *Caspiolasa nordmanni* olarak anılan türün gerçekte küçük sinoniminin *A. caspia* olduğu ifade edilmektedir.

Svetovidov (1964), türlerin morfolojilerini göz önüne alarak, yaptığı sınıflandırmasında ise *Caspiolasa*'nın farklı bir alt cins olarak geçerli olmadığını ifade etmiştir. Bobori ve ark. (2001) Karadeniz-Hazar türlerinin farklı bir biyocoğrafik bölgede meydana geldiğini ve *A. caspia*'nın diğer türlerden morfolojik olarak farklı olduğunu belirtmiştir.

MtDNA'nın farklı bölgeleriyle deniz balıkları ile yapılan benzer çalışmalarda, türler arasındaki nükleotid farklılık değerleri şu şekilde bulunmuştur. Gharret ve ark., (2001) kayabalıkları türleri (*Sebastes* spp.) ile ND 3/4 ve 12s/16s rRNA gen bölgeleriyle yaptıkları çalışmalarında türler arasındaki nükleotid farklılık değerini ortalama 0.0249 olarak tespit etmişlerdir.

Mamuris ve ark. (2001) barbun türleri *M. surmuletus* ve *M. barbatus* arasındaki nükleotid uzaklığı COI ve 12s-16s rRNA gen bölgeleri için 0.020-0.008 olarak bulduklarını rapor etmişlerdir.

Papasotiropoulos ve ark. (2002) kefal türleri arasında 12s rRNA geni ile yaptıkları çalışmada nükleotid farklılık değerlerini türler arasında 0.0032-0.015 olarak belirtmişlerdir.

Karaiskou ve ark. (2003) istavrit türleri ile sitokrom b geni ile yaptıkları çalışmada ise türler arasındaki nükleotid farklılığı en düşük 0.0213, en yüksek 0.0525 olarak saptamıştır.

Poulin ve ark. (2004) mtDNA'nın D-loop tanınma bölgesinde Şili ve Kaliforniyada'ki istavrit türleri ile yaptıkları çalışmalarında türler arasındaki nükleotid farklılık değerini en düşük 0.017 en yüksek 0.024 olarak tespit etmişlerdir. Grant ve ark. (2005) Yeni dünya ve eski dünya olarak niteledikleri hamsi türleri arasındaki farklılığı sitokrom b geni ile araştırarak nükleotid farklılık değerini 0.015 olarak bildirmişlerdir.

Çalışma sonucunda türler arasındaki nükleotid farklılık değerleri en düşük 0.000007, en yüksek 0.009599 olarak bulunmuştur. Billington ve Hebert, (1991) deniz balıkları için nükleotid farklılık değerlerini en düşük 0.0031 ve en yüksek 0.0133 arasında belirtmiştir. Turan, (1997) ND 3/4 genleri ile tirsi türleri ile yakın

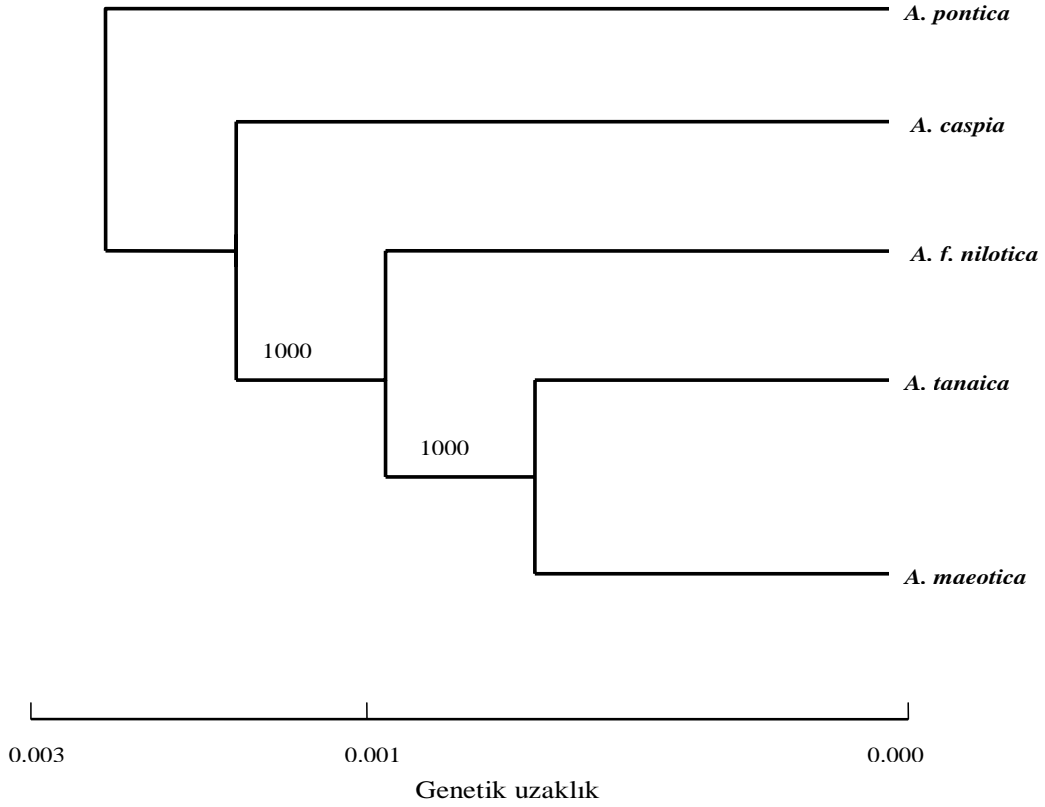
akrabalık gösteren Atlantik (*Clupea harengus*) ve Pasifik (*Clupea pallasii*) ringa türleri için yapılan benzer RFLP çalışmasında nükleotid farklılık değerlerini en düşük 0.000013 en yüksek 0.018318 olarak, ND 5/6 genleri için ise bu değerleri 0.00009 ile 0.034862 arasında saptamıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulguların diğer deniz balıkları ile yapılan çalışmaların sonuçlarına göre değerlendirmesi sonucu, türler arasında saptanan nükleotid farklılık değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Nükleotid farklılık değerinin düşük bulunmasında belki incelenen tür sayısının az olmasından ya da örnekleme alanının daha geniş bir alanda olmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Türler arasındaki moleküler sistematik ilişkiyi gösteren UPGMA soy ağacına göre, *A. maeotica* ve *A. tanaica* türleri birbirine en yakın tür olarak görülmektedir. *A. fallax nilotica* da bu iki türe en yakın tür olarak görülmektedir. *A. caspia*'nın ise *A. fallax nilotica* türüne *A. tanaica* ve *A. maeotica*'ya oranla genetik olarak daha yakın olduğu görülmektedir. UPGMA soy ağacına göre *A. pontica* türünün diğer türlere göre genetik olarak en uzak olduğu göze çarpmaktadır. Türler arasındaki ilişkiyi gösteren UPGMA soy ağacı ve genetik mesafe değerleri Şekil 4.7'de verilmiştir.

