



**ERZURUM KARASU HAVZASI'NDA YAŞAYAN
PELOPHYLAX RIDIBUNDUS'DA
(OVA KURBAĞASI) KARYOTİPİK
VE GENOTOKSİK ÇALIŞMALAR**

Esra CANPOLAT

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN
2017**

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZURUM KARASU HAVZASI'NDA YAŞAYAN *Pelophylax*
ridibundus'DA (OVA KURBAĞASI) KARYOTİPİK VE
GENOTOKSİK ÇALIŞMALAR

Esra CANPOLAT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

ERZURUM KARASU HAVZASI'DA YAŞAYAN *Pelophylax ridibundus*'DA (OVA KURBAĞASI) KARYOTİPİK VE GENOTOKSİK ÇALIŞMALAR

Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'ın danışmanlığında Esra CANPOLAT tarafından hazırlanan bu çalışma 16/11/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oyçokluğu** (...../.....) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Yahya TEPE

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 30 / 11 / 2017 tarih ve 47 / 15 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2016/171

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZURUM KARASU HAVZASI'NDA YAŞAYAN *Pelophylax ridibundus* 'DA (OVA KURBAĞASI) KARYOTİPİK VE GENOTOKSİK ÇALIŞMALAR

Esra CANPOLAT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Erzurum il sınırları içinde olan Karasu Havzası Fırat Nehri'nin kaynağını oluşturmaktadır. Tarımsal kaynaklı suni gübrelerin, insektisitlerin, kanalizasyon, sanayi ve fabrika atıklarının bu havzayı kirlettiği düşünülmektedir. Bu havzadaki kirlilik Fırat Havzası'nı tehdit eder niteliktedir. Son yıllarda çevresel kirlilikteki artışla beraber amfibi populasyonlarında ciddi azalmalar meydana geldiği bilinmektedir. Bu amfibi türlerinden biri olan ova kurbağaları (*Pelophylax ridibundus*) Karasu Havzası'nda da yaşamaktadır. Bu çalışmada önce *Pelophylax ridibundus*'un karyotipik özellikleri kemik iliği ve barsaklarından elde edilen metafaz kromozomları incelenerek araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kurbağalar Karasu Havzası'nın 3 farklı noktasından yakalanmıştır. Kurbağalar canlı olarak laboratuvara getirilmiş ve analizden önce akvaryumlara yerleştirilmiştir. Kurbağaların barsak epitel ve kemik iliği ana hücreleri karyotip analizi için kullanılmıştır. Bu hücrelerden en iyi metafaz kromozom yayılımları 1 saat hipotonik (0.075 M KCl) uygulama, soğuk hazırlanmış karnoy solüsyonu (3 metanol: 1 glasiyal asetik asit) ile fiksasyon ve %10'luk Giemsa ile 20 dakika boyama sonucu elde edilmiştir. Kemik iliğinden ve barsaklardan elde edilen mitotik kromozom preparatlarına daha sonra gümüş nitrat (AgNOR) boyama ve C-bantlama teknikleri uygulanmıştır. Hazırlanan preparatlarda yapılan incelemeler sonucunda her iki hücre tipinde *Pelophylax ridibundus*'un $2n=26$ kromozoma sahip olduğu anlaşılmıştır. Karyotip analizi sonucunda *Pelophylax ridibundus*'da 7 metasentrik, 5 submetasentrik ve 1 subtelosentrik kromozom çifti olduğu belirlenmiştir (14M+10SM+2ST). Kol sayısı FN=52 olarak tespit edilmiş ve Ag-NOR pozisyonunun 10. kromozom çiftinin uzun kolunda olduğu bulunmuştur. C-bantlama ile yapılan karyotiplerde ise C-pozitif heterokromatin bantlarının kromozomların telomerlerinde olduğu görülmüştür. Karyotip simetri/asimetri indeksi 1.53 olarak hesaplanmıştır. Araştırmanın ikinci kısmında ise çevresel kirliliğin etkilerini tespit etmek amacıyla havzanın tarım yapılan alanlarından (Dereboğazı Köyü ve Söğütlü Köyü) yakalanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda genotoksik çalışmalar yapılmıştır. Kurbağalarda genotoksisite, eritrositik çekirdek anormalliklerinin (EÇA) oluşumuna bakılarak tespit edilmiştir. Böbrek şekilli çekirdek, çentikli çekirdek ve loplu çekirdek anormallikleri kurbağaların eritrositleri kullanılarak belirlenmiştir. Genotoksisite bakımından Dereboğazı Köyü'nden yakalanan kurbağalarda istatistiksel olarak bir artış gözlenmemiştir. Ancak Söğütlü Köyü'nden yakalanan kurbağalarda genotoksitesinin arttığı ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir.

2017, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pelophylax ridibundus*, Su Kirliliği, Karasu Havzası, Kromozom, Karyogram, İdiyogram, Genotoksisite, Eritrositik Çekirdek Anormallliği.

ABSTRACT

Master Thesis

SITOGNETIC AND GENOTOXIC INVESTIATION OF *Pelophylax ridibundus* FROM KARASU BASIN, ERZURUM

Esra CANPOLAT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology
Department of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Karasu Karasu Basin, in Erzurum boundary, is the source of the Euphrates River. It is considered that artificial fertilizers, insecticides, municipal sewage, industrial and factory wastes are polluted the basin. The pollution in the Karasu Basin also threatens the Euphrates Basin. During the last few years, many amphibian populations have been decreasing dramatically by environmental pollution. An amphibian species marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) are also distributed in Karasu Basin. Firstly, the karyotypic characteristics of *Pelophylax ridibundus* have been investigated by examining metaphase chromosomes spreads obtained from bone marrow and intestine epithelium. The frogs used in the study were caught from three stations of the Karasu Basin. The frogs were transported to the laboratory as live, and kept in aquarium before the analysis. Bone marrow and intestine of frogs were used for karyotype analysis. The best treatment parameters for preparing good metaphase chromosome spreads from the cells were optimized as hypotonic 1 hour (0.075 M KCl) treatment, fixation with carnoy solution (3 methanol: 1 acetic acid) and stained 10% Giemsa for 20 minutes. The prepared mitotic chromosomes were also analysed silver staining (AgNOR) and C-banding techniques. It was determined that *Pelophylax ridibundus* had $2n=26$ chromosomes by investigation of the chromosome spreads. *Pelophylax ridibundus* karyotypes were determined as being composed of 7 metacentric, 5 submetacentric and 1 subtelocentric chromosome pairs (14M+10SM+2ST). The fundamental arm numbers of chromosomes were determined FN=52 and Ag-NOR positions located in the long arm of chromosome pair 10. The C-banded karyotypes showed C-positive heterochromatin bands at the telomeric regions of the chromosomes. Karyotype symmetry/asymmetry index was 1.53. Secondly, to determine the environmental pollution effects, we performed the genotoxicity studies in *Pelophylax ridibundus* frogs collected at agricultural areas in the Karasu Basin (Dereboğazı Village and Söğütlü Village). Genotoxicity assays such as erythrocytic nuclear abnormalities (ENA) were carried out on the frogs studied. ENA named kidney-shaped nucleus, notched nucleus and lobed nucleus were assessed in peripheral blood erythrocytes of the frog. The genotoxic effects did not show significant increasing between frog species caught from Dereboğazı Village, statistically. However, the toxic effects increased in Söğütlü Village and this increase was found to be statistically significant.

2017, 58 pages

Keywords: *Pelophylax ridibundus*, Water Pollution, Karasu Basin, Chromosome, Karyogram, Ideogram, Genotoxicity, Erythrocytic Nuclear Abnormalities.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi ve Histolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde emeği geçen, öneri ve desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a ve Biyoloji Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Erzurum'da kaldığım süre boyunca bana destek olan, çalışmalarım esnasında ve tez yazım aşamasında her türlü desteği sağlayan sevgili arkadaşım Sayın Arş. Gör. Fatma SONGUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim sevgili aileme ve tezimi bitirmem noktasında beni teşvik eden en sevgili arkadaşım İrem AKSU'ya sonsuz sevgilerimi sunarım.

Esra CANPOLAT

Kasım, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Hücrenin Yapısı.....	9
1.3. Çekirdek	9
1.4. Hücre Bölünmeleri	10
1.4.1. Mitoz	11
1.5. Karyotip.....	12
1.5.1. Karyotip çalışmaları	15
1.5.2. Bantlama çalışmaları	16
1.6. Amfibiler	16
1.6.1. Ranidae familyası	16
1.6.2. <i>Pelophylax (Rana)</i> cinsi	17
1.6.3. <i>Pelophylax ridibundus</i>	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Çalışma Bölgeleri	24
3.2. Sitogenetik Yöntemler.....	27
3.2.1. Giemsa boyama (G bantlama).....	27
3.2.2. Gümüş nirtat boyama (AgNOR)	29
3.2.3. C bantlama.....	30
3.2.4. Karyotip analizi	30
3.3. Sitogenetik Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	31
3.4. Genotoksik Analiz	32

3.5. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	32
3.6. İstatistik	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un Karyotip Analizi	34
4.2. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'da Genotoksik Analiz	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR	51
EKLER.....	56
EK 1.....	56
EK 2.....	57
EK 3.....	58
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

♀	Dişi
♂	Erkek
2n	Diploid kromozom sayısı
KCl	Potasyum klorür
M	Molar
mg	Miligram
mg/L	Miligram/litre
ml	Mililitre
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ifade.
µg/L	Mikrogram/litre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

2n	Diploid kromozom sayısı
2XSSC	2X standart tuzlu sitrat
Ba(OH) ₂	Baryum hidroksil
KCl	Potasyum klorür
NF	Kromozomların temel kol sayısı
NFa	Otozomal kromozomların kol sayısı
AgNOR	Gümüş nitrat boyama
a	Akrosentrik kromozom
m	Metasentrik kromozom
sm	Submetasentrik
t	Telosentrik kromozom

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sentromerin durumuna göre kromozom morfolojileri	14
Şekil 1.2. <i>P. ridibundus</i> 'un dünya üzerinde yayılış alanı	18
Şekil 1.3. <i>R. ridibunda</i> 'nın Türkiye'deki dağılımı	18
Şekil 3.1. İstasyonların genel haritası ve Erzurum Karasu havzası	25
Şekil 3.2. İstasyonların Erzurum şehir merkezine göre konumları.....	25
Şekil 3.3. İstasyonların birbirine olan konumları. 1. İstasyon: Dereboğazı Köyü. 39°49'17.7 K, 41°00'56.8 D 2. İstasyon: Dereboğazı Köyü. 39°49'34.3 K, 41°01'36.1 D 3. İstasyon: Söğütlü Köyü. 39°53'16.0 K, 41°06'34.5 D. ..	26
Şekil 3.4. <i>Pelophylax ridibundus</i> (Ova kurbağası, ♂), dorsal görünüş.	27
Şekil 3.5. Kurbağaya fitohemoglutinin intraperitoneal olarak enjeksiyon işlemi	28
Şekil 3.6. Kurbağa femurundan çıkarılan kemik iliği (ok)	29
Şekil 4.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un giemsa ile boyanmış (G bantlama) metafaz plağı.....	35
Şekil 4.2. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un idiyogramı	37
Şekil 4.3. <i>Pelophylax ridibudus</i> 'da NOR bölgelerini gösteren gümüş nitrat boyalı metafaz plağı. Oklar 10. kromozom çiftini göstermektedir	38
Şekil 4.4. <i>P. ridibudus</i> 'da konstitütif heterokromatin kısımlarını gösteren C-bantlama yapılmış metafaz plağı.....	38
Şekil 4.5. Laboratuara canlı olarak getirilen kurbağaların bekletildiği akvaryum	39
Şekil 4.6. Kurbağalarda ağırlık ölçümü	39
Şekil 4.7. <i>Pelophylax ridibudus</i> 'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri	41
Şekil 4.8. <i>Pelophylax ridibudus</i> 'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar	32
Çizelge 4.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un barsak dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi.....	34
Çizelge 4.2. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un kemik iliği dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi.....	34
Çizelge 4.3. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un kromozomlarının ölçümleri (μm olarak) ve sentromerik endeksleri.....	36
Çizelge 4.4. Seçili lokalitelerinden yakalanan <i>Pelopylax ridibundus</i> kurbağaların periferik eritrositlerindeki çekirdek anormallikleri ve frekansları.....	40
Çizelge 4.5. Söğütlü Köyü'nden yakalanan kurbağaların genotoksisitesinin mevsimsel değişimi.....	40
Çizelge 5.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un karyotipik özellikleri.....	45

1. GİRİŞ

Orta Avrupa ve Batı Asya'nın yaygın kurbağa türlerinden olan *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Anura; Ranidae) Ülkemizde de yaşamaktadır. Diğer omurgalılarda olduğu gibi kurbağalarda da sitotaksonomik analizler hayvanların sistematigi ve yayılışları hakkında güvenilir bilgiler verme noktasında oldukça etkilidirler. Özellikle karyotip analizleri bu konuda en yaygın kullanılan tekniktir. Kurbağalarda yapılan karyotip analizlerinde özellikle *Rana* (sinonim=*Pelophylax*) cinsinde kromozom sayısının populasyonlar arası farklılıklara rağmen $2n=26$ olduğunu göstermektedir (Kuramoto, 1990). Yakın türlerde ise kromozomları C-bantlama tekniği ile ayırmak mümkün olmaktadır. Bu teknikle kromozomların heterokromatin bölgeleri yönünden değerlendirilmektedir. Ülkemizde *Pelophylax ridibundus* türüne ait ilk karyotip Alpagut ve Falakalı (1995) tarafından yapılmıştır. Sonrasında ise Orta Anadolu'da yayılış gösteren aynı türe ait C-bantlama ve gümüş nitrat boyama teknikleri ile karyotip oluşturulmuştur (Arslan vd 2010). Ancak Erzurum'da yayılış gösteren *Pelophylax ridibundus* türüne ait bu anlamda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

1.1. Genel Bilgiler

Yeryüzünde bulunan milyonlarca canlı türünü sınıflandırmak, insanoğlunun en nihai hedeflerinden biridir. Bu hedef doğrultusunda canlıları sınıflandırarak, bilmediği ve hükmedemediği bir şeyden korkma, kontrol altında tutamama korkusunu yenmiştir. Aynı zamanda sınıflandırma işlemini yaparak doğayı ve doğada bulunan tüm canlıları kendi isteği ve menfaati doğrultusunda daha verimli olarak kullanmayı başarmıştır. Canlıların sınıflandırma tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Nitekim Aristo ile başlayan bu işlem günümüze kadar devam etmiştir. Yeni türlerin keşfiyle gelecekte de sınıflandırma olgusu varlığını devam ettirecektir.

Canlılarla ilgili araştırma veya inceleme yapıldığında, incelenen organizmanın ya da analizi yapılan örneklerin ait olduğu sistematik birim belirlenemediğinde, yapılan

Çalışma yetersiz ve yüzeysel kalacaktır. Çevresel incelemeler yapılırken, araştırma alanından elde edilen verileri analiz etmek amacıyla, öncelikle eldeki örneklerin türleri tesbit edilir ve sistematikteki yeri kesin olarak belirlenir. Belirli bir alanda çalışılması gerekiyorsa, o bölgede bulunan canlı türlerinin tam anlamıyla bilinmesi gerekir (Yılmaz 2012).

Canlılar alemi zengin bir çeşitlenme potansiyeline sahiptir. Tek bir türe ait bireylerin bile her biri diğerk bireylerden birçok karakter bakımından farklı olabilirken, farklı türler karakter açısından çok daha zengin bir tablo oluşturmaktadır. Taksonomistin vazifelerinden birisi, incelediğı veya karşılaştırdığı taksonların hangi özellikler bakımından birbirleriyle benzer ve farklılıklarının olduğunu ortaya koyup, elde edilen bilgiler ışığında ele aldığı canlı grubunun hangi tre, alttre veya cinse ait olabileceğı hususunda bir karara varmaktır. Bunu yapmanın en kolay yöntemi, elindeki numunelerin morfolojik olarak farklı olup olmadıklarını tespit etmektir (Yılmaz 2012).

Geçmiş dönemlerde sınıflandırma ile ilgili çalışmalar yapılırken; dış görünüşe, morfolojik karakterlere, nitel ve nicel gözlemlere dayalı tespitler yapılıyordu. Bu durum taksonomi açısından önem arz ediyordu. Canlılarda ayak sayısı, ayakların tırnaklı veya perde bulunup bulunmaması, göz kapağının bulunması ya da yokluğu, tüy, kıl, pul gibi yapıların bulunup bulunmamasına bağlı olarak karşılaştırmalar yapıılıyor elde edilen sonuçlar herhangi bir ölçü aleti gerektirmediğinden bu işlemlerin daha pratik olarak yapılmasını sağlıyordu. Elbette geçmişte sınıflandırma yapmak için kullanılan yöntemler ile günümüzde kullanılan yöntemler arasında azami farklar vardır. Günümüzde artık dış görünüşe bakılarak yani sadece morfolojiye bakılarak, metrik veya meristik yöntemlerle yapılan sınıflandırma bazı alt türlerin veya keşfedilmemiş türlerin tespitini zorlaştırmaktadır. Zamanla bu şekilde doğrudan -nitel gözlem ve alet kullanmadan- inceleyebileceğimiz karakterler arasındaki benzerlik ve farklılıkların tespiti, tür, trii veya traltı seviyelerinde yetersiz kalmıştır. Bu sebeple daha küçük ve ince yapılarda, spesifik ayırt edici karakterlerin tesbit edileceğı düşünülerek, hassas gözlemlere girişilmiştir. Ayrıca, bu dönemde ihtiyaa paralel olarak gelişen ışık, faz-kontrast ve polarizasyon mikroskopları gibi büyütme gücü çok yüksek olan gözlem

araçlarının gelişmesinin de canlılarınların daha ince yapısal özelliklerini açığa çıkarmada önemli faydalar sağlamıştır (Yılmaz 2012).

Teknolojinin gelişmesiyle beraber taksonomide kullanılan yöntem ve teknikler de (sitogenetik, karyotipik analiz, elektroforez, kromozom çalışmaları) daha kesin ve net ayırım yapmamızı ve bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Böylece sadece dış görünüşü incelemeye bağlı olarak yapılan çalışmalar ile birbirlerinden ayırt edilmesi güç olan türleri ayırmak için daha iyi ve kesin sonuç verebilecek taksonomik özelliklerin belirlenmesi ve üretimi hedeflenmiştir (Sevindik 2013). Populasyon genetikçileri geçmiş yıllardan beri, bireyler arasındaki farklı özellikleri, örneğin tohum şekli, çiçek rengi ya da beneklenmedeki çeşitlilik gibi fenotipik farklılıkları analiz edip değerlendirerek tür içi çeşitlilik hakkında tahmin yürütmüşlerdir. Canlılarda kalıtımı sağlayan DNA, popülasyonda bulunan aynı tür bireyler arasındaki genetik farklılıkları belirlemek ve bunları sayısal verilere dökmek için doğrudan kullanılan moleküler bir materyaldir. Bu yöntem, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliği belirlemek ve değerlendirmek için çok önemli bir araç olmuştur. Çekirdek, mitokondri ve kloroplastda bulunan DNA'lar genetik çeşitlilik seviyesini belirlemek için analiz edilebilir. İlgili türün DNA'sı ile gerçekleştirilen DNA analiz yöntemleriyle, koruma biyologları tarafından genetik çeşitlilik dağılımının ve düzeyinin boyutlarını incelemekte ve koruma çabalarına yardımcı olmakta kullanılmaktadır (Klug and Cummings 2009).

