

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bufo bufo* TÜR GRUBUNUN (ANURA, BUFONIDAE) KUZEY
ANADOLU BOYUNCA DAĞILIMININ MOLEKÜLER
VERİLERLE BELİRLENMESİ**

EBRU KIZILHAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NURHAYAT ÖZDEMİR

TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. BİLAL KUTRUP
DOÇ. DR. SERKAN GÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019

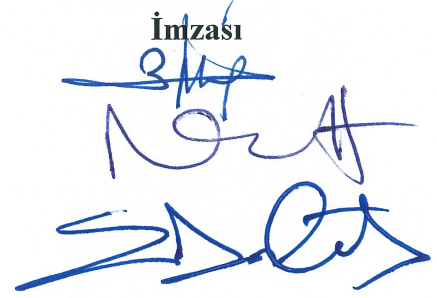
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bufo bufo* TÜR GRUBUNUN (ANURA, BUFONIDAE) KUZEY ANADOLU
BOYUNCA DAĞILIMININ MOLEKÜLER VERİLERLE BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR danışmanlığında, Ebru KIZILHAN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/05/2019 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Bilal KUTRUP
Üye	: Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR
Üye	: Doç. Dr. Serkan GÜL

İmzası



Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bufo bufo Tür Grubunun (Anura, Bufonidae) Kuzey Anadolu Boyunca Dağılımının Moleküler Verilerle Belirlenmesi başlıklı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın planlanmasında ve tez aşamasında önerilerini ve paylaşımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda her türlü yardım ve desteklerini şahsıma esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Serkan GÜL'e teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca yanımda olan ve her zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Cantekin DURSUN'a ve Özge ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, değerli aile bireylerim babam Salim KIZILHAN'a, annem Aynur KIZILHAN'a ve kardeşlerim Hakan ve Furkan KIZILHAN'a teşekkür ederim. Ayrıca hayatıma renk katan, bana her zaman inanan ve güç veren canım dostlarım Merve Şehnaz İŞYARLAR'a, Münevver CİHANGİR'e ve Seda OKUMUŞ'a tüm kalbimle teşekkürler.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi Tübitak tarafından 2015.114Z823 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ebru KIZILHAN

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Bufo bufo* Tür Grubunun (Anura, Bufonidae) Kuzey Anadolu Boyunca Dağılımının Moleküler Verilerle Belirlenmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 21/05/2019

Ebru KIZILHAN

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

***Bufo bufo* TÜR GRUBUNUN (ANURA, BUFONIDAE) KUZHEY ANADOLU BOYUNCA DAĞILIMININ MOLEKÜLER VERİLERLE BELİRLENMESİ**

Ebru KIZILHAN

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR**

Üç farklı sıcak noktanın kesişim alanı olan Anadolu coğrafyası jeolojik ve filocoğrafik geçmişiyile önemli bir türleşme merkezi görevi görmüş ve birçok farklı tür için yaşam sahası olmuştur. Anadolu coğrafyasında yayılış gösteren *Bufo bufo* tür grubuna ait türlerin (*Bufo bufo* ve *Bufo verrucosissimus*) sistematik belirsizliği günümüzde hala devam etmektedir. Literatür incelendiğinde yapılan moleküler çalışmalar arasındaki uyumsuzluklar göze çarpmaktadır. Bu tez çalışması ile varolan sistematik problemin çözümlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, Kuzey Anadolu hattı boyunca 17 ilden toplanan 51 örnekten ve GenBank'tan elde edilen mtDNA (16S ve Sitokrom b) ve nDNA (RPL3) dizileri ile haplotipler belirlenmiş ve filogenetik analizler (Maksimum Olasılık ve Bayesian Analizi) gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyal DNA dizin analizleri sonucunda Artvin örneklerinin Gürcistan'a ait örnekler ile aynı dal üzerinde yer alıp *Bufo verrucosissimus* türüne ait olduğu, diğer haplotiplerin ise ayrı bir dal üzerinde yer aldığı ve *Bufo bufo* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Nükleer DNA dizin analizlerinde ise tüm örnekler aynı dal üzerinde toplanmış ve net bir ayırım tespit edilememiştir.

2019, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bufo verrucosissimus*, Filogeni, mtDNA, Kafkasya

ABSTRACT

DISTRIBUTION RANGE OF *Bufo bufo* SPECIES GROUP (ANURA, BUFONIDAE) ALONG THE BLACK SEA COAST OF TURKEY INFERRED FROM MOLECULAR DATA

Ebru KIZILHAN

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

With the geological and phylogeographic history Anatolian geography, which is the junction point of three different biological hotspot, served as a speciation centre and home range for many different species. The systematic uncertainty of the species (*Bufo bufo* and *Bufo verrucosissimus*) belonging to *Bufo bufo* species group living in Anatolia still has been continuing. As literature is investigated, the discordance among the results of recent molecular studies is standing out. With this thesis, it is aimed to resolve the systematic problem. In this context the haplogroups were determined by using the mitochondrial DNA (16S and Cytb) and nuclear DNA (RPL3) sequences of 51 individuals from 17 provinces locating along the Black Sea Region and the sequences obtained from GenBank. Phylogenetic analyses (Maximum Likelihood and Bayesian Inference) were carried out by using these haplogroups. As a result of mitochondrial DNA sequence analyses, it was found that Artvin specimens nested in the same branch with Georgian samples belonging to *Bufo verrucosissimus* species while the rest of all haplogroups on a different branch and belonging to *Bufo bufo* species. As to nuclear DNA sequences analyses, all the samples nested in a single branch, therefore, a clear separation was not determined.

2019, 60 pages

Keywords: *Bufo verrucosissimus*, Phylogeny, mtDNA, Caucasia

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Amfibiler Hakkında Genel Bilgiler	2
1.3. Türleşme Mekanizmaları	4
1.3.1. Allopatrik Türleşme (Ayrı Yurtlu Türleşme)	4
1.3.2. Peripatrik Türleşme (Çevre Yurtlu Türleşme).....	5
1.3.3. Simpatrik Türleşme (Aynı Yurtlu Türleşme)	5
1.3.4. Parapatrik Türleşme (Komşu Yurtlu Türleşme).....	6
1.4. Moleküler Belirteçler.....	6
1.4.1. Mitokondriyal DNA	6
1.4.1.1. 16S Ribozomal RNA Geni	8
1.4.1.2. Sitokrom b Geni.....	8
1.4.2. Nükleer DNA.....	8
1.4.2.1. Ribozomal Protein L3 geni.....	9
1.5. Kafkasya'nın Jeolojik Geçmişi.....	9
1.6. Sıcak Nokta Kavramı ve Kafkasya Sıcak Noktası	14
1.7. Literatür Özeti.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Materyaller.....	21
2.1.1. <i>Bufo bufo</i>	21
2.1.2. <i>Bufo verrucosissimus</i>	23
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Örneklerin Toplandığı Alanlar ve Birey Sayıları	25

2.2.2.	Kurbağa Parmaklarından Genomik DNA'ların İzolasyonu	26
2.2.3.	mtDNA ve nDNA Genlerinin PZR Yardımı ile Çoğaltılması ve DNA Dizin Analizi.....	27
2.2.4.	DNA Dizin Analizi Sonucunda Filogenetik Ağaçların Oluşturulması	28
2.2.4.1.	MrModeltest v.2.3 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması	28
2.2.4.2.	TCS (The Method of Templeton, Crandall and Sing) ve Network Analizleri .	28
2.2.4.3.	Maksimum Olasılık Analizi.....	28
2.2.4.4.	Bayesian Analizi.....	29
2.2.4.5.	FigTree Programı.....	29
3.	BULGULAR	30
3.1.	16S rRNA Gen Dizileri ile Elde Edilen Bulgular.....	31
3.2.	Sitokrom b Gen Dizileri ile Elde Edilen Bulgular.....	34
3.3.	RPL3 Gen Dizileri ile Elde Edilen Bulgular	37
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	40
5.	ÖNERİLER	48
	KAYNAKLAR	49
	ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Mitokondriyal DNA	7
Şekil 2.	Miyosen dönemi	12
Şekil 3.	Kafkaslar ve yakın coğrafyanın fiziki haritası	13
Şekil 4.	Anadolu coğrafyası içerisindeki sıcak bölgeler	15
Şekil 5.	Kafkas sıcak bölgesi	15
Şekil 6.	<i>Bufo bufo</i>	22
Şekil 7.	<i>Bufo verrucosissimus</i>	24
Şekil 8.	Örnekleme yapılan lokaliteler	26
Şekil 9.	16S ribozomal geni için haplotip ağı	32
Şekil 10.	MrBayes ve Maksimum Olasılık analizine göre oluşan 16S geni için filogenetik ağaç	33
Şekil 11.	Sitokrom b geni için haplotip ağı	35
Şekil 12.	MrBayes ve Maksimum Olasılık analizine göre oluşan Sitokrom b geni için filogenetik ağaç	36
Şekil 13.	RPL3 geni için haplotip ağı	38
Şekil 14.	MrBayes ve Maksimum Olasılık analizine göre oluşan RPL3 geni için filogenetik ağaç	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışma alanı ve birey dağılımı.....	25
Tablo 2. Moleküler analizlerde kullanılan gen bölgeleri ve primerler	27
Tablo 3. GenBank'tan elde edilen DNA dizileri ve erişim kodları.....	30
Tablo 4. 16S ribozomal geni haplotip grupları.....	31
Tablo 5. Sitokrom b geni haplotip grupları	34
Tablo 6. RPL3 geni haplotip grupları	37



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ L	Mikro Litre
16S rRNA	16S Ribozomal RNA Geni
bç	Baz Çifti
Cyt b	Sitokrom b Geni
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit Trifosfat
kb	Kilo Baz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
nDNA	Nükleer DNA
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPL3	Ribozomal Protein L3 Geni
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
tRNA	Taşıyıcı RNA
vd.	Ve Diğerleri
UV	Ultraviyole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Sınıflandırma yapılırken kuşkusuz benzerliklerden yararlanılır. Birden fazla ve birbirine çok benzeyen unsurlar, dikkatli gözlemlendiğinde farklı özelliklere sahiptir. Bu özellikler, gözleyen tarafından sık sık görüldüğünde artık yavaş yavaş unsurları birbirinden ayırt etmeye başlanır. Öte yandan hayvanları bu şekilde anlamak da yeterli değildir. Canlı sistemlerin, giderek bir hayvan grubundan diğer bir gruba doğru değişim gösterdiği, bir evrimsel yol izlediği görülür. Bu nedenle sistematigi yaparken türün dünya üzerinde ilk görüldüğü günden bugüne değin geçirdiği değişimleri inceleyen filogenilerine bakmak gerekir (Şahin, 2000).

Günümüzde 4 temel sistematik yaklaşım vardır. Bunlar, klasik evrimsel taksonomi, fenetik, kladistik ve moleküler taksonomidir. Her biri, benzerliklerden akrabalıkları çıkarmak için farklı teknikler kullanır. Organizmaları sınıflandırmadaki en popüler yeni yöntem moleküler taksonomidir. Bu yaklaşım, moleküler seviye üzerinde yoğunlaşarak homoloji ve analogi tartışmasından uzak durur. Moleküler, konvergent evrimleşme olasılığının çok az olduğunu ve dolayısıyla bu seviyedeki analizlerin daha doğru olacağını varsaymaktadır (Keeton vd., 2003).

Organizmalar birbirine ne kadar yakın akraba iseler, proteinlerin yapısı da o kadar uygunluk gösterir. Birbirine yakın akraba olan organizmalar benzer gen taşıdıkları için, benzer proteinlere sahiptir. Canlılar için gerekli kalıtsal bilgi DNA moleküllerinde bulunur. Canlı varlıkların akrabalık derecesi, DNA'larındaki benzer dizinlerinin karşılaştırılması ile verilebilir. Proteinlerin yapısında olduğu gibi, DNA'nın yapısında da evrimsel ilişkiler çıkarılabilir bu da Moleküler Filogeni'nin konusuna girer. Günümüzde moleküler filogenetik bulgular yardımı ile evrimsel bir takım sorunların, biyolojik açıklamaları yapılmaktadır (Kızıroğlu, 2010).

Bufo cinsi tanımlanmış 283 türle amfibiler içerisinde en fazla sayıda türe sahip olan cinslerdendir (Recuero vd., 2012). Parafiletik olmasından dolayı Frost vd. (2006),

tarafından birçok cinse ayrılmıştır, bu durum *Bufo bufo* grubu sistematığının ne kadar kompleks olduğunu göstermektedir (Recuero vd., 2012).

Garcia-Porta vd. (2012), Frost (2011)'u referans göstererek *Bufo* cinsinin iki tür kompleksine sahip olduğunu yazmıştır. İlki Avrasya'nın doğusunda (iç ve doğu Çin, Viyetnam'ın kuzeyi, Kore, Rusya'nın doğusu ve Japonya) yer alan *Bufo gargarizans* tür kompleksi, ikincisi ise Batı Palearktikte dağılım gösteren *B. bufo* tür kompleksidir. Ülkemizi de içine alan bu ikinci tür kompleksi içerisinde, *Bufo eichwaldi* (Litvinchuk vd., 2008), *Bufo verrucosissimus* ve *Bufo bufo* yer almaktadır.

Ülkemizdeki sistematik durumu net olmayan *Bufo bufo* tür grubunun taksonomik durumu, son yapılan moleküler temelli çalışmalarda (Recuero vd., 2012 ve Garcia-Porta vd., 2012) farklı sonuçların elde edilmesiyle daha da karışık hale gelmiştir. 2013 yılında Arntzen vd. (2013b) *B. bufo* tür grubunun sistematığı hakkında var olan moleküler verilere dayanarak durumun ne kadar karmaşık olduğu konusunda bir makale yayınlamışlardır. Bu bahsedilen makaleler arasındaki uyumsuzluk, Türkiye'deki *B. bufo* tür grubunun taksonomisi hakkında bilim insanlarının bir fikir birliğine varamadığını göstermektedir.

Bu tez çalışması ile *Bufo bufo* tür grubunun Kuzey Anadolu boyunca dağılımı moleküler veriler kullanılarak incelenecektir. Daha önce bu alanda yapılan çalışmalarda yeterli örnek toplanmamasından dolayı net bir sonuç elde edilememiştir. Bu tez çalışmasında ise tür grubunun bulunduğu tüm lokalitelerden örnek alınıp ve moleküler belirteçler kullanılarak kapsamlı analizler yapılmıştır. Moleküler belirteçler olarak mitokondriyal DNA'nın 16S rRNA ve cyt b genleri ile nükleer DNA'nın RPL3 gen bölgesi sekans edilerek, filogenetik analizler yapılmıştır.

1.2. Amfibiler Hakkında Genel Bilgiler

Amfibilerin Devoniyen'de, büyük bir olasılıkla hem su da hem de karada solunum yapabilen Coelacanthiformes balık takımından türedikleri düşünülmektedir. Devoniyen'in sonunda ortaya çıkan kuraklıkla, bazı akciğerli balıklar yaşam ortamlarını terk ederek karadan diğer sulara geçiş yapmışlardır. Daha sonra tüm suların kuruması

ile daha çok süre de karada yaşamaya başlamışlar ve amfibilerin atasınının temeli olmuşlardır (Şahin, 2000).

İki yaşamlılar, karaya adım atan ilk omurgalı grubu oldukları için, birçok bölgeden, rekabet olmadan rahatça faydalanabilmişler ve özellikle Karbon ve Perm devrinde patlarcasına yaygınlaşmış ve çeşitlenmişlerdir. Tersiyerde ise tatlı sular arasındaki etkili yalıtımla birlikte farklı birçok türe türemişlerdir (Şahin, 2000).

Ayrıca amfibilerin anatomik yapılarında da önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Ama yine de bir memeli hayvan gibi, suyla da tamamen ilişkilerini kesememişlerdir. Bu nedenle bunlara iki yaşamlı (suda ve karada) manasına gelen “amfibiler” olarak isimlendirilirler. Kurbağaların karada yaşama özelliği kazanması sonucunda, yüzgeçler yerine bacaklar, solungaçlar yerine akciğerler oluşmuştur. Larva döneminde sucul hayata daha bağımlıdırlar (Baran vd., 2012).

Amfibilerin derileri çıplak ve salgı bezleri bakımından zengindir ve bunun için daima nemlidir. Derileri dermis ve epidermis olmak üzere iki tabakadan oluşur. Epiderminin üzerinde yer alan ölü hücre ve keratinimsi tabaka, belirli aralıklarla atılarak değiştirilir (Pough vd., 2009).

Kurbağalar besinlerini yapışkan ve bol miktarda salgı bezi bulunan dilleri yardımıyla alırlar. Sindirim sistemi ağızla başlar. Ağızda, genellikle üst çenede çok ince dişler bulunur, bazı semender türlerinde alt çenede de ince dişler mevcuttur. Kara kurbağalarının bir kısmında ise dişler bulunmaz. Sindirim kanalı ağızdan sonra gelen kısa bir yemek borusu, basit bir mide, ince ve kalın bağırsakla devam eder ve kloakta son bulur. Kloak aynı zamanda boşaltım ve üreme sistemlerinin de açıldığı yerdir. Mide torba veya boru şeklinde olup çok fazla genişleme yeteneğine sahiptir ve bu özelliğiyle de bir depo organı gibi görev yapar. Ergin amfibiler genellikle etçildir. Larva devresinde kuyruklu kurbağalar etçil, kuyruksuz kurbağalar bitkilerle beslenir, erginleri ise hayvansal besinleri alırlar (Kuru, 2004).

İki yaşamlılarda solunum; solungaçlar, akciğer, deri ve ağız boşluğu ile yapılabilir. Larvalar dış solungaçlarla solunum yaparlar. Metamorfoz tamamlanıp ergin

hale geçince solungaçların yerini akciğerler alır. Böylece karada solunum yapabilirler. Akciğerler daha yüksek omurgalı türlerine göre daha basit yapılıdır. Vücudun oksijen gereksinimi genellikle deri solunumuyla sağlanır (Mason vd., 2011).

Kurbağalar soğukkanlı hayvanlar olduklarından vücut ısısı çevre sıcaklığına göre değişir. Kalpleri iki kulakçık ve bir karıncıktan olmak üzere 3 gözlüdür. Bu yapı sayesinde kurbağalarda çift dolaşım ortaya çıkar. Amfibilerde tek karıncık olmasına rağmen, kirli kanla temiz kanın karışmaması kısmen sağlanmıştır. Alyuvarları çekirdekli ve oldukça büyüktür (Öber, 2008).

Amfibiler ayrı eşeylidirler ve genelde dış döllenme görülür. Ancak bazı semender türlerinde iç döllenme de görülebilir. Bu hayvanlarda erkeğin bıraktığı sperm paketini, dişi kloaki ile içeri alır. Boşaltım organları ise mezonefroz tipteki böbreklerdir (Duellman ve Trueb, 1994).

1.3. Türleşme Mekanizmaları

Tür, taksonomide olduğu gibi biyocoğrafyada da temel birimdir. Tür üstü kategoriler ancak bir ya da birkaç kademeli türleşme sonucunda oluşmuşlardır. Bir türleşme olayı bir gen havuzunun gen alışverişlerini engelleyecek bir etkenin devreye girmesi olarak ve ayrılan gen havuzlarının süreç içerisinde farklılaşması ve üreme izolasyonunun kazanılması sonucu bağımsız bir evrimsel birim haline gelmesi olarak tanımlanabilir (Demirsoy, 2008).

1.3.1. Allopatrik Türleşme (Ayrı Yurtlu Türleşme)

Ayrı yurtlu türleşme, fiziksel bir engel (topografi, su ya da kara, elverişsiz habitat, vb.) tarafından coğrafi olarak ayrılmış toplumlar arasında genetik üreme engellerinin evrimleşmesidir. Coğrafi bariyerin oluşumuna göre allopatrik türleşme, yayılma (dağılma, dispersal) ve vikaryans yollarıyla gerçekleşir (Freeman ve Herron, 2009).

Yayılma modelinde köken tür, yeni alanlara yayılarak yayılış alanını genişletir ve yeni habitatlara ulaşır. Yeni bir alana ulaşan popülasyonlar, kendi habitatlarında

bağımsız olarak farklılaşma sürecine girerler ve bu alanlara populasyonlar bariyerleri aşarak ulaşmışlardır (Freeman ve Herron, 2009).