Ayrıca soy ağacında ülkemizde alt tür olarak bilinen Atlantik kökenli *A. fallax nilotica*'nın da tür düzeyinde tanımlanan *A. maeotica* ve *A. tanaica*'ya yakın olduğu ve dolayısıyla alt tür seviyesinde değil de tür seviyesinde kabul edilebileceği görülmektedir.

Bentzen (1993), Kuzey Amerika ve Avrupa türleri üzerine yaptığı araştırmasında *A. fallax* ve *A. alosa* arasında genetik olarak yakınlık görmüş ve bu iki tür arasında bir karışımın olduğunu belirtmiştir.



Şekil 4.7. Türler Arasındaki (*A. maeotica*, *A. tanaica*, *A. fallax nilotica*, *A. caspia* ve *A. pontica*) Genetik Uzaklığın UPGMA Soy Ağacı İle Gösterimi. Soy ağacındaki belirtilen değerler % 100 olarak genetik uzaklığı desteklemektedir (Nei ve Tajima, 1981).

Faria ve ark. (2006), Karadeniz türü olan *A. pontica*'nın (sinonim; *A. immaculata*) Akdeniz ve Atlantik'te dağılım gösteren *A. fallax nilotica* türünden genetik olarak daha uzak olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da *A. pontica* ve *A. fallax nilotica* türlerinin birbirlerinden genetik olarak daha uzak oldukları görülmüştür.

Tirsi türleri ile yapılan bu genetik çalışmada PCR-RFLP tekniği ile elde edilen sonuçların diğer *alosa* cinsi türler ve deniz balıklarının benzer sonuçlarıyla değerlendirilmesi sonucunda, tirsi türlerinin hem morfolojik hem de genetik olarak birbirinden farklı olduğu ve alt tür olarak bilinen *A. fallax nilotica*'nın da tür düzeyinde tanımlanabileceği kanısına varılmıştır.

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

• Bu çalışmada, Türkiye denizlerinde yaşamlarını sürdüren tirsi türlerinin (*A. caspia*, *A. fallax nilotica*, *A. maeotica*, *A. pontica* ve *A. tanaica*) genetik yapıları ve türler arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

• Avcılığın yoğun olarak yapıldığı Karadeniz bölgesinden Şile, Marmara bölgesinden İstanbul (Adalar), Akdeniz bölgesinin doğu havzası olan İskenderun körfezi (Samandağ) kıyılarından olmak üzere ülkemizde mevcut bulunan beş tirsi türüne ait temsili 20'şer adet olmak üzere toplam 100 adet örnek genetik açıdan incelenmiştir.

• Çalışmada incelenen *A. pontica* örnekleri Marmara denizi'nden temin edilmiştir. Yapılan araştırmaya göre, bu türün ilk kez Marmara denizi'nde son yıllarda bulunduğu bildirilmektedir (Eryılmaz, 2001).

• Türlerin ayırımında meristik verilerden yararlanılmıştır. Bunun için örneklerin yanal çizgi pul sayıları, solungaç diken sayısı, karina pulları ve omur sayılarından yararlanılmış ve türlerin tayininde ve tür ayırımında solungaç diken sayılarının oldukça önemli olduğu görülmüştür.

• Denizlerimizin farklı bölgelerinden elde edilen bu örnekler son yıllarda yaygın olarak kullanılan ve daha güvenilir sonuçlar veren PCR-RFLP teknikleri kullanılarak ND 5/6 genleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

• Yapılan çalışma sonucunda *A. caspia*, *A. maeotica*, *A. fallax nilotica*, *A. pontica* ve *A. tanaica* örneklerinde ND 5/6 genleri için uygulanan 6 sınırlama enzimi sonucunda, 13 haplotip belirlenmiştir. *A. maeotica*, *A. fallax nilotica*, *A. pontica* ve *A. tanaica* örneklerinde haplotip bakımından çeşitlilik gözlenirken; *A. caspia* örneklerinde haplotip yönünden bir çeşitlilik görülmemiştir.

• Çalışma sonucunda elde edilen sonuçların değerlendirilmesine göre, tüm türlerin birbirlerinden genetik benzerlik yönünden tür olarak kabul edilecek düzeyde uzak oldukları belirlenmiştir.