Hayvanların sahip olduğu morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri genetik ve çevre şartlarının bir görüntüsüdür. Bu nedenle sitotaksonomik çalışmalardan, hücre seviyesinde bilgi elde edinilebilir. Canlının sahip olacağı karakterler hücrenin kromozomlarına kodlanmış olarak bulunmaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar karyoloji adı altında yürütülmektedir. Sitotaksonomiyle ilgili yapılan çalışmaların çoğu, daha evvel kromozom sayısı, morfolojisi ve davranışlarıyla ilgiliyken bugün sitokimyasal çalışmalar da oldukça büyük ölçüde hız kazanmıştır.

Hayvan populasyonlarının kalıtsal yapılarının belirlenmesinde, popülasyonlar arası ve populasyon içi hatta tek birey için kromozomal analizler yapılarak kromozom

polimorfizmi belirlenebilir. Bununla birlikte su kirliliği göstergesi olarak, kromozomal hastalıkların ortaya çıkarılmasında, filogenetik bağlantıların net olarak belirlenebilmesinden dolayı önemlidir.

Özellikle amfibi ve sürüngenlerin reel bir genel çevre sağlığı indikatörü olduğu da düşünülmektedir (Pollet and Bendell-Young 2000).

İki yaşamlılar-Amphibia (eski Yunanca Amphi=iki; Bios=yaşam) alemi içinde bulunan *Pelophylax ridibundus* (Anura; Ranidae) Batı Palearktik su kurbağaları içinde en eski tanımlanmış türlerden biridir. Birçok amfibinin gelişimini tamamlarken, yaşamlarının erken dönemlerinde başkalaşım (metamorfoz) geçirirler. Başkalaşımında, larvalar suda yaşar ve solungaçlarıyla solunum yaparlar, daha sonra sınırlı şartlarda da olsa karada yaşayan erginler gelişir. Larvalar (iribaşlar) gelişim döneminde tek katmanlı epidermise, solungaçlara, göz kapağı bulunmayan gözlere, gerçek dişleri bulunmamakla beraber yerine boynuzumsu dişlere, balıklara benzerlik gösteren bir dolaşım sistemine, yanal çizgiye ve dayanıklı bir kuyruk yapısına sahiptir (Kuru 2004). *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) türü, Dünya üzerinde Orta ve Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Batı Asya'ya kadar geniş bir dağılım gösterir. Amphibia sınıfı ülkemizde kuyruksuz kurbağa (Anura) ve kuyruklu kurbağa (Urodela) olmak üzere iki takımla (ordo) temsil edilir. Bu takımlardan Anura'nın, 14 türü ile temsil edilir (Özeti ve Yılmaz 1994; Baran ve Atatür 1997).

Pelophylax ridibundus'da vücut boyu yaklaşık 15 cm kadar, kulak zarı oldukça belirgin ve başın yan kısımlarında koyu renkli şerit (temporal şerit) yoktur. Derilerinde kıvrımlar bulunur ve bu kıvrımlar sırt yanlarından başlayıp boydan boya uzanır. Derileri genellikle pürüzlüdür. Erkeklerde dış ses kesesi oldukça belirgindir. *Pelophylax ridibundus*'un genellikle sırt tarafları yeşilimsi gri, kahverenginin açık veya koyu renkleri olabilir. Bu türün bazı üyelerinde sırtlarının tam ortasından geçip, sırt boyunca uzanan açık renkli bir şerit bulunabilir. Karın bölgesinde ise genellikle kirli beyaz veya sarımsı renkte olup çoğunlukla küçük lekeler bulunur. Nadir olarak alt tarafı kırmızımsı lekeli olan türlerde rastlanır (Baran 2005). Akıntılı sularda bu türe rastlamak

mümkündür. Besin olarak böcek türleriyle beslenmeyi tercih ederler. Tarım zararlısı böcek türleri ve sivrisinekleri besin maddesi olarak kullandığından populasyonların dengede kalmasına yardımcı olan kurbağa türüdür. Ancak farklı amaçlar için ihraç edilmek üzere toplanan kurbağa örnekleri genellikle üreme dönemlerinde toplandığı için, *Pelophylax ridibundus* populasyonları azami oranda azalmıştır. Türkiye’de kendilerine uygun habitatlarda yayılmışlardır. Ülkemizde iki alt türü yaşayan bu tür, deniz seviyesinden yaklaşık 2500 metre yüksekliklerde yaşam alanı bulmuştur (Baran 2012).

Dünyanın hemen her yerinde yaşam alanı bulabilen türler için tür içi ve türler arası varyasyonları belirlemek zor olmaktadır. Ova kurbağalarını da bu açıdan incelemek oldukça güçtür. Bu sebeple sadece morfolojik inceleme, metrik ve mersitik niteliklere bağlı kalarak çalışmak yetersiz kalabileceği için sitogenetik olarak ve moleküler düzeyde çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Gün geçtikçe sitogenetik tekniklerin gelişmesi, türler arasındaki karyotipik farklılıkların ortaya çıkarılması açısından önemli bir fırsattır. Özellikle omurgalı hayvanlarda kromozomların sayısı ve yapısıyla ilgili değişiklikleri ortaya çıkaracak çeşitli çalışmalar, büyük bir artışla devam etmektedir (Alpagut and Falakalı 1995; Ergene *et al.* 1999; Uğurtaş vd 2001; Ergene and Çavaş 2002; Lymberakis *et al.* 2007; Mindrescu and Ghiorghita 2008; Martirosyan and Stepanyan 2009; Napoli *et al.* 2009; Arslan vd 2010; Ergene vd 2010; Kılıç and Şişman 2016 Şişman vd. 2016). Örneğin *Rana ridibunda* ve *Rana lessonae*’nın hibridogenetik ürünü *Rana esculenta*’nın olduğu konusunda yapılan çalışmalarda kesin ve net sonuçlar alınması için çok sayıda sitogenetik çalışma ve inceleme yapılmıştır (Spasic-Boskovic *et al.* 1999).

Sitogenetik çalışma yapılırken öncelikli olarak amaç, üzerinde çalışılan canlının kromozom sayısını ve dağılımını belirlemek için karyotip analizi yapmaktır. Ardından, kromozomal bantlama teknikleri ile formlar arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Bantlama çalışmaları sonucu elde edilen bant durumlarının, filogenetik analizlerde ayırt edici karakter olduğunu göstermesiyle, büyük önem kazanmıştır (Dobingy *et al.* 2004).

İnsan hücrelerinin çekirdeğinde yer alan kromozomların birbirlerinden ayırt edilebilmesi için oldukça basit ve kullanışlı bir tekniğe ihtiyaç duyulması, bantlama tekniklerinin gelişmesi adına önemli bir kolaylık sağlamıştır. Ancak bantlama teknikleri, özellikle de insanlar üzerinde yapılması amaçlanan çalışmalar ve analizler için geliştirilmiştir. İlk kromozom bantlama tekniği 1968’de uygulanmış ve bu teknik sayesinde kromozomların üstünde bantlar halinde dizilmiş sekansların ayırt edilebilmesi kolaylaşmıştır (Caspersson *et al.* 1968).

Kromozomları ayırt etmek için kromozomlar üzerinde bantlaşmış bölgeleri oluşturmaya yönelik birçok teknik belirlenmiştir. Bunlardan bazıları ve en önemlileri C, G, R bantlarıdır. Bunların dışında daha az kullanılan ve hazırlanması oldukça zor olan Q bandı tekniği de vardır (Gosden 1994).

Memeliler arasındaki benzerlik-akrabalık ilişkilerini belirlemeye yönelik yaşanan problemleri ortadan kaldırmak için yapılan karyolojik çalışmalar büyük önem arz eder. Karyotipin taksonomik bir karakter olarak kullanılmasındaki avantajı, kromozom yapısının çevredeki değişikliklerin etkilerinden doğrudan etkilenmemesidir. Yani havanın sıcak veya soğuk olması, nem miktarı, su, besin çeşidi ve bulunma miktarı gibi çevresel faktörler canlıyı morfolojik olarak etkilese bile kromozom yapısı fiziksel çevre şartlarından etkilenmez. Ayrıca kromozomal farklılıklar, birbirleriyle karıştırılma olasılığı yüksek formların doğrudan üreme ile ilgili izolasyon derecesi hakkında bilgi verebilir. Karyolojik yöntemler birbirleriyle akraba olan türlerin taksonomik ve sitogenetik incelemelerle ortaya çıkan sorunların çözülmesinde ve benzer özellikler taşıyan türlerin morfolojik olarak da ayırt edilmesinde çok fayda sağlayacaktır. Karyotip; popülasyonu oluşturan türlerin, tür içi ve türler arasındaki ilişkilerini türün kendisine has belirleyici özelliklerine göre ortaya çıkararak kesin ve net sonuçlara ulaştırır (Sumner 2008).

Karyoloji ve yapılan sitotaksonomik analizler dünyanın birçok yerinde rahatlıkla yaşayabilen *Pelophlax* cinsinin karyotipini belirlemek için oldukça güvenilir tekniklerdir.

Ayrıca pestisit kirliliğinin miktarını ve etkilerini belirlemede, kromozomların sayı ve yapısında meydana gelen değişiklikleri ortaya çıkarmada, erozyon, orman tahribi, yapılaşma, kimyasal mücadele, izolasyon gibi durumların türleşmeye katkısı olup olmadığı ya da hibrid türlerin açığa çıkmasında etkili olup olmadığını belirlemek için bu tekniklerin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Avrupa türleri de dahil olmak üzere amfibiler ve sürüngenlerle ilgili taksonomik ve sistematik incelemeler sonucunda elde edilen isimlendirme listeleri sürekli değişim göstermektedir. O halde, türlerin birbirinden ayırt edilmesinde, yeni ve gizli keşfedilmemiş türlerin ortaya çıkarılmasında sitotaksonomik teknikler, protein elektroforezi, sitogenetik analizler, biyoakustik metodlar, karyoloji çalışmaları gibi yeni tekniklerin kullanılmasını kesin ve net sonuçlar elde edebilmek için gerekmektedir. Dubois (1998) tarafından da çoğunlukla vurgulandığı gibi, bu değişiklikler biz yeni teknikler keşfetmeye ve bazı ‘alttürler’in durumunu yeniden incelemeye ve farklı anlayışlar edinmeye zorlamaktadır. Ayrıca sınıfların sistematik-taksonomik benzerliklerinden dolayı sınıflandırma yapılırken uzmanların dikkatinden kaçmış olan yeni sınıfların ve türlerin keşfine dayanmıştır. Yeni türlerin ortaya çıkarılmasını kolaylaştıran bu çalışmalar aynı zamanda; kromozomların yapısında ve sayısında meydana gelen değişikliklerin de açığa çıkarılmasında azami ölçüde yardımcı olmuştur. Mikronukleus analizleri, çekirdek anormallikler ve tarımsal faaliyetlerde yoğun olarak kullanılan pestisitlerin sitogenetik, genotoksik ve sitotoksik etkileri hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır.

Son dönemlerde, balıklarda kromozom sayısında ve yapısında meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi için oldukça uygun fiyatlı olan mikroçekirdek (MÇ) testi kullanılmakta, ayrıca basit olması, laboratuvar ortamda veya doğal ortamda uygulanabilir olması sebebiyle etkin bir biçimde kullanılma oranını artırmıştır (Çavaş ve Ergene-Gözükara 2005). Amfibilerin de çekirdekli alyuvarlara sahip olması nedeniyle MÇ testi bu canlılarda uygulanabilir hale gelmektedir. Memeli hayvanlarda, MÇ deneylerinin hassas sonuç vermesi ve kullanılabilirliği yeni bir teknik olan, hücre bölünmesi esnasında yeni oluşmuş iki çekirdekli hücrelerde, mikronukleus sayımına

imkan sağlayan bloke-sitokinez yöntemi ile önemli miktarda arttırılmıştır (Fenech and Morley 1985). Amfibiler ve balıklarda ise çekirdekli eritrositlerde sadece mikro çekirdek değıl loplu, çentikli, tomurcuklu, çift çekirdek ve böbrek şekilli çekirdek oluşumları gibi oldukça geniş bir yelpazede genotoksisite taramaları yapılmaktadır.

Karsinogen ve mutajen özellik taşıyan maddeler ya DNA’da hasara yol açar, ya da DNA’nın düzgün olarak eşlenmesine engel olurlar. DNA üzerinde meydana gelen hasarların genotoksik sonuçları DNA eşlenmesi ve hücre döngüsü tamamlanıncaya kadar net bir şekilde görülmez. Genotoksik madde etkisi görülmeden önce hücre içinde hasarların tamirini sağlamak üzere işleyen çok sayıda biyokimyasal basamaklar mevcuttur. Mikronükleus oluşumu ya asentrik kromozom parçalarının ya da anafaz sonrasında çekirdek içinde yer alamayan tüm bir kromozomun yoğunlaşması sonucu meydana gelir. Başka bir şekilde ifade edecek olursak, direk DNA’da veya iğı ipliğinde meydana gelen bir hasar ile hücre bölünmesi sonunda ya nükleusa dahil olamayan kırık kromozom parçalarından ya da tüm kromozomun kromatin haline dönüşmesi sonucu oluşur. Bir hücrede görülen mikronükleus o hücredeki meydana gelen sayısal veya yapısal bir genetik hasar hakkında bilgi verir (Heddle *et al.* 1983).

Türlerin populasyon durumlarının net olarak bilinmemesi, bu konuda yapılacak çalışmalara ve elde edilecek kesin ve sağlıklı bilgilere büyük ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Ülkemizdeki yaşayan amfibi populasyonlarını tehdit eden başlıca doğal ve doğal olmayan etmenler; ormanların tahrib edilmesi ve erozyon, tatlısu ortamlarının çeşitli sebeplerle kurutulması, canlılarla biyolojik ve kimyasal mücadele, ötrofikasyon, tarımsal çalışmalar, mesken - yol yapımı ve ihracattır (Çiçek vd 2011). Dünya genelinde yapılan araştırma ve incelemelere göre, özellikle son 20 yıl içerisinde kurbağalarda meydana gelen deformasyonların görülme sıklığında ciddi oranda artış ve populasyonlarda azalmalar olduğu gözlenmiştir (Houlahan *et al.* 2000; Sparling *et al.* 2001). Bu azalmayı durdurabilmek için, hangi faktörlerin rol oynadığını belirlemek önemlidir. Amfibi sayısındaki bu yaygın azalmalara dair kanıtlar hızla ortaya konmakla

beraber bu azalmaların altında yatan sebepler hala tam olarak açıklanamamıştır. Artık günümüzde bu azalmalara neden olan bir faktör olarak pestisit kirliliği de dikkate alınmakla beraber bu konuya ilişkin bilimsel araştırmalar hala yeterli düzeyde değildir.

Bu bilgiler ışığında proje kapsamında daha önce kromozom sayıları tespit edilmemiş Karasu Havzası'nda yaşayan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların kromozom sayılarının tespiti ve buna bağlı olarak kurbağaların yaşadığı tarımsal ortamlardaki muhtemel çevresel kirliliğinin kurbağaların genetik yapısı üzerine olabilecek olumsuz etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Hücrenin Yapısı

Canlılarda canlılık özelliği gösteren, biyolojik organizasyonun hiyerarşisinde yaşayan en küçük yapı birimi hücredir. Tüm canlılar hücre veya hücre guruplarından meydana gelmiştir. Tüm hücreler hücre zarı adı verilen bir zarla çevrilidir. Zarın iç kısmında organeller ve akışkan bir madde olan sitoplazma yer alır. Bütün hücreler DNA halinde genleri taşıyan kromozomlar ve genlerden alınan şifreye uygun olarak protein sentezleyen küçük ve zarsız ve iki birimden oluşmuş organeller olan ribozomları içerir. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin birbirleri arasındaki en temel fark ise adlarından da anlaşılacağı gibi ökaryotik hücredeki kromozomların zarla çevrili bir çekirdek ve zarlı organellere sahip olmalarıdır (Campbell and Reece 2008).

1.3. Çekirdek

Bir hücrenin tüm genetik bilgisini içeren DNA'ya genom adı verilir. Prokaryotlarda bulunan genom genellikle tek ve uzun bir DNA molekülü iken, ökaryotlarda bulunan genomlar genellikle çok sayıda DNA molekülü şeklindedir. Ökaryotik bir hücrede yer alan DNA'nın toplam uzunluğu oldukça fazladır. Örneğin tipik bir insan hücresi yaklaşık 3 m boyunda DNA içerir. Bu uzunluk hücre çapının yaklaşık 300.000 katıdır. Hücre bölünmesi meydana gelmeden önce, yeni hücreye aktarılmak üzere bu DNA'nın tümü kopyalanır ve iki kopya birbirlerinden ayrılır. Böylece oluşan her yeni hücre, ana

genomun tam bir kopyasına sahip olur. Bu kadar büyük miktardaki DNA'nın eşlenmesi ve yavru hücrelere hatasız olarak aktarılabilmesi, DNA'nın kromozomlar halinde paketlenmiş olmasının sağlamış olduğu bir avantajdır. (Campbell and Reece 2008)

Nükleoprotein yapıdan meydana gelmiş, her canlı türünde mutlaka bulunan, türe özgü şekli, yapısı ve sayısı olan, canlılarda karakterlerin meydana gelmesinden sorumlu, hücrenin interfaz evresinde çekirdekte bulunan ve kromatin iplikler şeklinde olan, hücre bölünmesi sonucu eşlenerek yavru hücrelere aktarılan bu yapı birimlerine kromozom adı verilir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 2010). Genetik materyalin özel yapılar halinde yoğunlaşmış halidir kromozomlar.

Her ökaryotik tür kendine özgü sayıda kromozoma sahiptir ve bu kromozomlar o organizmanın her hücresinin çekirdeğinde yer alırlar. Örneğin, *Pelophylax ridibundus* da somatik hücrelerinin (üreme hücreleri haricindeki bütün vücut hücreleri) her biri 26 kromozom içerir. Üreme hücreleri yani gametler (yumurta ve sperm hücreleri) ise, somatik hücrelerdekini yarısı kadar sayıda kromozom içerirler. *Pelophylax ridibundus* için bu sayı 13'tür.

Kromozomların büyüklükleri ve sentromerlerinin konumları farklıdır. Kromozomlar belirli boyalarla boyandıkları zaman, her kromozomun renkli bantlardan oluşan ayırt edici desene sahip olduğu görülür.

