



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KUZEYDOĞU ANADOLU'DA *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) VE
Bufo verrucosissimus (Pallas, 1814) ARASINDAKİ HİBRİT ZONUN
GENETİK VE MORFOLOJİK YÖNDEN TANIMLANMASI**

(Doktora Tezi)

Cantekin DURSUN

**Danışman
Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR**

**RİZE
2023**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR danışmanlığında, Cantekin DURSUN tarafından hazırlanan *Kuzeydoğu Anadolu’da Bufo bufo (Linnaeus, 1758) ve Bufo verrucosissimus (Pallas, 1814) Arasındaki Hibrit Zonun Genetik ve Morfolojik Yönden Tanımlanması* adlı bu tez çalışması, 26/10/2023 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı SOYADI

İmza

Başkan

:

Prof. Dr. Bilal KUTRUP

Üye

:

Prof. Dr. İslam GÜNDÜZ

Üye

:

Prof. Dr. Davut TURAN

Üye

:

Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

Üye

:

Prof. Dr. Serkan GÜL

ETİK BEYAN

Biyoloji Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Kuzeydoğu Anadolu’da *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) ve *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) Arasındaki Hibrit Zonun Genetik ve Morfolojik Yönden Tanımlanması” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

26 /10/2023

Cantekin DURSUN

ÖN SÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programında gerçekleştirilen bu tezde, ülkemiz sınırları içerisinde dağılım gösteren, *Bufo bufo* tür grubuna dahil olan *Bufo bufo* ve *B. verrucosissimus* taksonları arasındaki hibrit zonun belirlenmesi, lokal ölçekte belirsiz kalan coğrafi dağılım sınırlarının çizilmesi ve türler arasındaki gen akışına dair örüntülerin açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, bilimsel yolculuğuma rehberlik eden ve her daim beraber çalışmaktan onur duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR ve Sayın Prof. Dr. Serkan GÜL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışmamın mikrosatellit DNA uygulamaları için laboratuvarını bana açan ve değerli yönlendirmeleri ile katkıda bulunan Dr. İnigo Martínez-Solano ve laboratuvar uygulamaları süresince yardımcı olan Dr. Gregorio Sánchez-Montes'e içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, değerli aile bireylerim babam Fikri DURSUN'a, annem Binniye DURSUN'a ve kardeşim Özge DURSUN KARAGÖZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

“Bu çalışmanın bir kısmı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje numarası: FBA-2019-1047” (“This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdogan University. Project Number: FBA-2019-1047”).

Cantekin DURSUN
2023/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIII
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Yalıtım.....	5
1.2. Hibridizasyon	6
1.3. Hibrit Zonlar.....	8
1.4. Hibrit Zonların Şekillenmesi.....	10
1.4.1. Birincil Zonlar	12
1.4.2. Sekonder Kontak Zonlar.....	12
1.4.3. Gerilim Bölgeleri.....	15
1.5. Hibrit Zonların Nesnelleştirilmesi.....	18
1.5.1. Coğrafik Klinler.....	20
1.5.2. Genomik Klinler	22
1.5.3. Klinal ve Mozaik Hibrit Zonlar	24
1.6. Hibrit Zon Hareketi	26
1.7. İntrogresyon	27
1.8. Geri Çapraz Oluşumu.....	30
1.9. Sitonükleer Uyumsuzluklar.....	32
1.10. Literatür Özeti	38
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	54
2.1. Materyaller	54
2.1.1. <i>Bufo bufo</i> Türüne Ait Genel Bilgiler	54

2.1.2. <i>Bufo verrucosissimus</i> Türüne Ait Genel Bilgiler	56
2.2. Metot	58
2.2.1. Arazi Çalışması	58
2.2.2. Mitokondriyal DNA Analizleri	60
2.2.2.1. Mitokondriyal Sitokrom b Geninin PZR Yardımı ile Çoğaltılması .	60
2.2.2.2. Filogenetik ve Demografik Analizler	61
2.2.3. Mikrosatellit DNA Analizleri.....	63
2.2.3.1. Mikrosatellit Fragmentlerinin Eldesi	63
2.2.3.2. Mikrosatellit Verilerinin İşlenmesi	66
2.2.3.3. Temel Popülasyon Genetiği Analizleri.....	66
2.2.3.4. Çok Değişkenli İstatistiksel Analizler	67
2.2.3.5. Yapısal Genetik Analizler.....	67
2.2.3.6. Mekânsal Analizler	68
2.2.3.7. Coğrafik Klin Analizi	70
2.2.3.8. Genomik Klin Analizi.....	71
2.2.3.9. Morfolojik Analizler	71
3. BULGULAR.....	74
3.1. Arazi Gözlemleri	74
3.2. Mitokondriyal DNA Analizleri	76
3.3. Mikrosatellit DNA Analizleri	85
3.3.1. Temel Popülasyon Genetiği Analiz Sonuçları	85
3.3.2. Çok Değişkenli İstatistiksel Analiz Sonuçları	89
3.3.3. Yapısal Genetik Analiz Sonuçları	95
3.3.4. Mekânsal Genetik Analiz Sonuçları	99
3.3.5. Coğrafik Klin Analizi	104
3.3.6. Genomik Klin Analizi	107
3.4. Morfolojik Analizler	109
3.4.1. Mitokondriyal DNA Grupları için Tek Değişkenli Analiz Sonuçları	109
3.4.2. Mitokondriyal DNA Grupları için Çok Değişkenli Analiz Sonuçları....	115
3.4.3. Mikrosatellit DNA Grupları için Tek Değişkenli Analiz Sonuçları.....	122
3.4.4. Mikrosatellit DNA Grupları için Çok Değişkenli Analiz Sonuçları	128
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	132

4.1. Mitokondriyal DNA Verileri.....	133
4.2. Mikrosatellit DNA Verileri	139
4.3. Sonuçlar.....	156
4.4. Öneriler	157
KAYNAKÇA.....	158
EKLER.....	187



Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Türü : Doktora Tezi

Danışman : Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

Hazırlayan : Cantekin DURSUN

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 187

ÖZET

KUZEYDOĞU ANADOLU’DA *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) VE *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) ARASINDAKİ HİBRİT ZONUN GENETİK VE MORFOLOJİK YÖNDEN TANIMLANMASI

Bu tez çalışması ile Türkiye’nin kuzeydoğusunda yer alan Rize ile Artvin il sınırları içerisinde *Bufo bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında var olduğu düşünülen kontak zonlar ve bu zonlarda meydana gelmesi beklenen hibridizasyon örüntülerinin açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasının yöntemi arazi çalışması, mtDNA analizi, mikrosatellit DNA analizi ve morfolojik analizler olmak üzere dört ana bölümden oluşmaktadır. Çalışma kapsamında, Artvin ve Rize illerinde 16 ayrı ilçeden 22 farklı popülasyon örneklenmiştir. Türler arasındaki filocoğrafik örüntüleri ve kontak zonları belirlemek için 65 örneğin Sitokrom b gen bölgesi baz sırasına dayalı filogenetik ve demografik analizleri yapılmıştır. Türler arasındaki hibrit zonun tespitinde, multipleks PZR kullanılarak 201 birey için 14 farklı mikrosatellit lokusunun genotiplemesi yapılmıştır. Elde edilen veriler yapısal ve mekânsal analizlere tabi tutulmuş ve klin konsepti çerçevesinde değerlendirilmiştir. Popülasyonları temsil eden 145 ergin bireye ait 31 farklı morfolojik karakter tek ve çok değişkenli istatistik analizlere tabi tutularak saf tür ve hibrit bireyler arasındaki morfolojik farklılıklar yorumlanmıştır. Mitokondriyal DNA analizlerine göre Pazar, Hemşin ve Çamlıhemşin ilçeleri her iki taksona ait mitokondriyal haplotiplerin bulunduğu ilçeler olarak belirlenmiştir ve kontak alanları oluşturmuştur. Demografik analizlere göre Kuvaterner Dönem içerisinde meydana gelen buzul döngüler türlerin genişleme örüntülerini şekillendirmiş, sekonder kontak ise buzul dönemlerin bitişini takiben oluşmuştur. Mikrosatellit lokuslarıyla yapılan analizler ise türler arasında Fındıklı ilçesi Yaylacılar köyü civarında dar ve bimodal örüntü sergileyen ve gerilim bölgesi olarak sınıflandırılan hibrit zonun var olduğunu ilk kez açığa çıkarmıştır. Tespit edilen güçlü seçim baskısı ve sınırlı introgresyon ise taksonların ayrı birer tür olduğunu doğrulamıştır. Mikrosatellit verilerine göre *B. bufo* türü Rize, *B. verrucosissimus* türü ise Artvin ilinde dağılım göstermiştir. Nükleer ve mitokondriyal belirteçler arasında ortaya çıkan asimetric şemalar uyumsuzlukların *B. bufo* türünün erkek eşey yanlı dispersaline bağlı olarak devam eden genişlemesinin veya tarihsel olarak doğu yönlü bir hibrit zon hareketinin sonucunda meydana gelmiş olabileceğini işaret etmiştir. Morfolojik analizler saf türlerin gözler, iç metatarsal tüberkül ve parotidler bakımından ayrıştığını fakat hibritler için karakterlerin aynı ölçüde diyagnostik olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Filocoğrafya, Hibrit Zon, Klin, Morfoloji, Moleküler Ekoloji

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Department of Biology

Thesis Type : Doctorate Thesis

Supervisor : Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

Author : Cantekin DURSUN

Year : 2023

Pages : 187

ABSTRACT

GENETIC and MORPHOLOGICAL DATA DESCRIBING the HYBRID ZONE between *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) and *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) in NORTHEASTERN ANATOLIA

The purpose of the thesis is identifying potential contact areas between the *Bufo bufo* and *B. verrucosissimus* species within the boundaries of Rize and Artvin in northeastern Türkiye, as well as the expected hybridization patterns in these areas. The method is composed of four main sections as fieldwork, mtDNA analysis, microsatellite DNA analysis, and morphological analyses. In this content, 22 different populations were sampled from 16 different districts in Artvin and Rize provinces. To determine phylogeographic patterns and contact regions, 65 samples were examined by phylogenetic and demographic analyses based on Cytochrome b gene region sequences. To reveal the hybrid zone between species, 201 individuals were genotyped using 14 microsatellite loci based on multiplex PCR technique. The obtained data were examined using structural and spatial analyses and evaluated within the framework of the clin concept. To understand morphological differences between pure species and hybrids, 145 adult individuals representing all populations were subjected to univariate and multivariate analyses using 31 different morphological characters. According to mtDNA analyses, Pazar, Hemşin and Çamlıhemşin were determined as the districts with mitochondrial haplotypes belonging to both taxa and formed contact areas. According to demographic analyses, glacial cycles that occurred during the Quaternary Period shaped the expansion patterns of these species, and secondary contact was established following the end of the glacial periods. Microsatellite based analyses revealed the presence of a hybrid zone for the first time exhibiting a narrow and bimodal pattern classified as a tension zone, around the Yaylacılar Village of Fındıklı district. The strong selection pressure and limited introgression obviously validated that these taxa are distinct species. According to microsatellite data, *B. bufo* species was distributed in Rize whereas *B. verrucosissimus* species was distributed in Artvin. The asymmetric patterns aroused between nuclear and mitochondrial markers suggested that it may have occurred due to the ongoing expansion of *B. bufo* species due to the male biased dispersal or a historically eastward hybrid zone movement. Morphological analyses showed that pure species diverged in eyes, inner metatarsal tubercle, and parotoids, but these characters were not as diagnostic for hybrids.

Keywords: Phylogeography, Hybrid Zone, Cline, Morphology, Molecular Ecology

KISALTMALAR

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece
♀	:	Dişi
♂	:	Erkek
bç	:	Baz çifti
BI	:	Bayesian Inference (Bayes Çıkarımı)
Cyt b	:	Cytochrome b (Sitokrom b)
DAPC	:	Discriminant Analysis of Principal Components (Temel Bileşenlerin Diskriminant Analizi)
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
F ₁	:	Birinci nesil hibritler
F ₂	:	İkinci nesil hibritler
F _{ST}	:	Fiksasyon indeksi
GC	:	Guanin-Sitozin içeriği
Hap	:	Haplotip
HCl	:	Hidroklorik asit
IUCN	:	The International Union for Conservation of Nature (Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği)
K	:	Küme değeri
KCl	:	Potasyum klorür
km	:	Kilometre
KMO	:	Kaiser-Mayer-Olkin Testi
L	:	Litre
LC	:	Least Concern (Asgari Endişe)
LD	:	Linear Diskriminant
Maks	:	Maksimum değer
MCMC	:	Markov Chain Monte Carlo (Markov Zincirli Monte Carlo)
Min	:	Minimum değer
mg	:	Miligram
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
ml	:	Mililitre

mM	:	Mikromol
mtDNA	:	Mitokondriyal DNA
MO	:	Maksimum olasılık
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
nDNA	:	Nükleer DNA
N	:	Örnek sayısı
NT	:	Near Threatened (Yakın tehdit altında)
P1	:	Parental 1 (Ebeveyn 1)
P2	:	Parental 2 (Ebeveyn 2)
PC	:	Principal Component (Temel Bileşen)
PCA	:	Principal Component Analysis (Temel Bileşen Analizi)
Pmaks	:	Maksimum kuyruk ucu
Pmin	:	Minimum kuyruk ucu
Post	:	Sonra
Pre	:	Önce
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Q	:	Aidiyet katsayısı
RNA	:	Ribonükleik asit
rRNA	:	Ribozomal RNA
sd	:	Serbestlik derecesi
St. hata	:	Standart hata
SNP	:	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Baz Polimorfizmi)
sPCA	:	Spatial Principal Component Analysis (Boyutsal Temel Bileşen Analizi)
U	:	Ünite
vb	:	Ve benzeri
vd	:	Ve diğerleri
Z	:	Medyan skoru
µl	:	Mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan alanlara ait coğrafik bilgiler ve genotiplenen birey sayısı	59
Tablo 2. Tez çalışması kapsamında denemesi yapılan mikrosatellit lokuslarına ait açıklayıcı bilgiler	64
Tablo 3. Multipleks PZR gruplarını belirlemek için seçilen örnekler ve plaka üzerindeki temsili sıraları.....	65
Tablo 4. Multipleks PZR için belirlenen final grupları ve belirteçlere ait bilgiler ...	66
Tablo 5. Sitokrom b gen bölgesi için oluşan haplotiplere ait açıklayıcı bilgiler.....	77
Tablo 6. Taksonlar arasında Sitokrom b gen bölgesine dayalı polimorfik bölgeler ve nükleotid pozisyonları.....	79
Tablo 7. Sitokrom b gen bölgesi için belirlenen haplotipler arasındaki <i>p</i> -distance metodu ile belirlenen ikili genetik mesafeler ve toplam baz çifti farklılıkları.....	80
Tablo 8. Filogenetik ağaç içerisinde kullanılan GenBank örneklerine ait bilgiler ...	81
Tablo 9. Popülasyonlara ait temel genetik çeşitlilik verileri.....	85
Tablo 10. Genotiplenen 14 mikrosatellit lokusuna ait verilerin bütünsel değerlendirilmesine dayalı olarak hesaplanmış popülasyonlar arası ikili genetik mesafeler ve istatistiksel anlamlılık değerleri.....	88
Tablo 11. PCA analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki ortalama merkez değerleri	89
Tablo 12. DAPC analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki ortalama merkez değerleri	91
Tablo 13. Mikrosatellit lokuslarına göre gruplar ve popülasyonlar arasında varyans analizi değerleri.....	99
Tablo 14. TESS analizi sonucu elde edilen aitlik katsayıları.....	100
Tablo 15. sPCA analizi ile çıkarsaması yapılan eksenlere ait açıklayıcı bilgiler....	101
Tablo 16. Coğrafik klin modellerine ait parametreler.....	104
Tablo 17. En uygun klin modelleri için elde edilen coğrafi bilgiler	105
Tablo 18. Dişi bireyler için mitokondriyal DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler	110
Tablo 19. Erkek bireyler için mitokondriyal DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler	112

Tablo 20. Tek değişkenli istatistiksel analizlere ait sonuçlar.....	114
Tablo 21. Dişı bireyler için çıkarsaması yapılan bileşenlere ait yükler, özdeğerleri ve açıkladıkları varyans oranları.....	116
Tablo 22. Erkek bireyler için çıkarsaması yapılan bileşenlere ait yükler, özdeğerleri ve açıkladıkları varyans oranları.....	117
Tablo 23. Dişı bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları.....	118
Tablo 24. Dişı bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri.....	118
Tablo 25. Dişı bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu.....	119
Tablo 26. Erkek bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları..	120
Tablo 27. Erkek bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri.....	120
Tablo 28. Erkek bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu.....	120
Tablo 29. Tek değişkenli istatistiksel analizlere ait sonuçlar.....	123
Tablo 30. Dişı bireyler için mikrosatellit DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler.....	124
Tablo 31. Erkek bireyler için mikrosatellit DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler.....	126
Tablo 32. Dişı bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları.....	128
Tablo 33. Dişı bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri.....	129
Tablo 34. Dişı bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu.....	129
Tablo 35. Erkek bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları..	130
Tablo 36. Erkek bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri.....	130
Tablo 37. Erkek bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu.....	130

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Yalıtım ve hibridizasyon adımlarının şematik diyagramı	6
Şekil 2. Hibrit zonların sınıflandırma şeması	12
Şekil 3. Sekonder kontakların meydana gelişine ait şematik gösterim	13
Şekil 4. Sekonder kontak sonucunda meydana gelebilecek genetik örüntülerin şematik gösterimi	14
Şekil 5. Sekonder kontaklar içerisinde gözlenebilecek morfolojik örüntülere ait şematik gösterim	15
Şekil 6. Farklılaşmış türler arasındaki genetik karışımı temsil eden hibrit zon modellerinin şematik gösterimi	17
Şekil 7. Genel bir sigmoid klin şekline ait parametreler ve matematiksel arka planı	20
Şekil 8. Konum ve şekillerine göre sınıflandırılan klin modellerinin görsel temsili.	21
Şekil 9. Habitat şekli ve çevrenin hibrit zon yapısı ve pozisyonuna etkisini gösteren coğrafik şema	25
Şekil 10. Hibridizasyon ve introgresyon arasındaki farklılıkları şematize eden genomik örüntüler	28
Şekil 11. İki farklı ebeveyn türün çiftleşmesi sonucu meydana gelen ilk jenerasyon hibritler ve hibritlerin çiftleşmesiyle meydana gelen ikinci jenerasyon hibritler için oluşabilecek fenotipik varyasyonlar	31
Şekil 12. Hibridizasyon ve tür sınırlarının değişmesine bağlı olarak meydana gelen asimetric mitokondriyal DNA introgresyonunun şematik temsili	34
Şekil 13. Tamamlanmamış soy farklılaşması ve hibridizasyon olaylarında gözlenen genetik arka plan	35
Şekil 14. Dağılım sınırları ve coğrafik klinler arasında gözlenen uyumsuz biyocoğrafik örüntüleri betimleyen hipotetik senaryo şeması	36
Şekil 15. Anklavların oluşumuna dair iki hipotez	37
Şekil 16. Ardeşen ilçesinde örnekleme yapılan <i>B. bufo</i> türüne ait bir dişi birey	54
Şekil 17. Borçka ilçesinde örnekleme yapılan <i>B. verrucosissimus</i> türüne ait bir erkek birey	56
Şekil 18. Tez çalışması kapsamında <i>Bufo</i> cinsine ait örnekleme ve gözlemlerin yapıldığı noktaları temsil eden cins oluş haritası	58

Şekil 19. Multipleks PZR dizaynını ve gruplar içerisindeki polimorfik örüntüyü temsil eden jel görüntüsü.....	65
Şekil 20. Sitokrom b geni kullanılarak oluşturulan şebeke grafiği ve haplotipler arası genetik benzerliği gösteren ısı haritası.....	78
Şekil 21. Sitokrom b gen bölgesi haplotipleri için inşa edilen filogenetik ağaç	82
Şekil 22. Extended Bayesian Skyline Plot ve Mismatch analizlerine ait görseller	83
Şekil 23. Mitokondriyal haplotiplerin coğrafi dağılımını gösteren harita ve türler için elde edilen frekanslar ile oluşturulan pasta grafikler	84
Şekil 24. Mikrosatellit DNA verilerine dayalı olarak oluşturulan dendogram ve popülasyonlar arası genetik benzerlik oranını temsil eden ısı haritası	87
Şekil 25. PCA analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki saçılım grafikleri.....	90
Şekil 26. DAPC analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki saçılım grafikleri.....	92
Şekil 27. Diskriminant analizi skorlarına dayalı olarak her bir popülasyon için bireysel aitlik olasılıkları ve çapraz doğrulama matrisi.....	93
Şekil 28. Diskriminant analizi skorlarına dayalı olarak STRUCTURE grupları için bireysel aitlik olasılıkları ve çapraz doğrulama matrisi	94
Şekil 29. ΔK metoduna göre belirlenen en uygun küme sayısı.....	96
Şekil 30. STRUCTURE sonuçlarına göre elde edilen genetik örüntünün pasta grafik görselleştirilmesi.....	97
Şekil 31. NewHybrids analizi sonuçlarını temsil eden bar grafiği	98
Şekil 32. TESS analizi ile oluşturulan coğrafi enterpolasyon haritası ve popülasyonlara ait atamaları gösteren bar grafik	100
Şekil 33. sPCA analizi ile elde edilen genetik yüzey şemalandırması ve enterpolasyon haritası.....	102
Şekil 34. Genetik mesafe ve coğrafik uzaklık arasındaki ilişki modelini gösteren grafik.....	103
Şekil 35. En uygun klin modelleri için oluşan coğrafik eğriler.....	106
Şekil 36. Tüm bireyler ve mikrosatellit belirteçleri için oluşturulan genomik harita	107
Şekil 37. Çalışma kapsamında kullanılan 14 mikrosatellit lokusuna ait genomik klin	

modelleri	108
Şekil 38. Mitokondriyal DNA analizine dayalı oluşan grupların PCA morfouzaydaki ve ayrışım morfouzayındaki saçılım grafikleri	121
Şekil 39. Mikrosatellit DNA analizine dayalı oluşan grupların PCA morfouzaydaki ve ayrışım morfouzaydaki saçılım grafikleri	131



GİRİŞ

Ülkemizdeki sistematik durumu ve dağılışı sınırları geniş bir tartışma konusu oluşturmuş olan *Bufo bufo* tür grubundaki karmaşa, yapılan moleküler temelli çalışmalarla (Recuero vd., 2012 ve Garcia-Porta vd., 2012; Arntzen vd., 2013a) bambaşka bir boyuta taşınmıştır. Özdemir vd. (2020)'in morfolojik ve moleküler verilerden yararlanarak yaptıkları çalışma ile *Bufo bufo* ve *Bufo verrucosissimus* taksonlarının ayrı birer tür olduğu doğrulanmış, ayrıca *Bufo verrucosissimus*'un kuzeyde Artvin, güneyde ise Antalya, Mersin, Hatay ve Osmaniye illerinde dağılışı gösterdiği belirlenmiştir. Türkiye sınırları içerisinde kalan diğer alanlarda ise *B. bufo* türünün dağılımı gösterdiği ifade edilmiştir. Her ne kadar genel dağılımın belirlenmesi ve tür durumlarının doğrulanması açısından daha net bilgilere ulaşılmış olsa da çalışma içerisinde kullanılan mitokondriyal ve nükleer belirteçlerle inşa edilen filogeniler arasındaki sitonükleer uyumsuzluklar ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar mitokondriyal ve nükleer genomlar arasındaki farklılıkların özellikle de yakın ilişkili ve benzer coğrafya içerisinde dağılım gösteren türler için gen akışının işaretçisi olduğunu ifade ederek türler arasında var olması muhtemel kontak zonun mutlaka araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir (Garcia-Porta vd., 2012; Recuero vd., 2012; Özdemir vd., 2020).

Literatür içerisinde kontak zonların mevcut olma ihtimali olan bölgeler hipotetik olarak ifade edilmiş olup, coğrafi pozisyonlarının mekânsal detayları bakımından eksiklik içermektedir. Bu durum ise coğrafi anlamda ve özellikle de lokal kapsamda tür sınırlarını hala belirsiz kılmaktadır. Bahsedilen eksikliğe atfen bu tez çalışması için ana hipotez “Artvin-Rize il sınırları içerisinde *Bufo bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında gen akışının gerçekleştiği bir kontak zon mevcuttur” şeklinde kurulmuştur.

Tez çalışmasının yöntemi arazi çalışması, mtDNA analizi, mikrosatellit DNA analizi ve morfolojik analizler olmak üzere 4 ana bölümünden oluşmaktadır. Arazi çalışmaları Türkiye'nin kuzeydoğu ucunu temsil eden Artvin-Rize illeri arasında yapılarak 145 birey için 31 ayrı karakteri içeren morfolojik veri, 201 birey için ise genetik veri elde edilmiştir. Toplamda 16 ayrı ilçeden 22 farklı popülasyonun örnekleme yapılmıştır.

Avrupa Karası sınırlarında amfibiler için tür ve tür altı seviyesinde hibrit zonlar sıkça çalışılırken ülkemizde bu konunun sınırlı kalması aşılması gereken bir sorun olup, tez çalışmamız ile alana yardımcı olabilecek bir referans kaynak oluşturmaya çalışılmıştır. Bu tez çalışması, farklı genetik belirteçleri (mtDNA + mikrosatellit DNA) ve morfolojik verileri bir arada kullanan bütüncül taksonomik yaklaşıma dayalı olması ve yüksek örneklem sayısına sahip olması nedeniyle önceki çalışmalardan ayrılmaktadır.

Bu tez çalışması ile Türkiye'nin kuzeydoğusunda yer alan Rize ile Artvin il sınırları içerisinde *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında var olduğu düşünülen kontak zonların ve bu zonlarda meydana gelmesi beklenen hibridizasyon örüntülerinin açığa çıkarılması amaçlanmıştır. İki taksonun yayılışındaki kesişme alanı olan Anadolu içerisinde lokal ölçekte hala belirsiz kalmış dağılım sınırları, tür durumlarını farklı olarak yorumlamaya neden olmuş genetik yapı ve sitonükleer uyumsuzluklar bütün olarak türlerin sistematiği üzerinde hala çözülmesi gereken bir problem olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, bu tez çalışmasının genetik açıdan hedefleri muhtemel kontak zon içerisinde gerçekleşebilecek gen akışının yönünü ve seviyesini tespit etmek, klin konseptine dayanarak sekonder kontak zonun coğrafi konumunu, büyüklüğünü ve merkezini bulmak, taksonların genetik ve coğrafik sınırlarını örneklenen hatlar üzerinden açıklayarak tür oluş sürecine ait eksiklikleri gidermek ve eksik olan örüntüyü tamamlamaktır. Ayrıca morfolojik açıdan saf tür popülasyonları ve hibrit bireyler arasındaki varyasyonları açıklamak, morfolojik verilerin belirleyiciliğini değerlendirmek ve hibridizasyonun fenotipik farklılıklar üzerindeki etkisini gözlemlemek ikincil hedef olarak belirlenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

Bilimsel metotların gelişimine bağlı olarak yıllar içerisinde hayvan türlerinin akrabalık ilişkileri ve dağılımlarına ilişkin elde edilen bilgilerde de artış gözlenmiştir. Morfolojik çalışmalarla başlayan süreçlere DNA dizilerinin de dahil olmasıyla canlılar üzerine elde edilen bilgilerin güvenilirliği daha sağlam temellere oturmuştur. Günümüz taksonomik çalışmaları ileri seviye bilgilere ulaşmada öncelikle moleküler belirteçleri referans almaktadır (Blaxter, 2004; Ahrens vd., 2007; Padial vd., 2010). İçinde bulunduğumuz ve “Genomik Çağ” olarak adlandırılan güncel dönem türleşme ve türlerin değişim süreçleri üzerine eğilmiş olan bilim dallarının gelişimine ciddi bir ivme kazandırmıştır. Ayrıca, geleneksel dayanağı olan morfolojik veriler de sınıflandırma çalışmalarında destekleyici rol oynamaktadır.

Yaşam bilimlerinin sistematik, ekoloji ve koruma biyolojisi gibi birçok dalı organizmalar için ortaya koyulmuş güvenilir taksonomilere ve sınırları belli alanlardaki tür çeşitliliğine ihtiyaç duymaktadır. Moleküler veriler sahip olduğu güç ile güncel yaklaşımlar içerisinde başı çeken veriler olsa da son yıllarda yapılan taksonomik ve sistematik çalışmalar tek bir disipline bağlı kalmaktan ziyade, moleküler verilerin omurgayı oluşturduğu farklı taksonomik karakterlerin de değerlendirmelere dahil edildiği multidisipliner yaklaşım çerçevesinde şekillendirilmektedir. Bu karma yaklaşım türlerin (ve tür içi çeşitliliğin) taksonomik pozisyonunu değerlendirirken farklı veri setlerinden yararlanılarak güçlü çıkarımlar elde edilmesi için avantaj sağlamaktadır. Davranış, niş tercihleri, dağılımlar, morfolojik analizler ve genetik bilgiler beraberce harmanlanarak daha desteklenebilir sonuçlar ortaya koyulmaktadır. Geleneksel tek tip yaklaşımların aksine, multidisipliner bir bakış açısıyla oluşturulan bütüncül taksonomi yaklaşımı araştırmacıların daha geniş bir perspektiften gerçekliklere dair bilgilere erişilmesi için bir basamak görevi görmektedir (Padial vd., 2010; Hausdorf ve Hennig, 2020; Hillis vd., 2021). Bahsedilen bu konseptin türlerin coğrafik dağılım ile ilişkisi üzerine uygulanabilecek başlıca iki modeli bulunmaktadır. Birinci modele göre genetik ve fenotipik verilerin analizi ve coğrafi dağılışa entegrasyonu ile birkaç farklı alan içerisinde tür sınırlarının belirlenmesi tavsiye edilirken (Guillot vd., 2012) ikinci modelde genetik, morfolojik ve ekolojik verilerden türetilen farklı uzaklık matrislerinin metrik olmayan çok boyutlu ölçeklendirmesine dayalı birleşimi

üzerinden bir kümeleme yaklaşımı tavsiye edilmektedir (Edwards ve Knowles, 2014).

Aristo'dan günümüze kadar uzanan süreçte sınıflandırma şekilleri canlıların fenotipik benzerlikleri üzerine bağlı kalmayarak, evrimsel ilişkileri yansıtacak şekilde filogenilerin yeniden yorumlanmasına doğru yönelmiştir. Sınırlı sayıda karakterin ötesine geçilip, kladistik yaklaşıma dayanan metotlarla ele alınan ilişkiler türler arasındaki soyoluş örüntülerini açıklamak için yeni bir yol açmıştır. Bu yoldaki en güçlü araç ise DNA dizileri, yani moleküler verilerdir (Tautz vd., 2003; DeSalle ve Goldstein, 2019). Bu veriler tek deneysel çalışmada çok sayıdaki karakter hakkında bilgi sağlar, kesindir, nümerik temele oturtulabildiği için matematiksel ve istatistiksel analizlere uygundur. Bu verilerle inşa edilen ve ağaç olarak adlandırılan örüntü şemaları ise organizmalar arasındaki ilişkileri güçlü bir şekilde temsil eden diyagramlardır (Mooers ve Heard, 1997; Abaza, 2020). Çıkarsama ağaçları olarak elde edilen bu diyagramlar gerek gen bölgeleri için oluşturulan ağaçlar arasında gerekse de gen-tür ağaçları bakımından uyumsuzluk gösterebilir ve yüzde yüz olarak gerçek ağaç olarak nitelendirilemez. Genetik arka planda bu durumun oluşması için rekombinasyon, mutasyon vb. olaylar rol oynasa da türler için düşünüldüğünde elzem olan sebeplerden biri de hibritleşmenin varlığıdır. Farklı gen dizileri ile oluşturulmuş filogenetik ağaçları arasındaki uyumsuzluk soylar (türler, alttürler) arasında hibridizasyon ve gen akışının meydana geldiğine dair ilk gösterge olarak ele alınması önerilmektedir (Baack ve Riesenberger, 2007; Abbott vd., 2016). Doğal popülasyonlar için hibrit zonlar içerisinde meydana gelen hibridizasyon ve introgresyon olayları evrimsel yeniliklerin potansiyel kaynağı olarak düşünülmekte olup, adaptasyonlar ve türleşme süreçlerinin yapı taşı olarak ifade edilirler. Hibrit zonlar içerisinde gen akışına bağlı olarak etkileşen soylar arasında meydana gelen örüntüler sistematik çalışmalar yürüten bilim insanlarına oldukça kullanışlı bilgiler sağlamaktadır.

Ülkemiz bulunduğu coğrafi konumdan ve sahip olduğu jeolojik geçmişinden dolayı türleşme süreçleri için bir merkez görevi görmüştür. Anadolu coğrafyasını özellikle amfibi ve sürüngenler için bir türleşme merkezine dönüştüren nedenler, sahip olduğu jeomorfolojik yapı, eski ve karmaşık paleocoğrafik ve paleoklimatik tarihi ile coğrafi pozisyonudur (Veith vd., 2003; Akın vd., 2010; Ahmadzadeh vd., 2013; Arribas vd., 2022a). Anadolu'nun dağlık topografyası türleşme ve biyocoğrafik alt bölgelerin oluşmasında önemli bir rol oynamakta ve genetik farklılaşmayı da

tetiklemektedir. Bu bölgeler sekonder kontakları ve hibrit zonları konu alan çalışmalar için ideal bir laboratuvar olarak düşünülebilir.

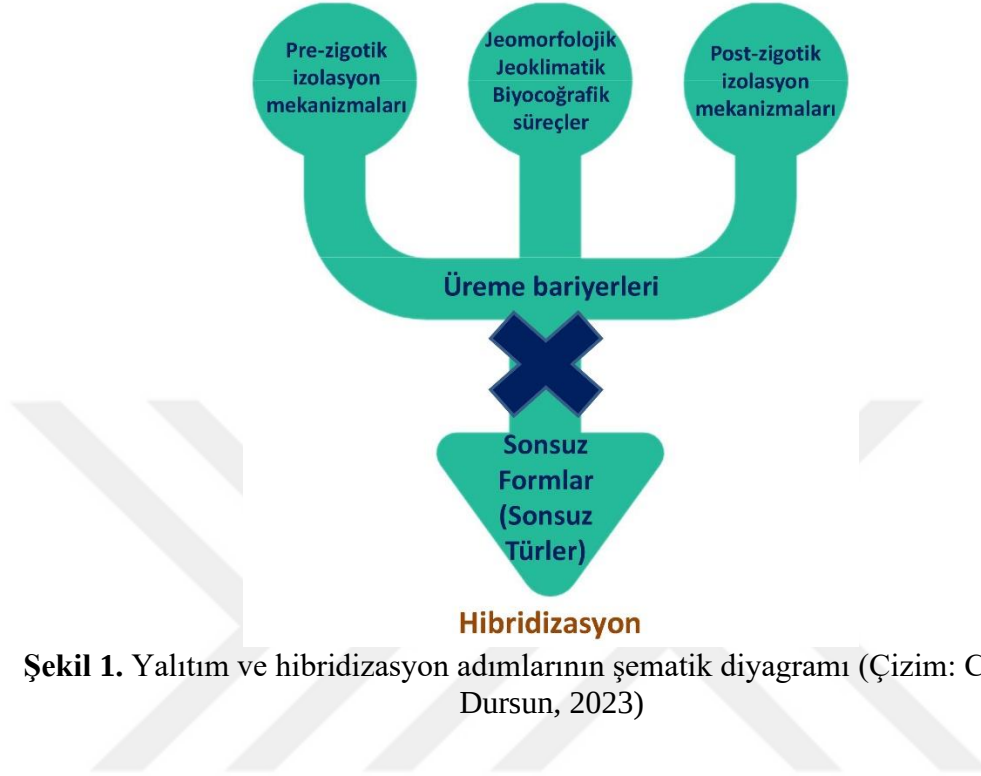
1.1. Yalıtım

Biyolojik tür tanımı üreme uyumluluğu üzerinden açıklandığından dolayı, yeni türlerin oluşması üreme bariyerlerine dayanır. Üreme yalıtımı, iki türün üyelerinin kendi aralarında üreyerek verimli döller vermesini engelleyen faktörlerin tamamıdır. Bu engeller türler arası gen akışını keser ve çiftleşmeleri sonucu meydana gelecek hibrit döllerin oluşumunu sınırlandırır. Tek bir engel efektif olmasa bile birkaç engelin iş birliği gen havuzunda çok etkin bir yalıtımı sağlayacaktır. Gen akışının kesilmesiyle ortaya çıkan genetik farklılaşma üreme izolasyonunu kuvvetlendirmektedir. Nesiller boyunca, biriken genetik farklılıklar sonucunda iki farklı tür veya popülasyonlar arasında üyelerin çiftleşebilme ve yaşar döl verme olasılığı azalır. Değişen dünya süreçlerinin ve üreme yalıtımlarının birlikteliği sonucunda ise sonsuz formlar meydana gelir (Howard ve Berlocher, 1998). Taksonomistlerin bugüne kadar betimlediği 1,9 milyon tür mevcut olup, geleneksel tahminlere göre bu sayı 10 milyon, yüksek seviye tahminlere göre ise 100 milyona kadar ulaşabilecektir (Shapiro vd., 2016).

Üreme yalıtımını sağlayan mekanizmalar prezigotik ve postzigotik üreme engelleri olmak üzere iki çatı altında toplanmaktadır. Prezigotik üreme engelleri popülasyonların döllenme öncesi çiftleşmelerini engelleyecek işlevler görürken, postzigotik üreme engelleri döllenme sonrasında yaşayabilir döllerin gelişimini veya döl üretme potansiyelini indirgeyecek şekilde ödev görür (Servedio ve Sætre, 2003; Birkhead ve Brillard, 2007). Prezigotik üreme bariyerleri döllenme öncesi devreye giren coğrafik izolasyon, habitat izolasyonu, zamansal izolasyon, mekanik izolasyon, davranışsal izolasyon, gamet izolasyonu gibi mekanizmalardır. Postzigotik izolasyon mekanizmaları ise düşük hibrit yaşarlığı, düşük hibrit erginliği, hibrit kısırılığı ve hibrit ölümü gibi mekanizmalardır (Sá-Pinto vd., 2013; Coughlan ve Matute, 2020).

Türleşmenin meydana gelmesinde en önemli faktör üreme yalıtımının oluşmasıdır, fakat bu bariyerler mutlak kırılamaz bir kavram olarak öne sürülememektedir. Üreme bariyerleri özellikle yakın zamanda ayrılmış ve henüz farklılaşma sürecinde olan popülasyonlar, soylar, alttürler ve türler arasında

kırılabilir (Bozdağ vd., 2021; Gilles vd., 2022). Bunun sonucunda meydana gelen olay ise hibridizasyon ve hibrit zonların oluşmasıdır (Şekil 1).



Şekil 1. Yalıtım ve hibridizasyon adımlarının şematik diyagramı (Çizim: Cantekin Dursun, 2023)

1.2. Hibridizasyon

Hibridizasyon, bir veya daha fazla kalıtsal karakter ile ayırt edilebilen, iki farklı popülasyona ait bireylerin veya popülasyon gruplarının kendi aralarında çiftleşmesi olayıdır (Abbott vd., 2013; Harrison ve Larson, 2014; Taylor vd., 2015). Farklılaşmış soy hatları arasındaki genetik varyantların değiş tokuşu şeklinde meydana gelir (Barton ve Hewitt, 1985; Gompert vd., 2017). Yani hibridizasyon, genetik olarak ayırt edilebilen taksonların bireyleri arasında meydana gelen ve bir ölçüde yaşayabilir döller üretilmesi ile sonuçlanan doğal süreçlerdir (Mallet, 2005; Baack ve Riesenber, 2007; Cortés-Ortiz vd., 2019). Bu süreçte, farklı türlerin genetik materyalleri birleşerek yeni bir hibrit popülasyon oluşturur. Hibridizasyon sonucunda, melez bireyler genellikle ebeveyn türlere ait özelliklerin genetik bir kombinasyonunu taşırlar.

Hibridizasyon popülasyonlar, soylar, alttürler ve türler arasında meydana gelmekte ve bunun sonucunda hibrit bireyler ve hibrit türlerin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Hibritleşme yoluyla türleşme hayvanlarda nadir iken bitkilerde daha yaygındır. Bu oran bitkiler için %25 hayvanlar içinse %10 seviyesindedir (Mallet,

2005; Mallet, 2007; Vallejo-Marín ve Hiscock, 2016). Rieseberg (2001), coğrafik izolasyon dışındaki izolasyon mekanizmalarının yakın akraba türler arasında gen akışını tam olarak engellemediğini ileri sürmektedir. Yakın ilişkili gruplar arasındaki hibridizasyonun bir yönü ise iki farklı türün hibriti olan üçüncü bir türün oluşması yerine belirli oranda farklılaşmış iki popülasyonun üreme izolasyonunun tamamlanmasını ifade eden durumlardır. Özellikle belirli oranda farklılaşmış iki yakın akraba türün oluşturduğu hibritlerin uyum güçleri (*fitness*) düşük olduğunda, zamanla hibritleşmeyi önleyici mekanizmalar yönünde seçilim oluşur ve seçilim baskısı hibrit oluşumunu önleyici bir yönlendirilmiş seçilimle sonuçlanır. Bu hibrit soy, eğer uyum gücü tam veya tama yakın ise varlığını sürdürebilir bir soy hattı oluşturabilir ve özellikle genetik sürüklenmenin devreye girmesi ile özgül ve hızlı bir bağımsız evrimleşme gösteren bir gen havuzunun oluşmasını sağlayabilir.

Hibridizasyon aynı zamanda evrimsel biyolojinin tartışma merkezine yerleşmiş konulardan biridir. Bu kavram bağlantılı popülasyonlar arasındaki gen akışına bağlı olarak yeni soyları inşa eden evrimsel bir yok oluş veya önemli bir süreç olarak nitelendirilmiştir. Hibridizasyon yeni türler oluşturan veya soya yönelmeyi sağlayarak aynı işlevi yerine getirmektedir. Öte yandan hibridizasyon, adaptasyon ve türleşmeyi sınırlayan ve nesli tükenmekte olan türler için tehlike arz eden bir mekanizmadır. Hibridizasyonun en çok çatıştığı evrimsel biyoloji konuları koruma genetiği, yeni flora ve faunaların oluşması ve tür kavramlarıdır (Morgan-Richards vd., 2009; Sullivan vd., 2015). Üreme izolasyonuna dayalı olan biyolojik tür kavramı türlerin ayrı bir gen havuzuna sahip olduklarını, yani kesilmiş bir gen akışı olduğunu, yaşayabilir ve verimli döller meydana gelmesi için tür içi çiftleşmenin şart olduğunu ileri sürmektedir. Buna karşın her hibrit tür verimsiz değildir. Doğada popülasyonlar için her zaman keskin sınırlar olmayıp farklı popülasyonlar veya türler arasında gen akışı mümkün olabilmektedir. Filogenetik tür kavramına göre; türler evrimsel soyağaçlarında en küçük dal oluşturacak monofletik kümeler olup, ayrı tür olduğunu doğrulayacak kadar farklılaşmış genetik veya morfolojik karaktere sahip olmalıdırlar. Bu kavramın aksine hibrit bireyler iki ataya da benzeyen karakterler ihtiva etmektedir ve farklı dallar üzerinde konumlanabilmektedirler. Özellikle gen ve tür ağaçları arasındaki uyumsuzluk introgresyon ve tamamlanmamış soy farklılaşmasından dolayı meydana gelebilmektedir (Ravinet vd., 2017). Hibridizasyon boyunca bir taksonun

genomundan belli kısımlar bir diğerk taksonun genomuna geğerken, diğerk genomik bölgeler asla karışmamaktadır. Dolayısı ile seçilen belirteçlere bağılı olarak farklı filogenetik sinyaller görülebılır. Bu durum her ne kadar filogenik çıkarımları zorlaştırsa da hibridizasyon periyodu boyunca oluşank dinamikler hakkında bilgi sahibi olunmasında yardımcı olur (Cortes-Ortiz, 2017).

Hibridizasyonun popölasyonlar üzerindeki etkisi, hibrit bireylerin hayatta kalma ve üreme başarısıyla da ilintili bir durumdur. Hibrit bireyler, ebeveyn türlerin yaşamı için ihtiyaç duyduğu ortam ve ekolojik gereksinimlerine uymada avantajlı olabilir veya dezavantajlı konuma geçebilir. Bu faktörler, hibritlerin doğal seçim sürecindeki başarılarını belirlemektedir. Ayrıca, ebeveyn türler veya alttürler arasındaki genetik farklılıkların derecesi önemlidir. Yakın ilişkili ve daha erken türleşme tarihine sahip olan türler veya alttürler arasında hibridizasyon genellikle daha başarılı olurken, daha uzak akraba olan türler arasında ise başarı oranı düşüş göstermektedir. Öte yandan, hibridizasyon genetik çeşitliliği artırabilir ve evrimsel potansiyeli genişletebilir. Ancak, bazı durumlarda hibridizasyon, ebeveyn türlerin veya alttürlerin kaybına yol açabilir (Schwenk vd., 2008; Abbott vd., 2016).

1.3. Hibrit Zonlar

Hibrit zonları açıklamada en çok kullanılan ve en fazla atıf alan tanım Barton ve Hewitt (1985) tarafından yapılmıştır. Bu tanıma göre hibrit zonlar, genetik olarak farklılaşmış popölasyonların (türler, alttürler vb.) bir araya gelerek çiftleştiğı ve hibrit bireyler ürettiğı coğrafik alanlardır. Sıkça kullanılan ikinci alternatif tanıma göreyse hibrit zonlar türleşme olaylarının, ekolojik ve evrimsel farklılaşmaların arka planındaki mekanizmaların test edilebileceğı doğal laboratuvarlar ve evrimsel süreçlere açılan pencerelerdir (Hewitt, 1988; Harrison, 1990). Boyutsal perspektiften bakınca ise hibrit zonlar alel frekanslarının veya karakteristik özelliklerin klin veya gradyan şeklindeki değişimidir (Gompert vd., 2017).

Hibrit zonlar, içerisinde evrimsel öneme sahip olayların meydana geldiğı yerlerdir. Bu olaylardan başlıcaları soya yönelme, hibrit soyların oluşumu, poliploidizasyon ve genetik karışımdır (Stewart vd., 2016). Doğal laboratuvarlar olan hibrit zonlarda işleyen bu mekanizmaların yakıtı ise türler arasında biriktirilmiş mutasyon birleşimleridir. Bu mutasyonlar başlıca üç grup altında toplanmaktadır.

Birinci grup, hibritler ve ebeveyn türler eşit uyum gücüne sahip olduğunda hibrit zon boyunca serbestçe geçiş yapabilen mutasyonlardır. İkinci grup, sekonder kontakların gerçekleştiği bölgelerde hızlıca geçiş yapan, hibrit arka planında şekillenen varyantlardır. Üçüncü grup ise, hibritlerin üremelerini ve gelişmelerini engelleyerek veya eşeysel seçilime yol açarak gen akışını sınırlayan mutasyonlardır (Payseur, 2010; Gilbert vd., 2022).

Hibrit zonlar içerisindeki genetik yapının ve introgresyonun farkına varmak doğal hibridizasyona bağlı meydana gelebilecek potansiyel evrimsel sonuçları tahmin etmekte kritik rol oynamaktadır. Geleneksel popülasyon genetiği konsepti gen akışına bağlı olarak popülasyonlar arasındaki genetik benzerliği yorumlamaktadır fakat türler arasında dahi paylaşılan ortak atadan kaynaklı olarak benzer genetik örüntüler gözlemlenebilir. Dolayısıyla hibrit zonları değerlendirirken popülasyon genetiği analizleri filocoğrafik yaklaşımlarla harmanlanmalıdır. Hibrit zonlar içerisinde ebeveyn türler arasında paylaşılan aleller veya haplotipler türler arası gen akışı yoluyla gerçekleşen introgresyonun, yakın zamanlı paylaşılan ortak atanın veya her iki duruma dayalı olarak meydana gelen birleşimin bir sonucu olabilir. Ayrıca, ebeveyn türler ve hibrit popülasyonlar arasında paylaşılan aleller hem lokal hem de geniş bir mesafe gerçekleşen tarihsel veya hali hazırda devam eden gen akışından kaynaklanabilir. Bu senaryoları ayırt etmek kolay bir iş olmasa da hibrit zonun hikayesinin anlaşılması için gerekli olup, çoklu lokusların genetik varyasyon modelleriyle çıkarsama yapılabilir (Modliszewski vd., 2006; Semenov vd., 2023).

Hibrit zonlar, üreme izolasyonunun şekillenmesinde bireysel genlerin rolünü belirlemek için önemli fırsatlar sunmaktadır. Nesiller boyu devam edecek hibridizasyon ve introgresyon farklılaşmış genomların kaynaşmasına neden olacaktır. Belirli genler için genetik bağlantı ilişkileriyle beraber işleyen seçilimin kuvveti meydana gelecek introgresyon seviyesini belirlemektedir. Ebeveyn türlerin genomik arka planındaki avantajlı aleller hibridizasyon yoluyla kolayca değişilebilecekken, bariyer görevi gören genomik bölgeler daha düşük seviyede bir gen akışına tabi olmaktadır. Bu açıdan bariyer görevi gören gen veya genomik bölgeler tür sınırlarını belirlerken önem arz etmektedirler (Larson vd., 2013).

Hibrit zonlar, üreme izolasyonunun genetik temellerinin ve lokal adaptasyonların açıklanabilmesinin yanı sıra adaptif gen akışı veya artış gösteren

genetik farklılaşmanın meydana geldiği genomik bölgelerin belirlenmesinde oldukça büyük bir bilgi kaynağı sağlar (Riquet vd., 2017). Bu zonlar organizmalara ve evrimsel sürecin işleyişine adaptif varyasyonlar, fonksiyonel yenilikler, adaptif yayılım, yeni türler, yeni ekotipler, yeni gen kombinasyonları ve soya yönelme üzerinden üreme bariyerlerinin gelişimiyle katkıda bulunmaktadır. Bahsedilen olumlu katkılarının yanı sıra, hibrit zonların varlığı türlerin kaynaşması, genetik çeşitliliğin azalması, soy dışı üreme depresyonu (*outbreeding depression*) ve melez kovanı (*hybrid swarm*) gibi dezavantajlar oluşturabilecek olaylara yol açabilir (Allendorf vd., 2001; Seehausen, 2004; Mallet, 2007; Abbott vd., 2013).

1.4. Hibrit Zonların Şekillenmesi

Hibrit zonlar genelde dar bir coğrafik genişliğe sahip olma eğiliminde olsa da uzunluk bakımından yüzlerce kilometre uzunluğa da erişebilirler (Harrison ve Larson, 2016; Arntzen vd., 2018). Dağlık, nehirlik veya farklı toprak tiplerine sahip, yollar ile bölünmüş heterojen arazi yapıları türlerin dispersal kapasitelerini farklı ölçüde kısıtladığı için kontağa geçilen alanlar boyunca farklı derecede genetik karışım örüntüleri gözlenebilir. Benzer şekilde, hibrit zon boyunca boyutsal olarak çeşitlenen iklimsel şartlar potansiyel olarak ebeveyn türler ve hibrit bireyler üzerinde farklı seçim baskısı oluşturabilir. Topografik yapı daha korunmuş bir yapı sergilediğinden dolayı iklim değişimi zamansal ölçekte hibrit zon dinamiklerini çalışmak için daha uygundur ve hibrit zon hareketlerinde meydana gelen asimetric introgresyonu açıklamak için kaynak işlevi görür (Arntzen vd., 2020a).

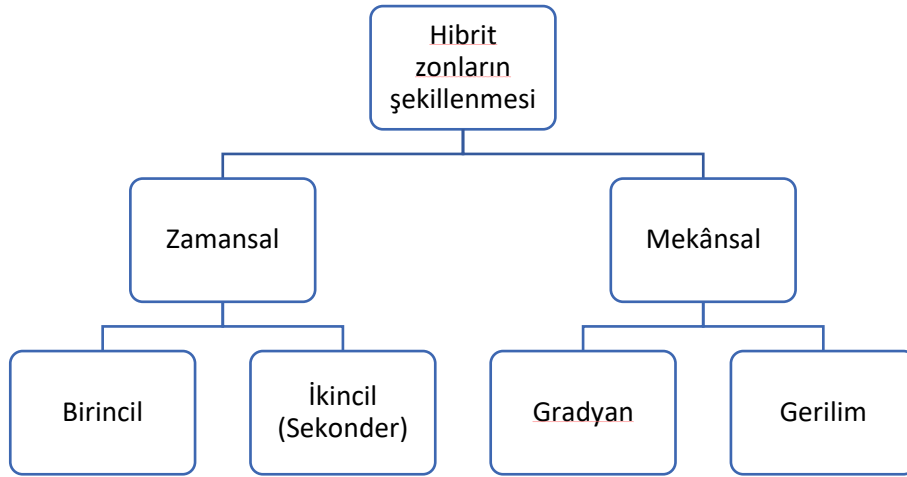
Hibrit zonların yapısının ve devamlılığının açıklayabilmek için farklı teorik modeller öne sürülmüştür. Bu modeller arasında en sık kullanılanlardan birisi habitatların devamlılığına dayanan hibrit zon modelleridir. Dispersal bağımsız modeller, hibrit bireylerin ebeveyn formlardan yüksek uyum gücüne sahip oldukları ara ekotonlar üzerinde meydana gelen hibrit zonları niteleyici modellerdir (Moore, 1977). Bu modellerde çevresel şartlar hibrit uyum gücünü koruduğu sürece hibrit zonlar durağan ve kararlıdır. En sık görülen şekli sınırlamış hibrit üstünlüğü (*Bounded Hybrid Superiority*) olarak adlandırılan oluşumdur. Gerilim bölgelerinin aksine hibrit üstünlüğü ve ekotonal tabanlı modellerde hibrit bireylerin uyum gücü çevreye bağımlı olarak şekillenmektedir ve en yüksek seviyeye sınırlandırılmış alan içerisinde

çıkmaktadır (Nikolakis vd., 2022). Çevresel şartların değişimi, sınırlandırılmayı ortadan kaldırırsa hibritler yayılımını genişletebilir ve zonun sınırlarında değişim meydana gelebilir (Culumber vd., 2012; Smith vd., 2013).