• Genetik mesafe bakımından birbirlerine en yakın tür olarak *A. tanaica* ve *A. maeotica* bulunurken; bu türlere en uzak türün *A. pontica* olduğu, ayrıca alt tür olarak bilinen *A. fallax nilotica*'nın da tür düzeyinde kabul edilebileceği görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar ışığında mtDNA'nın ND 5/6 bölgesinin PCR-RFLP tekniği ile araştırılması sonucunda tirsi türleri arasındaki genetik ilişkinin şekli ve derecesi ortaya çıkarılmıştır.

PCR-RFLP tekniği ile elde edilen moleküler analiz sonuçlarının Svetovidov (1964) tarafından oluşturulan morfolojik sınıflandırmayı destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

Diğer denizlerde bulunan tirsi türlerinin de analiz edilmesi, farklı genlerin incelenmesi, bize bu türler hakkında daha ayrıntılı bilgi verecektir. Ayrıca mtDNA'nın yanında nükleer DNA'nın da çalışılması bundan sonra yapılacak çalışmalar arasındadır.

## KAYNAKLAR

- AKŞIRAY, F., 1954. Türkiye Deniz Balıkları Tayin Anahtarı İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü Yayınları Sayı 1, İstanbul, 277 s.
- AKŞIRAY, F., 1987. Türkiye Deniz Balıkları ve Tayin Anahtarı İ.Ü Rektörlüğü Yayınları. 2. Baskı. No: 3490, İstanbul, 811 s.
- ALLENDORF, F.W., RYMAN, N., and UTTER, F. 1987. Genetics and Fishery Management: Past, Present and Future in Pop. Gen. Fish. Man. (Ryman N. and Utter F., eds.), University of Washington Press, Seattle and London, 1-20.
- ALEXANDRINO, P.J., SOUSA, C., PEREIRA, A., and FERRAND, N., 1993. Genetic Polymorphism of Adenosine deaminase (ADA; E.C. 3.5.4.4.) in Allis shad, *Alosa alosa*, and twaite shad, *Alosa fallax*. Journal of Fish Biology. 43(6): 951–953.
- ALEXANDRINO, P.J., 1996. Genetic and Morphological Differentiation among some Portuguese populations of allis *Alosa alosa* (L. 1758) and twaite shad *Alosa fallax* (Lacepede, 1803). Publication Especiala Institute Espana Oceanography 21: 15-24.
- ALEXANDRINO, P.J., FERRAND, N., and ROCHA, J. 1996. Genetic Polymorphism of a Haemoglobin Chain and Adenosine Deaminase in European Shads: Evidence for the Existence of Two Distinct Genetic Entities with Natural Hybridization. Journal of Fish Biology. 48: 447–456.
- ALEXANDRINO, P., CASTRO, F., and LINHARES, D., 2000. Species Differentiation, Population Structure and Hybridisation In Allis Shad (*Alosa Alosa*) and Twaite Shad (*Alosa fallax*): A genetic Analysis Based on Protein loci. First International conference European Shads, Bourdeaux, France, 22–25 May 2000.

- ALEXANDRINO, P., FARIA, R., LINHARES, D., CASTRO, F., LE CORRE, M., SABATIE, R., BAGLINIERE, J.L. and WEISS, S., 2006. Interspecific Differentiation and Intraspecific Substructure in Two Closely Related Clupeids with Extensive Hybridization, *Alosa alosa* and *Alosa fallax*. *Journal of Fish Biology*, 69: 242-259.
- AVISE, J. C. and LANSMAN, R.A., 1983. Polymorphism of MtDNA in Populations of Higher Animals. *Evolution of Genes and Proteins* M. Nei and R.K. Koeh, Sinauer, Sunderland, MA, 147-164.
- AVISE, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, USA, 511.
- AVŞAR, D., 1994. A Stock Differentiation Study of the Sprat (*Sprattus sprattus phalericus* Risso) off the Southern Coast of the Black Sea. *Fisheries Research*, 19: 363-378.
- BAGLINIERE, J.L., 2000. Le genre *Alosa* sp. In: Bagliniere, J.L., Elie, P.(Eds.), *Les aloses Alosa alosa et Alosa fallax spp.* Inra-Cemagref, Paris, pp.1-30.
- BARDAKÇI F. 2006. DEGERLI, N., OZDEMIR O., and BASIBUYUK, H.H., Phylogeography of the Turkish brown trout *Salmo trutta* L.: mitochondrial DNA PCR-RFLP Variation. *Journal of Fish Biology*, 68 (Supp., A): 36–55.
- BARDAKÇI F. ve KARATAŞ, M., 2005. Moleküler Belirteçler ve Sistematiğe Kullanım Alanları. [In: Ed: Karataş, M.] Bölüm 15, 425-434.
- BEMBO, D.G., CARVALHO, G.R., SNOW, M., CINGOLANI, N., and PITCHER, T.J., 1995. Stock Discrimination Among European Anchovies, *Engraulis encrasicolus*, by means of PCR-Amplified Mitochondrial DNA analysis. *Fisheries Bulletin*, 94: 31-40.
- BEMBO, D.G., CARVALHO, G.R., CINGOLANI, N., ARNERI, E., GLANETTI, G., and PITCHER, T.J., 1996. Allozymic and Morphometrics Evidence for Two Stock of the European Anchovies, *Engraulis encrasicolus* in Adriatic Waters, *Marine Biology*, 126: 529 p.
- BENTZEN, P., LEGGET, W.C., and BROWN, G.G., 1988. Length and Restriction Site Heteroplasmy in the Mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics*, 118: 509-518.