1.4. Hücre Bölünmeleri

Canlılığın devamı hücre üremesine yani hücre bölünmesine bağlıdır. Ökaryot canlılar mitoz ve mayoz bölünme geçirirler. Çok hücreli canlıların büyüüp gelişmesi, kendisini oluşturan hücrelerin çoğalması ve büyümesi hücre bölünmesine bağlıdır. Tek hücreli canlılarda hücre bölünmesi birey sayısının artmasını, yani üremeyi sağlar. Çok hücreli canlılarda ise birey, zigotun ard arda bölünmesi ve bu hücrelerin büyümesiyle meydana gelir. Mayoz bölünme eşey hücrelerinde görülür. Mitoz bölünme ise somatik hücrelerde görülür.

1.4.1. Mitoz

Bir organizma için sayı ve şekil bakımından özel olan kromozom takımının, sayısal ve yapısal değişikliğe uğramadan yavru hücrelere aktarılmasını sağlayan hücre bölünmesine mitoz bölünme denir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 2010). Çok hücreli canlılarda, hücreler arasındaki genetik devamlılık mitoz bölünme ile sağlanır. Mitoz bölünmede kromozomlar, genetik özelliklerin bir sonraki nesile aktarılmasında araç olarak görev alır.

Mitoz bölünme, hücrede bulunan kalıtsal materyalin yavru hücrelere eşit oranda dağılmasını sağlayan oldukça karmaşık bir olaydır. Hücre mitoz bölünme evresine girmeden evvel hazırlık aşamasında ((interfaz) DNA'sını eşleyerek iki katına çıkarır. Yani kromozomları tek iplikli iken eşlendiği için iki iplikli hale geçer (iki kromatidli olur). Ardından meydana gelen mitozda çekirdek bölünmesi daha önce replike olmuş DNA miktarının yarıya inmesiyle sonlanır. Bir hücreden iki hücre oluşuncaya kadar geçen süre hücre siklusu olarak adlandırılır. Hücrenin hayat siklusunda iki evre görülür: birincisi interfaz, ikincisi karyokinez ve sitokinezin görüldüğü mitotik evredir.

İnterfaz evresinde bölünme için gerekli hazırlıklar yapılır. Mitotik evreyi ise 4 faza ayırarak inceleyebiliriz. Profaz, Metafaz, Anafaz, Telofaz.

Profaz

Profaz sırasında çekirdek ve sitoplazma içinde değişiklikler olur. Çekirdek içindeki kromatin iplikler kısalıp kalınlaşır. Kromozomların her biri birbirlerine tutunmuş özdeş iki kardeş kromatid halinde görülür. Sitoplazma içinde iğ iplikleri oluşmaya başlar. Çekirdek zarı ve çekirdekçik eriyerek kaybolur. Sentrozomlar zıt kutuplara gitmek için hareket eder.

Metafaz

Sentrozomlar hücrenin zıt kutuplarına yerleşmiştir. Kromozomlar metafaz plağı denilen ve mitotik mekiğin iki kutbundan eşit uzaklıkta olduğu varsayılan bir düzlem üzerinde yani ekvatorial düzlem üzerinde sıralanmıştır. Her kromozom zıt kutuplardan gelen mikrotübüllerden oluşan iğ ipliklerine tutunmuştur. Kromozomların en net olarak görüldüğü evredir. Karyotip çalışmaları yapılırken kromozomlar metafaz evresinde çeşitli kimyasal tekniklerle durdurularak incelenir.

Anafaz

Her kromozomun çift halindeki sentromerleri ayrılıp, kardeş kromatitlerin birbirlerinden ayrılmaya başladığı ve zıt kutuplara doğru çekildiği evredir.

Telofaz

Hücrenin iki kutbunda yeni çekirdekler oluşur. Kromozomlar açılarak tekrar kromatin ipliği halini alır. Profaz evresinde olan olayların tam tersi olaylar gerçekleşir. Bu evreden sonra sitoplazma bölünmesi gerçekleşir ve iki yeni özdeş hücre oluşur (Campbell and Reece 2008).

1.5. Karyotip

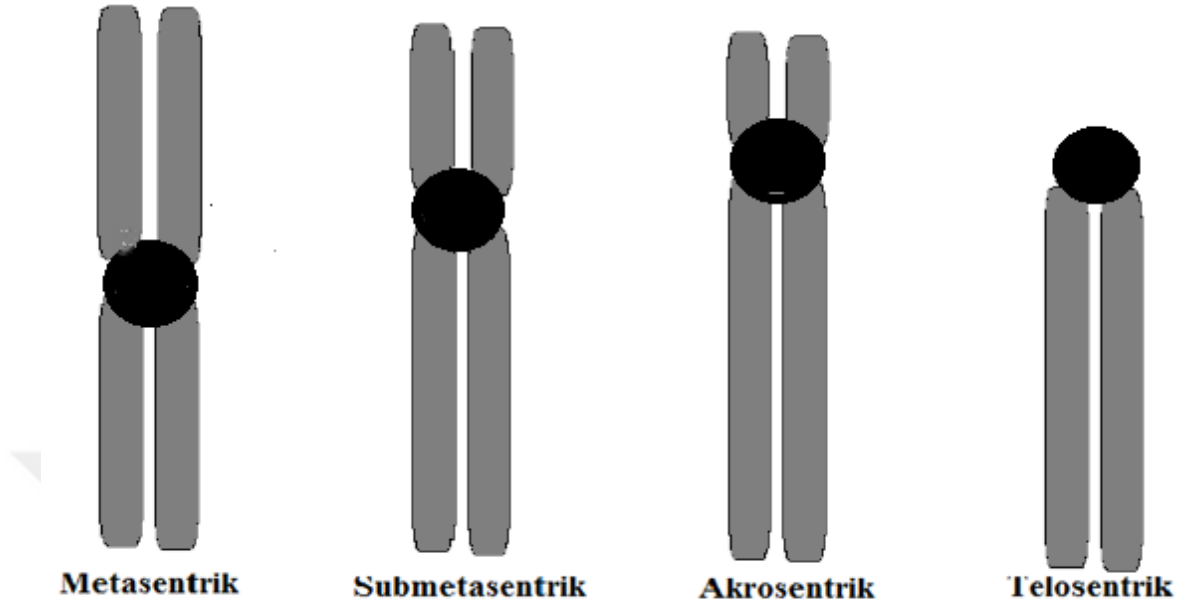
Bir hücredeki kromozomların özdeş çift kromozomlar halinde eşlendikten sonra belli bir düzene göre sıralanmasına yani, bir organizmaya ait tüm kromozomların yapısal ve sayısal özellikleri dikkate alınarak homolog kromozom çiftleri halinde sıralanmasına karyotip denir. Karyotip her tür için karakteristiktir. Bununla beraber karyotip terimi, bir birey için veya bir tek hücre içinde kullanılabilir.

Bir canlının kromozomlarını en net ve belirgin olarak incelendiği evre mitozun metafaz evresidir. Çünkü kromozomlar bu devrede en kısa boya ve en fazla kalınlığa ulaşmıştır. Dolayısıyla bir canlının kromozomlarını net bir biçimde incelenecekse mitoz bölünme geçiren hücreleri metafaz evresinde durdurabilmek için uygun evrede ön muamele kimyasalları ile muamele edip, kromozomların hücre içinde dağılmasının ve sonraki evreye geçmesinin önlenmesi sağlanmalıdır.

Sonra elde edilen bu materyalden boyama yöntemleriyle preparatlar yapılır. Hazırlanan preparatlarda kromozom yapısı ve sayısı belirlenerek karyotip analizi yapılabilir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 2010).

Sentromer, kromozom kollarının birleştiği yerde meydana gelen primer boğum bölgesi adı verilen bir bölgedir. Bu bölgede sferula denen küçük bir tanecik içeren parlak, açık bir bölge bulunur. Bu açık bölgedeki DNA'ya sentromer adı verilir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 2010). Aynı kromozom sayısına sahip olsa dahi bu türlerin bulunduğu cinslerde çoğu zaman kromozom yapılarında farklılıklar görülür. Mesela; sentromerin pozisyon, yani iğ ipliklerinin kromozoma bağlandığı noktanın yeri aynı kromozom sayısına sahip bu türleri ayırt etmede işimizi kolaylaştıran önemli bir özelliktir.

Sentromer, her bir kromozomun genel görünümünü saptar. Sentromerin konumuna bağlı olarak farklı kol oranları tesbit edilmiştir. Kromozomlar sentromer yerleşimlerine bakılarak metasentrik, submetasentrik, akrosentrik ya da telosentrik olarak sınıflandırılırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Sentromerin durumuna göre kromozom morfolojileri

Kromozom sayılarının ve şekillerinin her bir canlı türü için spesifik olduğu fark edilmesinin ardından bu özellik birçok taksonomistin dikkatini çekmiş ve bu konu üzerine eğilmişlerdir (Yılmaz 2012). Her bir canlı organizma kendisine özel farklı karyotipik özellikleri içerir ve genellikle karyotipleri benzer olan türlerin, benzerlikleri diğer türlerden çok daha fazladır. Kromozomların boyut, sayı ve morfolojisinde meydana gelen farklılıklar evrimsel açıdan kanıt olarak kullanılabilir özelliklerdir ve kromozomlar aracılığıyla genlerdeki değişiklikleri evrimsel boyutta takip etmeye yardımcı birçok yol bulunmaktadır (Sumner 2008). Morfolojilerine bakılarak yapılan sınıflandırmada görülen karışıklık, canlının evrimsel açıdan değerlendirilmesinde kafa karışıklığı oluşturmaktadır. Böyle canlı gruplarında açığa çıkan evrim ve türleşme problemlerini çalışırken kromozom çalışmalarından elde edilen sonuçlar uygun, net ve daha kesin bilgiler toplamamıza yardımcı olacaktır (Matur 2009).

1.5.1. Karyotip çalışmaları

Kromozomal çalışmalarda hayvan hücrelerinden oluşturulan preparattaki metafaz plaklarının incelenmesiyle diploid kromozom sayısı ($2n$), temel kromozom kol sayısı (FN) ve otozomal kromozomların kol sayısı (FNa) belirlenmektedir. Hayvanın tam metafaz plağıyla, kromozomları tek tek şekillerine göre ve homologları bulunarak yan yana belli bir düzende dizilerek karyotipi hazırlanır. Erkek örneklerin karyotipinden yararlanılarak cinsiyeti oluşturan eşey kromozomları da belirlenir ve oluşturulan karyotip üzerinden hayvanın $2n$, FN ve FNa değerleri hesaplanır. $2n$ değerinin belirlenmesi için karyotipteki kromozomların hepsi tek tek sayılır. FN değerinin belirlenmesi için kromozomların kol sayıları sayılır.

Hayvanların sahip olduğu morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler, canlının sahip olduğu genetik ve yaşadığı çevrenin etkisiyle ortaya çıktığından yapılan sitotaksonomik çalışmalarda hücre seviyesinde bilgi elde edilir. Hücrenin kromozomlarına kodlanmış olan genetik bilgileri çekirdeğinde olduğundan bu çalışmalar karyoloji adı altında yürütülmektedir.

Geçmişte yapılan sitotaksonomik çalışmaların çoğu kromozom sayıları, morfolojileri ve davranışlarıyla ilgiliyken bugün daha detaylı ve sağlam veriler edindiğimiz sitokimyasal çalışmalarda hız kazanmıştır. Kromozom analizleri sayesinde hayvan popülasyonlarının kendilerine özgü genetik yapılarının belirlenmesi, türler arası ve tür içi (hatta bireysel) kromozom polimorfizmi belirlenebilir. Ayrıca bu teknikler sayesinde canlının hücrelerindeki oluşan hasar, kromozomal hastalıkların ortaya çıkarılması, filogenetik ilişkilerinin belirlenebilmesinden dolayı önemlidir. Bu noktada amfibi ve sürüngenler iyi bir genel çevre sağlığı göstergesi olarak düşünülmektedirler. Canlıların evrimsel geçmişi ortaya çıkarmak, akrabalık ilişkilerini belirlemek ve genel anlamda bilgi sahibi olmak için, popülasyonlar veya popülasyonu oluşturan türler arasındaki genetik farklılıklardan yararlanabiliriz (Klug *et al.* 2009). Ancak bu konuyla ilgili yapılan çalışma sayısı ülkemizde oldukça azdır.

1.5.2. Bantlama çalışmaları

Sitogenetik çalışmalar yapılırken ilk olarak hedef, incelenecek canlının kromozom sayısını ve dağılımını net olarak belirlemek için karyotip çalışması yaparak, amaca uygun bantlama teknikleri ile kromozomal formlar arasındaki benzerlik-farklılık ilişkisini ortaya çıkarmaktır. Dobingy *et al.* (2004) yapmış oldukları bantlama çalışmaları sonucu elde edilen bant durumlarının filogenetik analizlerde kullanılabilecek nitelikte karakterler olduğunu göstermesiyle, büyük önem kazanmıştır. Hücre çekirdeğinde bulunan kromozomların birbirlerinden ayırt edilmesi için basit ve kullanışlı bir metodun geliştirilmesine ihtiyaç duyulması bantlama tekniklerinin gelişimi için önemli bir kolaylık sağlamıştır. Bantlama teknikleri, diğer canlılarda da kullanılıyor ancak özellikle insanlar üzerinde yapılması amaçlanan çalışmalar için geliştirilmiştir (Caspersson *et al.* 1968).

İlk bantlama tekniği 1968’de yapılmış ve bu teknik sayesinde kromozomlar üzerinde koyulu açık bantlar halinde dizilmiş DNA bölgelerinin ayırt edilmesi kolaylaşmıştır. Caspersson *et al.* (1968). Kromozomlar üzerinde bantlanmış bölgeleri belirlemek ve ayırt etmek amacıyla birçok teknik tanımlanmıştır. C, G, R bantlama teknikleri en önemlilerinden bazılarıdır. Bunların haricinde daha az kullanılan ve hazırlanması diğer tekniklere göre daha zor olan Q bantı tekniği vardır (Gosden 1994).

1.6. Amfibiler

Amfibiler omurgalı hayvanlar içerisinde suya ve karaya en iyi uyum sağlamış olan yarı-sucul bir canlı grubudur. *Rana* cinsi Avrupa, Amerika, Avustralya’da yayılım gösterir (Özeti ve Yılmaz 1994; Demirsoy 2004).

1.6.1. Ranidae familyası

Ranidae familyasında bulunan kurbağaların boyları 1.5-25 cm. arasında farklılık gösterir. Bacakları uzun, dillerinin arka ucu serbesttir ve üst çenelerinde diş mevcuttur. Suya bağlı olarak yaşayan bu türün, derileri pek düzgün değildir yani pürüzlüdür.

Yumurtalarını suya toplu halde bırakırlar. Dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunur ve yaklaşık 300 kadar türü vardır. Tür bakımından en zengin familyadır. Ülkemizde iki cinsi (*Rana* ve *Pelophylax*) vardır (Demirsoy 2004; Kuru 2004; Baran vd. 2012).

1.6.2. *Pelophylax (Rana)* cinsi

Bu cinse ait bireylerin gözbebekleri yatay, dilleri arkada serbest ve çatallıdır. Arka ayaklarında parmak arası zarsı perdeli, ön ayak parmakları ise serbesttir. Ülkemizde yaşayanlarda kulak zarı belirgin olarak fark edilir. Tüm dünyada geniş bir yelpazede yayılmışlardır; ancak en çok türü Hindistanda bulunmaktadır. Yaşamlarının her evresinde su veya suya yakın yerlerde yaşamayı tercih ederler. Ülkemizde bu cins 3 türü ile temsil edilir. Bunlar; *Pelophylax ridibundus*, *P. bedriagne*, *P. carolinatus*, (Demirsoy 2004; Baran vd. 2012).

1.6.3. *Pelophylax ridibundus*

Pelophylax ridibundus'a çok geniş ve oldukça değişik yaşam alanlarında rastlamak mümkündür. Yaprak dökken orman diplerinde, step ve bozkır ikliminde, çayır ve otlaklarda, yarı çöl özelliği gösteren ve kurak olan bölgelerde de yaşamlarını sürdürebilirler. Fakat büyük ölçüde nemli alanları tercih ettikleri için nehir vadilerinde, kanallar boyunca, durgun veya akışkan su kıyılarında, gölcüklerden daha büyük olan göllere geçiş alanlarında, nehir ve çayların toprakla birleştiği yerlerde yaşamlarını rahatlıkla sürdürebilirler. Yarı sucul olan bu türün üyeleri; açık, ısınan ve bitki örtüsüyle çevrilmiş alanlarda yaşamayı tercih ederler (Şekil 1.2).

Ayrıca *Pelophylax ridibundus* sadece tatlı sularda değil biraz tuzlu olan sularda da yaşamlarını sürdürebilirler. Örneğin Hazar denizi, Aralı yarımadasının kuzey kıyılarında deniz suyuna yaklaşık 0.5-1 m mesafedeki alanda ürediği görülmüştür. (Anonim 2009)

Türkiye'de ise bu türün üyeleri kendileri için uygun olan biyotopu buldukları her bölgede yaşamlarını sürdürebilir (Şekil 1.3).



Şekil 1.2. *P. ridibundus*'un dünya üzerinde yayılış alanı (Anonim 2017a)



Şekil 1.3. *R. ridibunda*'nın Türkiye'deki dağılımı (Anonim 2017b)

Dünya genelinde yapılan araştırmalarla, özellikle son 20 yıl içerisinde kurbağaların yapısında ve morfolojisinde bozulmalar meydana gelmiş, bu durumun görülme sıklığı artmış ve populasyonların azalmasıyla sonuçlanmıştır (Sparling *et al.* 2001). Amfibi sayısında görülen bu azalmaların tesbiti hızla yapılmakta fakat bu azalmalara neden olan faktörler hala tam olarak açıklanamamaktadır. Günümüzde bu azalmalara neden olan etkenlerden biri de pestisit kirliliğidir. Ancak bu konuya ilişkin bilimsel araştırmalar hala yeterli seviyede değildir (Keskin 2000).

Karyotipi belirlemek üzere uygulanan teknikler ve sitotaksonomik analizler ile dünyanın her yerinde geniş alanda yayılım gösteren *Rana*'nın karyotipini belirlemek için güvenilir bir yöntemdir. Ayrıca daha öncede bahsettiğimiz pestisit kirliliğini belirlemede, kromozomların sayı ve yapısında meydana gelen değişiklikleri açığa çıkarmada, bahsi geçen erozyon, orman tahribi, yapılaşma, kimyasal mücadele, izolasyon gibi durumların türleşmeye katkısı olup olmadığı yada hibrid türlerin açığa çıkmasında ne derece etkili olduğunu tesbit etmek için bu tekniklerin kullanılması şarttır.