Dispersal bağımlı modeller, hibritlerin çevreye bağlı veya çevreden bağımsız olarak işleyen seçilimin ve zon içerisine yapılan göçlerin kurduğu denge içerisinde kararlılığını korumasını ifade ederler. Hibritlerin uyum güçlerinin ebeveyn formlardan daha düşük olduğu modellerdir. Bu modellerde zonlar iki formun göç oranlarının denk olduğu alanlarda ve düşük popülasyon yoğunluğuna sahip olan noktalar içerisinde konumlanmaktadır. Ebeveyn türlerin popülasyon yoğunluğundaki değişimler zonun sınırlarının değişmesine yol açar. Gerilim bölgeleri, bu modellerin en iyi örneğidir (Barton ve Gale, 1993; Smith vd., 2013). Dispersal ile şekillendirilmiş olan teorik zon modellerinin örnekleri farklı taksonların dağılımları boyunca gözlenmiş olup, hibrit zonların devamlılığını sağlayan faktörleri anlamak için farklı bakış açıları kazandırmıştır.

Genellikle sekonder kontakların sonucunda meydana geldiği farz edilen hibrit zonlar *in-situ* olarak ortaya çıkan genetik değişimlerden kaynaklı da oluşabilmektedir. Bu bağlamda, hibrit zonlar için tarihsel olarak birincil veya ikincil farklılaşmanın baskınlığını belirlemek zordur. Genomik verilerden evrimsel tarih çıkarımının zorluğu, birincil sapmalar ve sekonder kontakları belirlemede ikilik ortaya çıkarabilir. Ayrıca hibrit zonun geçmiş hikayesinde her iki olayında farklı zaman dilimleri içerisinde baskın olduğu bir akış sırası gerçekleşebilir. Hibrit zonlar, hibrit bireylere ait genomun belli bölgelerinde veya tamamında etkili olacak kadar uzun süre devam etmiş, seçim-göç dengesine yaklaşmış kadar eski bir tarihe dayanabilir. Ayrıca, hibrit zonlar yeni oluşmuş olabilir, buna bağlı olarak genomun tamamı veya bir kısmı seçim-göç dengesi beklentilerinden sapabilir. Türlerin özellikle iklimsel salınımlar süresince defalarca maruz kaldığı alan değişiklikleri ve habitatların dinamik doğaları göz önüne alındığında, yeni kurulan hibrit zonların güncel ve eski döneme dayanan lokusların ve bireylerin bir karışımı olduğu düşünülebilir (Gompert vd., 2017).

Hibrit zonların şekillendirilmesinde kullanılan bir diğer yol ise bu zonları mekânsal ve tarihsel olarak tasvir etmektir (Şekil 2). Bu yaklaşıma göre hibrit zonlar dört ayrı model içerisinde açıklanmaktadır (Endler, 1977; Barton ve Hewitt, 1985; Durrett vd., 2000; Mettler ve Spellman, 2009).



Şekil 2. Hibrit zonların sınıflandırma şeması

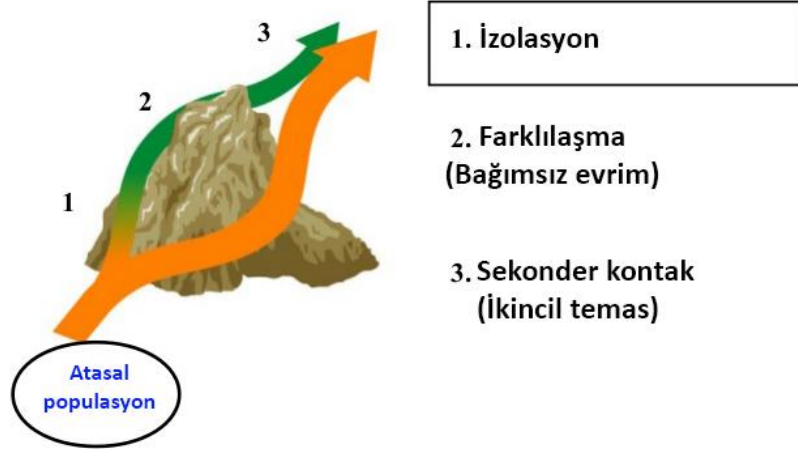
1.4.1. Birincil Zonlar

Birincil hibrit zonlar (*primary intergradation*) çevresel gradyanlar veya yamalı habitatlar gibi durumlar sonucunda boyutsal olarak çeşitlenen seçilime karşı verilen *in-situ* cevaplar ile ortaya çıkan hibrit zonlardır (Durrett vd., 2000). Tek lokusa dayalı olarak değerlendirildiğinde sekonder kontak zonlardan ayrımı zordur. Bu zonlar ayrıca ekolojik seçilimden bağımsız olarak genetik uyumsuzluklardan dolayı parapatrik türleşmenin meydana gelebileceğini de göstermektedir (Pettengil ve Moeller, 2012). Birincil hibrit zonlar, devamlılık gösteren popülasyonların habitatlarında meydana gelen boyutsal farklılıkların sonucu olarak benzer klin şemaları oluşturabilirler.

1.4.2. Sekonder Kontak Zonlar

Sekonder kontaklar, genetik olarak farklılaşmış, allopatrik dağılış gösteren popülasyonların veya türlerin dağılımlarında meydana gelen değişim sonucu coğrafik olarak tekrar kaynaşmasıdır (Kutcha, 2007). İkincil temasın gerçekleştiği bölgeler ise sekonder kontak zonlar olarak adlandırılır (Hewitt, 2011; Cortés-Ortiz, 2017). Önceki zamanlarda coğrafik olarak izole olmuş popülasyonların tekrar kontak kurduğu alanlar olan bu zonlar evrimsel soyların genetik bağımsızlığını etkileyen faktörler üzerinde çalışan evrimsel biyologlar için ideal doğal sistemlerdir (Şekil 3). Etkileşen popülasyonlar arasında coğrafi olarak geçiş yapan morfolojik ve moleküler belirteçlerin analiz edilmesi seçilimin tipi ve etki alanı hakkında çıkarım yapmayı ve türeme izolasyonunun derecesini anlamayı mümkün kılmaktadır (Waldron vd., 2019).

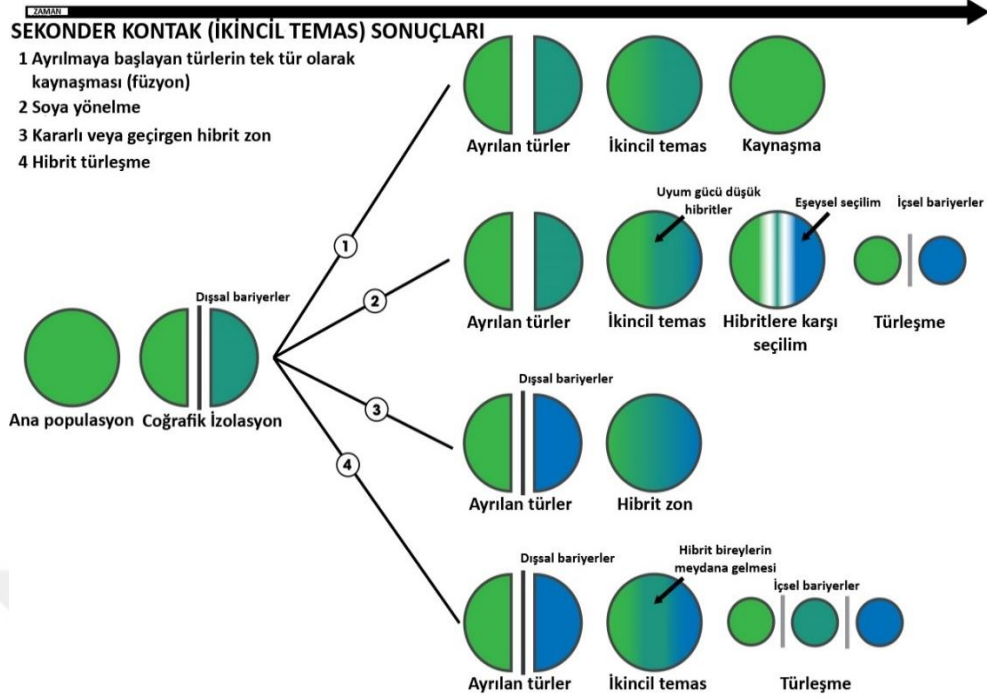
Türleşmede Üç Adım



Şekil 3. Sekonder kontakların meydana gelişine ait şematik gösterim (Hashmi, 2016)

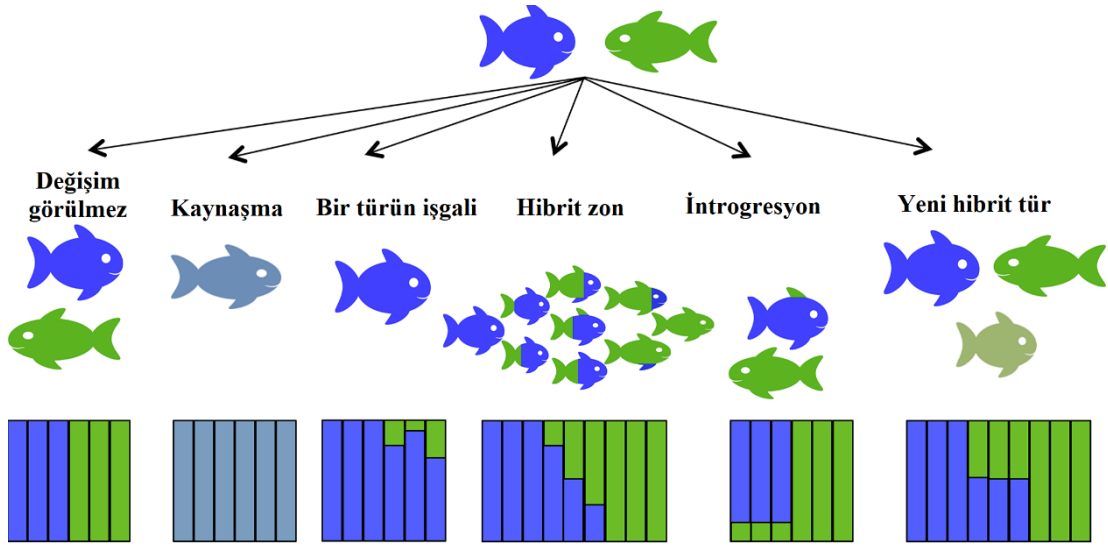
Eğer hibrit zonlar, sekonder kontaklar sonucu oluşmuş ve bütün özellikler izolasyon periyodu boyunca farklılaşmışsa, bu alanlar çakışık klinler ile karakterize edilecektir fakat birincil zonlar için bu beklenti bir zorunluluk değildir. Buna ek olarak, uyumlu klinlerde sekonder kontak zonların işaretçileri olup, nötral olarak bilinen bazı karakterler sonucu ortaya çıkan ve değişimleri reddeden klinlerin varlığında ikna edici kanıt rolü oynarlar. Tarihsel olarak, diploid ve otopoliploidleri kapsayan çoğu hibrit zon sekonder kontakların bir sonucudur (Petit vd., 1999).

Sekonder kontak zonlar kurulduktan sonra bu bölge içerisinde seçilime bağlı olarak şekillenecek farklı sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 4). Bu sonuçlardan başlıcaları gen akışına karşı üreme bariyerlerinin güçlenmesi yani soya yönelme, üreme bariyerlerinin çöküşü ve türlerin kaynaşması, genetik çeşitliliğin azalması, genetik çeşitliliğin kaybı veya yeni türler oluşmasıdır. Kontak zonlarda farklı seviyedeki hibridizasyonun araştırılması ve gelişimlerinin incelenmesi, türleşmenin anlaşılması ve bireysel tür bariyerlerinin gen akışının varlığındaki çöküşü veya güçlenmesini görmede oldukça kritik bilgiler sağlar (Engebretsen vd., 2016; Vallejo-Marin ve Hiscock, 2016). Sekonder kontakların olası sonuçlarına etki eden faktörler ise allopatrik izolasyon içerisinde geçen zaman, eş tanıma sistemi, çevresel şartlar ve popülasyon yoğunluğudur (Espregueira Themudo vd., 2012; Stewart vd., 2016).



Şekil 4. Sekonder kontak sonucunda meydana gelebilecek genetik örüntülerin şematik gösterimi (Colvin, 2018)

Kriptik türleri de kapsayan allopatrik soylar sekonder kontak oluşturduklarında genetik mesafenin yanı sıra diğer organizmal ve çevresel faktörlere bağlı olarak oluşabilecek en uç sonuç tamamlanmış bir üreme yalıtımı veya gen havuzlarının kaynaşmasıdır (Rudman ve Schluter, 2016). Öte yandan orta kademedeki evrimsel süreçlerde soylar hibrit zon oluşturma eğilimindedir. Bu aşamada birkaç nesil boyunca süregelen rekombinasyon varyantları doğal organizmaların evrimsel kuvvetler baskısı altında devam eden gen ve fenotip üzerinde etkili olan genomik etkileşimleri çalışarak özellikle hayvan gruplarının dispersalini anlamada birincil kaynak işlevi görür. Hibrit zon içerisindeki bireyler ebeveynlere kıyasla genellikle ara morfolojik karakterler gösterme eğilimindedirler (Şekil 5). Alternatif olarak, bireyler ebeveyn karakterlerinin uç değerlerini aşacak şekilde geniş bir karakter yelpazesi de sergileyebilirler. Transgresyon olarak adlandırılan bu olay epistasi ve tamamlayıcı alellerin ayrışmasından kaynaklı olarak meydana gelebilir ve adaptif yayılımı destekleyebilir (Majtyka vd., 2022).



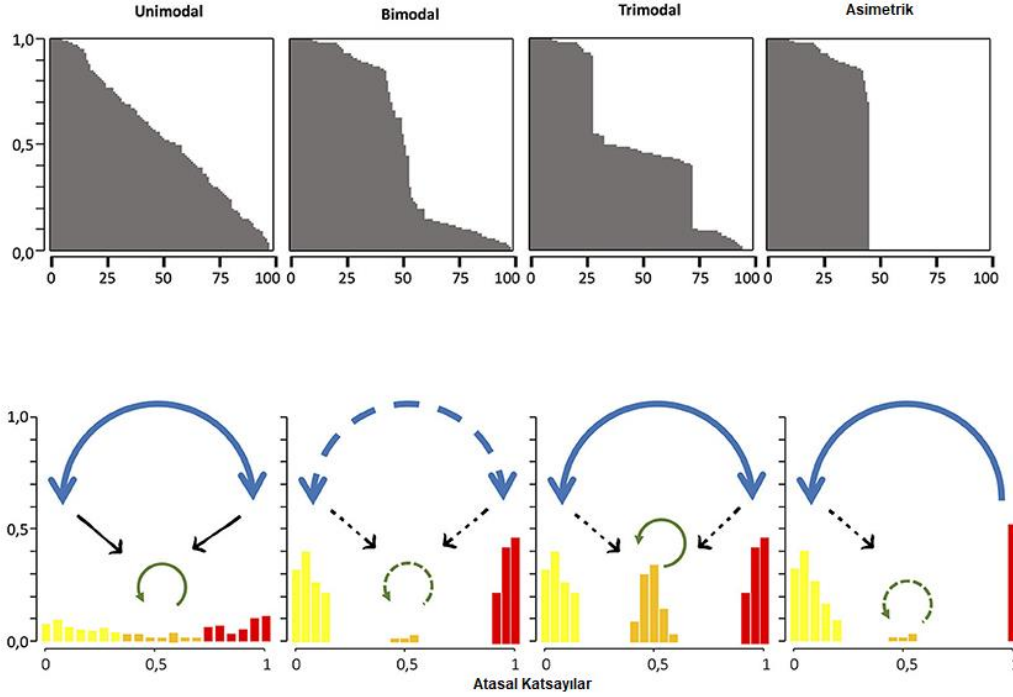
Şekil 5. Sekonder kontaklar içerisinde gözlenebilecek morfolojik örüntülere ait şematik gösterim (Runemark vd., 2019)

1.4.3. Gerilim Bölgeleri

Gerilim bölgeleri, hibritler üzerindeki endojen seçilimin allopatrik popülasyonlardan ebeveyn bireylerin devamlı dispersali ile dengede tutulduğu hibrit zon modelidir (Barton ve Hewitt, 1985; Carling ve Zuckenberg, 2011; Roy vd., 2012). Yani gerilim bölgeleri, seçim ve dispersal olaylarının bir denge oluşturduğu hibrit zonlardır (Mettler ve Spellman, 2009; Abbott vd., 2013). Bu dar coğrafik alanlarda hibrit bireyler için işleyen eleyici seçim baskısı, ebeveyn bireylerin rastgele göçü ile dengelenmektedir (Taylor vd., 2015).

Birçok hibrit zon, hibrit bireylerin ebeveynlerden daha az uyum gücüne sahip olduğu gerilim bölgeleri olarak kategorize edilir. Bu konsept hibridizasyonun zararlı etkiye sahip uyumsuzluklar ile sonuçlandığını ve bu durumun indirgenmiş uyum gücüne ve düşük hayatta kalma başarısına sahip hibrit bireylerin oluşmasına neden olduğunu öne sürer (Nikolakis vd., 2022). Uyum gücü düşük hibritler ebeveyn genotiplerinin tek bir popülasyonda harmanlanmasını önler veya kısmen erteler ve böylece hibrit zonların coğrafik olarak sınırlı kalmasını sağlar. Dolayısı ile gerilim bölgeleri bir yandan uzun süre varlığını koruyarak dispersal ve akrabalı çiftleşme arasında bir denge kurarken diğer yandan seçimle karışmış genleri eler (Wielstra, 2019). Gerilim bölgelerinde, ebeveyn popülasyonlardan süregelen gen akışı ve merkezindeki hibrit bireylerin doğal seçim tarafından elenmesi nedeniyle zonun pozisyon ve genişliği uzun süre kararlı kalma eğilimindedir (Arntzen vd., 2017).

Gerilim bölgesi şeklindeki hibrit zonların coğrafi genişliği nötral geçişler ve sınırlanmamış hibridizasyon etkisiyle beklenenden daha dar olabilir. Böylece beklenen ve gözlenen genişliğe bağlı olarak seçilime bağlı meydana gelen değişimleri tahmin etmek için alternatif bir yol oluşturur. Ayrıca seçim ve göç arasındaki etkileşim hibrit zon dinamikleri hakkında bir dizi bilgi verici modeller sunabilir. Örneğin pozitif sınıflandırıcı çiftleşme etkisiyle hibridizasyona karşı işleyen güçlü seçilimin veya postzigotik seçilime bağlı olarak göç eden ebeveyn türler ile çiftleşen hibrit bireylerin varlığında hibrit zon merkezi için ebeveyn bireyleri temsil eden iki tepeli (bimodal) dağılım modelleri görülmektedir (Jiggins ve Mallet, 2000). Belirli ölçüde meydana gelen hibridizasyon ve introgresyonun yanı sıra hibrit ve geri çapraz bireyler üzerine işleyen seçilimin varlığında genetik ataların dağılımı ebeveyn ve hibritleri temsil edecek şekilde üç tepeli (trimodal) dağılım gözlenmektedir (Abdelaziz vd., 2021). Bu senaryoda genotiplerdeki örneklem varyansı hibrit zon merkezine doğru artış göstermektedir. Diğer senaryoların aksine kısa göç mesafesine eşlik eden zayıf bir seçilimin varlığında ise melez kovanı oluşumunu temsil eden tek tepeli (unimodal) genetik dağılım meydana gelmekte olup, zon boyunca hibrit indeksini temsil edecek varyansta bir değişim gözlenmez (Şekil 6). Ek olarak zonalardaki bireyleri F_1 , F_2 ve geri çapraz hibrit sınıfları içerisindeki sıklığının belirlenmesi üreme izolasyonunun mekanizmasını anlamak için bir yol sağlar. Örneğin, F_1 bireylerin varlığı ve diğer melez tiplerinin görülmemesi güçlü seçilime bağlı indirgenmiş doğurganlığı veya geri çapraz bireylerin baskın olması zayıf üreme izolasyonu ve yaygın introgresyonu ortaya koyar (Gay vd., 2008; Semenov vd., 2023).



Şekil 6. Farklılaşmış türler arasındaki genetik karışımı temsil eden hibrit zon modellerinin şematik gösterimi (Abdelaziz vd., 2021)

Doğada en fazla rastlanan hibrit zonlar sekonder kontak zonlar ve gerilim bölgeleridir. Günümüzde en fazla etkiye sahip olan süreçler Plio-Pleistosen Dönemleri içerisindeki ardışık buzul devirleri ve buzullar arası dönemler boyunca değişen tür sınırları bu kontakların oluşumunu doğrudan tetiklemiştir (Hewitt, 2011). Güncel olarak bu zonların şekillenmesinde katkıda bulunan bir diğer etken ise insan etkisidir. Küresel ısınma, habitat yıkımları, türlerin ticarileştirilmesi ve yer değiştirilmeleri gibi insan kaynaklı birçok sebep, türler arasındaki kontakları oluşturmaktadır (Cahill vd., 2015; Cahill vd., 2018). Doğal laboratuvar olarak farz edilen hibrit zonların birçoğunun binlerce yıl önce meydana gelmiş Kuvaterner Dönem iklimsel salınımlarını gibi uzun vadeli süreçlere cevap olarak türlerin hareketine bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bu tip doğal hibrit zonlarda genellikle klinal bir yapıya sahip, coğrafi olarak dar ve ebeveyn türler arasında kademeli genotipik ve fenotipik karakter geçişinin olduğu doğrusal bir karışım meydana gelmektedir. Aksi senaryoda ise özellikle de antropojenik etkiyle meydana gelmiş, tarihsel olarak daha yakın zamana tekabül eden, doğal sınırları içerisinde dağılış gösteren türler ve invaziv türler arasında şekillenen hibrit zonlar doğrusal olmayan bir hat şeklinde mozaik bir yapı sergiler (Andersen vd., 2022).

1.5. Hibrit Zonların Nesnelleştirilmesi

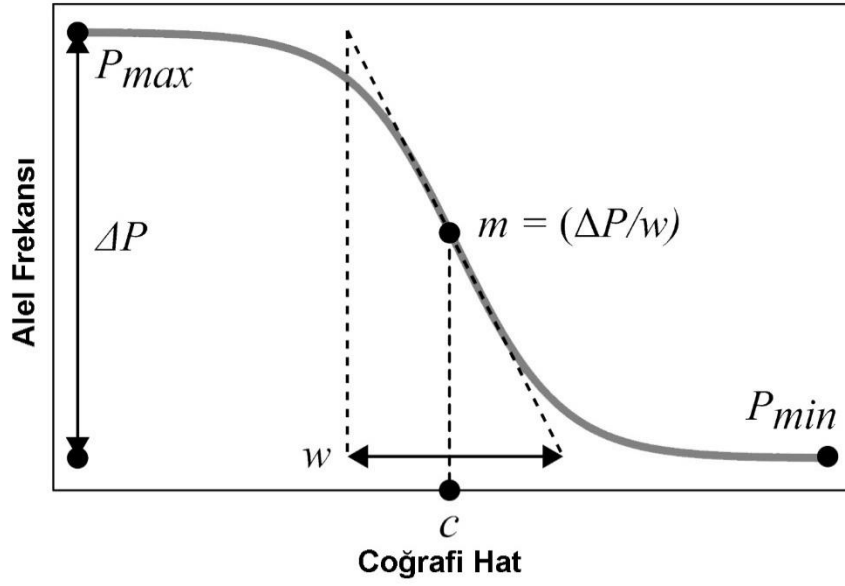
Kontak alanlar ve hibrit zonların doğru bir şekilde nesnelleştirilebilmesi coğrafik örnekleme ile doğrudan ilişkilidir. Eğer geniş dağılım gösteren taksonlar için sadece yüzlerce kilometre uzaklıktaki alanlardan örneklemeler yapılırsa, olasılık modellenli yöntemler coğrafik klinleri yapay türler üzerinden bölerek coğrafi yakınlığa dayalı yönelim oluşturacaktır (Chambers ve Hillis, 2020). Öte yandan, kontak alanlar ve hibrit zonlar boyunca yapılacak örnekleme genomik karışımın doğasını araştırmak, taksonlar arasında mevcut herhangi bir üreme izolasyonunu test etmek imkânı sağlayacaktır. Hibridizasyon uzak ilişkili taksonlar arasında da meydana gelebilse de farklı evrimsel soyların varlığını sürdürecektir üreme izolasyonuna yol açan genetik bariyerler mevcut olmalıdır. İki ayrı türün simpatrik olarak yaşadığı alanlarda sınıflandırıcı çiftleşme ve hibritlere karşı var olması beklenen seçilime bağlı olarak, iki saf türün ve hibrit bireylerin beraberce yaşaması beklenmektedir. Dolayısıyla hibritlerin varlığı ve türler arasında gen akışı olmasına rağmen, sınırlı gen akışı ve ebeveyn tiplerin varlığından dolayı toplamda iki ayrı evrimleşen soy olarak ele alınırlar. Aksine, tek bir tür içinde belirgin bir coğrafi yapılanma varsa, popülasyonlar arasında kademeli karışım beklenir ve sonuçta ortaya çıkan klinler ara türlere karşı seçim kanıtı olmadan tamamen karışık bireylerden oluşur (Chambers vd., 2023).

Hibrit zonların varlığını, zon boyunca gözlenen değişimi doğrulamak ve nesnelleştirmek için izlenecek yol klin modelleridir. Klin, genetik olarak farklılaşmış veya allopatrik olarak dağılım gösteren iki tür arasında bir bölgeden diğerine gidildikçe aleller veya fenotipik karakterlerde gözlenen kademeli değişimdir. Klinlere dayalı olarak oluşturulan klin teorisi, gen akışının karşısında üreme bariyerlerinin sergileyeceği dinamiğini anlamak için bir çerçeve oluşturmaktadır. Ayrıca hibrit zonlar, klin genişliği tahmini ve bağlantı dengesizliğine dayalı olarak seçim ve gen akışı arasındaki dengeyi anlamak için güçlü bir konsept çerçevesi sunar (Abbott vd., 2013). Bu teori, hibrit zonları anlama ve açıklayabilmek için geliştirilmiş klin modelleri ile görselleştirilmektedir (Barton ve Hewitt, 1989; Barton ve Gale, 1993). Klin modelleri, bir hibrit zon içerisinde veya hibrit zon boyunca gerçekleşen gen akışını hesaplamada ve bu şemalardan yararlanarak bir veya birden fazla lokus üzerindeki seçim baskısını ortaya çıkarmaktadır (Szymura ve Barton, 1986; Gompert vd., 2017). Klinler, iki grup arasında geçişin meydana geldiği bölgelere yerleştirilir ve

sigmoidal eğri şekline sahiptir. Bir gruptan diğerine geçiş kademeli olsa da geçişler ebeveyn türlerin dağılımına kıyasla oldukça dar bölgelerde gerçekleşmektedir.

Geleneksel klin teorisi doğada görülen örüntüleri üç ana hibrit zon belirleyici kavramla eşleştirmektedir. Bu kavramlar gen akışı, seçilim ve rekombinasyondur. Klin teorisi, bağımsız olarak ayrılan belirteçler arasında gözlenen önemli bağlantı dengesizliklerinin, saf genotiplerin hibrit bölge merkezine akışından kaynaklandığını ve seçilen lokusların her biri üzerindeki etkili seçilim baskısını arttırdığını öngörmektedir. Buna bağlı olarak birbiriyle ilişkili alellerin frekansına dayalı klinler böylece daha dik bir sigmoid eğri şekline bürünerek artacak olan bağlantı dengesizliğinin ve etkili seçilimin altyapısının oluştuğunu belirtir (Nürnberg vd., 2016). Çoğu hibrit zonda, hibrit bireyler üzerine işleyen seçilim baskısı karakter geçişini sergileyen eğrilerin şekline bağlı olarak çıkarsanır. Hibritler üzerine işleyen güçlü seçilimin meydana geldiği alanlarda ebeveyn türler arasındaki karakter geçiş dik ve keskin şekilli eğriler ile karakterize edilirken, zayıf veya belirlenemeyen seçilimin varlığında daha kademeli bir geçiş temsil eden sigmoid eğriler gözlenir (Rohwer vd., 2022).

Genel bir sigmoid klin modelinde koordinat düzleminin yatay eksenini örneklenen transekt hattını, dikey eksenine ise alel frekansını belirtir (Şekil 7). Klin üzerindeki ΔP parametresi transekt boyunca alel frekanslarında meydana gelen bütün değişimin tahminini belirtmektedir. Sayısal olarak, klin boyunca alel farklılığı olmadığını belirten 0 değeri ve farklı alellerin kuyruklar boyunca sabitlendiği 1 değeri arasında değişir. Klin uçlarını temsil eden $P_{\min}$ ve $P_{\max}$ parametreleri ise alelin klin üzerindeki en düşük ve en yüksek kuyruk derecesini ifade ederler ve alel frekansındaki varyasyonun boyutsal örüntüsünü detaylandırırlar. Klin genişliğini ifade eden c parametresi alel değişimleri üzerinde etkili olan seçilimin yön ve pozisyonunu açıklar. Klin eğimi olarak ifade edilen m parametresi ise alel frekansındaki değişimin en yüksek olduğu noktayı gösterir ve artan eğim seçilim baskısının kuvvetlendiğini belirtir.



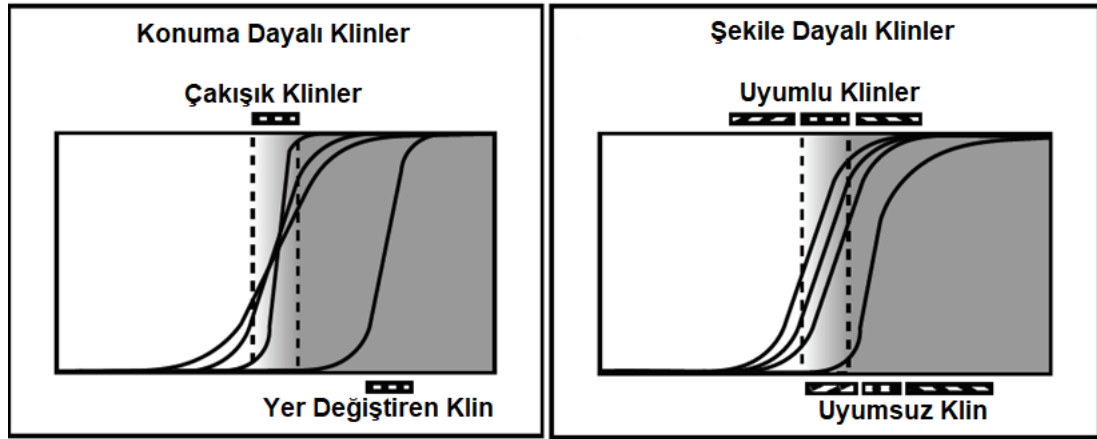
Şekil 7. Genel bir sigmoid klin şekline ait parametreler ve matematiksel arka planı (Stankowski vd., 2017)

1.5.1. Coğrafi Klinler

Coğrafi klinler, coğrafi bir hat boyunca ebeveyn ve hibrit popülasyonlar arasında ölçülen alel frekanslarının veya diğer karakterlerin değişimini açıklamada kullanılan klinlerdir (Brumfield vd., 2001; Carling ve Brumfield, 2008; Payseur vd., 2010). Gen akışının tahminindeki en klasik yaklaşım, hibrit zon boyunca coğrafi bir hat üzerinde alel frekanslarındaki değişimin görselleştirilmesidir. Zonun merkezi en fazla karışımın olduğu yer iken hibrit bireyler merkez dışında daha az yaygındır. Tür sınırlarına veya lokal adaptasyonlara katkıda bulunan aleller zon boyunca frekansları için ani değişim sergilerken, türler arasında hareketlilik gösteren aleller ise kademeli değişim gösterirler. Coğrafi klinler bir hibrit zon çevreden bağımsız olduğunda veya bir çevresel değişken boyunca meydana geldiğinde daha etkili çalışmaktadır. Klinal hibrit zonların analizinde daha etkilidir (Taylor vd., 2015). Coğrafi klinler bir lokus üzerindeki seçim baskısının derecesini elde edilecek klin şekilleri üzerinden açıklamaktadır. Bu klinler, alel frekansları ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi sigmoidal tanjant hiperbolik fonksiyonu kullanarak uyumlandırır ve böylece hat boyunca klin merkezi, genişliği ve eğimi belirlenir (Storfer vd., 2018). Coğrafi klinlerin şekilleri ve pozisyonları hibrit zonun biçimlenmesinde rol oynayan evrimsel süreçlerin göstergeleri olup, temel olarak dört farklı grupta sınıflandırılırlar (Barton ve Hewitt, 1985). Hibrit zonlar genellikle sigmoidal şekilli klinler oluşturmaktadır. Hibrit

zon merkezine doğru klinler keskin bir geçiş sergiler ve merkezden kenarlara doğru daha sığ bir eğri çöküşü oluşur. Alel frekanslarındaki kademelilik, lokus üzerindeki seçimden bağımsız olarak sekonder kontakların başlaması ile oluşmaktadır. Zaman içerisinde meydana gelen nötral geçişler klinleri kontak zonun başlangıcından itibaren oluşan nesil sayısının karekök değerine orantılı olacak şekilde yassılaştırmaktadır. Bundan dolayı seçim sigmoidal eğriler oluşturmaya meyillidir. Alel frekanslarındaki boyutsal değişim klin genişliği (w) üzerinden karakterize edilir ve en yüksek eğim derecesini ifade eder, ayrıca maksimum alel frekansı gradyanının gözlendiği alanda zon merkezi (c) olarak belirlenir (Payseur, 2010).

Coğrafik klinlerin güncel pozisyonu ve şekli hibrit zonun meydana gelmesinden itibaren geçen evrimsel süreci aydınlatmaya ışık tutmaktadır. Klin varyasyonları konuma ve şekline göre iki temel grup altında sınıflandırılmaktadır. Konuma dayalı olanlar çakışık ve yer değişen klinler, şekle dayalı olanlar ise uyumlu ve uyumsuz klinler olmak üzere toplamda dört alt grup içerisine dahil edilebilmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Konum ve şekillerine göre sınıflandırılan klin modellerinin görsel temsili (van Riemsdijk, 2019)

Farklı lokuslar için aynı coğrafi merkezi paylaşan klinler çakışık (*coincident*) klinler olarak adlandırılır. Bu klinlerin oluşturacağı eğrilerin şekil olarak benzeşmeleri gerekli değildir. Çakışık klinler hibrit zonun zaman içerisinde stabil bir pozisyonda kaldığının kanıtı olarak düşünülürler. Uyumlu ve dar klinler (*concordant*), hibrit zon içerisinde seçim ve dispersal dengesinin korunduğu alanları ifade eder. Genişlik ve eğri şekli bakımından benzerlik gösterirler. Klin merkezlerinin aynı coğrafik nokta

olması gerekli değildir. Uyumsuz klinler (*discordant*) mevcut klinlerin çoğundan daha farklı bir şekil sergilerler ve merkezleri diğer lokuslar için oluşan klinlerden daha uzakta konumlanır. Yer değişen ve geniş klinler (*displaced*) ise hibritlere karşı işleyen seçilimin düşük seviyede olduğunu yansıtır. Yer değişen ve uyumsuz klinler, birçok tür için mevcut olup, cinsiyet yanlı seçim, adaptif introgresyon veya hibrit zon hareketinden kaynaklı olarak ortaya çıkabilir (van Riemsdijk, 2019). Özetle, coğrafik klinlerin şekilsel olarak ortaya çıkarılması alel frekansının mevcut lokuslara uyumunun belirlenmesine dayanmaktadır, fakat genetik sürüklenme klinlerin pozisyonlarını değiştirebilir, genişliklerini etkileyebilir ve şekil bakımından uyumsuzluklar yaratabilir (Polechová ve Barton, 2011).

1.5.2. Genomik Klinler

Genomik klin yaklaşımı, bir lokusta gözlenen alel frekanslarındaki değişimlerin genom boyu tahmini karışıma oranlanarak görselleştirilmesidir. Bu yaklaşımda hibrit zon içerisindeki bireylerin her biri bir ebeveyn türden kökenlenmiş genomlarının oranı yani hibrit indeksi ile değerlendirilir (Gompert ve Buerkle, 2012). Genomik klinler ayrıca odak lokus içerisindeki alel frekansında gözlenen değişikliğin ortalama hibrit indeksine dayalı beklenen değişikliğe karşı görselleştirilmesiyle de oluşturabilmektedir. Bu varsayımda, nötr beklentilerden önemli derecede sapmalar genlerin seçilime tabi olduğunu işaret eder (Gompert ve Buerkle, 2009).

Genomik klinler ayrıca seçilimin spesifik modları arasında (epistasi, yönlendirilmiş seçim, heterozigot dezavantajı) ayırım yapmak için de nötral varsayımlardan sapmaları kullanır. Gen akışının, karışım gradyanı boyunca gerçekleştiğini varsayan bu klinlerin nesnelleştirilmesi için mekânsal koordinatlara ihtiyaç yoktur (Gompert ve Buerkle, 2011). Mozaik hibrit zonların analizinde oldukça kullanışlıdır. Mekânsal koordinatlara gerek duyulmadığından dolayı, genomik klinler için oluşturulmuş alternatif analiz metotları mevcuttur. Başlıca analiz modelleri multinominal regresyon metodu, Barton'un uyum metodu ve Bayesian genomik klinleridir (Taylor vd., 2015; van Riemsdijk, 2019). Genomik klinlerde alelik veya atasal frekanslar ortalama alel frekansı veya hibrit indeksinin bir fonksiyonu olarak modellenir. Bu parametreler ayrıca genomik klinin şeklini yansıtır ve aykırı değerlerin belirlenmesini sağlar. Genomik klinler, genom boyu karışımı gerçekleşmiş olan

introgresyon örüntüleri için sıfır hipotezi oluşturma imkânı sağlamaktadır.

Genomik klin analizi, alel veya lokusların genotip frekanslarını bireylerin veya popülasyonların genomik soylarını temsil eden genom boyu ortalamaya göre kıyaslamaya dayanır. Coğrafik klinler özellikle mozaik hibrit zonları açıklamak için her zaman uygun bir metot değildir. Genomik klinlerin temel fikri, bir hibrit zonda veya P1 ve P2 olarak nitelendirilen iki ebeveyn popülasyon arasındaki hibrit popülasyonda, her bir birey (veya deme) P1 atadan kalıtılmış genom boyu ortalama nükleotid oranı ile temsil edilmesidir. Yani genomik klinlerin amacı beklenen örüntüden sapan lokus spesifik durumları belirlemektir. Bu sapmalar yönlendirici seçim, fonksiyonel bozukluklar veya hibrit yaşarlığına neden olan genomik bölgeleri ortaya çıkarmaya yardım eder (Fitzpatrick, 2013). Genomik klinlerin analizi interspesifik heterozigotluğu çalışmaya olanak sağlamaktadır ve atasal oranlar ile birleştirildiğinde ebeveyn türler arasındaki üreme bariyerlerinin ölçütünü, hibritlerin avantajını ve dezavantajlarını değerlendirme imkânı sunmaktadır. Atasal ve interspesifik heterozigotluğun beraberce ele alınması birkaç nesil boyunca karışmış olan hibrit zonlar için oldukça önemlidir çünkü bir nesil boyunca karışımın meydana geldiği varsayımından bağımsız olarak hibrit genotiplerin sürekli dağılımı çalışmaya olanak sağlanmış olur (De La Torre vd., 2015).

Hibrit zonlarda genomik ve coğrafik klin teorilerinin kullanımı zonun merkezi ve genişliğinin, ayrımsal introgresyonun gerçekleştiği bölgelerin ve bu bölgeler üzerinde çalışan seçimle ilgili ilişkinin belirlenmesinde yönlendiricidir. Klinlerin coğrafik ve genomik analiz metotları zonların korunumunu ve zon boyunca devamlılık gösteren evrimsel şemaları açıklar. Coğrafik ve genomik klin analizleri birbirinin tamamlayıcısıdır (Gompert vd., 2017). Coğrafik klinler tür dağılımlarındaki değişimi belgelendirmede açık bir yoldur. Hibrit zon boyunca doğru bir örnekleme yapıldığında oldukça bilgi vericidir. Genomik klinler de aynı şekilde kullanılabilir. Bu durumda türlerin dağılımındaki değişim farklı hibrit indislerine sahip bireylerin oranını farklı zaman aralıkları ve coğrafik lokasyonlarla karşılaştırılarak değerlendirme yapılmalıdır (Fitzpatrick, 2013; Payseur ve Riesenber, 2016).

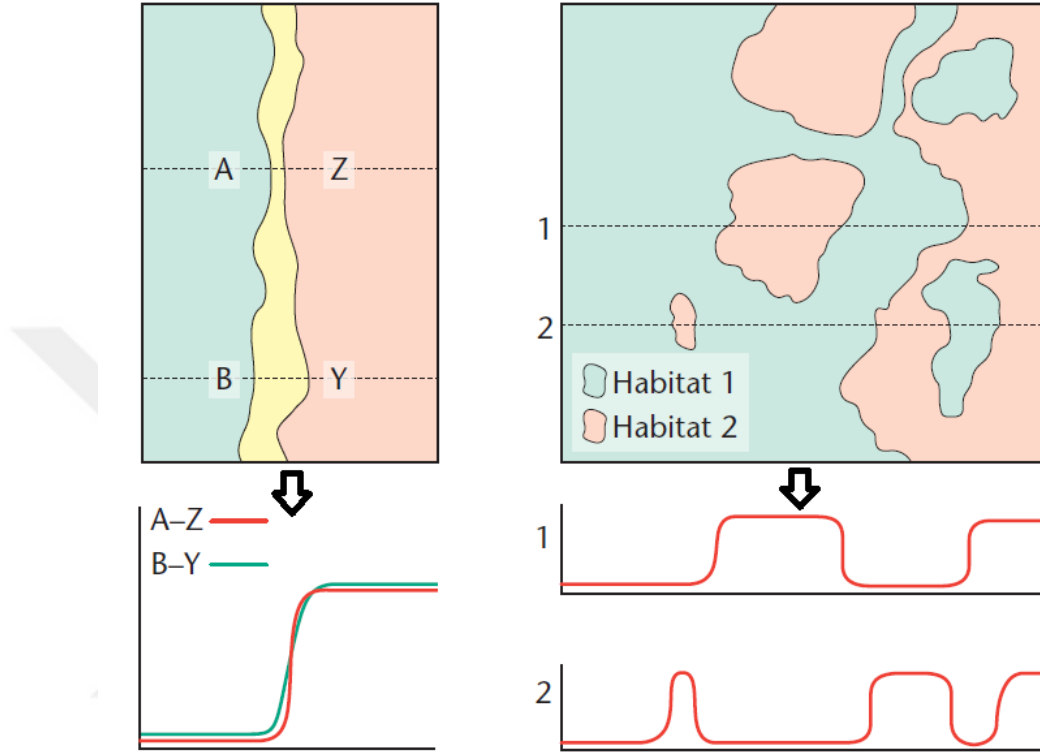
1.5.3. Klinal ve Mozaik Hibrit Zonlar

Genotipik ve fenotipik karakterlerin hibrit zon boyunca gösterdiği boyutsal dağılışı belirlemek, hibrit zonların kurulması ve sürdürülmesini sağlayan süreçleri anlamaya çalışan araştırmacıların temel amacı olmuştur. Hibrit zonlar uzamsal olarak bir türden diğerine doğru kademeli genotip veya fenotip geçişini temsil eden klin şeklinde tasvir edilebilir. Alternatif olarak, hibrit zonlar çevresel heterojeniteye bağlı olarak genotipik veya fenotipik karakterlerin parçalı bir örüntü sergilediği mozaik bir yapı sergileyebilir (Benson vd., 2012).

Klinal hibrit zonlar, bir karakter durumunun zon boyunca uyumlu bir eğri ekseninde değişim gösterdiği zonlardır (Şekil 9). Bu zonlar gerilim bölgeleri veya çevresel bir değişken boyunca var olan seçilimin işaretçisidir. Klinal hibrit zonlar birkaç farklı seçim şeması ile tanımlanmaktadır. Bu şemalar hibrit genotiplere karşı işleyen endojen seçim, çevresel bir gradyanın iki ucunda yer alan farklı ebeveyn tiplerini destekleyen seçim ve atasal karışıma sahip bireyleri destekleyen geçiş habitatları içerisindeki seçim olarak kategorize edilirler. Hibritlere karşı işleyen seçim güçlü olduğunda, bir türe ait sınırların değişimi diğer türe ait sınırların değişimiyle yakın ilişkili olmaktadır. Dahası, hibritleşen türler çevresel bir gradyan boyunca dağılım gösterdiğinde, zon boyunca ekolojik ve reproduktif karakter değişimlerine bağlı olarak hibridizasyon sadece türlerin beraber bulundukları alan içerisinde sınırlı kalmaktadır (Taylor vd., 2015).

Eğer farklı çevreler, mekânsal olarak mozaik bir şema şeklinde dağılım gösteriyorsa ve bu alanlarda alternatif genotipler üzerine işleyen güçlü bir seçim mevcutsa, genotipler basit bir klinden ziyade mozaik şemaları takip edecektir. Bu durumda ise mozaik zonlar ortaya çıkmaktadır. Mozaik hibrit zonlar, habitat veya kaynak kullanımı bakımından ayrılan, farklı genetik gruplara ait bireylerin çevresel yamalarda etkileşmesi ile meydana gelen zonlardır. Mozaik habitata dayalı hibrit zonlarda seçilimin kuvveti göç oranını aşmaktadır. Öte yandan, organizmalar rastgele bir dağılıştan ziyade habitatlara adapte bir yayılım sergilediğinde genotipler için gözlenecek mozaik örüntüler boyutsal ölçekte daha küçük alanlar içerisinde meydana gelebilir. Bu bakımdan, habitat tercihi simpatrik türleşmeye benzer şekilde mozaik zonların meydana gelmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Periferlerde bulunan saf bireylerin ek göçleri mozaik zonların devamlılığına yardım etmektedir. Mozaik

örüntüler demeler arasında göç eden birey sayısının az olması veya komşuluk sayısının sınırlı olmasından ötürü meydana gelecek rastgele sürüklenme ile de oluşabilmektedir (Vines vd., 2003; Aldrich ve Kambhampati, 2009).



Şekil 9. Habitat şekli ve çevrenin hibrit zon yapısı ve pozisyonuna etkisini gösteren coğrafik şema (Kawakami ve Butlin, 2012). Sol: Klinal hibrit zon; Sağ: Mozaik hibrit zon

Parapatrik ve allopatrik dağılım gösteren ebeveynlere dayalı olarak meydana gelen klinal zonlar, klin olarak şekillenmiş genetik ayrılmayı temsil ederken, farklı habitatların oluşturduğu yamalı dağılımlarla ortaya çıkan mozaik zonlar daha özelleşmiş bir yapıyı temsil eder. Her iki hibrit zonda çoklu faktörlere dayalı olarak tanımlanmakta olup, dışsal ve içsel farklılaşma mekanizmaları ile sürdürülürler. Yine de klinal kontak zonlar ikincil temas öncesi allopatri boyunca gelişmiş içsel üreme bariyerleri ile daha fazla yorumlanırken, mozaik hibrit zonların lokal adaptasyonlarla yönlendirildiği kanısı mevcuttur. Lokal adaptasyon sergileyen genler üzerinde işleyen seçim paralel biçimli habitatlar arasındaki artış gösteren farklılaşmayı ortaya koyar (Riquet vd., 2017).

1.6. Hibrit Zon Hareketi

Hibrit zonlar genellikle çevresel geçişler üzerinde konumlanmakta ve bu alanlardaki türlerin farklı çevrelere uyum sağladıkları düşünülmektedir. Sekonder kontaklar coğrafik açıdan denge pozisyonu üzerinde kurulmayabilmektedir. Konumlanmanın pozisyonu, türlerin uyum güçlerindeki farklılıklara ve iklimsel değişimlere karşı verilen cevaplara bağlı olarak şekillenmektedir. Değişen koşullar altında, bir türün diğeri ile yer değişmesini destekleyecek olan dışsal seçilimin aktif olarak ödev görmesi beklenir ve bahsedilen durum genom boyunca birçok lokus için uyum gücünde asimetrielerin oluşmasını tetikler. Bunun sonucunda ise hibrit zon hareketi meydana gelir (Wielstra vd., 2017).

Hibrit zon hareketi geçmiş dönemlerde yaygın olmayan bir durum olarak düşünülüp, önemsiz olarak görülse de (Barton ve Hewitt, 1985; Hewitt, 1988) günümüz içerisinde yapılan çalışmaların sayısındaki artışla bu kanı yavaşça ortadan kalkmakta, zonların hareketi birçok grupta gözlenmektedir (Bugs, 2007; Wielstra vd., 2017; Ryan vd., 2018; van Riemsdijk vd., 2019; Wielstra, 2019). Eğer bir popülasyon rekabet üstünlüğüne sahipse ve diğer popülasyona rağmen sınırlarını genişletiyor ise hibrit zon hareketinin ortaya çıkması beklenmektedir. Sekonder kontak kuran türlerin bu alan içerisinde eşit uyum gücüne sahip olmasının muhtemel olmadığı ve değişen çevre şartlarından dolayı eşit uyum gücüne sahip herhangi bir pozisyonun uzun süre durağan kalamayacağı düşünüldüğünde, popülasyon dinamiğine bağlı olarak meydana gelen hibrit zon hareketinin istisnadan ziyade bir kural olduğu göz önüne alınmalıdır (Arntzen vd., 2017; Wielstra vd., 2017). Hibrit zon hareketi rekabet üstünlüğü, asimetrik hibrit uyumu etkisi veya çevresel değişimlerden kaynaklı olarak uyum gücünde meydana gelen farklılıklardan dolayı bir türün diğerinin yerini alması olarak ifade edilebilir (Bugs, 2007). Harekete bağlı olarak birçok nötral alelin artan introgresyonuna sebep olur (Gay vd., 2008; Excoffier vd., 2009; Wielstra, 2019).

Hibrit zon hareketini belirleyebilmek için esas alınan iki yaklaşım mevcuttur. Birinci yaklaşım bir hibrit zon boyunca morfolojik ve moleküler belirteçlerdeki değişimlerin uzun süre takibinin sağlandığı izlem çalışmaları olup, zon hareketlerinin kanıtlanabilmesi için yüksek seviye güvenilirliğe sahip bir metottur. Örneğin, gerilim bölgeleri, ebeveyn popülasyonlardan devam eden gen akışı nedeni ile zaman içerisinde durağanlığını korumaya meyillidir. Ancak, popülasyon yoğunluğunun düşük olduğu

alanlarda oluşan gerilim bölgelerinde eğer çevresel şartlar yoğunluk üzerinde etkili değişiklikler meydana getirirse zonun pozisyonu zaman içerisinde kayabilir (Arntzen vd., 2016).

İkinci yaklaşım ise uygun belirteçler yardımı ile belirli bir zamanda introgresyon için meydana gelen farklı şemaların analiz edilmesidir. Bu yöntem hareket hakkında çıkarsamalar yapmaya yardımcı olabilir. Hibrit zon hareketi ayrıca uyum gücündeki, popülasyon yapısındaki, gen frekanslarındaki ve zon boyunca değişen ekolojik koşullardaki farklılıklardan da cereyan edebilmektedir (Barton ve Hewitt 1985, Buggs, 2007; Meittler ve Spellman, 2009). Hibrit zon hareketlerin fazlaca önem arz etmesinin esas sebebi yeni çevreler ve genetik arka planlar üzerinde introgresyonların gerçekleştiği genlerin sürekli olarak seçilim tarafından test edilmesidir (Visser vd., 2017).

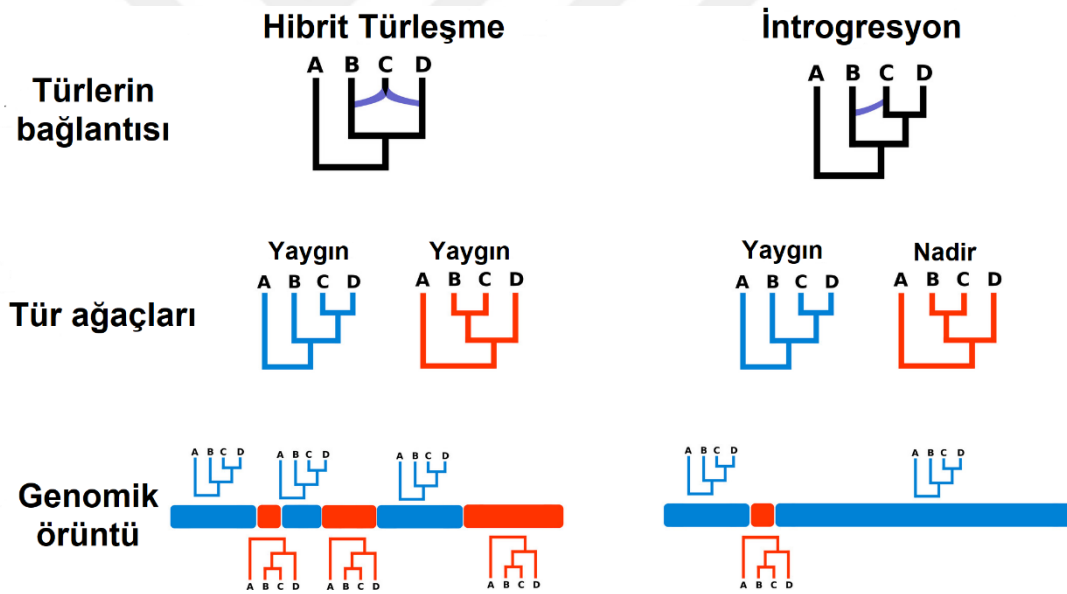
Hibrit zonların coğrafik konumuna ek olarak hibrit zon hareketleri de genetik şemaları anlamak için kayda değer bilgiler sağlamaktadır. Moleküler metotlar geçmişe yönelik hibrit zon hareketlerine ait sinyalleri belirlemeyi de mümkün kılmaktadır. Gerilim bölgelerinde hibritleşen taksonların popülasyon yoğunlukları, asimetrik hibridizasyon veya ebeveyn türlerin farklı adaptasyon seviyeleri hibrit zon hareketine yol açabilmektedir. Öte yandan yüksek uyum gücüne sahip hibritler geçiş zonları içerisinde sınırlandığı senaryoda rekabet avantajına sahip olan ebeveyn taksonun varlığı, asimetrik hibridizasyon veya çevrede meydana gelecek değişimler de hareketi tetikleyecek zemini hazırlar (Aguillon ve Rohwer, 2022).

1.7. İntrogresyon

Hibridizasyon veya geri çaprazlama üzerinden bir türdeki alellerin diğer bir türün gen havuzuna geçişi introgresyon olarak tanımlanmaktadır (Harrison ve Larson, 2014). Yani introgresyon, yabancı genetik materyalin genom içerisine geçişi (Mallet, 2005), nötral ve adaptif genetik varyasyonların türler üzerinden transferidir (Allendorf vd., 2001; Seehausen, 2004). Yaygın bir evrimsel kuvvet olan introgresyon doğanın adaptif genetik varyasyon mühendisidir (Schmnickil vd., 2017).