- BENTZEN, P., BROWN, G.C., and LEGGETT, W.C., 1989. Mitochondrial DNA Polymorphism, Population Structure, and Life History Variation in American shad (*Alosa sapidissima*). Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 46 (8): 1446-1454.
- BENTZEN, P, HARRIS, A., and WRIGHT, J.M., 1991. Cloning of Hypervariable Minisatellite and Simple Sequence Microsatellite Repeats for DNA Fingerprinting of Important Aquacultural Species. In DNA Fingerprinting: Approaches and Applications (Burke T., Dolf G.A., Jeffreys A.J. and Wolf R. eds.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 243-262.
- BENTZEN, P., LEGGETT, W.C., and BROWN, G.C., 1993. Genetic Relationships Among the Shads (*Alosa*) Revealed by Mitochondrial DNA Analysis. Journal of Fish Biology. 43(6): 909–917.
- BERG, L.S., 1948-1949. Freshwater Fishes of the U.S.S.R. and Adjacent Countries. Guide to the Fauna of the U.S.S.R.. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem (1962), 1368 p.
- BERMINGHAM, E., MCCAFFERTY, S.S., and MARTIN, J.C. 1997. Fish Biogeography and Molecular clocks: Perspectives from the Panamanian Isthmus. In Molecular Systematics of Fishes (T.D. Kocher and C.A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego.
- BERMINGHAM, E., LAMB, T. And AVISE, J.C., 1986. Size Polymorphism and Heteroplasmy in The Mitochondrial DNA of Lower Vertebrates. J. Heredity, 77: 249-252.
- BERNARTCHEZ, L., GUYOMARD, R., and BONHOMME, F., 1992. DNA Sequence Variation of the Mitochondrial Control Region Among Geographically and Morphologically Remote European Brown Trout. *Salmo trutta* Populations. Molecular Ecology, 1: 161-173.
- BILLINGTON, N. and HEBERT, P.D.N., 1991. Mitochondrial DNA Diversity in Fishes and Its Implications for Introductions. Can. J. Fish Aquat. Sci., 48: 80-94.

- BIRD, L.J., EPPLER, D.T., and CHECKLY, D.M., 1986. Comparison of Herring Otoliths Using Series Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43: 1228-1234.
- BİLECENOĞLU, M., TAŞKAVAK, E., MATER. S., and KAYA M., 2002. Checklist of The Marine Fishes of Turkey. Magnolia Pres, Auckland, New Zealand. *Zootaxa*, 113: 194 p.
- BOBORI, D.C., KOUTRAKIS, E.T., and ECONOMIDIS, P.S., 2001. Shad Species in Greek Waters-an Historical Overview and Present Status. *Bull. Fr.Peche Piscic.* 362/363: 1101-1108.
- BOISNEAU, P., MENNESSON-BOISNEAU, C., and GUYOMARD, R., 1992. Electrophoretic Identity Between Allis Shad *Alosa alosa* (L.) and Twaite Shad *A. fallax* (Lacepede). *Journal of Fish Biology*, 40: 731-738.
- BOOKSTEIN, F.L., 1982. Foundation of Morphometrics, *Ann. Rev. Ecol. Syst*, 13: 451-470.
- BOWEN, B.W. and AVISE, J.C. 1990. Genetics Structure of Atlantic and Gulf of Mexico Populations of Seabass, Menhaden and Sturgeon: Influence of Zoo Geographic Factors and Life History Patterns. *Marine Biology*, 107: 371-381.
- CARR, S.M. and MARSHALL, H.D., 1991. A Direct Approach to the Measurement of Genetic-Variation in Fish Populations - Applications of the Polymerase Chain-Reaction to Studies of Atlantic Cod, *Godus morhua* L. *J. Fish Biol.*, 39: 101-107.
- CARVALHO, G.R. BEMBO, D.G., CARONE, A., GIESBRECHT, G., CINGOLANI, N., and PITCHER, T.J., 1994. Stock Discrimination in Relation to the Assessment of Adriatic Anchovy and Sardine Fisheries. Final Project Report to the Commission of the European Community, EC XIV-1/MED/91001/A.
- CASSELMAN, J.M., COLLINS, J.J., CROSSMAN, P.E., IHSEN, P.E, and SPANGLER, G.R., 1981. Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) Stock of the Ontario Waters of Lake Huron. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 1775-1789.

- CASTRO, F., LINHARES, D., and ALEXANDRINO, P., 1999. Acid Phosphate Polymorphism in European Shad (Fish: Clupeids). *Biochemical Genetics*, 37: 718.
- CASTRO, F., ALEXANDRINO, P., 2000. Mitochondrial DNA Variation in European Shad: Preliminary Data Based on Cytochrome b Sequences. First International Conference European Shads, Bourdeaux, France, 22–25 May 2000.
- CHAPMAN, R.W., PATTON, J.C., and ELEBY, B. 1994. Comparison of Mitochondrial DNA Variation in Four Alosid Species as Revealed by the Total Genome, the NADH Dehydrogenase I and Cytochrome b Regions. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (A.R. Beaumont, ed.). Chapman & Hall, London, pp. 249-262.
- COAD, B.W., HUSSAIN, N.A., ALÌ, T.S., and LIMBURG, K.E., 2003. Middle Eastern shads. *American Fisheries Society Symposium*, 35: 59-67.
- CORTI, M., THORPE, R.S., SOLA, L., SBORDONI, V., and CATAUDELLA, S., 1988. Multivariate Morphometrics in Aquaculture: a Case Study of Six Stocks of the Common Carp (*Cyprinus carpio*) from Italy, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 1548-1554.
- CRONIN, M.A., SPEARMAN, W.J., WILMOT, R.L., PATTO, J.C., and BICKHAM, J.W., 1993. Mitochondrial DNA Variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Chum salmon (*O.keta*) Detected by Restriction Enzyme Analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 708-715.
- D'AMATO, M.E. and CARVALHO, G.R., 2005. Population Genetic Structure and History of the Long-tailed Hake, *Macruronus magellenicus*, in the SW Atlantic as Revealed by MtDNA RFLP Analysis. *ICES Journal of Marine Science*, 62: 247-255.
- DEMİRSOY, A., 1996. Genel ve Türkiye Zoocoğrafyası (Hayvan Zoocoğrafyası). Meteksan yayınları, Ankara, 630 s.
- DEMİRSOY, A., 1998. Yaşamın Temel Kuralları. Cilt 3, Kısım 1, Ankara, 684 s.