Bu çalışmalar ışığında tespit edilen tür içi farklılıklar yanında karyolojik analizlerin de yapılması farklılıkların ortaya çıkarılması konusunda yarar sağlayabilmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından daha önce Güneybatı Anadolu populasyonları (İzmir, Manisa, Aydın, Denizli, Burdur, Isparta ve Konya illerindeki 10 farklı lokaliteden toplanan populasyonlar) ve Doğu Akdeniz'i temsil edebilecek Mersin populasyonunun karyolojik özellikleri çalışılmıştır. Bu çalışmada Erzurum il sınırları içinde 3 farklı lokaliteden toplanan *Pelophylax ridbundus* türü kurbağalarda karyotipik ve genotoksik analizler yapılarak Doğu Anadolu popülasyonu hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Avustralya’da bulunan *Hylidae* familyasında yer alan *Litoria* cinsi üzerinde, King (1980) tarafından yapılan karyotipik çalışmalara göre, *Litoria* cinsinin bütün türlerinde $2n=26$ iken, *Litoria infrafrenata* $2n=24$ kromozom sayısına sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada; kromozomlar üzerinde G-bantlama, C- bantlama ve Gümüş boyama teknikleri uygulanarak, kromozom sayıları, kromozom yapısı, sentromerin konumu ve çekirdekçiğin oluşumundan sorumlu NOR bölgeleri belirlenmiştir.

Kumlutaş (1999) tarafından yapılan çalışma ile Karadeniz Bölgesinden (toplam 115) *Rana ridibunda* örnekleri incelendi. Morfolojik incelemeler yapılırken çeşitli vücut ölçümleri alınarak bunların birbirine oranı, renk-desen analizleri yapılarak incelenen tür hakkında bilgi edinilmiştir.

Uğurtaş vd (2001) tarafından Bursa’da yapılan bu çalışmada Pelobatidae (Amphibia, Anura) familyasına ait Toprak kurbağası (*Pelobates syriacus*)’nın kromozom yapı ve sayıları incelenmiş ve karyotipi saptanmıştır. Sitogenetik incelemeler sonucunda $2n=26$ kromozom bulunmuştur. Yapılan karyotipler sonucunda 13 çift kromozomdan 11 çiftinin submetasentrik, 1 çiftinin metasentrik ve 1 çiftinin de akrosentrik olduğu gözlenmiştir.

Saleh ve Zeytinoğlu (2001) yapmış oldukları çalışma ile, Eskişehir ve Kütahya illerinden geçen Porsuk çayında sanayi ve tarımsal kirleticilerin klastojenik etkileri, *Rana ridibunda*’nın periferik eritrositlerinde araştırılmıştır. Kan yayma preparatlarının incelenmesi sonucu, mikronükleus oluşumunun, sanayi bölgelerinden alınan kurbağalarda nehrin en az kirli bölgelerinden alınanlara göre 5-6 kez daha fazla miktarda olduğunu görülmüştür, Mikronükleus oluşumunu etkileyen bu artış endüstriyel ve tarımsal kirlenmenin canlılar üzerinde klastojenik etkiler doğurduğu, dolayısıyla bölgede yaşayan insan topluluğu üzerinde de benzer etkilerin olabileceğini göstermektedir.

Ayaz vd (2004) tarafından Erzurum civarında morfolojik renk-desen analiz yapmak üzere 40 kurbağa örneği toplanmıştır. Elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında ventral tarafın renklenme özelliği açısından nominat ırktan çok *Rana ridibunda*'ya benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Sudi Arabistanda; Al-Shehri and Al-Saleh (2005) tarafından *Rana ridibunda*'nın karyotipi üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Çeşitli araştırmacılar tarafından da belirlenen *Rana ridibunda* nın 13 çift olan kromozom sayısı bu çalışmayla bir kez daha teyit edilmiştir. Bu kromozomlardan 7 çifti metasentrik, 6 çifti ise submetasentrik olarak belirlenmiştir. Bu çalışmayla, kromozom morfolojisiyle ilgili ince ölçümler yapılmış ve dikkatle hazırlanmış net bir karyotip görüntüsü sunulmuştur. Ayrıca bu çalışmada cinsiyetle ilgili kromozomlar da teşhis edilmiştir.

Zhelev *et al.* (2006) tarafından kimyasal sanayinin gelişmiş olduğu arazilerden toplanan kurbağalar üzerinde incelemeler yapılmıştır. Kurbağaların kanlarından elde edilmiş kan preparatları incelenerek, çekirdek anormallikleri incelenmiştir ve temiz arazilerden toplanan örneklerle karşılaştırılmıştır.

Moldova'da Mindrescu and Ghiorghita (2008) tarafından yapılan sitogenetik ve karyotipik çalışmalar sonucu *Rana ridibunda* ve *Rana esculenta* kromozom sayısı belirlenmiştir. Her iki türünde kromozom sayısı $2n=26$ olarak belirlenmiştir. Bu kromozomların 1-5 çift kromozomun büyük geriye kalan 6-13 çiftinin ise daha küçük boyutlarda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 10. Kromozomda sekonder boğumun varlığı saptanmıştır. Cinsiyete özgü karakterleri taşıyan kromozom belirlenememiştir.

Martirosyan and Stepanyan (2009) tarafından kurbağa karyolojisi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Ermenistan'ın farklı bölgelerinde toplanan *Rana macrocnemis* ve *Rana ridibunda* örnekleri karyolojik ve sitogenetik olarak incelenmiştir. *Rana ridibundus* Ermenistan'ın kuzey, merkez ve güney bölgelerinden; *Rana macrocnemis* ise Ermenistan'ın kuzey ve batı bölgelerinden toplanmıştır. Yapılan analizler sonucu *Rana ridibundus* kromozom sayısı $2n=26$ ($10m+12sm+4st$) $NF=52$ olduğu bulunmuştur. Aynı

zamanda 10. Kromozom çiftinin NOR bölgesini oluşturduğunu bulmuşlardır. Ejmiatsin yakınlarında toplanan *Rana ridibundus* örneklerinde $2n=26$ ($12m+10sm+4st$) olduğu görülmüştür. *Rana macrocnemis* için ise bu sayı $2n=26$ ($8m+12sm+6st$) $NF=52$ 'dir.

Ergene vd (2010) tarafından Mersin'de çeşitli sitogenetik ve kromozom bantlama çalışmaları yapılmıştır. Mersin'de çeşitli sulak alanlardan toplanan *Rana ridibunda* örneklerinin bağırsak ve kemik iliği hücreleri kullanılarak, havada kurutma tekniği ile kromozom analizleri yapılmıştır. *Rana ridibunda*'nın 14 metasentrik, 10 submetasentrik ve 2 subtelosentrik olmak üzere $2n=26$ diploid sayıda kromozoma sahip olduğu tespit edilmiştir.

Aymak (2010) Mersin'in Alata ve Kazanlı bölgesinde yayılış gösteren *Rana ridibunda*'da 2007- 2009 yılları arasında meydana gelen kirlilikten etkilenme oranını araştırmak için, kas ve karaciğer dokularını, yaşadığı ortamda yer alan suyu ve suyun altında kalan sedimentte ağır metal birikimleri incelenmiştir. Ayrıca çevresel kirliliğin genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla nükleus anomali testi yapılmış mikronükleus, binükleus, loblu nükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus oranları belirlenmiştir.

Arslan vd (2010) tarafından Konya ve çevresinde (Meram, Beyşehir, Hadim) toplanan *Rana ridibunda* üzerinde karyotip çalışmaları yapılmıştır. Diploid kromozom sayısı $2n=26$ ($14m+8sm+4st$), temel kromozom kol sayısı (NF)=52 olarak belirlendi. Gümüşnitrat boyama tekniği ile 8 nolu kromozomun uzun kolu üzerinde NOR(nükleolar organizatör bölge (ikincil boğum) tespit edilmiştir.

Satari et al. (2015)'nin Ürdün'de yapmış oldukları çalışmaya göre *Pelophylax bedriagae*'nin karyotipik analizi yapılmış ve sonuç olarak 7 metasentrik (1,3,5,6,7,8 ve 9), 6 submetasentrik (2,4,10,11,12 ve 13) kromozom tesbit edilmiştir.($7M+6SM$)

Şişman et al. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada Karasu Havzası'nın tek akarsuyu olan Karasu Nehri ve civarında yaşayan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların sucül kirlilikten etkilenip etkilenmediğini araştırmışlar ve çimento fabrikası yakınlarında

yaşayan bu kurbağlarda mikro çekirdek, böbrek şekilli çekirdek, çentikli çekirdek ve loplu çekirdek anormallikleri tespit etmişlerdir. Kirlenmiş bölge kurbağalarının kanlarında çekirdek anormalliği frekansı temiz bölge kurbağalarına göre önemli ölçüde arttığı tespit edilen genotoksisitenin endüstriyel, tarımsal ve evsel aktivitelerle ilgili olabileceği kanaatine varmışlardır.

Gürkan *et al.* (2012) yaptıkları çalışma ile Vize (Kırklareli) ve Kazdağı (Yenice, Çanakkale) civarında toplanan *Pelophylax ridibundus* örneklerine ait eritrositlerde mikronukleus analizi yapılmış ve nuklear anormallikler tespit edilmiştir. Çalışmada binuklear, çentikli, tomurcuklu ve küçük loplu olmak üzere 4 tip nuklear anomallik belirlenmiştir. Vize ve Kazdağı örnekleri arasında toplam nuklear anormallik sayısı bakımından fark tespit edilmemiştir ($p=0,31$). Araştırma sonucunda elde edilen bulgulara göre, Vize örneklerinde mikronukleus frekansının daha yüksek bulunması, bölgedeki yoğun tarımsal faaliyetlerde kullanılan genotoksik pestisitlere maruz kalınmayla ilişkilendirilmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Bölgeleri

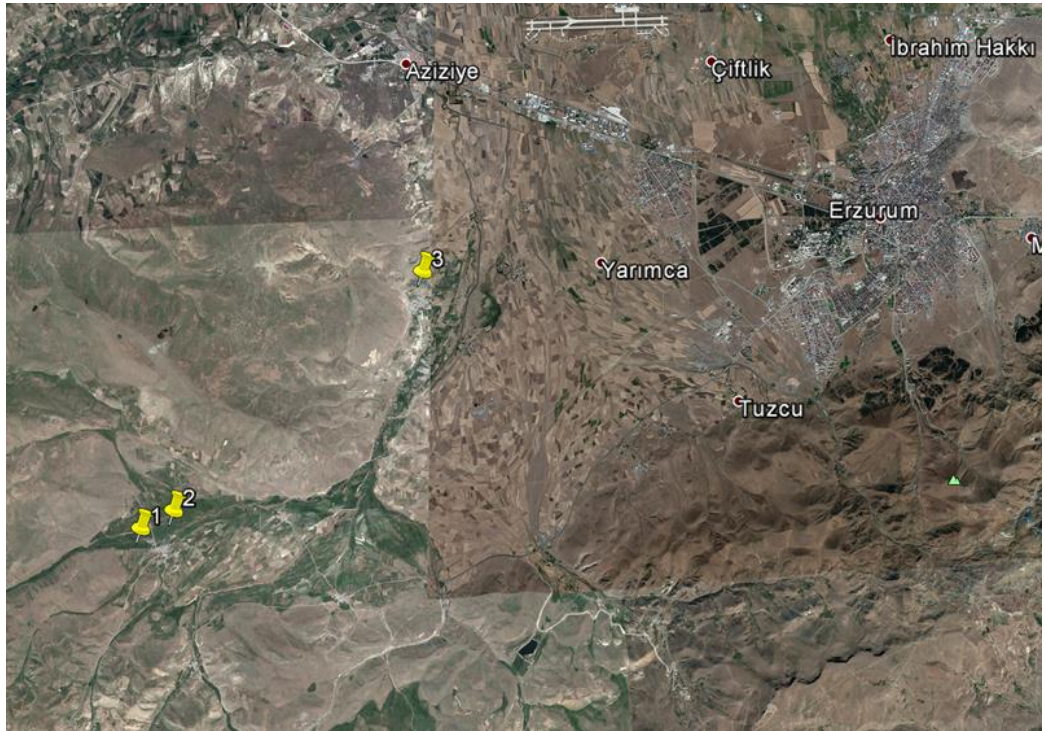
Karasu Havzası ismini içinden geçen Karasu Nehri'nden almaktadır. Nehir 1890 m rakımlı Erzurum Ovası'nın tek akarsuyudur. Fırat Nehri'nin önemli iki kolundan biri olan Karasu Nehri, Erzurum sınırları içinde Dumlu Dağı'nın eteklerinden doğar ve Erzurum Ovası'nı doğu-batı yönünde geçerek ovanın kuzeydoğusundaki 3000-3500 m yükseklikteki Karacağız, Güvercin ve Kandil Dağları'ndan gelen Köşk, Karagöbek ve Dumlu Derelerinin birleşmesinden sonra Karasu adını alır. Önce güneybatıya doğru akar, sonra batıya yönelir. Ilıca ilçesinden Pulur Çayı'nı alır ve İspir yolu üzerinde bulunan Serçeme Deresi'yle de birleşerek ovayı terk eder. Suyunu Fırat Nehri üzerine kurulmuş Elazığ'da bulunan Keban Baraj Gölü'ne ulaştırmaktadır. Karasu Nehri'nin Erzurum ili içindeki drenaj alanı 1642 km² ve ortalama akımı 4,304 m³/sn dir (Sönmez 2011).

Araştırmamızda tarımsal faaliyet çeşitliliği durumu göz önüne alınarak 3 istasyon seçilmiştir (Şekil 3.1). Bunlardan ilki Erzurum'un merkez köylerinden olan Dereboğazı Köyü'nden geçen Ömertepesuyu Deresi'nin köye giriş noktasıdır. Burası kirliliğin hiç olmadığı referans istasyonu olarak kabul edilmiştir (1. İstasyon). Diğer aynı derenin köy çıkışında olan ve suni gübrelemenin yapıldığı alan olarak seçilmiştir (2. İstasyon). Son istasyon ise yoğun tarımsal faaliyetin yapıldığı ve pestisit kullanımının tespit edildiği, aynı dereden sulamanın yapıldığı Söğütlü Köyü olmuştur (3. İstasyon) (Şekil 3.2).

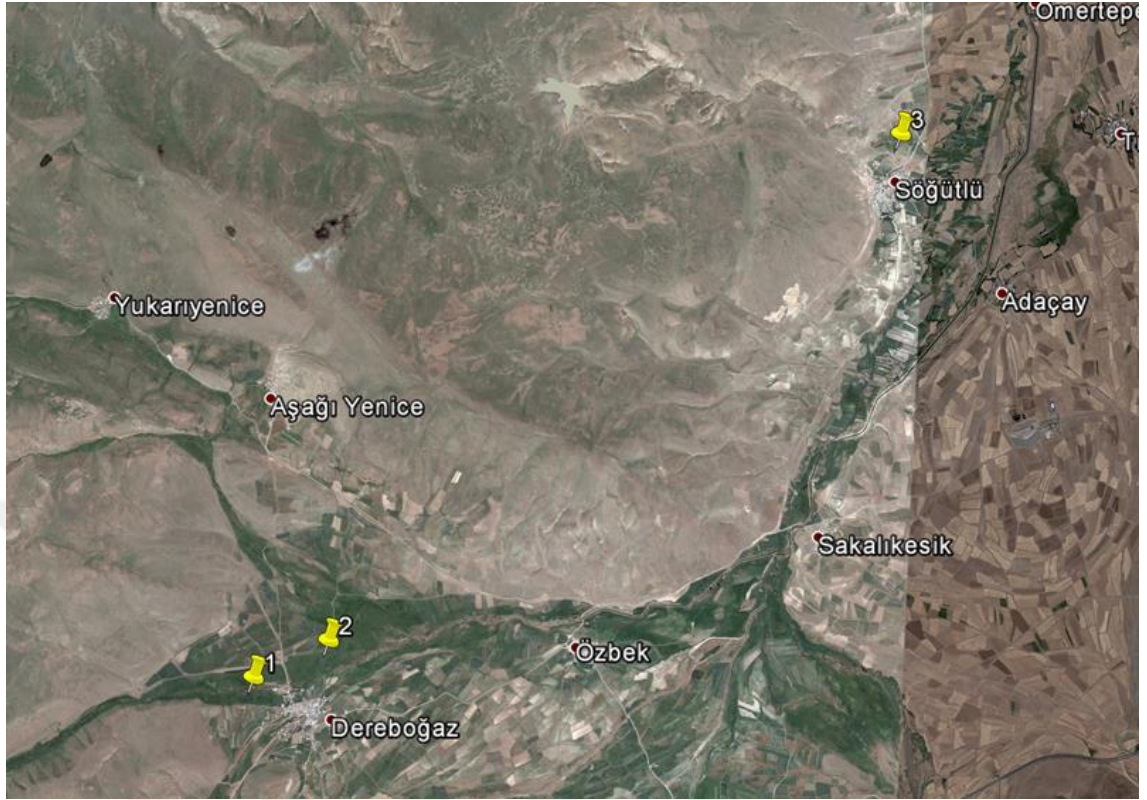
- 1. İstasyon:** Dereboğazı Köyü I. Erzurum- Dereboğazı Köyü 28.6. km (Şekil 3.3)
- 2. İstasyon:** Dereboğazı Köyü II. Erzurum- Dereboğazı Köyü 27. km (Şekil 3.3)
- 3. İstasyon:** Söğütlü Köyü. Erzurum- Söğütlü Köyü 17.7. km (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. İstasyonların genel haritası ve Erzurum Karasu havzası

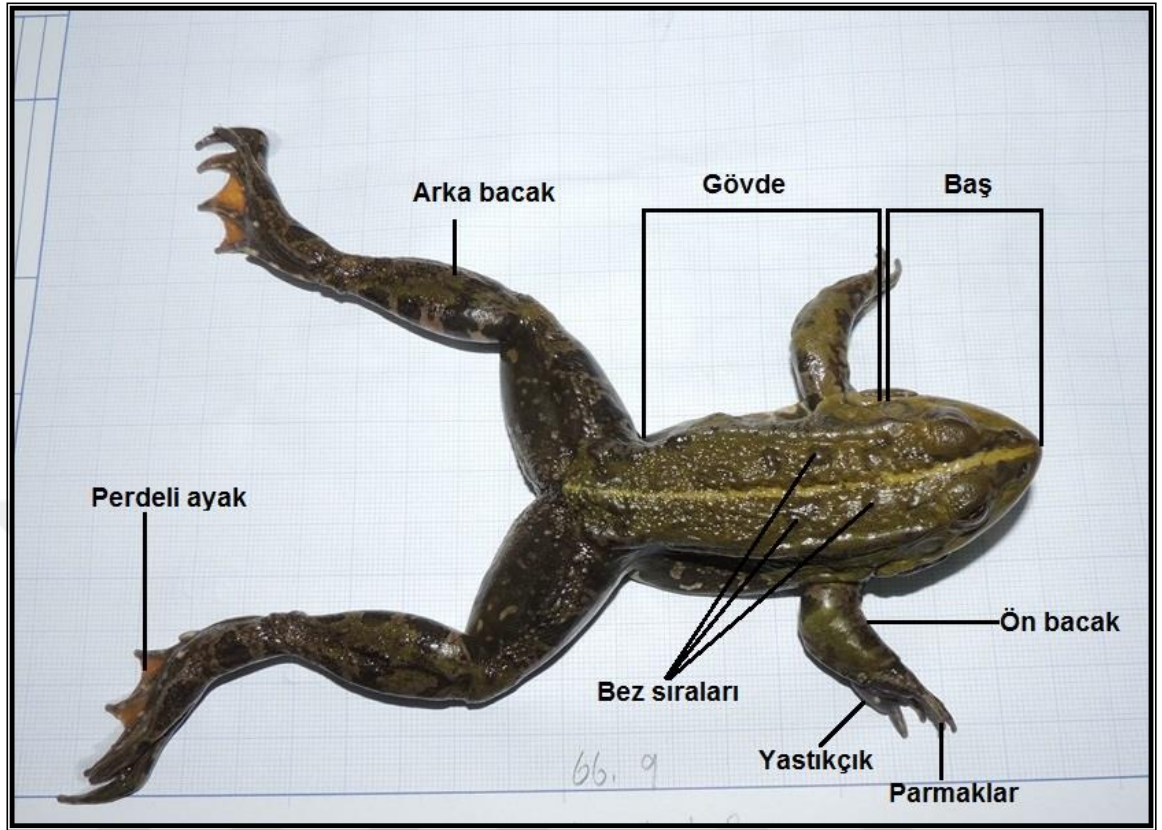


Şekil 3.2. İstasyonların Erzurum şehir merkezine göre konumları



Şekil 3.3. İstasyonların birbirine olan konumları. 1. İstasyon: Dereboğazı Köyü. 39°49'17.7 K, 41°00'56.8 D 2. İstasyon: Dereboğazı Köyü. 39°49'34.3 K, 41°01'36.1 D 3. İstasyon: Söğütü Köyü. 39°53'16.0 K, 41°06'34.5 D.