Vikaryans olarak tanımlanan modelde ise köken türün yayılış alanı içerisinde, jeolojik, coğrafik veya iklimsel değişimlere bağlı olarak yeni bariyerlerin ortaya çıkması sonucu köken populasyon iki veya daha fazla alt populasyona bölünür ve her biri ayrı evrimsel birimler olarak işlerler (Freeman ve Herron, 2009).

1.3.2. Peripatrik Türleşme (Çevre Yurtlu Türleşme)

Allopatrik türleşmenin özel bir biçimidir. Peripatrik türleşme, ana populasyonun periferinde kalan bir populasyon, coğrafik olarak ayrılması ve farklılaşmasıdır. Bu türleşme modeli için iki özellik önemlidir. Biricisi, periferik olarak ayrılan populasyonun yayılış alanı ve populasyon büyüklüğü bakımından ana populasyondan küçük olmasıdır. İkincisi ise bu küçük periferik populasyonların kurucu etkisi ve sürüklenme nedeniyle hızla farklılaşmasıdır. Periferik ayrılmalarla oluşan yeni türler filogenetik analizlerde atasal soy hattı içerisinde bir alt filogenetik grup oluşturur ve bu nedenle kladogenetik değil, anagenetik bir türleşme şeklindedir. Teorik model olarak kabul görmesine karşın sınırlı sayıda doğal örnek tanımlanmıştır (Futuyma, 2008).

1.3.3. Simpatrik Türleşme (Aynı Yurtlu Türleşme)

Simpatrik türleşme, bir köken soy hattının coğrafik bariyerler dışındaki nedenlerle farklı seyirleri olan iki veya daha fazla evrimsel birim olarak başlamasını ve yeterli sürenin sonucunda ayrı soy hatlarının oluşmasını öngörür. Her ne kadar önceleri bu modele uygun türleşmelerin doğada az olduğu savunulmuş ise de son zamanlarda simpatrik türleşmenin yaygın olduğuna ilişkin çokça veri edinilmiştir (Futuyma, 2008).

Aynı yurtlu türleşme modellerinin çoğu aynı alelli genotiplerin iki kaynaktan (ya da iki mikro yaşam alanından) birisi ya da diğerinden yüksek uyum başarısı gösterdiğini, ara fenotiplerin (ayrı alelliler) ise düşük uyum başarısı gösterdiği, çeşitlendirici seçilimi kabul eder (Futuyma, 2008).

1.3.4. Parapatrik Türleşme (Komşu Yurtlu Türleşme)

Parapatrik türleşme, farklılaşma sürecinde kökenleş populasyonların yan yana bulunmaları kast edilir. Başka bir şekilde söylenecek olursa yayılışları ayrı ancak yan yana olan ve hatta bir oranda örtüşen populasyonların farklılaşmasıdır (Futuyma, 2008).

Komşu yurtlu türleşme, kurumsal olarak, farklı seçim baskıları altındaki komşu toplumlar arasındaki gen akışı, gen kombinasyonları üzerindeki farklılaştırıcı seçiminden zayıf ise ortaya çıkabilir. Keskin ekolojik sınırlarla ayrılan farklı yaşam alanlarında işleyen güçlü seçim, gen alışverişine karşı bir engel oluşturarak öteki tarafa geçen yanlış genotip ya da fenotiplerin, üremede başarısız olmasını sağlar. Sonuçta, aynı yörede çeşitli lokuslar bakımından dereceli coğrafi değişimler ortaya çıkarak, ikincil melez bölgesi gibi görünsede birincil melez bölgesi olan alanlar meydana getirir. Bu şekilde devam eden farklılaşma, sonunda tam üreme yalıtımı ile sonuçlanabilir (Futuyma, 2008).

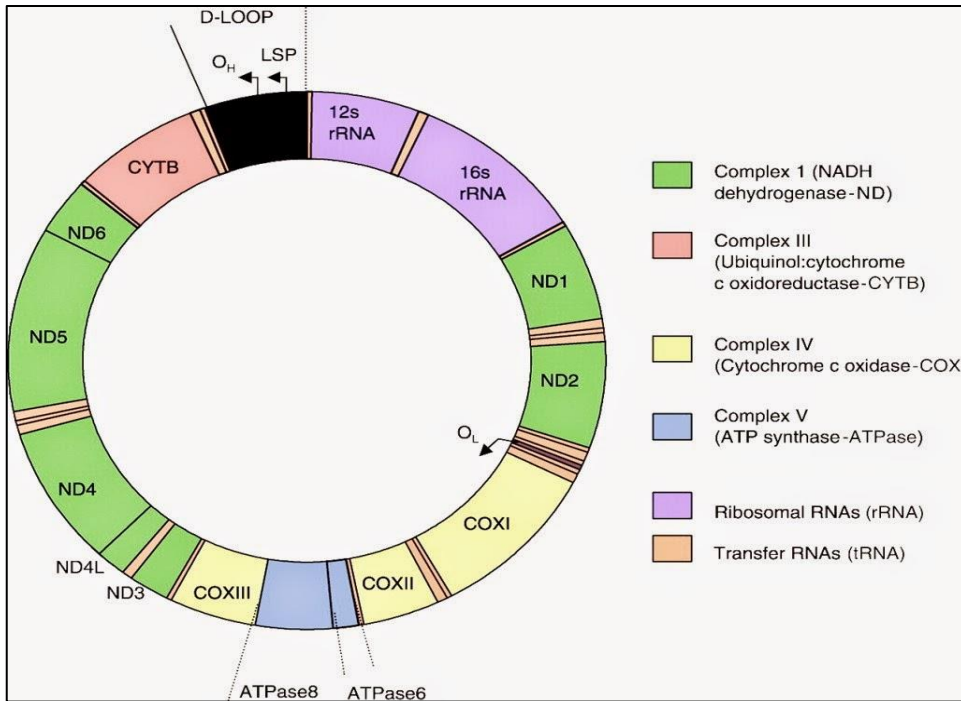
1.4. Moleküler Belirteçler

1.4.1. Mitokondriyal DNA

Son yıllarda, mitokondriyal DNA'nın sahip olduğu moleküler temel ve genlerinin fonksiyonları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir (Wittig vd., 2003). Mitokondriyal DNA çift zincirli kapalı halkasal yapıya (Şekil 1) sahip olup, yarı saklı (semikonservatif) olarak kendini eşlemektedir. Büyüklük bakımından mtDNA farklı organizmalar arasında değişiklikler gösterir. Mitokondriyal genom 37 gen bölgesine sahiptir. Bunlardan 13'ü solunum zincirindeki yapısal proteinleri, 2'si RNA ve 22'si de tRNA genlerini kodlar. Hayvanlar aleminin büyük bir kısmında mtDNA, 16.000 ila 18.000 bp (16-18 kb) büyüklüğündedir. Omurgalılarda organel başına 5 ila 10 mtDNA molekülü bulunurken, bitkilerde ise bu sayı organel başına 20-40 kopyaya kadar çıkabilir. İstisnai durumlar dışında gen tekrarı neredeyse hiç yoktur ve replikasyonu çekirdek DNA'sından sentezlenen enzimlere bağlıdır. Mitokondriyal genler, ribozomal RNA'ları, 20'den fazla tRNA'yı ve organelin hücresel solunum görevini yapabilmesi için gerekli pek çok proteini kodlamaktadır (Klug ve Cummings 2000).

Çekirdek DNA'sı ile mtDNA'nın evrimsel kökenleri farklıdır ve mtDNA'nın bakterilerdeki halkasal genomlardan evrildiği varsayılmaktadır. Bu yönü ile prokaryot hücreden ökaryot hücreye geçiş süreci hakkında bilgi verir. Ayrıca evrimsel süreçlerin araştırılmasıyla ilgili yapılan birçok çalışmada yapı taşı olmuştur (Meusel vd., 1993).

Mitokondriyal DNA'nın taksonomik çalışmalarda aranan başlıca moleküler belirteçlerden biri olmasının temel sebebi, maternal halkasal kod dizisine sahip olması, kod dizisi hücre DNA'sından daha da kısa olması, sadece mutasyonlar sonucu meydana gelmiş değişimler göstermesi ve mayoz bölünme geçirmemiş olmasıdır. Bunun sonucunda var olan mutasyonlar takip edilerek filogenetik soy ağacı oluşturmaya imkan sağlar. Nükleer DNA'ya göre daha fazla mutasyona uğrayan mtDNA mutasyonlarının hızı 1 milyon yıllık süreçte ortalama %2-4 oranındadır. Mitokondriyal DNA, populasyonlar, türler ve bireyler arasındaki var olan evrimsel ilişkileri belirlemek için kullanılan en önemli belirteçlerden biridir (Irwin vd., 1991; Holger vd., 2003). Yakın zamana kadar, evrimsel akrabalık ilişkileri incelenirken restriksiyon ve klonlama tekniği kullanılırken, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniğinin geliştirilmesi ile mitokondriyal gen bölgelerinin çoğaltılmasını mümkün kılmıştır (Harrison, 1989; Kocher vd., 1989).



Şekil 1. Mitokondriyal DNA (URL-1).

1.4.1.1. 16S Ribozomal RNA Geni

16S ribozomal RNA (16S rRNA) geninin temel yapısı oldukça korunmuş olup, %70 veya daha fazla DNA benzerliğine sahip türlerde, genellikle sahip oldukları sekans dizileri %97 oranında belirlenebilmektedir. Kalan %3 lük kısmı ise temel yapı boyunca dağılmış olup özellikle fazla değişkenlik gösteren bölgelerde yoğunlaşmıştır. Bu %3 lük kısım filogenetik uzaklıkların belirlenmesinde etkinlik göstermektedir (Stackebrandt vd., 1994). 16S rRNA geninin yüksek başarı göstermesi iyi şekilde korunmuş olmasından dolayıdır. Bu nedenle 16S rRNA'ya dayalı analizler farklı organizmalar üzerinde kolayca uygulanabilir. Diğer bir avantajı mitokondri üzerinde konumlanmış olması ve genomu maternal kalıtımla aktarılıp, organizmanın genomunda tek tip olarak gözlenmesidir. Dolayısıyla çok sayıda kopyası çoğaltılabilir ve bu kopyalardan sekans dizileri kolayca elde edilebilir (Lane vd., 1985).

1.4.1.2. Sitokrom b Geni

Sitokrom b (cyt b) geni, sahip olduğu yapı ve fonksiyonlar açısından oldukça iyi bilindiği için filogenetik çalışmalarda önde gelen ve en çok tercih edilen mitokondriyal gen bölgesidir (Esposti vd., 1993). Cyt b geni yaklaşık olarak 1140 bp uzunluğuna sahiptir. Mitokondriyal genomun diğer bölgeleriyle karşılaştırıldığında cyt b geni, protein kodlayan dizilerin sahip olduğu yüksek çeşitlilik bakımından önemli bir filogenetik belirteç olarak nitelendirilebilir (Irwin vd., 1991). Cyt b geni kolay evrimleşebildiği gibi aynı zamanda iyi de korunmuş kodon sıralarını içinde barındırmaktadır. Bu sebepten ötürü sistematik karmaşıklıkların çözülmesinde iyi bir ayırıcıdır (Lydeard ve Roe, 1997; Kumazawa ve Nishida, 1999).

1.4.2. Nükleer DNA

Nükleer DNA (nDNA), ökaryotik hücre yapısına sahip organizmaların çekirdeğinde, prokaryotik hücre yapısına sahip organizmaların ise sitoplazmalarında bulunur. Nükleer genler hem anneden hem babadan kalıtılırlar, yani biparentaldirler. Hücre için gerekli olan proteinlerin neredeyse tamamını kodlayan nükleer DNA birkaç

linear kromozomdan oluşmaktadır ve mtDNA'ya kıyasla daha uzun bir DNA dizisine sahiptir (Panawala, 2017).

Moleküler sistematik alanı son zamanlarda özellikle yüksek derecede korunmuş tekrarlı nükleer genlere eğilim göstermiştir. Nükleer genomun filogenetik karmaşıklıklara getirdiği çözümler sayesinde, üst seviyedeki filogenetik ilişkilerden sonuç çıkarmada ciddi bir ilerleme sağlanmıştır (Friedlander vd., 1992). nDNA bölgelerindeki varyasyon miktarı mtDNA'ya kıyasla çok daha düşük seviyede olduğu için, bu bölgeler genellikle derin filogenetik çalışmalarda tür, cins ve daha yüksek kategorilerdeki taksonları gruplandırmada kullanılır (Demirtaş, 2012). Oluşturulan nükleer gen ağaçları, mtDNA gen ağaçları ile kıyaslanarak, daha güvenilir tür ağaçlarının elde edilmesinde, türün ya da türlerin filogenileri ve filocoğrafik ilişkilerini ortaya çıkarmada katkı sağlar (Hillis ve Dixon, 1991; Wickliffe vd., 2003; Creer, 2007).

1.4.2.1. Ribozomal Protein L3 geni

Ribozomal Protein L3 (RPL3) geni 60 alt ünitelik ribozomal protein kodlayan bir gendir. Bu protein L3P ailesine ait ve sitoplazma içerisinde konumlanmış proteindir (Chan vd., 1998). RPL3 geni peptidiltransferaz merkezinin yapısı için vazgeçilmezdir. Ribozomal protein, sahip olduğu dizi yapısını çok iyi bir şekilde koruduğu için 3 domeinde de önemlilik arz etmektedir (Meskauskas ve Dinman, 2007).

1.5. Kafkasya'nın Jeolojik Geçmişi

Kafkasların yapısını ve jeolojik tarihini denetleyen ana unsur birbirine yaklaşan Avrasya ve Afrika-Arabistan levhaları arasındaki konumudur. Geç Proterozoyik ile Tersiyer arasında Kafkaslar, Tetis Okyanusu ve bu okyanusun Avrasya ve Afrika-Arabistan kıta kenarlarını içermekteydi. Bu sistem içerisinde yer alan ada yayları, yay-ıç i riftler, yay-ardı havzalar Kafkaslar'ın çarpışma öncesi jeoloji tarihinin bir parçasını teşkil eder. Erken Paleozoyik'te Batı Gondwana'nın altına güneye doğru dalan bir dalma-batma zonu üzerinde gelişen yay-ardı riftleşme ile Kafkaslar ve Alpin orojenik kuşak içinde yer alan diğer Üst Prekambriyen-Kambriyen kristalen temel parçaları, Gondwana'dan ayrılmıştır. Kuzeye hareket eden bu Gondwana çevresi (Peri-

Gondwana) mntıkalarının güneyinde Paleotetis Okyanusu açılmıştır. Kafkasya ve diğerk Gondwana evresi mntıkalarının Avrasya güney kenarını eklenmesi ~350 milyon yıl önce tamamlanmıştır. Avrasya kıta kenarının altına kuzeye doğru dalan bir dalma batma zonu üzerinde yaygın mikroklinli granitoid plutonlarının yerleşimi 320-280 milyon yıl önce aralığında gerçekleşmiştir. Tüm bu Variskan, Eo-Kimmeriyen ve Erken Alpin olaylara rağmen Kafkaslar'ın güneyindeki Paleozoik okyanusunun tamamen kapanmamış ve Mesozoyik Tetis Paleotetis'ten miras kalmıştır. Mesozoik ve Erken Tersiyer'de, Büyük Kafkaslar ve Trans-Kafkasya, Avrasya levhasının güney aktif kıta kenarını, bir diğerk ifade ile Kuzey Tetis bölgesini temsil ediyordu (Adamia vd., 2011b).

Trans-Kafkaya'nın dağ arası çöküntü bölgelerinde gelişen Oligosen-Neojen ve Kuvaterner havzalar bölgenin çarpışma ve çarpışma sonrası evrimini temsil eder. Bu havzalar Paratetis'in bir kesimini temsil eder ve sedimanları kapalı veya yarı-kapalı havzalarda çökelmiştir. Afrika-Arabistan ve Avrasya levhalarının nihai çarpışması ve bugünkü kıtalararası Kafkasya Dağ kuşağının oluşumu Neojen-Kuvaterner'de meydana gelmiştir. Geç Miyosen'den (9-7 milyon yıl önce) Pleistosen'in sonuna kadar geçen zamanda Kafkaslar'ın merkezi kesimlerinde volkanik faaliyetler meydana gelmiş ve molas havzaları oluşmuştur (Adamia vd., 2011b).

Trans-Kafkasya'daki tektonik deformasyonun geometrisini kontrol eden ana etken kama şeklinde sert Arabistan bloğunun Anadolu-Kafkasya bölgesine saplanmasıdır. Buna bağlı olarak tüm yapısal-morfolojik çizgilerin, Arabistan levhasının kuzey sınırını yansıtan bir şekilde, kuzeye doğru i bükey bir geometri gösterir. Buna karşın daha kuzeyde kıvrım bindirme kuşaklarının geometrisi farklıdır (Adamia vd., 2011b).

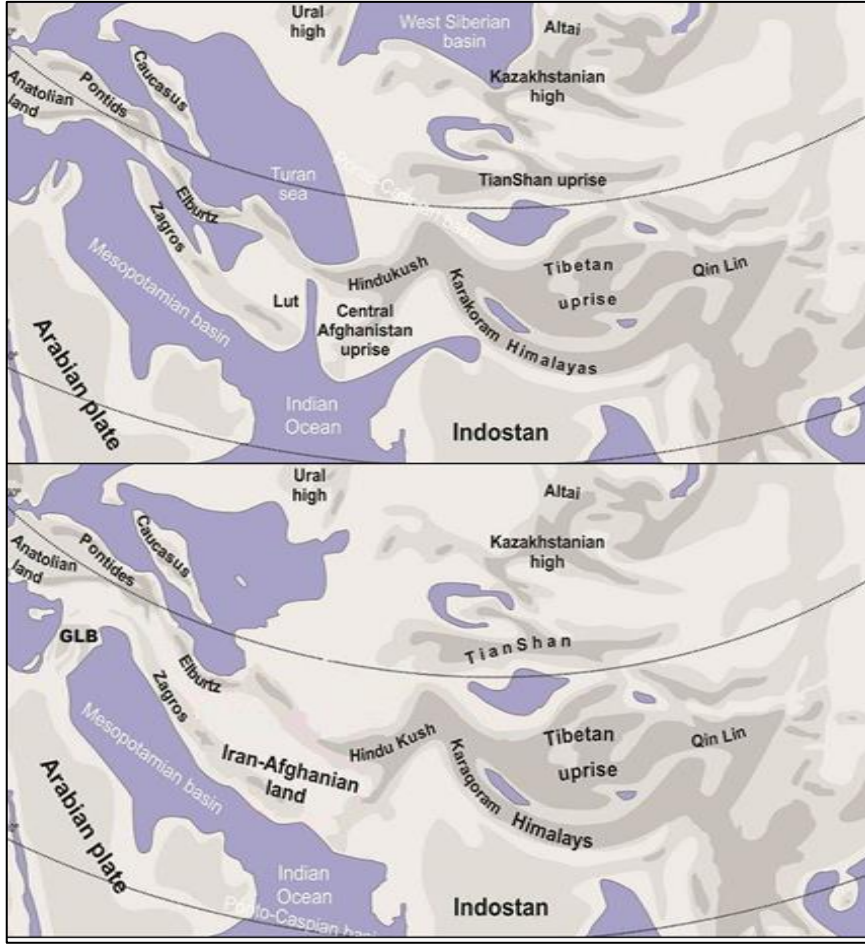
Büyük Kafkaslar, Paleozoyik-Mesozoyik-Erken Tersiyer (Jura-Eeosen), yaşlı bir yay-ardı havzanın (Dizi havzası) Geç Tersiyer'de Afrika-Arabistan ile Avrasya levhalarının yakınlaşması ve çarpışmasına bağlı olarak yapısal terslenmesi ile oluşmuştur (Adamia vd., 2011a). Tüm Mesozoyik, Palaeosen ve Eosen boyunca Büyük Kafkaslar kalın kıvrıntılı, karbonat ve volkanik malzemenin depolandığı bir havza oluşturur, Oligo-Miyosen'de bu havza Karadeniz ve Hazar Denizi havzaları arasında yükselen bir dağ kuşağına dönüşür (Adamia vd., 2011a).

Üst Oligosen boyunca Büyük Kafkasya adası Küçük Kafkaslar'dan Trans-Kafkasya boğazıyla ayrılmıştı. Bu periyotta Küçük Kafkaslar birkaç adadan oluşan bir takımda şeklindeydi. Kafkas Dağları ve ovalarının kapladığı alanın oranı günümüzde ki kapladığı alanla neredeyse aynıydı (Medvedev ve Kotti, 2012). Küçük Kafkaslar'ın oluşumunu etkileyen temel tektonik olaylar Paleosen-Eosen döneminde Güney Ermenistan Bloğu'nun Avrupa ile çarpışması ve Oligosen-Miyosen döneminde Arap-Avrasya levhalarının çarpışması olarak ifade edilir (Meijers vd., 2015).