İntrogresif hibridizasyon, bir popülasyondaki genetik materyalin, genetik olarak farklı bir popülasyona sızdığı çok aşamalı bir süreçtir. İntrogresif hibridizasyonun gerçekleşmesi için, başlangıçta iki tür arasında F₁ melezleri

üretilmelidir. Doğada, bu tür hibrit oluşumu çoğu zaman çoklu prezigotik ve postzigotik üreme bariyerlerinin varlığı nedeniyle nadir görülen bir olaydır ve aslında bugüne kadar çalışılan çoğu tür çiftinde F_1 hibrit oluşumunun frekansları düşüktür. Bununla birlikte, F_1 melezleri düşük uyum gücüne sahip olsalar bile, birinci nesil melezleri üretmek için bir veya her iki ebeveyn türüyle çiftleşebilirler. Birinci nesil hibritler, saf tür bireylerle daha fazla geri çaprazlama yapabilir ve sonuçta hibridize edici soylar veya türler arasında yeni alellerin transferine yol açar (Arnold ve Martin, 2009). İntrogresyon sıklıkla hibridizasyonla eş anlamlı gibi algılanmaktadır fakat bu iki olayın altında yatan temeller, ortaya çıkacak sonuçları farklı şekilde yönlendirmektedir. İntrogresyon, ebeveyn genlerinin kompleks bir şekilde karışmasıyla sonuçlanırken hibridizasyon ilk nesilde iki türün görece eşit seviyede olan daha homojen bir karışımıyla sonuçlanır (Şekil 10).



Şekil 10. Hibridizasyon ve introgresyon arasındaki farklılıkları şematize eden genomik örüntüler (Folk vd., 2018)

Üreme izolasyonunun doğrudan ölçümü yabancı alellerin introgresyonu ile belirlenmektedir. İntrogresyonun biçimlenmesi ve oranı, uyum gücü üzerinde alelik varyasyonların etkisi ve diğer genetik bölgelerle olan bağlantı dengesizliği tarafından şekillendirilir (Gompert ve Buerkle, 2011). İntrogresyonla değiş tokuşu gerçekleşen bazı varyantlar alıcı türler için faydalı olabilir ve seçilim tarafından tercih edilirler (Barton, 1979). Uyumsal açılımların yakıtı olabilecek varyasyonların kaynağı olan

adaptif introgresyonlar birçok lokusta meydana gelebileceği gibi özel genler veya genomik bölgelerle de kısıtlı kalabilir (Hedrick, 2013). İntrogresyon üzerinden gerçekleşen hibridizasyonun önemli bir özelliği oldukça büyük ölçekte yeni aleller ve eş zamanlı olarak çoklu bağımsız lokuslar oluşturma potansiyelidir. Bu durum hibrit zon içerisinde poligenik özelliklerin adaptasyonuna imkân sağlar (Mallet, 2007; Abbott vd., 2013) ve hızlı tür evrimini destekler (Arnold ve Martin, 2009; Hedrick, 2013; Arnold ve Kunte, 2017).

Bir coğrafi hat içerisinde gözlenen introgresyon örüntüleri farklı seçim tiplerinin işaretçisi olabilir. Hibrit zonlarda tek yönlü daha fazla gen akışı şeklinde gerçekleşen asimetric introgresyon hibrit zon hareketi, pozitif seçim veya asimetric üreme izolasyonundan dolayı meydana gelebilir (van Riemsdijk vd., 2019). Hibrit zon boyunca örneklenmiş çoklu hatların varlığı, yapılacak çıkarsamaları aynı ölçüde güçlü kılmaktadır. Bu yaklaşım ile hatlar arasındaki örüntülerin tekrarlanabilirliğini test etme, polimorfik genlerin varlığında hatlar arasındaki tür içi farklılaşma ile hatların içindeki türler arası farklılaşmayı belirlemeye imkân sağlamaktadır. Son durum introgresyon için güçlü bir test sağlar çünkü hibrit zonlarda artan genetik benzerlik başka hiçbir senaryo altında gerçekleşmemektedir. Bazı durumlarda, hibrit zon boyunca var olan introgresyon türleşen genleri belirleme veya en azından bu genlerin nasıl etkileşim gösterdiğini anlamada gerekli doğrulamayı sağlayabilir (Ravinet vd., 2017). Örneğin, birçok hibrit zon içerisinde belgelendirilmiş olan diferansiyel introgresyon, aynı lokus üzerinde bulunan alellerden bazılarının diğerlerine göre daha fazla geçiş sağlamasını ifade eder. Teorik olarak avantajlı aleller daha kolay geçiş yapma eğilimindedir. Nötral aleller farklı ölçüde geçişler yapar fakat genlerle olan bağlantılar alellerin hareketlerini azaltacaktır. Ayrıca, introgresyonun coğrafik örüntüleri ve boyutsal ölçeği hibridizasyonun meydana geldiği çevreye, bireylerin yayılım kapasitesi ve doğal seçilimin derecesine göre değişmektedir. Yaygın introgresyonda bir türe ait aleller hibrit zondan uzakta konumlanmış diğer türe ait saf popülasyonlara geçiş yapabilirken, sınırlanmış introgresyonda iki türe ait bireylerin beraber bulunduğu ve hibritleştiği alanda alel geçişleri gözlenmektedir (Harrison ve Larson, 2014).

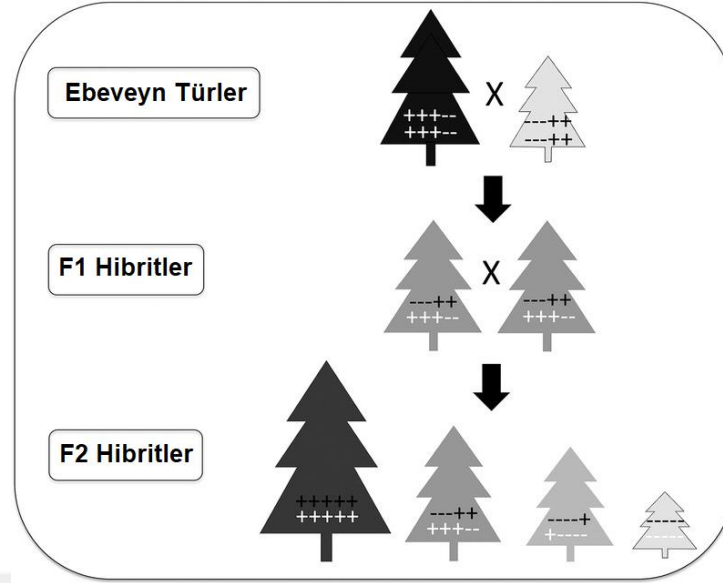
Adaptif genetik varyasyon mühendisi olarak betimlenen introgresyon, popülasyondan türlere uzanan ölçekte etkileşim içerisindeki gruplara yeni genotipik

ve fenotipik varyasyonlar kazandırabilir, yeni nişlere adaptasyonu kolaylaştırabilir, farklılaşmanın öncüllüğünü üstlenerek evrimsel süreçlerin devamlılığını sağlayabilir. Pozitif anlamdaki katkılarının yanı sıra, tür sınırlarının erozyonuna, adaptif alellerin bozulmasına, hastalıklarla ilişkili genetik varyantların değiş tokuşuna, genetik çeşitlilikte azalmaya ve türlerin invazyonuna da yol açabilir (Petit vd., 1999; Furman vd., 2017)

1.8. Geri Çapraz Oluşumu

Geri çaprazlama (*backcrossing*), genetik olarak ebeveyn türlere benzemeyen hibrit bireylerin (F_1 dölleri) ebeveynlerden biriyle veya genetik olarak ebeveynlere benzeyen organizmalarla çiftleşmesidir. Hibrit zonlarda meydana gelen introgresyonun yürütücüsü geri çaprazlamanın tam kendisidir. Hibridizasyon sonucu meydana gelen ilk jenerasyon hibritler, benzerlik bakımından iki ebeveyn tür arasında konumlanır. Yaşam güçleri (*vigor*) sonraki jenerasyon hibritlere kıyasla yüksektir fakat genetik ve morfolojik olarak tekdüzedirler. Birinci jenerasyon hibritlerin çiftleşmesiyle meydana gelen ikinci jenerasyon hibritler de ara konumlu benzerlikler gösterebilirler de F_1 döllere kıyasla tek tipten ziyade oldukça fazla morfolojik ve genetik değişkenlik sergilerler. Yaşam güçleri daha zayıftır. Atasal türlere benzerlikler gösterebilirler (Mallet, 2005).

İlk jenerasyonlar birbiri ile çiftleşip ikinci jenerasyon hibritleri oluşturmaktan ziyade atasal türlerle geri çaprazlamaya daha meyillidirler. Geri çaprazlama ile birinci jenerasyon hibritler kendilerini kalıcılaştırmaya ve oluşacak soylarının melez yapısını görünmez kılmaya çalışırlar. Bu durum ise hibrit zonların ve içerisinde sürececek introgresyonun devamlılığını sağlar (Şekil 11).



Şekil 11. İki farklı ebeveyn türün çiftleşmesi sonucu meydana gelen ilk jenerasyon hibritler ve hibritlerin çiftleşmesiyle meydana gelen ikinci jenerasyon hibritler için oluşabilecek fenotipik varyasyonlar (Hamilton ve Miller, 2016)

Hibrit zonlar içerisinde var olduğu farz edilen hibrit bireyleri teşhis edebilmek için geleneksel olarak ara morfolojik karakterlerin kullanılması esas alınmıştır fakat hibritler ebeveynlerden ayırt edilemeyecek kadar benzerlik gösterebilir ya da yüksek seviyedeki geri çaprazlama morfolojiye dayalı teşhis metodunu geçersiz kılabilir. Ortaya çıkacak problemleri aşabilmek ve hibrit zonlar içerisinde her seviyedeki hibridizasyonu belirleyebilmek için nükleer ve mitokondriyal belirteçlerin kullanılacağı moleküler metotlar tercih edilmelidir. Bahsedilen metotlar kriptik bireyleri, bunların maternal atalarını ve ayrıca introgresyonun yönü ve seviyesini tam olarak ortaya çıkarabilmektedir (Vogel ve Johnson, 2018).

1.9. Sitonükleer Uyumsuzluklar

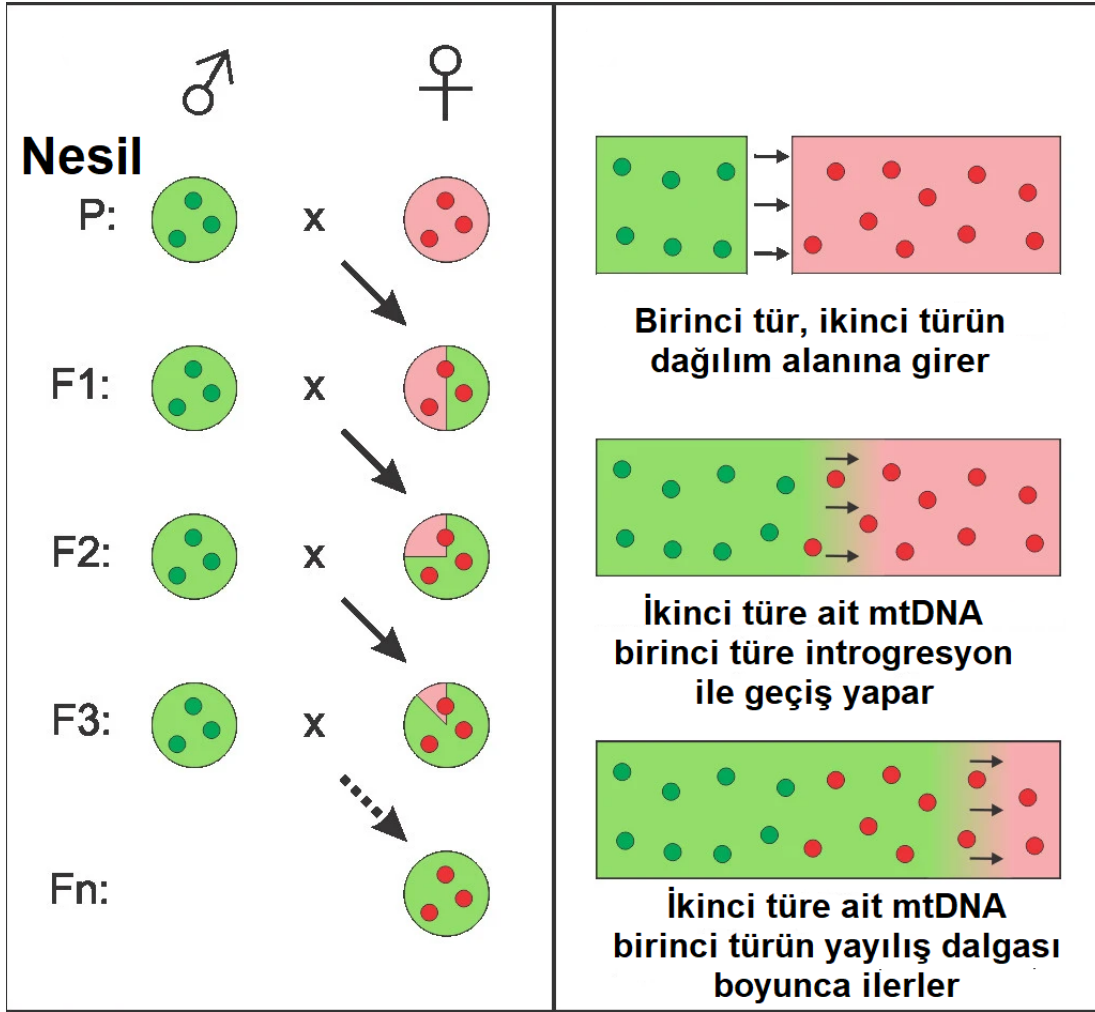
İzolasyonla geçen yeterli zamanın ardından bağımsız çevresel seçilime maruz kalmış olan popülasyonlar, soylar ve daha üst hiyerarşik kategoriye dahil taksonlar genetik olarak farklılaşma eğilimindedirler (Orr, 1995). Bu genetik gruplar içerisinde veya arasında farklı seçim baskılarına maruz kalmış (kodlanan-kodlanmayan) veya farklı efektif popülasyon büyüklüğü gösteren (otozomal, organel veya eşey bağımlı) genomik lokuslar paylaşılan genetik öyküye rağmen kendi evrimsel hikayelerini yansıtan gensel uyumsuzluklar sergileyebilir. Lokuslar arası uyumsuzluk farklılaşan özellikle de yeni ayrılmış olan soylar veya türleşme öyküsünün yeni başladığı türler için sıkça gözlenen bir durumdur. Kontak zonlar içerisinde gözlenen sitoplazmik (mitokondriyal) ve nükleer lokuslar arasındaki uyumsuzluklar genetik varyasyonun dağılımını şekillendiren tarihsel, demografik ve seçilime bağlı süreçleri tespit etmek için sinyal görevi görür (Dakin, 2006; Toews ve Brelsford, 2012; Després, 2019).

Sitonükleer uyumsuzluklar farklılaşan soylarda yaygın gözlenen bir örüntü olup, genellikle mitokondriyal DNA için gözlenen asimetric introgresyon ile karakterize edilmektedir. Bahsedilen asimetri demografik, seçilime dayalı ve davranışsal mekanizmaların etkisi altında oluşabilmektedir. Örnek olarak eşey yanlı dispersal, boyutsal popülasyon genişlemesini takip eden genetik sürüklenme, farklılaştırıcı seçim veya eş seçimindeki asimetrikler bahsedilen mekanizmaları tetikleyecek durumlardır (Toews ve Brelsford, 2012). Ayrıca mitokondriyal DNA'nın hızlı evrimleşme kapasitesi, daha düşük efektif popülasyon büyüklüğü, sekonder kontakları takiben kaynaşması gibi nötral demografik süreçlerin sonucunda da uyumsuzluklar meydana gelmektedir (Dufresnes vd., 2020a). Sekonder kontaklarda meydana gelen asimetric introgresyon farklı belirteçlerle inşa edilecek klinler arasında pozisyon değişikliğine yol açarken, mtDNA ve nükleer DNA'ya dayalı olarak farklı klin genişliklerine de sebep olabilmektedir (Johnson vd., 2015).

Sitonükleer uyumsuzluklar yakın ilişkili genetik gruplar arasında geçmiş dönemde meydana gelmiş, seçici (asimetric geri çaprazlama, pozitif seçim) ve demografik (cinsiyet yanlı dispersal, genetik sürüklenme) olayların yönlendirdiği gen akışına dair nitelikli izler taşırlar. Teorik ve deneysel olarak, lokal hibridizasyon olayları alan genişlemesi boyunca yaygın olarak gerçekleşen mitokondriyal introgresyonu desteklemekte ve bazen türler arasında mitokondriyal genomun komple

değişmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu olaylar, özellikle hızlı dispersal kapasitesine sahip ve dişi bireylerin daha güçlü hibrit bireyleri oluşturduğu erkek-heterogametik organizmalarda daha yaygın görülmektedir (Zieliński vd., 2013; Dufresnes vd., 2019). Asimetrik introgresyonun mtDNA için sıkça rapor edilmesi, belirtecin rekombinasyona maruz kalmamasından dolayı nükleer arka plana kıyasla daha kolay iz sürülebilmesinden ötürüdür. Mitokondriyal genomun farklı kalıtım mekanizması özellikle eş seçimine dayalı meydana gelen introgresyon asimetrisi bakımından izolasyon mekanizmalarını anlamaya ışık tutar. Öte yandan, çoğunlukla maternal olarak kalıtılan mitokondriyal belirteçleri kullanmak iki eşeyli türlerin evrimsel süreçlerini anlamada yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla farklı kalıtsal özelliklere sahip belirteçleri kapsayan, iki ebeveynden kalıtılan (biparental), çoklu lokusa dayalı genotiplerin dağılımı soylar arasındaki üreme izolasyonunun ölçüsünü ele almada avantaj sağlar (Coyner vd., 2015; Schultze vd., 2020).

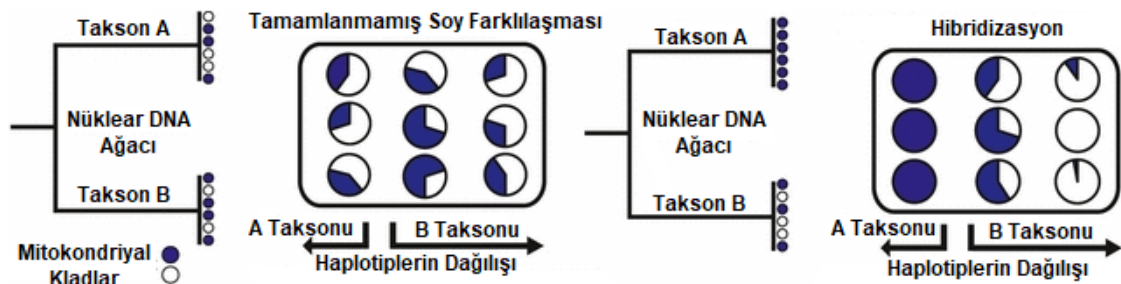
İkincil temas kuran veya parapatrik dağılım sergileyen türler coğrafik olarak asimetrik introgresyon gösterebilir. Yani bir tür diğer türe özgü genleri dağılım sınırlarının önemli bir kısmında genomu içerisinde sergileyebilir. Bu durum genel olarak avantajlı yabancı genlerin doğal seçilime bağlı olarak diğer türün sınırlarına giriş yapmasıyla açıklanmıştır. Öte yandan, bir türün diğer tür ile yer değişmesi sürecinde ortak bir mitokondriyal genom gözlenmesi yaygın bir durumdur. Yerli olan tür, dağılım alanını istila eden diğer tür tarafından kuşatıldığında ve yabancı olan tür yerli türe rağmen genişlemeyi sürdürdüğünde, yabancı türe ait popülasyonun büyümesine bağlı olarak mitokondriyal genomun introgresyonu meydana gelmektedir. Introgresyonun yönü ise birey yoğunluğundan bağımsız olarak genellikle yerli türlerden istilacı türe doğrudur. Sonuç olarak, mitokondriyal DNA türler arasında adeta sörf yapar ve popülasyonlar üzerinde izini bırakır (Şekil 12). Bu durumda mitokondriyal ve nükleer genoma dayalı olarak farklı bulgular oluşacağından sitonükleer uyumsuzluklar meydana gelir (Wielstra ve Arntzen, 2012; Tominaga vd., 2018).



Şekil 12. Hibridizasyon ve tür sınırlarının değişmesine bağlı olarak meydana gelen asimetric mitokondriyal DNA introgresyonunun şematik temsili (Wielstra ve Arntzen, 2012)

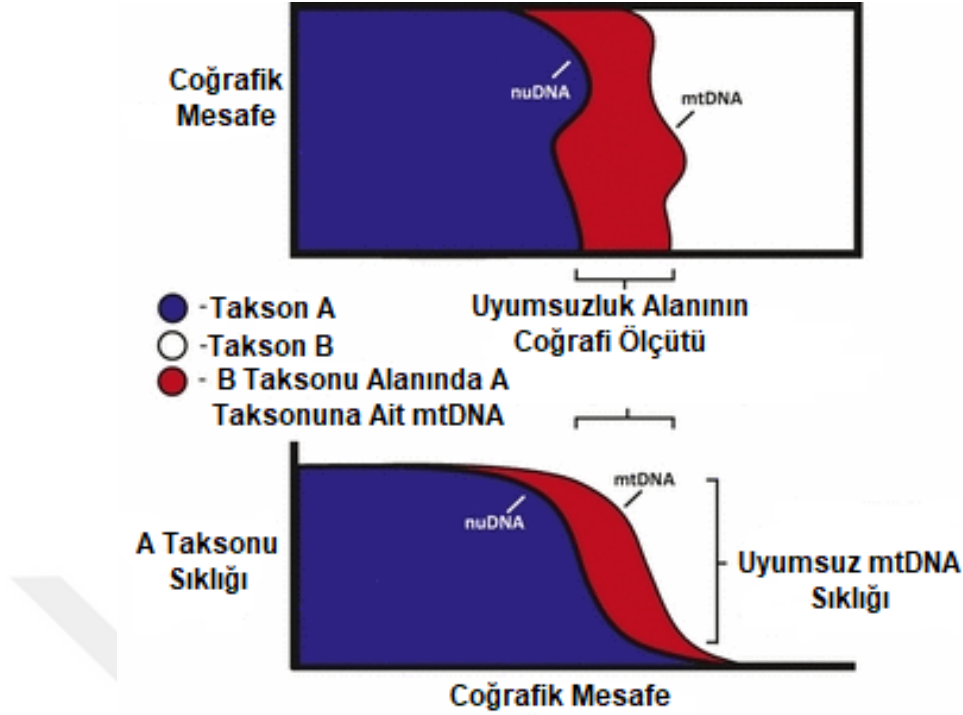
Hibrit zonların zaman içerisindeki değişimine bağlı olarak farklı sitonükleer uyumsuzluk senaryoları gözlenebilir. Filocoğrafik kapsamda, mitokondriyal genom tutulmasının coğrafi örüntüleri kriptik türler arasında geçmişe dayalı dağılış değişimlerinin izini sürmeye yardım eder. Örneğin, yerleşik olarak nitelendirilecek bir türün dağılış alanını genişleterek yeni bir alana girdiği, fakat sonrasında yabancı türün aynı alana doğru yayıldığı bir senaryo ele alındığında, yabancı türün güncel allopatrik dağılışı içerisindeki popülasyonlar daha önce alanda mevcut olan yerleşik türe ait mitokondriyal genomu taşır ve invazyonu kanıtlar. Bu durumda, simpatrik zondan uzakta konumlanmış ve introgresyon gerçekleşmiş popülasyonların yerleşik tür dağılımının maksimum kapsamını göstermesi gerekir. Durağan hibrit zon senaryosunda ise hibritleşen iki tür arasında başlangıçta kurulan kontak zonun

konumu, güncel kontak zonla uyumlu olmalıdır. Dolayısıyla, durağan hibrit zonlar ilk temastan itibaren iki türün demografik dengede kaldığı ve mitokondriyal DNA introgresyonunun simpatrik zon ile sınırlı kaldığı senaryoyu temsil eder (Cinget vd., 2015). Sitonükleer uyumsuzluklarda öne çıkan diğer bir önemli husus ise hibridizasyon ve tamamlanmamış soy farklılaşması (*incomplete lineage sorting*) olaylarının ayırt edilmesidir. Her iki olayda benzer genetik örüntüler gözlenebilmektedir. İki olay arasındaki temel farklılık ise tamamlanmamış soy farklılaşmasına dair genetik şemalar arkalarında tahmin edilebilecek bir biyocoğrafik örüntü bırakmamaktadır (Şekil 13). Bu durumda, mtDNA ve nükleer DNA arasındaki güçlü uyumsuzluklar hibridizasyon olarak ele alınabilir ve tamamlanmamış soy farklılaşması göz ardı edilebilir.



Şekil 13. Tamamlanmamış soy farklılaşması ve hibridizasyon olaylarında gözlenen genetik arka plan (Toews ve Brelsford, 2012)

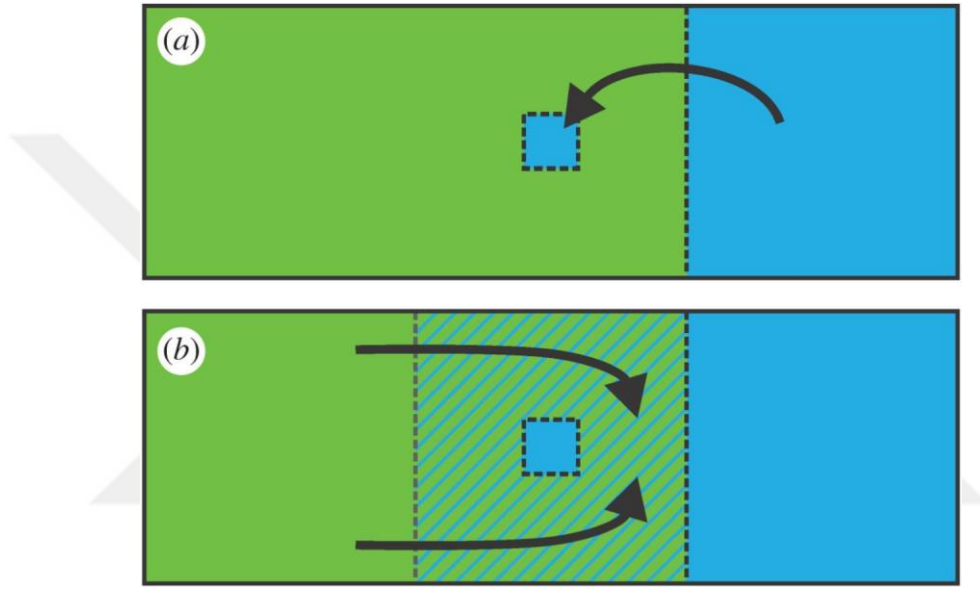
Biyocoğrafik uyumsuzluklar genellikle merkez ve genişlik bakımından coğrafi olarak farklı mtDNA ve nükleer DNA klinaleri ile sonuçlanır. Uyumsuzluğun ölçüsü bir türden diğer türe doğru mtDNA değişimi veya daha sınırlı şekilde nükleer DNA örüntülerinin tersine yabancı türe ait mtDNA haplotiplerinin gözlenmesi arasında değişkenlik gösterir (Şekil 14).



Şekil 14. Dağılım sınırları ve coğrafik klinler arasında gözlenen uyumsuz biyocoğrafik örüntüleri betimleyen hipotetik senaryo şeması (Toews ve Brelsford, 2012). Üst panel türlere ait dağılım sınırları ve mitokondriyal uyumsuzluğun gözlemlendiği alanı, alt panel ise ilgili alanlar için oluşan klin modellerini resmetmektedir.

Sitonükleer uyumsuzlukların sık gözlemlendiği bir diğer genetik örüntü ise anklav (*enclave*) olarak adlandırılan kuşatılmış popülasyonların varlığıdır. Anklavlar parapatric dağılıma sahip olan yakın ilişkili iki türden birinin dağılım alanı içerisinde diğer türe ait olan ve genetik olarak ana türden izole olmuş popülasyonlardır (Themudo ve Arntzen, 2007). Bir anklav türlerin kolonizasyonuna bağlı olarak oluşabilir veya daha önceleri daha geniş dağılım gösteren türün, henüz tamamlanmamış olan coğrafi yer değişimine bağlı olarak relikt dağılım gösteren bir parçası olabilir (Şekil 15). İki senaryodan herhangi birinin meydana gelme olasılığı tür dağılımındaki dispersal merkezinin genişliği ve şekline bağlı olarak veya anklav popülasyonun türe ait ana dağılım alanından uzaklığına bağlı olarak değişmektedir (Wielstra vd., 2017). Eğer popülasyonun yer değiştirmesi tamamlanmamış ise ve genişleyen popülasyon geri çekilen popülasyonun eski ve esnek sınırları civarında hareket ediyorsa, bu durum genişleyen popülasyonun aralığına bağlı olarak anklavların karakteristik dağılım örüntüsü ile sonuçlanmaktadır. Eğer anklav popülasyonun sınırları türe ait ana dağılım sınırlarına uzaksa ve türün hareket kapasitesi sınırlı ise, uzun mesafeli kolonizasyon

pek olası görülmemektedir (Wielstra, 2019). Dolayısıyla, anklavlar düşük yayılış kapasitesine sahip organizmalarda daha fazla gözlenir. Amfibiler üremede suya bağımlılıkları ve kısa mesafe hareket kapasitesi nedeniyle anklavları gözlemlemek için daha uygun bir canlı grubudur. Anklavlar oluştuktan sonra çözülme, zaman içerisinde sabit kalma veya ait olduğu türün ana dağılım sınırıyla tekrar bağlantı kurulması sonucunda kaybolma şeklinde üç muhtemel sona tabidir (Arntzen ve Espregueira Themudo, 2008; Wielstra vd., 2017; Wielstra, 2019).



Şekil 15. Anklavların oluşumuna dair iki hipotez: a) Durağan bir hibrit zonu aşarak gerçekleşen uzun mesafeli kolonizasyon sonucunda meydana gelen anklav popülasyonu; b) Yabancı türün dağılış alan genişletmesi sonucunda hareket eden hibrit zonun gerisinde kalarak lokalize olmuş relik anklav popülasyonu (Wielstra vd., 2017)

1.10. Literatür Özeti

Tez kapsamında yapılan literatür taraması sonucuna göre *Bufo bufo* tür grubuna dahil olan *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* taksonlarının tür durumları hakkında geçmişten beri süregelen bir karmaşanın var olduğu ve coğrafi dağılışları üzerine farklı yorumlar getirildiği göze çarpmaktadır. Gerek eski dönemde morfolojik karakterlere dayalı olarak yapılan çalışmalar, gerekse de yakın dönemde güncel moleküler tekniklerden yararlanılarak gerçekleştirilmiş çalışmaların özellikle taksonlar için muhtemel kontak zonları içeren ülkemiz coğrafyası ekseninde farklı bulgular sunduğu tespit edilmiştir.

Bodenheimer (1944) Türkiye herpetofaunası hakkında yaptığı çalışmada Manisa, İstanbul, İzmir, Keşiş Dağı, Arifiye ve Rize ilini de kapsayan eski kayıtları değerlendirerek, Kuzeybatı Anadolu hattını *Bufo bufo*'nun yayılış alanı içerisine dahil etmiştir. Mertens ve Wermuth (1960) ülkemizi de içerisine alacak şekilde Kuzeybatı Afrika'dan, Avrupa ve Doğu Asya'ya kadar olan coğrafyada *Bufo bufo* türünün dağılış gösterdiğini ifade etmişlerdir. Ardından, Eiselt (1965) Trabzon'dan elde edilmiş bir örneği *Bufo bufo verrucosissimus* olarak tanımlamıştır.

De Lange (1973) tür içi varyasyonu araştırdığı çalışmasında *B. bufo* olarak betimlediği bireyleri deride bulunan keratinli siğilleri kullanarak gruplandırmaya çalışmıştır. Çalışma sonucunda siğillerin bulunma sıklığı bakımından kuzey-güney yönlü bir klinal varyasyon olduğunu, gözlenen farklılıkların iklimsel geçiş ile ilişkili gösterdiğini, kuzeyde yayılan popülasyonlarda daha sivri dikenlere sahip keratinli siğiller gözlendiğini açıklamıştır. Araştırmacı ayrıca Akdeniz hattı boyunca dağılımı açıklanan *Bufo bufo spinosus* taksonu için alttür durumunun muallak olduğunu öne sürmüştür.

Başoğlu ve Özeti (1973), Rize ilinden elde edilmiş ve Frankfurt Zooloji Müzesi koleksiyonunda buluna bir örneği *Bufo bufo spinosus* olarak tayin etmiş, bu taksonun Kuzeybatı Afrika ve Akdeniz hattı boyunca yayıldığını söylemişlerdir. Aynı yıl içerisinde Clark ve Clark (1973) Artvin ili Hopa ilçesinden elde edilmiş bir örneği *Bufo bufo spinosus* olarak tavsif etmişlerdir. Sparreboom ve Arntzen (1987) Düzce ve Zonguldak illerinden, Baran vd. (1997) ise Rize ilinden elde ettikleri örnekleri morfolojik yönden ele almış ve *Bufo bufo spinosus* olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmalara paralel şekilde Yılmaz (1984) Trakya bölgesinden, Tok (1999) Reşadiye

Yarımadası'ndan, Özdemir ve Baran (2002) ise Uşak ve Kütahya arasında yer alan Murat Dağı'ndan elde ettikleri örnekleri morfolojiye dayalı olarak *Bufo bufo spinosus* olarak değerlendirmiş ve taksona ait dağılım alanını genişletmişlerdir.

Orlova ve Tuniyev (1989), Kafkasya boyunca dağılım gösteren *Bufo* cinsine ait örnekleri geniş bir kapsamda ele alarak morfolojik karakterler üzerinden analiz etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda bölge içerisinde dağılışı gösteren taksonu *Bufo verrucosissimus* olarak tanımlamış ve üç ayrı alttürün var olduğunu öne sürmüşlerdir. Alttürlerde görülen morfolojik varyasyonu renk ve desenler, boyun uzunluğu, rostrum şekli, dil şekli, parotidler üzerinde bulunan bantlardaki farklılaşma üzerinden açıklayarak taksonların coğrafi sınırlarını çizmişlerdir. Buna göre, Büyük Kafkas Dağları'nın kuzey yamaçlarında Malaya Laba – Bolskaya Laba nehirleri arasındaki sınırlı bir alan *Bufo verrucosissimus turowi* alttürünün, Büyük Kafkas Dağları'nın kuzeyinden Karadeniz kıyısı boyunca Gelendzhik şehrine kadar erişen bir alanda *Bufo verrucosissimus circassicus* alttürünün, Büyük Kafkas Dağları boyunca uzanarak Karadeniz'in güneyine ulaşan ve batı yönlü dar bir şerit şeklinde Trabzon Dağları'na kadar devam eden alan içerisinde ise *Bufo verrucosissimus verrucosissimus* alttürünün yayılışı gösterdiği not edilmiştir. Bahsedilen alttürlerle ek olarak, Kidov (2009) Rusya Federasyonu sınırlarında Krasnodar – Stavropol hattı içerisindeki uygun habitatlarda yaşayan bireyleri *Bufo verrucosissimus tertyschnikovi* alttürü olarak tavsif etmiştir.

Yılmaz ve Kumlutaş (1995) mevcut karmaşadan yola çıkarak *Bufo bufo* türünün durumu hakkında yapmış oldukları inceleme sonucunda farklı bölgelerden alınan örnekler arasında (Karadeniz, Akdeniz, Ege ve Marmara) taksonomik açıdan diyagnostik olarak kullanılabilecek önemli bir morfolojik farklılığın olmadığı sonucuna ulaşmış ve mevcut varyasyonların farklı tür veya alttürün varlığına hüküm vermek için yetersiz kaldığını vurgulamışlardır. Ayrıca *Bufo verrucosissimus* türünün sadece Kafkasya'da yayılım gösterdiğini ve ülkemizde mevcut olmadığını öne sürmüşlerdir.

Tarkhnishvili (1996) Gürcistan ve Kafkasya'daki amfibi türlerinin dağılışı ve ekolojileri üzerine biyocoğrafik açıdan bakış getirdiği araştırmasında *B. verrucosissimus* taksonunu tür seviyesinde ele almış ve Gürcistan içerisindeki dağılımını haritalamıştır. Türkiye'nin kuzeydoğusu ise belirsiz bir alan olarak işaretlenmiştir. Ayrıca türe ait popülasyonlar Colchic ve Elburs olmak üzere iki ayrı

alt biyocoğrafik bölge içerisinde değerlendirilmiştir.

Macey vd. (1998), Tibet coğrafyasının doğu yakasında *B. bufo* tür grubuna ait taksonlar arasındaki filogenetik örüntüleri anlamak için toplam 1063 baz uzunluğuna sahip mitokondriyal gen bölgelerini kullanmıştır. Çalışma sonucunda türleri yükselti bazlı sınıflandırmış, yüksek rakımda *B. andrewsi*, düşük rakımlarda ise *B. gargarizans* ve *B. minshanicus* türlerinin varlığını belirlemiştir. Bu taksonlar günümüzde *B. gargarizans* tür grubu içerisine dahil edilmiştir. Çalışma içerisinde ayrıca Gürcistan'dan elde edilmiş örnek *B. verrucosissimus* türü olarak değerlendirilmiş ve bu türün Asya taksonlarıyla kardeş tür olduğu ifade edilmiştir.

Kumlutaş vd. (1998), Ordu ve Giresun illeri içerisinde yakalanan siğilli kurbağaları *B. bufo* olarak tayin etmişlerdir. Kutrup (2001) ise Artvin-Murgul ilçesinin herpetofaunası üzerine yaptığı çalışmada örneklenen bireylerin yeşilimsi-kahverengi vücut rengine, böbrek-şekilli, alt kısmında koyu bir bant bulunan ve büyük parotidlere sahip olduğunu belirtmiş ve taksonomik olarak *B. bufo* türü içerisine dahil etmiştir.

Tosunoğlu ve Taşkavak (2001) önceki çalışmalarda *Bufo bufo spinosus* ve *Bufo bufo verrucosissimus* olarak tanımlanmış iki taksonu kan-serum proteinleri kullanarak serolojik yönden karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Bunun için Manyas (Balıkesir) ve Çamlıhemşin (Rize)'den elde edilmiş örnekleri kalitatif ve kantitatif metotlarla analiz etmiş ve atfedilen alttürler arasında herhangi bir farklılık gözlemlememişlerdir. Sonuç olarak *Bufo bufo verrucosissimus* ve *Bufo bufo spinosus* olarak betimlenen alttürlerin sinonim olabileceklerini bildirmişlerdir.

Lüscher vd. (2001), İsviçre-İtalya Alpleri'nde ve Orta Avrupa'da dağılım gösteren *B. bufo* popülasyonlarındaki genetik varyasyonu 8 farklı enzim üzerinden araştırmışlardır. Bulgular mevcut düşük seviyede genetik varyasyonun gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Yaptıkları çalışma sonucunda Akdeniz'de var olan *Bufo bufo* popülasyonları ile kuzeydeki *Bufo bufo* popülasyonlarının arasındaki ayırıcı morfolojik karakterlerin ekolojik etkenlerden ötürü meydana gelmiş olabileceğini belirtmişler ve Akdeniz hattındaki *B. b. spinosus* alttürünü genetik bakımdan doğrulamamıştır.

Erdoğan vd. (2002)'ın Antalya Yamansaz Gölü ve çevresini avifauna ve herpetofauna bakımından raporladıkları çalışmada yakalan tek bir birey *B. bufo* olarak değerlendirilmiştir. Olgun vd. (2003) Orta Toroslar civarında dağılım gösteren amfibi

türleri üzerine yaptıkları çalışmada Mersin ili içerisinde elde edilen örneği *B. bufo bufo* alt türü olarak rapor etmişlerdir. Kurtuluş vd. (2004) ise İzmir-Bozdağ civarında aynı türün varlığını bildirmiştir.

Özdemir (2005) ‘Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*)’nın Morfolojik ve Moleküler Açından İncelenmesi’ adlı doktora çalışmasında Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Mersin ve Adapazarı illerinden elde edilmiş örnekler arasında incelenen 20 morfolojik karakterlerden sadece burun delikleri – burun ucu mesafesinde bir farklılık olduğu sonucunu çıkarmıştır. Ayrıca, Türkiye örneklerinin İtalya örneklerine kıyasla daha sivri bir burun yapısına sahip olduğunu bulmuştur. Genetik açıdan ise 16S ribozomal RNA geni ile yapılmış filogenetik analizler sonucunda elde edilen 23 haplotipin maksimum 17 baz farklılığı oluşturduğunu söylemiştir. Haplotipler arasındaki gözlenen farklılık derecesinin (%0,11-%1,85) Pleistosen Dönemi içerisinde gerçekleşen farklılaşmadan kaynaklı oluştuğuna ve yaklaşık 1 milyon yıl önce meydana geldiği sonucuna ulaşmıştır.

Kutrup vd. (2006), siğilli kurbağaların filogenetik ilişkileri üzerine yaptıkları çalışmada 16 farklı popülasyona dahil olan toplam 29 bireyde 16S ribozomal RNA genine ait 936 bazlık kısmın DNA dizin analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma içerisinde Türkiye’den Artvin (Erenköy, Borçka), Rize (Fındıklı, Çamlıhemşin, Karasu, Gündoğdu), Trabzon (Araklı, Akçaabat, Yeşilova, Maçka), Mersin (Mezitli), Giresun ve Adapazarı illeri içerisinde elde edilmiş örnekler kullanılmıştır. Ek olarak, İtalya’nın Matera (Garaguso), Yunanistan’ın Metsova (Pindos Dağları) kentlerinden *B. b. bufo* olarak belirlenen örneklerin yanı sıra Sicilya (İtalya)’dan *B. b. spinosus* olarak tayin edilen örnekleride analizlere dahil etmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre toplam 23 haplotip bulunmuş ve bu haplotipler arasında ise maksimum 17 baz (%0,11-%1,85) farklılık olduğu görülmüştür. Siğilli kurbağalar için Türkiye’de gözlenen bu genetik çeşitlilik *B. bufo* için tür içi varyasyon olarak yorumlamış alttür durumlarını kabul edilmemiştir.

Litvinchuk vd. (2008), Kafkasya’daki siğilli kurbağaların taksonomik pozisyonlarını aydınlatmak amacıyla yaptığı çalışmada genom büyüklüğünden, 24 farklı allozim lokusundan ve morfolojik verilerden yararlanmıştır. Çalışma içerisine Gürcistan, Rusya, Avrupa karasının büyük bir kısmı ve Afrika’dan örneklenmiş bireyler dahil edilmiştir. Ülkemiz sınırlarında ise Alanya ve Abant’tan elde edilmiş

bireylerin değerlendirmesi yapılmıştır. Akış sitometrisi kullanılarak belirlenen genom büyüklüğü bakımından *B. verrucosissimus* türünün Kafkasya içerisindeki dağılımı belirlenmiş, çalışma içerisindeki coğrafik gruplar için en az genetik mesafenin ise Avrupa'daki *B. bufo* grubu ve *B. verrucosissimus* arasında olduğu not edilmiştir (Nei Genetik Mesafe: 0,138). Çalışmada allozim verilerine göre türler arasındaki diyagnostik lokus kıyaslaması bakımından en düşük sayı *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında tespit edilmiştir (2 lokus), yani paylaşılan ortak lokus sayısı oldukça fazladır. Bu durumun türlerin henüz soy oluş sürecini devam ettirmesinden kaynaklı olarak meydana gelebileceği vurgulanmıştır. Araştırmacılar ayrıca Anadolu coğrafyasının tamamında *B. verrucosissimus*'un dağılış gösterdiğini belirtmiş ve taksonu ayrı bir tür olarak değerlendirilmesini önermişlerdir.

Dönmez vd. (2009), siğilli kurbağaların kan parametreleri üzerine yaptıkları çalışmada Çanakale Gelibolu yöresinden elde edilen rnekleri *B. bufo* olarak değerlendirmişlerdir. Afşar ve Tok (2011) Sultan Dağları'nın herpetofaunası üzerine yaptıkları araştırmada Afyon-Dereçine civarında yaşayan siğilli kurbağaları *B. bufo* olarak tayin etmişlerdir. Afsar vd. (2012) alışmasında ise Artvin Camili Biyosfer Rezerv Alanı içerisinde yakalan bireyler *B. bufo* türüne dahil edilmiştir.

Iskanderov (2009), Azerbaycan sınırları içerisindeki *B. verrucosissimus* popülasyonlarının güncel durumlarını ele aldığı çalışmada, türün Azerbaycan dışında Kafkasya ve İran'ın kuzeybatısında yayılış gösterdiğini belirtmiştir.

Recuero vd. (2012), Batı Palearktık sınırları içerisinde *B. bufo* tür grubuna ait popülasyonlardan örneklenen 232 bireyi, 2 mitokondriyal ve 4 nükleer gene ait DNA dizilerinden oluşan kapsamlı bir moleküler veri seti kullanarak ele almışlardır. Türkiye'den ise 4 farklı lokaliteden (Samsun-Havza, Tokat-Erbaa, Karabük-Eflani ve Artvin-şavşat Karagöl) 6 rnek analizlere dahil edilmiştir. İnşa edilen tür ağaçları sonuçlarına göre *B. bufo* tür grubu içerisinde 4 farklı taksonun ayrı birer tür olduğuna karar verilmiştir (*B. bufo*, *B. verrucosissimus*, *B. spinosus*, *B. eichwaldi*). Mitokondriyal belirteçlere göre yapılan filogenetik analizler sonucunda Türkiye'den elde edilen Havza, Erbaa ve Eflani rnekleri *B. bufo*, Artvin rneği ise *B. verrucosissimus* türü içerisine dahil edilmiştir. Oluşturulan filogeni ağacında *B. verrucosissimus* türünü kapsayan ana klad içerisinde Kafkasya'nın kuzeyi (Rusya ve Gürcistan'nın kuzeyi) ve güneyi (Artvin ve Gürcistan'nın güneyi) olmak üzere iki alt

kladın varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan moleküler kalibrasyona dayalı olarak *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerinin 2,75 milyon yıl önce Pleistosen Dönemi içerisinde ortak atadan ayrıldıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar son olarak *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri için Türkiye'nin kuzeydoğusundaki coğrafi sınırları ve türler arasındaki potansiyel kontak zonun varlığı bakımından hala belirsizlik olduğunu vurgulamış ve çalışılması gerektiğini söylemişlerdir.

Garcia-Porta vd. (2012) ise *Bufo bufo* tür kompleksi olarak değerlendirdiği gruba ait olan 151 örneği, 2 farklı mitokondriyal gen ve 21 lokusa ait allozim verileri bakımından değerlendirmişlerdir. Çalışma içerisinde Türkiye'den 6 farklı lokalitenin örnekleme yapılmıştır (Ordu-Kayabaşı, Samsun-Bafra, Bolu-Abant, Bursa, Alanya, Trabzon-Anayurt). Yapılan filogenetik analizlere göre tür kompleksi Hazar Denizi Bölgesi, Avrupa, Kafkasya, İberya ve Afrika olmak üzere 5 ana dal altında kümelenmiştir. Türkiye'den elde edilen Alanya ve Bolu-Abant örneği Kafkasya dalında yer alırken diğer tüm örnekler ise Avrupa dalında yer almıştır. Araştırmacılar Litvinchuk vd. (2008)'in *B. eichwaldi* türü olarak tanımladığı Hazar ana dalı haricindeki diğer tüm ana dalların alttür seviyesinde değerlendirilmesi gerektiğini beyan etmişlerdir. Kafkasya anadalını oluşturan Kafkas coğrafyası ve Türkiye örnekleri mtDNA verileri bakımından *B. b. verrucosissimus* alttürü olarak değerlendirilmiştir, fakat allozim verileri yeterli bir farklılık oluşturmamış ve *B. b. spinosus* alttürü ile benzeşmiştir. Ayrıca Bolu'daki durumun hala belirsizliğini koruduğu vurgulayarak daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtilmiştir. Araştırmacılar *B. bufo bufo* olarak değerlendirdikleri Avrupa kladı ve *B. b. verrucosissimus* olarak değerlendirdikleri Kafkasya kladını kardeş gruplar olarak değerlendirmişlerdir. Kafkas kladı içerisinde Kafkas Dağları'nın kuzeyi, güneyi ve Merkez Anadolu olmak üzere üç alt kladın var olduğu ve bu grupların oluşmasında Pleistosen döneminde bu alanların sığınak görevi görmesi ve buzul faktörlerinin etkisi olduğunu düşünmüşlerdir.

Yukarıda bahsedilen iki çalışma sonucunda elde edilen bulguların farklılığı üzerine Arntzen vd. (2013a), Recuero vd. (2012)'nin makalesinde yer alan nükleer sekansları ve Litvinchuk vd. (2008)'tan temin ettiği 21 allozim lokusuna ait verileri yeniden analiz etmiş ve hibridizasyona dair ileri sürülen görüşleri popülasyonlardan ziyade bireyler üzerinden yorumlamayı amaçlamışlardır. Sonuç olarak *B. bufo* ile *B.*

eichwaldi'nin tür durumlarının kesin olduğu fakat *B. spinosus* ile *B. verrucosissimus*'un durumunun belirsizliğini koruduğu belirtilmiş ve aksi detaylı bilgilerle kanıtlanıncaya kadar Orlova ve Tuniyev (1989) tarafından tür olarak bildirilen *Bufo verrucosissimus* taksonunun tür durumunun korunması gerektiğini vurgulamışlardır. Çalışma sonucunda Recuero vd. (2012)'nin tür kabul ettiği taksonlar arasında enzimlere dayalı genetik mesafenin önceki çalışmalarda belirlenen mtDNA ve nükleer lokuslar için belirlenen yüksek seviyedeki farklılıkla uyumlu olduğunu söylemiştir. Hibridizasyonu yorumlamadan önce bu durumun alellerdeki atasal polimorfizme dayalı olarak meydana gelebileceği not edilmiştir. *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* taksonlarının bazı lokuslar üzerinden aynı nükleer DNA haplotiplerini paylaştıklarına rağmen ortaya çıkan durumun coğrafik örüntülere dayalı alel paylaşımını göstermediği belirtilerek, sonuçları hibridizasyondan ziyade tamamlanmamış soy farklılaşması (*incompleted lineage sorting*) olarak değerlendirmişlerdir. Tüm belirteçlere dayalı olarak (allozim, mtDNA, nDNA) Türkiye içerisinde batıdan doğuya mozaik bir dağılım olduğunu belirtmişler (*B. bufo*: Batı, Simpatrik: Bolu Abant, *B. verrucosissimus*: Doğu). Benzer bir çalışmada, Arntzen vd. (2013b) *B. bufo* ve *B. spinosus* türlerinin dağılım alanlarının kesiştiği Fransa'daki popülasyonları morfolojik ve moleküler verilerle incelediği çalışmasında türlerin morfolojik olarak ayrıldığını, mitokondriyal belirteçlerden elde edilen sonuçlara göre *B. bufo*'dan *B. spinosus*'a doğru Caen şehri civarından kısmi bir göç ve çakışmanın olduğunu gösterse de, açık bir hibridizasyonun var olmayışından dolayı (nükleer belirteçlere dayanarak) en bariz şekilde farklılaşmış türler olduğunu söylemişlerdir. Bu iki çalışmadaki en dikkat çekici ifadeler ise araştırmacıların ilerde tam tersi sonuçlara ulaşacağı *B. spinosus* ve *B. bufo*' nun kriptik tür olduğunu ve aralarında hibridizasyon gözlenmediği çıkarımıdır.

Solak (2013), Antalya-Boğazkent yöresindeki *Acrocephalus* cinsine ait kuş türlerinin göç karakteristiklerini incelediği tez çalışmasında araştırma alanı içerisinde *B. bufo* türünün görüldüğünü söylemiştir.

Tuniyev vd. (2014), ülkemizin doğusunda Trabzon'dan Bingöl'e, Van'dan Artvin'e kadar uzanan bir alanda, 1995-2012 yılları arasında gerçekleştirdiği gezilerle elde ettiği verileri değerlendirmiş, tür olarak betimlediği *B. verrucosissimus*'un Kaçkar Dağları'nın batısından başlayarak Artvin-Şavşat sınırları içerisinde son bulan bir

yayılışa sahip olduğunu işaret etmiştir.

Kumlutaş vd. (2015), Fethiye-Göcek (Muğla) özel çevre koruma bölgesinin herpetofaunal çeşitliliğini araştırdıkları çalışmada siğilli kurbağaların yalnızca İnlice civarında Anadolu Sağla Ağacı (*Liquidambar orientalis*) ormanı içerisinde mevcut olduğunu ve düşük popülasyon yoğunluğunun gözlemlendiğini kaydetmişlerdir.

Köseoğlu (2015), amonyum sülfatın siğilli kurbağa larvalarının gelişimi üzerindeki toksikolojik etkilerini araştırdığı yüksek lisans tez çalışmasında Rize ili Çamlıhemşin ilçesindeki Çat köyü civarında örneklediği bireyleri *B. bufo* olarak betimlemiştir.

Nalbantsoy vd. (2016), Türkiye'deki bufonid kara kurbağalarında deri ve parotid bezi salgılarının biyolojik aktivitesini incelemiş, bu salgıların antikanser ve antimikrobiyal etkileri olduğuna dair bulgulara erişmişlerdir. Çalışmada *B. bufo* olarak değerlendirilen örnekler Antalya ilinde Konyaaltı civarından, *B. verrucosissimus* olarak değerlendirilen örnekler ise Rize ilinde Fındıklı civarından toplanmıştır.

Yakar (2016), İzmir ilinde *B. bufo* popülasyonlarının çağrı davranışlarını incelediği çalışmada çalışmada siğilli kurbağalarda serbest bırakılma ve reklam çağrısı olmak üzere toplam 2 farklı çağrı tespit etmiştir. Bu çağrılardan serbest bırakılma çağrısında ise birbirinden farklı ses diyagram yapısı sergileyen 2 farklı çağrı açığa çıkarılmıştır. Araştırmacı, Gürcistan'dan elde edilen *Bufo verrucosissimus* türüne ait ses kayıtlarıyla yaptığı kıyaslama sonucunda serbest bırakılma çağrıları içerisinde yalnızca ikinci tipteki serbest bırakılma çağrısını belirleyebilmiştir. İzmir popülasyonlarına ait ikinci tip serbest bırakılma çağrılarının *Bufo verrucosissimus* türüne ait çağrılara kıyasla daha kısa bir periyoda sahip olduğu anlaşılmıştır. Diğer serbest bırakma çağrısı özellikleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmamış, üreme çağrısı bakımından ise bir kıyas yapılmamıştır. Ardı sıra gelen yıl içerisinde Yakar vd. (2017) Karabük ilindeki *B. bufo* bireylerini reklam ve serbest bırakma çağrıları bakımından incelemiş ve İzmir popülasyonlarında gözlemlendiği gibi iki farklı serbest bırakılma çağrısının var olduğunu tespit etmişlerdir. Kumlutaş vd. (2017)'ta Karabük ili herpetofaunasını belirledikleri çalışmada aynı türün varlığını doğrulamışlardır.