- DESJARDINS, P. and MORAIS, R., 1990. Sequence and Gene Organization of Chicken Mitochondrial Genome. *J. Mol. Biol.*, 212: 599-634.
- ECONOMIDIS, P.S and SINIS, A.I., 1986. Situation taxonomique et comparaison des Aloses (Pisces, Clupeidae) provenant des lacs Volvi et Vistonis (Grece), Description d'une nouvelle sous-espece: *Alosa caspai vistonica*, *J. Nat. Hist.* 20: 723-734.
- ECONOMIDIS, P.S., 2001. Shad Species in Greek Waters-An Historical Overview and Present Status. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 362-363: 1101-1108.
- ERAZI, R.A.R., 1942. Marine Fishes Found in the Sea of Marmara and in the Bosphorus. *Revue dela Faculte des Sciences de L'universite D'Istanbul*, 7(1/2), 103-114.
- ERYILMAZ, L.S., 2001. A Study on the Bony Fishes Caught in the South of The Sea of Marmara by Bottom Trawling and Their Morphologies. *Turk. J. Zool.*, 25: 323-342.
- FARIA, R., WALLNER, B., WEISS. S., and ALEXANDRINO P., 2004. Isolation and Characterization of Eight Dinucleotide Microsatellite Loci from Two Closely Related Clupeid Species (*Alosa alosa* and *A. fallax*). *Molecular Ecology*, 4 (4): 586.
- FARIA R. WEISS S. and ALEXANDRINO, P., 2006, A Molecular Phylogenetic Perspective on the Evolutionary History of *Alosa spp.* (Clupeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 298-304.
- FELSENSTEIN, J., 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6a3. Distributed By the Author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- FRIEDLAND, K.D. and REDDIN, D.G., 1994. Use of Otolith Morphology in Stock Discrimination of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 91-98.
- GELDİAY, R. ve BALIK, S., 1996. Türkiye Tatl Su Balıkları, Ege Üniversitesi. Basımevi, İzmir, 520 s.

- GHARRETT, A.J., GRAY, A.K., and HEIFETZ, J., 2001. Identification of Rockfish by Restriction site Analysis of the Mitochondrial ND-3/ND-4 and 12S/16S rRNA Gene Regions -*Sebastes* spp- Statistical data included. *Fishery Bulletin*, 99(1): 49-62.
- GRANT, W. S., LESLIE, R. W., and B. W. BOWEN, 2005. Molecular Genetic Assessment of Bipolarity in the Anchovy Genus *Engraulis*. *Journal of Fish Biology*, 67: 1242–1265.
- GRAYBEAL, A., 1993. The Phylogenetic Utility of Cytochrome b: Lessons from Bufonid Frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2: 256-269.
- HADDON, M. and WILLIS, T.J., 1995. Morphometric and Meristic Comparison of Orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*, Trachichthidae) from the Puysegur Bank and Lord-Howe-Rise, New Zealand, and Its Implications for Stock Structure, *Marine Biology*, 123: 19-27.
- HADORN, E., WEHNER, R., 1974. *Allgemeine Zoologie*. Georg Thime Verlg. Stuttgart, 533 p.
- HALL, H.J., 1992. The Genetics of Brown Trout (*Salmo trutta*) Populations in Wales. PhD Thesis, University of Wales.
- HALL, H.J. and NAWROCKI, L.W., 1995. A Rapid Method for Detecting Mitochondrial DNA Variation in the Brown Trout, *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, 46: 360-364.
- HANSEN, M.M. and LOESCHCKE, V., 1996. Genetic Differentiation Among Danish Brown Trout Populations, as Detected by RFLP Analysis of PCR Amplified Mitochondrial DNA Segments. *Journal of Fish Biology*, 48: 422-436.
- HARRISON, R.G., 1989. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends Ecol. Evol.*, 4: 6-11.
- HAUSER, L., 1996. Genetic and Morphological Differentiation of Native and Introduced Populations of the Lake Tanganyika Sardine, *Limnothrissa miodon*. Ph.D. Dissertation. University of Wales, Swansea, Wales, 243 p.