Paratetis Denizi'nin doğusunda meydana gelen ana deformasyon ve bu alanı çevreleyen dağların oluşumu (Pontit, Küçük Kafkasya ve Toroslar) Erken Pliyosen Dönem'de meydana gelmiştir. Fakat daha erken oluşan baskılanmış blokların hareketleri Geç Miyosen'de Erken Pontian süresince gerçekleşmiştir. Bu orojenik gelişimlerin sonucunda Karadeniz çukuru sahip olduğu güncel haline kavuşmuştur. Doğu Paratetis Denizi'nde ki bu pozisyon değişimi Büyük Kafkaslar'ın yükselmesine, Küçük Kafkaslar'ın ise çökmesine neden olmuştur. Bu denizel alanın pozisyon değişimi sonucunda da Trans-Kafkasya'nın büyük bir kısmı Turan Levhası üzerinde meydana gelmiştir (Popov vd., 2006).

Orta Miyosende, Orta Sarmatian süresince meydana gelen orojenik hareketler sonucunda dağlık Kafkas Yarımadası, İran ve Küçük Kafkaslar karasıyla birleşmiştir. Maeotian içerisinde Doğu Paratetis civarında meydana gelen alüvyon ve deltoik yer değişimleri Büyük Kafkasyanın kuzey marjı boyunca artan orojenik hareketleri ortaya çıkarmıştır. Akchagilian güçlü allezik, bazaltik volkanizma hareketleri Paratetis'in güney sınırları boyunca orojenik kuşak üzerinde (Anadolu, Küçük Kafkaslar ve Elbruz Dağları) ve ayrıca Büyük Kafkaslar'da özellikle de Kafkaslar merkezi üzerinde Kazbek Dağı etrafında meydana gelmiştir (Popov vd., 2006).

Yaklaşık 10 milyon yıl önce, Orta Sarmatian döneminde Kafkaslar'ın yükselmesi devam etmiş ve Trans-Kafkasya boğazı ortadan kalkmış ve Trans-Kafkasya karası meydana gelmeye başlamıştır. Miyosen'in (Şekil 2) sonunda Trans-Kafkasya Küçük Asya'nın en uç noktası olmuştur. Batısından Karadeniz, doğusundan Hazar Denizi tarafından çevrelenmiştir (Vekua ve Lordkipanidze, 2008).



Şekil 2. Miyosen dönemi (Solovyeva, 2018).

Kafkasya'daki dağ orman komplekslerinin Orta Miyosen döneminde oluştuğu düşünülmektedir. Birbirine yakın alanlardaki kara bağlantıları Neojen dönemi sonunda birçok faunistik kompleksin Kafkas içerisinde yerleşmesine olanak tanıdı. Örneğin kuzey faunası Pliyosen'in sonlarında girişim göstermiş ve ardışık soğuma dönemlerinde daha da önemli hale gelmiştir. Kafkas faunasının şekillenmesinde birçok açıdan etkin rol oynayan etmen Antik Akdeniz yani Tetis Denizi'dir. Miyosen'den, Neojen başlangıcına kadar Eski Tetis Okyanusu Avrupa ve Kuzey Asya levhalarını Afrika ve Hindistan levhalarından ayırmıştır (Medvedev ve Kotti, 2012). Üst Paleosen ve en azından Orta Miyosen'e kadar olan süreçte Kafkaslar, Paratetis Denizi'nin ortasında kıtasal levhalardan izole olan bir ada şeklindeydi. Üst Miyosen döneminde Anadolu karasıyla birleşmeye başlayıp Pliyosen döneminde birleşmesini tamamlamıştır. Bu dönem boyunca meydana gelen orojenik aktiviteler sonucunda yüksek dağ formasyonları meydana gelmiştir (Kholodov and Nedumov, 1996; Tarkhnishvili vd., 2000).

Kafkasya bölgesi dağlık bir bölge olup, Büyük Kafkaslar tarafından bölünmektedir. Bu dağ sırası 1300 km boyunca uzanmakta olup, Karadeniz ve Hazar Denizi arasında bir hat oluşturmaktadır. Bu bölgenin güneyi Trans-Kafkasya olarak adlandırılmaktadır. Büyük Kafkas Dağları, Rusya ve Gürcistan sınırları arasında uzanmaktadır. Trans-Kafkasya ise Gürcistan, Ermenistan ve Azerbaycan'ı kapsamaktadır (Shahgedanov vd., 2009). Büyük Kafkas Dağları'nda rakım 5000 metreye kadar çıkmaktadır ve 1600 km²'lik bir buzul alanına sahiptir. Trans-Kafkasya bölgesi bir mozaik olup dağlık alanları, platoları, az yağış alan yarı kurak ovaları, nemli ve çok yağış alan ovaları içinde barındırmaktadır (Shahgedanov vd., 2009; Tielidze, 2016).

Kuzeyde Büyük Kafkas Dağları (Şekil 3) lineer sistemiyle, tektonik olarak aktif olan Küçük Kafkas Dağları ve Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesi bir bütün olarak Kafkas-Arap Sintaks'ı ismiyle tanımlanır. Arap plakasının güneydoğu Avrupa kratonunun içine girdiği yerdir. Detaylı şekilde ifade edildiği üzere Arap levhasının Avrasya levhasının güney sınırına çarpması ve devamında kuzey yönü hareketi sonucunda oluşmuştur. Bu Syntax Neojen-Kuvaterner volkanik kuşağını içerir ve Anadolu'dan başlayıp Küçük Kafkaslar üzerinden Büyük Kafkaslar'a kadar uzanır (Sharkov vd., 2015).



Şekil 3. Kafkaslar ve yakın coğrafyanın fiziki haritası (URL-2).

1.6. Sıcak Nokta Kavramı ve Kafkasya Sıcak Noktası

Sıcak nokta kavramına ilk kez 1988 yılında Normand Myers değinmiştir. Myers bu kavramı öne sürerken biyoçeşitlilikte görülen geri dönüşümsüz derecedeki azalmayı esas olarak almıştır. Biyoçeşitlilik konsepti yüksek seviyede korumaya değer coğrafik bölgelerin öncelikli olarak belirtilmesini ifade etmektedir (Myers vd., 1988; Mittermeier vd., 1999; Geiger vd., 2014). Myers, iki önemli kıstas koyarak dünya ölçeğinde var olan sıcak noktaları belirlemiştir. Bu kıstaslardan birincisi seçilen alanlarda biyoçeşitliliğin tehdit altında (özellikle insan tehdidi) olması, ikinci ise bu alanlardaki yüksek endemizm oranı, yani o yöreye ait türlerin olması gerektiğidir.

Dünya üzerinde var olan 34 biyoçeşitlilik sıcak noktası istisnai derecede endemik türü bünyesinde barındıran ve istisnai seviyede habitat kaybını tecrübe etmiş alanlar olarak tanımlanmaktadır (Myers, 2000; Mittermeier, 2005; Delibes-Mateos vd., 2008). Biyoçeşitlilik sıcak noktaları özellikle koruma stratejileri açısından önem teşkil eder. Boyutsal özellikleri ve biyoçeşitlilik seviyesinin yanı sıra biyotalar filogenetik ve zamansal boyutlarada sahip olan yüksek sayıda türlerle karakterize edilirler (Myers vd., 2000; Kondraskov vd., 2015). Bir bölgenin, biyolojik çeşitlilik sıcak noktası olarak ifade edilebilmesi için, minimum 1500 endemik damarlı bitki türüne ev sahipliği yapmalı, bir başka ifadeyle yeri doldurulamaz olmalıdır. Aranılan diğer bir ölçüt ise özgün doğal vejetasyonunun en fazla %30'unu bünyesinde barındırması, yani tehlike altında olmasıdır. Dünya üzerinde var olan sıcak noktalar, yeryüzünün sadece %2.3'ünü kaplar fakat endemik bitki türlerinin yarısından fazlasına, iki yaşamlı, sürüngen, kuş ve memeli türlerinin ise yaklaşık %43'üne ev sahipliği yapmaktadır (Gür, 2017).

Dünya üzerinde var olan 34 sıcak noktadan 3 tanesi Anadolu sınırları içerisinde yer almaktadır (Şekil 4). Bu sıcak noktalar Kafkas sıcak noktası, Akdeniz sıcak noktası ve İran-Turan sıcak noktalarıdır (Gür, 2017).



Şekil 4. Anadolu coğrafyası içerisindeki sıcak bölgeler (Gür, 2017).

Kafkasya sıcak noktası (Şekil 5) Dünya üzerinde var olan 34 sıcak noktadan birisidir (Mittermeier vd., 1999; Tarkhnishvili vd., 2008). Ve ayrıca dünya üzerinde var olan en çarpıcı 200 farklı biyoçeşitlilik alanlarının temsilcilerinden bir tanesidir (Olson and Dinerstein, 2002). Kafkas sıcak noktası Azerbaycan, Ermenistan, Gürcistan ve Türkiye'nin kuzeydoğusunu kapsayan Trans-Kafkasya, Rusya sınırları içerisinde Kafkaslar'ın kuzey kısmını kapsayan Cis-Kafkasya ve kuzeybatı İran'ın küçük bir kısmı olmak üzere yaklaşık olarak 580,000 km² alanı kapsamaktadır (Zazanashvili and Mallon 2009; Gül vd., 2018).



Şekil 5. Kafkas sıcak bölgesi (Kazancı vd., 2011).

Kafkas sıcak noktası içerisindeki dağlar, temel olarak iki sırayı kapsamaktadır. Bunlar güneyde Küçük Kafkas Dağ'ları zinciri, kuzeyde ise Büyük Kafkas Dağ sıraları olarak adlandırılır. Kafkas biyoçeşitlilik sıcak noktası dünya üzerindeki ılıman ormanlar arasında en yüksek biyolojik çeşitliliğe sahip alanlardır. Bölgenin sahip olduğu ormanlar yüksek dağlar, sulak alanlar, yarı çöl bölgeler, Avrupa ve Asya'daki benzer bölgelerle kıyaslanınca 2 katından daha fazla bitki ve hayvan çeşitliliğini bünyesinde toplamıştır. Kafkas sıcak noktası 1600'ü endemik 6500 damarlı bitkiye, 1'i endemik 378 kuş türüne, 18'i endemik 131 memeli türüne, 12'si endemik 127 balık türüne, 20'si endemik 86 reptil türüne ve 3'ü endemik 17 amfibi türüne yani toplamda 700'den fazla omurgalı türüne ev sahipliği yapmaktadır (Gül vd., 2018)

1.7. Literatür Özeti

Bufo bufo türünün Türkiye'deki dağılışı sahaları ve buralardaki alt tür durumları hakkında çeşitli morfolojik ve moleküler çalışmalar yapılmıştır ancak durum hakkında kesin bir şey söylemek pek mümkün olmamıştır.

Bodenheimer (1944)'ın Türkiye herpetofaunası hakkında yaptığı çalışmada İzmir, Manisa, Rize, İstanbul, Keşiş Dağı ve Arifiye'ye dâhil olan eski kayıtları referans almış, Kuzeybatı Anadolu'yu *Bufo bufo*'nun yayılış alanı olarak ifade etmiştir.

Mertens ve Wermuth (1960)'un çalışmalarına göre Kuzeybatı Afrika'dan, Avrupa ve Doğu Asya'ya kadar olan alanda *Bufo bufo* türünün yayılış gösterdiğini ifade etmişlerdir. Eiselt (1965), Trabzon'dan elde edilmiş bir örneği *Bufo bufo verrucosissimus* olarak tanımlamıştır.

Baçoğlu ve Özeti (1973), Rize'den elde edilmiş ve Frankfurt Zooloji Müzesi'nde bulunan bir örneği, Kuzeybatı Afrika ve Akdeniz Bölgesi'nde yayıldığı kabul edilen *Bufo bufo spinosus* olarak tayin etmişlerdir. Clark ve Clark (1973), Hopa ve Balıkesir yakınlarındaki bulunduğu iki örneği *Bufo bufo spinosus* olarak kaydetmiştir.

Yılmaz (1984)'ın Trakya'dan, Baran vd. (1997)'ninde Çamlıhemşin (Rize)'den elde ettikleri örneklerin *B. b. spinosus* alt türüne dahil edilmesini uygun bulmuşlardır.

Tosunoğlu ve Taşkavak (2001), Türkiye’deki *B. b. spinosus* ve *B. b. verrucosissimus* alt türlerini karşılaştırmak amacıyla Manyas (Balıkesir) ve Çamlıhemşin (Rize)’den alınan örneklerin kan-serum proteinlerini kalitatif ve kantitatif olarak incelemiş ve aralarında herhangi bir farklılık gözlemlememişlerdir. Sonuç olarak *B. b. verrucosissimus* ve *B. b. spinosus*’un sinonim olabileceğini bildirmişlerdir.

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

Lüscher vd. (2001), İsviçre’deki *B. b. bufo* ve *B. b. spinosus* populasyonlarının 8 enzimini yatay nişasta jel elektroforezi ile analiz ederek iki alt tür arasında net bir genetik farklılığın gözlenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca *Bufo bufo* populasyonlarının (alt tür dahil) çok düşük bir genetik farklılığa sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. Akdeniz bölgesindeki *B. b. spinosus*’un morfolojik karakterlere dayanan alt tür durumu yapılan genetik çalışmalarla doğrulanmamıştır.

Kutrup vd. (2006)’nın çalışmasında, 16 populasyondan toplam 29 *B. bufo* bireyinin 16S ribozomal RNA geninin 936 bazlık kısmının DNA dizin analizini yapmışlardır. Örneklerin toplandığı yerler; Artvin (Erenköy, Borçka), Rize (Fındıklı, Çamlıhemşin, Karasu, Gündoğdu), Trabzon (Araklı, Akçaabat, Yeşilova, Maçka), Mersin (Mezitli), Giresun, Giresun Adası ve Adapazarı’dır. Ayrıca İtalya’nın Matera (Garaguso), Yunanistan’ın Metsova (Pindos Dağları) kentlerinden *B. bufo* ve Sicilya (İtalya)’dan *B. b. spinosus* örnekleri de analizlere dahil edilmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda toplam 23 haplotip bulunmuş ve bu haplotipler arasında ise maksimum 17 baz (% 0,11 - % 1,85) farklılık olduğu görülmüştür. Fakat bu farklılığın bir alt tür oluşturacak kadar önemli olmadığı ve bunun tür içi varyasyon olduğuna karar verilmiştir.

Recuero vd. (2012), batıda İberya Yarımadası ve Kuzey Afrika'dan, doğuda Kazakistan'ın kuzeyi ve Sibirya'nın doğusuna kadar olan bölgelerde dağılım gösteren *B. bufo* grubunun toplam 232 birey (tüm alt türleri ve *verrucosissimus*'u da içine alan) kullanarak incelemiş ve mtDNA'nın 16S rRNA ve cyt-b genleri ile 4 nükleer gen (proopiomelanocortin: POMC, chemokine (C-X-C) receptor 4: CXCR 4, brain-derived neurotrophic factor: BDNF ve ribozomal protein L3: RPL3) üzerinde çalışmışlardır. Recuero vd. (2012)'nin bu çalışmasında Türkiye'den 4 lokaliteden toplam 6 örnek yer almıştır: Havza (Samsun), Erbaa (Tokat), Eflani (Karabük) ve Karagöl (Artvin). Yapılan filogenetik analizler sonucunda Havza, Erbaa ve Eflani örneklerinin *Bufo bufo*'ya, Artvin örneğinin ise *Bufo verrucosissimus* türüne ait olduğu belirtilmiştir. Fakat çalışma sonucunda *Bufo bufo*'nun doğuda nereye kadar dağılım gösterdiği ve *Bufo verrucosissimus* ile kontak zonlarının hala belirsiz olduğu vurgulanmıştır. Recuero vd. (2012)'nin bu çalışmasında sadece Türkiye'nin kuzeyinden örnek alınmıştır, batı ve güney populasyonları değerlendirmeye katılmamıştır ve sistematik durumu çözülememiştir.

Garcia-Porta vd. (2012), ise 147'si *Bufo bufo* kompleksine ait, 4'ü Genbank'tan alınmış toplam 151 örnekte mtDNA'nın tRNAval (48 bp), 16S rRNA (1386 bp) ve ND1 (554 bp) genlerini kullanarak filogenetik analizler yapmışlardır. Ayrıca bazı lokalitelere ait örneklerde ise 21 lokusa ait 16 protein sistemi (allozim) çalışmışlardır. Bu çalışmada Türkiye'den 6 lokalite yer almıştır. mtDNA üzerine yaptıkları filogenetik analizler sonucunda *B. bufo* kompleksinin 5 ana dala (Hazar Denizi, Avrupa, Kafkasya, İberya ve Afrika) ayrıldığını bulmuşlardır. Türkiye'den Alanya örneği Kafkasya dalında (*Bufo verrucosissimus*) yer alırken diğerleri (Anayurt, Kayabaşı, Bursa ve Bafra) ise Avrupa dalında (*B. bufo*) yer almıştır. Allozim çalışmasında ise Türkiye'den sadece Bolu ve Alanya örneği kullanılmıştır ve ikisi de *B. b. spinosus* olarak sınıflandırılmasına rağmen filogenetik analizlerde *B. verrucosissimus* olarak gruplanmıştır. Yani morfoloji ve coğrafik dağılımlarına göre *B. b. spinosus* olarak tayin edilen populasyonların (Alanya ve Bolu) mtDNA veya allozim sonuçlarına göre *B. verrucosissimus* olarak gruplanmıştır.

Arntzen vd. (2013a), *B. bufo* tür grubunun sistematığı hakkında, moleküler verilere dayanarak durumun ne kadar karmaşık olduğu konusunda bir makale yayınlamışlardır. Bu çalışmada Recuero vd. (2012)'nin makalesinde yer alan nükleer sekanslar yeniden analiz edilmiştir. Sonuç olarak *B. bufo* ile *B. eichwaldi*'nin tür durumlarının kesin olduğu fakat *B. spinosus* ile *B. verrucosissimus*'un durumunun belirsizliğini koruduğu belirtilmiş ve aksi detaylı bilgilerle kanıtlanıncaya kadar Orlova ve Tuniyev (1989), tarafından tür olarak bildirilen “*verrucosissimus*”un tür durumunun korunması gerektiğini vurgulamışlardır. Sadece Bolu’da *B. bufo* ile *B. verrucosissimus*’un simpatrik yaşadığı yazılmıştır. Bazı lokuslarda nükleer DNA haplotiplerini paylaştıkları ancak alel paylaşımında bir coğrafik örüntünün olmamasını hibridizasyondan ziyade “incomplete lineage sorting”e bağlamışlardır. Fakat Bolu’daki durumun hala belirsizliğini koruduğunu vurgulamışlar ve *B. verrucosissimus*’un taksonomik durumu için başka çalışmaların yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca aksi tam olarak ispatlanana kadar Recuero vd. (2012)’nin *B. verrucosissimus*’un tür durumunu devam ettirilmesi sonuçlarına uyulması gerektiğini savunmuşlardır.

Arntzen vd. (2014), Britanya ve Fransa arasındaki Kanal Adaları olarak adlandırılan yedi adadan en büyüğü olan Jersey Adası’ndaki *Bufo* popülasyonu hakkında morfolojik ve moleküler yönden çalışmışlar, mitokondriyal belirteçler ve RAG1 nükleer gen bölgesi olmak üzere iki farklı moleküler belirteç kullanmıştır. RAG1 gen bölgesi bakımından bütün örneklerin *Bufo spinosus* olduğu belirlenmiş ve bu durum mitokondriyal verilerle de desteklenmiştir.

Roth ve Jehle (2016), Norveç etrafındaki takımadalarda var olan *Bufo bufo* popülasyonları ile Ana kara popülasyonları arasındaki genetik farklılaşmayı incelemek üzere 9 farklı mikrosatellit belirteç kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Su birikintilerini kullanarak üreyen amfibi türlerinin düşük yayılım kapasiteleri ve doğal popülasyon yapılarının habitat parçalanması ile meydana gelen genetik farklılaşmayı tespit etmede önemli bir nokta olduğunu belirten araştırmacılar, kurdukları hipotezi destekleyecek sonuçlar elde etmişlerdir. Anakara popülasyonları ile adalar içerisinde var olan popülasyonlar arasında ve hatta ada popülasyonlarının arasında da yüksek genetik uzaklığın varlığını ortaya koymuşlardır.