Tunç ve Yavuz (2017), Phaselis Antik Kenti ve Bey Dağları'nın civarının herpetofaunal çeşitliliğini incelediği çalışmada gözlemledikleri siğilli kurbağa bireylerini *B. bufo* türü olarak nitelendirmiş ve bu alandaki tarım arazileri ve meraları

uygun habitat alanları olarak tanımlamışlardır. Bahsedilen bu yöre Antalya ilinin batısına tekabül etmektedir.

Mermer (2018), Antalya Olimpos-Beydağları Milli Parkı çevresinde *B. bufo* türünün varlığını not etmişlerdir, fakat bu kayıtları destekleyecek genetik bir veri sunmamışlardır. Çalışma alanı Tunç ve Yavuz (2017) ile örtüşen bir bölgeyi kapsamıştır.

Arslan vd. (2018), Gediz Deltası içerisindeki herpetofaunayı oluşturan türlerin güncel durumu ve dağılımı üzerine gerçekleştirdikleri araştırmalarında *B. bufo* türünün Kuzey, Güney ve Batı Anadolu ile Trakya içerisinde dağılışı gösterdiğini belirtmiş, Gediz Deltası sınırlarında ise kuzeyden güneye doğru azalan bir popülasyon yoğunluğu olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca güneydeki popülasyonların taksonomik durumunun belirsiz olduğunu, bahsedilen grupların genetik olarak *Bufo bufo bufo* ve *B. b. verrucosissimus* alttürlerine daha yakın *B. b. spinosus* türüne daha uzak olduğunu öne sürmüşlerdir.

Afsar vd. (2018) Borçka Karagöl Tabiat Parkı ve çevresindeki kurbağa türlerinin listesini oluşturduğu çalışmada alan içerisinde yakalanan siğilli kurbağa bireylerini *B. verrucosissimus* türü içerisinde dahil etmişlerdir.

Dursun (2018), tez çalışması kapsamında içerisinde 25 farklı ilden örneklenmiş 193 bireye ait 31 morfolojik karakter verisini tür ekseninde sınıflandırarak çok değişkenli istatistiksel analizler gerçekleştirmiştir. Temel bileşenler analizi ve lojistik regresyon modeline dayalı olarak türler arasındaki başlıca farklılıkları parotid bezleri, iç metatarsal tüberkül, göz ve baş kısmı ile ilgili karakterler üzerinden açıklamıştır. Buna göre, *Bufo verrucosissimus* türünün *Bufo bufo* türüne kıyasla hem erkek bireyler hem de dişi bireyler bakımından daha büyük bir baş yapısına ve daha uzun iç metatarsal tüberküllere sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen lojistik modele göre ise farklılık oluşturan karakterler iç metatarsal tüberkülün boyu, boyutu ve gözler arasındaki mesafedir. *B. verrucosissimus* türünde daha ayırık bir göz yapısı olduğu not edilmiştir. Türler arasındaki yüksek morfolojik benzerliğin sebebi olarak ise *Bufo bufo* tür grubu içerisinde en yakın ortak atayı paylaşmaları ve Pleistosen Dönemi içerisinde farklılaşmaları öne sürülmüştür.

Beşir ve Gül (2019)'ün Rize ilinde yaşayan amfibi türlerine ait dağılışı haritalandırdığı çalışmada il içerisinde 10 farklı coğrafik noktadan elde edilen siğilli

kurbağaların *B. bufo* türüne ait olduğunu rapor edilmiştir.

Ergül-Kalaycı vd. (2019), farklı yükseltilerde yaşayan siğilli kurbağa popülasyonlarını yaş yapısı ve vücut büyüklüğü bakımından kıyasladığı çalışmasında Kastamonu, Yalova ve Trabzon'dan elde ettiği örnekleri *B. bufo* türü olarak değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda düşük rakımda yaşayan bireylerin daha büyük vücut boyutuna ve daha uzun yaşam süresine sahip olduğu kayda geçirilmiştir.

Jablonski ve Sadek (2019), 16S rRNA verilerine dayanarak *B. verrucosissimus* türünün Levant bölgesindeki ilk kaydını vermişlerdir. Bu çalışmada Levant bölgesindeki örneklerin ilginç bir şekilde Akdeniz Bölgesi'ne kıyasla Kafkasya örnekleri ile genetik olarak daha benzer, orjin merkezinin Kafkasya kolonizasyon yönünün ise güney olduğunu belirterek bahsedilen bu alanlarda genomik çalışmaların yapılması gerektiğini söylemişlerdir. Yani bu çalışma ile Recuero vd. (2012)'nin tür durumu ve dağılım sınırları üzerine verdiği önerileri desteklemişlerdir.

Özdemir vd. (2020), *B. bufo* tür grubunda ortaya çıkan ve özellikle de ülkemiz sınırları içerisinde yoğunlaşan taksonomik problemleri çözümlemek ve alandaki tartışmaları nihayete erdirmek için geniş kapsamlı ve integratif taksonomik yaklaşıma dayanan bir çalışmayı icra etmişlerdir. Bu bağlamda 25 farklı ilden örneklenmiş 193 bireyin 31 farklı morfometrik karaktere ait verileri kaydedilmiştir. Filogenetik analizler için her ilden 3'er birey olmak üzere toplam 74 bireyin 2 mitokondriyal ve 2 nükleer gen bölgesine ait DNA dizin analizleri yapılmıştır. Mitokondriyal verilere dayalı sonuçlar tür durumunu doğrulamış ve taksonlar minimum 18 mutasyonel adım ile ayrılmıştır. Bu genetik kümelerden *B. verrucosissimus* türünü temsil eden grupta ise Artvin, Hatay, Osmaniye, Mersin ve Antalya iline ait örnekler yer almıştır. Nükleer verilerin analizi ile elde edilen sonuçlar ise net bir ayrışım sağlamamış, fakat Artvin-Rize illerine ait örnekler ile Akdeniz Bölgesi-Isparta iline ait örnekler aynı haplogruplar içerisinde yer almışlardır. Yapılan morfolojik analizler sonucunda ise *Bufo verrucosissimus* türünün *Bufo bufo* türüne kıyasla hem erkek bireyler hemde dişi bireyler bakımından daha büyük bir baş yapısına ve daha uzun iç metatarsal tüberküllere sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *B. verrucosissimus* türüne ait soy hatlarının parotid bezi morfolojisi bakımından ayrıştığı ortaya konmuş Akdeniz Bölgesi soyu daha dışbükey, dar açılı ve büyük, Artvin soyu ise daha paralel ve dar parotid şekli ile karakterize edilmiştir. Araştırmacılar, tür grubuna ait belirsizliklerin

büyük ölçüde çözüldüğünü belirtse de çalışmadaki örneklemelerin il bazında tek lokaliteden yapıldığını ve lokal ölçekte sınırlı kaldığını not etmişlerdir. Ek olarak çalışmadaki sitonükleer uyumsuzlukların sekonder kontak zonların bulunabileceğini işaret ettiğini, mikrosatellitler veya SNP verileri kullanılarak hibridizasyon örüntülerinin mutlaka araştırılması gerektiğini eklemişlerdir.

Kurnaz (2020), Türkiye'deki amfibi ve sürüngen türleri için oluşturduğu tür listesinde *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerini Özdemir vd. (2020)'in referansıya ayrı iki tür olarak değerlendirmiş fakat dağılım sınırlarının hala tam olarak çözülemediğini not etmiştir.

Koç-Gür vd. (2020), Rize ili içerisinde amfibi ve sürüngenlerin yol ölümleri üzerine yaptıkları araştırmada Pazar-Başköy ve Hemşin-Hilalköy hattı arasındaki ana yol üzerinde 59 bireyin yol ölümünü kaydetmiş ve bu bireyleri *B. bufo* türü içerisinde sınıflandırmışlardır.

Üzüm vd. (2021), Trabzon, Bolu, Artvin, Alanya ve Osmaniye illerinden elde edilmiş örneklerin kafataslarını geometrik morfometri yöntemiyle ele almış, türler arasındaki şekilsel ve boyutsal varyasyonları açığa çıkarmaya çalışmışlardır. Elde edilen bulgular ışığında *B. verrucosissimus* türünün *B. bufo* türün göre daha küçük squamosuma sahip olduğu, *B. bufo* türünün ise göre daha kısa maksillaya fakat daha uzun oksipital bölgeye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca türlerin genel hatlar bakımından oldukça benzeştiği ve bahsedilen farklılıkların taksonomik seviyede belirgin bir ayırım yapmada yetersiz kaldığı söylenmiştir.

Yaşar vd. (2021), Türkiye amfibilerinin dağılımlarını ve biyocoğrafik karakteristiklerini inceledikleri çalışmada mevcut bütün türleri 50x50 km² boyutundaki kareleme sistemi ile haritalandırmışlardır. Oluşturulan haritalara göre *B. verrucosissimus* türü kuzeyde Artvin ili sınırlarında ve Rize ili için en doğu uçta tek bir kare alanı ile temsil edilmiştir. Güneydeki dağılım alanı ise Hatay-Alanya arasında haritalanmıştır. Karadeniz, Marmara, Ege ve Batı Akdeniz kuşağında ise *B. bufo* türünün yayılımı haritalandırılmıştır.

Karataş vd. (2021), Türkiye'nin omurgalı çeşitliliğini raporladıkları çalışmada *B. verrucosissimus* türünün sadece Karadeniz Bölgesi içerisinde yayılım gösterdiğini, *B. bufo* türünün ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu hariç bütün bölgeler içerisinde mevcut olduğunu öne sürmüşlerdir.

Yalçinkaya vd. (2022), Kahramanmaraş ilindeki amfibi ve sürüngen çeşitliliğini raporladıkları çalışmalarında bu il içerisinde *B. bufo* türünün dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir, fakat elde edilen kayıt saha gözlemi olarak değil Türkherptil sitesine koyulan bir resme atfedilerek eklenmiştir.

Dursun ve Özdemir (2022), Borçka Karagöl civarında yaşayan *B. verrucosissimus* popülasyonundaki morfolojik varyasyonu ve yaş parametrelerini ele aldıkları çalışmalarının sonucunda bu bölgede yaşayan bireylerin Kafkasya'daki temsilcilerine kıyasla daha küçük bir baş yapısına sahip olduklarını, vücut uzunluğu bakımından bir farklılık olmadığını fakat üyeler bakımından oransal olarak Kafkas popülasyonlarında daha büyük değerler gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Renk ve desenlenme bakımından ise benzer karakteristiklerin paylaşıldığı not edilmiştir. Çalışmada ayrıca morfolojiye dayalı olarak belirlenmiş dört alttürün varlığı reddedilmiş ve tür içerisinde genetik olarak üç ayrı soyun var olduğu görüşü desteklenmiştir.

Dursun vd. (2022), *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerini baş kısmında bulunan siğiller üzerindeki keratinleşmiş dikenlerin sıklığı bakımından karşılaştırmış ve yükseltinin bu yapıların sıklığı üzerine etkisini araştırmışlardır. Türkiye içerisinde 25 farklı ilden örneklenmiş 193 bireyden elde edilen verilere göre *B. bufo* türünün *B. verrucosissimus* türüne kıyasla daha fazla sayıda ve daha yoğun şekilde keratinleşmiş dikenlere sahip olduğu, *B. verrucosissimus* türünün genellikle az yoğunlukta dikenli siğiller ihtiva ettiği not edilmiştir. Ayrıca düşük rakımda yaşayan bireylerde lokal iklim şartlarına ve avcılara karşı savunma cevabına bağlı olarak daha yoğun şekilde keratinli siğillerin var olduğu gözlenmiştir. Çalışmaya dahil olan lokalitelerde dağılım gösteren türler ise Özdemir vd. (2020)'nin çalışmasına göre belirlenmiştir.

Gül vd. (2023), *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerinin Türkiye ve Kafkasya sınırları içerisindeki dağılım örüntüsü ve bu dağılımları şekillendiren çevresel değişkenleri ekolojik niş modellemeleri ile anlamaya çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre *B. verrucosissimus* türünün dağılımının yağış miktarı ve rejimi ile şekillendiği tespit edilmiştir. *B. bufo* türünün dağılımını ise sıcaklığın mevsimsel değişimlerine bağlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, *B. verrucosissimus* türü için uygun yaşam alanlarının Kafkasya ve Türkiye'nin kuzeydoğusunda, *B. bufo* türü için ise Anadolu ve Levant bölgesinde olduğu belirlenmiştir. Son olarak türlerin niş

tercihlerinin farklı olduğu, fakat dağılımların iklimsel etkenlerden ziyade coğrafik bariyerler ile şekillendiği not edilmiştir.

Literatür içerisinde *Bufo bufo* tür grubuna ait kontak zonlar ve gen akışına dair çalışmalar Fransa-İtalya hattı boyunca dağılım alanları kesişen *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri için sunulmuştur. Bu bağlamda tür grubunu temsilen iki takson arasındaki hibrit zon örüntülerini açıklayan çalışmalar konunun daha iyi özümsebilmesi için literatür özetine dahil edilmiştir. Dağılımları büyük ölçüde Fransa üzerinde kesişen bu iki tür daha önce Arntzen vd. (2013a,b) tarafından en net olarak ayrılabilir türler olarak ifade edilmiş ve hibridizasyonun var olmadığı söylenmiştir. Aynı araştırmacının içinde bulunduğu sonraki çalışmalar ise bu durumu tamamen tersine çevirmiştir.

İlk olarak Arntzen vd. (2016), mitokondriyal ve nükleer belirteçlerin (KASP-PZR tekniğine dayanan SNP verilerini elde ederek) yanı sıra 12 polimorfik mikrosatellit lokusu kullanarak, Fransa'nın kuzeybatısında *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki kontak zonu ve buradaki gen akışı örüntülerini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda 30 km'lik genişliğe sahip dar bir kontak zonu varlığı tespit edilmiştir. Bu zonu keşfedilmesiyle hibrit zon dinamiklerini çalışmak için önemli bir adım atıldığını söylemişlerdir ki ardı sıra gelen yıllar içerisindeki yayınlar bu öngörüü doğrulamıştır.

Trujillo vd. (2017), 14 farklı mikrosatellit lokusu kullanarak icra ettikleri çalışmada, her iki türün kendine özgü morfolojik, mitokondriyal ve nükleer DNA içeriğiyle ayırt olabileceğini, fakat Moyaux isimli şehrin türler arasındaki hibrit zonu merkezi olduğunu, gen alışverişinin açıkça gözlemlendiğini ve bunu engelleyici bir durumun var olmadığını ortaya koymuşlardır.

Arntzen vd. (2017), yukarıda belirtilen alanın ötesine geçerek, Fransa'nın güneydoğusu ve İtalya'nın kuzeybatısı olmak üzere Alp Dağları'nın iki yakasında var olan *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki etkileşim ve kontak zonlar üzerine mitokondriyal ve nükleer belirteçler kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda her iki hatta da bariz ve uyumlu nükleer genetik geçişler gözlemlendiğini mtDNA introgresyonlarının (geri çaprazlama) asimetri gösterdiğini ifade etmişlerdir. Çalışmada elde edilen mitokondriyal soy hatlarını yorumlayarak *B. bufo*'nun son buzul maksimumunda sığınaklarda sınırlandığını, *B. spinosus*'un İberya sığınağına yakın alanlardaki lokal *B. bufo* popülasyonlarının yerini aldığını, sonraki

dönemde Balkanlardan gelen *B. bufo* popülasyonlarının *B. spinosus* popülasyonlarını Alp dağlarının çatalının sağ ve sol yakası boyunca güneye doğru sürdüğünü ifade etmişlerdir.

Arntzen vd. (2018), Fransa kuzeydoğu yarısını *B. bufo*, güneybatı yarısını ise *B. spinosus* popülasyonları ile karakterize etmiş, Fransa'nın merkezinde ise mtDNA bakımından 10 km, 4 nükleer lokus bakımından ise 61 km genişliğinde bir hibrit zonun varlığını ortaya çıkarmıştır. Türlerin Avrupa boyunca sahip oldukları kontak zonların Fransa'da Atlantik kıyısındaki Caen şehrinden Akdeniz kıyısındaki İtalya'nın Savona şehrine kadar uzanan 900 kilometrelik bir hattın varlığına değinilerek hibrit zonların sahip olduğu coğrafik pozisyonların dağlar ve nehirler gibi çevresel faktörler ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir.

Arntzen (2019), 31 farklı diyagnostik SNP verisi ve 1 mitokondriyal belirteç ile elde ettiği sonuçlarla *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki tarihsel hibrit zonun Britanya'ya kadar uzandığını fakat daha sonrasında güneye doğru yer değiştiğini ve Britanya üzerinde *B. spinosus*'un dağılışının son bulduğunu belirtmişlerdir. Türlerin ortak atalarından Miyosen döneminde farklılaştığı, güncel kontak zonların ise Holosen içerisinde olduğu ifade edilmiştir. Bu zon İspanya ve Fransa'nın güneyindeki sığınaklardan (*refugia*) hareket eden *B. spinosus* ve Orta Balkanlar'daki sığınaklardan hareket eden *B. bufo*'nun dağılımlarını genişletmesi ile sekonder kontak olarak meydana gelmiştir.

Van Riemsdijk vd. (2019), kontak zonların hareketini değerlendirdiği çalışmalarında, Arntzen'in önceki çalışmalarından elde edilmiş DNA örneklerini kullanmıştır. Ağırlıkla hibrit zon içerisindeki lokaliteleri kapsayan örnekler haricinde, zonun merkezinden 500 km uzaklıktan örneklenmiş 8 saf *B. bufo* ve 12 saf *B. spinosus* örneği analizlere dahil edilmiştir. SNP verileri ile yapılan analizlerle tür durumlarını doğrulanmış, hibrit zon üzerindeki lokalitelerdeki gen akışı örüntüleri ortaya çıkarılmış, nükleer genomda *B. spinosus* alellerinin daha yüksek frekansa sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Önceki çalışmalarda ortaya çıkarılan bu hibrit zon tekrardan doğrulanmış, nükleer verilere dayanarak daha önce 30 km genişliğinde olduğu belirtilen zon 63 km olarak yenilenmiştir. Baskın gen akışının *B. spinosus*'dan *B. bufo*'ya doğru olduğu tespit edilmiş, nükleer belirteçler için gözlenen asimetrik introgresyon güney yönlü hibrit zon hareketini işaret etmiştir.

Arntzen vd. (2020a), 900 km’lik hibrit zon üzerinde gerçekleşen gen akışında çevresel faktörlerin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla 514 lokaliteden, 6584 bireyin SNP verileri ile genotiplemesi yapılmış, topografik, iklimsel ve arazi kullanımına ait değişkenler ile değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda sıcaklık ve yağış gibi etmenlerin türlere ait saf popülasyonların dağılımını belirlemede daha doğru bilgiler verdiğini, fakat hibrit zonlar için efektif olmadığını söylemişlerdir. Sıcaklık ve yağış bakımından saf türlerin sergilediği dağılım örüntüsünü *B. bufo* türü için soğuk ve nemli alanlar; *B. spinosus* türü sıcak, daha kurak ve ekstrem şartlara sahip olan alanlar olarak belirlemişlerdir.

Arntzen vd. (2020b), Alpler ve Apenin Dağları’ndaki siğilli kurbağaların morfolojik ve genetik farklılaşmasını araştırdıkları çalışmada 31 farklı diyagnostik nükleer SNP verisinden yararlanmış ve 56 popülasyonu analize tabi tutmuşlardır. Çalışma sonucunda, İtalya içerisinde *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zonun 24 km genişliğe eriştiğini, bu zonun Fransa içerisindeki zona kıyasla çok dar olduğunu açığa çıkarmışlardır. Morfolojik açıdan ise İtalya’daki *B. bufo* bireylerinin daha çok *B. spinosus* türüne benzediği gözlenmiş ve bu durumun örneklenen coğrafya içerisinde gerçekleşen konvergent adaptif morfolojik evrimden ötürü meydana geldiğini varsaymışlardır.

Dufresnes vd. (2020b), farklı kromozom sistemlerine dayalı olarak *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibridizasyon ve introgresyon örüntülerini incelemişlerdir. Bu kapsamda Fransa-İsviçre hattı arasında 67 lokaliteden 576 bireyin RADseq metodu ile genotiplemesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda Fransa’nın güneyinde asimetrik nükleer ve mitokondriyal geçişin olduğu 10 km genişliğinde bir zon tespit edilmiştir. Gözlenen introgresyon şemaları ise *B. spinosus* türünün tarihsel olarak *B. bufo* türüne ait eski dağılım alanı olan güney Fransa’ya doğru genişlediğini kanıtlamıştır. Çalışmada oluşturulan ekolojik niş modellemesi ise Anadolu’daki kuzey kıyıların tür için uygun dağılım alanı oluşturduğu, fakat güney kıyılara doğru gidildikçe uygun habitatların sınırlandığını göstermiştir.

Chiocchio vd. (2021), İtalya’daki siğilli kurbağa popülasyonlarının buzul dönemi şemalarını anlamak, genetik çeşitliliğin sıcak noktalarını belirlemek ve buzul dönemi bitişini takiben meydana gelen dispersal örüntülerini açıklamak için mikrosatellit belirteçlerden faydalanmışlardır. Çalışma sonucunda kuzey, güney ve

merkez olmak üzere *B. bufo* türüne ait üç soyun varlığı açığa çıkarılmış ve bu soyların son buzul devrinden önce sekonder kontaklar oluşturdukları belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca Fransa hattındaki Ligurian Alpleri içerisinde sınırlı bir alanda türün *B. spinosus* ile hibritleştiği bir bölgenin var olduğunu eklemiştir.

Van Riemsdijk vd. (2023), mevcut kontak zonu Fransa'nın kuzeybatı ve güneydoğu yakasında iki ayrı hat olarak ele almış ve incelemeye tabi tutmuşlardır. Bu çalışmada yeni nesil DNA dizileme metotlarından biri olan DNA-RADseq kullanılmış ve tam 1200 farklı belirteç yardımı ile türler arasındaki 900 km'lik hibrit zon boyunca gen akışındaki varyasyonlar test edilmiştir. Analizler sonucunda 26 tanesi ortak olmak üzere güneydoğu hattında 123, kuzeybatı hattında 56 bariyer lokusu tespit edilmiştir. Kuzeybatı hattında *B. spinosus*'tan *B. bufo*'ya doğru yüksek derecede gen akışı olduğu ve asimetrik introgresyon gözlemlendiği, diğer hatta ise durağan bir zona bağlı olarak simetrik bir gen akışı mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların ise *B. bufo* türünün kendi içindeki genetik varyasyonlardan kaynaklı olabileceği öngörülmüştür.

Yukarıda sunulan literatür özetinden anlaşıldığı üzere *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerini morfolojik, moleküler veya her iki veri tipini ele alan bütüncül çalışmalar, gerek geniş ölçekteki dağılış sınırları bakımından gerekse de muhtemel kontak alanlarını içeren daha dar kapsamlı ve lokal ölçekteki dağılış sınırları üzerine farklı yorumlar getirmiştir. Öte yandan, her ne kadar kontak zon mevcudiyetinin var olma ihtimalinden bahsedilse de *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında hibritleşme ve gen akışını ele alan bir çalışma yapılmamıştır.

B. bufo tür grubu içerisinde 9 milyon yıl öncesine dayanan farklılaşma tarihine sahip olan *B. spinosus* ve *B. bufo* türleri arasındaki sekonder kontak zonların açığa çıkarılması, Pleistosen Dönemi içerisinde farklılaştığı farz edilen *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasındaki kontak zonu araştırmak için cesaret verici bir dayanak oluşturmuştur. Daha erken dönemde ayrılan türlere ait kontak zonlarda gen akışı ve hibritleşme gözlenirken, tür grubu içerisinde en yakın farklılaşma tarihine sahip olan kardeş türler *B. bufo* ve *B. verrucosissimus*'un sekonder kontak zon oluşturması ve aralarında gen akışının gerçekleşmesi kuvvetle muhtemeldir. Özellikle çok erken dönemde ayrılmış yakın ilişkili veya kardeş türlerin tür oluş süreçlerini anlama da kontak zonların ele alınması elzemdir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

Tez çalışması kapsamında materyal olarak kullanılan organizmalar Bufonidae familyasına dahil olan ve *Bufo bufo* tür grubu içerisinde konumlandırılan *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) ve *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) türleridir. Bufonidae familyası (Gray, 1825) Anura takımı içerisinde en yüksek çeşitlilik ihtiva eden grup olup dünya üzerinde kozmopolit bir dağılışı sergiler. Günümüzde 53 cins ve 642 tür ile temsil edilmektedir (Amphibiaweb, 2023).

2.1.1. *Bufo bufo* Türüne Ait Genel Bilgiler

Vücut uzunluğu 15 cm'ye kadar erişebilmektedir. Cinsiyetler arasında bariz bir eşeysel boyut dimorfizmi mevcut olup, dişi bireyler daha büyüktür. Gözbebeği yatay, iris genelde altın veya bakır rengindedir. Deri bariz siğilli, renklenme genelde kahverengi-yeşil veya grimsi, nadiren kiremit kırmızısı tonundadır. Deri üzerinde siyah lekelenmeler gözlenebilir. Başın posterodorsal kısmı üzerinde konumlanan parotid bezleri genellikle hafif dışbükey konumludur (Şekil 16).



Şekil 16. Ardeşen ilçesinde örnekleme yapılan *B. bufo* türüne ait bir dişi birey (Fotoğraf: Cantekin Dursun, 2021)

Ekolojik toleransı yüksek olup, genelde nemli, seyrek vejetasyon ihtiva eden kayalık alanlar veya konifer-yaprak döken orman tabanları üzerinde yaşar. İnsanlara ait yerleşkelerde ve tarım alanlarında da görülebilir. Besin diyetini küçük omurgasızlar oluşturur. Üreme döneminde sulak alanlara doğru göç eder. Bahar döneminin ilk aylarında üremesini tamamlar. Üreme davranışı olarak aksillar tip amplexus gözlenir. Erkekler arasında eş bulma için rekabet vardır. Yaklaşık 7000 adet bırakılan yumurtalar çift zincirlidir ve bir jel kılıf içerisinde sucul bitkilerin, çalılarının veya kopmuş dalların üzerine sardırılır (Dursun, 2018).

Biyotop tercihi oldukça geniş olup deniz seviyesinden başlayarak 3000 metreye kadar erişen rakımlarda yaşayan karasal bir türdür. Avrupa'nın büyük bir kısmında dağılışı gösteren türün batı Sınırı Fransa'nın doğusunu kapsamaktadır. Doğu sınırı ise Rusya'daki Baykal Gölü'ne kadar erişmektedir. Britanya Adası ve Çin'de de türün dağılışı gösterdiğini öne süren çalışmalar mevcuttur. Ülkemizde ise Karadeniz, Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde yaşam sürmektedir, kuzeydoğuda Artvin-Rize, güneybatıda ise Antalya ve çevre illeri içerisindeki lokal dağılımı belirsizliğini korumaktadır (Özdemir vd., 2020). IUCN Kırmızı Listeye göre *B. bufo* düşük riskli (LC) kategorisinde değerlendirilmektedir. Türe ait sistematik bilgileri aşağıda sunulmuştur:

Alem	: Animalia
Şube	: Chordata
Altşube	: Vertebrata
Üst sınıf	: Tetrapoda
Sınıf	: Amphibia
Alt sınıf	: Lissamphibia
Takım	: Anura
Alttakım	: Neobatrachia
Aile	: Bufonidae
Cins	: <i>Bufo</i>
Tür	: <i>Bufo bufo</i> (Linnaeus, 1758)

2.1.2. *Bufo verrucosissimus* Türüne Ait Genel Bilgiler

Vücut uzunluğu 19 cm'ye kadar erişebilmektedir ve tür grubundaki diğer üyelere kıyasla daha büyük bir vücuda sahip olduğu rapor edilmiştir. Cinsiyetler arasında bariz bir eşeyssel boyut dimorfizmi mevcut olup, dişi bireyler daha büyüktür. Burun geniş ve kısa, kafa vücutla kaynaşık ve boyun bölgesi belirsizdir. Deri bariz ve büyük siğiller ihtiva eder. Parotidler belirgin, genelde en bakımından dar, paralel veya oldukça divergent konumludur. Gözbebeği elips şekilli, iris kırmızımsı kahve veya bakıra yakın tondadır. Renklenmede fazla çeşitlilik mevcut olup, genelde kiremit kırmızısı, yeşil veya yeşil-kahve tonları gözlenir. Parotid bezinin alt kısmına mevcut olan siyah bant bazen bütün, bazen de parçalı olabilir fakat boyu asla parotid bezini geçmez. Deri üzerinde siyah lekeler gözlenebilir (Şekil 17). Karın kısmında belli veya belirsiz desenlenme görülebilir (Dursun, 2018).



Şekil 17. Borçka ilçesinde örneklemesi yapılan *B. verrucosissimus* türüne ait bir erkek birey (Fotoğraf: Cantekin Dursun, 2019).

Besin diyeti ağırlıklı uçamayan küçük omurgasızlardan oluşur. Nemli alanlar ve dağ ormanlarında yaşamayı tercih ederler, açık alanlar veya dağ eteklerinde konumlanmış ovalarda pek görülmezler. Orman çizgisini terk etmezler. Üreme döneminde sulak alanlara göç ederler, genelde Nisan-Mayıs aylarında yumurta bırakır. Özellikle küçük nehirlerin yavaş akıntılı kısımları, dereler, orman içindeki küçük su birikintileri, göl veya göletleri kullanır. Bireyler arasında aksillar tip amplexus görülür. Çift zincirli ve jel kılıf içerisindeki kordonlar 10,000 kadar yumurta ihtiva eder (Sinsch vd., 2009).

Kafkas endemiği olarak tanımlanan türün dağılış alanının büyük kısmı Gürcistan sınırları içerisinde. Genel dağılışına bakıldığında ise Büyük ve Küçük Kafkas Dağları'nı takip ettiği görülüp, bu alanlar Rusya'nın güneybatısında Karadeniz kıyıları ve civarı ile Türkiye'nin kuzeydoğu hattını kapsamaktadır. Türün ayrıca Ermenistan ve Azerbaycan içerisindeki dağılışı da raporlanmıştır. Her ne kadar Kafkasya endemiği olarak ifade edilse de yapılan güncel moleküler çalışmalar türün Türkiye içerisinde Akdeniz bölgesinde ve ayrıca Lübnan'da dağılış gösterdiğini ortaya koymuştur (Jablonski ve Sadek, 2019). Öte yandan bu taksonun Türkiye'nin kuzeydoğusunda Artvin-Rize, güneybatısında ise Antalya ve çevre illeri içerisindeki lokal dağılımı belirsizliğini korumaktadır (Özdemir vd., 2020). IUCN Kırmızı Listeye göre *B. verrucosissimus* türü tehdide yakın (NT) kategorisinde değerlendirilmektedir. Türe ait sistematik bilgileri aşağıda sunulmuştur:

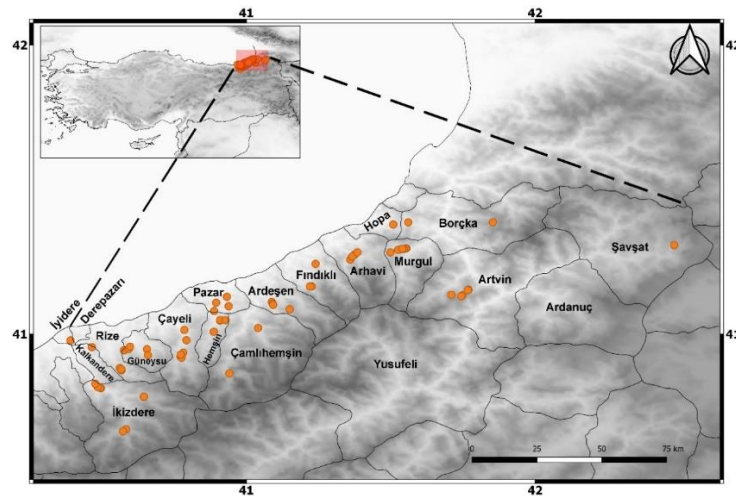
Alem	: Animalia
Şube	: Chordata
Altşube	: Vertebrata
Üstsınıf	: Tetrapoda
Sınıf	: Amphibia
Altsınıf	: Lissamphibia
Takım	: Anura
Alttakım	: Neobatrachia
Aile	: Bufonidae
Cins	: <i>Bufo</i>
Tür	: <i>Bufo verrucosissimus</i> (Pallas, 1814)

2.2. Metot

Bu tez çalışmasında, literatür özetinde sunulmuş olan *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zon çalışmaları göz önüne alınarak metodoloji oluşturulmuştur. Bu bağlamda, metot kısmı arazi çalışmaları, mitokondriyal DNA analizi, mikrosatellit DNA analizi ve morfolojik analizler olmak üzere dört ana başlıktan oluşmaktadır.

2.2.1. Arazi Çalışması

Literatür bilgilerine dayanarak Rize ve Artvin illerinin Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*) ve Kafkas Siğilli Kurbağası (*Bufo verrucosissimus*) türlerinin dağılım sınırları içerisinde dahil olduğu bilinmektedir, fakat tür dağılımlarının lokal olarak nerede kesiştiği veya bu iki farklı türün simpatrik olarak yaşadıkları alanlar bilinmemektedir. Bahsedilen dağılım göz önüne alınarak arazi çalışmaları bu iki ilin tamamını kapsayacak şekilde planlanmıştır. Arazi çalışmaları için Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından yerel etik kurul onayı (2019/06) ve T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü'nden örnekleme izni alınmıştır (Sayı: 67852565-140.03.03-E.2256731). Arazi çalışmaları Nisan 2020 ve Mayıs 2021 tarihleri arasında tamamlanmıştır. Arazi çalışmalarında mevcut literatürde coğrafi kayıt verilen alanlara ek olarak, çoğunlukla tarafımızca ziyaret edilen yeni alanlardan örnekleme yapılmış ve türlere ait yeni coğrafik kayıt noktaları oluşturulmuştur (Şekil 18).



Şekil 18. Tez çalışması kapsamında *Bufo* cinsine ait örnekleme ve gözlemlerin yapıldığı noktaları temsil eden cins oluş haritası

Arazi çalışması sonucunda, Artvin ve Rize illerinde toplam 16 ilçeden örnek temin edilmiştir (Artvin: Şavşat, Borçka, Murgul, Merkez, Arhavi; Rize: Fındıklı, Ardeşen, Pazar, Hemşin, Çamlıhemşin, Çayeli, Merkez, Güneysu, İyidere, İkizdere, Kalkandere). Arazi çalışması yapılan lokalitelere ait coğrafi veriler ve örneklem sayıları Tablo 1’de sunulmuştur. Popülasyonlara ait coğrafi koordinat bilgileri *geosphere* (Hijmans, 2022) paketi yardımıyla doğrusallaştırılmıştır.

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan alanlara ait coğrafi bilgiler ve genotiplenen birey sayısı

İl	İlçe-Lokasyon	Kod	Enlem	Boylam	Uzaklık	N (mtDNA)	N (nDNA)
Rize	İyidere, Kalecik Köyü	KAL	40,977265	40,391197	0 km	2	11
Rize	Kalkandere, Cevizlik Köyü	CEV	40,940342	40,461885	6 km	3	11
Rize	İkizdere, Ballıköy Yolu	IKZ	40,662801	40,573095	9 km	3	9
Rize	Karasu, Güzeyurt Mah.	ALI	40,882399	40,561415	15 km	3	10
Rize	Güneysu, Ballıdere Köyü	GUN1	40,955632	40,597200	21 km	3	10
Rize	Güneysu, Başköy	GUN2	40,926408	40,659281	26 km	2	3
Rize	Çayeli, Kaptanpaşa Yolu	SEN	40,977914	40,792446	42 km	3	10
Rize	Çamlıhemşin, Çat Köyü	CAT	40,863810	40,935220	53 km	3	11
Rize	Pazar, Suçatı (Başköy)	SUC	41,079027	40,888264	55 km	3	6
Rize	Hemşin, Hemşin Şelalesi	HEM	41,045670	40,908900	56 km	3	11
Rize	Pazar, Akbucak Köyü	PAZ	41,095719	40,938826	61 km	3	10
Rize	Çamlıhemşin, Kaplıca Mah.	KAP	41,020292	41,040828	69 km	3	10
Rize	Ardeşen, Yukarıdurak Köyü	ARD	41,110750	41,087906	77 km	4	11
Rize	Fındıklı, Yaylacılar Köyü	YAY	41,183889	41,198333	90 km	3	10
Rize	Fındıklı, Beydere Köyü	FIN	41,242491	41,239790	96 km	3	3
Artvin	Arhavi, Ortacalar Bucağı	ORT	41,282146	41,384842	113 km	3	10
Artvin	Hopa, Yoldere	HOP	41,391390	41,471040	125 km	1	2
Artvin	Murgul, Başköy	MUR	41,281769	41,499082	125 km	3	10
Artvin	Borçka, Çifteköprü Köyü	CFT	41,385898	41,560632	134 km	3	10
Artvin	Merkez, Kafkasör Hatila Yolu	AKH	41,146371	41,769031	146 km	3	10
Artvin	Borçka, Borçka Karagöl	BOR	41,387000	41,853000	165 km	3	12
Artvin	Şavşat, Meşeli Karagöl	MES	41,307000	42,481771	228 km	5	11

Genetik analizlerde kullanmak üzere ergin veya yol ölümüne maruz kalmış bireylerden “*Toe-clipping*” yöntemiyle parmak ucu ve ayrıca larvaların da kuyruk ucu kesilerek doku örnekleri elde edilmiştir. Ayrıca ergin bireylerde kesilen parmakta oluşabilecek bir enfeksiyona karşı Bactine adlı antiseptik sprey kullanılmıştır (Martin ve Hong, 1991; Phillott vd., 2010). Morfolojik çalışmalar için *Bufo* cinsinin dağılım gösterdiği belirlenen ilçelerde bulunabilen ergin bireylerden 27 farklı morfolojik karaktere ait ölçümler alınmıştır. Yakalan ergin bireyler olduğu yerde doğaya geri bırakıldığından üreyen popülasyonlar üzerinde invaziv bir etki yaratılmamıştır.

2.2.2. Mitokondriyal DNA Analizleri

2.2.2.1. Mitokondriyal Sitokrom b Geninin PZR Yardımı ile Çoğaltılması

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan her bir ilçeyi ve iki türün Artvin ve Rize'deki mevcut dağılımını temsil eden toplam 59 bireyin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA eldesi için toplanan doku örneklerinden, Macharey-Nagel NucleoSpin Tissue Kit DNA kiti kullanılarak total genomik DNA izole edilmiştir. Bu adımlar üreticinin sağladığı protokol takip edilerek yapılmıştır. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı etidyum bromür ile boyanmış %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve Nanodrop spektrofotometrede (Thermo Scientific) görüntülenerek miktarı belirlenmiştir.

Tür dağılımlarının moleküler belirteçlere dayalı olarak belirlenmesi amacıyla, mitokondriyal Sitokrom b (cyt b) gen bölgesinin çoğaltılması tercih edilmiştir. Bu gen bölgesi 16S rRNA gibi korunmuş olan gen bölgelerine kıyasla daha yüksek dizi çeşitliliği göstermektedir (Branicki vd., 2003; van den Burg vd., 2020; Chan vd., 2022). Ayrıca önceki çalışmalarda 16S rRNA ve cyt b gen bölgelerinin türleri ayırmada duyarlı oldukları belirtilmiş, fakat cyt b geninin daha fazla haplotip oluşturduğu gözlenmiştir. Gen bölgesinin PZR Yardımı ile çoğaltılmasında Recuero vd. (2012)'nin Cyt Bufo F (5'-ATCTACCTTCACATCGGACGAG-3') ve Cyt Bufo R (5'-AGTTTTRTTTCTGTGAGTCC-3') primerleri kullanılmıştır.

Cyt b geni için reaksiyon karışımı ve PZR şartları: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; %0,1 Triton X-100; 0,4 mM oligonükleotid; 2,5 mM MgCl₂; 0,5 U/100 µl Taq DNA polimeraz ve 0,1µM her bir primerden oluşmaktadır. PZR reaksiyonu ise 96°C'de 2 dakika denatürasyon; 52°C'de 45 saniye bağlanma; 72°C'de 2 dakika uzatma; 38 döngü ve 72°C'de 5 dakika son uzatma şeklindedir (Goebel vd., 1999; Stöck vd., 2006).

PZR reaksiyonları 50 µL son hacim olacak şekilde BioRad T100 cihazı kullanarak yapılmıştır. Mitokondriyal DNA dizin (sekans) analizleri MacroGen Europe (The Netherlands) şirketinde hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2. Filogenetik ve Demografik Analizler

Filogenetik ve demografik analizlerin girdi dosyalarını oluşturabilmek için “.abi” formatlı kromatogramlar gözle kontrol edilerek okumaların doğruluğu teyit edilmiş ve ham veride meydana gelebilecek makine kaynaklı hatalar minimize edilmiştir. Ardından ileri ve geri primerlerle okuması yapılan *forward* ve *reverse* dizileri NCBI blastn suite modülü kullanılarak karşılaştırılmıştır (Zhang vd., 2000). Kesişen diziler belirlendikten sonra “.txt” formatlı dizin dosyaları üzerinden gerekli düzenlemeler yapılarak her bir birey için en ortak diziler oluşturulmuştur. Bu işlemlerden sonra her bir bireye ait diziler GenBank içerisinde mevcut olan örnekler ile karşılaştırılıp çapraz kontrolü yapılmıştır. Doğrulaması yapılan diziler fasta formatında kaydedilerek tek bir dosya içerisinde birleştirilmiştir. Ayrıca, her bir bireye ait nükleotid dizileri GenBank içerisine yüklenmiş ve erişim numaraları alınmıştır.

İkinci adım olarak, her bir bireye ait DNA dizilerinin BioEdit v7.2.5 (Hall, 2011) içinde bütünleşik olan ClustalW modülü aracılığıyla hizalaması yapılmış, başlangıç ve sondaki fazla nükleotidler kesilmiştir. Oluşturulan dosya fasta formatında kaydedilmiştir. Ayrıca, bu formattaki diziler SequenceMatrix v1.8 (Vaidya vd., 2011) programı ile nexus formatına da çevrilerek farklı programlar için gereken girdi dosyası oluşturulmuştur.

Mitokondriyal Sitokrom b genine ait haplotipleri belirlemek ve haplotiplerin temsil ettiği türlere ait genetik verinin açıklayıcı istatistiklerini hesaplamak için DnaSP v6.0 (Rozas vd., 2017) programı kullanılmıştır. Oluşturulan haplotipler arasındaki ikili genetik mesafeler ise *uncorrected p-distance* metodu kullanılarak MEGA X (Kumar vd., 2018) programı içerisinde yapılmıştır. Genetik mesafeler gamma dağılımına göre modellenen baz dizileri arasındaki varyasyon üzerinden hesaplanmıştır. Haplotipler arasındaki nükleotid dizisi farklılıklarını referans alan simetrik uzaklık matrisine ait ısı haritası R programlama dili içerisinde Toparslan vd. (2020)’nin yayınlamış olduğu kod bloğu kullanılarak görselleştirilmiştir. Son olarak haplotiplere ait şebeke grafiği medyan birleştirme ağı (*median-joining*) metodu kullanılarak ve epsilon = 0 ataması yapılarak PopArt v1.7 (Leigh ve Bryant, 2015) programı içerisinde görselleştirilmiştir.

Belirlenen haplotiplerin filogenetik analizleri için Bayes çıkarımı ve maksimum olasılık metodları çalıştırılmıştır. Bayes Çıkarımı MrBayes v.3.1.2 (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) programı ile gerçekleştirilmiştir. En uygun evrimsel

değişim modeli MrModeltest v.2.4 (Nylander, 2004) programı içerisinde Akaike Bilgi Kriteri (Akaike, 1981) algoritmasına dayalı olarak belirlenmiştir. Bayes analizi beş tekrarlı 1×10^6 jenerasyon (1 soğuk ve 3 sıcak zincir) şeklinde yürütülmüş ve her 1000 jenerasyonda bir örnekleme yapılmıştır. Analiz, standart hata frekansı 0,01 altına indiğinde sonlandırılmıştır. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metodu kullanılarak ağaç topolojilerinin son dağılımı meydana getirilmiş ve ardından oluşturulan ağaçların %25'i yakma işlemine tabi tutularak %50 çoğunluk kuralı konsensus (*majority-rule consensus*) ağacı elde edilmiştir. Analiz parametrelerinin doğruluğu ise Tracer v.1.7 (Rambaut vd., 2018) programı ile kontrol edilmiştir. Maksimum olasılık analizi ise RaxML v8.0 (Stamatakis, 2014) programı içerisinde inşa edilmiş ve 1000 tekerrürlü seç-bağla (*bootstrap*) testi uygulanarak istatistiki güvenilirliği artırılmıştır. Elde edilen ağaçlar FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2012) programı içerisinde görselleştirilmiştir.

Son adım olarak Artvin ve Rize illerinde yaşayan her iki türün kümülatif popülasyonları ile geçmiş dinamikleri araştırmak, mevcut ve tarihi coğrafi dağılım örüntüleri ile ilgili bilgileri çıkarmak için demografik analizler yapılmıştır. Popülasyon bölünmesi, popülasyonlardaki genişlemenin etkisini maskeleyebileceğinden (Galbreath vd., 2009; Lou vd., 2018), analizler her tür için belirlenen mitokondriyal haplotipleri içerecek şekilde ayrı ayrı yapılmıştır. İlk olarak, uyumsuzluk dağılımı (*mismatch distribution*), Tajima'nın *D* (Tajima, 1989) ve Fu'nun *F_s* (Fu, 1997) testleri, popülasyon genişleme hipotezini test etmek için kullanılmıştır. Türlerdeki boyut değişikliklerinin geçmiş dinamikleri, BEAST2 programı (Bouckaert vd., 2019) içerisinde *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) modülü kullanılarak tahmin edilmiştir. Bunun için MCMC zincirleri 30 milyon nesil boyunca çalıştırılmış ve her 5000 adımda bir örnekleme yapılmıştır. Nükleotid başına ortalama baz değişim oranı Recuero vd. (2012)'nin refereansıyla bir milyon yıl için 0,0069 olarak sabitlenmiştir. Evrimsel değişim modeli parametreleri, bModelTest ile otomatik olarak seçilmiştir (Bouckaert ve Drummond, 2017). Nihai sonuçlar, R programlama dili içerisinde “*plotEBSP*” komutu yardımıyla ve %10 yakma ile görselleştirilmiştir.

2.2.3. Mikrosatellit DNA Analizleri

2.2.3.1. Mikrosatellit Fragmentlerinin Eldesi

Mikrosatellit çalışmalarının ilk adımı olarak fragmentlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için, Brede vd. (2001) ve Trujillo vd. (2017)'nin çalışmalarında *Bufo bufo* tür grubu içerisine dahil olan *Bufo spinosus* türü için sentezlenmiş 18 adet primerin ve Madrid Ulusal Doğa Bilimleri Müzesi (*Museo Nacional de Ciencias Naturales*- MNCN) Zooloji Araştırma Laboratuvarı'nda mevcut 2 adet primerin hedef organizmalarla uygunluğu test edilmiştir (Tablo 2).

Seçilen primerler her biri farklı popülasyonu temsil eden 10 birey için (IKZ02, CEV02, GUN05, ALI01, SEN02, ARD02, ORT02, CFT02, AKH03, MES02) PZR yardımıyla çoğaltılmıştır.

Başlangıç testleri için Trujillo vd. (2017)'nin çalışmasındaki PZR şartları referans alınmıştır. Bu şartlara göre reaksiyon tüpleri 5×GoTaq Flexi buffer PROMEGA; 3 mM MgCl₂; 0,3 mM dNTP; 0,3 µM her bir primer; 0,5 U GoTaq Flexi DNA polymerase PROMEGA ve 1 µl of DNA içerecek şekilde toplam 15 µl son hacimle optimize edilmiştir. PZR için kullanılan protokol; 95 C°'de 5 dakika ön inkübasyon, 30 döngü olacak şekilde 95 C°'de 30 saniye, 60 C°'de 45 saniye, 72 C°'de 45 saniye ve son olarak 72 C°'de 10 dakika inkübe edilerek reaksiyon tamamlanmıştır. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kalitatif kontrolleri yapılmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda *B. spinosus* türü için referans edilen primerler *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* örnekleri içinde başarılı bir şekilde çalışmıştır.

İkinci aşamada ise miktarı ve kalitesi kontrol edilmiş olan genomik DNA'ların mikrosatellit bölgelerinin çoğaltımı, doğruluğu onaylanmış primerler kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle yapılmıştır. Mikrosatellit primerlerinin ileri yönlüleri, ürün boyu ve tutunma sıcaklığına bağlı olarak belirlenen floresan boya ile işaretli olarak kullanılmıştır. Multipleks PZR çalışmaları 96 kuyuya sahip plakalar ile yapılmıştır.

Tablo 2. Tez çalışması kapsamında denemesi yapılan mikrosatellit lokuslarına ait açıklayıcı bilgiler (Tm: Erime sıcaklığı)

Lokus	Motif	Primer Dizisi (5'-3')	Tm	Referans
<i>Bbufμ13</i>	(CA) ₁₄	F: AGCCTACATTGCTCAATCCGATAC R: GTGGCGTGGAGGGTCATAAAATC	52 °C	Brede vd., 2001
<i>Bbufμ49</i>	(GT) ₂₉	F: GATCTGGGCAGTGTGGATTG R: ATTCCGTCTGCTAAATGTCTCTTG	52 °C	Brede vd., 2001
<i>Bbufμ11</i>	(CA) ₁₉	F: GTCACATGGATAATAAATGAGACC R: TCTAATATTGATGACCAGACAACC	44 °C	Brede vd., 2001
<i>Bbufμ47</i>	(CA) ₁₈	F: GGATCAAGCCCTCAGACAACTC R: CACAGCAGCAGAAATTTGACCAG	53 °C	Brede vd., 2001
<i>Bspi3.11</i>	CTT	F: TTTCCTGCCTTCTTGTAACGTTG R: CTCACGTGTCAGCAATGTATGACC	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.24</i>	GATA	F: AAATTTGGGAGCAATCCTGTAGG R: GTCACAACGTCTCTGTTACCTTG	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi3.20</i>	ACA	F: CCTCAGCAAATATAAGCCCATGG R: TTGCATCAGAAACAACTTCCTG	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.25</i>	CTAT	F: ATTGTGTTGTGGATGGAAC TAGC R: TAGAGAGAGCTGAAATGTTGCTG	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.16</i>	GATA	F: AGGGCTACATATCCTCTT CAGTG R: CTAAACTGAGAAGATGGCAACCC	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.30</i>	TCTA	F: CACAGCCCTTTACAATCTATCCG R: ACAAACAGGCAGACAAATATCAG	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.27</i>	GATA	F: GAGACACGTAATCCAGACTTTCC R: TTAGGACTTGTGTGACATCTGAG	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.28</i>	CTAT	F: GGCATGGGTGAATAAAGAAGTCC R: AAACCTAGCTCACCTGGTCAGC	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.29</i>	TAGA	F: CCCTTCTATGTTCACCTCTGTAC R: ACAGTGCCATATCTTCAGTGTTG	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi3.02</i>	GGT	F: GGATTAGGGCATAGACAACTGAC R: CCGTCACAGAGAAATCAAAGGG	58 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi3.19</i>	ACT	F: CCGCTACCATTACAAC TACACAG R: TTGTCAGAAGAAAGAGTGATCGC	58 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi3.26</i>	AGT	F: GAAAGTCCCATGTCTCGTTATGC R: GTTGCTCTCTTCACTCAGATG	58 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.14</i>	GATA	F: ATGAGTCTGCTAGGAATTGTCTC R: CTGTAGCAATCATCTTCTCCTGC	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi4.05</i>	AGAT	F: TGATCTCAGGTCCTTTAATG R: CAAAGTACCTCTGCAGCTAATGG	60 °C	MNCN
<i>Bspi4.07</i>	AGAT	F: ACCCACCTCACGTTAATTATTGC R: ATCTTCAATTCCATAGCTGCACC	60 °C	Trujillo vd., 2017
<i>Bspi3.23</i>	AAT	F: ATGCCCTGGTACATATCATAGG R: TGTACAGCGCTATGGAATGAATG	60 °C	MNCN

Yapılan denemelerde, daha önceden genomik DNA'sı elde edilmiş 30 birey rastgele olarak seçilmiştir (Tablo 3). Pozitif kontrol olarak müzede mevcut olan bir *B. spinosus* örneğine ait DNA kullanılmıştır. Negatif kontrol için ise plaka içerisindeki bir kuyu DNA örneği içermeyecek şekilde hazırlanmıştır.

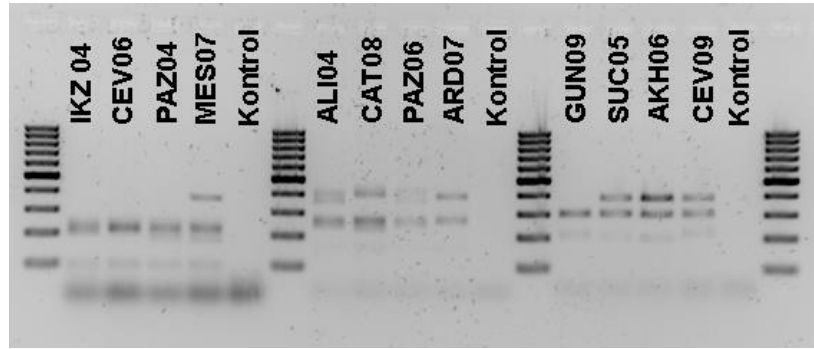
Bir plaka üçe bölünerek (3 farklı multipleks reaksiyonu içerecek şekilde) aynı örneklerin eş zamanlı olarak çoğaltılması hedeflenmiştir. Multipleks reaksiyonlar Type-it Microsatellite PZR (Qiagen) kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Buna göre her bir örnek için 7,5 µl Master Mix, 1,2 µl Primer Mix ve 5,3 µl RNaz içermeyen saf su olacak şekilde 15 µl son hacimli karışım hazırlanmıştır. PZR için kullanılan protokol;

95 C°'de 5 dakika ön inkübasyon, 30 döngü olacak şekilde 95 C°'de 30 saniye, 60 C°'de 90 saniye, 72 C°'de 30 saniye ve son olarak 60 C°'de 30 dakika son uzama şeklinde inkübe edilerek tamamlanmıştır. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kalitatif kontrolü yapılmıştır.