- HAUSER, L., TURAN, C., and CARVALHO, G.R., 2001. Haplotype Frequency Distribution and Discriminatory Power of Two mtDNA Fragments in a Marine Pelagic Teleost (Atlantic herring, *Clupea harengus*). *Heredity*, 87: 1–10.
- HYNES, R.A., FERGUSON, A., and MCCANN, M.A., 1996. Variation in Mitochondrial DNA and Postglacial Colonisation of North-Western Europe By Brown Trout. *Journal of Fish Biology*, 48: 54-67.
- IHSSEN, P.E, BOOKE, H.E., CASSELMAN, J.M., MCGLADE, J.M., PAYNE, N.R. and UTTER., F.M., 1981. Stock Identification: Materials and Methods. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Science*, 38: 1838-1855.
- JEFFREYS, A. J., MACLEOD, A., TAMAKI, K., NEIL, D. L. and MONCKTON, D.G., 1991. Minisatellite Repeat Coding as a Digital Approach to DNA Typing. *Nature*, 354. p
- KARAIKOU, N., APOSTOLIDIS, A.P., TRIANTAFYLLIDIS, A., KOUVATSI, A., and TRIANTAPHYLLIDIS, C., 2003. Genetic Identification and Phylogeny of Three Species of the Genus *Trachurus* Based on Mitochondrial DNA Analysis. *Marine Biotechnology*, 5: 493-504.
- KILIA-KLOSSA, E., PRASSA, M., PAPASOTIROPOULOS, V., ALAHOTIS, S., KILIAS, G., 2002. Mitochondrial DNA Diversity in *Atherina boyeri* Populations as Determined by RFLP Analysis of three mtDNA Segments. *Heredity*, 89: 363-370.
- KOCATAŞ, A., 2003. Ekoloji ve Çevre Biyolojisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları, No: 51, Bornova, İzmir, 597 s.
- KOSSWIG, C. and BATTALGİL, F., 1943. Beitrage zur Turkischen Faunengeschichte I. Süßwasserfische. C.R. Soc. Turque Sci. Phys., İstanbul Band 8, 32-63 p.
- KURU, M., 1980, Türkiye Tatlısu Balıkları Kataloğu. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ankara, 73 s.
- KURU, M., 1999. Omurgalı Hayvanlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 702 s.
- KURU, M., 2004. Recent Systematic Status of Inland Water Fishes of Turkey. G.Ü, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 24 (3): 1–21.

- KÜHN, A., 1964. Grundriss der allgemeinen Zoologie. Georg Thieme Verlag, 15. Aufl., Stuttgart, 309 p.
- LADIGES, W., 1964. Süswasserfische der Türkei. 3. Teil., Restliche Gruppen. Mitt. Hamburg Zool. Mus. Inst. Band. 61, 203-220 p.
- LANSMAN, R.A., SHADE, R.O., SHAPIRO, J.F., and AVISE, J.C., 1981. The Use of Restriction Endonucleases to Measure Mitochondrial DNA Sequence Relatedness in Natural Populations. Techniques and Potential Applications. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 214-226.
- LE CORRE, M., LINHARES, D., CASTRO, F., ALEXANDRINO, P., SABATIE, R., and BAGLINIERE, J.L., 1998. Preliminary Data on the Genetic Characterization of Twaite Shad (*Alosa fallax rhodanensis* Roule, 1924) Population in the River Rhone. *Bull. Fr. Peche Piscic*, 350-351: 635-645.
- LE CORRE, M., SABATIE, R., and BAGLINIERE, J.L., 2000. Demographic Characteristic of *Alosa fallax rhodanensis* (Clupeidae) Populations in the French Mediterranean Area. *Cybium*, 24 (3): 119-128.
- LE CORRE, M., ALEXANDRINO, P., SABATIE, M.R., APRAHAMIAN, M.W., and BAGLINIERE, J.L. 2005. Genetic Characterisation of the Rhodian Twaite Shad, *Alosa fallax rhodanensis*. *Fisheries Management and Ecology*, 12: 275-282.
- LYDEARD, C. and ROE, K.J., 1997. The Phylogenetic Utility of the Mitochondrial Cytochrome b Gene for Inferring Relationship Among Actinopterygian Fishes. In *Molecular Systematics of Fishes* (T.D. Kocher and C.A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego.
- MAGOULAS, A. and ZOUROS, E., 1993. Restriction site Heteroplasmy in Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Indicates Incidental Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10: 319-325.
- MAGOULAS, A., TSIMENIDES, N., and ZOUROS, E., 1996. Mitochondrial DNA Phylogeny and the Reconstruction of the Population History of a Species: The Case of the European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Mol. Biol. Evol.*, 13(1): 178-190.

- MAMURIS, Z., STAMATIS, C., MOUTOU, K.A., APOSTOLIDIS, A.P. and TRIANTAPHYLIDIS, C., 2001. RFLP Analysis of Mitochondrial DNA to Evaluate Genetic Variation in Striped Red Mullet (*Mullus surmuletus* L.) and Red Mullet (*Mullus barbatus* L.) Populations. Mar. Biotechnol., 3: 264-274.
- MARR, J.C., 1957. The Problem of Defining and Recognising Subpopulations of Fishes. U.S. Fish Wild. Serv. Spec. Sci. Rep., 208: 1-6.
- MARTIN, .A.P., KESSING, B.D., and Palumbi, S.R., 1990. Accuracy of Estimating Genetic Distance Between Species from Short Sequences of Mitochondrial DNA. Molecular Biology and Evolution, 7: 485-488.
- MATER, S. ve BİLECENOĞLU, M., 1999. Türkiye Deniz Balıkları. (A. Demirsoy, Ed.), Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası, Meteksan Matbaası, Ankara, 794 s.
- MATER, S., KAYA, M., and BİLECENOĞLU, M. 2000. [Eds.]: Check-list of Marine fishes of Turkey -Part II (Classis Osteichthyes). Bornova/İzmir, 13 p.
- McKENZIE, J.A., 1973. Comperative Electrophoresis of Tissues from Blueblack Herring *Alosa aestivalis* (mitchill) and Gasparaeu, *Alosa pseudoharengus* (wilson). Comperative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 44 (1): 65-66.
- McELROY, D., MORAN, P., BERMINGHAM, E., and KORNFIELD,I., 1992. REAP: An integrated environment for the Mainpulation and Phylogenetic Analysis of Restriction Data. Journal of Heredity, 83: 157-158.
- MELVIN, G.D., DADSWELL, M.J., and MCKENZIE, J.A., 1992. Usefulness of Meristic and Morphometric characters in Discriminating Populations of American shad (*Alosa sapidissima*) (Osteichtyes: Clupeidae) Inhabiting a Marine Environmet. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 49 (2): 266-280.
- MEYER, A., 1987 Phenotypic Plasticity and Heterohrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, Cichlidae) and their Implication for Speciation in Chclid Fishes. Evolution, 41: 1357-1369.