Arntzen vd. (2017), Fransa'nın Güneydoğusu ve İtalya'nın Kuzeybatısı olmak üzere iki farklı hatta yani Alp Dağları'nın iki yakasında var olan *Bufo bufo* ve *Bufo spinosus* türleri arasındaki etkileşim ve kontak zonlar üzerine mitokondriyal ve nükleer belirteçler ile morfolojik karakterleri kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada elde edilen mitokondriyal soy hatlarını yorumlayarak *Bufo bufo*'nun son buzul maksimumunda sığınaklarda sınırlandığını, *Bufo spinosus*'un İberya sığınağına yakın alanlardaki lokal *Bufo bufo* populasyonlarının yerini aldığını, sonraki dönemde Balkanlardan gelen *Bufo bufo* populasyonlarının *Bufo spinosus* populasyonlarını Alp Dağları'nın çatalının sağ ve sol yakası boyunca güneye doğru sürdüğünü ifade etmişlerdir. Ve bu senaryonun hatlar boyunca geniş şekilde yayılan kontak zonların varlığını net şekilde açıkladığını belirtmişlerdir.

Arntzen vd. (2018), *Bufo bufo* ve *Bufo spinosus* türlerinin Avrupa boyunca dağılım gösteren populasyonlarını mitokondriyal belirteçler ve morfolojik karakterleri kullanarak değerlendirmiş ve var olan kontak zonlar üzerine bir yorumlama getirmişlerdir. Çalışma sonucunda Fransa kuzeydoğu yarısını *Bufo bufo* güneybatı yarısını ise *Bufo spinosus* populasyonları ile karakterize etmişlerdir. Fransa'nın merkezinde ise mtDNA bakımından 10 km. 4 nükleer lokus bakımından ise 61 km. genişliğinde bir hibrit zonun varlığı ortaya çıkarılmıştır. Türlerin Avrupa boyunca sahip oldukları kontak zonların Fransa'da Atlantik kıyısındaki Caen şehrinden Akdeniz kıyısındaki İtalya'nın Savona şehrine kadar uzanan 900 km. lik bir hat olduğunu ortaya koymuşlardır. Türleri belirlemede kullanılan karakterlerde var olan önemli coğrafik varyasyonların varlığına değinip, bu karakterlerin Fransa içerisindeki türleri ayırmada etkin bir güce sahip olduğunu fakat İtalya'da ise aynı etkiyi yaratamadığını belirtmişlerdir. Son olarak hibrit zonların sahip olduğu coğrafik pozisyonların dağlar ve nehirler gibi çevresel faktörler ile ilişkili olduğuna değinilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

Yapılan bu çalışmada kullanılan materyaller, Bufonidae ailesine ait olan *Bufo bufo* (Linneaus, 1758) ve *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) türleridir.

2.1.1. *Bufo bufo*

Bufo bufo'ların sistematik yapıları alemden başlayıp tür kategorisine doğru hiyerarşik sıralanışı aşağıdaki gibidir (Kuru, 2004).

Regnum : Animalia
Phylum : Chordata
Subphylum : Vertebrata
Superclass : Tetrapoda
Class : Amfibia
Subclass : Lissamphibia
Ordo : Anura
Subordo : Neobatrachia
Familya : Bufonidae
Genus : *Bufo*
Species : *Bufo bufo* (Linneaus, 1758)

Vücut uzunluğu ortalama erkek bireylerde 11 cm, dişi bireylerde ise 15 cm'ye kadar ulaşabilmektedir (Şekil 6). Göz bebekleri yatay, göz irisi rengi altın veya bakır rengindedir. Kulak zarları küçük ve bazen neredeyse belirsizdir. Derileri fazla kabarcıklı, sırt bölgesinde çokça siğil bulunur. Ağızlarında diş yoktur. Erkeklerde ses kesesi bulunmaz. Sırt tarafı genellikle kahverengi, bazen kırmızımsı veya grimsi olabilir, alt taraf ise kirli beyaz veya grimsi renktedir (Baran vd., 2012). Kafalarının posterodorsal kısmında parotid bezleri bulunur. Parotid bezlerinin salgıları ile predatörlere ve parazitlere karşı korunma sağlarlar (Arntzen vd., 2013b).

Bu tür yüksek ekolojik adaptasyona sahiptir. Gececi bir karasal kurbağa türüdür (Tosunoğlu ve Taşkavak, 2001). Nemli, seyrek vejetasyonlu kayalık-çakıllık alanlarda, veya kozalaklı ve yaprak döken ormanların tabanı üzerinde yaşarlar (Denton and Beebee, 1994; Düşen, 2011). Yaşamını sürdürmek için ağırlıklı olarak ormanlar tercihleri olsada, bazen çayırlar, bahçeler ve insan yerleşkelerinde de görülebilmektedir (Cvetkovic vd., 2003).

Bufo bufo'nun üreme aktivitesi bahar mevsiminin erken dönemlerinde meydana gelmekte ve birkaç hafta sürmektedir (Arntzen, 1999; Hettyey vd., 2012). Üremek için daimi su birikintileri ve yavaş akışa sahip suları tercih ederler (Ritcher-Boix vd., 2004). Erkek birey, dişi bireyi kavrayarak yumurtlamasına yardımcı olur. Bir dişi genelde 5000 ila 7000 arası yumurta bırakmaktadır. Larvalar 32 mm uzunluğa ulaşabilir. Metamorfozları 2 ile 3 ay arasında tamamlanmakta olup ergin formlarını kazanırlar (Özeti ve Yılmaz, 1994; Özdemir, 2005).



Şekil 6. *Bufo bufo* (Foto: N. Özdemir).

2.1.2. *Bufo verrucosissimus*

Bufo verrucosissimus'ların sistematik yapıları aleminden başlayıp tür kategorisine doğru hiyerarşik sıralanışı aşağıdaki gibidir (Sinsch vd., 2009).

Regnum : Animalia
Phylum : Chordata
Subphylum : Vertebrata
Superclass : Tetrapoda
Class : Amphibia
Subclass : Lissamphibia
Ordo : Anura
Subordo : Neobatrachia
Familiya : Bufonidae
Genus : *Bufo*
Species : *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814)
Subspecies1 : *Bufo verrucosissimus verrucosissimus* (Orlova ve Tuniyev, 1989)
Subspecies2 : *Bufo verrucosissimus turowi* (Krasovsky, 1933)
Subspecies3 : *Bufo verrucosissimus circassicus* (Orlova ve Tuniyev, 1989)
Subspecies4 : *Bufo verrucosissimus tertyschnikovi* (Kidov, 2009)

Bufo verrucosissimus, dış görünüş olarak *Bufo bufo* tür grubunun Kuzey Avrasya'ya ait diğer türleri ile benzerlik göstermektedir. Vücut uzunluğu *Bufo bufo*'ya kıyasla daha büyük olmakla beraber 19 cm'ye kadar ulaşabilir (Tosunoğlu ve Taşkavak, 2001). Bu türde boyun bölgesi belirgin olmayıp kafayla birleşik haldedir (Orlova ve Tuniyev, 1989).

Bufo verrucosissimus'ta renklenme oldukça değişken olmakla beraber kiremit kırmızısından yeşilimsi kahverengiye kadar devam eder, genelde kahverengi tonları baskın renktir (Şekil 7). Bazı dişi bireyler çok belirgin olmayan dağınık parlaklıkta kiremit kırmızısı renge sahiptirler. Kahverengi ve yeşilimsi kahve renklere sahip dişilerin sırt kısmında çok sayıda koyu renkli noktalar ve çizgiler bulunabilir. Erkek bireyler ağırlıklı olarak yeşilimsi kahverengi renge sahiptirler ve vücut üzerinde lekeler

bulunmaz, fakat bazen düzensiz koyu renkli noktalara sahip bireyler gözlenebilir. Her iki cinsiyette karın gri renktedir, çok belli olmayan lekeler ile kaplıdır (Sinsch vd., 2009).

Nemli dağ orman kuşağında yaşamayı tercih ederler, açık alanlar ve dağ eteklerinde bulunan ovalar haricinde diğer ovaları tercih etmezler. Asla orman çizgisinden uzakta görülmezler. Gececi hayvanlardır. Yaşadıkları bölgeler genellikle yıllık 1000 mm ve üstünde yağış almaktadır. Yazın yağmurun az ve toprağın kuru olduğu zamanlarda sulara yakın bölgelerdeki odunların arasında bu dönemi geçirebilmektedirler (Sinsch vd., 2009).



Şekil 7. *Bufo verrucosissimus* (Foto: N. Özdemir).

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Toplandığı Alanlar ve Birey Sayıları

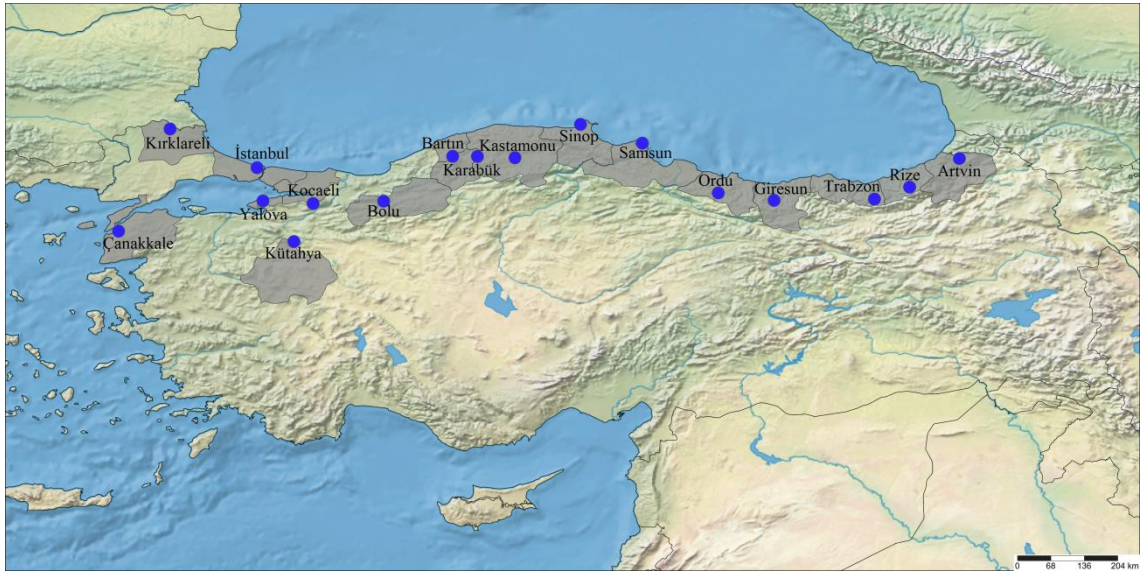
Bu çalışma kapsamında Türkiye sınırları içerisinde Karadeniz, Marmara ve Ege bölgelerinden toplamda 17 ilden (Şekil 8) örnekleme yapılmıştır. Örnekleme yapılan alanlara ait coğrafi veriler ile örneklenen birey sayıları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma alanı ve birey dağılımı

Şehir	Lokalite	Koordinat	Birey Sayısı
Artvin	Borçka, Karagöl Milli Parkı	Enlem : 41.2313 Boylam : 41.5114 Rakım : 1480 m.	3
Rize	Çamlıhemşin, Çat Köyü	Enlem : 40.51 47 Boylam : 40.5628 Rakım : 1299 m.	3
Trabzon	Çaykara, Uzungöl Milli Parkı	Enlem : 40.3799 Boylam : 40.1745 Rakım : 1132 m.	3
Giresun	Dereli, Yüce Köyü	Enlem : 40.62054 Boylam : 38.45294 Rakım : 1027 m.	3
Ordu	Kabataş, Elbeyi Köyü	Enlem : 40.75732 Boylam : 37.42921 Rakım : 687 m.	3
Samsun	Bafra, Kızılırmak Deltası	Enlem : 41.66959 Boylam : 36.0354 Rakım : 1 m.	3
Sinop	Sarıkum	Enlem : 42.01451 Boylam : 34.89994 Rakım : 74 m.	3
Kastamonu	Taşlık Köyü Göleti	Enlem : 41.402383 Boylam : 33.69708 Rakım : 925 m.	3
Bolu	Abant Gölü	Enlem : 40.606408 Boylam : 31.2866436 Rakım : 1342 m.	3
Bartın	Kumluca, Zafer Köyü	Enlem : 41.428278 Boylam : 32.554245 Rakım : 356 m.	3
Karabük	Eflani, Ortakçılar Göleti	Enlem : 41.426453 Boylam : 33.007707 Rakım : 946 m.	3
Kocaeli	Gebze, İnönü Yaylası	Enlem : 40.56315 Boylam : 29.99049 Rakım : 1133 m.	3
Yalova	Teşvikiye Yolu	Enlem : 40.610907 Boylam : 29. 070776 Rakım : 65 m.	3

Tablo 1 (devam). Çalışma alanı ve birey dağılımı

Şehir	Lokalite	Koordinat	Birey Sayısı
İstanbul	Bahçeköy, Belgrad Ormanı	Enlem : 41.220006 Boylam : 28.962657 Rakım : 160 m.	3
Kırklareli	Dereköy	Enlem : 41.9296 Boylam : 27.3664 Rakım : 446 m.	3
Çanakkale	Taşlıtarla Köyü	Enlem : 40.055243 Boylam : 26.4214873 Rakım : 141 m.	3
Kütahya	Domaniç, Kocayayla	Enlem : 39.86424 Boylam : 29.64014 Rakım : 1500 m.	3



Şekil 8. Örneklem yapılan lokaliteler

2.2.2. Kurbağa Parmaklarından Genomik DNA'ların İzolasyonu

Yakalanan bireyler MS222 ile bayıltıldıktan sonra steril cerrahi makasla parmak uçlarından doku örnekleri alınmıştır ve %96'lık alkol içeren ependorf tüplerine konulmuştur. Hayvanlar ayıldıktan sonra doğal ortamlarına geri bırakılmıştır. Alınan doku örnekleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Zooloji Araştırma Laboratuvarı'na getirilmiştir. Doku örneklerinden genomik DNA elde etmek için NucleoSpin Tissue genomik DNA saflaştırma kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın sağladığı protokol takip edilerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülmüş, UV görüntüleme cihazında görüntülenerek kontrolü sağlanmış ve kullanılıncaya kadar -20 C° de saklanmıştır.

2.2.3. mtDNA ve nDNA Genlerinin PZR Yardımı ile Çoğaltılması ve DNA Dizin Analizi

Yapılan bu çalışmada; mitokondriyal (16S ve Cyt b) ve nükleer (RPL3) gen bölgeleri kullanılarak Kuzey Anadolu boyunca dağılışı gösteren *Bufo* populasyonları hakkındaki sistematik belirsizliğin çözülmesi hedeflenmiştir.

Mitokondriyal (16S rRNA ve Cyt b genleri) ve nükleer (RPL3 geni) genlerinin PZR Yardımı ile çoğaltılmasında kullanılacak olan primerler referanslarıyla birlikte Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Moleküler analizlerde kullanılan gen bölgeleri ve primerler

Gen	Primer	Baz sırası	Referans	Uzunluk (bp)
16S rRNA	16S-ar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi vd., 1991	544
	16S-br	CCGGTCTGAACCTCAGATCACGT	Palumbi vd., 1991	
Cyt b	Cyt Bufo F	ATCTACCTTCACATCGGACGAG	Recuero vd., 2012	786
	Cyt Bufo R	AGTTTTRTTTCTGTGAGTCC	Recuero vd., 2012	
RPL3	RPL3buF1	AGGTGGCAGTGTCTGGAGTATT	Recuero vd., 2012	540
	RPL3buR1	GTCACCTTACTACAGCTTGTCTCA	Recuero vd., 2012	

Mitokondriyal ve nükleer gen bölgeleri çoğaltılırken, parmak uçlarından alınan doku örneklerinden elde edilmiş DNA’lar kullanılmıştır. 16S rRNA, Cyt b ve RPL3 genleri için 50 µl’lik reaksiyon karışımı PZR şartları; 50 Nm KCl, 10 Mm Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 % Triton X-100, 0.4 mM oligonükleotid, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 u/100 µl Taq DNA polimeraz ve her bir primerden 0.1µM şeklindedir. PZR protokolü ise 96 C°’de 2 dakika denatürasyon; 52 C°’de 45 saniye bağlanma; 72 C°’de 2 dakika uzatma; 38 döngü ve 72 C°’de 5 dakika son uzatma şeklindedir (Goebel vd., 1999; Stock vd., 2006).

Elde edilen PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülüp gözlenmiştir. Son aşama olarak PZR yardımıyla çoğaltılan genomik DNA’dan mitokondriyal ve nuklear genlere ait DNA dizilerini elde etmek için DNA örnekleri MacroGen (Hollanda) şirketine gönderilmiş ve dizileme işlemi bu şirket tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. DNA Dizin Analizi Sonucunda Filogenetik Ağaçların Oluşturulması

MacroGen (Hollanda) şirketi tarafından sekanslaması yapılan baz dizileri Bioedit v7.2.5 (Hall, 2011) programı kullanılarak her bir bireyin aynı lokusuna ait ileri ve geri primerler (forward ve reverse) ile elde edilen dizilerin kromatogramları tek tek gözden geçirilmiştir. Böylece konsensus (en ortak) diziler oluşturulmuş ve hizalandırılmaları yapılmıştır. Bu analiz için Bioedit içine bütünleşmiş haliyle ClustalW kullanılmıştır. DNA dizilerinin başlangıç ve bitiş kısımlarından fazlalıkları kesilerek aynı uzunluğa getirilen diziler fasta formatında kaydedilmiştir (Hall, 1999).

2.2.4.1. MrModeltest v.2.3 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Bulunması

Dizilerin analizleri için en uygun modeller, MrModeltest v.2.3 (Nylander, 2004) programı kullanılarak belirlenmiştir. Akaike bilgi kriteri (AIC) değerlerine göre her bir gen için evrimsel model hesaplaması yapılmıştır (Akaike, 1974).

2.2.4.2. TCS (The Method of Templeton, Crandall and Sing) ve Network Analizleri

Bireylerden elde edilen DNA dizilerine ait haplotipler PopART 1.7 (Leigh and Bryant, 2015) programı kullanılarak belirlenmiştir. Sonraki aşamada Median-Joining metodu kullanılarak haplotip ağları oluşturulmuştur. Bu program kendi içinde hem TCS (Clement vd., 2000) hem de Network v4.5.1.6 (<http://fluxus-engineering.com>) (Bandelt vd., 1999) programlarını barındırdığından kullanıcılara kolaylık sağlamaktadır.

2.2.4.3. Maksimum Olasılık Analizi

Maksimum olasılık analizleri RAxML v8.0. (Stamatakis, 2014) programı kullanarak her bir gen için ayrı ayrı icra edilmiştir RAxML v8.0. programında MrModeltest ile en uygun baz modeli olan SYM+G'ye karşılık gelen GTR evrimsel baz modeli analizlerde kullanıldı ve ayrıca her analiz için 1000 tekrarlı seç-bağla (bootstrapping) testi yapılarak en uygun evrimsel ağaca ulaşılmıştır.

2.2.4.4. Bayesian Analizi

Bayesian analizi, çalışma kapsamında kullanılan üç gen için ayrı ayrı çalıştırılmıştır. Bunun için MrBayes sürüm 3.2.6 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) programı kullanılmıştır. Modeltest v2.3 sonucunda bulunan en uygun baz değişim modeli olan SYM+G kullanıldı ve Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritması kullanıldı. Rastgele olarak ağaçlarla analize başlanmış ve 1.000.000 jenerasyon tekrarlanmıştır. Her 1000 jenerasyonda bir ağaçlar örneklenmiştir. Log likelihood skorlarının belli bir dengeye ulaştığı nokta (Standart hatası <0.01) “burn in” olarak belirlenmiş ve bu noktadan önceki ağaçlar analizden çıkarılmıştır. Bayesian MCMC çalışmasıyla oluşan log uzantılı dosya Tracer 1.6 programıyla etkili örnek büyüklüğü kontrol edildi. The Effective Sample Size (ESS) ve bu değer >200 üstünde olduğunda program tamamlanmıştır.