Çalışmada seçilen istasyonların doğal faunasında bulunan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalar tercih edilmiştir (Şekil 3.4). Örnekler Haziran ve Ekim 2016 tarihlerinde toplanmıştır. Bunun için gerekli izinler olan Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan Etik Kurulu İzni (EK1), Orman ve Su İşleri Bakanlığı'ndan Araştırma İzni (EK2), Gıda tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan Araştırma İzni (EK3) çalışma başlamadan önce ilgili yerlere müracaat edilerek alınmıştır.



Şekil 3.4. *Pelophylax ridibundus* (Ova kurbağası, ♂), dorsal görünüş.

3.2. Sitogenetik Yöntemler

3.2.1. Giemsa boyama (G bantlama)

Karasu Havzası'ndan toplanan toplam 60 kurbağa örneği üzerinde inceleme yapılmıştır. Kurbağalara ilk işlem olarak mitoz bölünmeyi teşvik etmesi amacıyla diseksiyondan 30 saat önce karın bölgelerinden %1'lik fitohemaglutinin verilmiştir.(Şekil 3.5)

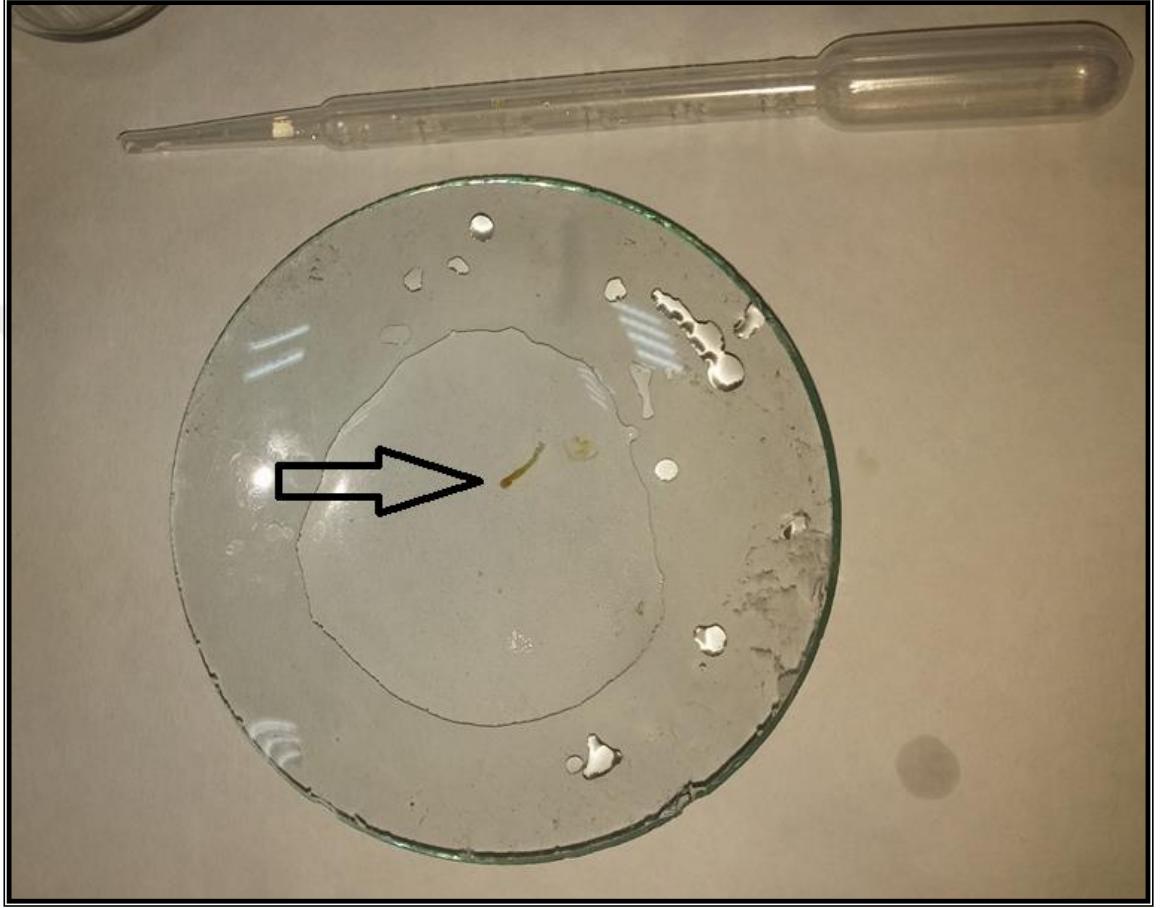


Şekil 3.5. Kurbağaya fitohemoglutinin intraperitoneal olarak enjeksiyon işlemi

Diseksiyondan yaklaşık 18 saat önce mitozdaki hücreleri metafaz aşamasında durdurmak için %1'lik kolşisin solüsyonundan aynı bölgeye enjekte edilmiştir. Enjeksiyon miktarları 10 g vücut ağırlığı için 1 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra hayvanlar benzocain ile bayıltılıp disekte edilerek önce barsak çıkarılmış, hipotonik sıvı içinde (0,075 M KCl) boydan boya kesilmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık 60 dakika bekletilmiştir. Hücre süspansiyonunu içeren tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 3:1 oranında hazırlanmış carnoy içinde fiske edilmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjlemeden sonra süpernatant atılarak tüpte kalan 0,5 ml'lik hücre süspansiyonu önceden soğutulmuş temiz lamalar üzerine damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Havada kurutulan lamalar fosfat tamponunda hazırlanmış %10'luk giemsa boyasıyla 20 dakika boyanmış, saf sudan geçirilmiş ve kurutularak incelenmiştir.

Kemik iliğinden kromozom eldesinde ise farklı bir yol izlenmemiştir. Kurbağalar disekte edildikten sonra hayvanın uzun kemikleri olan tibia ve femur, kas ve bağ dokudan iyice temizlenmiş ve kemiklerin epifizleri her iki taraftan düzgünce kesilmiştir. Kemik iliği, 0,075 M KCl içeren bir insülin enjektörü yardımıyla itmek suretiyle bir saat

camı içerisine alınmış ve doku küçük parçalara ayrılarak 60 dakika 0.075 M KCl içinde bekletilmiştir (şekil 3.6). Tespit ve boyama işlemleri yukarıdaki gibi tekrarlanmıştır.



şekil 3.6. Kurbağa femurundan çıkarılan kemik iliği (ok)

3.2.2. Gümüş nirtat boyama (AgNOR)

Fikse edilmiş preparatlar %50'lik AgNO_3 içeren solüsyona daldırılmış, kurutmadan lamel kapatılmış, 2 saat 60°C 'de inkübe edilmiş, saf suyla yıkanmış, kurutulmuş, %2'lik giemsada 30 dk boyanmış, saf sudan geirilmış ve havada kurutularak lamellerin etrafı kanada balsamı ile kapatılarak incelenmiştir.

3.2.3. C bantlama

Fikse edilmiş preparatlar 0.2 N HCl içinde 30 dk bekletilmiş, sonra saf sudan geçirilmiş ve havada kurutulmuştur. Preparatlar taze hazırlanmış Ba(OH)₂ solüsyonunda 30 derecede 10 dk bekletilmiştir. 0.2 N HCl'ye batırılıp ve sonra saf suyla yıkanmıştır. Sonra 2XSSC içinde 60°C'de 1.5 saat bekletilmiş, saf suyla yıkanmış ve kurutmadan %10'luk giemsada 10 dk boyanmış, yıkanmış, kurutulmuş ve incelenmiştir.

3.2.4. Karyotip analizi

Karyotipler kromozomların boylarına göre sınıflandırılarak hazırlanmıştır. Kromozom formülünü belirlemek için kromozomlardaki her kol ölçülmüştür. Kol ölçümleri Leica LAS EZ 3.0 görüntü analiz etme bilgisayar programıyla yapılmıştır. Her kromozomun kol oranı (KO), sentrometik endeksi (SE) ve nisbi kol uzunluğu (NKU) hesaplanmıştır. Bunun için aşağıdaki formüllerden yararlanılmıştır.

$KO = \text{Uzun Kol} / \text{Kısa Kol uzunluğu} (\mu\text{m olarak})$

$SE = 100 \times \text{Kısa Kol uzunluğu} / \text{Toplam kromozom uzunluğu}$

$NKU = 100 \times \text{Kromozomun Toplam Boyu} / \text{Kromozomların Boyları toplamı}$

Homolog kromozom çiftlerini ve karyotip formülünü belirlemek için kromozomlar SE değerlerine göre sıralanmıştır. Bu işlem Levan *et al.* (1964)'ün metoduna göre yapılmıştır. Buna göre SE değeri 50.00-37.51 olan kromozom çiftleri Metasentrik (M), 37.50-25.01 olanlar Submetasentrik (SM), 25.00-12.51 olanlar Subtelosentrik (ST) ve 12.50-0.00 olanlar da Telosentrik (T) olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca Microsoft Office Excel program kullanılarak karyotipin idiyogramı da çıkarılmıştır.

Karyotip simetri ve asimetrisi ise Eroğlu (2015)'na göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$S/A_I = (1 \times M) + (2 \times SM) + (3 \times ST) + (4 \times T) / 2n$$

S/A_I = simetri asimetri indeksi; M = metasentrik kromozom sayısı; SM = submetasentrik kromozom sayısı; ST = subtelosentrik kromozom sayısı; T = telosentrik metasentrik kromozom sayısı; $2n$ = diploid kromozom sayısını göstermektedir. Buna göre S/A_I değeri 1.0-2.0 arasında olan için karyotipi simetrik, 2.1-3.0 olan simetrik asimetrik arasında ve 3.1-4.0 olan karyotip de asimetrik olarak sınıflandırılmaktadır.

3.3. Sitogenetik Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

%1'lik Fitohemaglutinin: 0.1 g fitohemaglutinin 100 ml saf suda çözünerek hazırlanır.

%1'lik Kolşisin: 0.1 g kolşisin 100 ml saf suda çözünerek hazırlanır.

0.075 M KCl: 0.5592 g KCl 100 ml saf suda çözünerek hazırlanır.

Carnoy fiksatif: 150 ml metanol 50 ml asetik asitle (veya 3:1 oranında) karıştırılarak elde edilir.

Fosfat tamponu: İki farklı çözeltinin değişik miktarlarda karıştırılması ile elde edilen tampondur. Karyotip analizlerinde Giemsa boyası pH 6.8 olarak hazırlanan tampon içinde hazırlanmalıdır. Tampon için 2 farklı çözelti hazırlanır.

Çözelti A: Na_2HPO_4 (Disodyum hidrojen fosfat)'ten 11.9 g alınır ve 1000 ml su içinde çözünür.

Çözelti B: KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat)'ten 9.1 g alınır ve 1000 ml su içinde çözünür.

%10'luk Giemsa: Çözelti A'dan 50 ml, Çözelti B'den 100 ml alınır. pH'sı 6.8 olan bu karışımdan 90 ml alınır ve üzerine 10 ml giemsa boyası eklenir.

$\text{Ba}(\text{OH})_2$ Solüsyonu: Her zaman taze hazırlanır. 350 ml'lik beher hafifçe ısıtılır ve içine 55°C su yerleştirilir. Bir kaşık dolusu $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bu kaba konur ve karıştırılır. Biraz soğuduktan sonra (50°C 'nin altına inince) preparatlar içine daldırılır.

2XSSC: Boyama yapmadan 10 dk önce hazırlanır. 175.32 g NaCl ve 88.23 g Sodyum sitrat 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanır. Oda sıcaklığında 1 yıl sabitliğini korur.

3.4. Genotoksik Analiz

Genotoksik etkileri araştırmak amacıyla erişkin kurbağaların periferik kanları kullanılmıştır. Bilindiği üzere kurbağa eritrositlerinde çekirdek mevcuttur ve bu çekirdeklerde oluşan anormallikler (eritrositik çekirdek anormallikleri=EÇA) genotoksitenin bir göstergesidir (Carrasco *et al.* 1990). Bu amaçla yakalanan her kurbağadan 4 adet yayma kan preparatı hazırlanmıştır. Bu preparatlar 10 dakika etanolde fikse edildikten sonra giemsa boyasında 30 dakika boyanmıştır. Hazırlanan her preparat 100'lük objektif altında 1000 adet eritrosit sayılarak incelenmiştir. İncelenen preparatlarda böbrek şekilli çekirdek, loplu çekirdek ve çentikli çekirdek gibi eritrositik çekirdek anormallikleri ve frekansları tespit edilmiştir.

3.5. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Çalışmalar yapılırken kullanılan aletler ve cihazlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar

Cihazlar ve Aletler	Temin Edildikleri Firmalar
Makro çekim Dijital fotoğraf makinası	Nikon coolpix P510
Dijital kamera destekli mikroskop	Leica DM750
Ultra santrifüj	Nüve NF 200
Otomatik pipet	Finpipette Labsystems
Mikroskop	Prior T-100mA
Hassas terazi	Shimadzu TXB6201L
Saf su cihazı	Easypure RF compact ultrapure ws

3.6. İstatistik

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi SPSS 20.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her istasyon için elde edilen ortalama EÇA değerlerinin karşılaştırılmasında ANOVA ve LSD testleri kullanılmıştır. Aradaki fark $p<0.05$ seviyesinde anlam yönünden değerlendirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Pelophylax ridibundus*'un Karyotip Analizi

Ova Kurbağası'nın dişi ve erkek bireylerinin barsak ve kemik iliğinden hazırlanan preparatlarda barsakta 248 ve kemik iliğinde 525 adet metafaz plağı sayılmıştır. Metafaz sıklığının kemik iliğinde daha fazla olduğu bulunmuştur. Metafaz plaklarında sayılan kromozom sayısı barsakta %4.8 oranında $2n=22$, %19.0 oranında $2n=24$, %72 oranında $2n=26$ ve %4.2 oranında $2n=28$ (Çizelge 4.1), kemik iliğinde ise %1.5 oranında $2n=22$, %9.3 oranında $2n=24$, %87.4 oranında $2n=26$ ve %1.8 oranında $2n=28$ (Çizelge 4.1) olarak tespit edilmiştir. En çok tekrar eden değerin hem barsakta hem de kemik iliğinde $2n=26$ olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.1. *Pelophylax ridibundus*'un barsak dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi

Preparat No	Metafaz sayısı	$2n=22$	$2n=24$	$2n=26$	$2n=28$
RB1	25	1	4	18	2
RB2	36	2	9	22	3
RB3	38	1	8	27	2
RB4	95	5	15	72	3
RB5	54	3	11	40	-
Toplam	248	12	47	179	10
%		4.8	19.0	72.0	4.2

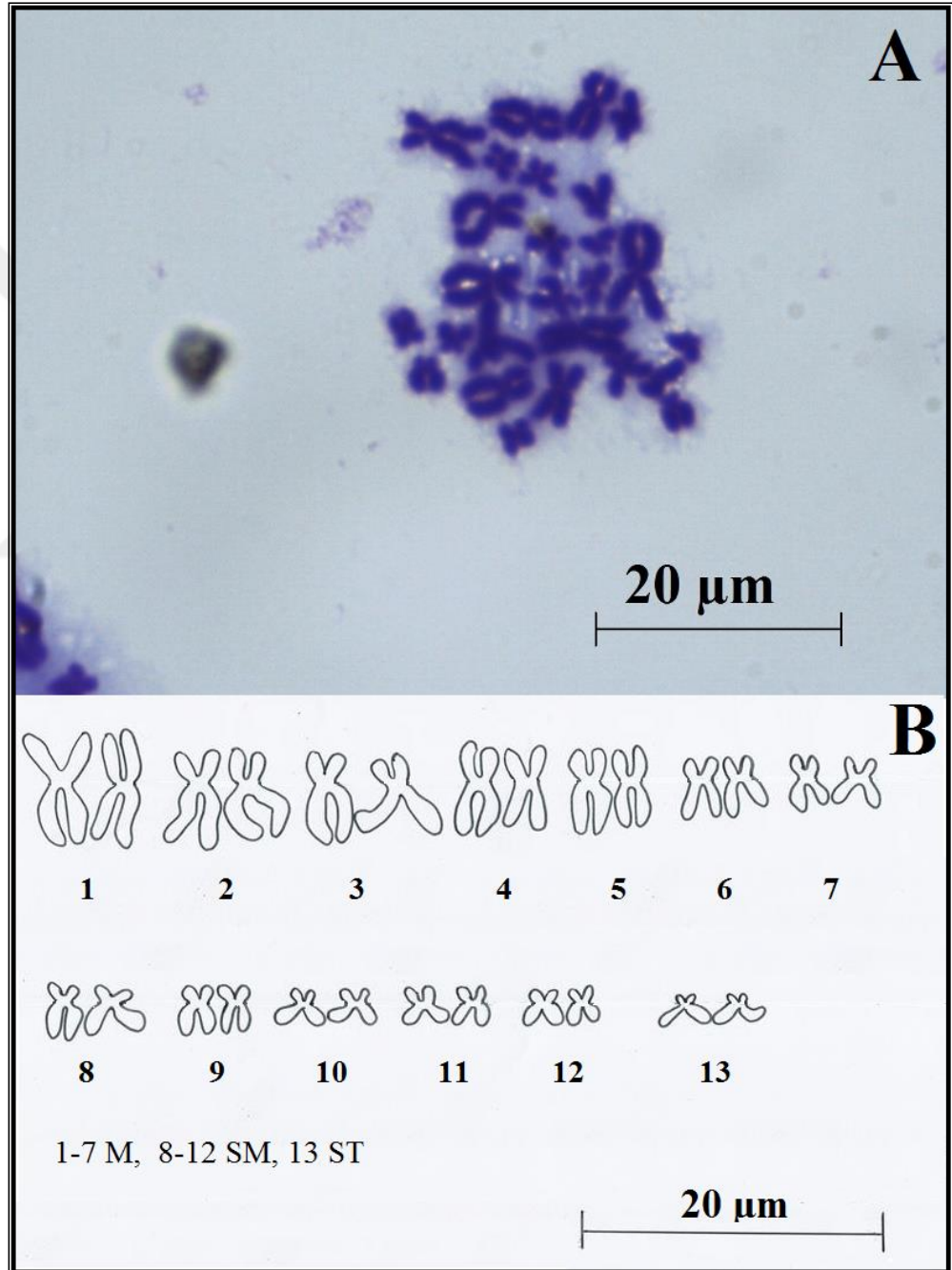
RB: “*ridibunda* barsak” kelimelerinin baş harfleridir.