- MEYER, A., 1993. Evolution of Mitochondrial DNA in Fishes. In Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2 (Hochaka & Mommsen, eds.), Elsevier Science Publishers, 1-38.
- MEZHHERIN, S.V. and FEDORENKO, L.V. 2005a. Genetic Structure of the Spawning Population of Danube shad, *Alosa pontica*, Eichwaldt 1838 (Clupeiformes, Alosiinae). *Tsitologiya i Genetika*, 39 (5): 35-40.
- MEZHHERIN, S.V. and FEDORENKO, L.V. 2005b. Genetic Variation of Azov Black Sea Herring *Alosa pontica* (Eichwald, 1838), (Clupeiformes, Alosinae) in Danube River: Analysis of Biochemical Gene Markers. *Tsitologiya i Genetika*, 39 (2): 42-48.
- MORITZ, C., DOWLING, T.E. and BROWN, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292.
- MORITZ, C., 1991. Evolutionary dynamics of mitochondrial DNA duplications in parthenogenetic geckos, *Heteronotia binoei*. *Genetics*, 129: 221-230.
- MULLIS and FALOONA, F., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- NAVODARU, I. and WALDMAN, J.R., 2003. Shads of Eastearn Europe from the Black Sea: Review of Species and Fisheries. *American Fisheries Society Symposium*, 35: 69-76.
- NEI, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Universty Pres, New York.
- NEI, M. and TAJIMA, F., 1981. DNA Polymorphism Detectable by Restriction Endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.
- NELSON, 1994. *Fishes of the World*. John Wiley and Sons Inc., New York, 600 p.
- NESBO, C.L., RUENESS, E.K., IVERSEN, S.A., SKAGEN, D.W., and JAKOBSEN, K.S., 2000. Phylogeography and Population History of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.): A Genealogical Approach Reveals Genetic Structuring Among the Eastearn Atlantic Stocks. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 281-292.

- NOLAN, K., GROSSFIELD, J., and WIRGIN, I., 1991. Discrimination Among Atlantic Coast Populations of American shad (*Alosa-Sapidissima*) Using Mitochondrial-DNA. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 48 (9): 1724–1734.
- O'MAOILEIDIGH, N., CAWDREY, S., BRACKEN, J.J., and FERGUSON, A., 1988. Morphometric, Meristic Character and Electrophoretic Analyses of Two Irish Populations of Twaite Shad, *Alosa fallax* Lacepede. *Journal of Fish Biology*, 32: 355-366.
- OLNEY, J.E., 2003. Incorrect Use of The Names “Alosidae” and “Alosid” When Referring to the Shads in the Subfamily Alosinae (Teleostei, Clupeidae). *American Fisheries Society Symposium*, 35: 13-15.
- PAPASOTIROPOULOS, V., KLOSSA-KILLA, E., KILIAS, G., and ALAHOTIS, S., 2002. Genetic Divergence and Phylogenetic Relationships in Grey Mulletts (Teleostei: Mugilidae) Based on PCR-RFLP Analysis of mtDNA Segment. *Biochemical Genetics*, 3/4: 71-86.
- POULIN, E. CARDENAS, L., HERNANDEZ, C. E., KORNFELD, I., and OJEDA, F. P. 2004. Resolution of the Taxonomic Status of Chilean and Californian Jack Mackerels Using Mitochondrial DNA Sequence. *Journal of Fish Biology*, 65, 1160–1164.
- PRAVOTOROV, B.T., 2000. On Population Structure of the Black Sea-Azov Sea Fish *Alosa caspia tanaica* (Grimm), (Clupeidae). *Hydrobiological Journal*, 36 (1): 101-105.
- ROYLE, N. J., CLARKSON, R. E., WONG, Z., and JEFFREYS, A. J., 1988. Clustering of Hypervariable Minisatellites in the Proterminal Region of Human Autosomes. *Genomics*, 3: 352-360.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D.H., STOFFEL, SCHARF, S.J. and BEDDINGTON, J.R., 1988. Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Second ed. Cold Spring Harbor Press, New York.