2.2.4.5. FigTree Programı

Filogenetik analizler sonucu oluşan ağaçların görüntülenmesi için FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012) programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda 17 lokaliteden 3'er örnek olmak üzere toplam 51 bireyden elde edilen 3 farklı gen bölgelerine ait nükleotid dizileri çalışılarak moleküler sonuçlara ulaşılmıştır. Yapılan filogenetik analizlerde 51 bireyden elde edilen DNA dizilerine ek olarak GenBank'tan elde edilen *B. verrucosissimus* alt türlerine ait DNA dizilerinin yanı sıra *B. eichwaldi*, *B. spinosus*, *B. japonicus*, *B. bankorensis* ve *B. gargarizans* türlerine ve alt türlerine ait DNA dizileri de kullanılmıştır (Tablo 3). Filogenetik analizler, mitokondriyal genler için oluşturulan haplogruplar kullanılarak, nükleer gen için ise bireyler üzerinden yapılmıştır. Nükleer gen için birey bazlı ağaçların oluşturulmasının nedeni ise genlerin bu türleri ayırmada mitokondriyal genlere kıyasla daha zayıf olması ve haplotipler için gruplaşma gözlenmemesidir (Recuero vd., 2012).

Tablo 3. GenBank'tan elde edilen DNA dizileri ve erişim kodları (B. v: *Bufo verrucosissimus*; B. g: *Bufo gargarizans*; B. j: *Bufo japonicus*)

Tür	Ülke	Lokalite	16S	Sitokrom b	RPL3
<i>B. v. verrucosissimus</i>	Türkiye	Karagöl	JN647232	-	JN647525
<i>B. v. verrucosissimus</i>	Gürcistan	Borjomi	JN647231	JN647467	JN647523
<i>B. v. verrucosissimus</i>	Gürcistan	Adjara-Charnali	JN647228	-	JN647522
<i>B. v. verrucosissimus</i>	Gürcistan	Abkhazia	JN647227	-	JN647521
<i>B. v. turowi</i>	Rusya	Krasnodar	JN647225	-	JN647519
<i>B. v. tertyschnikovi</i>	Rusya	Krasnodar	JN647226	JN647462	JN647520
<i>B. v. circassiscus</i>	Rusya	Krasnodar	JN647233	JN647469	-
<i>Bufo bankorensis</i>	Çin	Taiwan-Taipe	JN653290	JN653295	JN653321
<i>B. g. gargarizans</i>	Rusya	Jewish autonomus region	JN647244	JN647480	JN653318
<i>B. j. formosus</i>	Japonya	Tokyo	JN653293	JN653298	JN653320

Tablo 3 (devam). GenBank'tan elde edilen DNA dizileri ve erişim kodları (B.v: *Bufo verrucosissimus*; B.g: *Bufo gargarizans*; B.j: *Bufo japonicus*)

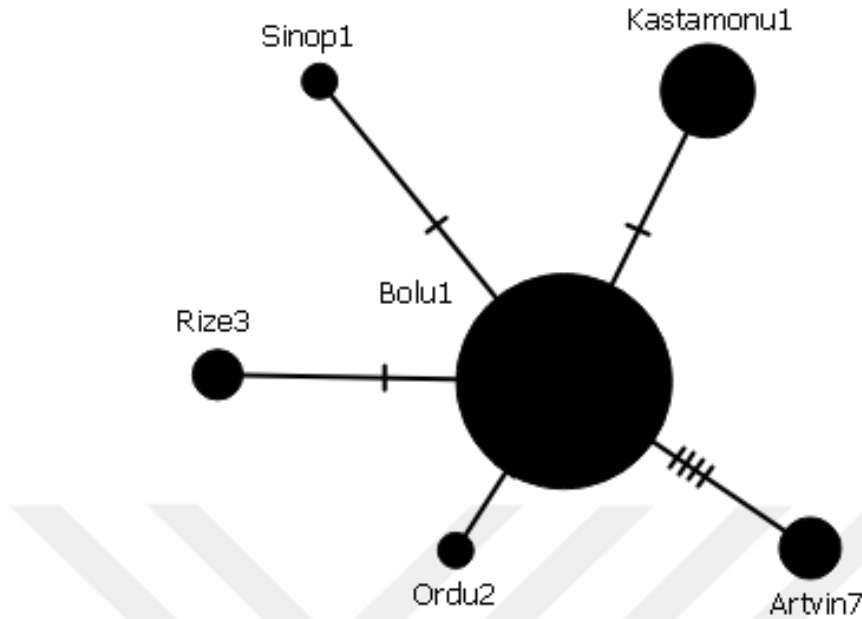
Tür	Ülke	Lokale	16S	Sitokrom b	RPL3
<i>Bufo spinosus</i>	İspanya	Laguna Grande de Gredos	JN647223	JN647424	JN647514
<i>Bufo spinosus</i>	Tunus	Beni M'Tir	JN647201	JN647442	JN647517
<i>Bufo eichwaldi</i>	Azerbaycan	Lerik	JN647240	JN647476	-
<i>Bufo eichwaldi</i>	Azerbaycan	Astara	JN647239	JN647475	JN647518

3.1. 16S rRNA Gen Dizileri ile Elde Edilen Bulgular

Çalışmadaki 51 örneğe ait 16S rRNA gen dizileri ile Network analizleri icra edilmiştir. Gerçekleştirilen Network analizleri sonucunda 6 farklı haplotip grubu (Tablo 4) tespit edilmiş ve haplotip ağ örgüsü grafiği görselleştirilmiştir (Şekil 9).

Tablo 4. 16S ribozomal geni haplotip grupları

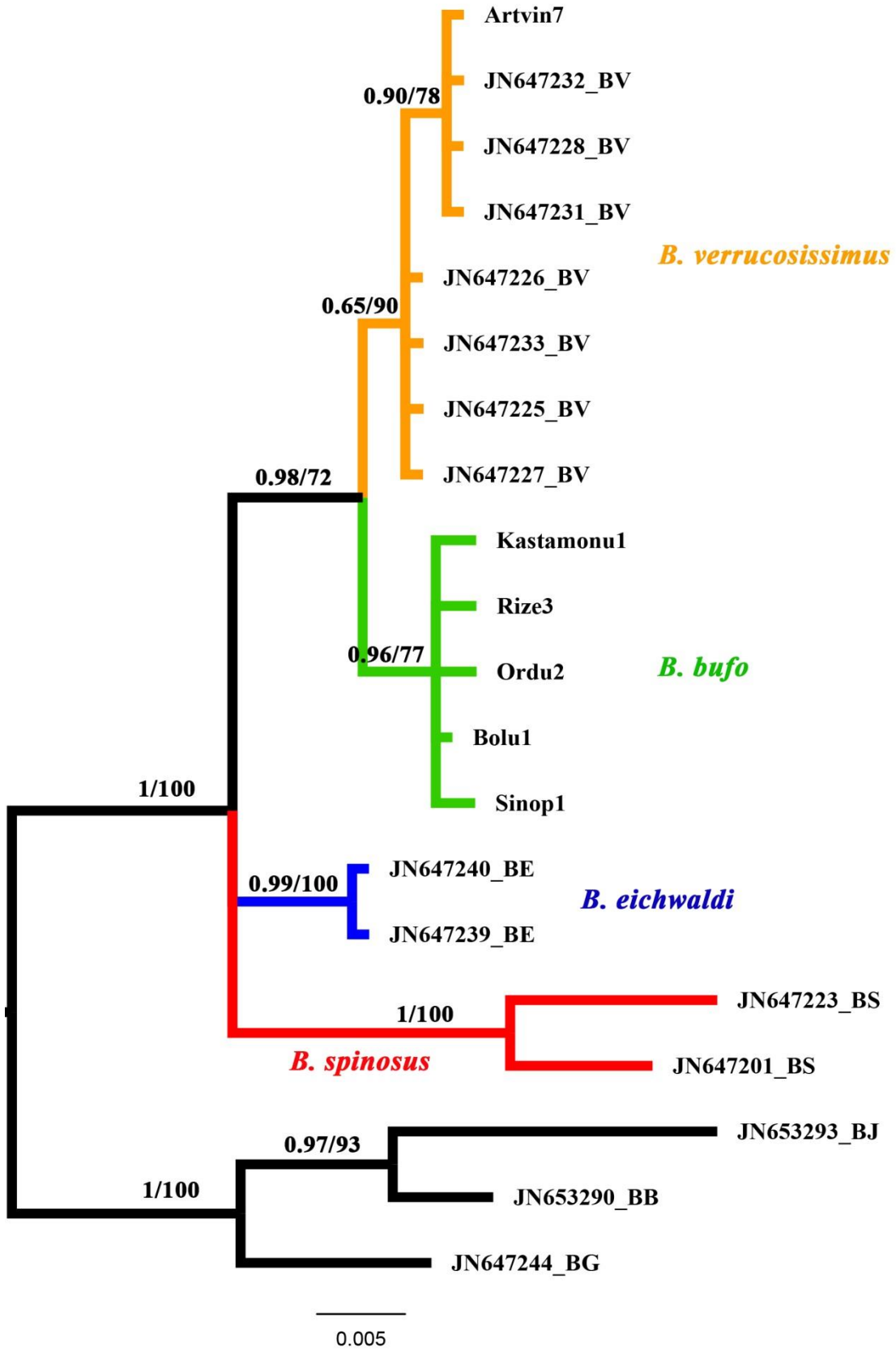
Haplotipler	Örnekler
Haplotip 1	Bolu1, Bolu2, Bolu6, Rize2, Giresun4, Trabzon1, Trabzon3, Trabzon7, Ordu1, Ordu3, Giresun5, Giresun6, Samsun2, Istanbul2, Istanbul3, Istanbul4, Bartın4, Bartın5, Bartın6, Kırklareli1, Kırklareli2, Kırklareli3, Karabuk3, Samsun1, Yalova1, Yalova2, Yalova3, Canakkale1, Canakkale2, Canakkale3, Kocaeli1, Kocaeli2, Kocaeli3, Kutahya1, Kutahya2, Kutahya3, Samsun4
Haplotip 2	Artvin7, Artvin8, Artvin9
Haplotip 3	Rize3, Rize1
Haplotip 4	Ordu2
Haplotip 5	Kastamonu1, Kastamonu2, Kastamonu3, Karabuk1, Karabuk2, Sinop2, Sinop3
Haplotip 6	Sinop1



Şekil 9. 16S ribozomal geni için haplotip ağı

Mitokondriyal DNA 16S rRNA gen bölgesi için elde edilen 547 bç'lik kısım kullanılarak Maksimum Olasılık ve Bayesian analizleri icra edilmiştir. Analizler sonucunda her iki yöntemden de elde edilen filogenetik ağaçlar aynı topolojik yapıya sahip olduklarından dolayı sonuçlar tek bir ağaç üzerinden gösterilmiştir (Şekil 10).

Analizler sonucunda Artvin7 haplotipi Kafkasya bölgesi bireyleriyle aynı dalda (0,65 MrBayes/90 Maksimum Olasılık) yer alırken, Kastamonu1, Rize3, Ordu2, Bolu1 ve Sinop1 haplotipleri kendi içinde bir dal (0,96/77) oluşturmuştur. Bunun sonucunda Artvin7 haplotipinin *Bufo verrucosissimus*, diğer haplotiplerin ise *Bufo bufo* türüne dahil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Artvin7 haplotipi Kafkasya'nın güneyindeki örneklerle ayrı bir dal olarak (0,90/78) kümelendiği görülmüştür.



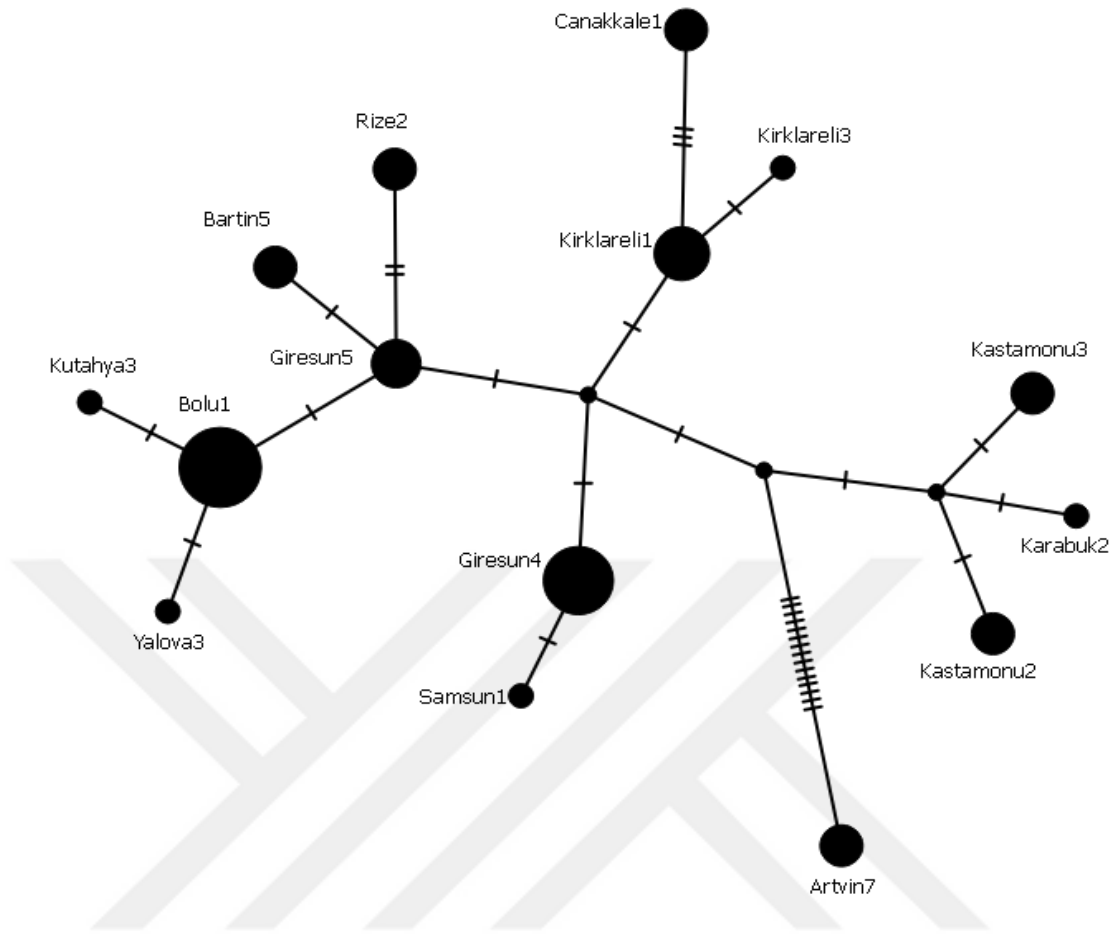
Şekil 10. MrBayes ve Maksimum Olasılık analizine göre oluşan 16S geni için filogenetik ağaç (dış grup; BJ: *Bufo japonicus*, BB: *Bufo bankorensis*, BG: *Bufo gargarizans*)

3.2. Sitokrom b Gen Dizileri ile Elde Edilen Bulgular

Çalışmadaki 51 örneğe ait Sitokrom b gen dizileri ile Network analizleri icra edilmiştir. Gerçekleştirilen Network analizleri sonucunda 15 farklı haplotip grubu (Tablo 5) tespit edilmiş ve haplotip ağ örgüsü grafiği görselleştirilmiştir (Şekil 11).

Tablo 5. Sitokrom b geni haplotip grupları

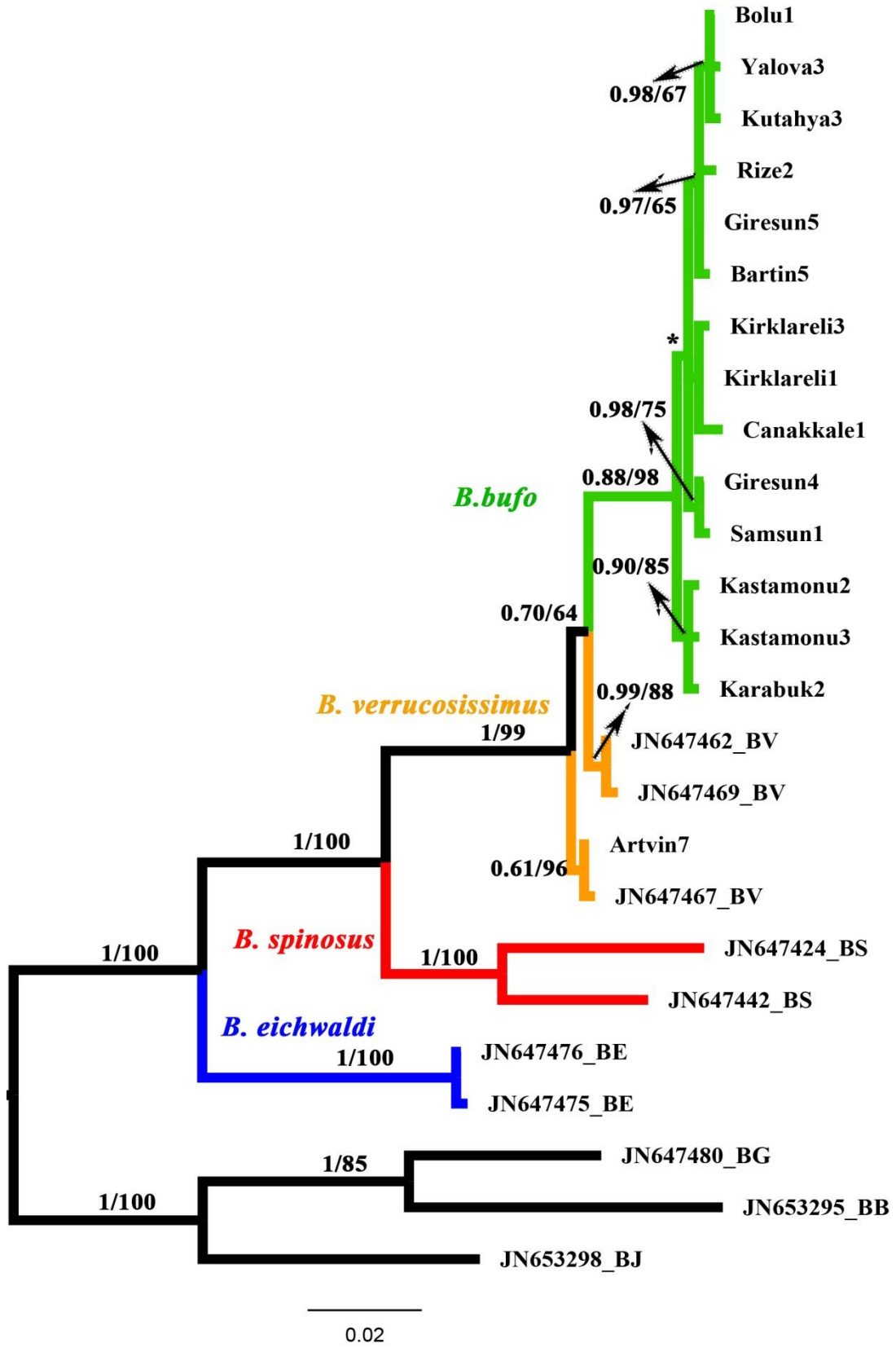
Haplotipler	Örnekler
Haplotip 1	Bolu1, Bolu2, Bolu6, Kocaeli1, Kocaeli2, Kocaeli3, Karabuk3, Yalova1, Yalova2, Kutahya1, Kutahya2
Haplotip 2	Artvin7, Artvin8, Artvin9
Haplotip 3	Rize2, Rize3, Rize1
Haplotip 4	Giresun4, Ordu1, Ordu2, Ordu3, Trabzon1, Trabzon3, Trabzon7, Samsun2
Haplotip 5	Giresun5, Giresun6, Sinop1, Samsun4
Haplotip 6	Samsun1
Haplotip 7	Bartın5, Bartın6, Bartın4
Haplotip 8	Kastamonu2, Kastamonu1, Karabuk1
Haplotip 9	Kirklareli1, Kirklareli2, İstanbul2, İstanbul3, İstanbul4
Haplotip 10	Kirklareli3
Haplotip 11	Kastamonu3, Sinop2, Sinop3
Haplotip 12	Canakkale1, Canakkale2, Canakkale3
Haplotip 13	Karabuk2
Haplotip 14	Yalova3
Haplotip 15	Kutahya3



Şekil 11. Sitokrom b geni için haplotip ağı

Mitokondriyal DNA Sitokrom b gen bölgesi için elde edilen 795 bç'lik kısım kullanılarak Maksimum Olasılık ve Bayesian analizleri icra edilmiştir. Analizler sonucunda her iki yöntemden de elde edilen filogenetik ağaçlar aynı topolojik yapıya sahip olduklarından dolayı sonuçlar tek bir ağaç üzerinden gösterilmiştir (Şekil 12).