Çizelge 4.2. *Pelophylax ridibundus*'un kemik iliği dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi.

Preparat No	Metafaz sayısı	$2n=22$	$2n=24$	$2n=26$	$2n=28$
RK1	85	1	8	74	2
RK2	100	2	12	85	1
RK3	65	1	4	60	-
RK4	95	1	11	82	1
RK5	180	3	14	158	5
Toplam	525	8	49	459	9
%		1.5	9.3	87.4	1.8

RK: “*ridibunda* kemik iliği” kelimelerinin baş harfleridir.

İncelenen 773 (248+525) metafaz plağından en iyi görünen ve en iyi dağılım gösterenlerden hazırlanan karyogramda kromozomlardan 7 çiftinin metasentrik (M), 5 çiftinin submetasentrik (SM) ve 1 çiftinin de subtelosentrik (ST) olduğu belirlenmiş ve karyotip 14M+10SM+2ST olarak düzenlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Pelophylax ridibundus*'un giemsa ile boyanmış (G bantlama) metafaz plağı (A) ve karyotipi (B). Metasentrik (M), submetasentrik (SM) ve subtelosentrik (ST) kromozomlar gruplandırılmıştır (14M+10SM+2ST)

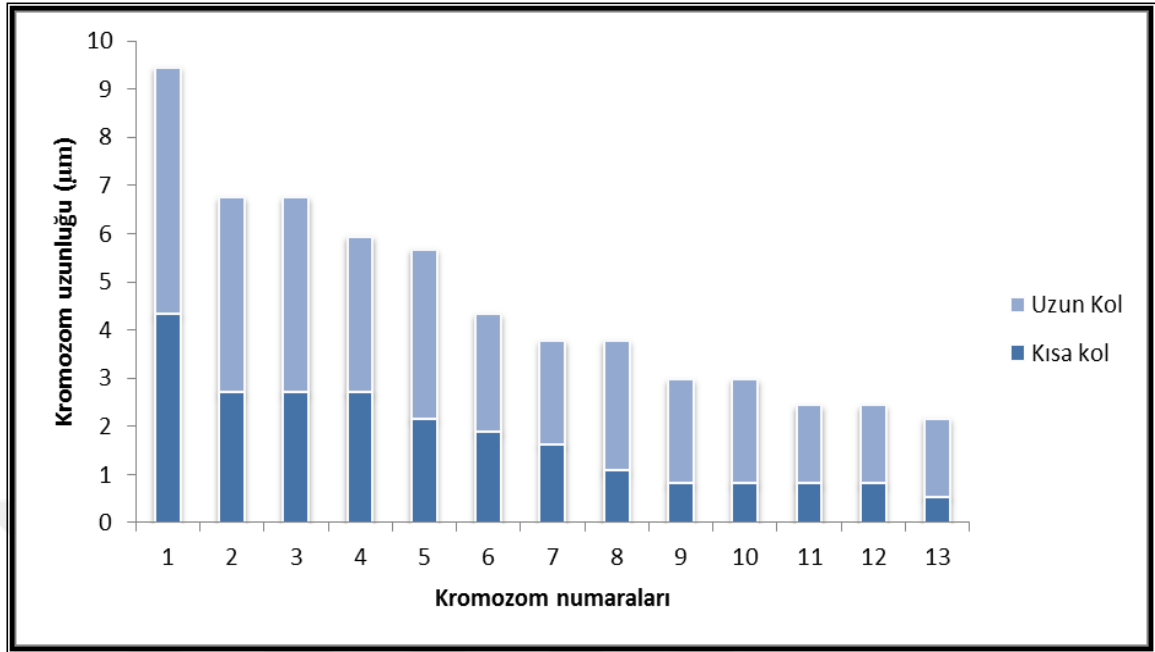
Toplam kromozom kol uzunluklarının 2.16 ile 9.45 µm arasında değiştiği, en uzun kromozomun metasentrik, en kısanın da subtelosentrik olduğu, kromozom kol sayısının (Fundamental Arm Number:FN) ise FN=52 olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Pelophylax ridibundus*'un kromozomlarının ölçümleri (µm olarak) ve sentromerik endeksleri

Kromozom numarası	Kısa kol	Uzun kol	Toplam uzunluk	Kol oranı	Sentromeri k indeks	Nisbi kol uzunluğu (%)	Kromozom formu	Kol sayısı
1	4.32	5.13	9.45	1.19	45.7	15.9	M	4
2	2.70	4.05	6.75	1.50	40.0	11.4	M	4
3	2.70	4.05	6.75	1.50	40.0	11.4	M	4
4	2.70	3.24	5.94	1.20	45.5	20.2	M	4
5	2.16	3.51	5.67	1.60	38.1	9.5	M	4
6	1.89	2.43	4.32	1.30	43.7	7.3	M	4
7	1.62	2.16	3.78	1.30	42.9	6.4	M	4
8	1.08	2.70	3.78	2.50	28.6	6.4	SM	4
9	0.81	2.16	2.97	2.70	27.2	5.0	SM	4
10	0.81	2.16	2.97	2.70	27.2	5.0	SM	4
11	0.81	1.62	2.43	2.00	33.3	4.1	SM	4
12	0.81	1.62	2.43	2.00	33.3	4.1	SM	4
13	0.54	1.62	2.16	3.00	25.0	3.6	ST	4
Toplam			59.4				13	52

*M: metasentrik, SM: submetasentrik, ST: subtelosentrik

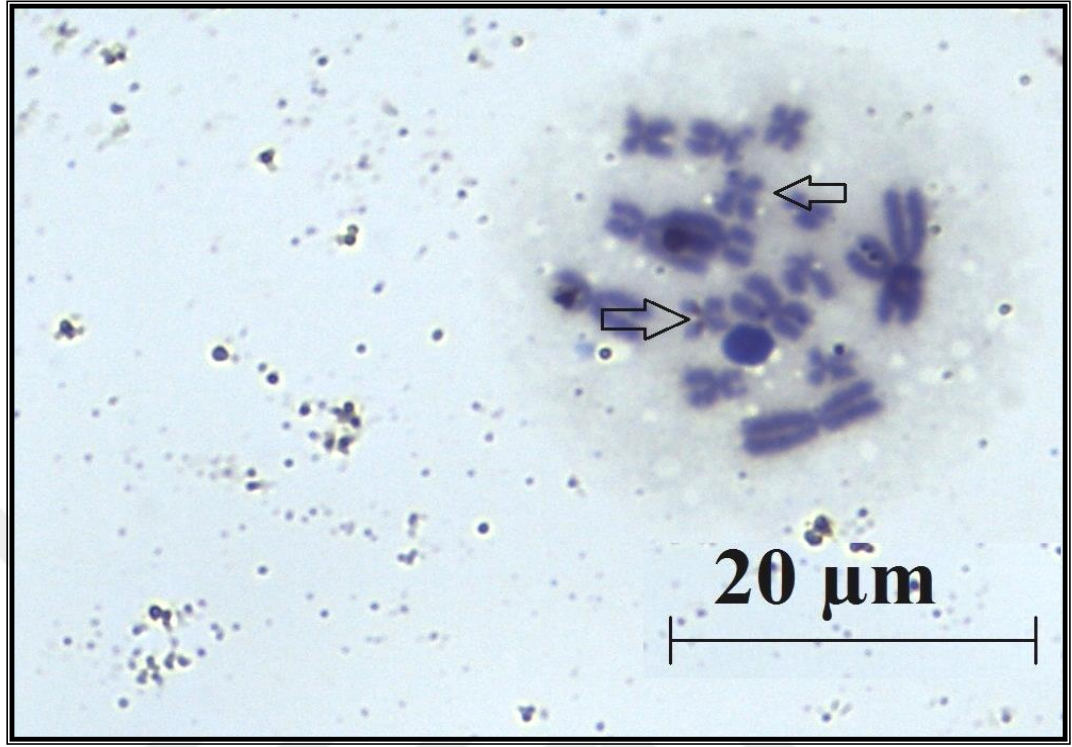
Bu ölçümlere göre hazırlanan idiyogram ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir. 1. 2. 3. 4. 5. 6. ve 7. kromozom çiftleri metasentrik (14M), 8. 9. 10. 11. ve 12. kromozom çiftleri submetasentrik (10SM), 13. kromozom çifti de subtelosentrik (2ST) olarak sırayla gruplandırılmıştır. Bu türde cinsiyete bağlı herhangi bir kromozom tespit edilememiştir. Simetri/asimetri indeksi ise $S/A_1 = (1 \times 14) + (2 \times 10) + (3 \times 2) / 26 = 1.53$ olarak tespit edilmiş olup *Pelophylax ridibundus*'un karyotipinin “simetrik” olduğu anlaşılmıştır.



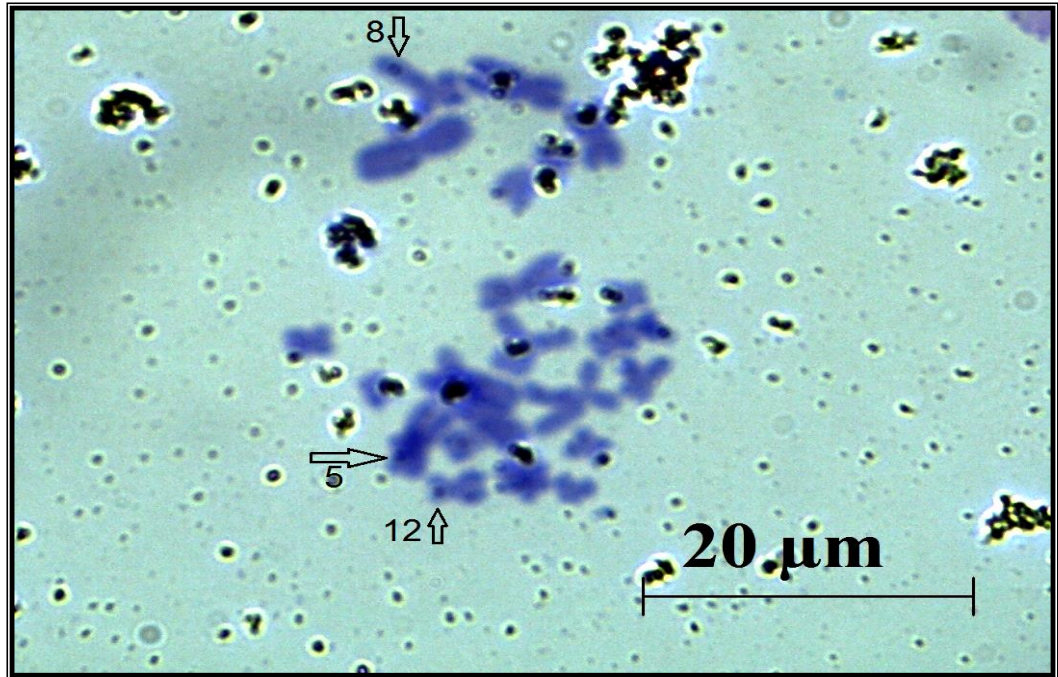
Şekil 4.2. *Pelophylax ridibundus*'un idiyoqramı

Giemsa boyama gibi rutin boyama yöntemleri karyotip hakkında genel bilgi sağlar. Ancak C ve NOR bantlama gibi diğer bantlama yöntemleri ile de daha ayrıntılı bilgiler edinilebilmektedir. Bu nedenle *Pelophylax ridibundus*'un karyolojik özelliklerini incelemek amacıyla Giemsa bantlama yönteminden başka gümüş nitrat boyama (Ag-NOR) ve C-Bantlama yöntemlerinden de yararlanılmıştır. Ag-NOR boyama kromozomlardaki nüklear organizler bölgeleri (NOR) boyar ve gösterir.

Yapılan boyama ile *Pelophylax ridibundus*'un NOR bölgesinin 10. kromozom çiftinin uzun kolu üzerinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3). Bir diğer boyama ise C-Bantlama tekniğidir. Bu yöntemle kromozomlardaki yoğun tekrar eden ve ifade edilmeyen DNA bölgeleri belirlenebilmektedir. Yapılan boyama ile *Pelophylax ridibundus*'un konstitütif heterokormatinler 5. ve 8. kromozom çiftlerinin uzun kolunun uç kısımlarında, 12. kromozom çiftinin kısa kolunun uç kısmında lokalize olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *Pelophylax ridibudus*'da NOR bölgelerini gösteren gümüş nitrat boyalı metafaz plağı. Oklar 10. kromozom çiftini göstermektedir



Şekil 4.4. *P. ridibudus*'da konstitütif heterokromatin kısımlarını gösteren C-bantlama yapılmış metafaz plağı. Oklar ilgili kromozomlardaki (5, 8 ve 12. kromozomlar) heterokromatin noktalarını göstermektedir

4.2. *Pelophylax ridibundus*'da Genotoksik Analiz

Araştırma kapsamında özellikle tarımsal faaliyetler dikkate alınarak Karasu Havzası içinde belirlenen bölgelerden yaz başı ve hasat sonrası iki farklı zamanda *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalar genotoksik açıdan incelenmişlerdir. Yakalanan kurbağaların boyutlarının aynı olmasına dikkat edilmiştir.(Şekil 4.5). Nitekim Haziran 2016'te yakalanan kurbağaların ortalama ağırlıkları 74.16 g ve burun ucundan kloak kenarı arası ortalama uzunlukları (SVL) 10.4 cm, Ekim 2016'te yakalanan kurbağaların ortalama ağırlıkları 85.37 g ve burun ucundan kloak kenarı arası ortalama uzunlukları 10.37 cm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Laboratuara canlı olarak getirilen kurbağaların bekletildiği akvaryum



Şekil 4.6. Kurbağalarda ağırlık ölçümü

Dereboğazı I (Kontrol), Dereboğazı II (Suni gübre alanı) ve Söğütlü Köyü (Pestisit alanı) bölgelerinden yakalanan kurbağaların eritrositik çekirdek anormallikleri (EÇA) frekansları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Mukayese istasyonlar arasında yapıldığında Dereboğazı I (Kontrol) kurbağalarında EÇA frekansı düşük gözlenmiştir. EÇA frekansı Dereboğazı II (Suni gübre alanı) kurbağalarında biraz artmış, ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. EÇA’ya bağlı genotoksisitenin Söğütlü Köyü (Pestisit alanı) kurbağalarında ise önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Seçili lokalitelerinden yakalanan Pelodytes ridibundus kurbağaların periferik eritrositlerindeki çekirdek anormallikleri ve frekansları (ort±SH)

Çekirdek anormalliği	Dereboğazı I	Dereboğazı II	Söğütlü
Çentikli çekirdek (Ç)	0.05±0.01	2.01±0.90	6.40±1.20
Loplu çekirdek (L)	0.02±0.00	0.6±0.40	1.90±0.70
Böbrek şekilli çekirdek (BŞ)	0.02±0.00	0.9±0.02	1.70±0.40
Toplam (Ç+L+BŞ)	0.09±0.01	3.51±0.00*	10.0±3.50*

* p<0.05 seviyesinde istasyonlar arasındaki istatistiki olarak farklılığı gösterir.

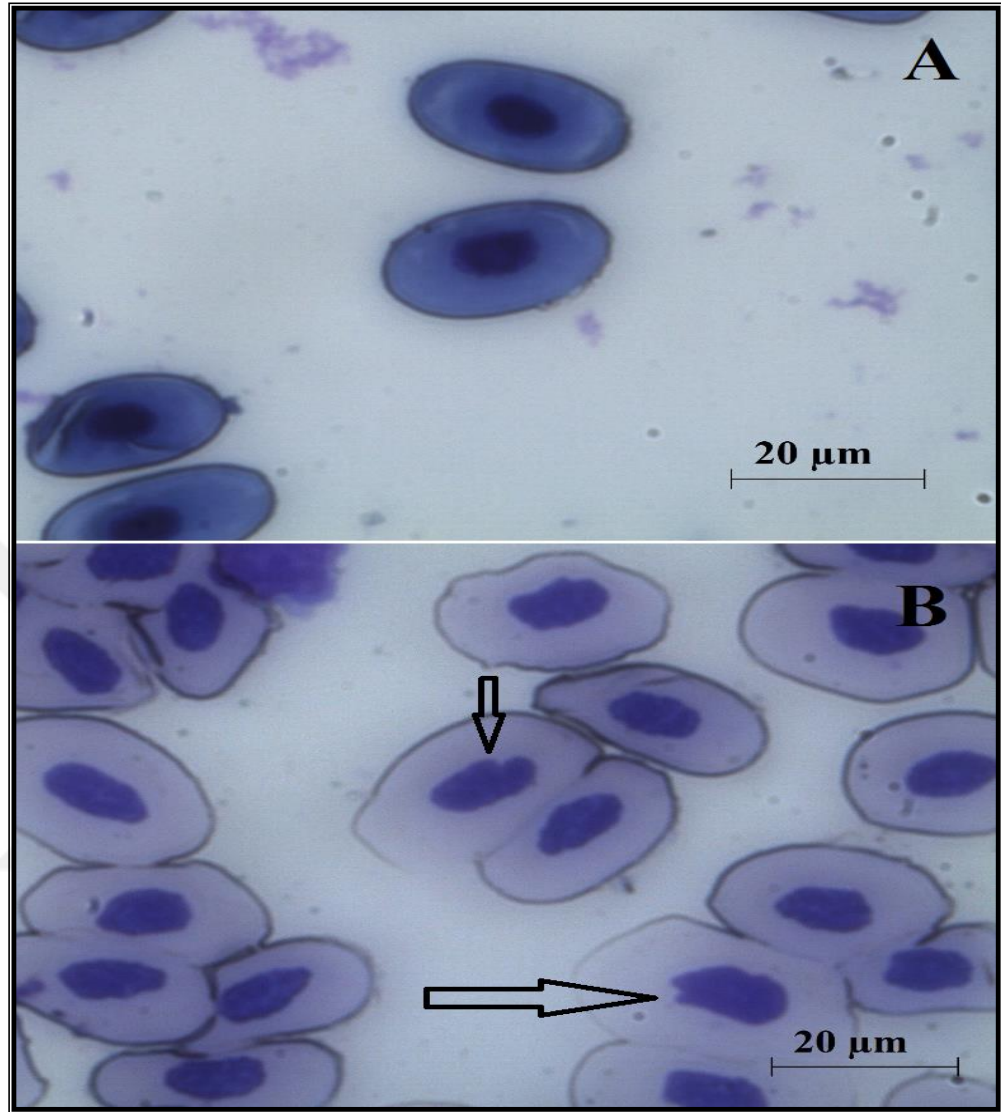
Mevsimsel olarak karşılaştırıldığında ise Söğütlü Köyü’nden haziran ayında yakalanan kurbağalardaki genotoksisitenin ekimde yakalananlara göre biraz daha fazla olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni yaz başında uygulanan pestisite maruz kalma olarak gösterilebilir (Çizelge 4.4). Uygulanan pestisitlerin zamanla parçalanması ve etkisinin azalması da ekim ayındaki azalan genotoksisiteyi açıklayabilir.