Tablo 3. Multipleks PZR gruplarını belirlemek için seçilen örnekler ve plaka üzerindeki temsili sıraları

	1	2	3	4
A	IKZ04	KAL11	KAP06	ORT05
B	IKZ05	CEV06	KAP08	ORT06
C	ALI07	HEM11	PAZ04	MES08
D	KAL04	Kontrol (+)	Kontrol (-)	MES07
E	CEV9	HEM07	SUC05	ARD07
F	GUN09	CAT07	PAZ06	ARD08
G	GUN10	CAT08	MUR05	AKH05
H	ALI04	SUC06	MUR09	AKH06

Jel görüntülemesi sonucunda lokusların her bir multipleks grupta başarılı olarak çoğaltıldığı ve polimorfik örüntü gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 19). Diğer yandan, gruplar birden fazla primer içerdiğinden dolayı nihai kararı vermek üzere PZR örnekleri fragment analizi için SECUGEN (Madrid, İspanya) firmasına gönderilmiştir.



Şekil 19. Multipleks PZR dizaynını ve gruplar içerisindeki polimorfik örüntüyü temsil eden jel görüntüsü

Fragment analizi sonuçlarına göre denemesi yapılan 20 lokustan 6 tanesinin her iki tür içinde monomorfik olduğu tespit edilmiştir. Kalan 14 lokusu çoğaltmak için yeni multipleks gruplar tasarlanmıştır. Bu tasarım için Multiplex Manager v1.0 programı kullanılmıştır (Holleley ve Geerts, 2009). Primerlere ait bilgiler programa girilerek 1 milyon tekerrürlü olasılık hesabı yapılmıştır. Tasarlanmış yeni gruplar Tablo 4'te sunulmuştur. Final grupları belirlendikten sonra toplam 201 örnek için 14 lokus çoğaltılmış ve fragment analizine tabi tutulmuştur.

Tablo 4. Multipleks PZR için belirlenen final grupları ve belirteçlere ait bilgiler (AS: Toplam alel sayısı; H_O: Gözlenen heterozigotluk; H_E: Beklenen heterozigotluk)

Belirteç	Grup	Boya	Renk	Büyüklik	AS	H _O	H _E
<i>Bbufu47</i>	M1	6-FAM	Mavi	130-148 bç	12	0,72	0,80
<i>Bspi3.23</i>	M1	VIC	Yeşil	143-152 bç	5	0,54	0,58
<i>Bspi4.14</i>	M1	VIC	Yeşil	324-492 bç	40	0,95	0,95
<i>Bbufu13</i>	M1	NED	Sarı	146-156 bç	5	0,21	0,20
<i>Bspi4.28</i>	M1	PET	Kırmızı	179-223 bç	17	0,83	0,90
<i>Bbufu49</i>	M2	6-FAM	Mavi	208-230 bç	12	0,73	0,85
<i>Bspi4.29</i>	M2	VIC	Yeşil	192-216 bç	7	0,74	0,80
<i>Bspi3.02</i>	M2	NED	Sarı	288-297 bç	5	0,28	0,33
<i>Bspi4.27</i>	M2	PET	Kırmızı	220-276 bç	20	0,84	0,91
<i>Bspi4.05</i>	M2	PET	Kırmızı	382-402 bç	8	0,48	0,73
<i>Bspi3.11</i>	M3	6-FAM	Mavi	258-261 bç	2	0,18	0,26
<i>Bspi4.24</i>	M3	VIC	Yeşil	234-270 bç	10	0,74	0,84
<i>Bspi4.07</i>	M3	NED	Sarı	347-419 bç	29	0,90	0,93
<i>Bbufu11</i>	M3	PET	Kırmızı	99-129 bç	16	0,78	0,84

2.2.3.2. Mikrosatellit Verilerinin İşlenmesi

Tez çalışması kapsamında 22 farklı popülasyona ait toplam 201 örneğin 14 mikrosatellit lokusuna ait genotipleri değerlendirilmiştir. Her bir lokusa ait veri ABI 3730 otomatik cihazları ile analiz edilmiştir. Her bir birey ve lokus için alel büyüklükleri ve frekansları GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems) programı ile belirlenmiştir.

2.2.3.3. Temel Popülasyon Genetiği Analizleri

Tez çalışması kapsamında, toplam 22 lokaliteden elde edilen 201 *Bufo* örneğinin 14 lokusuna ait genotip verileri analiz edilmiştir. İlk olarak her bir popülasyondaki boş aleller, skorlama hataları ve alel düşmesi durumlarının var olup olmadığı Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout vd., 2004) programı kullanılarak kontrol edilmiştir. Popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığını ve lokuslar arasındaki bağlantı dengesizliğini belirlemek için veri seti *genepop* (Rousset, 2008) paketi kullanılmıştır. Veri 10,000 ezberlemeye ayarlı şekilde 1000 yığma yapılarak ve her bir yığmada 10,000 tekrür kullanarak test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tekrarlı Bonferroni düzeltmesi ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Popülasyonlara ait temel genetik çeşitlilik indeksleri ve ikili karşılaştırmalar için *diveRsity* (Keenan vd., 2013), *hierfstat* (Goudet ve Jombart, 2022) ve *poppr* (Kamvar vd., 2014) paketleri kullanılmıştır. Ayrıca popülasyonlar kümeleme analizi yapılarak

genetik uzaklıklarına göre gruplandırılmış ve UPGMA metodu ile popülasyonların dallanmasını gösteren dendogram çizilmiştir.

2.2.3.4. Çok Değişkenli İstatistiksel Analizler

Genetik verinin çok değişkenli istatistik analizleri *adegenet* (Jombart, 2008) paketi kullanılarak yapılmıştır. Genotipleme yapılan 201 bireyin model bağımsız genetik yapısı ve tüm örnekler arasındaki varyasyon PCA analizi ile değerlendirilmiştir. Ek olarak, popülasyonlar arasındaki genetik farklılıkları özetlemek için DAPC analizi yapılmıştır. Bu analiz, PCA sonucunda gruplar arasında düşük farklılaşma gözlemlendiğinde daha iyi çözünürlük sağlayan bir metottur. DAPC analizi için her bir popülasyon bağımsız gruplar olarak atanmıştır. Elde edilecek temel bileşenlerin sayısı “ α -score” metodu ile belirlenmiştir. Popülasyon analizine ek olarak, grupların STRUCTURE sonuçlarına göre saf tür ve hibrit birey atamaları yapılarak saçılım grafikleri oluşturulmuştur.

2.2.3.5. Yapısal Genetik Analizler

Model tabanlı analizlerden önce, bazı lokalitelerde iribaşlardan örnekleme yapılması nedeniyle tüm popülasyonlarda potansiyel kardeşlik tahmini yapılmıştır. Bunun için COLONY v2.0.6.4 (Jones ve Wang, 2010) programında *full-likelihood* modeli kullanılmıştır. Veri setindeki tüm örnekler, herhangi bir ebeveyn adayını belirtilmeden yavru olarak atanmış ve genotip hata oranları her bir mikrosatellit belirteci için 0,05 olarak belirlenmiştir. Analiz 10 bağımsız tekerrür ile yürütülmüştür. Her bir popülasyondaki olası kardeş fazlalığını azaltmak için, dörtten fazla kardeş içeren aile gruplarında en fazla iki örnek veri seti içerisinde tutulmuştur.

Popülasyonların genetik yapılarının değerlendirilmesi, gen akışının görselleştirilmesi, saf türler ve hibrit bireylerin çıkarılması için Bayesian algoritması temelli STRUCTURE v2.3 (Pritchard vd., 2000) programı kullanılmıştır. Model parametreleri ise alel ilişkili karışım modeli ve lokalite bağımsız olarak seçilmiştir. MCMC zincirleri 500.000 tekrarlı yazdırma sonrası (*burn-in period*), 500.000 tekrarlı simülasyon olarak yürütülmüştür. Tahmini popülasyon sayısı 1-10 arasında ele alınarak 10 tekrarlı analiz yapılmış ve olasılık değişimleri arasından en uygun K değerini bulmak için sonuç dosyaları STRUCTURE HARVESTER platformuna

aktarılmıştır (Earl ve von Holdt, 2012). En uygun K olasılığı ise ΔK metodu ile tespit edilmiştir (Evanno vd., 2005). Ayrıca döngüler CLUMPAK sunucusuna aktararak birleştirilmiş (Kopelman vd., 2015) ve DISTRUCT (Rosenberg, 2004) ile görselleştirilmiştir. Hibrit bireylerin çıkarsanması için gereken eşik değeri daha önce *Bufo bufo* tür grubunda yapılan çalışmalar referans alınarak $0,2 < Q < 0,8$ aralığında belirlenmiştir (Endler, 1977; Arntzen vd., 2020a).

Genetik varyansın popülasyonlar arasındaki ayrışımı moleküler varyans analizi (Weir ve Cockerham, 1984) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bazı popülasyonlar içerisindeki örneklem sayısının düşük olmasından ötürü STRUCTURE sonuçlarındaki yapılanma göz önüne alınarak veri içerisinde alt gruplar oluşturulmuştur. Ardından 1000 tekrarlı permütasyon testi çalıştırılarak varyans hesabı yapılmıştır. Analiz *pegas* paketi (Paradis, 2010) kullanılarak yürütülmüştür.

STRUCTURE programı ile elde edilen sonuçları kıyaslamak ve potansiyel hibrit bireylerin doğasını anlamak için veriler NewHybrids v1.1 (Anderson ve Thompson, 2002) programı içerisinde değerlendirilmiştir. Bayesian algoritmasına dayanarak, genotiplendirilmiş her bir bireyin ebeveyn, F_1 , F_2 ve geri çaprazlama kategorileri içerisinde ataması yapılmıştır. Her bir döngü için Jeffrey önselleri ile rastgele başlayan MCMC tekerrürleri kullanılmıştır. STRUCTURE analizinde %90-100 güven aralığına kümelenmiş popülasyonlar ile farklı denemeler yapılarak, en uygun kümeleşmeyi sağlayan popülasyonlar Z değerine göre ebeveyn olarak ele alınmış ve geri çapraz bireylerin potansiyel etkisi azaltılmıştır. Analiz parametreleri için Thavornkanlapachai vd. (2019)'nin çalışması referans alınarak kendi verilerimize göre modifiye edilmiştir. Buna göre 5 kez bağımsız 1.000.000 MCMC döngüsü çalıştırılmış, ilk 100.000 döngü yakma (*burn-in*) işlemi ile süpürülerek elde edilen sonuçlara göre birleştirilmiş sonsal olabilirlik değerleri *graphics* (R Core Team, 2022) paketi ile görselleştirilmiştir.

2.2.3.6. Mekânsal Analizler

Genetik yapının mekânsal enterpolasyonunu görselleştirmek ve hibrit zonun coğrafik örüntülerini açığa çıkarmak için *tess3r* içerisinde Bayesian kümeleme algoritması kullanılmıştır (Caye ve Francois, 2016). Bu paket türlerin dağılım aralığı boyunca süreklilik sergileyen coğrafi varyasyonu modelleyerek örneklenen bireyler

arasındaki genetik yapıyı ortaya çıkarma fırsatı sunmaktadır. Tahmini popülasyon sayısı 1-10 arasında ele alınarak 10 tekrarlı analiz yürütülmüştür. Analiz sonucunda oluşan yamaç eğim grafiği ve STRUCTURE sonuçları beraberce göz önüne alınarak en uygun K değeri için oluşan potansiyel grupların atama skorları (*Q Score*) elde edilmiş ve bar grafikler ile görselleştirilmiştir. Bireyler için elde edilen skorların aritmetik ortalaması alınarak her bir popülasyona ait atasal katsayılar belirlenmiş ve Gauss süreç regresyonu olarak bilinen *Spatial Kriging* metodu ile coğrafik enterpolasyon haritası oluşturulmuştur.

Genetik denge varsayımından bağımsız olarak popülasyonların mekânsal örüntüleri açığa çıkarmak için *adegenet* paketi kullanılarak mekânsal temel bileşen (sPCA) analizi yapılmıştır. Bu analiz bireyler arasındaki benzerlik katsayılarını tahmin etmek için genetik verilerin uzamsal otokorelasyonunu (*Moran's I*) hesaba katmaktadır. İlk olarak aynı coğrafik konum içerisinde örnekleme yapılmış bireylerin koordinatları *geoR* paketi (Riberio vd., 2022) içerisinde analize uygun şekilde 0,001 hata payı ile modifiye edilerek birkaç metre uzaklıkta yer alacak şekilde yeni koordinatlar oluşturulmuştur. Elde edilen koordinatlar için Delunay Üçgenleme (*Delunay-triangulation*) Uzaklık Metodu kullanılarak şebeke grafiği oluşturulmuştur. Genetik varyasyonun lokal (komşu popülasyonların arasında beklenenden daha fazla bağıntılı olması) ve global (komşu popülasyonların arasında beklenenden daha fazla benzemezlik olması) yapılanmaları 9999 tekerrürlü Monte-Carlo testi ile kıyaslanmıştır. Son olarak çıkarsaması yapılan ilk iki bileşen kullanılarak genetik ve coğrafik açıdan farklılaşmış popülasyonlar türleri temsil edecek şekilde iki küme ataması yapılarak görselleştirilmiştir.

Türleri temsil eden popülasyonlar arasında coğrafi mesafeye bağlı şekillenen genetik ilişki Mantel testi kullanılarak araştırılmıştır. Uzaklığa bağlı izolasyon (*Isolation by Distance*) etkisi iki farklı değerlendirmeye tabi tutulmuştur. İlk olarak GenAlex v6.5 programı (Smouse ve Peakall, 2012) içerisinde popülasyonlar arasındaki doğrusallaştırılmış coğrafik mesafe ve ikili F_{ST} değerleri için ikili karşılaştırma matrisleri oluşturulmuştur. Ardından bu matrisler 99 permütasyon tekrarlı olacak şekilde teste tabi tutulmuştur. Korelasyonun %95 güven aralığı içerisindeki anlamlılığını doğrulamak için olasılığı gösteren *p* değeri hesaplanmıştır. İkinci metoda ise *ape* paketi (Paradis vd., 2019) içerisinde popülasyonlar arası ikili

genetik mesafe $d(L - d)/L$ formülü ile hesaplanmıştır. L değeri lokus sayısını d değeri ise iki birey arasındaki farklılık gösteren lokus sayısını ifade etmektedir. Ham coğrafi koordinatlar ise *stats* (R Core Team, 2022) paketi içerisinde Öklid mesafesi (*Euclidean*) metodu ile doğrusallaştırılmıştır. Ardından oluşturulan matrisler *vegan* (Oksanen vd., 2022) paketi yardımıyla Mantel testine tabi tutulmuştur.

2.2.3.7. Coğrafi Klin Analizi

Coğrafi klin analizi R programlama dili içerisinde *HZAR* (Derryberry, 2014) paketi kullanılarak yapılmıştır. Bu paket Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmasını kullanarak genetik verileri klasik denge klin modellerine (sigmoid şekilli) göre yerleştirmektedir. Bunun için Rize-Artvin illeri arasında örneklenen popülasyonların her biri için *STRUCTURE* analizinde $K=2$ modeliyle elde edilen atama katsayıları (Q) kullanılmıştır. Mitokondriyal klinler için ise her bir popülasyon içerisinde belirlenen mitokondriyal haplotiplerin frekanslarından yararlanılmıştır. Sonraki aşamada, coğrafi uzaklıklar ve genetik veriler eşleştirilerek null (sıfır) klin modelleri çıkarılmıştır. Bunun için 30 maksimum olasılık tahmini rastgele atanmış parametreler ile başlatılmış ve 60.000 nesil boyunca ham izleme analizi (*trace analysis*) yardımıyla $\Delta AICc$ değerleri belirlenmiştir.

Null modellerin ardından her bir genetik belirteç için farklı parametre kombinasyonlarına sahip 15 ayrı klin modeli oluşturulmuştur. Model ölçeklemeleri serbest (*free*), sabitlenmiş (*fixed*) ve standart (*none*) olmak üzere üç parametreden oluşmaktadır. Modeller için introgresyonu temsil eden kuyruk kombinasyonları ise introgresyon kuyruksuz (*no tail*), sol kuyruklu (*introgression tail to the left*), sağ kuyruklu (*introgression tail to the right*), ayna kuyruklar (*mirrored introgression tails*) ve bağımsız kuyruklular (*independent introgression tails*) olmak üzere beş ayrı parametreden oluşmaktadır. Modeller arasından en doğru coğrafi örüntüyü yansıtan klin ise $AICc$ skoruna göre belirlenmiştir. Klinler arasındaki farklılıkların önemi oluşturulan en iyi modellerin karşılaştırılması ile ortaya çıkarılmıştır. Kodlar için van Riemsdijk vd. (2019)'un sağladığı R komut bloğu kendi verimize uygun şekilde modifiye edilmiştir ve varsayılan (*default*) parametreler kullanılmıştır.

2.2.3.8. Genomik Klin Analizi

Genomik klin analizi *introgress* paketi kullanılarak yapılmıştır (Gompert ve Buerkle, 2010). Bu paket *log-likelihood* metodu kullanarak gözlenen veride anlamlılık değerlerini hesaplar ve nötral introgresyon beklentisinden sapan lokusları belirler. Klinleri oluşturmak için veri seti paket içinde istenen uygun girdi dosyasını sağlamak üzere iki-alellik sisteme dönüştürülmüştür. Coğrafi konum ve STRUCTURE analizi ile elde edilen Q skorları referans alınarak, her bir tür için üçer adet atasal popülasyon ataması yapılmıştır. Ardından, kalan 16 popülasyonda 14 lokus için *B. verrucosissimus* türünü temsil edecek şekilde alel frekansları hesaplanmıştır. Elde edilen frekanslar kullanarak her bir lokus için multinominal regresyon metodu ile genomik klinler çizilmiştir. Ayrıca birleşik alel frekansları kullanılarak tüm veriyi yansıtacak konsensus klin oluşturulmuştur. Analizler için 1000 tekerrürlü permütasyon simülasyonu kullanılmıştır.

2.2.3.9. Morfolojik Analizler

Arazi çalışması süresince örneklemesi yapılan ergin bireylerin her birinden Castellano ve Giacoma (1998)'nin çalışmasında referans verilmiş 27 farklı karaktere ait morfometrik ölçümler alınmıştır. Hayvanlara yakalandıkları yerde önce 250 mg/L konsantrasyonlu MS222 çözeltisi kullanılarak anestezi uygulaması yapılmış ve daha sonra 0,01 mm hassasiyetli kumpas kullanılarak her bir morfolojik karaktere ait veriler not edilmiştir. Ölçülen karakterler sırasıyla: Vücut uzunluğu (VU); Baş uzunluğu (BU); Baş genişliği (BG); Burun delikleri arası mesafe (BDA); Burun deliği-burun ucu mesafesi (BDBUA); Burun delikleri-göz arası mesafe (BDG); Göz-timpaniyum arası mesafe (GÖZTYM); Gözün çapı (GÇ); Timpaniyum çapı (TÇ); Parotid uzunluğu (PU); Dirsekler arası mesafe (DD); Dirsek-bilek arası mesafe (DB); Ön ayak uzunluğu (ÖNAY); Parmak uzunluğu (PARU); Femur uzunluğu (FU); Tibia uzunluğu (TU); Tarsus uzunluğu (TAU); Arka ayak uzunluğu (AAU); DMT-2.perde arası mesafe (DMT2P); Dış metatarsal tüberkül uzunluğu (DMTU); İki göz arası mesafe (GG); Parotidlerin ön uçları arasındaki mesafe (PARÖNUC); Parotidlerin arka uçları arasındaki mesafe (PARARKAUC); Sağ parotidin eni (SAĞPAREN); Sol parotidin eni (SOLPAREN) İç metatarsal tüberkülün boyu (İMTBOY); İç metatarsal tüberkülün eni (İMTEN). Ek olarak Arntzen vd. (2013b)'in *Bufo bufo* tür grubu taksonlarını

ayırmak için diyagnostik karakter olarak literatüre kattığı parotid açısı (PA), parotid divergentliği (PD), iç metatarsal tüberkülün boyutu (İMTBOYUT) ve şekli (İMTŞEKLİ) adlı karakterlerde incelemeye dahil edilmiştir.

Her iki türün cinsiyetleri arasında vücut büyüklüğü bakımından eşeyssel dimorfizm mevcut olduğu için erkek ve dişi bireyler ayrı ayrı analize tabi tutulmuşlardır. Mitokondriyal DNA verilerinin sonucuna göre saf türler ve mitokondriyal kontak grubu, mikrosatellit DNA verilerin sonucuna göre ise saf türler ve hibrit bireyler olarak ayrılan grupların merkezi eğilim ve dağılım ölçüleri hesaplanmıştır. Ardından verilerin normal dağılışa uygun olup olmadığı *olssr* paketi (Hebbali, 2020) içerisinde Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak kontrol edilmiştir. Gruplar arasında ölçülen karakterlerin ortalamaları bakımından mevcut farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ifade edip etmediği One-Way ANOVA (normal dağılıma tabi değişkenler) ve Kruskal-Wallis (normal dağılıma tabi olmayan değişkenler) testleri kullanılarak belirlenmiştir. Gruplar için merkezi eğilim ve dağılım ölçümleri *psych* paketi (Revelle, 2021) kullanılarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Kruskal-Wallis testleri *stats* paketi yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Çok değişkenli analizlerden önce, oluşturulan morfolojik veri matrisinin yeterliliğini doğrulamak için Standard Cronbach Alpha, KMO ve Bartlett's Sphere testleri *psych* paketi içerisinde çalıştırılmıştır. Veri seti içerisindeki sapmaları önlemek ve bozulma etkilerini en aza indirmek için log10-dönüşümü ile bütün değişkenler standardize edilmiştir. Sonraki adımda veri boyutu azaltmak ve morfolojik uzayda coğrafik ve genetik olarak belirlenen gruplar arasındaki karakter farklılıklarını ortaya çıkarmak için PCA analizi uygulanmıştır. Temel bileşenler analizi (PCA) denetimsiz öğrenme algoritmalarından biri olup, incelenen bireylerdeki varyasyonu grup bağımsız olarak değerlendirmede faydalıdır. Analiz yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisinden her değişkeni en iyi tanımlayan özdeğerleri (*Eigenvalue*) belirlenmiş ve eşik değeri 1 ve üzeri olarak atanmıştır. Rotasyon tekniği olarak *Varimax* metodu tercih edilmiştir. Daha sonra incelenen bireylerdeki varyasyonu en iyi açıklayan ve en yüksek varyans yüküne sahip ilk iki bileşen kullanılarak morfouzayı temsil eden saçılım grafikleri oluşturulmuştur. PCA analizi, *factoextra* (Kassambara ve Mundt, 2020) ve *FactoMineR* (Le vd., 2008) paketleri kullanılarak yapılmıştır. Son olarak,

farklılaşan karakterleri belirlemek ve tanımlanmış gruplara atanan örneklerin doğru sınıflandırılma olasılığını test etmek için için *MASS* (Venables ve Ripley, 2002) paketi kullanılarak diskriminant analizi yapılmıştır. Denetimli öğrenme algoritması olan bu analizle türler ve muhtemel kontak zonlar üzerindeki hibrit bireyler sınıflandırılarak elde edilen gözlemlerin doğruluğu test edilmiştir. Sonuçlar ise *ggplot2* (Wickham, 2016) paketi ve *grid* (R Core Team, 2022) paketiyle görselleştirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler R Programlama Dili (R Core Team, 2022) içerisinde gerçekleştirilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. Arazi Gözlemleri

Arhavi ilçesinde 13 Temmuz 2020, 8 Mayıs 2021 ve 9 Haziran 2021 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmaları sonucunda Ortacalar Bucağı, Çifteköprü ve Mençuna Şelalesi yolu üzerinde *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Murgul ilçesinde 13-14 Temmuz 2020 ve 8 Mayıs 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmalarında Damal köyü ve maden sahası, Karagöl mevkii, Erenköy, Başköy, Deliklitaş Şelalesi ve Deliklitaş alabalık tesisi civarında gözlemler yapılmış, taramalar sonucunda Başköy ve Deliklitaş Şelalesi civarında *Bufo* cinsine ait ergin bireyler, yol ölüleri ve larvalar bulunarak ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Artvin Merkez ilçesinde 15 ve 18 Temmuz 2020 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmaları sonucunda Kafkasör Yaylası yukarı mevkileri ve Hatila Vadisi içlerinde ergin bireylerden morfometrik ölçümler alınmış ve doku örnekleri elde edilmiştir.

Şavşat ilçesinde 16-17 Temmuz 2021 ve 25-26 Mayıs 2021 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmaları sonucunda Meşeli köyü ve Karagöl Milli Parkı sınırlarında *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Ardanuç ilçesinde 25 Temmuz 2021 tarihinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunamamıştır. İlçeye Artvin yol ayrımından girilerek Şavşat ilçesine bağlanan Karsniya mezrası dağ geçişine kadar bütün bölgeler taranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Bufotes viridis sitibundus* alttürüne ait yumurta ve larva örneklerinin yanı sıra bir adet yol ölüsü gözlenmiştir. Ardanuç ilçesinde türün gözlenmemesi muhtemel bir sonuç olarak görülmektedir. Bunun sebebi ise Şavşat ilçe merkezinden başlayarak Ardanuç-Ardahan hattına dönük olan alanlarda *B. viridis sitibundus* türünün var olmasıdır. Yapılan gözlemlere göre *Bufo* cinsinin dağılım gösterdiği coğrafya ise Şavşat'ın Borçka ve Gürcistan hattına dönük olan alanlarıdır.

Borçka ilçesinde Karagöl ve Borçka-Hopa sınırındaki iftetekpr köyü civarında 14 Temmuz 2020 ve 9 Mayıs 2021 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmaları sonucunda *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir. Aynı lokalitede yaşayan 29 bireyin daha önce elde ettiğimiz morfolojik ve genetik veriler tarafımızca muhafaza edildiği için ekstra morfolojik ölçüm alınmasına gerek duyulmamıştır.

Fındıklı ilçesinde 8 Mayıs 2020 ve 19 Haziran 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Beydere ve Yaylacılar civarında *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Ardeşen ilçesindeki arazi alışmaları 20 Haziran 2021 tarihinde tamamlanmıştır. Çalışma sonucunda aahona Yaylası, Tunca Vadisi yolu, Yukarıdurak köyü ve çevresinde *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Pazar ilçesindeki arazi alışmaları 28 Mayıs-12 Haziran 2021 tarihleri arasında tamamlanmıştır. Çalışma sonucunda Bucak, Akbucak ve Başköy (Suçatı) köylerini civarlarında *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Hemşin ilçesinde 9 Mayıs 2020 ve 12 Haziran 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Hemşin şelalesi yolu üzerinde ve şelalenin oluşturduğu akarsu da *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Çamlıhemşin ilçesinde 25 Mayıs 2021 tarihinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Kaplıca mahallesinde *Bufo* cinsine ait larvalar bulunmuş, analizler için doku örnekleri elde edilmiştir. Çamlıhemşin at köyünde yaşayan 11 bireyin daha önce elde ettiğimiz morfolojik ve genetik veriler tarafımızca muhafaza edildiği için ekstra morfolojik ölçüm alınmasına gerek duyulmamıştır.

Çayeli ilçesinde 9 Mayıs 2021 ve 29 Haziran 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Senoz Vadisi yolu üzerinde ve ukurluhoca köyünde *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Rize Merkez ilçesinde 29 Mayıs 2021 tarihinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Karasu köyü, Güzelyurt mahallesi, Alişor mevkisinde *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

Güneysu ilçesinde 9 Mayıs, 30 Mayıs ve 17 Haziran 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Gürgen, Başköy ve Ballıdere köylerinde *Bufo* cinsine ait ergin bireyler ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

İyidere ilçesinde 30 Mayıs 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Kalecik köyünde *Bufo* cinsine ait larvalar bulunmuş ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

İkizdere ilçesinde 30 Nisan 2021 ve 30 Mayıs 2021 tarihlerinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda Cimil yolu, Güneyce beldesi, Erzurum yolu üzeri, Kama köyü ve Ballıköy yolu üzerinde *Bufo* cinsine ait ergin bireyler, yol ölüleri ve larvalar bulunmuş, ilgili morfolojik ölçümler alınmış ve genetik analizler için doku örnekleri elde edilmiştir.

3.2. Mitokondriyal DNA Analizleri

Tez çalışması kapsamında sekanslaması yapılan 59 örnek, Özdemir vd. (2020)'in GenBank'ta depoladığı 3 Rize örneği (MN423932, MN423933, MN423937) ve 3 Artvin örneği (MN423929, MN423930, MN423931) olmak üzere toplam 65 bireyin sekans verileri hizalandıktan sonra başlangıç ve sondan kesilmiş ve toplam 786 bp büyüklüğünde DNA dizisi elde edilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, Artvin ve Rize illerinde örneklenen 65 bireye ait toplam 15 haplotip belirlenmiştir. İlgili türler için *B. verrucosissimus* taksonunu temsil eden 5, *B. bufo* taksonunu temsil eden 10 haplotip mevcuttur (Tablo 5).

Tablo 5. Sitokrom b gen bölgesi için oluşan haplotiplere ait açıklayıcı bilgiler (BB: *B. bufo* haplotipleri; BV: *B. verrucosissimus* haplotipleri)

Haplotipler	Tür	Frekans	Grup İçine Dahil Örnekler
Hap1	BV	9	AKH01, AKH02, AKH03, FIN01, FIN02, FIN03, YAY3, ORT02, ORT03
Hap2	BB	5	ALI01, ALI02, ALI03, CEV01, GUN01
Hap3	BV	27	ARD01, ARD02, ARD03, ARD04, CFT01, CFT02, CFT03, HEM04, KAP01, KAP02, KAP03, MES01, MES02, MUR01, MUR02, PAZ01, PAZ02, PAZ03, SUC02, YAY02, ORT1, Artvin9, Artvin8, Artvin7, HOP1, SAV1, SAV2
Hap4	BB	11	CEV02, GUN05, GUN06, IKZ03, KAL03, SEN01, SEN02, SUC03, Rize1, Rize2, Rize3
Hap5	BB	1	CEV03
Hap6	BB	1	GUN03
Hap7	BB	1	GUN04
Hap8	BB	2	HEM01, HEM02
Hap9	BB	2	IKZ01, IKZ02
Hap10	BB	1	KAL02
Hap11	BV	1	MES03
Hap12	BV	1	MUR03
Hap13	BB	1	SEN03
Hap14	BB	1	SUC01
Hap15	BV	1	YAY01

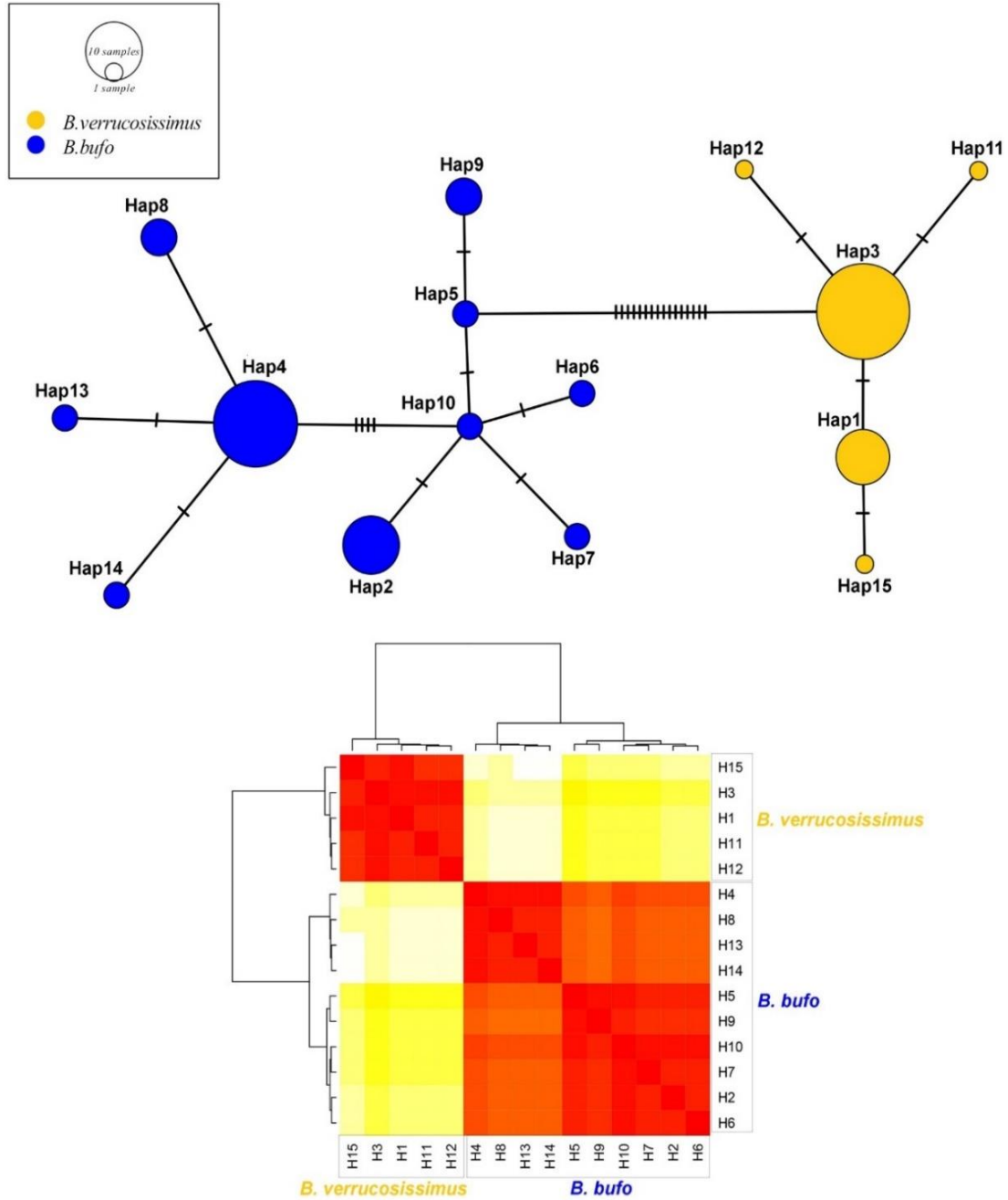
Türleri temsil eden haplotipler ayrıştırıldığında *B. bufo* taksonu için haplotip çeşitliliği (*Hd*) ve standart sapma $0,794 \pm 0,069$, *B. verrucosissimus* taksonu için ise $0,478 \pm 0,079$ olarak belirlenmiştir. Nükleotid çeşitliliği ise sırasıyla $0,00403 \pm 0,00039$ ve $0,00069 \pm 0,00014$ olarak hesaplanmıştır.

Değişmeyen bölge (monomorfik) sayısı 757'dir. Ayrışan bölgelerin sayısı (polimorfik) 29, toplam mutasyon sayısı ise 30 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 23 bölgenin ikili varyant ve 1 bölgenin üçlü varyant sergilediği toplam 24 bölge ise parsimonik bilgi verici bölge olarak atanmıştır (Tablo 6). Veri seti içerisindeki ortalama GC içeriği %46,30'dur.

Haplotipler arasında hesaplanan ikili genetik mesafeler ise %0 ila %3,08 oranı arasında değişiklik göstermektedir. Türleri temsil eden haplotipler arası ortalama genetik mesafe ise %2,44 olarak belirlenmiştir. Haplotipler arasındaki minimum mutasyonel farklılık 1 baz çifti, maksimum mutasyonel farklılık ise 22 baz çiftidir (Tablo 7).

Oluşturulan haplotip ağı, en az 16 mutasyonel adımla türlere ait mitokondriyal haplotipleri birbirinden ayırmıştır. İkili genetik mesafeler için oluşturulan ısı haritası çıkarsaması yapılan genetik mesafeleri destekler şekilde haplotipler arasındaki farklılık derecelerini iki ana grup üzerinden ayıştırmıştır (Şekil 20). SUC ve HEM popülasyonlarında birer birey *B. verrucosissimus* mitokondriyal haplotipleri ile

karakterize edildiği için, Hap3 haplogrubu introgresyonu gerçekleşen bireyleri kapsayan grup olarak öne çıkmıştır. Öte yandan, *B. bufo* türüne ait mitokondriyal haplotipler iki alt soy hattı ve star filogeni ile temsil edilmiştir.



Şekil 20. Sitokrom b geni kullanılarak oluşturulan şebeke grafiği (üst) ve haplotipler arası genetik benzerliği gösteren ısı haritası (alt). Şebeke grafiği üzerindeki dikey çizgiler mutasyonel adım sayısını göstermektedir. Isı grafiğinde en yüksek derecede benzerlik gösteren haplotipler kırmızı renk en düşük benzerlik gösteren haplotipler ise beyaz renk ile şematize edilmiştir.

Tablo 6. Taksonlar arasında Sitokrom b gen bölgesine dayalı polimorfik bölgeler ve nükleotid pozisyonları. Parsimonik bilgi verici olmayan nükleotid pozisyonları gri tonlama ile gölgelendirilmiştir (V: Varyant).

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24	V25	V26	V27	V28	V29
	25	35	46	52	94	109	112	145	148	152	163	211	244	254	282	307	325	406	422	499	535	562	575	619	680	682	691	745	751
Hap1	A	G	A	C	A	A	G	C	A	G	G	A	G	G	T	C	T	C	G	G	A	A	T	A	A	C	A	A	T
Hap2	G	.	.	T	G	.	.	.	G	A	A	G	A	A	.	T	C	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap4	G	A	G	T	G	.	.	T	G	A	A	G	A	.	.	T	.	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap5	G	.	.	T	G	.	.	.	G	A	A	G	A	.	.	T	C	T	.	A	G	G	.	.	.	T	.	G	C
Hap6	G	.	.	T	G	.	.	.	G	A	A	G	A	.	.	T	C	T	.	A	G	G	.	G	.	T	G	G	C
Hap7	G	.	.	A	G	.	.	.	G	A	A	G	A	.	.	T	C	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap8	G	A	G	T	G	.	A	T	G	A	A	G	A	.	.	T	.	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap9	G	.	.	T	G	.	.	.	G	A	A	G	A	.	.	T	C	T	.	A	G	G	.	.	G	T	.	G	C
Hap10	G	.	.	T	G	.	.	.	G	A	A	G	A	.	.	T	C	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap13	G	A	G	T	G	.	.	T	G	A	A	G	A	.	C	T	.	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap14	G	A	G	T	G	G	.	T	G	A	A	G	A	.	.	T	.	T	.	A	G	G	.	.	.	T	G	G	C
Hap15	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tablo 7. Sitokrom b gen bölgesi için belirlenen haplotipler arasındaki *p*-distance metodu ile belirlenen ikili genetik mesafeler (alt diyagonal) ve toplam baz çifti farklılıkları (üst diyagonal)

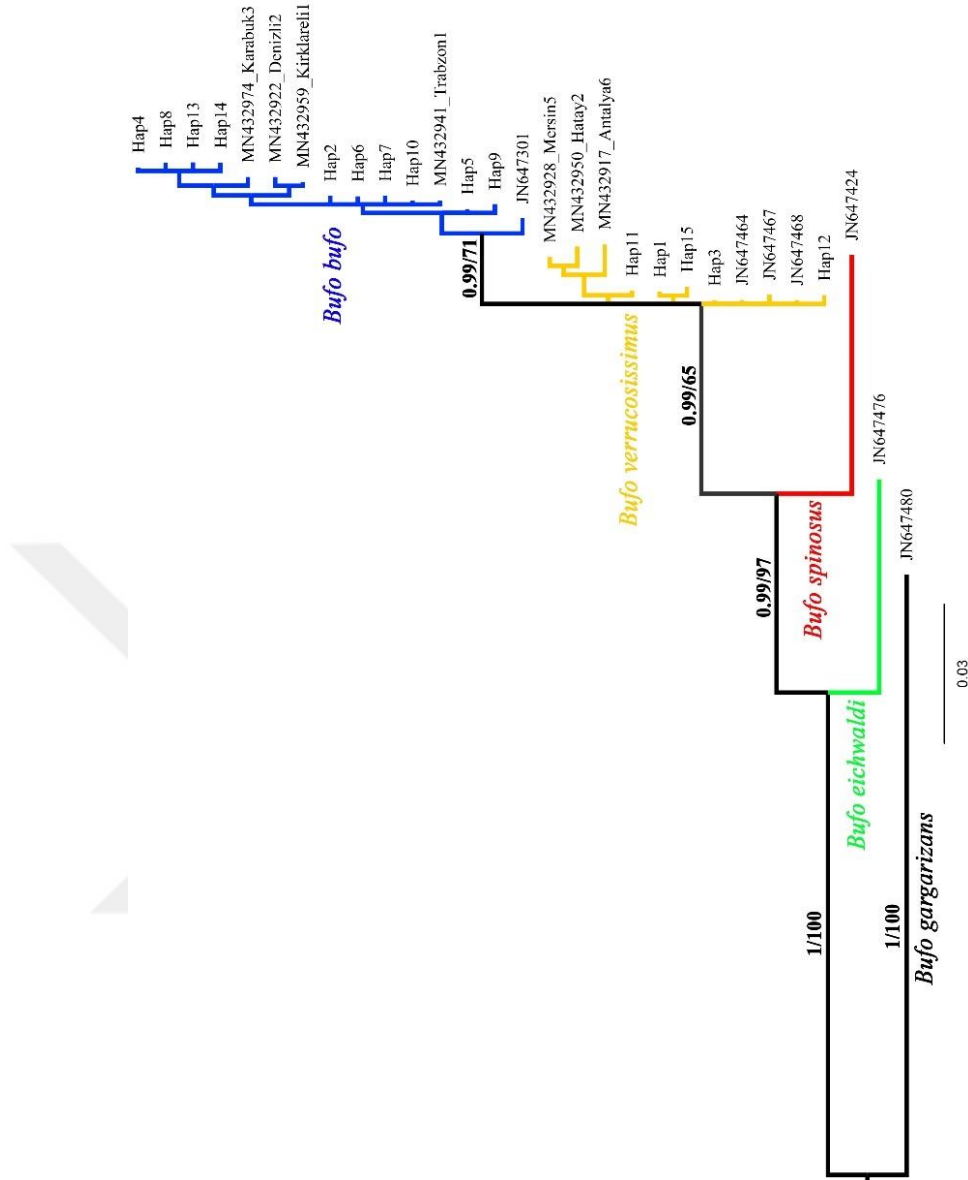
Haplotip	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10	Hap11	Hap12	Hap13	Hap14	Hap15
Hap1		19	1	20	17	19	18	21	18	18	2	2	21	21	1
Hap2	0,0260		18	5	2	2	2	6	3	1	19	19	6	6	20
Hap3	0,0012	0,0245		19	16	18	17	20	17	17	1	1	20	20	2
Hap4	0,0276	0,0064	0,0260		5	5	5	1	6	4	20	20	1	1	21
Hap5	0,0230	0,0025	0,0215	0,0064		2	2	6	1	1	17	17	6	6	18
Hap6	0,0260	0,0025	0,0245	0,0064	0,0025		2	6	3	1	19	19	6	6	20
Hap7	0,0245	0,0025	0,0230	0,0064	0,0025	0,0025		6	3	1	18	18	6	6	19
Hap8	0,0292	0,0078	0,0276	0,0012	0,0078	0,0078	0,0077		7	5	21	21	2	2	20
Hap9	0,0245	0,0039	0,0230	0,0078	0,0012	0,0039	0,0038	0,0091		2	18	18	7	7	19
Hap10	0,0245	0,0012	0,0230	0,0051	0,0012	0,0012	0,0012	0,0064	0,0025		18	18	5	5	9
Hap11	0,0025	0,0260	0,0012	0,0276	0,0230	0,0260	0,0245	0,0292	0,0245	0,0245		2	21	21	3
Hap12	0,0025	0,0258	0,0012	0,0274	0,0228	0,0258	0,0243	0,0289	0,0243	0,0243	0,0025		21	21	3
Hap13	0,0289	0,0077	0,0274	0,0012	0,0077	0,0077	0,0077	0,0025	0,0091	0,0064	0,0289	0,0287		2	22
Hap14	0,0292	0,0078	0,0276	0,0012	0,0078	0,0078	0,0077	0,0025	0,0091	0,0064	0,0292	0,0289	0,0025		22
Hap15	0,0012	0,0276	0,0025	0,0292	0,0245	0,0276	0,0261	0,0276	0,0260	0,0260	0,0039	0,0038	0,0305	0,0308	

BI analizi için en iyi evrimsel değişim modeli GTR+G olarak belirlenmiştir (AIC: 4375,62; -lnL = 2178,81; Ti/Tv = 13,60; Gama distribution shape = 0,16; Baz frekansları: freqA = 0,24; freqC = 0,33; freqG = 0,13; freqT = 0,28). MO analizi, tek evrimsel değişim modeli GTRCAT kullanılarak gerçekleştirilmiştir (-lnL = -2176,38; alpha: 0,18; frekanslar: freqA = 0,23; freqC = 0,32; freqG = 0,14; freqT = 0,29). Ayrıca tür grubuna ait genel ağaç topolojisini oluşturmak için Recuero vd. (2012)'nin çalışmasında mevcut olan *B. bufo*, *B. verrucosissimus*, *B. eichwaldi* ve *B. spinosus* türlerine ait DNA dizileri de kullanılmıştır. Ek olarak *B. gargarizans* türü de dış grup olarak analize dahil edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Filogenetik ağaç içerisinde kullanılan GenBank örneklerine ait bilgiler

Kod	Lokalite	Tür
MN432974	Karabük, Türkiye	<i>B. bufo</i>
MN432922	Denizli, Türkiye	<i>B. bufo</i>
MN432959	Kırklareli, Türkiye	<i>B. bufo</i>
MN432941	Trabzon, Türkiye	<i>B. bufo</i>
MN432928	Mersin, Türkiye	<i>B. verrucosissimus</i>
MN432950	Hatay, Türkiye	<i>B. verrucosissimus</i>
MN432917	Antalya, Türkiye	<i>B. verrucosissimus</i>
JN647301	Thessalia, Desi Yunanistan	<i>B. bufo</i>
JN647464	Adjara, Charnali, Gürcistan	<i>B. verrucosissimus</i>
JN647467	Borjomi, Gürcistan	<i>B. verrucosissimus</i>
JN647468	Şavşat Karagöl, Türkiye	<i>B. verrucosissimus</i>
JN647424	Laguna Grande de Gredos, İspanya	<i>B. spinosus</i>
JN647476	Lerik, Azerbaycan	<i>B. eichwaldi</i>
JN647480	Bastak, Çin	<i>B. gargarizans</i>

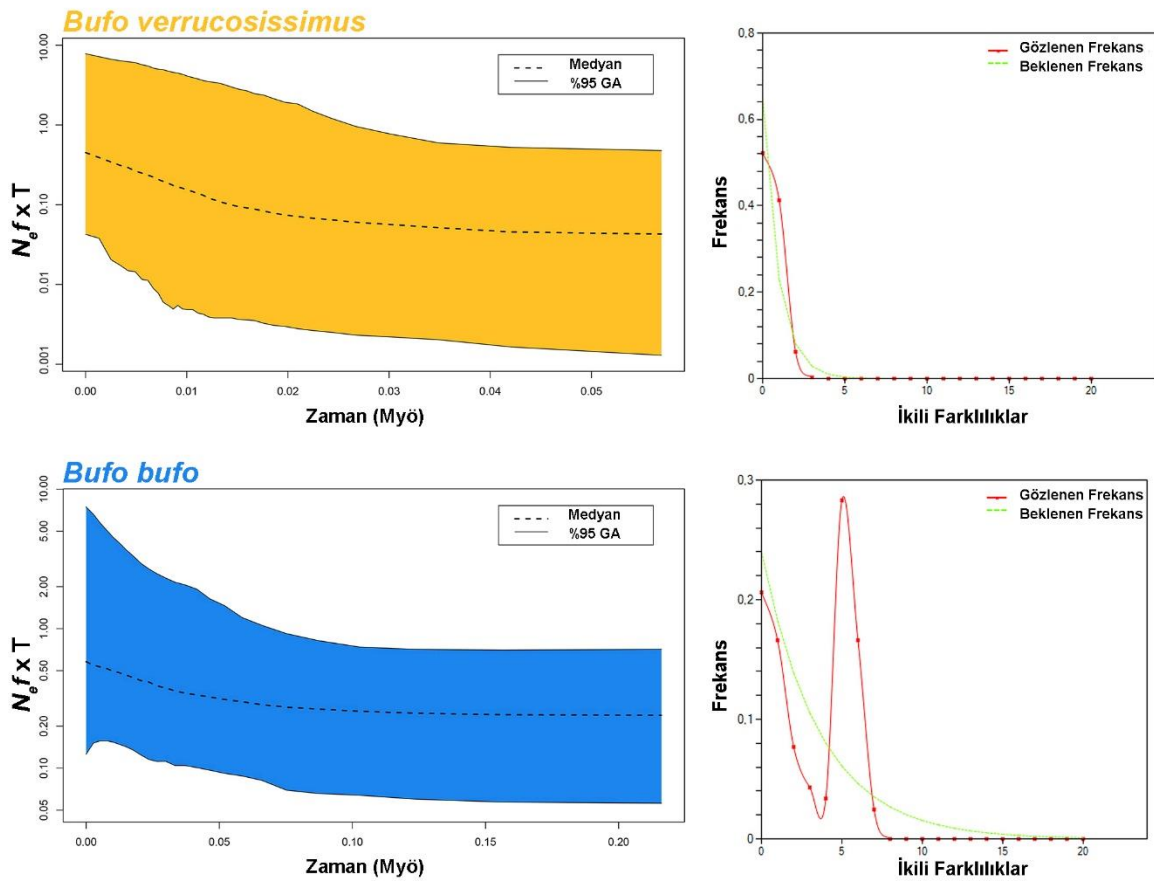
Her iki analizde elde edilen aynı ağaç topolojileri, *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerine karşılık gelen iki ana dalın varlığını ortaya koymuştur. Rize'den ilgili haplotipleri içeren *Bufo bufo* kladının daha güçlü dal destek değerlerine sahip olduğu (Bayes sonsal değeri: 0,99; Maksimum olabilirlik değeri: 71) ve monofletik bir örüntü sergilediği görülmüştür. Öte yandan, *B. verrucosissimus* kladı güçlü sonsal olabilirlik değeri (0,99) ve nispeten güçlü maksimum olabilirlik değerine sahip olsa da (65) klad içerisinde yer alan bireylerin filogenisi bakımından politomik bir örüntü açığa çıkmıştır ve redundant haplotipler gözlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Sitokrom b gen bölgesi haplotipleri için inşa edilen filogenetik ağaç (BI/MO)

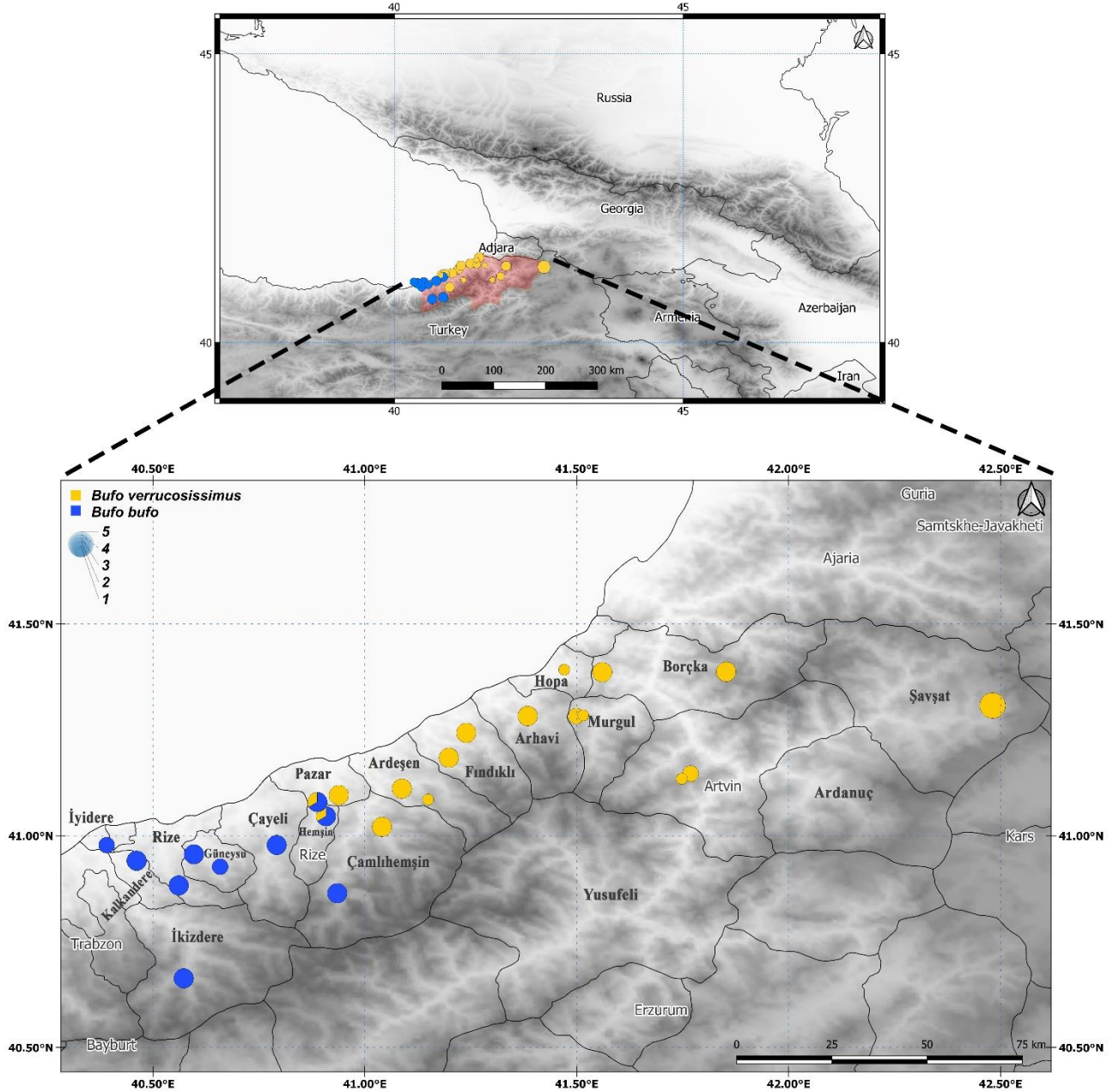
Filogenetik analizler, her iki türü temsil eden iki ana haplotip alt ağının varlığını ortaya koyduğundan, taksonlar demografik analizlerde bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Artvin ve Rize il sınırları içerisinde *B. verrucosissimus* taksonuna ait mitokondriyal haplotiplere dahil olan 39 birey için Tajima'nın *D* ve Fu'nun *F_s* istatistik değerleri sırasıyla -1,01 ve -1,98 olarak belirlenmiş ve popülasyon genişlemesini gösteren negatif değerler sergilemiştir. *B. bufo* türü için sadece Rize şehri sınırları içerisinde var olduğu tespit edilen 26 örnek için negatif Fu'nun *F_s* değeri

(-1,64) hesaplanmıştır, ancak pozitif yönlü Tajima'nın D değeri (0,02) genişlemeden ziyade dengeleyici seçilimi veya popülasyon kaynaşmasını işaret etmektedir. *B. verrucosissimus* taksonu için yapılan uyumsuzluk analizi, popülasyon genişlemesini ifade eden düşük Ramos-Onsins ve Rozas R_2 değeri (0,08) ile tek modlu (unimodal) dağılım göstermiştir. Bununla birlikte, *B. bufo* taksonunda Tajima'nın D istatistiğinin sonucunu destekleyen ve popülasyon genişleme hipotezine yeterince uymayan daha yüksek bir R_2 değerine (0,12) sahip multimodal dağılım gözlemlenmiştir. Extended Bayesian Skyline grafikleri, son yirmi bin *B. verrucosissimus* taksonunun ani bir popülasyon genişlemesi gösterdiğini fakat *B. bufo* taksonunun son elli bin yıl boyunca Tajima'nın D değerine göre öne çıkan popülasyon kaynaşması durumunu destekler şekilde daha yavaş bir genişleme yöneliminde olduğunu açığa çıkarmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. Extended Bayesian Skyline Plot (Sol) ve Mismatch (Sağ) analizlerine ait görseller (GA: Güven aralığı; Myö: Milyon yıl önce; $N_e f$: Efektif dışı popülasyon büyüklüğü; T: Ortalama nesil süresi)

Yapılan filogenetik analizler bütünsel olarak değerlendirildiğinde Pazar, Hemşin ve Çamlıhemşin sınırları içerisinde, her iki türe ait mitokondriyal haplotiplerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Mitokondriyal haplotiplerin coğrafi dağılımını gösteren harita ve türler için elde edilen frekanslar ile oluşturulan pasta grafikler

3.3. Mikrosatellit DNA Analizleri

3.3.1. Temel Popülasyon Genetiği Analiz Sonuçları

Micro-Checker analizi, PAZ popülasyonunda *Bspi3.23* lokusu, YAY popülasyonunda *Bspi4.05* ve MES popülasyonunda *Bbufu11* için boş alel belirtileri ortaya çıkarmıştır. Her lokus için boş alellerin olası varlığı yalnızca tek bir örnekleme bölgesinde bulunduğundan, herhangi bir ayarlama yapılmamıştır. Ayrıca alel düşüşü veya skor hataları için kanıt bulunmamıştır. Polimorfizm, iki alelli bir lokus (*Bspi3.11*) dışında, her bir lokus için yüksek olup, lokus başına alel sayısı 5 (*Bspi3.23*, *Bbufu13* ve *Bspi3.20*) ile 40 (*Bspi4.14*) arasında değişmiştir. Lokus başına ortalama alel sayısı 13,42'dir. Kayıp veri olarak sınıflandırılan kesin genotipleme oranı %0,92 seviyesindedir. Popülasyon-lokus kombinasyonu verileri sonuçlarına göre hiçbir popülasyonda Hardy-Weinberg oranından sapma gözlenmemiştir ve lokuslar arasında bağlantı dengesizliği olmadığı tespit edilmiştir. Genetik çeşitlilik indekslerine ait bilgiler Tablo 9'da sunulmaktadır.