Analizler sonucunda Artvin7 haplotipi Kafkasya bölgesinin güney bireyleriyle aynı dalda (0,61/96) yer alırken, Bolu1, Rize2, Giresun4, Giresun5, Samsun1, Bartin5, Kastamonu2, Kirklareli1, Kirklareli3, Kastamonu3, Canakkale1, Karabuk2, Yalova3, Kutahya3 haplotipleri kendi içinde bir dal (0,88/98) oluşturmuştur. Ayrıca Kaskasya Bölgesi'nin güney örnekleride kendi içinde bir dal (0,99/88) oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre Artvin7 haplotipinin *Bufo verrucosissimus*, diğer haplotiplerin ise *Bufo bufo* türüne dahil olduğu belirlenmiştir.



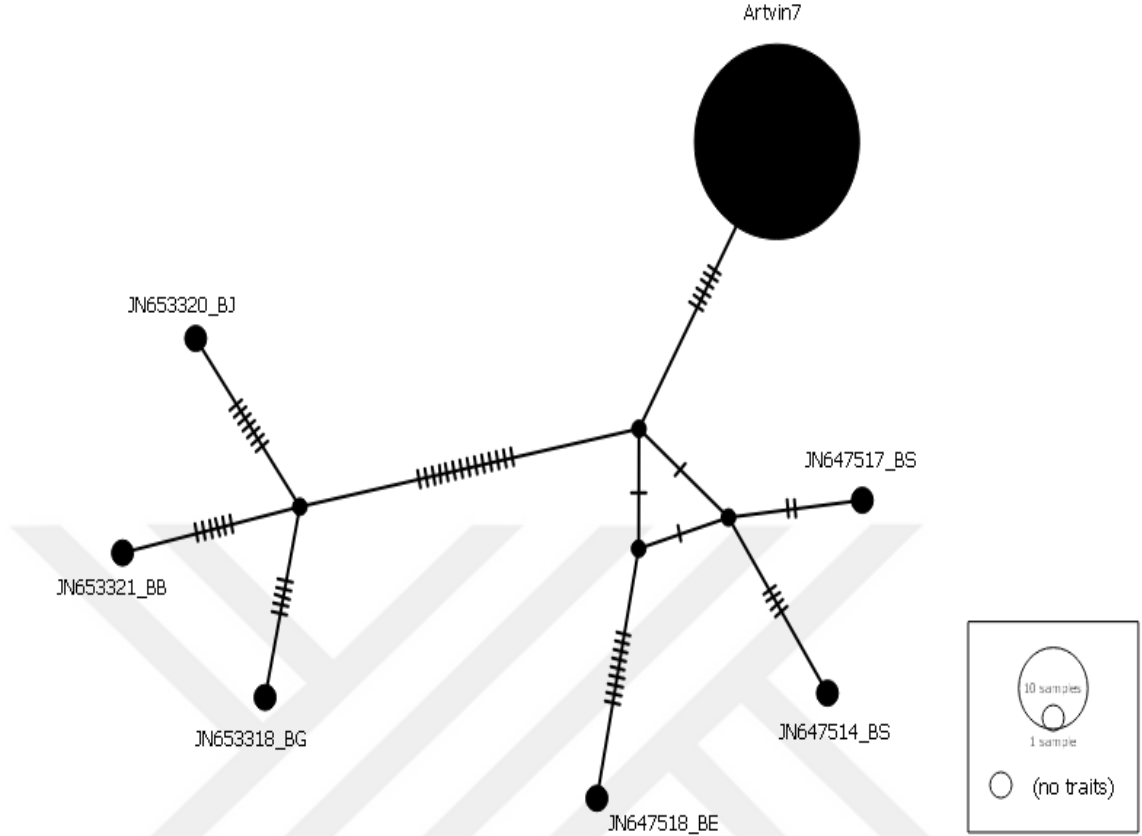
Şekil 12. MrBayes ve Maksimum Olasılık analizine göre oluşan Sitokrom b geni için filogenetik ağaç (dış grup; BJ: *Bufo japonicus*, BB: *Bufo bankorensis*, BG: *Bufo gargarizans*)

3.3. RPL3 Gen Dizileri ile Elde Edilen Bulgular

Çalışmadaki 51 örneğe ait RPL3 gen dizileri ve GenBank'tan elde edilen *B. verrucosissimus*, *B. spinosus*, *B. bankorensis*, *B. gargarizans*, *B. japonicus* ve *B. eichwaldi* türlerine ve alt türlerine ait RPL3 gen dizileri ile Network analizleri icra edilmiştir. Gerçekleştirilen Network analizleri sonucunda 7 tane haplotip grubu (Tablo 6) tespit edilmiş ve haplotip ağ örgüsü grafiği görselleştirilmiştir (Şekil 13).

Tablo 6. RPL3 geni haplotip grupları

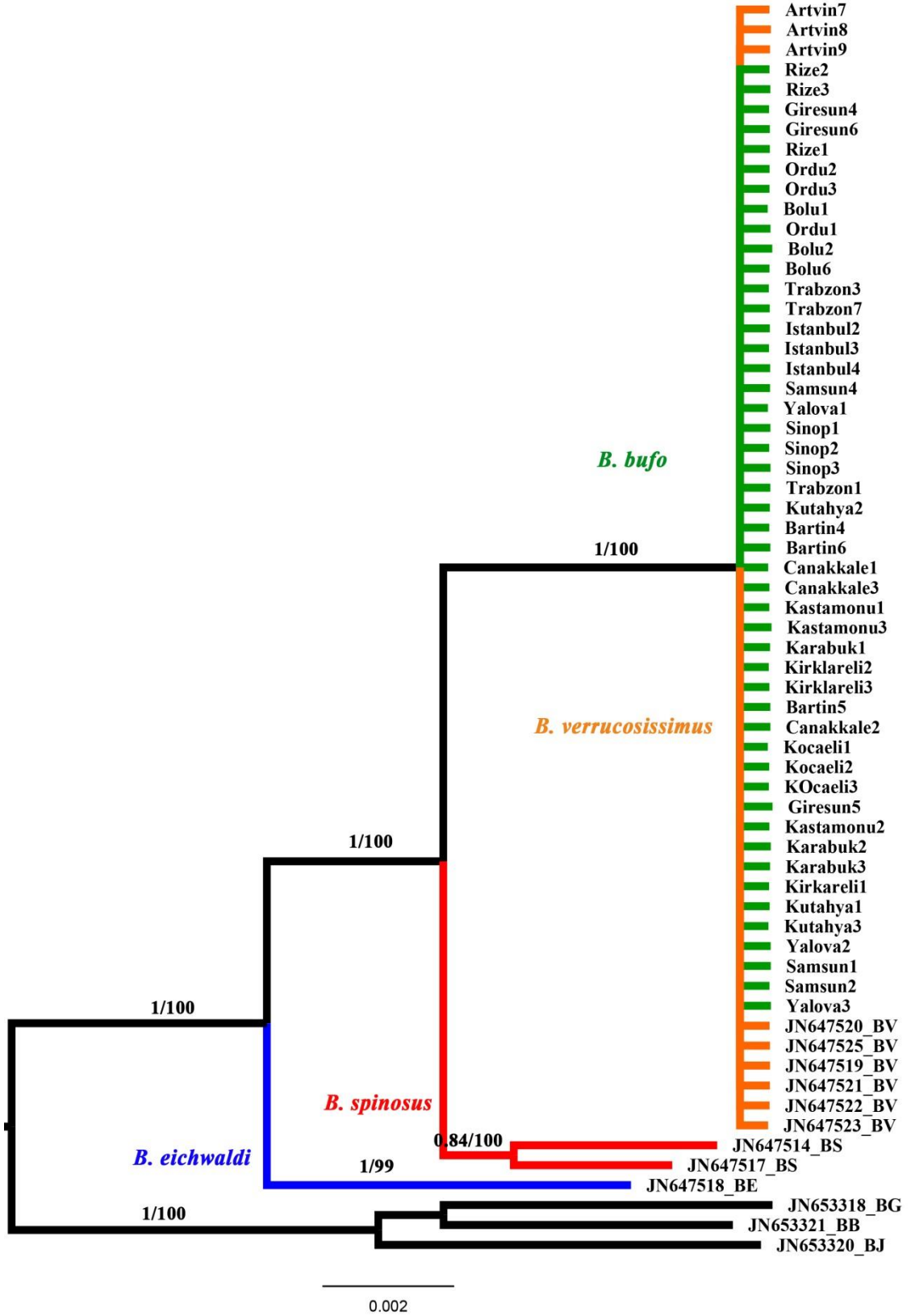
Haplotipler	Örnekler
Haplotip 1	Artvin7, Artvin8, Artvin9, Rize2, Rize3, Giresun4, Giresun6, Rize1, Ordu2, Ordu3, Bolu1, Ordu1, Bolu2, Bolu6, Trabzon3, Trabzon7, Istanbul2, Istanbul3, Istanbul4, Samsun4, Yalova1, Sinop1, Sinop2, Sinop3, Trabzon1, Kutahya2, Bartin4, Bartin6, Canakkale1, Canakkale3, Kastamonu1, Kastamonu3, Karabuk1, Kirklareli2, Kirklareli3, Bartin5, Canakkale2, Kocaeli1, Kocaeli2, Kocaeli3, Giresun5, Kastamonu2, Karabuk2, Karabuk3, Kirklareli1, Kutahya1, Kutahya3, Yalova2, Samsun1, Samsun2, Yalova3, JN647520-BV, JN647525-BV, JN647519-BV, JN647521-BV, JN647522-BV, JN647523-BV
Haplotip 2	JN647518-BE
Haplotip 3	JN647514-BS
Haplotip 4	JN647517-BS
Haplotip 5	JN653318-BG
Haplotip 6	JN653320-BJ
Haplotip 7	JN653321-BB



Şekil 13. RPL3 geni için haplotip ağı (BJ: *Bufo japonicus*, BB: *Bufo bankorensis*, BG: *Bufo gargarizans*; BS: *Bufo spinosus*; BE: *Bufo eichwaldi*)

Nükleer DNA RPL3 gen bölgesi için elde edilen 522 bç'lik kısım kullanılarak Maksimum Olasılık ve Bayesian analizleri icra edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda haplotipler için gruplaşma gözlemlenmediğinden dolayı analizler bireyler üzerinden yapılmıştır. Analizler sonucunda her iki yöntemden de elde edilen filogenetik ağaçlar aynı topolojik yapıya sahip olduklarından dolayı sonuçlar tek bir ağaç üzerinden gösterilmiştir (Şekil 14).

Filogenetik ağaç incelendiğinde, tez kapsamındaki tüm örneklerin ve GenBank'tan elde edilen *Bufo verrucosissimus* alttürlerine ait bireylerin aynı dal üzerinde (1/100) yer aldığı görülmüştür. Bu bağlamda RPL3 gen bölgesinin türler arası ayırım gücünün mitokondriyal gen bölgelerine kıyasla daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni nükleer genlerin mitokondriyal genlere göre daha yavaş bir evrimleşme sürecine sahip olmasıdır.



Şekil 14. MrBayes ve Maksimum Olasılık analizine göre oluşan RPL3 geni için filogenetik ağaç (dış grup; BJ: *Bufo japonicus*, BB: *Bufo bankorensis*, BG: *Bufo gargarizans*)

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kafkas coğrafyası tıpkı Akdeniz Havzası gibi Dünya üzerindeki önemli sıcak noktalardan birisidir. Topografik olarak 3 farklı dağ zinciri sistemi ile karakterize edilmektedir. Bu dağ sistemleri Kafkasya'nın kuzeyinde yer alan Büyük Kafkas Dağları, güneyinde yer alan Küçük Kafkas Dağları ve Talış-Elbruz Dağ Sistemi'dir. Küçük Kafkas Dağları'nın batı yakası Türkiye sınırları içerisindeki Doğu Karadeniz Dağları'dır. Büyük ve Küçük Kafkas Dağları arasında kalan bölge ise Trans-Kafkasya olarak adlandırılmaktadır. Kafkas coğrafyası sahip olduğu topografya ve buna paralel olarak özellikle de geçmiş jeolojik dönemler içerisinde meydana gelen iklim dalgalanmalarında sığınak görevi görmüş alanları bünyesinde barındırmıştır. Bu açıdan da hem tür içi hemde tür seviyesinde farklılıkların oluşmasında aktif rol oynamıştır.

Kutrup vd. (2006), yapmış olduğu çalışmada 16 popülasyondan toplam 29 *Bufo bufo* bireyinin 16S ribosomal RNA geninin 936 bazlık kısmının DNA dizin analizi yapılmıştır. Örneklerin toplandığı yerler; Artvin (Erenköy, Borçka), Rize (Fındıklı, Çamlıhemşin, Karasu, Gündoğdu), Trabzon (Araklı, Akçaabat, Yeşilova, Maçka), Mersin (Mezitli), Giresun, Giresun Adası ve Adapazarı'dır. Ayrıca İtalya'nın Matera (Garaguso), Yunanistan'ın Metsova (Pindos Dağları) kentlerinden *B. bufo* ve Sicilya (İtalya)'dan *B. b. spinosus* örnekleri de analizlere dahil edilmiştir. Yapılan filogenetik analizler sonucunda toplam 23 haplotip bulunmuş ve bu haplotipler arasında ise maksimum 17 baz (%0,11- %1,85) farklılık olduğu görülmüştür. Fakat bu farklılığın bir alttür oluşturacak kadar önemli olmadığı ve bunun tür içi varyasyon olduğuna karar verilmiştir. Bu çalışmayı Kutrup vd. (2006), Karadeniz hattı boyunca doğrulamıştır. Fakat Kutrup vd. (2006), aksine Artvin ilinde *Bufo verrucosissimus* türünün varlığı ortaya çıkarılmıştır.

Litvinchuk vd. (2008), allozim belirteçler kullanarak gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda Anadolu coğrafyasındaki *Bufo* popülasyonlarının tamamının *B. verrucosissimus* türü olarak değerlendirilmesini önermişlerdir. Fakat bu çalışmada *B. verrucosissimus* türünün sadece Artvin ili içerisinde var olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar Litvinchuk vd. (2008), çalışmasını doğrulamamaktadır.

Recuero vd. (2012), mitokondriyal ve nükleer belirteçler kullanarak *Bufo bufo* tür grubunun filogenetik tarihi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmanın sonucunda, *Bufo bufo* ve *Bufo verrucosissimus* türlerinin son ortak atasının yaklaşık 5 milyon yıl önce Kafkas coğrafyasında yayılış gösterdiğini, türlerin ise Pleistosen dönemi içerisinde ayrılmaya başladığını, bu durumun oluşmasında ise iklimsel dalgalanmaların ve deniz seviyelerindeki düşüşlerin etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Proje kapsamındaki verilerle kıyaslanınca elde edilen filogenetik sonuçların Recuero vd. (2012), çalışmasında elde edilen sonuçlarla aynı eksende olduğu ve oluşturulan filogenetik ağaçlardaki gruplaşmaların Recuero vd. (2012), çalışmasındaki ağaçlar ile aynı gruplaşmayı yansıttığı belirlenmiştir.

Garcia-Porta vd. (2012), mitokondriyal belirteçler kullanarak Palearktrik'te yayılış gösteren *Bufo* cinsine ait bütün türlerin filogenisi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada Kafkasya, Bolu ve Alanya örneklerini *Bufo verrucosissimus* türü olarak ifade etmişlerdir. Çalışma sonucunda örnekleri Kafkas kladı olarak tanımlamış ve bu kladın içerisinde üç ayrı alt grubun varlığını ifade etmişlerdir. Bu alt gruplar Güney Kafkasya, Kuzey Kafkasya ve Anadolu alt grupları olarak tanımlanmıştır. Tür içerisinde meydana gelen bu gruplaşmanın sebebini ise özellikle Pleistosen dönemi içerisinde meydana gelen ardışık buzul dönemleri olarak belirtmişlerdir. Buzul hareketlerine bağlı olarak populasyon sınırlarının daralma-genişleme yönlü döngüleri farklılaşmayı tetikleyici etken olarak düşünülmüştür. Ayrıca bu dönemler içerisinde Balkanlar'ın doğusu ve Anadolu'nun doğusunu kapsayan coğrafyanın *Bufo bufo* türü içinde bir sığınak görevi gördüğünü de ifade etmişlerdir. Kutrup vd. (2006), yaptıkları çalışmanın da kendilerini doğruladığını belirtmişlerdir. Bu çalışma kapsamında *Bufo verrucosissimus* türü içerisinde gözlenen filogenetik soy hatları Garcia-Porta vd. (2012), elde ettikleri soy hatları ile aynı soy hatları olarak belirlenmiştir. Fakat bahsedilen çalışmanın aksine Bolu İli populasyonu *Bufo Bufo* olarak belirlenmiştir.

Arntzen vd. (2013b), *B. bufo* tür grubunun sistematigi hakkında moleküler verilere dayanarak durumun ne kadar karmaşık olduğu konusunda bir makale yayımlamışlardır. Çalışmalarında, Recuero vd. (2012)'nin makalesinde yer alan nükleer sekanslar yeniden analiz edilmiştir. Sonuç olarak *B. bufo* ile *B. eichwaldi*'nin tür durumlarının kesin olduğu fakat *B. spinosus* ile *B. verrucosissimus*'un durumunun

belirsizliğini koruduğu belirtilmiş ve aksi detaylı bilgilerle kanıtlanıncaya kadar Orlova ve Tuniyev (1989), tarafından tür olarak bildirilen *B. verrucosissimus* un tür durumunun korunması gerektiğini vurgulamışlardır. Sadece Bolu’da *B. bufo* ile *B. verrucosissimus*’un simpatrik yaşadığı yazılmıştır. Bazı lokuslarda nükleer DNA haplotiplerini paylaştıkları ancak alel paylaşımında bir coğrafik örüntünün olmamasını hibridizasyondan ziyade “incomplete lineage sorting”e bağlamışlardır. Fakat Bolu’daki durumun hala belirsizliğini koruduğunu vurgulamışlar ve *B. verrucosissimus*’un taksonomik durumu için başka çalışmaların yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca aksi tam olarak ispatlanana kadar Recuero vd. (2012), *B. verrucosissimus*’un tür durumunu devam ettirilmesi sonuçlarına uyulması gerektiği savunulmuştur. Bu çalışma sonucunda da *Bufo verrucosissimus*’un tür durumu doğrulanmıştır. Fakat Arntzen vd. (2013b)’in aksine Bolu ilinde simpatrik bir yaşamın olmadığı ve bu ilde *Bufo bufo*’nun dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Babik vd. (2005), Avrupa’da dağılışı gösteren *Triturus* cinsi üzerinde mitokondriyal belirteçler kullanarak filocoğrafik bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda Kafkasya’da dağılım gösteren *Triturus vulgaris lantzi* alttürüne (güncel sistematik: *Lissotriton lantzi*) ait örnekler tek bir klad içerisinde kümelenmiştir. Bu klad kendi içerisinde kuzey ve güney olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Bu çeşitliliğin oluşmasında Pleistosen Dönemi içerisinde meydana gelen iklim dalgalanmalarının yanı sıra sığınak görevi gören alanların etkisinden de söz etmişlerdir. Anadolu ve Kafkaslar’ın sahip olduğu kompleks coğrafik yapı ve ayrıca içlerindeki dağ zincirleri yayılımı engelleyen güçlü bariyerler olarak işlev gördüğünü ve bu çeşitliliği ortaya çıkmasında rol oynadıklarını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Babik vd. (2005), çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Gabelaia vd. (2015), Kafkas ekolojik bölgesinde dağılım gösteren ve monofiletik bir tür grubu olan *Darevskia* cinsine dahil *Darevskia mixta* türünün morfolojisi ve filocoğrafyası üzerinde çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen filogenetik ağaç güçlü şekilde ayrılmış iki klad içermektedir ve bu kladlar Büyük Kafkas Dağları örnekleri ve Küçük Kafkas Dağları örnekleri olarak gruplaşmıştır. Bu grupların yaklaşık olarak 0.75 milyon yıl önce ayrıldığı tahmin edilmiştir. Bu dönem Orta Pleistosen içerisine denk düşmektedir. Bu dönem içerisinde meydana gelen iklim

dalgalanmaları özellikle Kafkas bölgesinde evrimsel soy hatlarının çoklu ayrımını tetikleyen olay olarak düşünülmektedir (Tarkhnishvili, 2014). Bu etkenin yanı sıra, iki dağ zinciri arasındaki vadiler ve nehirler gibi coğrafik faktörlerin bariyer görevi gördüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca Orta Pleistosen sonrasında yağışlarda meydana gelen azalmaya bağlı olarak uygun nemli habitatların parçalanmasında farklılaşmaya etki etmiştir. Küçük Kafkaslar'ın merkezi bu dönemler içerisinde canlılar için önemli bir sığınak görevi görmüştür. Büyük Kafkaslar'a kıyasla daha uygun ekolojik şartları içerisinde barındırmıştır. Küçük Kafkaslar'ın önemli sığınak görevi gören iki alanı Gürcistan'ın merkezi ve Türkiye'nin Doğu Karadeniz kıyıları olarak belirlenmiştir (Tarkhnishvili vd., 2000; Tarkhnishvili vd., 2012). Bahsedilen sonuçlar göz önüne alındığında, bu çalışma sonucunda Kafkasya ve Artvin İli örneklerinin gösterdiği gruplaşmanın meydana gelişi Gabelaia vd. (2015), ifade ettikleri etkenler ile şekillenmiş olma ihtimali mümkün bir ihtimaldir.