Çizelge 4.5. Söğütlü Köyü’nden yakalanan kurbağaların genotoksisitesinin mevsimsel değişimi

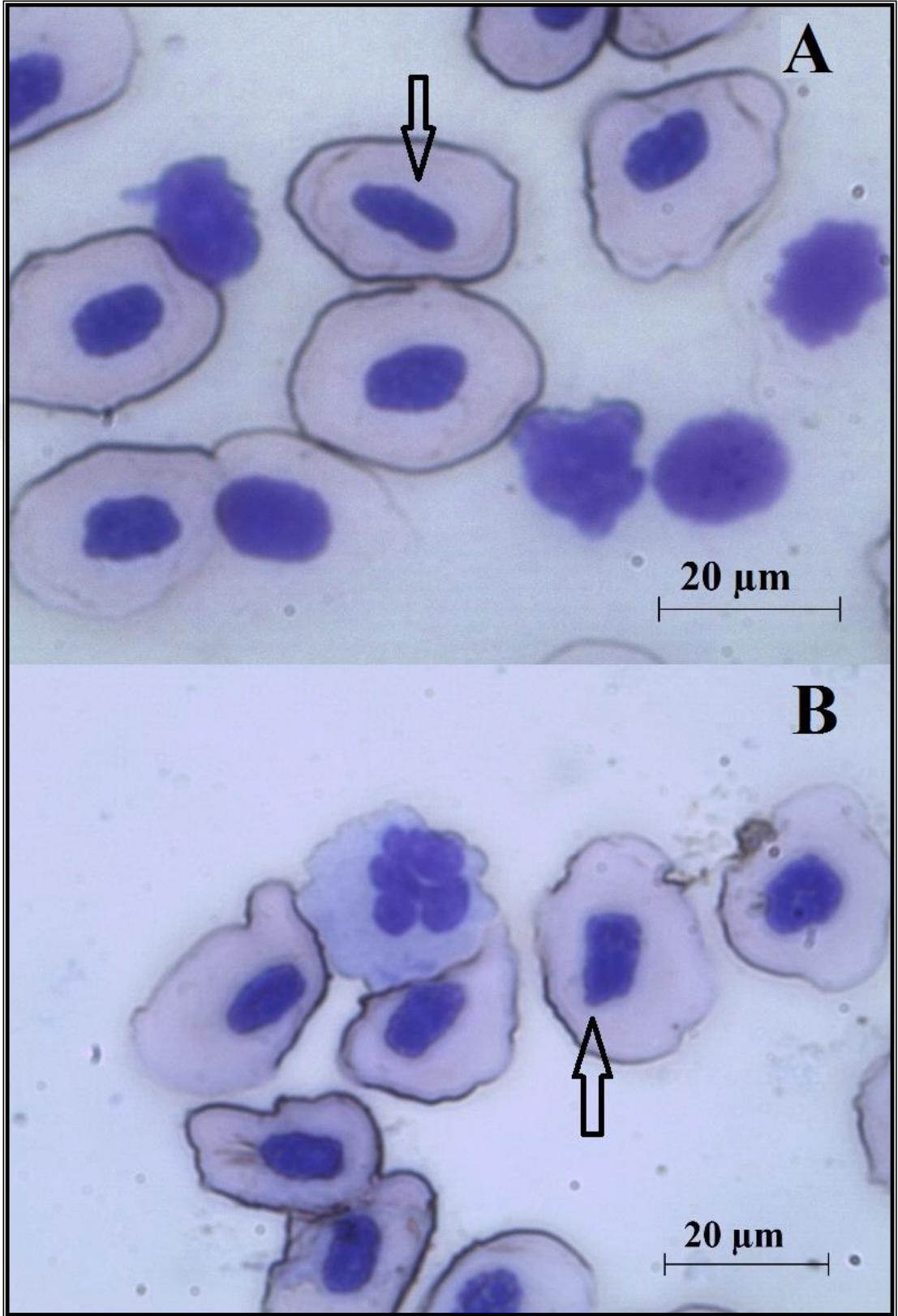
Periferik Eritrosit	Haziran 2016	Ekim 2016
Toplam eritrositik çekirdek anormalliği (EÇA) frekansı *	13.0	11.2

*Sayılar % olarak frekansı göstermekle birlikte her bir kurbağadan hazırlanmış 5’er preparat üzerinden elde edilmiştir

Genotoksik açıdan kurbağalar incelendiğinde en çok tespit edilen çekirdek anormalliğinin çentikli çekirdek (Şekil 4.7B) olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırayla loplu çekirdek (Şekil 4.8B) ve böbrek şekilli çekirdek (Şekil 4.8A) izlemiştir.



Şekil 4.7. *Pelophylax ridibudus*'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri
A) Normal çekirdekli eritrosit. B) Çentikli çekirdekli eritrosit (oklar)



Şekil 4.8. *Pelophylax ridibudus*'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri
A) Böbrek şeklinde çekirdekli eritrosit (ok). B) Lopluk çekirdekli eritrosit (ok).

Tüm bu bulgulardan elde edilen sonuçlar şöyle özetlenebilir:

- 1- *Pelophylax ridibudus*'un karyotipi $2n=26$, $14M+10SM+2ST$, $FN=52$ olarak tespit edilmiştir.
- 2- NOR bölgesi 10. kromozomun uzun kolu üzerindedir ve konstitütif heterokromatin 5. ve 8. kromozomların uzun, 12. kromozomun kısa kolu üzerinde olup c-pozitif bölgeler kromozomların telomerlerinde bulunmuştur.
- 3- Kurbağaların karyolojisi dokular, eşeyler ve istasyonlar arası değişiklik göstermemiştir.
- 4- Yakalanan tüm kurbağalarda genotoksik hasar tespit edilmiştir.
- 5- Genotoksik hasar tarım ilacı kullanılan Söğütlü Köyü kurbağalarında diğer bölge kurbağalarına göre fazla bulunmuştur. Suni gübre kullanım sahasında ise bu oran düşmüştür. Kontrol bölgesi kurbağalarında ise EÇA'ya oldukça seyrek rastlanmıştır.
- 6- Genotoksik hasarın Haziran ayında Ekim ayına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni yaz başında uygulanan pestisit ve suni gübreyle maruz kalma olarak gösterilebilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

1800’lerde buharlı makinelerin icadıyla başlayan çevresel kirlilik her geçen gün artmaktadır. Doğal olmayan her madde ekosisteme girdikçe mevcut organizmaların tamamı etkilenmektedir. 1950 ve sonrasında insan kendini de bu ekosistem içinde bulmuş ve doğanın kaynaklarının sınırsız olmadığını anlayarak yine kendi eliyle kirletmiş olduğu dünyasını temizlemeye, korumaya hatta kurtarmaya başlamıştır. Ancak bir yandan tedbirler alırken bir yandan da sentetik madde üretimine devam etmiştir. Tamba bu noktada iki problem karşısına çıkmıştır. Ne kadar kirletiyoruz ve bu kirlilikten kimler etkileniyor? İster bitki olsun ister hayvan olsun soruların cevabı tüm canlıları ilgilendiriyor. Özellikle hayvanlar kirlilikten etkilenmekle birlikte bu kirliliği besin zincirine dahil etmeleri noktasında oldukça önemli olabiliyorlar. Amfibiler dediğimiz iki yaşamlılar hem suda hem de karada yaşadıklarından çevresel felaketlerden daha çok etkilenmektedirler. Dolayısıyla genetik yapılarında da geçici veya kalıcı hasarlar olabilmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda bulunduğumuz bölgenin en yaygın amfibi türü olan *Pelophylax ridibundus* kurbağaları seçilmiştir. Öncelikle karyotipinin çıkarılması hedeflenen bu kurbağaların yakın akraba populasyonlardan temelde aynı olmasına rağmen bazı farklılıklara sahip olduğunu tespit edilmiştir. Ayrıca bu kurbağaların tarımsal faaliyetlerden etkilenip etkilenmedikleri de genotoksik analizlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Bu bölümde ilgili türün önce karyotipi, sonrada ekotoksikolojik mukayesesi yapılacaktır.

Şimdiye kadar *Rana* cinslerinin yaklaşık 300 türünden daha fazlası için karyotip çalışmaları yapılmıştır. Bu türler için kromozom sayısının $2n=26$ olup (bazılarında 22 veya 24) kromozom tipleri metasentrik, submetasentrik ve subtelosentrik olarak tespit edilmiştir (Martirosyan and Stepanyan 2009). Telosentrik kromozoma rastlanılmamıştır.

Çalışma kapsamında Karasu Havzası’nın tarım yapılan alanlarından yakalanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda yapılan karyotip analizi Doğu Anadolu Bölgesi için ilk olma özelliğindedir. Bu bağlamda ilgili türün kromozom sayısının $2n=26$ olduğu ve kromozom tiplerinin de metasentrik, submetasentrik ve subtelosentrik

morfolojisinde olduğu bulunmuştur. Çalışılan türün dişi ve erkek bireylerinde ise herhangi bir eşey kromozomuna rastlanmamıştır. Karyotip 3 farklı metoda göre hazırlanmıştır. Giemsa boyama, C-Bantlama ve Ag-NOR boyama. Araştırmamız neticesinde *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda 7 metasentrik, 5 submetasentrik ve 1 subtelosentrik kromozom çifti olduğu belirlenmiştir (14M+10SM+2ST). Kol sayısı FN=52 olarak tespit edilmiş ve Ag-NOR pozisyonunun 10. kromozom çiftinin uzun kolunda olduğu bulunmuştur. C-bantlama ile yapılan karyotiplerde ise C-pozitif heterokromatin bantlarının 5. 8. ve 12. kromozomların telomerlerinde olduğu görülmüştür. Karyotip simetri/asimetri indeksi de 1.53 olarak hesaplanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mukayesenin daha kolay yapılabilmesi için aşağıdaki tablo oluşturulmuştur (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. *Pelophylax ridibundus*'un karyotipik özellikleri (q: uzun kol, p: kısa kol)

Populasyon yeri	2n	Eşey kromozomu	c-bant	NOR	Karyotip formülü	Simetri/asimetri indeksi	Kaynak
Karasu havzası Erzurum	26	-	5q, 8q, 12p	10q	14M+10SM+2ST	1.53-simetrik	Mevcut çalışma
Mersin Göksu	26	-	-	-	14M+10SM+2ST	1.53-simetrik	Ergene vd 2010
Ermenistan	26	-	2q, 5p, 9q, 10q, 12p	10q	10M+12SM+4ST	1.76-simetrik	Martirosyan and Stepanyan 2009
İzmir (I)- Beyşehir (II)	26	XX, XY	-	10q 9q	I-16M+4SM+6ST II-15M+5SM+6ST♀ 14M+8SM+4ST♂	1.61 1.65, 1.61-simetrik	Alapagut and Falakali 1995
Suudi Arabistan	26	XX, XY	-	10q	14m+12sm	1.46- simetrik	Al-Shehri, Al-Saleh, 2005
Makedonya	26	XX, XY	3p	10q	8m+14sm+4st	1.84- simetrik	Spasic-Boskovic <i>et al.</i> 1999
Orta Avrupa	26	-	(1,2p,3q 4i,5i,7p, 9p,10qi, 11p) .(4qi,5p, 8qi,13q)	10q	10m+16sm	1.61- simetrik	Schmid 1978
Gürcistan	26	-	-	10q	10m+16sm	1.61- simetrik	Ivanov and Madjanov 1973

Çizelge 5.1. (devam)

Rusya	26	-	-	9q	10m+12sm +4st	1.76- simetrik	Kaybeleva <i>et al.</i> 2004
Ukrayna		-	-	9q	8m+14sm+4st	1.84- simetrik	Suryadnaya 2003
Çin	26	-	-	-	14m+12sm	1.46- simetrik	Gang Wei <i>et al.</i> , 1992

Yukarıdaki tablo incelendiğinde *Pelophylax ridibundus*'un Çin'den Orta Avrupa'ya kadar en önemli ortak noktası kromozom sayısının $2n=26$ olması ve kromozom simetri/asimetri değerinin 1.46-1.84 arasında olup "simetrik" kromozom yapısına sahip oluşudur. Ancak kromozom yapısında bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar da genellikle metasentrik ve submetasentrik kromozomlardan ve özellikle 6 ve 13. kromozom çiftlerinden kaynaklanmaktadır. Karasu Havzası, İzmir, Ermenistan, Suudia Arabistan, Ukrayna, Rusya, Avrupa ve Çin popülasyonlarının kromozom sayıları aynı olduğu, ilk 5 çift kromozomun metasentrik, ikinci 5 çiftin submetasentrik ve sonuncu çiftin de subtelosentrik olduğu görülmüştür (Çizelge 5.1). Sentromerik indeks bakımından Erzurum kurbağalarındaki subtelosentrik kromozom değeri 25.0 iken Ermenistan popülasyonunda da bu değer 25.0, Suudia Arabistan ve Avrupa kurbağalarında bu değer 21.9-24.7 arasında değişmektedir. Bu benzerlik bize en yakın coğrafya olan Ermenistan popülasyonu ile Karasu havzası popülasyonlarının birbirine daha yakın olduklarını göstermektedir. Literatüre göre C-heterokromatin Ranidae familyasının birçok türünde kromozomun sentromerinde yoğunlaşmıştır (Schmid 1978; Miura 1995). *Pelophylax ridibundus*'da telomerik bantlar 3. ve 5. kromozom çiftlerinin kısa kolu üzerinde tespit edilmiştir (Heppich 1978). Ermenistan kurbağalarında C-pozitif heterokromatin bölgeleri 2q, 5p, 9q, 10q, 12p olup Karasu Havzası kurbağalarında C-pozitif heterokromatin bölgeleri 5q, 8q, 12p kromozomlarında bulunmaktadır. Buradaki benzerlik 5 ve 12. kromozomlarda görülmektedir. Ag-NOR boyamalardan elde edilen sonuçlar mukayese edildiğinde 10q kromozomunda olan NOR bölgesi hem Karasu Havzası kurbağalarında hem de Ermenistan, Suudi Arabistan, Makedonya, Orta Avrupa ve Gürcistan kurbağalarında da tespit edilmiştir.

P. ridibundus'un Türkiye'de yaşayan populasyonları ile ilgili 2 önemli çalışma mevcuttur. Bunlardan ilkinde Alpagut and Falakalı (1995) yapmış oldukları karyotip çalışmasında İzmir ve Beyşehir kurbağlarını karşılaştırdıklarında kromozom sayısının aynı olduğunu ancak karyotipin farklı olduğunu bulmuşlardır. İzmir popülasyonunun karyotipi $16M+4SM+6ST$ olup eşeyler arasında bir farklılık yokken Beyşehir popülasyonunda dişiler $15M+5SM+6ST$, erkekler $14M+8SM+4ST$ karyotipli olarak tespit edilmiştir. Ancak kromozom simetri/asimetri durumlarının neredeyse aynı olduğu görülmektedir (Çizelge 5.1). Karasu Havzası kurbağalarının karyotipleri metasentrik kromozom bakımından bu kurbağalarla benzerlik göstermektedir.

Diğer çalışmada ise güney batı Anadolu'da yayılış gösteren 91 adet kurbağada mitotik ve mayotik kromozom analizi yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda İzmir, Bulca, Pazarağaç bölgesinden yakalanan kurbağaların kuzey bölgedeki *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarla aynı olduğu, ancak Göller Bölgesi'nden yakalanan kurbağaların Balkan türleri olan *Rana epeirotica* ve *Rana shqipericica*'ya karyolojik olarak daha çok benzediği sonucuna varılmıştır (Alpagut and Falakalı 2006). Bu iki çalışma gösteriyor ki aynı coğrafyada yaşayan kurbağalar da bile türleşme noktasında farklılıklar olabilir ve bu farklılıklar karyolojik olarak da ortaya konabilmektedir. Yukarıdaki kurbağanın karyotipi ile ilgili ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada, Ergene vd (2010) Mersin bölgesinde yakalanan *P. ridibundus* örneklerinde kromozom sayısının $2n=26$ olduğunu, kromozomlarının 14 metasentrik, 10 submetasentrik, 2 akrosentrik olduğunu belirlemişlerdir. Bu değerler Karasu Havzası kurbağalarının karyotipleri ile tamamen örtüşmektedir. Ranidae familyasına dahil türlerde diploid kromozom sayısı genelde 26 olmasına karşın kromozom sayısı 14-30 arasında değiştiği bildirilmiştir (Keskin 2000). Arslan vd (2010) ise Konya ili Meram, Beyşehir, Hadim lokalitelerinden toplanan 9 *Pelophylax ridibundus* örneğinde karyotipin 14 metasentrik ve 12 submetasentrik ($14M+12SM$) kromozomdan oluştuğunu, diploid kromozom sayısının da $2n=26$ ve kol sayısının $FN=52$ olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada bu türün kromozomlarının tamamının sentromerik konstitütif heterokromatine sahip olduğu ve Ag-NOR boyama tekniği ile 8 nolu submetasentrik kromozomun uzun kolu üzerinde nükleolar organizatör bölge (ikincil boğum) olduğu da tespit edilmiştir.

Pelophylax ridibundus'un karyotipi ile ilgili ülkemiz dışında yapılan çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiştir. *Rana* cinsinin çeşitli tür ve alttürlerine ait farklı populasyonlarda karyotipik farklılıkların olduğu daha önce yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Birstein 1984; Green 1985; Napoli *et al.* 2009). *Rana ridibunda* ve *Rana esculenta* türlerinin sitogenetik olarak incelendiği bir çalışmada Moldovya'nın kuzeyinden toplanan bu iki türün de $2n=26$ kromozoma sahip olduğu belirtilmiştir. Her iki türün kromozomlarının boyutlarına göre yapılan iki gruplu değerlendirmede ise ilk grubun 1-5 numaralı büyük kromozom çiftinden, ikinci grubun ise 6-13 numaralı küçük kromozom çiftlerinden oluştuğu rapor edilmiştir (Mindrescu and Ghiorghita 2008). Palearktik zoocoğrafik bölge sınırlarında kalan Ermenistan'ın 9 farklı lokalitesinden toplanan *Pelophylax ridibundus* örnekleri üzerinde yapılan karyolojik inceleme sonucunda bu türün diploid kromozom sayısının $2n=26$ olduğu tespit edilmiştir. Bu türde karyotipin 10 metasentrik, 12 submetasentrik ve 4 subtelosentrik kromozomdan oluştuğunu, 10. kromozom çiftinde ikincil boğum bulunduğunu; 2. ve 10. kromozom çiftlerinin uzun kollarında, 9. kromozom çiftinin uzun kolunun telomerik bölgesinde ve 5. kromozom çiftinin kısa kolunda C heterokromatin bölgelerin bulunduğu da belirtilmiştir (Martirosyan and Stepanyan 2009). Karasu Havzası kurbağalarının karyotipi Ermenistan populasyonuna da benzerlik göstermektedir.