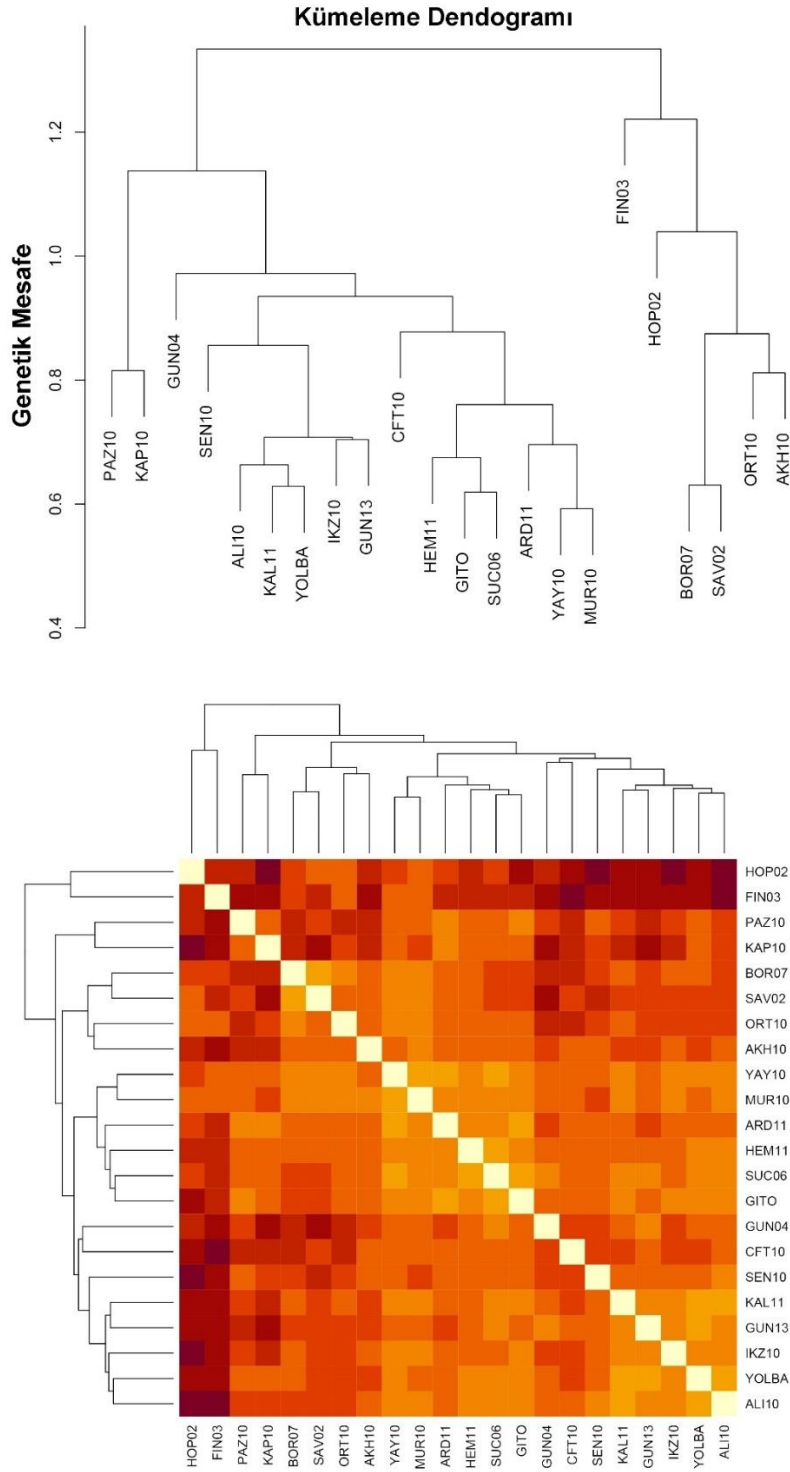
Tablo 9. Popülasyonlara ait temel genetik çeşitlilik verileri (AS:Toplam alel sayısı; AZ: Alelik zenginlik; H_O: Gözlenen heterozigotluk; H_E: Beklenen heterozigotluk; ÖA: Özgü alel sayısı; F_{IS}: Popülasyon içi fiksasyon indeksi)

Popülasyon	AS	AZ	H _O	H _E	ÖA	F _{IS}
KAL	71	5,07	0,66	0,57	2	-0,10
CEV	86	6,14	0,62	0,64	5	0,10
IKZ	64	4,57	0,62	0,57	4	-0,02
ALI	77	5,50	0,69	0,61	1	-0,07
GUN1	83	5,92	0,74	0,68	2	-0,04
GUN2	55	3,92	0,73	0,64	0	0,05
SEN	37	2,64	0,65	0,47	7	-0,32
CAT	83	5,92	0,63	0,62	1	0,05
SUC	70	5,00	0,65	0,66	0	0,10
HEM	82	5,85	0,72	0,65	2	-0,03
PAZ	58	4,14	0,59	0,53	1	-0,07
KAP	37	2,64	0,65	0,50	0	-0,25
ARD	80	5,71	0,64	0,61	4	0,00
YAY	92	6,57	0,68	0,66	0	0,01
FIN	38	2,71	0,64	0,47	3	-0,17
ORT	79	5,64	0,62	0,63	5	0,06
HOP	36	2,57	0,57	0,43	0	0,03
MUR	84	6,00	0,66	0,65	2	0,04
CFT	36	2,57	0,56	0,42	3	-0,29
AKH	58	4,14	0,51	0,54	16	0,09
BOR	78	5,57	0,58	0,53	1	-0,01
MES	72	5,14	0,55	0,54	3	0,02

Toplam alel sayısının en düşük olduğu popülasyonlar 36 alel ile CFT ve HOP, en yüksek olduğu popülasyon ise 92 alel ile YAY popülasyonudur. Özgü alel içermeyen popülasyonlar GUN2, SUC, KAP, HOP ve YAY, en yüksek özgü alele sahip olan ise 16 alel ile AKH popülasyonudur. Beklenen heterozigotluk (H_E) değerleri 0,51 ve 0,74 arasında, gözlenen heterozigotluk (H_O) değeri ise 0,42 ve 0,68 arasında değişmiştir. En yüksek gözlenen heterozigotluk değeri GUN1, en düşük gözlenen heterozigotluk değeri ise AKH popülasyonunda tespit edilmiştir.

Soy içi üreme katsayıları -0,32 ve 0,10 arasında değişmiştir. Popülasyonların geneli için güçlü bir soy içi üreme tespit edilmemiştir. Pozitif değerler heterozigot eksikliğini, negatif değerler ise heterozigot fazlalığını göstermektedir. Negatif değerler oransal olarak *B. bufo* türünü temsil eden popülasyonlar içerisinde daha fazla gözlenmiştir. İncelenen 22 popülasyon arasında ikili F_{ST} mesafeleri ile ilgili olarak, en yüksek farklılaşma derecesi FIN ve CFT popülasyonları arasında gözlenmiştir (0,383). Buna karşılık, en düşük farklılaşma derecesi SUC ve GUN2 popülasyonları arasında bulunmuştur (0,000). Ayrıca, YAY popülasyonun, diğer tüm popülasyonlar arasındaki ikili mesafeler 0,005 ila 0,184 arasında değişmekte olup, çoğunlukla çok az seviyede genetik farklılaşma düzeyi göstermiştir (Tablo 10).

Kümeleme analizi sonuçlarına göre ise hibrit zon merkezi olan YAY popülasyonunun coğrafik olarak doğusunu temsil eden ve *B. verrucosissimus* türüne denk gelen grup ile Artvin ilindeki CFT ve MUR, Rize ilindeki YAY ve batısında kalan diğer popülasyonların oluşturduğu grup olmak üzere iki temel grubun oluştuğu belirlenmiştir. Ayrışımın incelendiğinde ise mitokondriyal kontak olarak belirlenen SUC, HEM ve CAT popülasyonlarının CFT, MUR ve YAY popülasyonları ile bir alt küme oluşturduğu görülmektedir. Kümeleme mesafelerine bağlı ısı haritası Şekil 24'te sunulmuştur.



Şekil 24. Mikrosatellit DNA verilerine dayalı olarak oluşturulan dendrogram ve popülasyonlar arası genetik benzerlik oranını temsil eden ısı haritası. Grafiklerde temsilci olarak her bir popülasyon içerisinde bir bireye ait kod rastgele atanmıştır. Isı haritasındaki koyu renkler yüksek genetik benzerliği açık renkler ise düşük genetik benzerliği belirtmektedir.

Tablo 10. Genotiplenen 14 mikrosatellit lokusuna ait verilerin bütünsel değerlendirilmesine dayalı olarak hesaplanmış popülasyonlar arası ikili genetik mesafeler (alt diyagonal) ve istatistiksel anlamlılık değerleri (üst diyagonal)

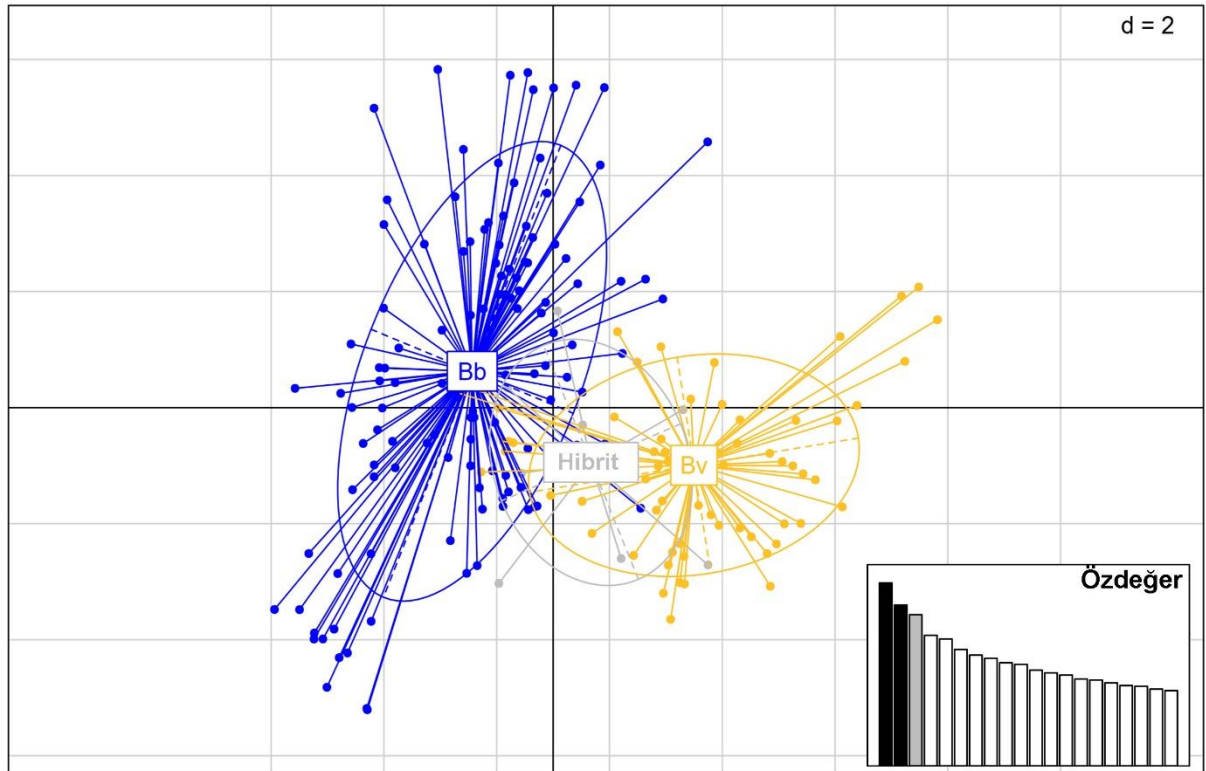
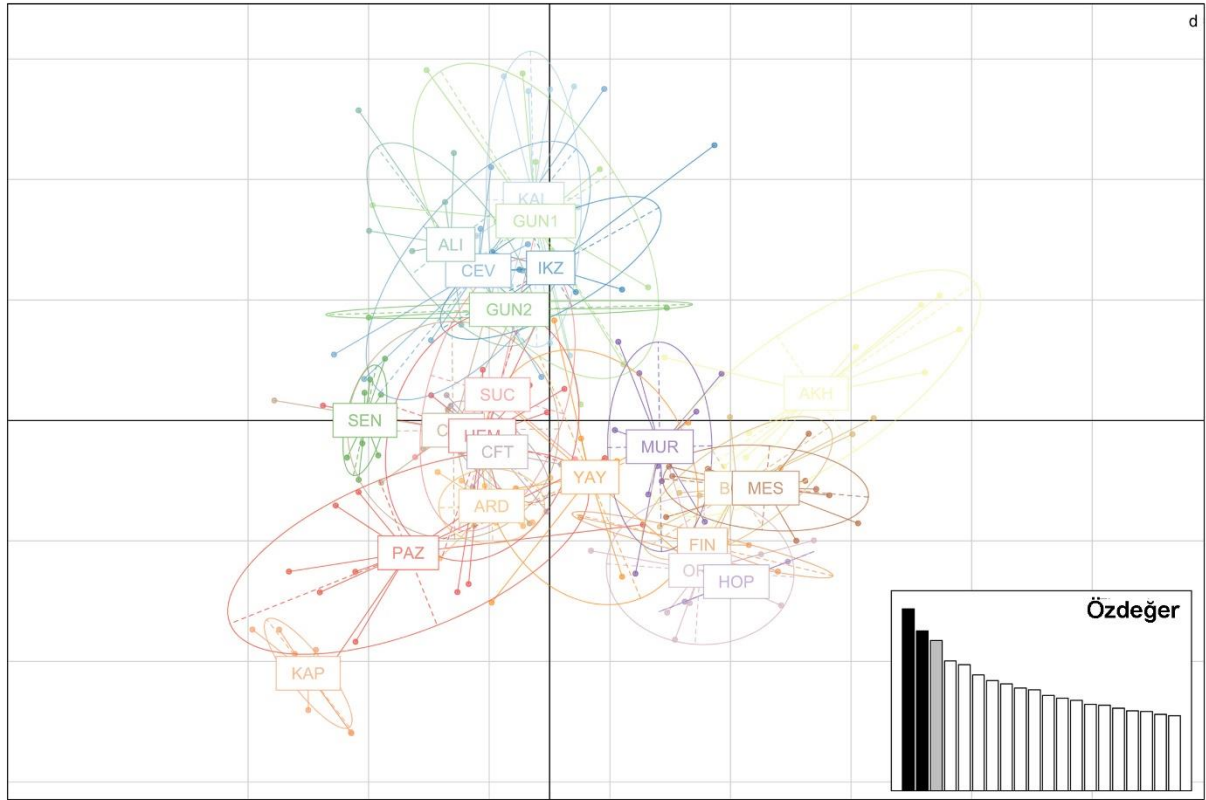
	KAL	CEV	IKZ	ALI	GUN1	GUN2	SEN	CAT	SUC	HEM	PAZ	KAP	ARD	YAY	FIN	ORT	HOP	MUR	CFT	AKH	BOR	MES
KAL		0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CEV	0,043		0,000	0,009	0,000	0,081	0,000	0,000	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
IKZ	0,092	0,058		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ALI	0,068	0,039	0,064		0,000	0,054	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GUN1	0,062	0,035	0,066	0,061		0,261	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,072	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GUN2	0,092	0,036	0,112	0,049	0,012		0,000	0,000	0,585	0,027	0,000	0,090	0,000	0,027	0,909	0,018	0,189	0,045	0,009	0,018	0,009	0,000
SEN	0,193	0,148	0,188	0,144	0,166	0,180		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CAT	0,100	0,071	0,089	0,073	0,091	0,051	0,151		0,306	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SUC	0,087	0,034	0,084	0,045	0,047	0,000	0,161	0,006		0,135	0,000	0,000	0,009	0,225	0,009	0,000	0,090	0,090	0,000	0,000	0,000	0,000
HEM	0,113	0,054	0,107	0,088	0,079	0,052	0,157	0,052	0,015		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PAZ	0,214	0,147	0,203	0,177	0,186	0,149	0,210	0,115	0,105	0,121		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
KAP	0,246	0,161	0,230	0,201	0,225	0,217	0,249	0,139	0,140	0,146	0,182		0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARD	0,134	0,104	0,128	0,103	0,124	0,076	0,179	0,055	0,038	0,075	0,120	0,138		0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
YAY	0,091	0,073	0,092	0,074	0,071	0,044	0,156	0,054	0,005	0,057	0,127	0,142	0,032		0,009	0,009	0,054	0,243	0,000	0,000	0,000	0,000
FIN	0,237	0,201	0,219	0,230	0,184	0,151	0,317	0,182	0,141	0,174	0,262	0,298	0,177	0,098		0,000	0,189	0,000	0,009	0,000	0,000	0,009
ORT	0,142	0,137	0,147	0,152	0,118	0,095	0,204	0,101	0,087	0,111	0,194	0,189	0,117	0,071	0,116		0,027	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000
HOP	0,211	0,173	0,222	0,210	0,151	0,084	0,344	0,172	0,071	0,132	0,217	0,303	0,123	0,098	0,210	0,074		0,054	0,009	0,036	0,018	0,180
MUR	0,099	0,088	0,090	0,079	0,079	0,051	0,181	0,069	0,030	0,072	0,133	0,183	0,059	0,006	0,109	0,061	0,049		0,000	0,000	0,000	0,000
CFT	0,245	0,217	0,237	0,204	0,193	0,230	0,277	0,192	0,196	0,181	0,291	0,325	0,178	0,184	0,383	0,253	0,329	0,180		0,000	0,000	0,000
AKH	0,178	0,154	0,166	0,148	0,149	0,130	0,207	0,130	0,119	0,143	0,235	0,251	0,132	0,107	0,253	0,123	0,179	0,072	0,235		0,000	0,000
BOR	0,156	0,142	0,151	0,187	0,158	0,172	0,226	0,175	0,143	0,134	0,233	0,259	0,163	0,089	0,184	0,111	0,153	0,089	0,299	0,171		0,000
MES	0,181	0,160	0,171	0,187	0,157	0,176	0,274	0,180	0,138	0,136	0,195	0,288	0,133	0,089	0,215	0,142	0,134	0,084	0,274	0,176	0,071	

3.3.2. Çok Değişkenli İstatistiksel Analiz Sonuçları

PCA analizi ile çıkarsaması yapılan ilk iki genetik bileşen, toplam genetik varyansın %6,29'unu açıklamıştır. Bileşenlerin özdeğerleri sırasıyla 6,27 ve 5,50 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, hibrit bölge de dahil olmak üzere popülasyon ve tür etiketleri kullanılarak görselleştirilmiştir. Popülasyonlar genetik uzayda nispeten yakın saçılım göstermiştir. Bununla birlikte, STRUCTURE sonuçlarına karşılık gelen saf ve karışım popülasyonları olarak üç ana kümenin var olduğu ve net bir şekilde ayrıştığı görülmüştür. Her iki türün saf popülasyonları, genetik uzayda farklı eksenlerde kümelenmiş ve potansiyel hibritler (YAY popülasyonu) saf tür gruplarının ortasında ara konuma sahip olmuştur (Şekil 25). Analiz sonuçlarına göre, *Bufo bufo* türüne karşılık gelen popülasyonlar negatif ortalama merkez değerlerine sahipken, *B. verrucosissimus* türü içerisine atanan popülasyonlar pozitif merkez skorlarına sahiptir (Tablo 11). Bununla birlikte, CFT popülasyonunda *B. bufo* temsilcileri gibi negatif bir ortalama merkez değeri (*centroid size*) tespit edilmiştir. Ayrıca, YAY popülasyonundan doğuya doğru takip eden dağılımda ortalama ağırlık merkezi değerlerinin matematiksel koordinat düzlemi açısından yön değiştirdiği belirlenmiştir.

Tablo 11. PCA analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki ortalama merkez değerleri (Bb: *B. bufo*; Bv: *B. verrucosissimus*)

PCA Merkez Değerleri					
Popülasyonlar				STRUCTURE Grupları	
KAL	-0,26	KAP	-4,00	Bb	-1,43
CEV	-1,18	ARD	-0,96	Hibrit	0,67
IKZ	0,01	YAY	0,67	Bv	2,49
ALI	-1,63	FIN	2,53		
GUN1	-0,22	ORT	2,49		
GUN2	-0,67	HOP	3,09		
SEN	-3,06	MUR	1,82		
CAT	-1,59	CFT	-0,86		
SUC	-0,86	AKH	4,42		
HEM	-1,11	BOR	3,11		
PAZ	-2,34	MES	3,58		

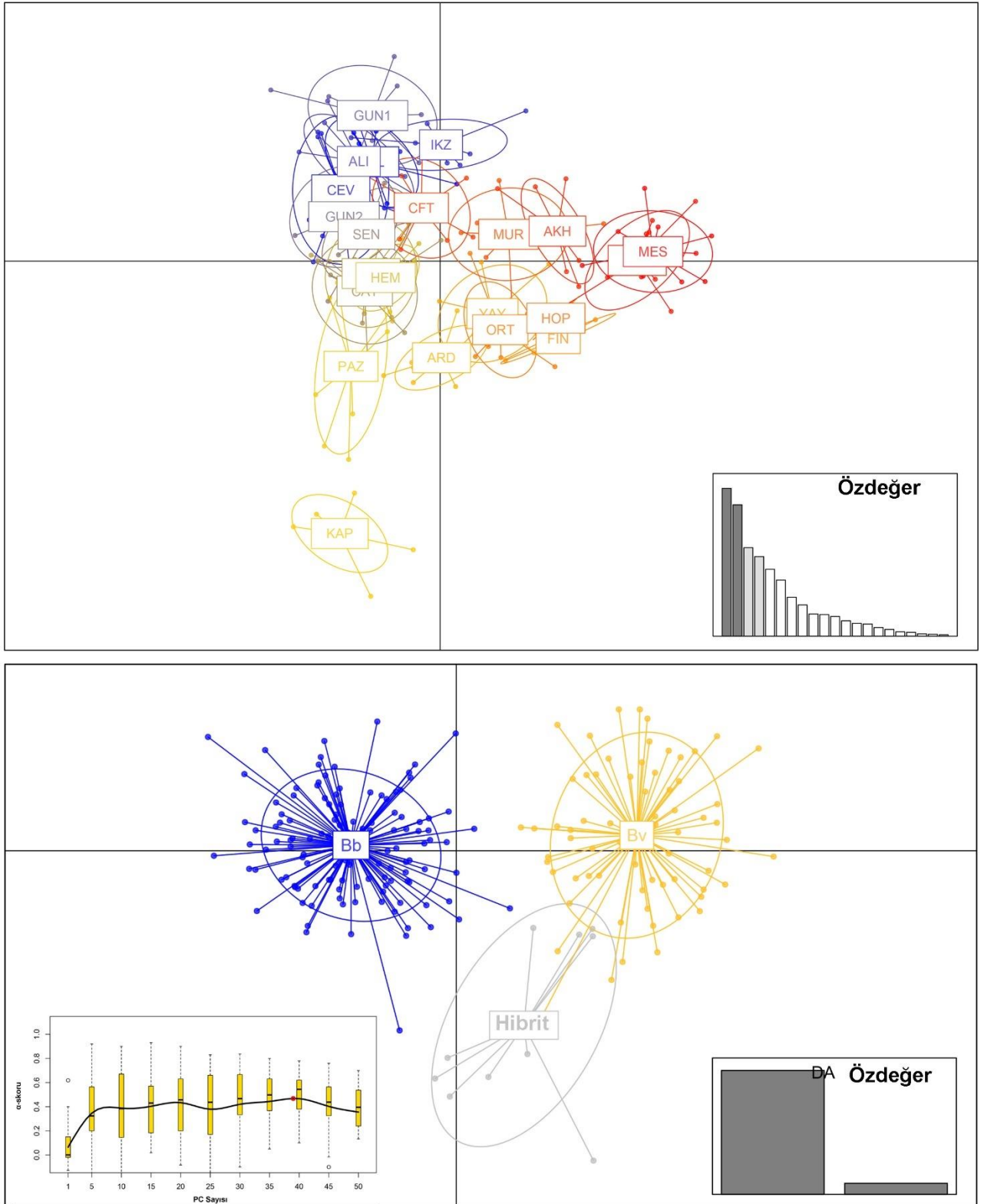


Şekil 25. PCA analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki saçılım grafikleri
(Bb: *B. bufo*; Bv: *B. verrucosissimus*)

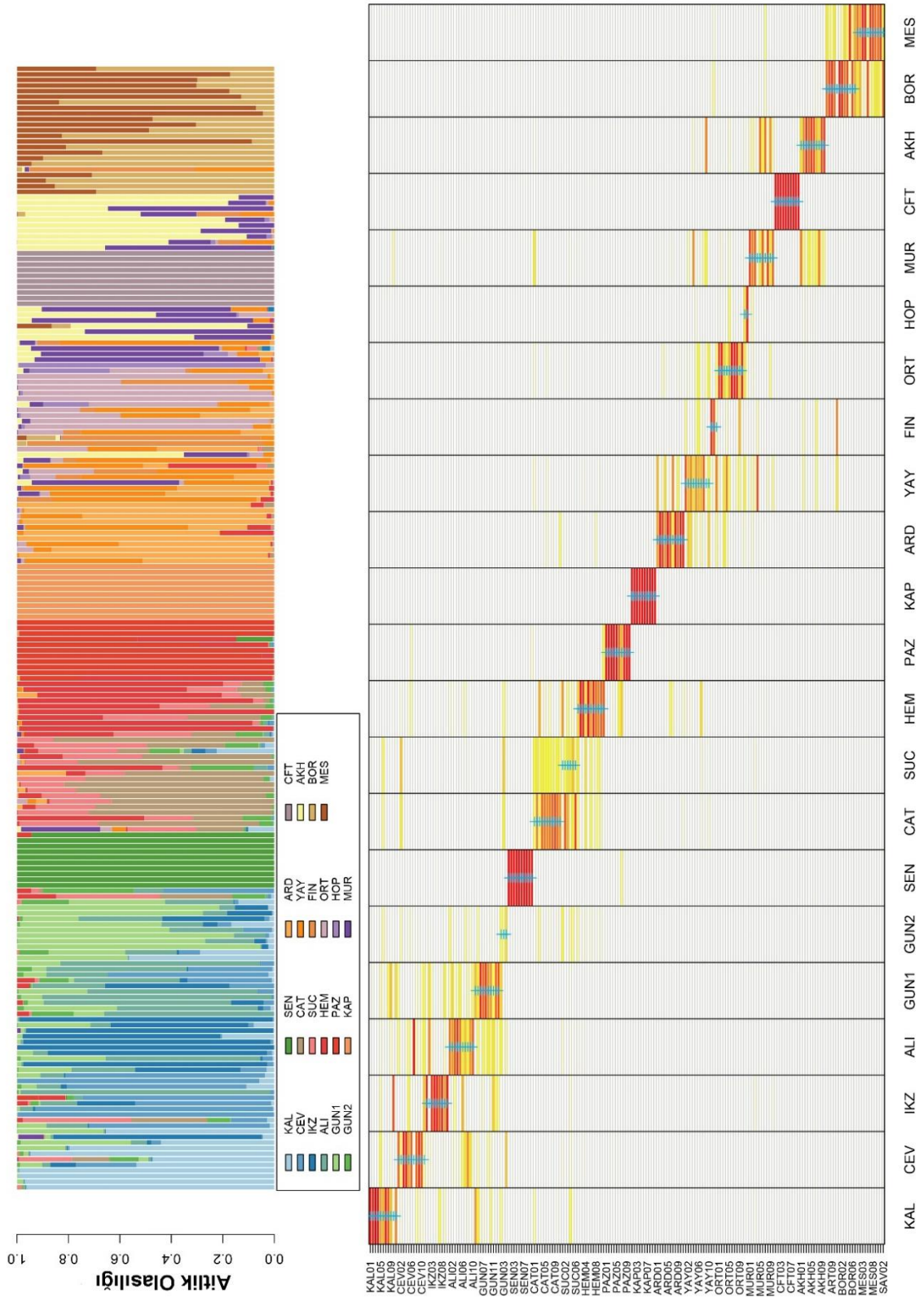
DAPC analizinde, α skoruna göre seçilen 40 PC toplam genetik varyansın %80,32'sini tanımlamıştır. DAPC sonuçlarına göre popülasyonların genetik uzaydaki saçılımı coğrafik konumları ile uyumlu şekilde konumlanmıştır (Şekil 26). Genetik olarak *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerini temsil eden saf popülasyonlar genetik uzayda dikey eksen hattı boyunca net olarak ayrılmıştır. CFT popülasyonu ise saf *B. bufo* popülasyonlarına daha yakın bir konuma yerleşmiştir (Tablo 12). Hibrit zon merkezi olan YAY popülasyonu ise ara konuma yerleşmiştir. DAPC sonuçları, popülasyonlardaki tüm bireylerin %81,59'unu doğru kümeler içerisine atamıştır. Genetik uzaydaki saçılımı temsil eden birinci fonksiyona ait özdeğer (LD1) 74,07, ikinci fonksiyona ait özdeğer (LD2) ise 65,80 olarak hesaplanmıştır. STRUCTURE sonuçlarına göre oluşturulan kümelere doğru şekilde atanan bireylerin oranı %96,51 olarak belirlenmiştir (Şekil 27). Grup özelinde ise *Bufo bufo* türünü temsil eden Bb grubu %98,37, *B. verrucosissimus* türünü temsil eden Bv grubu %98,52, Hibrit grup ise %60 oranında doğru sınıflandırılmıştır. Başlangıç olarak Bb grubu 123, Bv grubu 68, hibrit grup ise 10 birey ile analize dahil olmuş, final değerlendirmesinde ise bireyler 121 Bb, 72 Bv ve 8 hibrit birey olarak taksim edilmiştir (Şekil 28). Genetik uzaydaki saçılımı temsil eden birinci fonksiyona ait özdeğer (LD1) 508,83, ikinci fonksiyona ait özdeğer (LD2) ise 45,64 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 12. DAPC analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki ortalama merkez değerleri (Bb: *B. bufo*; Bv: *B. verrucosissimus*)

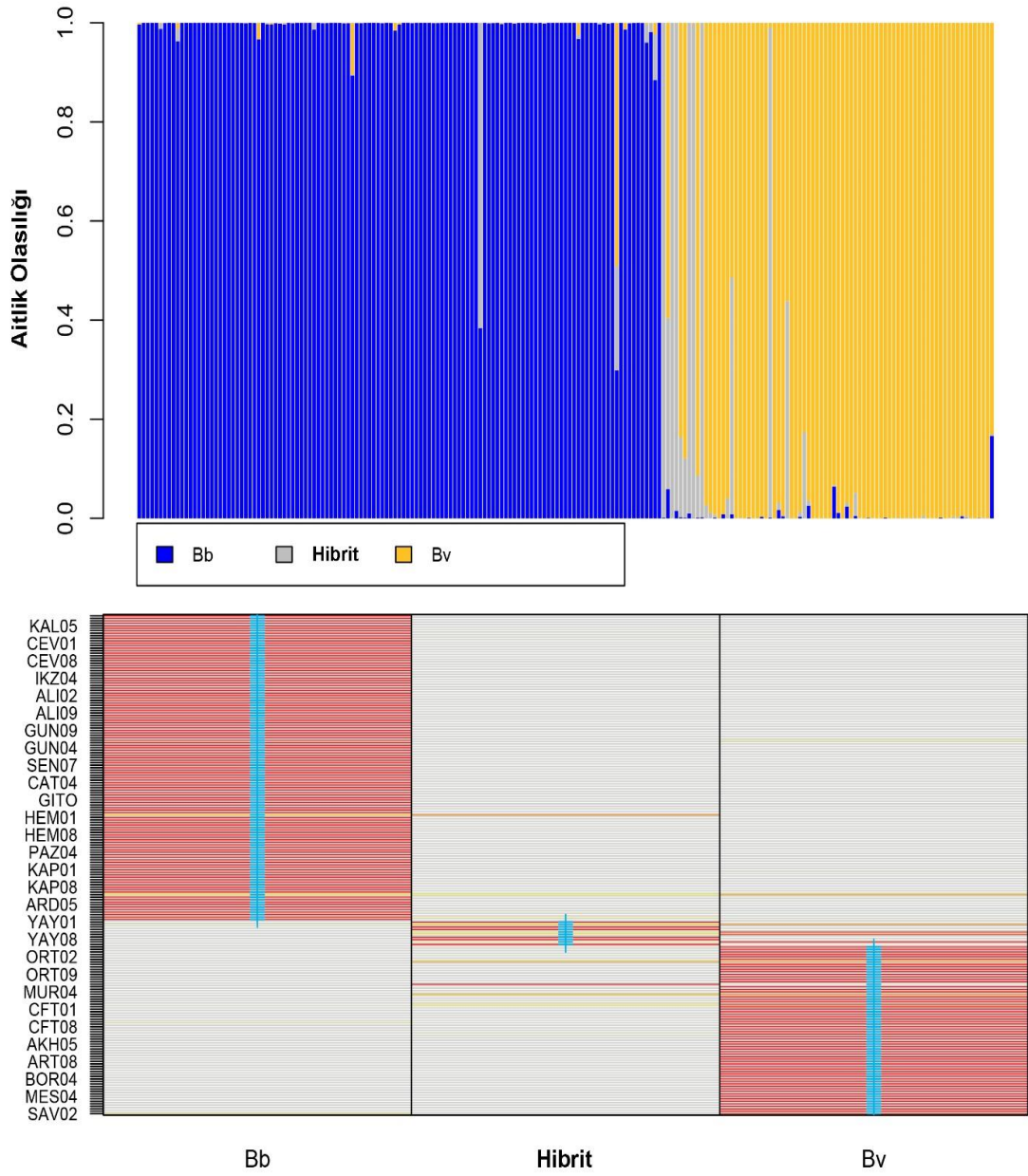
DAPC Merkez Değerleri					
Popülasyonlar				STRUCTURE Grupları	
KAL	-1,93	KAP	-2,84	Bb	-1,76
CEV	-2,81	ARD	0,03	Hibrit	1,13
IKZ	0,02	YAY	1,47	Bv	3,02
ALI	-2,30	FIN	3,33		
GUN1	-1,91	ORT	1,70		
GUN2	-2,72	HOP	3,27		
SEN	-2,08	MUR	1,93		
CAT	-2,13	CFT	-0,53		
SUC	-1,95	AKH	3,31		
HEM	-1,54	BOR	5,57		
PAZ	-2,52	MES	6,02		



Şekil 26. DAPC analizi sonucuna göre grupların genetik uzaydaki saçılım grafikleri
(Bb: *B. bufo*; Bv: *B. verrucosissimus*)



Şekil 27. Diskriminant analizi skorlarına dayalı olarak her bir popülasyon için bireysel aitlik olasılıkları (sol) ve çapraz doğrulama matrisi (sağ). Matris üzerindeki aidiyet derecesi 0 (beyaz) ve 1 (kırmızı) arasında derecelendirilmektedir.



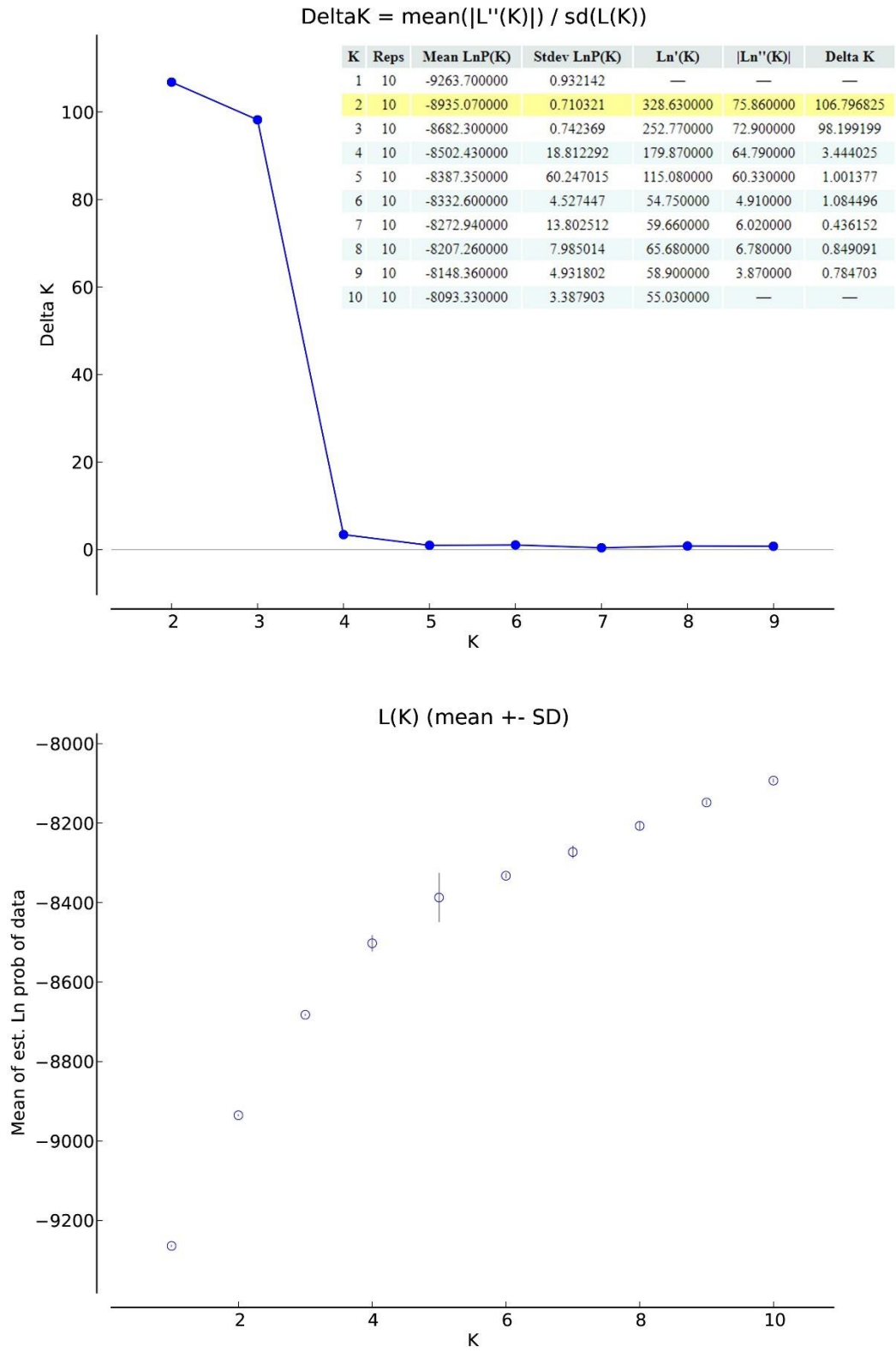
Şekil 28. Diskriminant analizi skorlarına dayalı olarak STRUCTURE grupları için bireysel aitlik olasılıkları (üst) ve çapraz doğrulama matrisi (alt). Matris üzerindeki aidiyet derecesi 0 (beyaz) ve 1 (kırmızı) arasında derecelendirilmektedir (Bb: *B. bufo*; Bv: *B. verrucosissimus*).

3.3.3. Yapısal Genetik Analiz Sonuçları

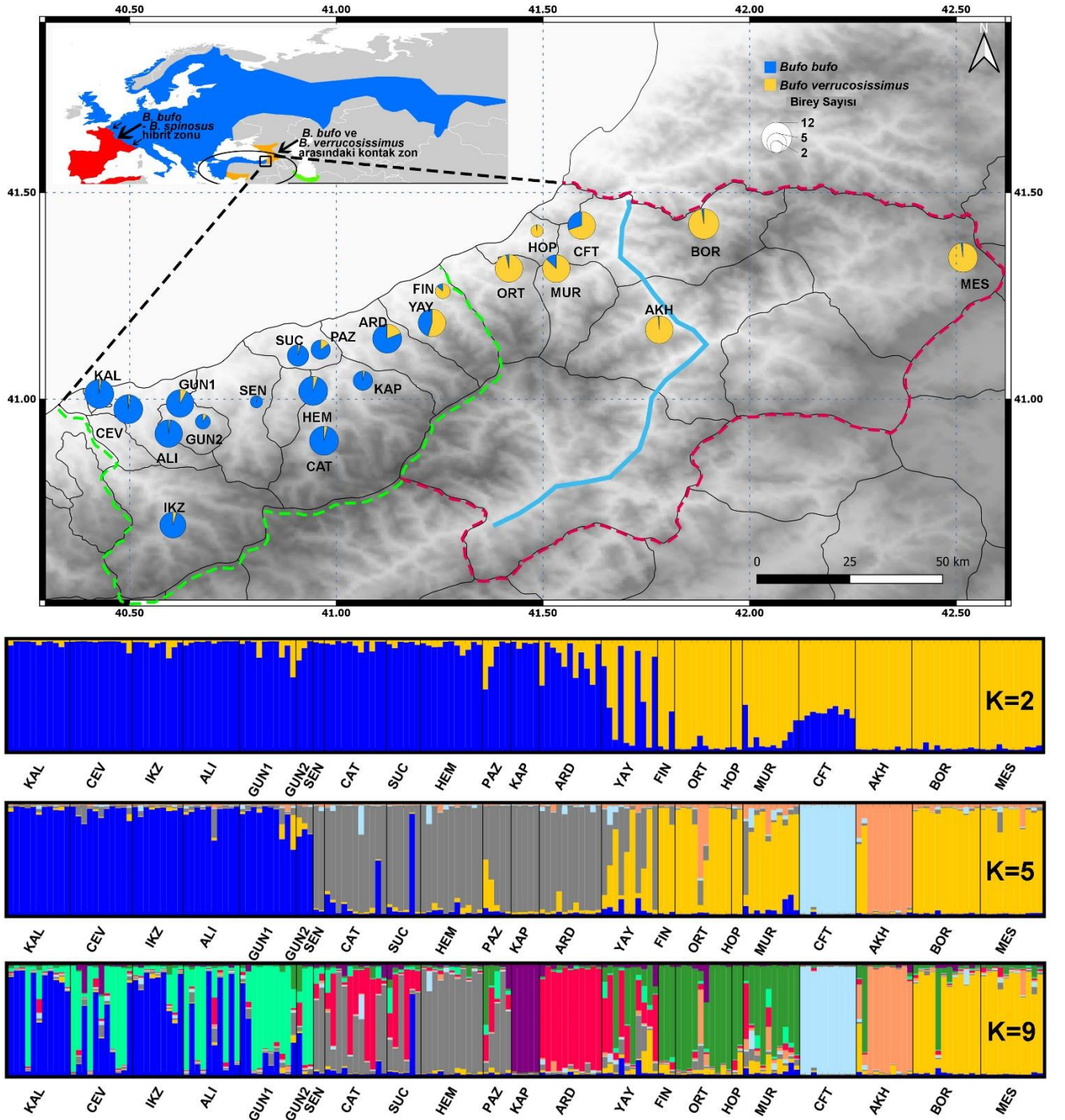
Genotipleme yapılan 201 bireyden SEN, KAP ve PAZ popülasyonlarında bir ailede dörtten fazla birey olmak üzere 3 çift öz kardeş belirlenmiştir. SEN popülasyonundaki bütün bireyler tam kardeş olarak belirlendiği için sadece 2 birey analizlere dahil edilmiştir. PAZ ve KAP popülasyonlarında kardeşlik olasılıklarına göre popülasyon başına 5 birey eksiltmiştir. Bu nedenle, takip eden analizler 183 bireyle yapılmıştır.

Analiz kapsamında 22 popülasyon arasındaki genetik farklılaşma Bayesian kümeleme yaklaşımı kullanılarak STRUCTURE programı içerisinde incelenmiştir. Analiz sonucu elde edilen veri dosyaları STRUCTURE HARVESTER içerisinde ΔK yöntemi ile test edilmiştir (Şekil 29). Elde edilen sonuçlara göre en uygun küme sayısı $K=2$ olarak belirlenmiştir ($\ln P(K)$: -8935,07; $\Delta K=106,79$). STRUCTURE analizi ile erişilen bulgular *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* taksonlarının varlığına karşılık gelen iki genetik kümenin açık bir şekilde ayrıştığını göstermiştir. Ayrıca YAY popülasyonunda ara seviyede genetik karışım oranı ve potansiyel hibridizasyon belirlenmiştir. Buna göre İyidere (KAL) ve Ardeşen (ARD) arasındaki popülasyonlar saf *B. bufo* türü, Fındıklı-Beydere (FIN) ve Şavşat (MES) arasındaki popülasyonlar ise saf *B. verrucosissimus* türü olarak atanmıştır. Ayrıca, tüm örneklerin %5,46'sını temsil eden Fındıklı-Yaylacılar (YAY) popülasyonu ($n=10$), nükleer genomda hibritleşme örüntüsü sergilemiştir. Öte yandan CFT popülasyonu *B. bufo* türüne karşılık gelen kümenin %30,20 oranındaki genetik karışımı ile temsil edilmektedir (Şekil 30).

Artan K değerleri ile (5 ila 9), *B. verrucosissimus* türünü temsil eden kümede CFT ve AKH popülasyonlarında net bir farklılaşmanın var olduğunu kanıtlamaktadır. İncelenen alanın batı ucunda, $K=2$ 'de *B. bufo* kümesini temsil eden KAL popülasyonundan GUN2'ye kadar uzanan popülasyonlarda da benzer karışım örüntüleri gözlenmektedir. Ek olarak doğu yönünde SEN-PAZ popülasyonları arasında ve FIN-MUR popülasyonları arasında da coğrafi alt kümelerin oluşumu gözlenmiştir.



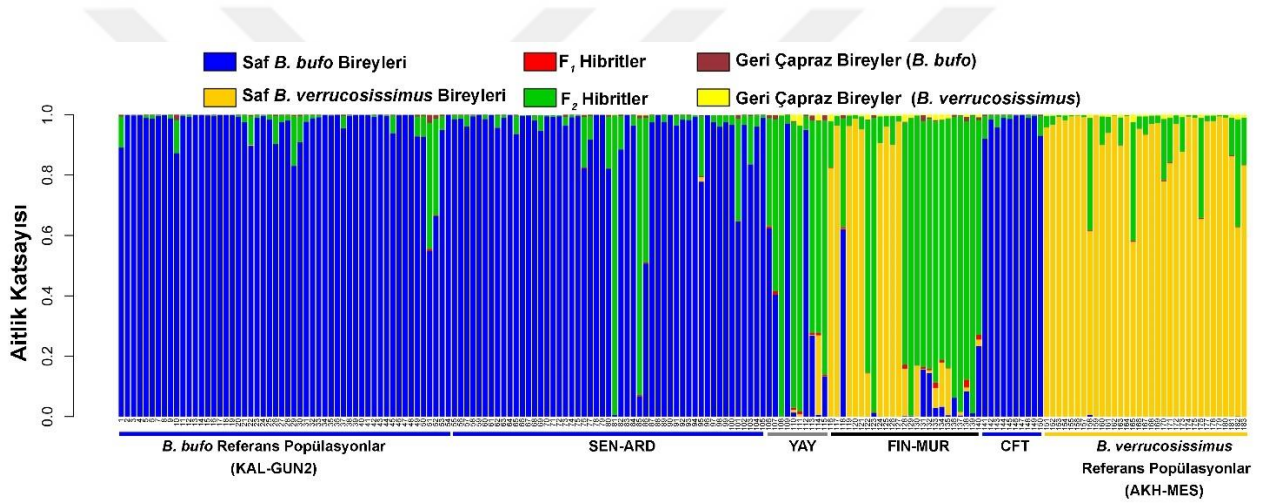
Şekil 29. ΔK metoduna göre belirlenen en uygun küme sayısı



Şekil 30. STRUCTURE sonuçlarına göre elde edilen genetik örüntünün pasta grafik görselleştirilmesi. En uygun STRUCTURE modeli (K=2) ve genetik altkümeleri yansıtan modeller için elde edilen bar grafikleri harita altında sunulmuştur.

NewHybrids analizi için STRUCTURE sonuçlarına göre KAL-GUN2 arası popülasyonlar *B. bufo* türü için AKH-MES arası popülasyonlar ise *B. verrucosissimus* türü için referans temsilciler olarak atanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre YAY-MUR

popülasyonları arasında F₂ olarak ataması yapılan hibrit bireyler gözlenmiştir. YAY popülasyonu içerisindeki 10 bireyden 7'si doğrudan F₂ olarak, 3 birey ise *B. bufo* olarak atanmıştır. Dikkat çeken bir diğer sonuç ise CFT popülasyonundaki 10 bireyin tamamı genetik olarak *B. bufo* kümesi içerisine atanmıştır. Ayrıca, *B. verrucosissimus* atamaları baskın olan FIN-ORT popülasyonları ve CFT popülasyonu arasında kalan MUR popülasyonuna ait bireylerde oluşan örüntüden kaynaklı olarak F₂ hibrit olarak sınıflandırılmıştır. Gözlenen bu durum STRUCTURE analizinde CFT popülasyonunun *B. bufo* türü ile genetik olarak benzeşmesiyle örtüşmektedir. İncelenen örnekler içerisinde hiçbir birey F₁ veya geri çapraz olarak sınıflandırılmamıştır (Şekil 31).



Şekil 31. NewHybrids analizi sonuçlarını temsil eden bar grafiği

Moleküler varyans analizi için STRUCTURE ve NewHybrids analizleriyle elde edilen sonuçları takiben 5 ayrı grup oluşturulmuştur. Birinci grup KAL-GUN2 arasındaki *B. bufo* türünü temsil eden popülasyonları kapsamaktadır. İkinci grup ise FIN-MES arasındaki *B. verrucosissimus* türünü kapsayan popülasyonlardır. Üçüncü grup mitokondriyal kontak bölge civarını ve nükleer hibrit zonu kapsayan SEN-YAY arasındaki popülasyonlardır. Dört ve beşinci gruplar ise *B. verrucosissimus* türü içerisinde STRUCTURE K=5 modeline göre ayrı birer genetik havuz oluşturmuş CFT ve AKH popülasyonlarıdır. Yapılan analiz sonucunda genetik farklılaşmanın yüksek oranda popülasyonlar içerisinde meydana geldiği görülmüştür (Tablo 13).