Tarkhnishvili vd. (2000), Gürcistan ve Türkiye'nin Doğu Karadeniz kıyıları boyunca dağılım gösteren *Mertensiella caucasica* türüne ait 10 popülasyonu nükleer ve mitokondriyal belirteçler kullanarak popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma ve jeolojik tarihi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda coğrafik olarak 2 farklı soy hattının var olduğunu ifade etmişlerdir. Bu soy hatlarının ayrılmasının Pleistosen öncesinde başladığını belirlemişlerdir. İfade ettikleri üzere, Üst Paleosen ve en azından Orta Miyosen'e kadar olan süreçte Kafkaslar, Paratetis Denizi'nin ortasında kıtasal levhalardan izole olan bir ada şeklinde konumlanmıştır. Üst Miyosen döneminde Anadolu karasıyla birleşmeye başlayıp Pliyosen döneminde birleşmesini tamamlamıştır. Bu dönem boyunca meydana gelen orojenik aktiviteler sonucunda yüksek dağ formasyonları meydana gelmiştir (Kholodov and Nedumov, 1996). Bu süreç Kafkas kıstağının batı yakasındaki subtropikal ormanların birkaç farklı sığınak şeklinde daralmasına neden olmuştur. Günümüzde Karadeniz havzasının doğusu bu alanların bir tanesi olup *Mertensiella caucasica* dağılışı gösterdiği bölgedir. Bir diğer alan türün dar bir yayılım gösterdiği Borjomi bölgesinde ki dağlık alanlardır. Türün doğu soy hatları bu alan içerisinde yer almaktadır. Soy hatlarındaki ayrılma muhtemelen Kafkas Adası ve Anadolu'nun birleşmesiyle başlamıştır. Türün büyük Kafkaslar'da var olmaması bu durumu doğrulamaktadır. Çünkü orojenik olarak Küçük Kafkaslar, Büyük Kafkaslar'dan ziyade Anadolu platosuyla aynı çizgidedir. Soy hatlarındaki farklılaşma

pliyosen döneminde subtropikal ormanlık alanların parçalanmasını işaret etmektedir. Bu çalışma içerisinde GenBank üzerinden elde edilen ve Borjomi'ye ait olan *B.verrucosissimus* örneği Artvin İli örnekleri ile beraber gruplaşmıştır. Dolayısıyla elde edilen veriler Tarkhnishvili vd. (2000)'nın bahsettiği coğrafik parçalanmayı desteklememektedir.

Seddon vd. (2002), Orta Avrupa'dan İran'a kadar yayılış gösteren *Erinaceus concolor* türü üzerinde mitokondriyal belirteçler kullanılarak türün filocoğrafyasını belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir ve özellikle Kafkasya'nın doğusundaki popülasyonların potansiyel bariyerlerle ilişkilerini ortaya koymayı hedeflemişlerdir. Çalışma sonucunda Kafkas Dağları'nın kuzey ve güney örnekleri açık şekilde ayrıldığı ve monofiletik kladlar oluşturdukları belirlenmiştir. Güney Kafkasya örneklerinin Türkiye örnekleri ile yakın ilişkili olarak ortaya çıkarılmıştır. Kafkas Dağları'nın kuzey ve güney örnekleri arasındaki kayda değer genetik farklılık belirgindir. Bu iki grup batıda boğazlarla doğuda ise Kafkaslar'ın yüksek dağlarıyla birbirinden ayrılmıştır. Bu tipte bir dağılım farklı buzul sığınaklarının ve buzul dönem sonrası kolonizasyon rotalarının varlığını açıkça göstermiştir. Ayrıca Kafkas Dağları'nın kuzey ve güney yakaları farklı iklimsel koşullar sergilediğinden soy hatları farklı ekolojik baskılara maruz kalmış ve bu yönde adapte olmuşlardır. Kirpilerin güney Kafkasya'daki sığınak alanları kuzey kladına nazaran daha az bilinmektedir. Fakat fosil ve iklim verileri muhtemel bir sığınığın varlığını işaret etmektedir. Son buzul maksimumunda Türkiye'nin kuzeyinde Karadeniz'in güney kıyısında dar bir bant şeklinde ılıman ormanlar varlık göstermiştir. Bu alan Güney ve Batı Kafkasya arasında yama şeklinde bir uzantı oluşturmuştur ve muhtemelen bir sığınak görevi görmüştür. Diğer yandan güney grubu içerisindeki genetik alt bölünmeler daha kompleks bir sığınak tarihini işaret etmektedir. Bu ayrılma sığınak alanı içerisinde popülasyonun parçalanmasıyla meydana gelmiş olup iklim ve vejetasyondaki boyutsal çeşitliliğin bir sonucu olarak veya coğrafik olarak birkaç farklı sığınığın varlığıyla ifade edilebilirler. Örneğin, Türkiye'nin kuzeyinde parçalanmış bir sığınak, güney Kafkaslar ve batı Türkiye soy hatlarının ayrı ayrı farklılaşmasına neden olmuş olabilir (Hewitt, 1996; Huntley, 1999). Düşük enlemlerde bulunması ve çeşitlilik gösteren topografyası doğu Avrupa'yı, Türkiye'yi ve Güney Kafkasları buzul dönemlerinde sığınak alanları olarak konumlandırmıştır. Ardışık buzul dönemleri bu alanlarda genetik soy hatlarının

farklılaşmasını meydana getirmiştir. Kirpilerde olduğu gibi derin farklılık gösteren bazı türlerin farklılaşma tarihi erken Pleistosen'e dayanmaktadır. Son olarak bu türün Alpler ve Preneler üzerinde buzul dönemi sonrası kuzey yönlü kolonizasyonu göz önünde alındığında Kafkas Dağı'nın tür için güçlü bir bariyer görevi gördüğü anlaşılmaktadır.

Bu çalışma da elde edilen sonuçlar Seddon vd. (2002)'nin elde ettiği sonuçlar ile kıyaslanınca benzerlik göstermektedir. Türkiye ve Gürcistan'ın güneybatısında yayılış gösteren *B. verrucosissimus* örnekleri Kafkaslar'ın kuzey kısımlarında yayılış gösteren diğer alttürlerle ait örneklerle ayrı birer grup oluşturmaktadırlar. Seddon vd. (2002)'nin bahsettiği üzere buzul dönemleri içerisinde Kafkasya ve Türkiye'de var olan farklı sığınıklar popülasyonlara liman görevi görmüş ve farklılaşmayı beraberinde getirmiş olabilir. Ayrıca tıpkı Akdeniz Bölgesi gibi, Kafkasya'nın dağlık yapısı da doğal topografik bariyerler oluştururarak bu farklılığa katkıda bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Seddon vd. (2002)'nin filocoğrafik senaryolarına uygunluk göstermektedir.

Boursot vd. (1996), *Mus musculus* türü üzerinde mitokondriyal belirteçlerden yararlanılarak türün filogenisi ve coğrafi yayılışı hakkında bir çalışma ortaya koymuşlardır. Çalışma sonucunda *Mus musculus* türünün 2 alt türü olan *Mus musculus musculus* ve *Mus musculus domesticus*'un coğrafik dağılımlarının filogenetik sonuçlarla örtüştüğünü ifade etmişlerdir. Anadolu içerisinde dağılış gösteren *M. m. domesticus* alt türü ve Kafkasya'nın kuzeyinde dağılış gösteren *M. m. musculus* alttürlerini coğrafi olarak sınırlayan bariyerlerin Kafkas Dağları olduğunu belirtmiştir.

Manceau vd. (1999), mitokondriyal belirteçler kullanarak *Capra* cinsinin sistematüğini ortaya koymayı hedeflemişlerdir. Çalışma sonucunda Kafkasya'da iki farklı mitokondriyal DNA kladı belirlemişlerdir. Doğu-batı yönlü bir farklılaşmanın var olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada Kafkasya içerisinde belirlenen farklı soy hatlarıda Manceau vd. (1999), sonuçlarını desteklemiştir. Tür içi farklı soy hatlarının varlığı bölgenin dağlık topografyası ile ilintilidir.

Rossiter vd. (2007), *Rhinolophus ferrumequinum* türü üzerinde mikrosatellit dizileri kullanılarak türün popülasyon tarihi, taksonomisi ve geniş ölçekli filogenisi üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Uzak Asya'dan, Kuzey Afrika'ya kadar çeşitli

alanlarda örnekler toplanarak değerlendirilmiş ve genetik çeşitlilik ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Türkiye ve Suriye örnekleri beraber kümelenmiş diğer örneklerden ise ayrılmışlardır. Bu durum Avrupa ve Anadolu arasında en azından son buzul maksimumunda Marmara Denizi'nin bir bariyer görevi gördüğünü ve populasyonların sığınaklar içerisinde sınırlı kaldığını işaret etmektedir. Güney Batı Rusya (Kafkasyanın kuzeyi) örnekleri, Suriye ve Türkiye örnekleriyle farklılık göstermiştir ve bu durum Kafkas Dağları'nın kuzeyinde var olmuş bir sığınak ile ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla genetik farklılaşmayı da beraberinde getirmiştir.

Mumladze vd. (2013), Kafkas endemiği olarak bilinen ve Gürcistan'da, Türkiye'nin kuzey doğusunda yayılış gösteren *Helix* cinsine ait *Helix buchii*, *Helix goderdziana* türlerini mitokondriyal ve nükleer belirteçler kullanarak sistematik ve evrimsel tarihi açısından incelemişlerdir. Ayrıca çalışma içerisinde morfolojik karakterlerden yararlanmışlardır. Çalışma sonucunda türlerin genetik olarak iki farklı tür olduğu belirlenmiş, morfolojik verilerle bu durum desteklenmiştir. Bu türlerden *Helix goderdziana* türünün dağılım alanı Küçük Kafkaslar'ın batısında, Gürcistan'ın güney batısı ve Türkiye'nin kuzey doğusuyla sınırlıdır. Paleontolojik verilerin desteklediği üzere bu alan son buzul maksimumunda sığınak görevi görmüştür (Zeist, and Bottema, 1988; Van Andel and Tzedakis 1996). Ayrıca *Mertensiella caucasica* üzerinde yapılan bir moleküler genetik çalışmanın sonucunda bu alan içerisinde buzul öncesi dönemlerde 2 farklı evrimsel soy hattının varlığını ortaya koymuştur. Bu soy hatlarına batı soy hattının dağılım alanı bahsedilen bu orman sığınağıyla örtüşmektedir yani *Helix goderdziana* türünün dağılım alanı sınırları içerisinde. Doğu soy hattı ise Gürcistan'ın merkezi içerisinde çok küçük bir alan ile sınırlıdır. Bu bulgular bahsedilen ormanlık sığınağın doğusunda daha küçük ormanlık sığınakların varlığını desteklemektedir (Tarkhnishvili vd., 2012). Sığınak görevi gördüğü bahsedilen bu büyük alan içerisindeki doğu soy hatlarından ayıran coğrafik hat Gürcistan'ın güney batısında Mesket Dağları'nı kesen bir kurak iklim kemeridir (Tarkhnishvili vd., 2008). Bu çalışmada da elde edilen soy hatlarının, Mumladze vd. (2013), bahsettiği üzere bu sığınak alanlarının etkisi ile oluştuğu düşünülebilecek bir olasılıktır.

Yine farklı türlerle yapılan bazı çalışmalar da Kafkasya içerisindeki tür ve tür içi seviyede meydana gelen genetik farklılaşmalarda dağlık yapı ve iklimsel dalgalanmaların aktif rol oynadığını desteklemektedir (Murphy vd., 2000; Pidancier vd., 2006; Zvychnaya vd., 2010; Wielstra vd., 2013).

Bu çalışmada:

- 1- *Bufo verrucosissimus* türünün Kafkasya Bölgesi'ne ek olarak Kuzey Anadolu sınırları içerisinde sadece Artvin ili Borçka'ya kadar dağılım gösterdiği netleşmiştir.
- 2- Kuzey Anadolu Bölgesinin kalan bütün sınırlarında *Bufo bufo* türünün doğuda Rize ili Çamlıhemşin ilçesine kadar yayılım gösterdiği kesinleşmiştir.
- 3- Kafkas Dağları'nın tür için doğal bariyerler meydana getirdiği, Pleistosen dönemindeki iklim değişimlerinin genetik farklılaşmayı tetiklediği,
- 4- Bu farklılaşmanın meydana gelişinde Kafkasya Bölgesi'nin sahip olduğu heterojen topografik yapı, fazlaca dağlık alanların bulunması, derin dağ vadileri, büyük nehirler gibi etkenlerin yanı sıra bu alanlar içerisinde uygun şartları ihtiva etmiş bölgelerin Pleistosen Dönemi iklim dalgalanmaları sırasında sığınak işlevi görmesi ile sağladığı yalıtımın etkisinin olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır.

5. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında örneklenen coğrafi alanlarda var olan türler ve filogenetik ilişkiler net olarak ortaya koyulmuştur. Fakat türlerin arasında olması muhtemel sekonder kontak zonlar (hibrit zonlar) hakkında bir değerlendirme yapılmamıştır. İleriki dönemlerde Artvin ve Rize illeri arasında var olması muhtemel sekonder kontak zonlar belirlenerek, türler arasındaki hibritleşme düzeyi, kontak zonların coğrafi büyüklüğü ve türler arası gen akışı araştırabilecek bir konudur.



KAYNAKLAR

- Adamia, S., Alania, V., Chabukiani, A., Kutelia, Z. and Sadradz, N., 2011a.** Great Caucasus (Cavcasioni): A Long-lived North-Tethyan Back-Arc Basin. Turkish Journal of Earth Sciences, 20, 611-628. DOI: 10.3906/yer-1005-12
- Adamia, S., Zakariadze, G., Chkhotua, T., Sadradze, N., Tsereteli, N., Chabukiani, A. and Gventsadze, A., 2011b.** Geology of the Caucasus: A Review. Turkish Journal of Earth Sciences, 20, 489-544. DOI: 10.3906/yer-1005-11
- Akaike, H., 1974.** A New Look at the Statistical Model Identification, The Institute of Electrical and Electronics Engineers, 19, 716-723.
- Arntzen, J.W., Recuero, E., Canestrelli, D. and Martínez-Solano, I., 2013a.** How complex is the *Bufo bufo* species group?, Molecular Phylogenetics and Evolution, 69(3), 1203-1208. DOI: org/10.1016/j.ympev.2013.07.012
- Arntzen, J.W., McAtear, J., Recuero, E., Ziermann, J.M., Ohler, A., Van Alphen, J. and Solano, M.İ., 2013b.** Morphological and genetic differentiation of Bufo toads: two cryptic species in Western Europe (Anura, Bufonidae). Contributions to Zoology, 82(4), 147-169.
- Arntzen, J.W., 1999.** Sexual selection and male mate choice in the common toad, *Bufo bufo*. Ethology Ecology and Evolution, 11, 407-414. DOI: 10.1080/08927014.1999.9522823
- Arntzen, J.W., De Vries, W., Canestrelli, D. and Solano, İ.M., 2017.** Hybrid Zone Formation and Contrasting outcomes of secondary contact over transect in Common Toads. Molecular Ecology, 26, 1-13. DOI: 10.1111/mec.14273
- Arntzen, J.W., McAtear, J., Butôt, R. and Solano, İ.M., 2018.** A common toad hybrid zone that runs from the Atlantic to the Mediterranean. Amphibia-Reptilia, 39(1), 41-50. DOI: 10.1163/15685381-00003145
- Arntzen, J.W., Wilkinson, W.J., Butot, R. and Solano, İ.M., 2014.** A new vertebrate species native to the British Isles: *Bufo spinosus* Daudin, 1803 in Jersey. Herpetological Journal, 24, 209-216.
- Babik, W., Branicki, W., Crnobrnja-Isailovic, J., Cogalniceanu, D., Sas, I., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Garcia-Paris, M. and Arntzen, J.W., 2005.** Phylogeography of two European newt species-discordance between mtDNA and morphology. Molecular Ecology, 14, 2475-2491. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02605.x
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1), 37-48. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

- Baran, İ., Ilgaz, Ç., Avcı, A., Kumlutaş, Y. ve Olgun, K., 2012.** Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu yayınları, yayın no: 207, 4. Baskı, ISBN: 978-975-403-703-6, 204 s., 1-2-25.
- Baran, İ., Tosunoğlu, M., Kaya, U. ve Kumlutaş, Y., 1997.** Çamlıhemşin (Rize) Civarının Herpetofaunası Hakkında Bir Çalışma. Turkish Journal of Biology, 21, 409-416.
- Başbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R. and Quicke, D.L.J., 2000.** Phylogenetic Systematics. Önder Matbaa, First Edition, ISBN: 975-93823-0-X, 134 s., 3-4.
- Başoğlu, M. ve Özeti, N., 1973.** Türkiye Amfibileri. Fen Fakültesi Kitapları Serisi, yayın no:50, 85-99.
- Bodenheimer, F.S., 1994.** Introduction into the Knowledge of the Amphibia and Reptilia of Turkey. Review of the Faculty Science İstanbul, 9(9), 1-78.
- Boursot, P., Din, W., Anand, R., Darviche, D., Dod, B., Deimling, F.V., Talwar, G.P. and Bonhomme, F., 1996.** Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA Phylogeny. Journal of Evolutionary Biology, 9(4), 391-415. DOI: 10.1046/j.1420-9101.1996.9040391.x
- Chan, H.Y.E., Zhang, Y., Hoheisel, J.D. and O’Kane, C.J., 1998.** Identification and characterization of the gene for *Drosophila* L3 ribosomal protein. An International Journal on Genes and Genomes, 212, 119-125.
- Clark, R.J. and Clark, E.D., 1973.** Collection of Amphibians and Reptiles from Turkey. California Academy of Science, 104, 1-62.
- Clement, M., Posada, D. and Crandall, K.A., 2000.** TCS, a computer program to estimate gene genealogies, Molecular Ecology, 9, 1657-1659.
- Creer, S., 2007.** Choosing and using introns in molecular phylogenetics. Evolutionary Bioinformatics, 3, 99-108.
- Cvetkovic, D., Aleksic, I. and Isailovic, J.C., 2003.** Reproductive Traits in Common Toad *Bufo bufo* from the Vicinity of Belgrade. Archives of Biological Sciences, 55, 3-4.
- Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P. and Villafuerte, R., 2008.** Key Role of European Rabbits in the Conservation of the Western Mediterranean Basin Hotspot. Society for Conservation Biology, 22(5), 1106-1117. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2008.00993.x
- Demirsoy, A., 2008.** Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası, Hayvan Coğrafyası. Meteksan A.Ş. yayınları, yayın no: 08-06-Y-0057-02, 7. Baskı, ISBN: 978-975-7746-33-1, 1007 s., 163.