Günümüzde teknolojinin ilerlemesine paralel olarak çevreye bırakılan ağır metal iyonu miktarının ve çeşidinin artması, tarımda zirai ilaçlama faaliyetlerinin ve suni gübre kullanımının çoğalması, gıda tüketimindeki artışla birlikte suni üretim artışına gidilmesi gibi bazı faktörleri de içine alan pek çok sebepten dolayı canlı çevrenin kirlenip, bozulduğu görülmektedir. Buradan yola çıkarak çalışmamızın ikinci kısmında Karasu Havzası içinde zirai tarımın yapıldığı, özellikle pestisit ve suni gübre kullanımının olduğu bölgelerde yaşayan ova kurbağalarının (*Pelophylax ridibundus*) bundan etkilenip etkilenmedikleri araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmada Karasu Havzası'nda belirlenen üç istasyondan (Dereboğazı I, II ve Söğütlü) yakalanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda çevresel kirliliğinin etkileri genotoksik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla kurbağaların periferik kan eritrositlerinde çekirdek anormallikleri tespit edilmiştir. Söğütlü köyü kurbağalarında tespit edilen çekirdek anormalliğinin diğer istasyonlardan

fazla bulunmuştur. Dereboğazı Köyü (II) istasyonunda ise Dereboğazı Köyü (I-Kontrol) istasyonuna kıyasla çekirdek anormallikleri frekansında biraz artışın olduğu gözlenmiştir. Karasu Havzası'ndaki tarımsal ve endüstriyel kaynaklı kirlenmenin doğal fauna ve florayı olumsuz yönde etkilediği yaptığımız bu çalışma ve diğer çalışmalarla net olarak gösterilmiştir. Örneğin Şişman vd. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada Karasu Havzası'nın tek akarsuyu olan Karasu Nehri ve civarında yaşayan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların sucul kirlilikten etkilenip etkilenmediğini aynı yöntemle araştırmışlar ve çimento fabrikası yakınlarında yaşayan bu kurbağalarda mikro çekirdek, böbrek şekilli çekirdek, çentikli çekirdek ve loplu çekirdek anormallikleri tespit etmişlerdir. Kirlenmiş bölge kurbağalarının kanlarında çekirdek anormalliği frekansı temiz bölge kurbağalarına göre önemli ölçüde arttığı tespit edilen genotoksitenin endüstriyel, tarımsal ve evsel aktivitelerle ilgili olabileceği kanaatine varmışlardır. Benzer sonuçlar Aymak (2010)'ın Mersin yöresi *Rana ridibunda* türü kurbağalarda da tespit edilmiştir. İlgili araştırmada çekirdek anormalliği frekansı özellikle ağır metal kirliliğinin olduğu yerde yaşayan kurbağalarda oldukça fazla bulunmuştur. Bir diğer çalışmada ise Vize Dağı (Kırklareli) ve Ida Dağı (Çanakkale) etrafından toplanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların eritrostilleri üzerine çekirdek anormallikleri araştırılmıştır. Sonuçta her iki alan kurbağalarında da toplam çekirdek anormalliğinin oldukça fazla olduğu, özellikle Vize dağında mikro çekirdek frekansının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Gürkan *et al.* 2012).

Amfibi eritrositleri oldukça esnek hücrelerdir. Bu hücreler için mikro çekirdek testini ilk geliştiren kişi Jaylet *et al.* (1986)'dır. Buna göre kurbağanın periferik yayma kan preparatları hazırlanır ve her 1000 hücrede meydana gelen çekirdek anormallikleri sayılır. Bu test 1999 yılından itibaren amfibilerde genotoksik ajanların varlığını tespit etmek amacıyla kullanılmaya başlamıştır (Zoll-Morreux and Ferrier 1999). Mikroçekirdek ve diğer çekirdek anormallikleri özellikle sulardaki kirlenmenin bir göstergesi olarak da kabul edilmiştir (Compana *et al.* 2003; Gauthier *et al.* 2004). Bu çalışmada da kullanılan yöntemle Karasu Havzası'nda tarım yapılan alanlardaki kurbağalarda çeşitli çekirdek anormallikleri tespit edilmiştir.

Ülkemizde özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki kurbağalarla ilgili karyotip ve kirlilik analizi için daha önceden yapılmış kapsamlı bir araştırma bulunmamaktadır. Karasu Havzası içinde tarım yapılan bölgelerden yapılan kurbağa örneklemleri neticesinde tüm alanlardan yakalanan kurbağaların karyotipleri $14M+10SM+2ST$, $2n=26$ ve $FN=52$ olarak tespit edilmiştir. Kirlilikten kurbağaların kromozom yapısı etkilenmemiştir.

Kirlilik açısından yapılan değerlendirmede ise Söğütlü Köyü yerleşkesi kurbağalarında genotoksisitenin anlamlı bir şekilde arttığı, Dereboğazı II bölgesindeki kurbağalarında azaldığı ve Dereboğazı I kurbağalarındaki anormallik frekansının ise önemsiz olduğunun bulunması Söğütlü bölgesi kurbağalarının buradaki tarımda kullanılan pestisitlerden etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Kurbağaların özellikle pestisit uygulanmış tarlalardan seçildiğini hatırlarsak yorumu daha anlamlı ve net yapabiliriz. Dereboğazı II bölgesinde ise suni gübre kullanımına bağlı olarak kurbağalarda hafif bir genotoksisite artışının olduğunu söyleyebiliriz. Dereboğazı I ise çevresel kirlilik etkilerinin neredeyse sıfır olduğu bir bölge olduğu için buradaki kurbağalarda anormallik durumların çok az olduğu bulunmuş, bu da mevsim, beslenme ve yaşa bağlı olarak ortaya çıkabilen hafif değişiklikler olarak değerlendirilmiştir. Mevcut kirliliğin burada yaşayan kurbağalar kadar aynı ortamdaki diğer canlıları da etkilediğini unutmamak gerekir. Keza besin zincirine karışan pestisit ve kalıntıları hem uygulandığı bitki ile hem de bu bölgenin otlaklarında yayılan mera hayvanları yolu ile insana kadar ulaşabileceği göz ardı edilmemelidir. Herhangi bir önlem alınmadığı takdirde yakın gelecekte tarımsal ve endüstriyel gelişmelere bağlı olarak Karasu Havzası'ndaki kirliliğin daha fazla artabileceği ve belki de buradaki amfibi ve diğer omurgalılarda kalıcı hasarlara yol açabileceği de öngörülmektedir. Havza'daki ekotoksikolojik gözlem ve araştırmalara devam edilmesi, diğer omurgalı hayvan ve bitki türlerinin de çalışmalara dahil edilmesinin önemli olduğunu belirtmek isteriz.

KAYNAKLAR

- Alpagut, N., Falakalı, B. 1995. Karyotype analysis of two *Rana ridibunda* (Ranidae; Anura) populations in Turkey, Israel Journal of Zoology, 41 (4): 523-531.
- Alpagut Keskin, N., Falakalı Muta, B. 2006. Rod-Shaped Bivalents indicate new assemblage among Anatolian Water Frog Populations, Amphibia-Reptilia, 27 (1): 47-53.
- Al-Sherhi A.H., Al-Saleh A.A. 2005. Karyotype of amphibians in Saudia Arabia 1: The karyotype of *Rana ridibunda*. J. Biol. Sci. 5(3): 335-338.
- Anonim, 2009. Kuzmin *et al.*, Pelophylax ridibundus, Eurasian Marsh Frog. ISSN 2307-8235 (online) IUCN 2008: T58705A11825745www.iucnredlist.org. 20.10.17
- Arslan, E., Arslan A., Gülbahçe, E. 2010. C-Banded Karyotype and Nucleolar Organizer Regions (NORs) of Marsh Frog, *Rana ridibunda* (Ranidae: Anura) in Central Anatolia. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 16 (Suppl-B): S369-S371. The IUCN Red List of Threatened Species: Pelophylax ridibundus – published in 2009.http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T58705A11825745.en,19.10.17
- Ayaz D., Tok C., Atatür M., Mermer A., 2004. Ranid Frog Specimens Collected from the Vicinity of Erzurum, NE Anatolia. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 2004 Cilt/Volume 21, Sayı/Issue (1-2): 103 – 106
- Aymak C. 2010. Determination of heavy metal pollution and its genotoxic effects by using micronucleus test in *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Ranidae, Amphibia) living in Mersin. [PhD Thesis]. Mersin University. 88 p. [in Turkish].
- Baran, İ. 2012. Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Pelin Matbaası, 165 s.
- Baran, İ., Atatür, M. 1997. Turkish Herpetofauna (Amphibian and Reptilian), Rep. of Turkey Ministry of Environment, 214 p.
- Birstein, V.J. 1984. Localization of NORs in Karyotype of four *Rana* species, Genetica, (64): 149-154.
- Campbell and Reece, 2008, Biyoloji. Palme yayıncılık, 218-219
- Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian J Fish Aquatic Sci. 47(11):2123-2136.
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res.* Jan;49(1):219–222.
- Compana A, Panzeri M, Moreno VJ, Dulout FN. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by Pyrethroid insecticide lambda-cytrathrin. Gen Molecular Biol. 26(1):99-103.
- Çavaş, T. ve Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents”, Aquatic Toxicology, 74:264-271.

- Çiçek, K., Mermer, A., Ayaz, D. 2011. Uludağ Milli Parkı'nda (Bursa/Türkiye) Yaşayan Kurbağalar, Dağılımları ve Korunmaları. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi* 2(2): 1-6.
- Demirsoy, A. 2004. Genel Biyoloji. Palme yayıncılık, Ankara, 1194 s.
- Dobingy, G., Ducros, J. F., Robinson, T. J., Volobouev, V. 2004. Cytogenetics and cladistics. *Syts. Biol.*, 53 (3): 470-484.
- Dubois, A. 1998. List of European species of amphibians and reptiles: will we soon be reaching "stability"? *Amphibia Reptilia*, 19: 1-28
- Dubois, A., Ohler, A. 1994. Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, genus *Rana*): A catalogue of available and valid scientific names, with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities", *Zool. Poloniae*, 39/3-4: 139-204.
- Ergene Gözükar, S., Çavaş, T. 2002. Karyological Analysis of *Gobius paganellus* L., 1758 (Pisces:Gobiidae) in Mersin, Turkey, *Folia Biologica*, Vol.50,No:1-2,5-7.
- Ergene S., Karahan A., Kuru M. 2010. Cytogenetic analysis of *Pseudophoxinus antalyae*, Boguskaya, 1992 (Pisces:Cyprinidae) from the Eastern Mediterranean River Basin, Turkey, *Tr Journal of Zoology* , 34, 111-117.
- Ergene S., Portakal E., Karahan A. 1999. Karyological analysis and body proportion of Catfish (Clariidae, *Clarias lazera*, Valenciennes. 1840) in Göksu Delta, Turkey. *Tr Journal of Zoology*, 23, 423-426.
- Eroğlu, H.E. 2015. Which chromosomes are subtelocentric or acrocentric? A new karyotype symmetry/asymmetry index. *Caryologia*, 68: 239-245.
- Fenech, M. and Morley, A. A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147: 29-36.
- Gang Wei, Ning Xu, Dejun Li, Min Wu. 1992. Karyotypes of two *Rana* from Xinjiang, China // *Asiatic Herpetological Res.* 4: 141-145.
- Gauthier L, Tardy E, Mouchet F. 2004. Biomonitoring of genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the river Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci Total Environ.* 323(1):47-61.
- Gosden, R. 1994. Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 29 Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- Green, D. M. 1985. Differentiation in amount of centromeric heterochromatin between subspecies of red legged frog, *Rana aorora*, *Copeia*, 4: 1071-1074.
- Gürkan, M., Hayrettaş, S., Yakın, B.Y., Tok, C.V. 2012. A preliminary study on micronucleus analysis and nuclear anomalies in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Anura) specimens collected around Vize (Kırklareli) and Ida Mountains (Çanakkale, Turkey). *Ege J Fish Aqua Sci.* 29(3):133-136.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., Salamon, M.F. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity", *Mutation Res.*, 12: 61-118.
- Heppich, S. 1978. Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Z. Zool. Syst. Evolut.* 16: 27-39.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., & Kuzmin, S. L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404(6779), 752.

- Ivanov V.G., Madyanov N.N. 1973. The comparative karyology of frogs of the genus *Rana* // *Tsitologia*. 16: 920-927 (In Russian).
- Jaylet A, Deparis P, Grinfeld S, Siboulet R. 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the new *Plerodeles waltl* to detect mutagen in fresh-water pollution. *Mutat Res.* 164(4):245-257.
- Kaybeleva E.I., Zavyalov E.V., Tabachaishin V.G. 2004. Ecologo-caryological peculiarities of the marsh frogs on the north of the Lower Volga region. *Povolzskii Ecol. J.* 3: 318-319. (In Russian).
- Keskin, N. A. 2000. Güneybatı Anadolu *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura: Ranidae) Populasyonlarında Sitogenetik ve İzoenzimik Özelliklerin Karşılaştırmalı İncelenmesi”, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 95s.
- Kılıç, D., Şişman, T. 2016. Karyotype analysis the European chub, *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758) from Karasu River-Erzurum, Turkey (Teleostei: Cyprinidae)” *Caspian Journal of Environmental Sciences* 14 (2): 95-103.
- King M., 1980. C-Banding Studies on Australian Hylid Frog Secondary Constriction Structure and the Concept of Euchromatin Transformation, *Chromosoma* (Berl.) 80, 191-217
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. 2009. Genetik Kavramlar (Çeviri). Palme yayıncılık, 784 s.
- Kumlutaş Y., 1999. Karadeniz Bölgesi *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) Populasyonları üzerinde Morfolojik Araştırma,) İzmir, Ek Sayı 3, 801-806.
- Kuramoto M. 1990. A list of chromosome numbers of Anuran amphibians. *Bull Fukuoka Univ Educ*, 39, 83-127.
- Kuru, M. 2004. Omurgalı Hayvanlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 841 s.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthou, G., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M. 2007. Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 115-125.
- Martirosyan, A., Stepanyan, I. 2009. Features of the karyotypes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and *Rana macrocnemis* Boulengeri 1885 (Amphibia: Ranidae) from Armenia, *Comparative Cytogenetics*, 3(1): 11-24.
- Matur F., 2009. Batı Türkiye Nannospalax (mammalia: rodentia) Kromozomal formlarının G ve C bantlama yöntemleriyle karşılaştırılması, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- Mindrescu G., Gheorghita G. 2008. The preliminary cytogenetic investigations in *R. ridibunda* Pall. and *R. esculenta* L. from the north of Moldavia. *Ann. Stcf. Univ. (Genet. Mol. Biol.)*. 9: 65-69.
- Miura, I. 1995. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). *Chromosoma*. 103: 567-574.
- Napoli, M. F., Ananias, F., Fonseca, P. M., & Silva, A. P. Z. (2009). Morphological and karyotypic contributions for a better taxonomic definition of the frog *Ischnocnema ramagii* (Boulenger, 1888)(Anura, Brachycephalidae). *South American Journal of Herpetology*, 4(2), 164-172.
- Özeti, N., Yılmaz, İ. 1994. Türkiye Amfibileri, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, 221 s.

- Pollet, I. and Bendell-Young, L. I. 2000. Amphibians as indicators of wetland quality in wetlands formed from oil sands effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2589–2597.
- Satari E., Quraan N., Alkhatib R., Amr Z. 2015. A Note on the Karyotype of the Amphibian *Pelophylax bedriagae* from Jordan, Volume 8, Number 4, December 2015, pages 325-326.
- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in amphibian. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae // *Chromosoma*. 68: 131-148.
- Sevindik, M. 2013. Türkiye Talpa Linneaus, 1758 (Mammalia: Soricomorpha) Türlerinin G Ve C Bantlama Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sönmez, A.Y., 2011. Karasu Irmağında Ağır Metal Kirliliğinin Belirlenmesi ve Bulanık Mantıkla Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sparling, D. W., Fellers, G. M., & McConnell, L. L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(7), 1591-1595.
- Spasic-Boskovic, O., Krizmanic, I., Vujosevic, M. 1999. Population composition and genetic variation of water frogs (Anura: Ranidae) from Yugoslavia, *Caryologia*, 52:1-2, 9-20,
- Sumner, A.T. 2008. Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing, 275 s.
- Sumner
- Suryadnaya N.N. 2003. The data on caryology of green frogs (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*, *R. esculenta*) from Ukraine // *Vestnik Zoologii*. 37(1): 33-40. (In Russian).
- Şişman, T., Aşkın, H., Türkez, H., Özkan, H., İncekara, Ü., Çolak, S. 2015. Determination of Nuclear Abnormalities in Peripheral Erythrocytes of the Frog *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) sampled from Karasu River Basin (Turkey) for Pollution Impacts *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research* 1(2): 75-81.
- Şişman, T., Şanlı, F., Tepe, Y., Kılıç, D. 2016. Erzurum Karasu Nehri Balıklarından *Chalcalburnus mossulensis*'in (Heckel, 1843) Karyotip Özellikleri. *Yunus Araştırma Bülteni*. 16 (4): 281-291.
- Topaktaş M., Rencüzoğulları E., 2010. Sitogenetik. Nobel Yayınları, 17-18.
- Uğurtaş, İ., Tunca, B., Aydemir, N., Bilaloğlu, R. 2001. A Cytogenetic Study of *Pelobates syriacus* (Amphibia, Anura) in Bursa-Turkey, *Turk J. Zool*, 25, 159-161.
- Yılmaz, İ. 2012. Taksonomik Zoolojinin Prensipleri ve Metodları. Sürat Üniversite yayınları, 245.
- Zhelev Z., Angelov M., Mollow M., 2006. A Study of Some Metric Parameters of the Erythrocytes in *Rana ridibunda* (Amphibia: Anura) Derived from an Area of Highly Developed Chemical Industry. *Acta zool. bulg.*, 58 (2), 2006: 235-244

Zoll-Morreux, C., Ferrier, V. 1999. The Jaylet test and the micronucleus test on amphibian evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. *Water Res.* 33(10):2301-2314.



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Elazığ'ın Karakoçan ilçesinde doğdu. İlkokulu Karakoçan'da, orta öğretim ve liseyi Elazığ'da tamamladı. 2007 yılında Marmara Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandı. 2013 yılında mezun oldu ve aynı yıl Bingöl'ün Karlıova ilçesinde Biyoloji öğretmeni olarak göreve başladı. 2016 yılında Kahramanmaraş'ın Afşin ilçesine tayini çıktı. Hala Kahramanmaraş'ın Afşin ilçesinde görev yapıyor. 2014 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Moleküler Biyoloji bölümünde yüksek lisans programına başlayıp, 2017 de tamamladı.