Tablo 13. Mikrosatellit lokuslarına göre gruplar ve popülasyonlar arasında varyans analizi değerleri (Sd: Serbestlik derecesi)

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyans
Gruplar arası	4	137,51	0,30	%6,66
Popülasyonlar arası (Grup içi)	17	195,80	0,43	%9,35
Popülasyonlar içi	380	1468,99	3,86	%83,99
Toplam	401	1802,31	4,60	%100

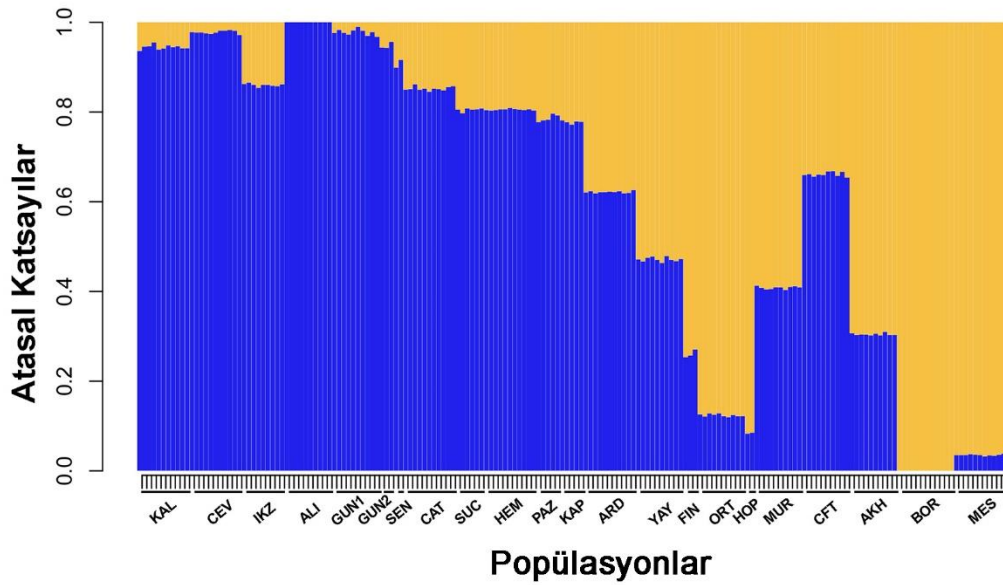
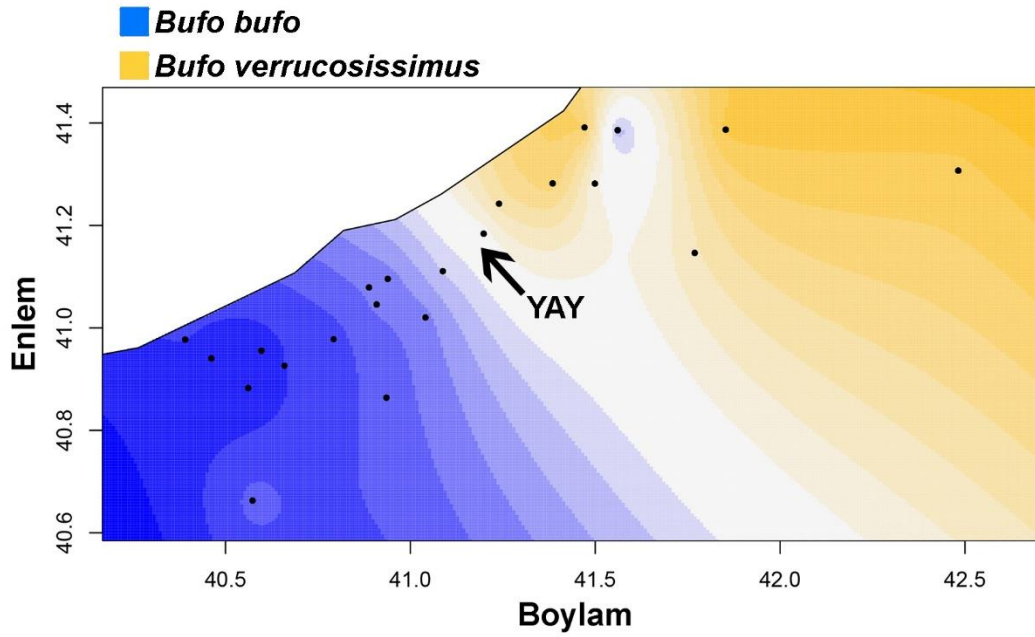
3.3.4. Mekânsal Genetik Analiz Sonuçları

STRUCTURE analizinde belirlenen en uygun K değerini takiben gerçekleştirilen TESS analizi, genetik veriler için türler arasında bir hibrit zon bölgesinin varlığını doğrulayan özdeş bir model oluşturmuştur. Çalışma alanı mekânsal bir bütün olarak değerlendirildiğinde YAY popülasyonunda minimum düzeyde genetik farklılaşma görülmüş ve iki türün karışımını yansıtacak bir benzerlik değeri hesaplanmıştır (Tablo 14). Buna göre popülasyon %47,10 oranında *B. bufo* grubu olarak kümelenen popülasyonlara %52,90 oranında ise *B. verrucosissimus* grubu olarak kümelenen popülasyonlara benzemektedir. YAY popülasyonunun batısında kalan örnekleme alanlarında *B. bufo*'yu temsil eden küme dağılışı gösterirken, *B. verrucosissimus* ile ilgili ikinci küme, çalışma alanının doğu tarafını domine etmiştir fakat daha az bir genetik yüzey alanı kaplamıştır (Şekil 32).

Genetik karışımı temsil eden bar grafik bulguları ORT popülasyonuna kadar türler arasında kademeli bir geçiş olduğunu göstermiştir. Ancak, STRUCTURE analizinin aksine, MUR ve CFT popülasyonları sırasıyla %40,81 ve %66,06 oranında *B. bufo* türü ile benzeşmektedir (Tablo 14). Coğrafik enterpolasyon haritası, hibrit zon bölgesinin merkezini YAY popülasyonu olarak vurgulamıştır ve saf türlere ait gradyanlar, diğer genetik analizlerle uyumlu bir dağılım göstermiştir. Bununla birlikte, CFT popülasyonu, genetik yüzey tahminine dayalı olarak *B. verrucosissimus* genetik yüzey alanı içerisinde kuşatılmış bir *B. bufo* popülasyonu karakteristiği sergilemiştir.

Tablo 14. TESS analizi sonucu elde edilen aitlik katsayıları

Popülasyonlar									
KAL	0,94	GUN2	0,94	PAZ	0,78	ORT	0,12	BOR	0,00
CEV	0,97	SEN	0,90	KAP	0,77	HOP	0,08	MES	0,03
IKZ	0,85	CAT	0,85	ARD	0,62	MUR	0,40		
ALI	0,99	SUC	0,80	YAY	0,47	CFT	0,66		
GUN1	0,97	HEM	0,80	FIN	0,26	AKH	0,30		



Şekil 32. TESS analizi ile oluşturulan coğrafi enterpolasyon haritası (üst) ve popülasyonlara ait atamaları gösteren bar grafik (alt).

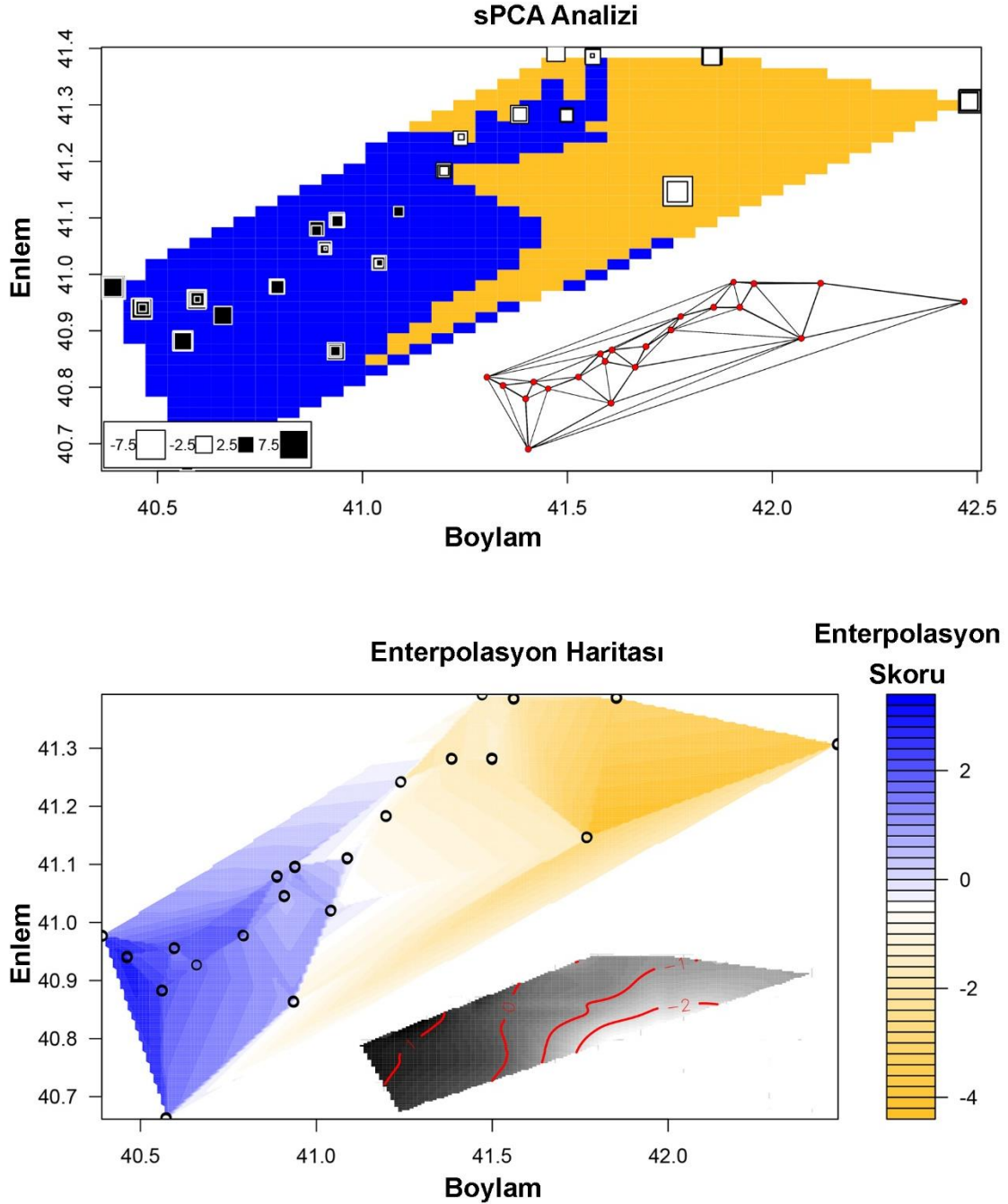
Yapılan sPCA analizi sonucunda 15 ayrı eksenin çıkarsaması yapılmıştır. Elde edilen eksenler toplam varyansın %29,92'sini açıklamıştır (Tablo 15). Çalışma alanını kapsayan veriler için uygulanan global r testi istatistiksel olarak anlamlı bir genetik yapılanmayı işaret etmiş ($p<0,01$) fakat lokal r testi için anlamlı bir bulguya ulaşılmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 15. sPCA analizi ile çıkarsaması yapılan eksenlere ait açıklayıcı bilgiler

Eksen	Özdeğer	Varyans	Moran'ın I Değeri
1	4,28	3,32	0,76
2	3,69	2,83	0,77
3	2,85	2,62	0,68
4	2,59	2,52	0,61
5	2,46	2,07	0,70
6	2,12	2,13	0,61
7	2,04	1,91	0,63
8	1,82	1,94	0,59
9	1,62	1,85	0,55
10	1,44	1,70	0,52
11	1,30	1,52	0,52
12	1,14	1,38	0,53
13	1,09	1,34	0,51
14	0,96	1,33	0,48
15	0,86	1,39	0,41

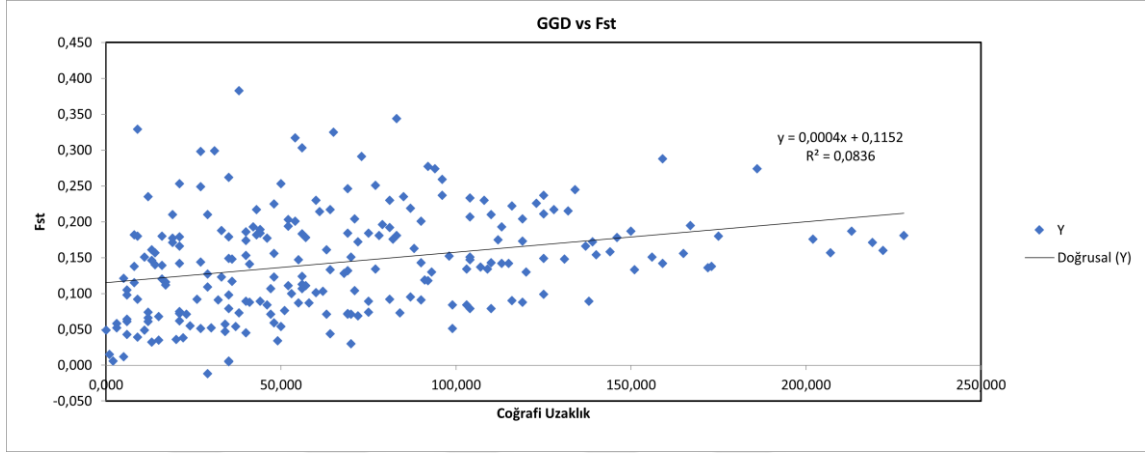
Çalışma hattı kapsamında *B. bufo* türünün dağılım alanı olan batı ucundan *B. verrucosissimus* türünün dağılım alanı olan doğu ucuna doğru gidildikçe mekânsal olarak kademeli bir genetik geçişin var olduğu gözlenmiş ve izohips değerlerinin klinal şekilde sıralandığı belirlenmiştir. Kontur haritasında koyu renkten açık renge doğru oluşan geçiş ise *B. verrucosissimus* türü dağılım alanı içerisindeki popülasyonlarda genetik yapılanma ve farklılaşmanın daha belirgin olduğunu göstermektedir. Birinci eksen üzerinde popülasyonların aldığı yük değerlerine göre oluşturulan mekânsal harita incelendiğinde batı-doğu hattını takip eden bir farklılaşma gözlenmiştir. Harita üzerinde yer alan karelerin büyüklüğü farklılaşma derecesini, koyu renkler pozitif ve açık renkler ise negatif yük skorlarını işaret etmektedir. Buna göre *B. verrucosissimus* türünü temsil eden ve STRUCTURE-NewHybrids analizlerinde saf tür olarak belirlenen AKH, BOR ve MES popülasyonları mekânsal olarak en yüksek derecede farklılaşan popülasyonlar olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca STRUCTURE-NewHybrids-TESS analizlerine paralel şekilde MUR ve CFT popülasyonlarının dağılım gösterdiği alanlar *B. bufo* türünü temsil eden poligon içerisine yerleşmiştir.

Yük değerlerini simgeleyen karelerin renklenme değıştiği alan ise YAY popölasyonunun dağılış sahasına denk gelmektedir. Son olarak oluşturulan enterpolasyon haritasına göre iki türü temsilen minimum genetik farklılaşma YAY ve FIN popölasyonlarının bulunduğu alan civarında meydana gelmiştir (şekil 33).



şekil 33. sPCA analizi ile elde edilen genetik yüzey şemalandırması (üst) ve enterpolasyon haritası (alt).

F_{ST} değerleri kullanılarak uygulanan Mantel testi sonucunda coğrafik mesafe ve genetik farklılaşma arasında sınırlı doğrusallık gösteren anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$; Şekil 34). Lokuslara dayalı olarak gerçekleştirilen Mantel analizinde de benzer şekilde anlamlı bir ilişki belirlenmiştir ($r: 0,27$; $p < 0,01$).



Şekil 34. Genetik mesafe ve coğrafik uzaklık arasındaki ilişki modelini gösteren grafik

3.3.5. Coğrafik Klin Analizi

Yapısal ve mekânsal genetik analizler sonucunda CFT popülasyonunda gözlenen atasal genetik örüntülerden ötürü, coğrafik klinler ilgili popülasyonu içerecek ve içermeyecek şekilde iki ayrı analitik modele dayalı olarak inşa edilmiştir. Kullanılan belirteçler için oluşan en uygun klin modelleri ve model parametreleri Tablo 16'da sunulmuştur.

Tablo 16. Coğrafik klin modellerine ait parametreler (AICc: Sınırlı örneklem için doğrulanmış Akaike bilgi kriteri değeri)

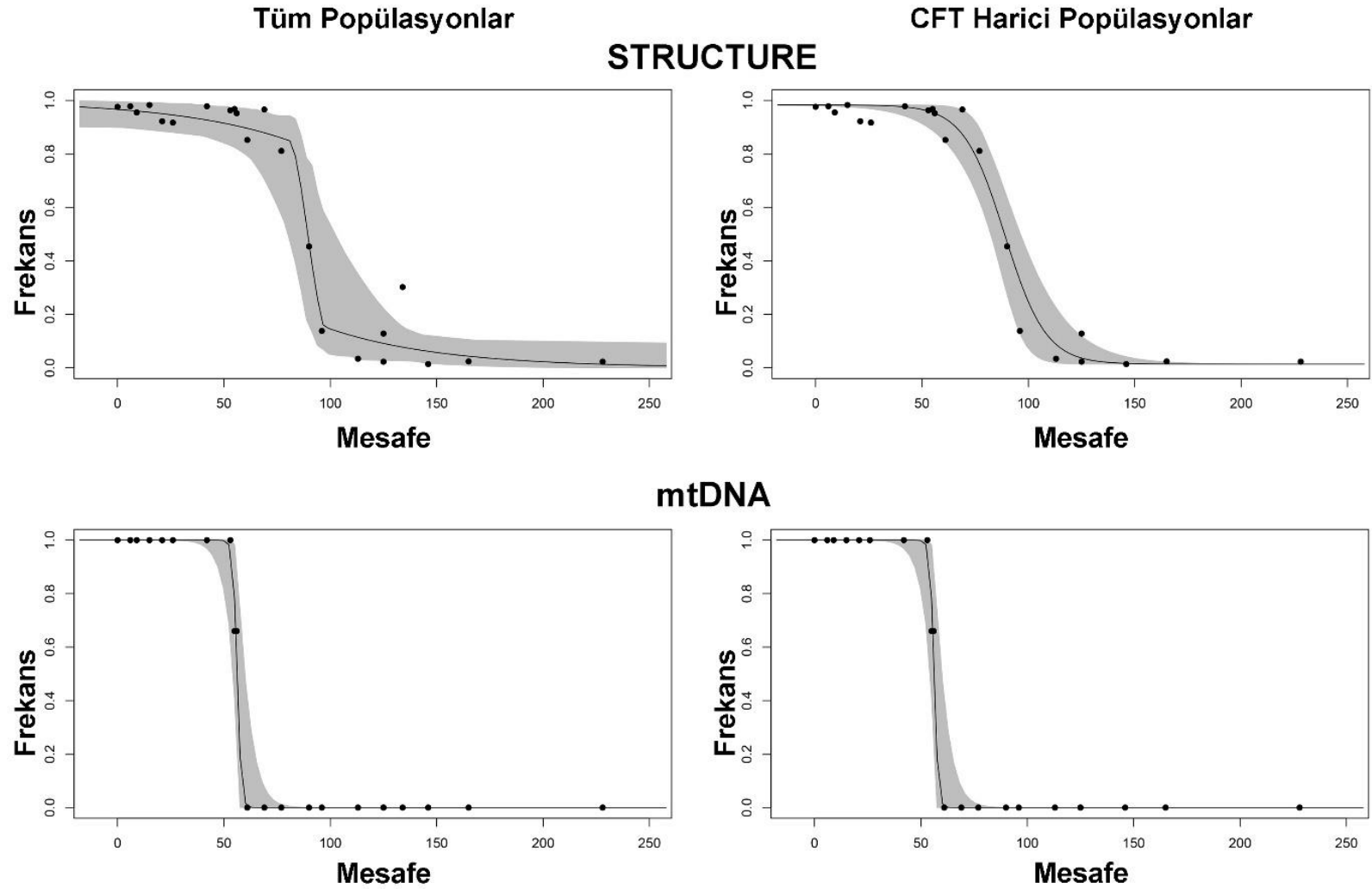
Tüm Popülasyonlara Ait Modeller				CFT Dahil Edilmeyen Modeller			
Structure	AICc	mtDNA	AICc	Structure	AICc	mtDNA	AICc
typM	17,09	typN	4,80	fixN	9,63	typN	4,81
fixN	17,25	typM	9,27	typM	11,28	typR	9,31
fixM	17,32	typL	9,27	fixM	11,42	typM	9,31
optN	17,46	typR	9,27	optN	11,91	typL	9,31
fixR	17,58	optN	9,54	fixL	12,81	optN	9,54
fixL	20,70	typB	14,05	fixR	12,95	typB	14,13
optR	20,71	optM	14,17	optM	15,85	optL	14,40
typB	20,89	optL	14,29	optR	15,94	optR	14,42
typN	20,95	optR	14,33	fixB	16,11	optM	14,43
optM	21,11	-	-	optL	16,19	-	-
fixB	21,13	-	-	typB	16,23	-	-
optL	21,71	-	-	typN	17,20	-	-
typL	22,81	-	-	typL	17,23	-	-
typR	23,20	-	-	typR	19,24	-	-
optB	25,31	-	-	optB	20,07	-	-

Nükleer DNA'yı temsil eden 14 ayrı mikrosatellit lokusunun kümülatif değerlendirmesi ile elde edilen STRUCTURE Q skorlarından yararlanılarak oluşturulan klin modeline göre *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* arasındaki hibrit zon coğrafi olarak YAY popülasyonunu temsil etmektedir ($c=89,40$ km) ve gerilim bölgesi olarak sınıflandırılabilir dar bir klin genişliği ile temsil edilmektedir ($w=17,43$ km). ARD ve FIN popülasyonları ise ayna model introgresyon kuyruğunun uç noktalarında konumlanmıştır. CFT popülasyonunu içermeyen model de ise hibrit zon merkezi 540 metre batıya doğru kaymış ($c=88,86$ km) ve klin genişliği 38,63 km olarak belirlenmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. En uygun klin modelleri için elde edilen coğrafi bilgiler (GA: Güven aralığı). Model merkez ve genişlik değerleri km cinsindedir.

Belirteç	Model	Merkez (%95 GA)	Genişlik (%95 GA)	Pmin	Pmaks
Structure	typM	89,40 (82,26-96,73)	17,43 (6,02-63,79)	0	1
Structure (CFT hariç)	fixN	88,86 (81,43-97,49)	38,62 (17,08-64,85)	0,01	0,98
mtDNA	typN	56,22 (54,50-59,70)	3,81 (1,01-16,78)	0	1
mtDNA(CFT hariç)	typN	56,20 (54,51-59,72)	3,74 (0,98-16,79)	0	1

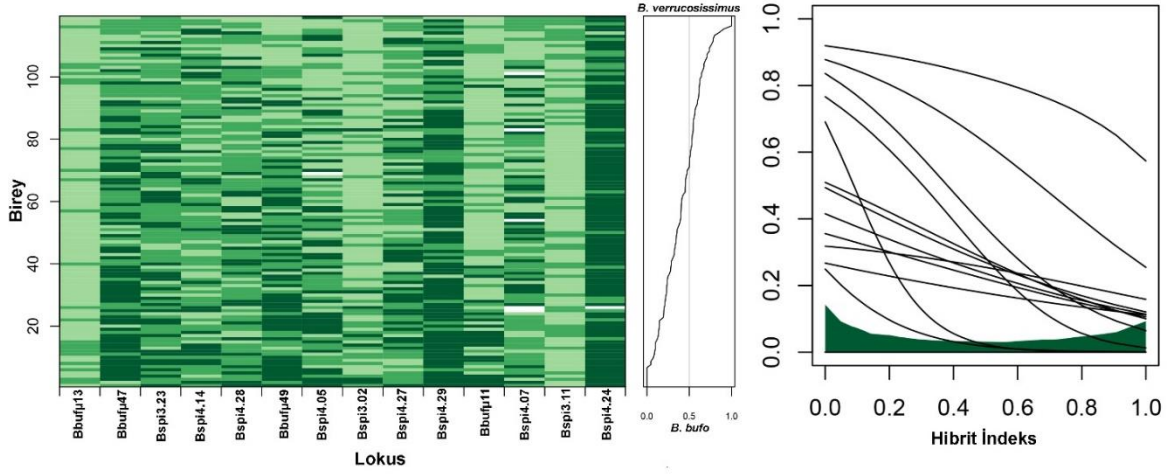
Nükleer belirteçlerin aksine, türlere ait mitokondriyal haplotiplerin frekansları ile oluşturulan klin modelleri batı yönüne kayan asimetric bir örüntü ortaya çıkarmıştır ($c=56,22$ km). Elde edilen en uygun model keskin ve dar bir klin eğrisi ile karakterize edilmiştir ($w=3,81$ km). Klin merkezi mitokondriyal kontağı oluşturan SUC popülasyonu ve *B. verrucosissimus* haplotiplerini içeren PAZ popülasyonu arasında konumlanmıştır. Benzer şekilde, CFT popülasyonunu içermeyen model ise 200 metre daha batıya kayan bir merkez ve 700 metre daha dar bir genişliğe sahip bir klin oluşturmuştur ($c=56,20$ km; $w=3,74$ km). Nükleer ve mitokondriyal klinler kendi aralarında değerlendirildiğinde uyumlu ve çakışık klin topolojileri oluşturmuş, fakat karşılıklı kıyaslandıklarında ise asimetric genetik örüntüyü kanıtlayacak şekilde yer değişen ve uyumsuz klin topolojileri sergilemişlerdir (Şekil 35).



Şekil 35. En uygun klin modelleri için oluşan coğrafik eğriler

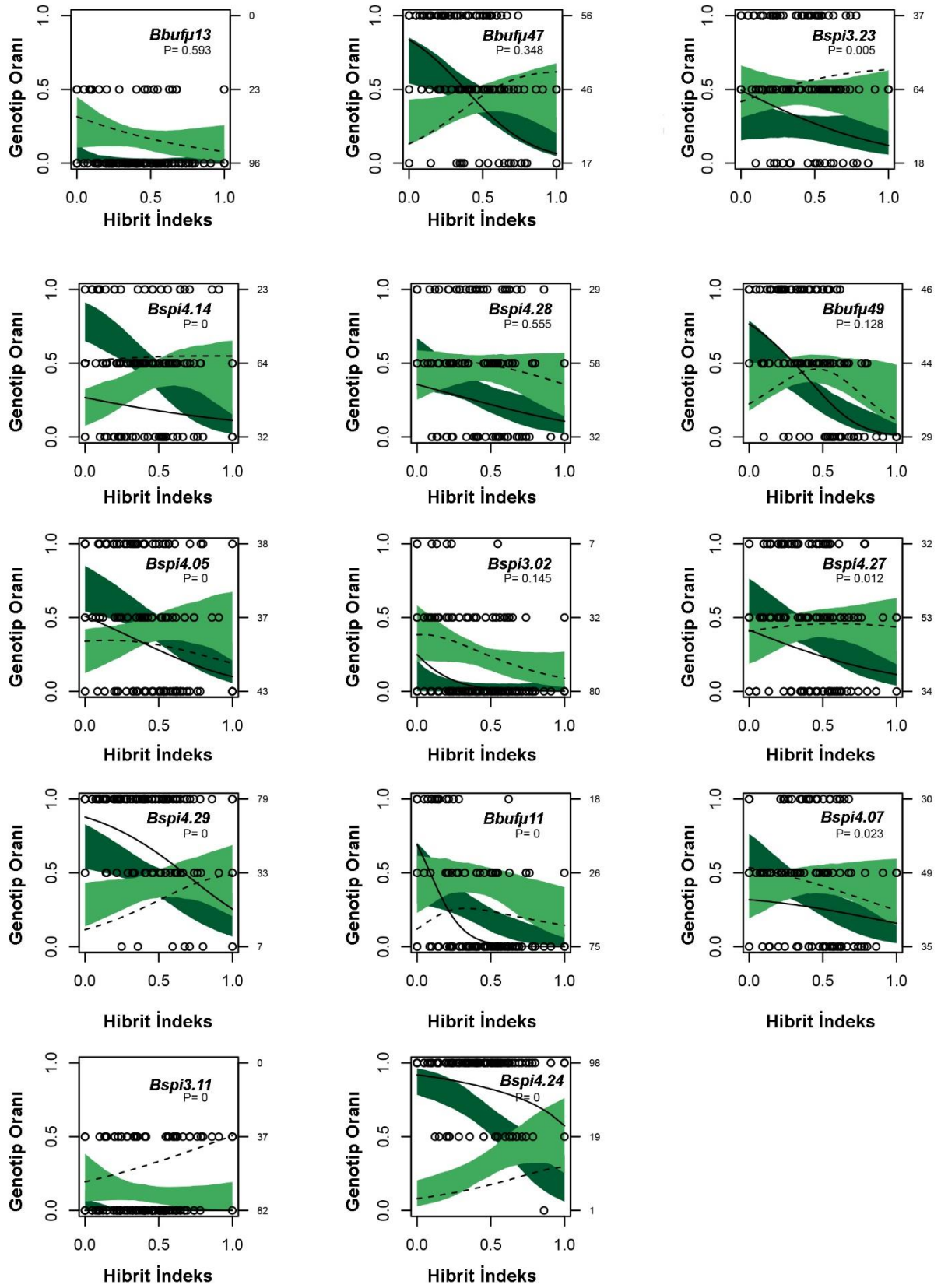
3.3.6. Genomik Klin Analizi

Genomik klinleri oluşturmak için her iki türe ait üçer popülasyonun referans olarak ataması yapılmıştır. STRUCTURE analizi ile elde edilen Q skorları göz önüne alınarak *B. bufo* türünü temsilen KAL, CEV ve IKZ popülasyonları, *B. verrucosissimus* türünü temsilen ise AKH, BOR ve MES popülasyonları atasal referans kaynakları olarak seçilmiştir. Lokusların toplu değerlendirmesi sonucu oluşan genomik klin eğrisine göre, coğrafik klinlerde introgresyon kuyruğu üzerinde yer alan ARD ve FIN popülasyonları ile hibrit zonun merkezini oluşturan YAY popülasyonuna ait bireyler genomik olarak ara karışımı yansıtan oran olan 0,5 ve civarına denk düşmüştür (Şekil 36).



Şekil 36. Tüm bireyler ve mikrosatellit belirteçleri için oluşturulan genomik harita. Koyu yeşil renk *B. bufo*, yeşil renk hibrit, açık yeşil renk ise *B. verrucosissimus* olarak atanan bireyleri temsil etmektedir. Harita yanındaki klin bütünsel lokus değerlendirmesine dayalı olarak oluşan genomik eğriyi, sağdaki şekil ise her bir lokus için oluşan genomik eğrileri temsil etmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, mikrosatellit lokusları için farklı introgresyon örüntüleri gözlenmiştir. İncelenen 14 lokustan sadece 2 lokus kademeli bir geçiş gösterirken (*Bbufu47* ve *Bbufu49*), diğer 12 lokusta keskin ve asimetric geçişler görülmüştür. Lokuslar nötral beklentilerden sapma gösteren klin topolojileri sergilemiştir. Dokuz lokus için gözlenen sapmalar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kademeli geçiş gösteren lokuslar için işleyen zayıf seçilimin aksine, 12 lokus için güçlü bir seçim baskısının var olduğu belirlenmiştir (Şekil 37).



Şekil 37. Çalışma kapsamında kullanılan 14 mikrosatellit lokusuna ait genomik klin modelleri

3.4. Morfolojik Analizler

3.4.1. Mitokondriyal DNA Grupları için Tek Değişkenli Analiz Sonuçları

Artvin ve Rize il sınırları içerisinde gerçekleştirilen arazi çalışmalarının sonucunda toplam 145 (85 ♀, 60 ♂) bireyi kapsayan bir veri seti oluşturulmuştur. Pazar-Çamlıhemşin-Hemşin ilçelerinde genetik olarak tespit edilen simpatridurumundan ötürü bu üç ilçe ayrı bir grup olarak değerlendirilmiştir. Buradaki amaç muhtemel sekonder kontak varlığında türler arasında meydana gelebilecek hibridizasyon veya gen akışına bağlı olarak morfolojik karakterlerde oluşabilecek varyasyonların etkisini ayırabilmektir. Gruplara ait açıklayıcı istatistikler Tablo 18 ve Tablo 19’da sunulmuştur.

Eşeyssel dimorfizme bağlı olarak tespit edilen boyut farkından ötürü devam eden analizlerde dişi ve erkek bireyler ayrı olarak değerlendirilmiştir. Kolmogorov-Smirnov testi sonucuna göre dişilerde VU, GG ve PD değişkenleri haricindeki ($p < 0,05$) bütün değişkenler normal dağılım göstermiştir ($p > 0,05$). Erkek bireylerde ise BU, İMTŞEKLİ, SAĞPAREN ve SOLPAREN değişkenleri haricinde ($p < 0,05$) bütün değişkenler normal dağılım göstermiştir ($p > 0,05$).

Gruplar arasında test edilen karakterlere ait ortalamalar normal dağılım gösteren değişkenler için Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) testi kullanılarak, normal dağılım göstermeyen değişkenler için ise Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Post-Hoc testleri için ise TUKEY HSD testi kullanılmıştır.

Tablo 18. Dişi bireyler için mitokondriyal DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

<i>Bufo verrucosissimus</i>						<i>Bufo bufo</i>					Mitokondriyal Kontak Grubu				
Değişken	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
VU	51	103,13	1,46	62,00	125,37	19	99,90	2,90	74,41	124,73	15	99,71	4,12	68,36	119,11
BU	51	25,59	0,40	20,25	31,92	19	24,23	0,73	18,82	31,19	15	24,13	1,27	15,23	30,72
BG	51	34,90	0,49	28,73	42,88	19	32,25	0,93	24,92	40,73	15	33,32	1,71	19,93	40,98
BDA	51	6,33	0,09	4,73	8,14	19	5,97	0,17	4,50	7,43	15	5,98	0,25	4,01	7,66
BDBUA	51	4,06	0,09	2,75	5,71	19	3,93	0,20	2,07	5,82	15	3,65	0,16	2,85	5,13
BDG	51	5,38	0,08	3,86	6,63	19	5,13	0,20	2,96	6,58	15	5,07	0,25	3,60	6,82
GÖZTYM	51	4,57	0,09	3,29	6,67	19	4,01	0,23	2,43	5,90	15	4,21	0,26	2,45	5,86
GÇ	51	9,49	0,12	7,53	11,43	19	9,39	0,20	7,62	11,08	15	9,48	0,30	6,93	10,92
TÇ	51	3,77	0,10	2,07	5,18	19	3,78	0,24	2,09	5,85	15	3,18	0,22	2,29	5,09
PU	51	22,54	0,29	17,19	26,91	19	20,96	0,68	15,96	27,45	15	21,14	1,08	13,12	26,31
DD	51	79,78	1,13	60,63	93,62	19	77,62	2,48	53,91	98,57	15	75,28	3,47	51,85	97,06
DB	51	30,99	0,52	23,95	38,43	19	30,77	1,11	22,40	40,84	15	28,58	1,58	17,36	36,02
ÖNAY	51	28,29	0,46	21,81	34,70	19	27,47	0,86	19,94	33,21	15	28,21	1,30	18,06	34,50
PARU	51	12,09	0,22	8,75	15,99	19	12,00	0,40	8,12	14,82	15	11,37	0,55	7,57	14,63
FU	51	43,17	0,57	35,48	53,97	19	41,59	1,25	30,90	53,76	15	41,11	2,10	25,49	53,54
TU	51	29,21	0,58	21,89	41,09	19	28,73	0,88	20,63	35,16	15	28,98	1,37	21,40	40,65
TAU	51	25,22	0,40	14,12	30,48	19	25,47	0,83	18,32	31,02	15	23,64	1,05	16,83	30,23
AAU	51	42,63	0,75	30,68	54,75	19	45,21	1,73	30,24	56,55	15	40,65	2,09	26,60	52,82
DMT2P	51	26,01	0,50	19,70	35,13	19	26,94	1,16	17,54	36,26	15	24,90	1,34	15,17	32,22
DMTU	51	4,36	0,10	2,54	5,97	19	4,29	0,21	2,86	6,07	15	4,39	0,25	2,78	6,09
GG	51	12,95	0,18	9,03	15,12	19	12,16	0,34	8,90	15,71	15	12,22	0,55	6,49	14,52

Tablo 18 (Devamı). Dişi bireyler için mitokondriyal DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Mitokondriyal Kontak Grubu				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
PARÖNÜC	51	24,14	0,30	19,39	29,45	19	23,43	0,65	19,15	30,12	15	22,49	0,97	14,42	27,26
PARARKAUC	51	35,22	0,57	26,30	42,03	19	33,09	1,18	25,92	44,95	15	32,89	1,70	20,39	40,05
SAĞPAREN	51	8,73	0,16	6,70	12,10	19	8,96	0,26	7,25	11,50	15	8,92	0,35	6,16	11,05
SOLPAREN	51	8,61	0,18	5,08	12,10	19	8,94	0,26	7,25	11,32	15	8,82	0,39	5,33	11,05
PD	51	0,689	0,008	0,568	0,841	19	0,712	0,012	0,630	0,818	15	0,692	0,020	0,583	0,911
PA	51	58,84	1,13	42,00	77,00	19	60,26	1,422	49,00	71,00	15	56,53	1,99	42,00	68,00
İMTBOY	51	6,14	0,10	4,31	7,84	19	5,72	0,22	3,67	7,82	15	5,55	0,25	4,04	7,30
İMTEN	51	3,48	0,06	2,58	5,42	19	3,46	0,14	2,22	4,68	15	3,40	0,14	2,35	4,13
İMTBOYUT	51	0,059	0,000	0,048	0,072	19	0,057	0,001	0,049	0,066	15	0,055	0,001	0,045	0,068
İMTŞEKLİ	51	0,570	0,008	0,458	0,691	19	0,608	0,017	0,475	0,747	15	0,616	0,015	0,535	0,739

Tablo 19. Erkek bireyler için mitokondriyal DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Mitokondriyal Kontak Grubu				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
VU	42	72,78	0,59	65,74	80,28	10	72,48	1,35	63,50	77,88	8	70,32	1,68	62,65	77,77
BU	42	17,18	0,15	14,98	19,52	10	17,42	0,39	15,89	19,31	8	17,00	0,46	14,75	19,15
BG	42	23,51	0,20	20,23	26,50	10	23,19	0,59	21,19	26,12	8	22,96	0,34	21,32	24,52
BDA	42	4,67	0,07	3,69	5,66	10	4,91	0,14	4,23	5,70	8	4,70	0,11	4,35	5,42
BDBUA	42	3,13	0,07	2,22	4,15	10	2,99	0,16	2,10	3,72	8	2,96	0,21	2,03	3,78
BDG	42	3,56	0,07	2,60	4,47	10	3,69	0,14	2,90	4,68	8	3,37	0,23	2,29	4,53
GÖZTYM	42	2,73	0,05	2,00	3,47	10	2,61	0,07	2,21	2,95	8	2,80	0,09	2,49	3,35
GÇ	42	7,19	0,08	5,70	8,22	10	7,28	0,13	6,68	7,86	8	7,04	0,20	6,33	7,96
TÇ	42	2,64	0,07	1,91	3,80	10	2,65	0,14	2,00	3,29	8	2,72	0,18	1,96	3,61
PU	42	15,24	0,19	12,38	17,72	10	14,82	0,42	12,60	16,68	8	14,01	0,42	12,21	15,67
DD	42	61,35	0,63	48,54	70,48	10	62,54	1,57	56,30	70,43	8	60,08	1,61	53,05	67,17
DB	42	24,00	0,32	18,40	28,49	10	24,23	0,60	21,26	26,60	8	23,72	1,02	18,22	26,95
ÖNAY	42	19,36	0,24	14,85	21,86	10	19,53	0,38	17,90	21,42	8	19,19	0,46	16,07	20,33
PARU	42	7,54	0,14	5,50	9,39	10	7,88	0,27	6,30	9,05	8	7,17	0,35	5,37	8,53
FU	42	31,17	0,34	27,06	36,19	10	32,07	0,63	28,80	34,69	8	32,70	0,90	28,17	36,45
TU	42	21,50	0,41	17,21	27,38	10	22,61	0,54	18,80	25,19	8	22,36	0,99	17,43	27,19
TAU	42	18,82	0,23	16,67	23,18	10	20,51	0,76	16,70	23,95	8	17,15	0,70	14,87	20,35
AAU	42	34,35	0,55	23,67	42,73	10	37,94	0,85	34,25	41,79	8	34,83	1,55	28,22	39,46
DMT2P	42	20,57	0,31	14,84	24,74	10	23,62	0,66	20,80	26,59	8	20,90	0,91	16,07	23,43
DMTU	42	2,84	0,07	1,94	3,84	10	3,02	0,18	2,10	4,04	8	2,98	0,14	2,42	3,74
GG	42	8,63	0,10	7,13	10,41	10	8,01	0,20	7,30	9,60	8	7,93	0,18	7,10	8,54

Tablo 19 (Devamı). Erkek bireyler için mitokondriyal DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Mitokondriyal Kontak Grubu				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
PARÖNÜC	42	16,76	0,17	14,77	19,54	10	16,83	0,36	14,55	18,89	8	15,80	0,33	14,04	16,91
PARARKAUC	42	23,92	0,33	19,49	30,00	10	23,48	0,80	20,80	29,65	8	22,08	0,75	19,52	25,84
SAĞPAREN	42	5,53	0,11	4,21	7,80	10	6,45	0,18	5,30	7,24	8	5,49	0,23	4,58	6,57
SOLPAREN	42	5,45	0,10	4,21	7,33	10	6,45	0,18	5,30	7,18	8	5,49	0,23	4,58	6,57
PD	42	0,704	0,008	0,538	0,809	10	0,721	0,020	0,629	0,851	8	0,719	0,020	0,634	0,818
PA	42	66,05	0,92	48,00	76,00	10	63,80	1,51	52,00	69,00	8	65,25	1,87	55,00	72,00
İMTBOY	42	4,47	0,07	3,27	5,29	10	4,06	0,14	3,15	4,44	8	4,40	0,18	3,37	5,10
İMTEN	42	2,55	0,03	1,95	2,97	10	2,46	0,09	2,00	2,99	8	2,64	0,09	2,14	2,87
İMTBOYUT	42	0,060	0,001	0,030	0,074	10	0,056	0,001	0,044	0,063	8	0,062	0,002	0,054	0,074
İMTŞEKLİ	42	0,573	0,008	0,479	0,760	10	0,609	0,022	0,507	0,713	8	0,602	0,018	0,521	0,691

Dişi bireylerde normal dağılılan verilerle yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi testi sonucunda gruplar arasında GÖZTYM, TÇ, İMTBOY ve İMTŞEKLİ değişkenleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Analiz detayları ve TUKEY HSD testi sonucuna göre belirlenen gruplar Tablo 20’de verilmiştir. Dişi bireylerde normal dağılmayan verilerle yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında sadece GG değişkeni bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Erkek bireylerde normal dağılılan verilerle yapılan One-Way ANOVA testi sonucunda gruplar arasında PU, TAU, AAU, DMT2P ve GG değişkenleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Erkek bireylerde normal dağılmayan verilerle yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında SAĞPAREN ve SOLPAREN değişkenleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Cinsiyetlere ait analiz detayları ve ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 20’de sunulmuştur.

Tablo 20. Tek değişkenli istatistiksel analizlere ait sonuçlar (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$)

Dişiler						
Tek Yönlü Varyans (One-Way ANOVA) Testi						
	<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Kontak Bölge	sd	F	P
	Ortalama $\pm$ St. Hata					
GÖZTYM	4,57 $\pm$ 0,09 ^a	4,01 $\pm$ 0,23 ^b	4,21 $\pm$ 0,26 ^{ab}	2	3,37	*
TÇ	3,77 $\pm$ 0,10 ^a	3,78 $\pm$ 0,24 ^{ab}	3,18 $\pm$ 0,22 ^b	2	3,13	*
İMTBOY	6,14 $\pm$ 0,10 ^a	5,72 $\pm$ 0,22 ^{ab}	5,55 $\pm$ 0,25 ^b	2	3,62	*
İMTŞEKLİ	0,57 $\pm$ 0,00 ^a	0,60 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,61 $\pm$ 0,01 ^b	2	4,56	*
Kruskal-Wallis Testi						
	Grup	N	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P
GG	<i>B. verrucosissimus</i>	51	48,06			
	<i>B. bufo</i>	19	30,97	2	6,749	*
	Kontak Bölge	15	41,03			
Erkekler						
Tek Yönlü Varyans (One-Way ANOVA) Testi						
	<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Kontak Bölge	sd	F	P
	Ortalama $\pm$ St. Hata					
PU	15,24 $\pm$ 0,19 ^a	14,82 $\pm$ 0,42 ^b	14,01 $\pm$ 0,42 ^b	2	3,33	*
TAU	18,82 $\pm$ 0,23 ^{ab}	20,51 $\pm$ 0,76 ^b	17,15 $\pm$ 0,70 ^a	2	8,19	*
AAU	34,35 $\pm$ 0,55 ^a	37,94 $\pm$ 0,85 ^b	34,83 $\pm$ 1,55 ^{ab}	2	4,11	*
DMT2P	20,57 $\pm$ 0,31 ^a	23,62 $\pm$ 0,66 ^b	20,90 $\pm$ 0,91 ^a	2	8,51	**
GG	8,63 $\pm$ 0,10 ^a	8,01 $\pm$ 0,20 ^{ab}	7,93 $\pm$ 0,18 ^b	2	5,96	*
Kruskal-Wallis Testi						
	Grup	N	Sıra Ortalaması	sd	χ^2	P
SAĞPAREN	<i>B. verrucosissimus</i>	42	26,96			
	<i>B. bufo</i>	10	47,20	2	11,00	**
	Kontak Bölge	8	28,19			
SOLPAREN	<i>B. verrucosissimus</i>	42	26,44			
	<i>B. bufo</i>	10	48,50	2	12,93	**
	Kontak Bölge	8	29,31			

3.4.2. Mitokondriyal DNA Grupları için Çok Değişkenli Analiz Sonuçları

Analize başlamadan önce değişkenlerin güvenilirliği ölçülmüş ve yüksek derecede güvenilir ölçeğe sahip oldukları belirlenmiştir (Standart Cronbach Alfa: 0,98). Kullanılan değişkenlerin çok değişkenli analizleri uygulamak için uygun olup olmadığı Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) ve Bartlett küresellik testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Test sonuçlarına göre verilerin çok değişkenli analizleri uygulamak için yeterli olduğu belirlenmiştir (KMO=0,94; Bartlett: $\chi^2=8238,3$; sd=465; $p<0,001$).

Veri çözümlemesinde ‘Temel Bileşenler Analizi (PCA)’ adlı faktör (bileşen) çıkarma yöntemi kullanılmıştır. Sonraki adımda bu matrisin bileşen sayısını belirlemek için gerekli olan özdeğer (*Eigenvalue*), varyans ve eklemeli varyans değerleri bulunmuştur. Kural olarak özdeğeri 1’den daha büyük olan bileşenler seçilerek bu bileşenler içerisinde en fazla katkı sunan karakterler belirlenmiştir.

Dişiler için yapılan analizlere göre özdeğeri 1’den büyük olan beş bileşen elde edilmiştir. Bu bileşenler toplam varyansın %80,09’unu açıklamaktadır. Bileşenlere ait yükler, özdeğer, varyans ve toplam varyans değerleri Tablo 21’de sunulmuştur. En yüksek özdeğere sahip ilk iki bileşene göre (PC1: %57,56; PC2: %7,87) lokaliteler arasındaki farklılıkları oluşturan karakterler dirsekler arası mesafe, baş uzunluğu, baş genişliği, parotidler ve iç metatarsal tüberkül olarak göze çarpmaktadır.

Erkek bireyler için yapılan analizlere göre özdeğeri 1’den büyük olan dokuz bileşen elde edilmiştir. Bu bileşenler toplam varyansın %79,02’sini açıklamaktadır. Bileşenlere ait yükler, özdeğer, varyans ve toplam varyans değerleri Tablo 22’de sunulmuştur. En yüksek özdeğere sahip ilk iki bileşene göre (PC1: %29,80; PC2: %11,56) lokaliteler arasındaki farklılıkları oluşturan karakterler dirsekler arası mesafe, baş uzunluğu, önayak uzunluğu, parotid ve iç metatarsal tüberkül olarak göze çarpmaktadır.

Tablo 21. Dişi bireyler için çıkarsaması yapılan bileşenlere ait yükler, özdeğerleri ve açıkladıkları varyans oranları

Değişken	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
VU	0,20	0,09	-0,02	0,04	-0,17
BU	0,22	-0,03	0,05	0,03	-0,05
BG	0,21	0,02	0,05	0,07	-0,05
BDA	0,19	-0,07	0,00	-0,08	0,02
BDBUA	0,13	-0,22	0,20	-0,00	0,39
BDG	0,18	-0,18	0,07	0,15	0,06
GÖZTYM	0,17	-0,24	0,12	0,12	-0,05
GÇ	0,19	0,08	0,12	-0,18	0,03
TÇ	0,12	-0,32	0,14	0,05	0,27
PU	0,20	0,00	-0,09	0,08	-0,11
DD	0,22	-0,03	0,04	-0,01	-0,04
DB	0,20	0,04	-0,01	0,15	-0,11
ÖNAY	0,21	-0,02	-0,05	-0,04	-0,08
PARU	0,19	0,03	-0,15	0,03	-0,06
FU	0,21	-0,01	0,06	0,09	-0,13
TU	0,17	0,00	-0,17	-0,25	-0,01
TAU	0,19	-0,06	-0,05	0,02	0,02
AAU	0,19	-0,07	0,17	-0,01	-0,02
DMT2P	0,21	0,02	0,15	0,00	0,12
DMTU	0,18	0,00	-0,09	-0,16	-0,16
GG	0,20	-0,06	0,08	0,06	-0,12
PARÖNÜC	0,21	-0,01	0,11	-0,00	-0,06
PARARKAUC	0,20	0,18	-0,12	0,18	-0,11
SAĞPAREN	0,13	0,38	0,11	0,00	0,37
SOLPAREN	0,14	0,32	0,14	-0,02	0,39
PD	-0,05	-0,33	0,36	-0,31	0,10
PA	-0,05	-0,35	0,10	-0,20	-0,34
İMTBOY	0,18	-0,08	-0,36	-0,14	0,09
İMTEN	0,16	0,13	-0,11	-0,50	-0,05
İMTBOYUT	0,02	-0,23	-0,51	-0,29	0,32
İMTŞEKLİ	-0,03	0,30	0,35	-0,48	-0,21
Özdeğer	17,84	2,40	2,05	1,36	1,11
Varyans (%)	57,56	7,87	6,63	4,41	3,06
Toplam Varyans (%)	57,56	65,44	72,08	76,49	80,09

Tablo 22. Erkek bireyler için çıkarsaması yapılan bileşenlere ait yükler, özdeğerleri ve açıkladıkları varyans oranları

Değişken	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
VU	0,25	-0,15	0,00	-0,20	0,10	-0,03	0,00	-0,01	0,25
BU	0,25	0,05	0,06	-0,02	-0,19	-0,09	0,00	-0,03	-0,03
BG	0,23	-0,07	0,24	-0,11	-0,10	-0,15	-0,03	0,00	0,01
BDA	0,16	-0,11	0,07	0,05	0,00	0,17	0,30	-0,51	-0,14
BDBUA	0,18	0,02	-0,08	-0,12	-0,08	0,25	0,08	-0,23	-0,20
BDG	0,18	-0,04	0,00	-0,18	-0,07	0,29	-0,19	-0,13	-0,26
GÖZTYM	0,10	0,09	0,00	-0,03	-0,12	0,00	-0,67	-0,04	0,06
GÇ	0,21	0,14	-0,03	0,11	-0,05	0,17	0,27	-0,06	-0,04
TÇ	0,12	0,08	-0,11	-0,14	-0,13	0,46	-0,11	-0,01	-0,08
PU	0,19	-0,06	0,07	-0,17	0,25	0,09	0,09	0,13	0,06
DD	0,29	0,03	0,04	0,09	0,07	0,10	-0,04	0,05	0,11
DB	0,19	-0,10	0,22	0,31	0,22	-0,08	-0,11	-0,01	-0,05
ÖNAY	0,25	0,08	-0,02	-0,05	-0,02	-0,17	0,12	-0,02	-0,01
PARU	0,22	-0,03	-0,07	-0,01	-0,05	-0,09	0,08	0,07	0,19
FU	0,17	-0,09	0,03	0,32	0,27	-0,08	-0,12	-0,23	-0,10
TU	0,15	0,22	-0,34	0,00	-0,04	-0,00	0,11	0,22	0,21
TAU	0,19	0,00	-0,18	0,18	-0,04	0,21	-0,09	0,29	0,22
AAU	0,22	0,04	-0,13	0,36	0,11	-0,00	-0,01	0,10	-0,01
DMT2P	0,19	0,02	-0,10	0,39	0,12	-0,02	-0,05	0,12	-0,22
DMTU	0,19	0,19	-0,25	-0,14	-0,03	-0,04	0,11	-0,01	0,17
GG	0,17	0,00	0,26	-0,17	-0,05	0,08	-0,31	0,20	-0,15
PARÖNUC	0,16	-0,19	0,35	0,01	-0,23	-0,19	0,08	0,00	0,17
PARARKAUC	0,13	-0,36	0,11	-0,21	0,18	-0,07	0,07	0,15	0,01
SAĞPAREN	0,08	-0,29	-0,25	0,00	-0,36	-0,22	-0,01	0,03	-0,18
SOLPAREN	0,08	-0,28	-0,23	0,05	-0,40	-0,22	0,00	0,01	-0,19
PD	-0,01	0,27	0,15	0,26	-0,41	-0,07	-0,01	-0,18	0,13
PA	0,00	0,24	0,23	0,09	-0,11	0,00	-0,08	-0,23	0,32
İMTBOY	0,17	0,32	0,04	-0,22	0,09	-0,24	0,03	-0,03	-0,07
İMTEN	0,12	0,11	-0,25	-0,22	0,22	-0,32	-0,17	-0,35	0,10
İMTBOYUT	0,01	0,35	-0,03	-0,05	0,11	-0,28	-0,03	0,12	-0,48
İMTŞEKLİ	-0,08	-0,27	-0,33	0,03	0,12	-0,04	-0,23	-0,33	0,20
Özdeğer	9,23	3,58	2,22	2,19	1,90	1,55	1,43	1,21	1,05
Varyans (%)	29,80	11,56	7,22	7,07	6,35	5,01	4,62	3,93	3,39
Toplam Varyans (%)	29,80	41,36	48,59	55,67	62,03	67,05	71,67	75,61	79,02

Dişiler için gerçekleştirilen diskriminant analizi sonucunda elde edilen fonksiyonlardan birinci fonksiyonun özdeğeri 1,604 ve kanonikal korelasyon değeri 0,785 (%78,50) olup, toplam varyansın %71,20'sini açıklamaktadır. İkinci fonksiyonun özdeğeri 0,650 ve kanonikal korelasyon değeri 0,628 (%62,80) olup, toplam varyansın %28,80'ini açıklamaktadır. Wilks' Lambda değerlerine göre elde edilen fonksiyonlardan LD1'den LD2'ye giden fonksiyonun grupları istatistiksel olarak anlamlı şekilde ayırt ettiği görülmüştür (Ki-kare=97,659; sd=62; p<0,01). LD2 fonksiyonu Wilks' Lambda değeri 0,233 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Ki-kare=33,543; sd=30; p>0,05).

Standardize edilmiş ayırma katsayıları tablosuna bakıldığında (Tablo 23) fonksiyon üzerinde en fazla yük tek değişkenli analizlerin sonucuna benzer şekilde BG, PARÖNUC, PARARKAUC, İMTBOY ve İMTEN değişkenleri üzerinde belirlenmiştir.

Tablo 23. Dişi bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	-0,44	-0,21	DB	-0,67	-0,58	PARARKAUC	3,77	3,06
BU	-1,26	-0,61	ÖNAY	-0,31	1,05	SAĞPAREN	0,28	-0,66
BG	2,69	0,15	PARU	0,07	0,00	SOLPAREN	-0,84	0,88
BDA	0,72	-0,19	FU	0,29	0,34	PD	2,44	2,21
BDBUA	-0,31	-0,26	TU	0,38	0,19	PA	-0,38	-0,37
BDG	0,00	-0,30	TAU	-0,23	0,04	İMTBOY	2,65	0,77
GÖZTYM	1,03	0,44	AAU	-1,01	0,39	İMTEN	-1,88	-1,40
GÇ	0,69	0,15	DMT2P	-0,49	0,21	İMTBOYUT	-0,74	-0,09
TÇ	-0,26	-0,48	DMTU	0,17	0,52	İMTŞEKLİ	0,91	1,08
PU	-0,36	0,20	GG	0,09	-0,10			
DD	-0,75	0,12	PARÖNUC	-3,24	-3,60			

Her bir değişken ve fonksiyonlar arasındaki korelasyon değerleri yapısal matris değerleri olarak belirtilmiştir (Tablo 24).