- Demirtaş, S., 2012.** Türkiye *Erinaceus* (Erinaceomorpha: Mammalia) Cinsinin Moleküler Filocoğrafyası. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Türkiye, 229 s., 2.
- Denton, S.J. and Beebee, J.C., 1994.** The basis of niche separation during terrestrial life between two species of toad (*Bufo bufo* and *Bufo calamita*): competition or specialisation?. *Oecologia*, 97, 390-398.
- Duellman, E.W. and Trueb, L., 1994.** Biology of Amphibians. The John Hopkins Universty Press, ISBN: 0-8018-4780-X, 670 s., 21-23.
- Düşen, S., 2011.** The helminth parasites of the two bufonid toads, European Common Toad, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) and European Green toad, *Bufo (Pseudepidalea) viridis* Laurenti, 1768 (Anura: Bufonidae), collected from Denizli Province, Inner-West Anatolia Region, Turkey. *Helminthologia*, 48(2), 101-107.
- Eiset, J., 1965.** Einige Amphibien und Reptilien aus der Nordoslichen Türkei, Gesammelt Von Hern H. Steiner. Annual Natural History Museum Wien, 67, 387-389.
- Esposti, M.D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. and Meyer, A., 1993.** Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143(3), 243-271. DOI: 10.1016/0005-2728(93)9197-N
- Freeman, S. and Herron, J.C., 2009.** Evrimsel Analiz. Palme yayınları, yayın no: 527, 2. Baskı, ISBN: 978-605-5829-53-7, 838 s., Çıplak, B. (Ç. Ed.), Başibüyük, H.H. (Ç. Ed.), Karaytuğ, S. (Ç. Ed.) ve Gündüz, İ. (Ç. Ed.), 612.
- Friedlander, T.P., Regier, J.C. and Mitter, C., 1992.** Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates. *Systematic Biology*, 41, 483-490.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. and Wheeler, W.C., 2006.** The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1-370.
- Frost, D.R., 2011.** Amphibian Species of the World: an Online Reference Version 5.5, Museum of Natural History; New York, January 31, Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American>.
- Futuyma, J.D., 2008.** Evrim. Palme yayınları, yayın no: 479, 1. Baskı, ISBN: 978-9944-341-84-4, 611 s., Kence, A. (Ç. Ed.) ve Bozcuk, N. (Ç. Ed.), 393.

- Gabelaia, M., Tarkhnishvili, D. and Murtskhvaladze, M., 2015.** Phylogeography and morphological variation in a narrowly distributed Caucasian rock lizard, *Darevskia mixta*. *Amphibia-Reptilia*, 36, 45-54. DOI: 10.1163/15685381-00002975
- Garcia-Porta, J., Litvinchuk, S.N., Crochet, P.A., Geniez, P.H., Lo-Valvo, M., Lymberakis, P. and Carranza, S., 2012.** Molecular phylogenetics and historical biogeography of the west-palearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63, 113-130. DOI: 10.1016/j.ympev.201112.019
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Casal-Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Karst, H., Kottelat, M., Kovacic, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marcic, Z., Özuluğ, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Sanda, R., Schneider, M., Slechtova, V., Stoumboudi, M., Walter, S. and Freyhof, J., 2014.** Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 14, 1210-1221. DOI: 10.1111/1755-0998.12257
- Goebel, A.M., Donnelly, J.M. and Atz, M.E., 1999.** PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome b in Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(1), 163-199. DOI: 10.1006/mpev.1998.0538
- Gül, S., Kumlutaş, Y. and Ilgaz, Ç., 2018.** Potential distribution under different climatic scenarios of climate change of the vulnerable Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*): A case study of the Caucasus Hotspot. *Biologia*, 73(2), 175-184. DOI: 10.2478/s11756-018-0020-y
- Gür, H., 2017.** Geç Kuvaterner Buzul Buzullararası Döngülerinin Anadolu'nun Biyolojik Çeşitliliği Üzerine Etkileri. *Türkiye Jeoloji Bülteni*, 60, 507-528. DOI: 10.25288/tjb.363813
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Harrison, R.G., 1989.** Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(1), 6-11. DOI: 10.1016/0169 5347(89)90006-2
- Hettyey, A., Vagi, B., Penn, J.D., Hoi, H. and Wagner, H.R., 2012.** Post-Meiotic Intra-Testicular Sperm Senescence in a Wild Vertebrate. *Plos One*, 7(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0050820

- Hewitt, G.M., 1996.** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53(3), 247-276. DOI: 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x
- Hillis, D.M. and Dixon, M.T., 1991.** Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66, 411-453.
- Holger, W., Mike, K.U. and Krause, D., 2003.** Central European Database of mitochondrial DNA. 19th International Society for Forensic Genetics Congress, Münster, 28 August- 1 September, 2001, 505-509.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001.** MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees, *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Huntley, B., 1999.** Climatic change and reconstruction. *Journal of Quaternary Science*, 14(6), 513-520. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1417(199910)14:6<513::AID-JQS486>3.0.CO;2-E
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C., 1991.** Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2), 128-144.
- Kazancı, N., Öz, B., Türkmen, G. and Başören, Ö.E., 2011.** Contributions to aquatic fauna of a Biodiversity Hotspot in Eastern Blacksea Region of Turkey with records from runningwater interstitial fauna. *Review of Hydrobiology*, 4(2), 131-138.
- Keeton, W., Gould, C. ve Gould, J., 2003.** Genel Biyoloji 1. Palme yayıncılık, yayın no: 247, 2. Baskı, ISBN: 975-7477-58-3, 583 s., Demirsoy, A. (Ç. Ed.), Türkan, İ. (Ç. Ed.) ve Gündüz, E. (Ç. Ed.), 516-523.
- Kholodov, V.N. and Nedumov, R.I., 1996.** Problems of the Caucasus Palaeoland existence during the Oligocene-Miocene time. *Stratigraphy and Geological Correlation*, 4, 181-190.
- Kızıroğlu, İ., 2010.** Genel Biyoloji. Okutman yayınları, yayın no: 07, 7. Baskı, ISBN: 978-605-58-84-21-5, 607 s., 525.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R., 2000.** Concepts of Genetics. Prentice Hall, 6th Edition, ISBN: 0130857025, 816 s.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. and Wilson, C., 1989.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6169-6200.

- Kondraskov, P., Schütz, N., Schübler, C., Sequeira, M.M., Guerra, A.S., Caujapé-Castells, J., Jaén-Molina, R., Marrero-Rodríguez, A., Koch, M.A., Linder, P., Kovar-Eder, J. and Thiv, M., 2015.** Biogeography of Mediterranean Hotspot Biodiversity: Re-Evaluating the 'Tertiary Relict' Hypothesis of Macaronesian Laurel Forests. *Plos One*, 10(7), 1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0132091
- Kumazawa, Y. and Nishida, M., 2000.** Molecular phylogeny of Osteoglossoids: A New Model for Gondwanian Origin and Plate Tectonic Transportation of the Asian Arowana. *Molecular Biology and Evolution*, 17(12), 1869-1878. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026288
- Kuru, M., 2004.** Omurgalı Hayvanlar. Palme yayıncılık, yayın no: 305, 7. Baskı, ISBN: 975-7477-52-4, 841 s., 289.
- Kutrup, B., Yilmaz, N., Canakci, S., Belduz, A.O. and Doglio, S., 2006.** Intraspecific variation of *Bufo bufo*, based on 16S Ribosomal RNA sequences. *Amphibia-Reptilia*, 27, 268-273.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R., 1985.** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 6955-6959.
- Leigh, J.W. and Bryant, D., 2015.** POPART: full-feature software for haplotype network Construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116. DOI: 10.1111/2041-210X.12410
- Litvinchuk, N.S., Borkin, L., Skorinov, V.D. and Rosanov, J.M., 2008.** A new species of common toads from the talysh mountains, south-eastern caucasus: genome size, allozyme, and morphological evidences. *Russian Journal of Herpetology*, 15(1), 19-43.
- Lüscher, B., Grossenbacher, K. and Scholl, A., 2001.** Genetic Differentiation of the Common Toad (*Bufo bufo*) in the Swiss Alps. *Amphibia-Reptilia*, 22, 141-154.
- Lydeard, C. and Roe, K.J., 1997.** The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. Academic Press, ISBN: 978-0-12-417540-2, 334 s., 285-303.
- Macey, J.R., Schulte II, J.A., Larson, A., Fang, Z., Wang, Y., Tuniyev, B.S. and Papenfuss, T.J., 1998.** Phylogenetic Relationships of Toads in the *Bufo bufo* Species Group from the Eastern Escarpment of the Tibetan Plateau: A Case of Vicariance and Dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(9), 80-87.
- Manceau, V., Despres, L., Bouvet, J. and Taberlet, P., 1999.** Systematics of the Genus *Capra* Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(3), 504-510. DOI: 10.1006/mpev.1999.0688
- Mason, K.M., Losos, J.B. and Singer, S.R., 2011.** Biology. Mcgraw-Hill International Edition, Ninth Edition, ISBN: 978-0-07-122206-8, 1279 s., 703.

- Medvedev, S.G. and Kotti, B.K., 2012.** Patterns of Formation of the Flea (Siphonaptera) Fauna in the Caucasus. Pleiades Publishing, 45(6), 470-487. DOI: 10.1134/S0013873812040069
- Meijers, M.J.J., Smith, B., Pastor-Galán, D., Degenaar, R., Sadradze, N., Adamia, S., Sahakyan, L., Avagyan, A., Sosson, M., Rolland, Y., Langereis, C.G. and Müller, C., 2015.** Progressive orocline formation in the Eastern Pontides-Lesser Caucasus. Geological Society Publications, 428(1), 117-143. DOI: 10.1144/SP428.8
- Mertens, R. and Wermuth, H., 1960.** Die Amphibien und Reptilien Europas. Verlag Valdemer Kramer, 12, 264 s.
- Meskauskas, A. and Dinman, J.D., 2007.** Ribosomal Protein L3: Gatekeeper to the A Site. Molecular Cell, 25, 877-888. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.02.015
- Meusel, M.S. and Moritz, R.F., 1993.** Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. Current Genetics, 24(6), 539-543.
- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J. and Da Fonseca, G.A.B., 2005.** Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City, 392 s.
- Mittermeier, R.A., Myers, N., Mittermeier, C.G. and Robles, G.P., 1999.** Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City, ISBN: 9686397582, 431 s., 10.
- Mumladze, L., Tarkhnishvili, D. and Murtskhvaladze, M., 2013.** Systematics and evolutionary history of large endemic snails from the Caucasus (*Helix buchii*, and *H. goderdziana*) (Helicidae). American Malacological Society, 31(2), 1-10. DOI: 10.4003/006.031.0202
- Murphy, R.W., Fu, J., Macculloch, R.D., Darevsky, I.S. and Kupriyanova, L.A., 2000.** A fine line between sex and unisexuality: the phylogenetic constraints on parthenogenesis in lacertid lizards. Zoological Journal of the Linnean Society, 130, 527-549. DOI: 10. 1006/zjls.1Y99.0241
- Myers, N., 1988.** Threatened biotas: hot spots in tropical forests. The Environmentalist, 8(3), 187-208.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A. and Kent, J., 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403, 853-858. DOI: 10.1038/35002501
- Nylander, J.A.A., 2004.** MrModeltest v2. Program distributed by the author, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

- Olson, D.M. and Dinerstein, E., 2002.** The Global 200: Priority ecoregions for global conservation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 89(2), 199-224. DOI: 10.2307/3298564
- Orlova, V.F. and Tuniyev, B.S., 1989.** On the taxonomy of the Caucasasian Common Toads belonging to the group *Bufo verrucosissimus verrucosissimus* (Pallas) (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Byulleten Moskovskogo Obshchestva Ispytatelei Prirody*, 94, 13-24.
- Öber, A., 2008.** Zooloji. Nobel yayınları, yayın no: 1266, 2. Baskı, ISBN: 978-605-395-062-2, 239 s., 175.
- Özdemir, N., 2005.** Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*)’nın Morfolojik ve Moleküler Açidan İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 95 s., 33-34.
- Özeti, N. ve Yılmaz, İ., 1994.** Türkiye Amfibileri, Ege Üniversitesi Basımevi, yayın no: 151, 2. Baskı, ISBN: 975-483-236-6, 221 s., 13.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. and Grabowski, G., 1991.** The Simple Fool’s Guide to PCR, Version 2.0. Privately published document compiled by S. Palumbi, Department of Zoology.
- Panawala, L., 2017.** Difference Between Mitochondrial DNA and Nuclear DNA. *Pediaa*, 1-13.
- Pidancier, N., Jordan, S., Luikart, G. and Taberlet, P., 2006.** Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): Discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40, 739-749. DOI: 10.1016/j.ympev.2006.04.002
- Popov, S.V., Shcherba, I.G., Ilyina, L.B., Nevesskaya, L.A., Paramonova, N.P., Khondkarian, S.O. and Magyar, I., 2006.** Late Miocene to Pliocene palaeogeography of the Paratethys and its relation to the Mediterranean. *Palaeo*, 238, 91-106. DOI: 10.1016/j.palaeo.2006.03.020
- Pough, F.H., Janis, C.M. and Heiser, J.B., 2009.** Vertebrate Life. Person education, Eight Edition, ISBN: 978-0-321-60079-0, 688 s., 220-221.
- Rambaut, A., 2012.** Figtree version 1.4.0 [Internet], Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (last accessed July 9, 2018).
- Recuero, E., Canestrelli, D., Vörös, J., Szabó, K., Poyarkov, N.A., Arntzen, J.W., Isailovic, J.C., Kidov, A.A., Coga Iniceanu, D., Caputo, F.P., Nascetti, G. and Solano, I.M., 2012.** Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 71-86. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.09.008

- Richter-Boix, A., Llorente, A.G. and Montori, A., 2004.** Responses to competition effects of two anuran tadpoles according to life-history traits. *Oikos*, 106, 39-50.
- Rossiter, S.J., Benda, P., Dietz, C., Zhang, S. and Jones, G., 2007.** Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology*, 16, 4699-4714. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03546.x
- Roth, S. and Jehle, R., 2016.** High genetic diversity of common toad (*Bufo bufo*) populations under strong natural fragmentation on a Northern archipelago. *Ecology and Evolution*, 6(6), 1626-1636. DOI:10.1002/ece3.1957.
- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N. and Hewitt, G.H., 2002.** Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 463-467. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2002.00408.x
- Shahgedanov, M., Hagg, W., Hassell, D., Stokes, C.R. and Popovnin, V., 2009.** Threats to Global Water Security. NATO science for peace and security series C: environmental security. Springer, ISBN: 9789048123445, 400 s., 131-143.
- Sharkov, E., Lebedev, V., Chugaev, A., Zabarinskaya, L., Rodnikov, A., Sergeeva, N. and Safonova, I., 2015.** The Caucasian-Arabian segment of the Alpine-Himalayan collisional belt: Geology, volcanism and neotectonics. *Geoscience Frontiers*, 6, 513-522. DOI: 10.1016/j.gsf.2014.07.001
- Sinsch, U., Schneider, H. and Tarkhishvili, D., 2009.** *Bufo bufo* Superspezies - Erdkröten - Artenkreis - taxon bufo (Linnaeus, 1758) - Erdkröte - taxon gredosicola L. Müller und Hellmich 1935 - Gredoserdkröte - taxon spinosus Daudin, 1803 - Riesenerdkröte - taxon verrucosissimus (Pallas, 1811) - Kolchische Erdkröten. *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*, 5(2), 191-335.
- Solovyeva, E.N., Lebedev, V.S., Dunayev, E.A., Nazarov, R.A., Bannikova, A.A., Che, J., Murphy, R.W. and Poyarkov, N.A., 2018.** Cenozoic aridization in Central Eurasia shaped diversification of toad-headed agamas (*Phrynocephalus*; Agamidae, Reptilia). *Peerj*, 6, 1-43. DOI: 10.7717/peerj.4543
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994.** Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849. DOI: 0020-7713/94/\$04.00 + 0
- Stamatakis, A., 2014.** RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033

- Stock, M., Moritz, C., Hickerson, M., Frynta, D., Dujsebayaeva, T., Eremchenko, V., Macey, J.R., Papenfuss, T.J. and Wake, D.B., 2006.** Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 663-689.
- Şahin, Y., 2000.** Hayvan Sistematigi. Bilim Teknik yayınları, yayın no: 52. 1. Baskı, 321 s., 1-2-274.
- Tarkhnishvili, D., 2014.** Historical Biogeography of the Caucasus. NOVA science publishers, ISBN: 978-1-63321-910-6, 234 s.
- Tarkhnishvili, D., Gavashelishvili, A. and Mumladze, L., 2012.** Palaeoclimatic models help to understand current distribution of Caucasian forest species. *Biological Journal of the Linnean Society* 105(1), 231-248. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2011.01788.x
- Tarkhnishvili, D., Kaya, U., Gavashelishvili, A. and Serbinova, I., 2008.** Ecological divergence between two evolutionary lineages of the Caucasian salamander: Evidence from the GIS analysis. *The Herpetological Journal*, 18(3), 155-163.
- Tarkhnishvili, D.N., Thorpe, R.S. and Arntzen, J.W., 2000.** Pre-Pleistocene Refugia and Differentiation between Populations of the Caucasian Salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(3), 414-422. DOI: 10.1006/mpev.1999.0718
- Tielidze, L.G., 2016.** Glacier change over the last century, Caucasus Mountains, Georgia, observed from old topographical maps. *Landsat and ASTER satellite imagery. The Cryosphere*, 10, 713-725. DOI: 10.5194/tc-10-713-2016
- Tosunoglu, M. and Taskavak, E., 2001.** A serological investigation of the *Bufo bufo* (Anura, Bufonidae) populations in Southern Marmara (Manyas, Balıkesir) and Eastern Black Sea (Çamlıhemşin, Rize) region. *Italian Journal of Zoology*, 68, 165-168. DOI: 10.1080/11250000109356402
- URL-1, 2018.** <http://genetikdanisma.blogspot.com.tr/2015/01/mitokondriyal-dna-mtdna.html> (8 Ağustos 2018).
- URL-2, 2018.** <http://roundtripticket.me/caucasus-mountains-world-map.html/caucasus-mountains-map-inside-world> (8 Ağustos 2018).
- Van Andel, T.H. and Tzedakis, P.C., 1996.** Palaeolithic landscapes of Europe and environs, 150,000-25,000 years ago: An overview. *Quaternary Science Reviews*, 15, 481-500. DOI: 10.1016/0277-3791(96)00028-5
- Vekua, A. and Lordkipanidze, D., 2008.** The History of Vertebrate Fauna in Eastern Georgia. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 2(3), 149-155.

- Wickliffe, J.K., Hoffmann, F.G., Carroli, D.S., Dunina-Barkovskaya, Y.V., Bradley, R. and Baker, R., 2003.** Intron 7 (FGB-I7) of the Fibrinogen, Beta Polypeptide (FGB): A nuclear DNA Phylogenetic Marker for Mammals. Museum of Texas Tech University. Occasional papers, 219.
- Wielstra, B., Crnobrnja-Isailović, J., Litvinchuk, S.N., Reijnen, B.T., Skidmore, A.K., Sotiropoulos, K., Albertus G Toxopeus, A.G., Tzankov, N., Vukov, T. and Arntzen, J.W., 2013.** Tracing glacial refugia of Triturus newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. *Frontiers in Zoology*, 10, 1-14. DOI: org/10.1186/1742-9994-10-13
- Wittig, H., Aschenbrenner, A., Poetsch, M., Krause, D. and Lignitz, E., 2003.** Variability of mtDNA in a population sample from Iceland. *Legal Medicine*, 5, 173-176. DOI: 10.1016/S1344-6223(02)00103-7
- Yılmaz, İ., 1984.** Trakya Kuyruksuz Kurbağaları Üzerine Morfolojik ve Taksonomik Bir Araştırma (Anura: Discoglossidae, Pelobatidae, Bufonidae, Hylidae, Ranidae), *Doğa Bilim Dergisi TÜBİTAK*, 8, 244-264.
- Zazanashvili, N. and Mallon, D., 2009.** Status and protection of globally threatened species in the Caucasus. Contour Ltd, ISBN: 978-9941-0-2203-6, 232 s., 1-25.
- Zeist, W.V. and Bottema, S., 1988.** Late Quaternary vegetational and climatic history of southwest Asia. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 54(3), 461-480.
- Zvychnaynaya, E.Y., 2010.** Genetic Differentiation of the Wild Goats (Genus *Capra*) Based on the Analysis of Mitochondrial Gene Cytochrome B and Fragment of Nuclear Gene SRY. *Severtsov Institute of Ecology and Evolution*, 22, 255-276.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru KIZILHAN, 02/01/1992 tarihinde Rize/Çayeli’nde doğdu. İlköğretimini 2006 yılında Çayeli İlçesi’nde Hasan Yılmaz İlköğretim Okulu’nda ve Ortaöğretimini 2010 yılında Çayeli İlçesi’nde Ahmet Hamdi-Nurzan İshakoğlu Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 31/08/2010 tarihinde başladığı lisans eğitimini 27/06/2014 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.