- SAMSUN, O., 1995. Orta Karadeniz’de Avlanan Tirsi (*Alosa pontica* Eichw. 1838) Balığının Boy–Ağırlık İlişkisi. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi, Cilt 12, No:1-2, 15-20.
- SHAW., P.W, TURAN, C., WRIGHT, J.M., O’CONNELL, M., and CARVALHO, G.R. 1999. Microsatellite DNA Analysis of Population Structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with Direct Comparison to Allozyme and mtDNA RFLP Analyses. Heredity, 490-499.
- SHEPHERD, G., 1991. Meristic and Morphometric Variation in Black Sea Bass North Cape Hatteras, North Carolina, American Journal Fisheries Management, 11: 139-149.
- SICK, K., 1961. Haemoglobin Polymorphism in Fishes. Nature, London. 192: 894-896.
- SLASTENENKO, E., 1956. Karadeniz Havzası Balıkları [Fishes of Black Sea Basin]. Et ve Balık Kurumu Yayınları, İstanbul, 711 s.
- SMITH, P.J. and FUJIO, Y., 1982. Genetic Variation in Marine Teleosts: High Variability in Habitat Specialists and Low Variability in Habitat Generalists, Marine Biology, 69: 7-20.
- STEARNS, S.C., 1983. A Natural Experiment in Life-History Evolution: Field Data on the Introduction of Mosquitofish (*Gambusia affinis*) to Hawaii. Evolution, 37: 601-617.
- SVETOVIDOV, A.N., 1963. Clupeidae, Fauna of the U.S.S.R., Fishes. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 2(1), 428 pp.
- SVETOVIDOV, A.N., 1964. Systematics of North America Anadromous Clupeoid Fishes of The Genera *Alosa*, *Caspiolasa* and *Pomolobus*. Copeia, 196: 118-130.
- SWOFFORD, D.L., 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods). Version 4.0b10. Sinaeur Associates Press, Sunderland, M.A.

- TRINGALI, M.D. and WILSON, R.R., 1993. Differences in Haplotype Frequencies of mtDNA of the Spanish Sardine *Sardinella aurita* Between Specimens From the Eastern Gulf of Mexico and Southern Brazil. *Fishery Bulletin*, 91: 362-370.
- TURAN, C., 1997. Population Structure of Atlantic herring, *Clupea harengus* L., in the Northeast Atlantic Using Phenotypic and Molecular Approaches, Ph.D. Thesis, University of Hull, U.K., 298 p.
- TURAN, C. CARVALHO, G. R., and MORK, J., 1998. Molecular Genetic Analysis of Atlanto-Scandian Herring (*Clupea Harengus*) Populations using Allozymes and Mitochondrial DNA Markers. *Journal of Marine Biological Association of UK*, 78: 269-283.
- TURAN, C., 2000. Stok ve Tür Tespitinde Kullanılan Moleküler Genetik Teknikler. IV. Su Ürünleri Sempozyumu, Erzurum, 151-152.
- TURAN, C. and BAŞUSTA, N., 2000. Comparison of Morphometric Characters of Twaite Shad (*Alosa fallax nilotica*, Geoffroy Saint-Hilaire, 1808) Among Three Areas in Turkish Seas. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture (Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems)*, 362/363: 1027-1035.
- TURAN, C., 2002. Genetik. Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı, Yayın No: 2, Hatay, 169 s.
- UTTER, F.M., 1991. Biochemical Genetics and Fishery Management: An Historical Perspective. *Journal of Fish Biology*, 39 (Suppl. A): 1-20.
- VERON, V., SABATIE, R., BAGLINIERE, J.L., and ALEXANDRINO, P., 2001. First Morphological, Biological and Genetic Characteristics of Shads (*Alosa alosa* and *Alosa fallax* spp.) in the River Charente (France). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 362-363: 1037-1057.
- WALLACE, D.C., 1986. Mitochondrial Genes and Diseases. *Hospital practice*, 21: 77-92.
- WARD, R.D. and GREWE, P. 1994. Appraisal of Molecular Genetic Techniques in Fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 300-325.

- WARD, R.D., WOODWARK, M., and SKIBINSKI, D.O.F., 1994. A comparison of Genetic Diversity Levels in Marine, Fresh-Water, and Anadromous Fishes. *Journal of Fish Biology*, 44: 213-232.
- WATERS, J.M., EPIFANIO, J.M., GUNTER, T., and BROWN, B.L., 2000. Homing Behaviour Facilitates Subtle Genetic Differentiation Among River Populations of *Alosa sapidissima*: Microsatellites and MtDNA. *Journal of Fish Biology*, 56: 622-636.
- WHITEHEAD, P.J.P., 1984. Clupeidae. In: P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.) *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris. Vol. 1, 510 p.
- WHITEHEAD, P.J.P., 1985. *FAO Species Catalogue. Clupeoid Fishes of the World (suborder Clupeoidei). An Annotated and Illustrated Catalogue of the Herrings, Sardines, Pilchards, Sprats, Anchovies and Wolfherrings. Part 1: Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae*. FAO Fisheries Synopsis, Rome. No,125, Vol.7, 303 p.
- WILSON, A.C., CANN, R.L., CARR, S.M., GEORGE, M., GYLLENSTEN, U. B., HELMBYCHOWSKI, K.M., HIGUCHI, R.G., PALUMBI, S.R., PRAGER, E.M., SAGE, R.D. and STONEKING, M. 1985. Mitochondrial-DNA and Two Perspectives on Evolutionary Genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375-400,
- YILMAZ, S. and POLAT, N., 2002. Age Determination of Shad (*Alosa pontica* Eichwald, 1838) Inhabiting the Black Sea. *Turk J. Zool.*, 26: 393-398.
- ZENGİN, M., GENÇ, Y., ve TABAK, I., 1998. Karadeniz'de 1990-1995 Yılları Arasında Avlanan Önemli Ticari Balık Türlerinin Av Verileri Üzerine Araştırmalar (Sonuç Raporu). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Trabzon Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü. Müdürlüğü, Trabzon, 56 s.

## ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İskenderun'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini İskenderun'da tamamladı. 1994 yılında girmiş olduğu Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünden 1999 yılında Balıkçılık Teknolojisi Mühendisi ünvanı ile mezun oldu.

2000 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Avlama Bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 2002 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalında Yüksek Lisans'ını tamamladı. 2003 yılında doktora eğitimini yapmak üzere 35. madde gereği Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümüne atandı. Halen Çukurova Üniversitesi'nde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.