Tablo 24. Dişi bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	0,05	-0,14	DB	-0,04	-0,24	PARARKAUC	0,09	-0,24
BU	0,16	-0,19	ÖNAY	0,07	-0,02	SAĞPAREN	-0,04	0,08
BG	0,08	-0,21	PARU	-0,02	-0,18	SOLPAREN	-0,06	0,08
BDA	0,10	-0,23	FU	0,05	-0,19	PD	-0,11	0,03
BDBUA	0,00	-0,25	TU	0,03	-0,02	PA	-0,09	-0,12
BDG	-0,31	-0,26	TAU	-0,07	-0,21	İMTBOY	0,09	-0,34
GÖZTYM	0,17	-0,22	AAU	-0,16	-0,11	İMTEN	0,00	-0,07
GÇ	0,03	-0,01	DMT2P	-0,10	-0,10	İMTBOYUT	0,06	-0,27
TÇ	-0,07	-0,32	DMTU	0,03	0,00	İMTŞEKLİ	-0,12	0,36
PU	0,13	-0,26	GG	0,12	-0,24			
DD	0,02	-0,21	PARÖNUC	0,02	-0,29			

Dişi bireyler için elde edilen fonksiyonlar kullanılarak oluşturulan sınıflandırma sonuçları tablosuna göre gruplara atanan bireyler %88,20 oranında doğru yerleştirilmiştir (Tablo 25). Çapraz doğrulama oranı ise %51,80'dir.

Tablo 25. Dişi bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu

		Tahmini Grup Atamaları			
	Gruplar	<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Kontak Bölge	Toplam
Orjinal	<i>B. verrucosissimus</i>	49 (%96,1)	1 (%2,0)	1(%2,0)	51
	<i>B. bufo</i>	2 (%10,5)	16 (%84,2)	1 (%5,3)	19
	Kontak Bölge	5 (%33,3)	0 (%0)	10 (%66,7)	15
Çapraz	<i>B. verrucosissimus</i>	28 (%54,9)	9 (%17,6)	14 (%27,5)	51
Doğrulama	<i>B. bufo</i>	4 (%21,1)	13 (%64,8)	2 (%10,5)	19
	Kontak Bölge	9 (%60,0)	3 (%20,0)	3 (%20,0)	15

Erkekler için gerçekleştirilen diskriminant analizi sonucunda elde edilen fonksiyonlardan birinci fonksiyonun özdeğeri 4,298 ve kanonikal korelasyon değeri 0,901 (%90,10) olup, toplam varyansın %76,00'sını açıklamaktadır. İkinci fonksiyonun özdeğeri 1,359 ve kanonikal korelasyon değeri 0,759 (%75,90) olup, toplam varyansın %24,00'ünü açıklamaktadır.

Wilks' Lambda değerlerine göre elde edilen fonksiyonlardan LD1'den LD2'ye giden fonksiyonun grupları istatistiksel olarak anlamlı şekilde ayırt ettiği görülmüştür (Ki-kare=106,082; sd=62; p<0,01). Wilks' Lambda değeri 0,08 olarak hesaplanmıştır. LD2 fonksiyonu Wilks' Lambda değeri 0,424 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Ki-kare=36,050; sd=30; p>0,05).

Standardize edilmiş ayırma katsayıları incelendiğinde (Tablo 26) fonksiyon üzerinde en fazla yük pozitif olarak PARARKAUC, İMTBOY, İMTŞEKLİ, PD, BG ve GÖZTYM negatif olarak ise PARÖNUC ve IMTEN değişkenlerindedir. Her bir değişken ve fonksiyonlar arasındaki korelasyon değerleri yapısal matris değerleri olarak belirtilmiştir (Tablo 27).

Tablo 26. Erkek bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	1,12	0,09	DB	0,66	-0,17	PARARKAUC	2,63	0,69
BU	-0,07	-0,10	ÖNAY	-0,51	0,29	SAĞPAREN	0,22	0,56
BG	0,32	-0,46	PARU	-0,30	-0,03	SOLPAREN	-0,77	-0,66
BDA	-0,53	-0,16	FU	-0,03	-0,59	PD	2,19	0,70
BDBUA	0,97	0,15	TU	-0,12	-0,80	PA	-0,11	0,12
BDG	-0,97	0,25	TAU	-0,30	1,25	İMTBOY	1,64	1,31
GÖZTYM	0,31	-0,29	AAU	0,29	-0,28	İMTEN	-1,48	-1,24
GÇ	0,64	-0,05	DMT2P	-1,60	0,34	İMTBOYUT	0,89	0,16
TÇ	0,32	-0,35	DMTU	-0,74	0,15	İMTŞEKLİ	1,33	1,01
PU	0,16	0,62	GG	0,44	0,19			
DD	-0,05	-0,45	PARÖNUC	-1,96	0,19			

Tablo 27. Erkek bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri

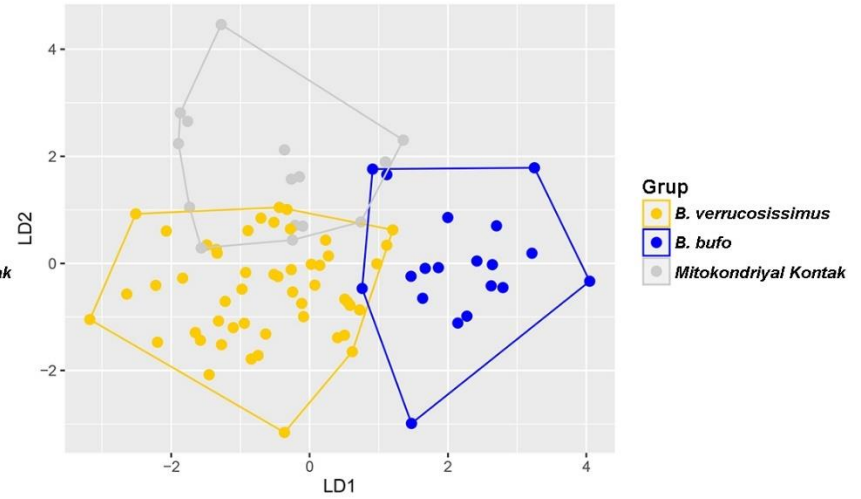
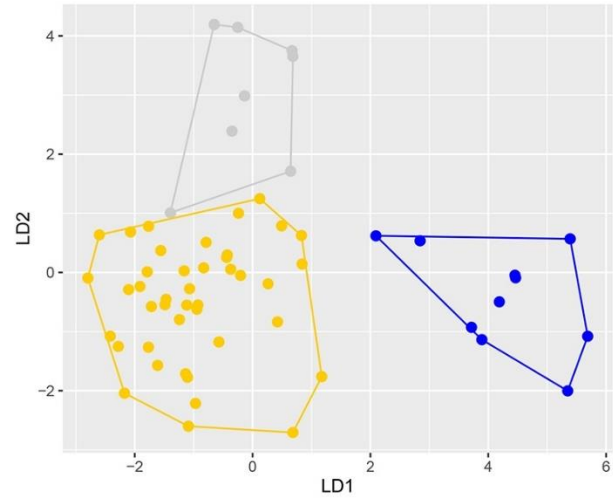
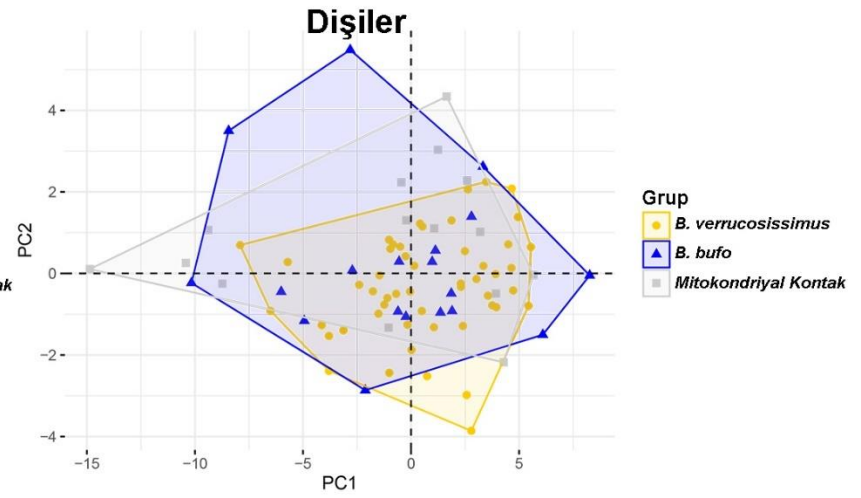
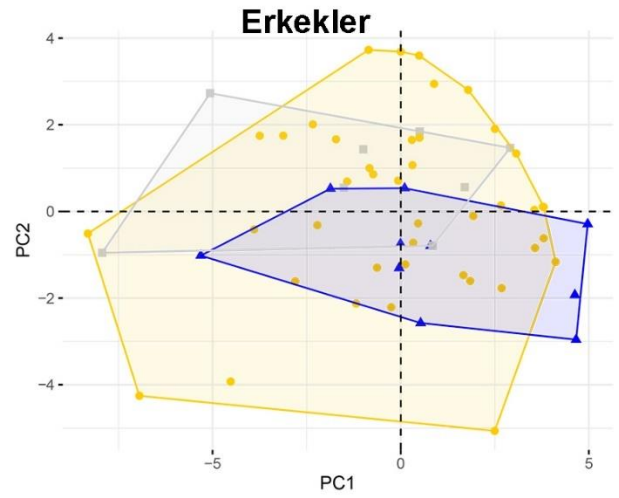
Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	0,01	0,17	DB	-0,01	0,04	PARARKAUC	0,04	0,23
BU	-0,03	0,06	ÖNAY	-0,02	0,04	SAĞPAREN	-0,22	0,10
BG	0,04	0,10	PARU	-0,06	0,14	SOLPAREN	-0,26	0,08
BDA	-0,09	0,01	FU	-0,07	-0,17	PD	-0,05	-0,05
BDBUA	0,05	0,07	TU	-0,08	-0,07	PA	0,07	0,01
BDG	-0,04	0,13	TAU	-0,16	0,35	İMTBOY	0,14	-0,01
GÖZTYM	0,06	-0,08	AAU	-0,18	0,03	İMTEN	0,05	-0,12
GÇ	-0,02	0,08	DMT2P	-0,26	0,05	İMTBOYUT	0,10	-0,12
TÇ	0,00	-0,04	DMTU	-0,06	-0,05	İMTŞEKLİ	-0,11	-0,10
PU	0,06	0,26	GG	0,17	0,24			
DD	-0,04	0,10	PARÖNUC	0,00	0,26			

Erkek bireyler için elde edilen fonksiyonlar kullanılarak oluşturulan sınıflandırma sonuçları tablosuna göre gruplara atanan bireyler %98,20 oranında doğru yerleştirilmiştir. Çapraz doğrulama oranı ise %71,70'tir (Tablo 28).

Tablo 28. Erkek bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu

Tahmini Grup Atamaları					
Gruplar		<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Kontak Bölge	Toplam
Orjinal	<i>B. verrucosissimus</i>	42 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	42
	<i>B. bufo</i>	0 (%0)	10 (%100)	0 (%0)	10
	Kontak Bölge	1 (%12,5)	0 (%0)	7 (%87,5)	8
Çapraz	<i>B. verrucosissimus</i>	33 (%76,8)	4 (%9,5)	5 (%11,9)	42
Doğrulama	<i>B. bufo</i>	3 (%30)	6 (%60)	1 (%10)	10
	Kontak Bölge	4 (%50)	0 (%0)	4 (%50)	8

Dişilerde toplam varyansın %65,44'ünü açıklayan ilk iki bileşen ile oluşan saçılım grafiğine göre Hemşin, Pazar ve Çamlıhemşin ilçelerine ait örneklerden oluşan mitokondriyal kontak grubu türler arası alanda konumlanmıştır. Erkeklerde ise toplam varyansın %41,36'sını açıklayan iki bileşene ait saçılım grafiğine göre mitokondriyal kontak grubuna ait örneklerin türler arasında yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 38).



Şekil 38. Mitokondriyal DNA analizine dayalı oluşan grupların PCA morfouzaydaki (üst) ve ayrışım morfouzayındaki (alt) saçılım grafikleri

3.4.3. Mikrosatellit DNA Grupları için Tek Değişkenli Analiz Sonuçları

STRUCTURE ve klin analizleri sonucunda Fındıklı Yaylacılar popülasyonunun hibrit zonu oluşturduğu açığa çıkarıldığı için popülasyona dahil olan bireyler hibrit grup olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca elde edilen genetik bulgulara göre hibrit zon merkezin batısında kalan bütün popülasyonlar *B. bufo*, doğusunda kalan bütün popülasyonlar ise *B. verrucosissimus* değerlendirilmiştir ve grup atamaları genetik örüntülere göre yapılmıştır.

Gruplar arasında test edilen karakterlere ait ortalamalar normal dağılım gösteren değişkenler için Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) testi kullanılarak, normal dağılım göstermeyen değişkenler için ise Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Post-Hoc testleri için ise TUKEY HSD testi kullanılmıştır. Dişi bireylerde normal dağılım verileriyle yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi testi sonucunda gruplar arasında BDBUA, GÖZTYM, SAĞPAREN, SOLPAREN, İMTBOY, İMTBOYUT ve İMTŞEKLİ değişkenleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Analiz detayları ve TUKEY HSD testi sonucuna göre belirlenen gruplar Tablo 29’da verilmiştir.

Dişi bireylerde normal dağılmayan verilerle yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında değişkenler bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Erkek bireylerde normal dağılım verileriyle yapılan ANOVA testi sonucunda gruplar arasında FU, AAU, DMT2P ve GG değişkenleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Erkek bireylerde normal dağılmayan verilerle yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında SAĞPAREN ve SOLPAREN değişkenleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). İkili karşılaştırmalara göre bu farklılık saf türler arasında oluşmaktadır. Gruplara ait açıklayıcı istatistikler Tablo 30 ve 31’de sunulmuştur.

Tablo 29. Tek değişkenli istatistiksel analizlere ait sonuçlar (*: p<0,05; **: p<0,01)

Dişiler						
Tek Yönlü Varyans (One-Way ANOVA) Testi						
	<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Hibrit Zon			
	Ortalama ± St. Hata			sd	F	P
BDBUA	3,79±0,09 ^a	3,94±0,13 ^a	4,71±0,16 ^b	2	5,92	**
GÖZTYM	4,47±0,10 ^{ab}	4,16±0,15 ^a	4,98±0,31 ^b	2	3,83	*
SAĞPAREN	8,38,0,16 ^a	9,06±0,21 ^{ab}	9,57±0,24 ^b	2	5,44	**
SOLPAREN	8,21±0,18 ^a	9,00±0,22 ^{ab}	9,57±0,24 ^b	2	6,28	**
İMTBOY	6,27±0,12 ^a	5,70±0,15 ^b	5,62±0,22 ^{ab}	2	5,06	**
İMTBOYUT	0,060±0,000 ^a	0,056±0,000 ^b	0,054±0,001 ^b	2	8,22	**
İMTŞEKLİ	0,558±0,009 ^a	0,607±0,010 ^{ab}	0,612±0,016 ^b	2	6,64	**
Erkekler						
Tek Yönlü Varyans (One-Way ANOVA) Testi						
	<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Hibrit Zon			
	Ortalama ± St. Hata			sd	F	P
FU	30,98±0,33 ^a	32,35±0,52 ^{ab}	35,00±1,19 ^b	2	5,92	**
AAU	34,02±0,52 ^a	36,56±0,89 ^{ab}	40,76±1,97 ^b	2	6,18	**
DMT2P	20,41±0,30 ^a	22,41±0,62 ^{ab}	23,85±0,89 ^b	2	7,02	**
GG	8,62±0,11 ^a	7,97±0,13 ^b	8,89±0,33 ^a	2	6,11	**
Kruskall-Wallis Testi						
	Grup	N	Sıra Ortalaması	sd	χ ²	P
SAĞPAREN	<i>B. verrucosissimus</i>	40	26,26	2	7,09	*
	<i>B. bufo</i>	18	38,75			
	Hibrit Zon	2	41,00			
SOLPAREN	<i>B. verrucosissimus</i>	40	25,61	2	9,45	**
	<i>B. bufo</i>	18	39,97			
	Hibrit Zon	2	43,00			

Tablo 30. Dişi bireyler için mikrosatellit DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Hibrit Zon				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
VU	37	102,33	1,72	62,00	115,18	39	100,84	2,28	68,36	125,37	9	103,84	2,38	95,65	113,61
BU	37	25,15	0,43	20,25	31,92	39	24,46	0,65	15,23	31,19	9	26,99	0,83	23,43	31,66
BG	37	34,08	0,50	28,73	40,27	39	33,39	0,88	19,93	42,88	9	36,63	0,90	32,69	41,60
BDA	37	6,28	0,11	4,73	8,14	39	6,02	0,13	4,01	7,66	9	6,57	0,19	5,55	7,63
BDBUA	37	3,79	0,09	2,75	4,94	39	3,94	0,13	2,07	5,82	9	4,71	0,16	4,13	5,52
BDG	37	5,30	0,10	3,86	6,63	39	5,15	0,13	2,96	6,82	9	5,66	0,20	4,52	6,63
GÖZTYM	37	4,47	0,10	3,29	5,83	39	4,16	0,15	2,43	5,90	9	4,98	0,31	3,91	6,67
GÇ	37	9,31	0,15	7,53	11,43	39	9,49	0,15	6,93	11,08	9	10,01	0,16	9,06	10,66
TÇ	37	3,73	0,12	2,07	5,18	39	3,56	0,15	2,09	5,85	9	3,91	0,18	3,33	4,91
PU	37	22,50	0,32	17,19	25,81	39	21,36	0,56	13,12	27,45	9	22,18	0,64	20,41	25,90
DD	37	78,79	1,39	60,63	93,62	39	77,14	1,85	51,85	98,57	9	83,20	1,71	76,45	90,58
DB	37	31,04	0,54	24,64	38,37	39	30,29	0,87	17,36	40,84	9	29,30	1,46	23,95	36,72
ÖNAY	37	28,23	0,53	21,81	34,70	39	28,07	0,69	18,06	34,50	9	27,61	1,00	23,36	33,57
PARU	37	12,2203	0,25	9,12	15,99	39	11,77	0,31	7,57	14,82	9	11,56	0,61	9,05	14,74
FU	37	42,7541	0,66	35,48	53,97	39	41,78	1,05	25,49	53,76	9	44,13	1,20	39,04	49,43
TU	37	29,3459	0,75	21,89	41,09	39	28,98	0,69	20,63	40,65	9	28,25	0,82	24,43	32,78
TAU	37	25,2297	0,41	21,28	30,48	39	24,89	0,61	16,83	31,02	9	24,53	1,42	14,12	29,58
AAU	37	41,4527	0,71	33,46	52,69	39	43,32	1,31	26,60	56,55	9	46,64	1,30	41,58	52,59
DMT2P	37	25,0327	0,53	19,70	31,90	39	26,40	0,81	15,17	36,26	9	28,45	1,07	24,78	35,13
DMTU	37	4,3803	0,13	2,54	5,82	39	4,35	0,14	2,78	6,09	9	4,26	0,29	3,11	5,97
GG	37	12,8124	0,22	9,03	14,98	39	12,30	0,28	6,49	15,71	9	13,44	0,22	12,37	14,56

Tablo 30 (Devamı). Dişı bireyler için mikrosatellit DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Hibrit Zon				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
PARÖNUC	37	23,82	0,34	19,39	28,22	39	23,30	0,53	14,42	30,12	9	24,83	0,47	23,03	26,81
PARARKAUC	37	35,16	0,65	27,32	42,03	39	33,40	0,92	20,39	44,95	9	35,03	1,20	30,69	41,88
SAĞPAREN	37	8,38	0,16	6,70	10,32	39	9,06	0,21	6,16	12,10	9	9,57	0,24	8,53	10,77
SOLPAREN	37	8,21	0,18	5,08	10,98	39	9,00	0,22	5,33	12,10	9	9,57	0,24	8,53	10,77
PD	37	0,681	0,009	0,586	0,814	39	0,704	0,010	0,583	0,911	9	0,713	0,021	0,620	0,841
PA	37	58,95	1028	45	77	39	58,41	1,22	42	71	9	59,44	2,66	48	75
İMTBOY	37	6,27	0,12	4,31	7,84	39	5,70	0,15	3,67	7,82	9	5,62	0,22	5,02	7,23
İMTEN	37	3,49	0,08	2,58	5,42	39	3,44	0,09	2,22	4,68	9	3,41	0,06	3,17	3,71
İMTBOYUT	37	0,060	0,000	0,051	0,072	39	0,056	0,009	0,045	0,068	9	0,054	0,001	0,048	0,064
İMTŞEKLİ	37	0,558	0,009	0,485	0,691	39	0,607	0,010	0,475	0,747	9	0,612	0,001	0,513	0,675

Tablo 31. Erkek bireyler için mikrosatellit DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Hibrit Zon				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
VU	40	72,72	0,62	65,74	80,28	18	71,52	1,06	62,65	77,88	2	74,00	0,54	73,46	74,55
BU	40	17,15	0,16	14,98	19,52	18	17,24	0,29	14,75	19,31	2	17,93	0,32	17,61	18,25
BG	40	23,48	0,21	20,23	26,50	18	23,09	0,35	21,19	26,12	2	24,18	0,07	24,11	24,26
BDA	40	4,67	0,07	3,69	5,66	18	4,81	0,09	4,23	5,70	2	4,62	0,29	4,33	4,91
BDBUA	40	3,11	0,08	2,22	4,15	18	2,97	0,12	2,03	3,78	2	3,42	0,00	3,42	3,42
BDG	40	3,59	0,07	2,60	4,47	18	3,55	0,13	2,29	4,68	2	3,14	0,19	2,95	3,33
GÖZTYM	40	2,71	0,06	2,00	3,47	18	2,69	0,06	2,21	3,35	2	3,08	0,09	2,99	3,17
GÇ	40	7,17	0,08	5,70	8,22	18	7,17	0,11	6,33	7,96	2	7,57	0,55	7,02	8,13
TÇ	40	2,65	0,08	1,91	3,80	18	2,68	0,11	1,96	3,61	2	2,31	0,27	2,04	2,58
PU	40	15,27	0,19	12,38	17,72	18	14,46	0,31	12,21	16,68	2	14,51	0,05	14,46	14,56
DD	40	61,20	0,65	48,54	70,48	18	61,45	1,13	53,05	70,43	2	64,32	1,08	63,24	65,40
DB	40	23,93	0,33	18,40	28,49	18	24,00	0,54	18,22	26,95	2	25,39	1,45	23,94	26,84
ÖNAY	40	19,32	0,25	14,85	21,86	18	19,38	0,29	16,07	21,42	2	20,18	1,01	19,17	21,20
PARU	40	7,55	0,15	5,50	9,39	18	7,57	0,23	5,37	9,05	2	7,19	1,00	6,19	8,20
FU	40	30,98	0,33	27,06	35,68	18	32,35	0,52	28,17	36,45	2	35,00	1,19	33,81	36,19
TU	40	21,48	0,43	17,21	27,38	18	22,505	0,51	17,43	27,19	2	21,78	0,15	21,63	21,93
TAU	40	18,75	0,24	16,67	23,18	18	19,021	0,65	14,87	23,95	2	20,25	0,47	19,78	20,73
AAU	40	34,02	0,52	23,67	39,83	18	36,56	0,89	12,82	41,79	2	40,76	1,97	38,79	42,73
DMT2P	40	20,41	0,30	14,84	23,76	18	22,41	0,62	16,07	26,59	2	23,85	0,89	22,96	24,74
DMTU	40	2,85	0,07	1,94	3,84	18	3,00	0,11	2,10	4,04	2	2,78	0,18	2,60	2,97
GG	40	8,62	0,11	7,13	10,41	18	7,97	0,13	7,10	9,60	2	8,89	0,33	8,56	9,23

Tablo 31 (Devamı). Erkek bireyler için mikrosatellit DNA verilerine göre oluşan morfolojik gruplara ait açıklayıcı istatistikler

Değişken	<i>Bufo verrucosissimus</i>					<i>Bufo bufo</i>					Hibrit Zon				
	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks	N	Ortalama	St. Hata	Min	Maks
PARÖNÜC	40	16,74	0,18	14,77	19,54	18	16,37	0,27	62,65	77,88	2	17,15	0,36	16,79	17,51
PARARKAUC	40	23,95	0,35	19,49	30,00	18	22,86	0,57	14,75	19,31	2	23,25	0,60	22,65	23,86
SAĞPAREN	40	5,49	0,11	4,21	7,80	18	6,02	0,18	21,19	26,12	2	6,34	0,94	5,40	7,28
SOLPAREN	40	5,41	0,10	4,21	7,33	18	6,02	0,18	4,23	5,70	2	6,34	0,94	5,40	7,28
PD	40	0,702	0,008	0,538	0,809	18	0,720	0,0014	2,03	3,78	2	0,738	0,034	0,704	0,773
PA	40	66,07	0,96	48	76	18	64,44	1,16	2,29	4,68	2	65,50	3,50	62	69
İMTBOY	40	4,47	0,07	3,27	5,29	18	4,21	0,12	2,21	3,35	2	4,45	0,66	3,79	5,11
İMTEN	40	2,54	0,03	1,95	2,97	18	2,54	0,07	6,33	7,96	2	2,60	0,21	2,39	2,81
İMTBOYUT	40	0,060	0,001	0,030	0,074	18	0,058	0,001	1,96	3,61	2	0,060	0,008	0,052	0,069
İMTŞEKLİ	40	0,572	0,008	0,479	0,760	18	0,606	0,014	12,21	16,68	2	0,590	0,040	0,550	0,631

3.4.4. Mikrosatellit DNA Grupları için Çok Değişkenli Analiz Sonuçları

PCA analizi varyans bağımlı bir analiz olup grup atamalarından bağımsız sonuçlar oluşturduğundan dolayı sadece grup görselleştirmesi yapılarak mikrosatellit DNA sonuçlarına göre saçılım grafikleri oluşturulmuştur. STRUCTURE ve klin analizleri sonucunda YAY popülasyonunun hibrit zonu oluşturduğu açığa çıkarıldığı için bu alandaki bireyler hibrit grup olarak değerlendirilmiştir. Dişiler için elde edilen birinci fonksiyonun (LD1) özdeğeri 2,520 ve kanonikal korelasyon değeri 0,846 (%84,60) olup, toplam varyansın %76,50'sini açıklamaktadır. İkinci fonksiyonun (LD2) özdeğeri 0,774 ve kanonikal korelasyon değeri 0,661 (%66,10) olup, toplam varyansın %23,50'sini açıklamaktadır.

Wilks' Lambda değerlerine göre elde edilen fonksiyonlardan LD1'den LD2'ye giden fonksiyonun grupları istatistiksel olarak anlamlı şekilde ayırt ettiği görülmüştür ($p < 0,01$). LD1 için Wilks' Lambda değeri 0,160 olarak hesaplanmış ve ilgili fonksiyon bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-kare=122,717; sd=62; $p < 0,001$). LD2 fonksiyonu Wilks' Lambda değeri 0,564 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Ki-kare=38,409; sd=30; $p > 0,05$). Standardize edilmiş ayırma katsayıları tablosun bakıldığında (Tablo 32) fonksiyon üzerinde en fazla yük tek değişkenli analizlerin sonucuna benzer şekilde PARÖNUC, PARARKAUC, İMTEN, İMTBOYUT ve İMTŞEKLİ değişkenleri üzerindedir.

Tablo 32. Dişi bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	-0,72	-0,07	DB	0,88	-0,83	PARARKAUC	3,74	-0,31
BU	-1,15	1,38	ÖNAY	-0,01	-1,64	SAĞPAREN	-0,07	0,81
BG	0,20	-0,01	PARU	0,04	0,31	SOLPAREN	-0,89	-0,98
BDA	0,34	0,78	FU	0,60	-0,12	PD	2,23	-0,44
BDBUA	-0,86	-0,11	TU	0,37	-0,24	PA	-0,15	0,06
BDG	-0,22	0,07	TAU	0,12	0,02	İMTBOY	0,20	1,50
GÖZTYM	0,28	0,49	AAU	-1,08	-0,43	İMTEN	2,55	-1,67
GÇ	-0,07	0,51	DMT2P	-0,54	-0,16	İMTBOYUT	-1,16	0,03
TÇ	0,69	-0,04	DMTU	-0,29	-0,25	İMTŞEKLİ	-1,85	0,90
PU	-0,49	0,06	GG	-0,40	0,34			
DD	0,03	0,23	PARÖNUC	-2,31	0,32			

Her bir değişken ve fonksiyonlar arasındaki korelasyon değerleri yapısal matris değerleri olarak belirtilmiştir (Tablo 33).

Tablo 33. Dişi bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	0,00	0,09	DB	0,07	-0,01	PARARKAUC	0,05	0,17
BU	-0,04	0,24	ÖNAY	0,02	-0,02	SAĞPAREN	-0,22	-0,03
BG	-0,05	0,23	PARU	0,08	0,03	SOLPAREN	-0,24	-0,04
BDA	0,00	0,27	FU	0,00	0,15	PD	-0,12	-0,05
BDBUA	-0,20	0,22	TU	0,04	-0,02	PA	0,00	0,05
BDG	-0,03	0,22	TAU	0,04	0,00	İMTBOY	0,20	0,14
GÖZTYM	-0,02	0,34	AAU	-0,15	0,05	İMTEN	0,03	0,01
GÇ	-0,13	0,09	DMT2P	-0,16	0,04	İMTBOYUT	0,28	0,06
TÇ	0,00	0,15	DMTU	0,07	0,17	İMTŞEKLİ	-0,23	-0,17
PU	0,02	-0,02	GG	0,00	0,27			
DD	-0,03	0,20	PARÖNUC	0,02	0,19			

Dişi bireyler için elde edilen fonksiyonlar kullanılarak oluşturulan sınıflandırma sonuçları tablosuna göre gruplara atanan bireyler %89,40 oranında doğru yerleştirilmiştir (Tablo 34). Çapraz doğrulama oranı ise %61,20'dir.

Tablo 34. Dişi bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu

Tahmini Grup Atamaları					
	Gruplar	<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Hibrit Zon	Toplam
Orjinal	<i>B. verrucosissimus</i>	34 (%91,9)	3 (%8,1)	0 ((%0)	37
	<i>B. bufo</i>	4(%10,3)	34 ((%87,2)	1(%2,6)	39
	Hibrit Zon	0 ((%0)	1 (%11,1)	8(%88,9)	9
Çapraz	<i>B. verrucosissimus</i>	24 (%64,9)	11 (%29,7)	2 (%5,4)	37
Doğrulama	<i>B. bufo</i>	10 (%25,6)	24 (%61,5)	5 (%12,8)	39
	Hibrit Zon	1 (%11,1)	4 (%44,4)	4 (%44,4)	9

Erkeklerle yapılan diskriminant analizi sonucunda elde edilen fonksiyonlardan birinci fonksiyonun özdeğeri 3,396 ve kanonikal korelasyon değeri 0,879 (%87,90) olup, toplam varyansın %73,70'ini açıklamaktadır. İkinci fonksiyonun özdeğeri 1,211 ve kanonikal korelasyon değeri 0,740 (%74,00) olup, toplam varyansın %26,30'unu açıklamaktadır. LD1 için Wilks' Lambda değeri 0,103 olarak hesaplanmış ve ilgili fonksiyon bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Ki-kare=95,518; sd=62; p<0,01). LD2 fonksiyonu Wilks' Lambda değeri 0,452 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Ki-kare=33,324; sd=30; p>0,05). Standardize edilmiş ayırma katsayıları incelendiğinde (Tablo 35) fonksiyon üzerinde en fazla yükü PARARKAUC, PARÖNUC, SOLPAREN, PD ve SAĞPAREN değişkenlerinin aldığı görülmektedir (Tablo 35).

Tablo 35. Erkek bireyler için hesaplanan standardize edilmiş ayırma katsayıları

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	0,22	1,53	DB	0,78	-0,68	PARARKAUC	2,88	-0,21
BU	0,16	-0,57	ÖNAY	0,05	-0,51	SAĞPAREN	0,59	0,05
BG	-0,18	0,23	PARU	0,38	-1,27	SOLPAREN	-1,30	0,23
BDA	-0,29	-0,54	FU	-0,63	0,35	PD	2,07	0,51
BDBUA	0,48	0,85	TU	-0,44	-0,48	PA	0,29	-0,55
BDG	-0,16	-0,88	TAU	0,74	-0,01	İMTBOY	0,31	3,92
GÖZTYM	-0,12	0,32	AAU	-0,62	1,24	İMTEN	-0,40	-3,39
GÇ	0,28	0,41	DMT2P	-0,72	-0,75	İMTBOYUT	0,53	0,69
TÇ	0,09	-0,15	DMTU	-0,17	-0,64	İMTŞEKLİ	0,24	3,07
PU	0,59	0,00	GG	0,46	0,09			
DD	-0,80	0,79	PARÖNUC	-1,74	0,35			

Her bir değişken ve fonksiyonlar arasındaki korelasyon değerleri yapısal matris değerleri olarak belirtilmiştir (Tablo 36).

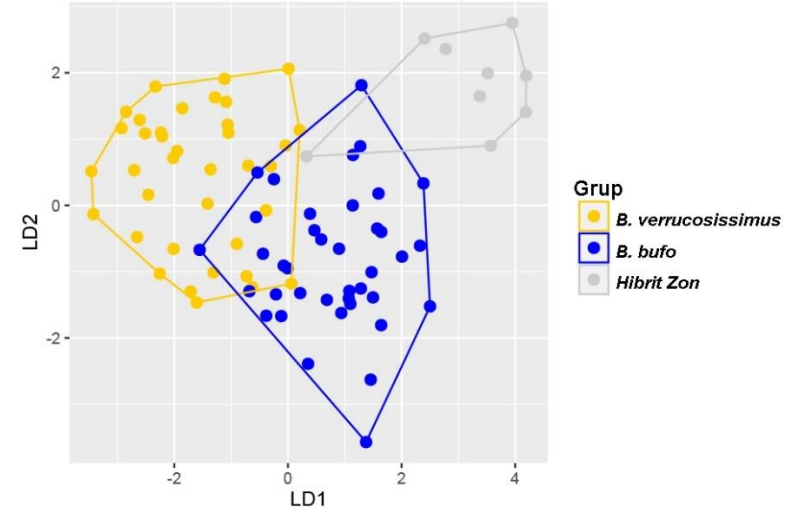
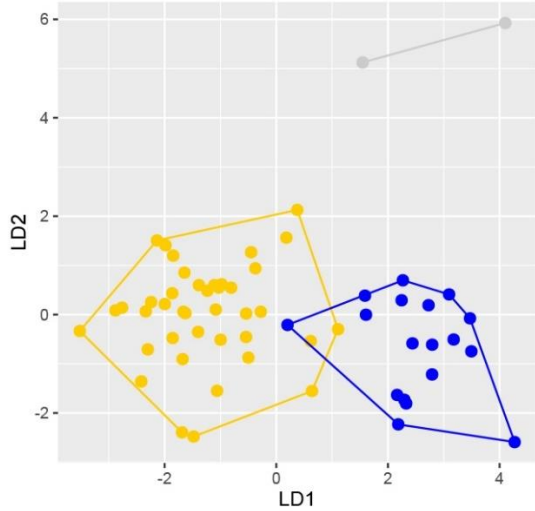
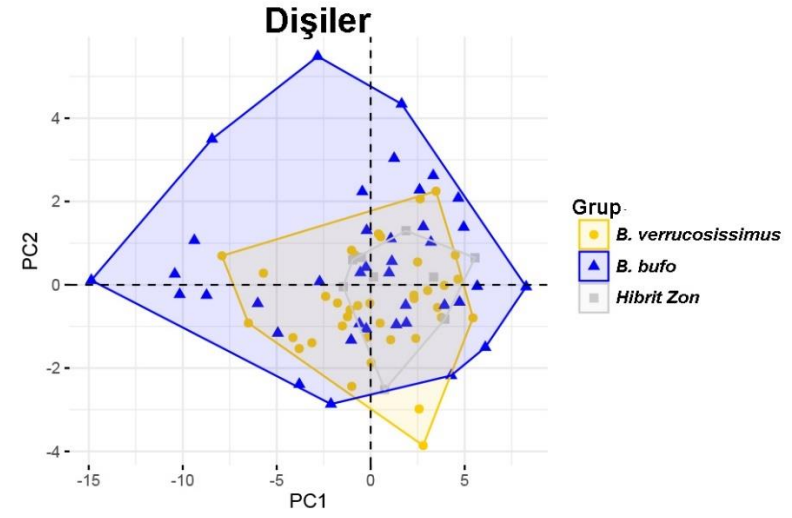
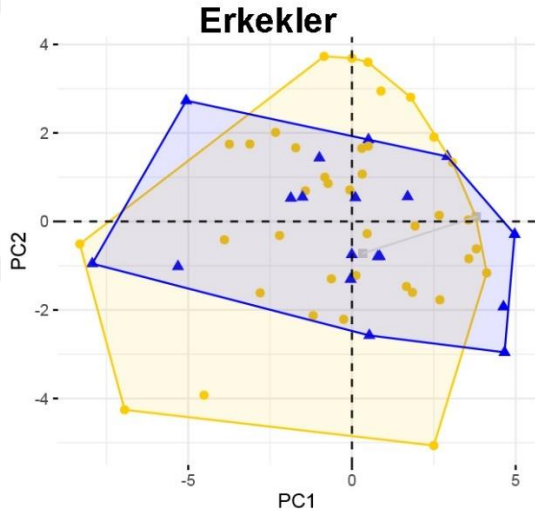
Tablo 36. Erkek bireyler için hesaplanan yapısal matris değerleri

Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2	Değişken	LD1	LD2
VU	0,06	0,10	DB	-0,02	0,10	PARARKAUC	0,12	0,03
BU	-0,03	0,09	ÖNAY	-0,02	0,08	SAĞPAREN	-0,19	0,05
BG	0,05	0,12	PARU	0,00	-0,06	SOLPAREN	-0,23	0,05
BDA	-0,06	-0,07	FU	-0,20	0,18	PD	-0,09	0,04
BDBUA	0,04	0,14	TU	-0,09	-0,05	PA	0,06	0,03
BDG	0,04	-0,13	TAU	-0,05	0,09	İMTBOY	0,12	0,08
GÖZTYM	-0,02	0,17	AAU	-0,22	0,18	İMTEN	0,00	0,03
GÇ	-0,02	0,11	DMT2P	-0,26	0,09	İMTBOYUT	0,04	0,02
TÇ	0,00	-0,12	DMTU	-0,06	-0,07	İMTŞEKLİ	-0,14	-0,05
PU	0,16	0,01	GG	0,21	0,23			
DD	-0,03	0,10	PARÖNUC	0,06	0,11			

Erkek bireyler için elde edilen fonksiyonlar kullanılarak oluşturulan sınıflandırma sonuçları tablosuna göre gruplara atanan bireyler %95,00 oranında doğru yerleştirilmiştir. Çapraz doğrulama oranı ise %76,70'tir (Tablo 37). Hibrit bireyler morfouzayda saf türlerden ayrışık bir küme oluşturmaktadır (Şekil 39).

Tablo 37. Erkek bireylere ait sınıflandırma sonuçları tablosu

Tahmini Grup Atamaları					
Gruplar		<i>B. verrucosissimus</i>	<i>B. bufo</i>	Hibrit Zon	Toplam
Orjinal	<i>B. verrucosissimus</i>	38 (%95)	2 (%5)	0 (%0)	40
	<i>B. bufo</i>	0 (%5,6)	17 (%94,4)	0 (%0)	18
	Hibrit Zon	0 (%0)	0 (%0)	2 (%100)	2
Çapraz Doğrulama	<i>B. verrucosissimus</i>	33 (%82,5)	6 ((%15)	1 (%2,5)	40
	<i>B. bufo</i>	1 (%22,2)	13 (%72,2)	1 (%5,6)	18
	Hibrit Zon	1 (%50)	1 (%50)	0 (%0)	2



Şekil 39. Mikrosatellit DNA analizine dayalı oluşan grupların PCA morfouzaydaki (üst) ve ayrışım morfouzaydaki (alt) saçılım grafikleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türler biyoloji, ekoloji ve koruma disiplinlerinin temel üniteleridir. Dünya üzerindeki çeşitlilik genlerden ekosistemlere kadar uzanan farklı kategoriler içerisine yerleştirilebilse de türlerin kendileri bu yapının temelini oluşturur. Dolayısıyla, tür sınırlarını belirlemek sadece evrim ve türleşme süreçlerini anlamak için değil, biyocoğrafya, komünite ekolojisi, makroekoloji, tür zenginliği ve türlerin dağılımını kavrayabilme açısından da önemlidir (Tobias vd., 2010; Méndez-Rodríguez vd., 2021).

Tür sınırlarının belirlenmesi koruma biyolojisi ve evrimsel biyoloji disiplinleri içerisinde türleşme sürecinin yorumlanması için yaygın olarak ele alınan bir konudur (Guillot vd., 2012; Rannala ve Yang, 2020). Günümüz sistematik çalışmalarında türler ve türleşme olayları değerlendirilirken farklı veri setlerini ve taksonomik karakterleri beraberce alan bütünleştirici taksonomik yaklaşım kullanılmaktadır (Padial vd., 2010). Özetle, farklı metotların gücünü birlikte kullanarak türlerin karakteristiklerini ve akrabalık ilişkilerini doğru şekilde belirlemek biyoçeşitlilik ve koruma ekseninde ele alınabilecek en makul yol olup, coğrafi dağılımların ortaya çıkarılmasında oldukça kullanışlıdır. Morfolojik ve moleküler verilerin bütüncül olarak ele alınmasını yeğleyen güncel yaklaşımlar tür sınırlarının belirlenmesini konu alan çalışmalar için sağladığı tutarlı veriler ile türlerin taksonomik durumları hakkında karar vermede kullanışlı bir dayanak görevi görmektedir (Hillis, 2019; Burbrink ve Ruane, 2021; Hillis vd., 2021).

Ayrıca, türlerin ve popülasyonların coğrafi sınırlarını araştırmak, kesin dağılım sınırları üzerine bilgi elde etmek için kritik bir rol oynamaktadır (Rissler ve Smith, 2010; Hausdorf ve Hennig, 2020). Türler ve popülasyonlar arasındaki coğrafi ilişkiler tür sınırlarının çıkarımında oldukça bilgi verici olabilmektedir. Farklılaşmış gruplara ait bireyler aynı lokalitede bulunursa, karakter durumlarının dağılımındaki farklılıklar bu grupların ayrı birer tür olarak sınıflandırılmasını işaret eder. Simpatrik grupların daimî farklılaşma kriteri genetik tür tanımları ve farklılaşan uyum gücü üzerinden açıklanabilir, fakat allopatrik metapopülasyonlar üzerinden tür sınırlarının belirlenmesi hataya daha açıktır. Bunun sebebiyse, allopatrik metapopülasyonlar arasında gözlenen farklılıkların, bu metapopülasyonların temas üzerinden kaynaşması

durumunda yeterli bir kriter olup olmayacağıdır (Hausdorf ve Hennig, 2020). Dolayısıyla, farklı türlerin sınırlarını belirlerken veya türler arası farklılaşma derecesini değerlendirirken coğrafi veri öncül veya sonsal bir yaklaşım olarak önem arz etmektedir.

4.1. Mitokondriyal DNA Verileri

Mitokondriyal verilere dayalı olarak elde edilen sonuçlara göre *B. bufo* türüne ait mitokondriyal haplotipler Rize-İyidere ilçesi ve Rize-Çayeli ilçesi boyunca belirlenmiştir. Öte yandan, *B. verrucosissimus* türüne ait haplotiplerin varlığının ise Artvin-Şavşat ilçesi ve Rize-Ardeşen ilçesi hattı içerisinde belirlenmiştir. Her iki türün haplotiplerinin bulunduğu ilçeler ise Pazar, Hemşin ve Çamlıhemşin olarak tespit edilmiştir. Literatür özetinde de sunulduğu üzere morfolojik veriye dayalı olarak belirlenen türlerin Doğu Karadeniz içerisindeki dağılımı Hopa-Trabzon hattı boyunca farklı alanları kapsayacak şekilde raporlanmıştır (Bodenheimer, 1944; Mertens ve Wermuth, 1960; Eiselt, 1965; Clark ve Clark, 1973; Orlova ve Tuniyev, 1989; Yılmaz ve Kumlutaş, 1995; Baran vd., 1997; Kutrup, 2001; Tosunoğlu ve Taşkavak, 2001). Moleküler çalışmalara göre ise Kutrup vd. (2006) Rize ve Artvin illerinden elde edilen örnekleri, Garcia-Porta vd. (2012) ise Kafkasya bölgesindeki örnekleri *B. bufo*, olarak Litvinchuk vd. (2008) ise *B. verrucosissimus* olarak değerlendirmişlerdir. Recuero vd. (2012), Jablonski ve Sadek (2019) ve Özdemir vd. (2020) ise Artvin ili örneklerini *B. verrucosissimus* türü içerisine dahil etmişlerdir. Tez kapsamında oluşan mitokondriyal haplotiplerin coğrafi dağılımı ise daha önce yapılan çalışmaları özellikle de lokal ölçekte desteklememektedir. Tuniyev vd. (2014), 1995 ve 2012 yılları arasında gerçekleştirdiği geziler sonucunda yaptıkları değerlendirmeye göre *B. verrucosissimus* türünün Doğu Karadeniz içerisinde Artvin-Şavşat ilçesinden başlayarak Kaçkar Dağları'nın batı yüzünü oluşturan Rize-Pazar ilçesine kadar dağılış gösterdiğini not etmişlerdir. Mitokondriyal veriler, Tuniyev vd. (2014)'ün çizdiği sınırları doğrular niteliktedir.

Mitokondriyal veriler ile inşa edilen filogenetik ağaç topolojisi ve haplotiplere ait şebeke grafiği birbirini tamamlayıcı sonuçlar açığa çıkarmıştır. Ek olarak, mitokondriyal ısı haritasındaki genetik farklılaşma derecesine göre oluşan dendogram da iki ayrı türün varlığını doğrulayan bir çatallaşma göstermiştir. Filogenetik ağaçta

ise *B. verrucosissimus* türüne ait klad içerisinde politomik örüntüler gözlenmiştir. Wang vd. (2021) *B. bufo* türünün filogenetik ilişkilerini incelediği çalışmada GenBank içerisinde mevcut olan Sitokrom b verileri ve Çin-Xinjiang bölgesinden elde ettiği bireylere ait verileri beraberce kullanmıştır. Çalışma sonucunda oluşan ağaçta *B. verrucosissimus* türünü temsil eden bireylerden oluşan klad benzer şekilde politomik bir örüntü sergilemiştir. Amfibilerde tür oluş hikayesi özellikle Pleistosen Dönemi içerisine denk düşen türler için türleşmede geçen görece kısa periyoda bağlı olarak ortaya çıkan yakın filogenetik ilişkilerin benzer örüntülere yol açtığı farklı türler için yapılan çalışmalar içerisinde de gözlenmiştir (Gvoždík vd., 2010; van Riemsdijk vd., 2017; Olson vd., 2021). Garcia-Porta vd. (2012) *Bufo* cinsi içerisine dahil türlerde gözlenen bölgesel genetik çeşitlenmeye sebep olan birincil faktörün Pleistosen Dönemi buzul döngüleri olduğunu not etmişlerdir. Ayrıca, bu durumun özellikle Avrupa ve Kafkasya içerisinde yerleşik olan taksonlar için daha etkin bir iz bıraktığı belirtilmiştir. Tarkhishvili (2014) neme bağımlı karasal türlere ait Kafkasya soylarının Avrupa ve Merkez Asya temsilcilerinden 3 ve 7 milyon yıl önce izole olduklarını ifade etmiştir. Recuero vd. (2012)'nin çalışmada kalibre edilen moleküler saat bulgularına göre *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri yaklaşık 2,75 milyon yıl önce son ortak atadan ayrılarak türleşme döngüsüne başlamıştır ve hesaplanan üst sınıra göre bu başlangıcın 4,20 milyon yıl önceye kadar erişebileceği de dikkate sunulmuştur. Çalışmamızda meydana gelen politomik örüntü ve literatür yorumları göz önüne alınınca, bulgular mevcut kontak/hibrit zonların ve türler arası gen akışının var olabileceğini gösteren genetik işaretleri sunmaktadır.

van Riemsdijk vd. (2022) yaptıkları çalışmada Karadeniz Bölgesi boyunca dağılışı gösteren *Ommatotriton nesterovi* (batı) ve *O. ophryticus* (doğu) türlerinin genetik verilere göre Samsun civarında bir kontak zona sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca ülkemiz sınırlarına denk düşecek şekilde Karadeniz'in güney kıyılarının yakın ilişkili taksonlar için dağılım sınırlarının kesişebileceği ve buzul sonrası dönemleri takip eden coğrafi genişlemeye bağlı olarak sekonder kontakların kurulabileceği sütur zonlar olarak tanımlamıştır (Bilgin, 2011). Ortak atadan yakın zamanda ayrılmış olan türler arasındaki üreme bariyerleri eski tarihli türleşme geçmişine sahip türlere kıyasla daha zayıf olduğundan dolayı, farklı genetik belirteçlerden elde edilen filogenetik sinyaller arasında meydana gelecek

uyumsuzluklarda sütur zonlar boyu halihazırda devam eden introgresyon, kontak zonlar üzerindeki gen akışı veya hibridizasyonu yansıtabilmektedir. Artvin ve Rize ili sınırları içerisinde yer alan Doğu Karadeniz konumlu dağ zincirleri ve Gürcistan'ın Transkafkasya bölgesi aynı coğrafi kemerin parçaları olup Kuzey Anadolu-Küçük Kafkasya Ofiyolit Süturu'na ait alanlardır. Dahası, Artvin ve çevresi beraberce Doğu Karadeniz Dağları'nın Artvin-Bolsini merkez hattını oluşturmaktadır (Yılmaz, 2000; Rangin vd., 2002). Sütur zonlar sahip oldukları iklimsel etki, seçim ve adaptasyon döngülerine bağlı olarak bir kompleks oluşturmaktadırlar. Sütur zonlar içerisinde gözlenen etkiler, zonlar içerisindeki dağların topografyası, nehirlerin varlığı ve benzer coğrafi aktörlerin etkisi ile oluşan ana mekânsal karakteristikler ile şekillenmekte olup, özellikle buzul dönemi sığınaklarından hareketle meydana gelen tarihsel genişleme ile ilişkilidir. Bahsedilen karakterler özellikle de amfibilerde tür ve alt tür düzeyindeki genetik varyasyonun dağılımını doğrudan etkilemektedir (Zamudio ve Savage, 2003; Elmer vd., 2012; Stojak ve Tarnowska, 2019). Karadeniz Bölgesi içerisinde birçok farklı amfibi ve sürüngen türü için benzer kontak zonların varlığı rapor edilmiştir. Örneğin *Triturus* cinsi (Wielstra vd., 2013; Wielstra ve Arntzen, 2016), *Lissotriton* cinsi (Wielstra vd., 2015), *Vipera* cinsi (Mebert vd., 2015); *Lacerta* cinsi (Marzahn vd., 2016) ve *Darevskia* cinsi (Arribas vd., 2022b) bu cinslerin başlıcaları olarak göze çarpmaktadır. En dikkat çeken kontak zon ise Fındıklı Çağlayan Vadisi içerisindeki *Pelias barani* ve *Pelias kaznakovi* arasındaki zondur (Gül, 2020).

Recuero vd. (2012) inşa ettiği nükleer ağaçlarda *B. verrucosissimus* türüne ait bireylerin *B. bufo* kladı içerisine yerleştiğini fakat mitokondriyal analizlerde ise ayrı birer takson olarak ayrıldığını söylemiştir. Özdemir vd. (2020) türlerin genetik örüntüleri için benzer sitonükleer uyumsuzlukların varlığını doğrulamış, çok sınırlı bir nükleer DNA çeşitliliğine kıyasla net şekilde ayrılan iki mitokondriyal kladı ortaya koymuştur. Araştırmacılar bağımsız olarak muhtemel bir kontak zonun var olduğunu belirterek, tez çalışmasına konu olan coğrafi alanın detaylı örneklenmesini önermişlerdir. Sütur zonların konumu ve taksonlar için rapor edilen genetik örüntüler Artvin-Rize hattının kontak/hibrit zonları ihtiva ettiğini doğrulamaktadır.

Demografik genetik analizler sonucu elde edilen değerlere göre, *B. verrucosissimus* türüne dahil haplotipler için popülasyon genişlemesinin var olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde, EBSF analizi sonuçları da *B. verrucosissimus* türü için

efektif popölasyon büyüklüğünün son 20 bin yıl içerisinde ani bir genişleme gösterdiğini doğrulamaktadır. Diğer yandan, *B. bufo* türüne dahil haplotiplerle yapılan analizler ise türün 50 bin yıldır kademeli şekilde fakat daha yavaş bir genişleme gösterdiğini işaret etmektedir fakat, uyumsuzluk analizi sonuçları genişlemeyi desteklemeyen multimodal bir dağılımı açığa çıkarmıştır ve polimorfizm testleri ile elde edilen değerler de aynı yönde benzerlik göstermiştir. Her ne kadar *B. verrucosissimus* türü için elde edilen demografik analiz sonuçları genişleme yönlü olsa da, istatistiksel olarak bir anlamlılık ifade etmemektedir. Aykırı bir sonuç olarak *B. bufo* türü için daha yüksek haplotiptip çeşitliliği gözlenmiştir. Yüksek haplotip çeşitliliği ve düşük nükleotid çeşitliliği değerleri ani popölasyon genişlemesini doğrulayan bulgulardır ve farklılaşma için yeteri kadar zamanın geçtiğini ifade eder fakat bu durum önemli ölçüde dizi farklılıklarının genom içerisinde oluşması için yeterli sürenin geçmiş olduğuna da kanıt sunabilir (Avisé, 2000). Bahsedilen durumlar farklı amfibi türleri için rapor edilmiştir (Nuñez vd., 2011; Zhang vd., 2015; Langone vd., 2016; Najibzadeh vd., 2018).

Buzul ve buzullar arası dönemlerin birbirini ardışık şekilde takip ettiği Kuvaterner Dönem tür dağılımları üzerinde önemli etkilere neden olmuş ve tür sınırlarının coğrafi değişimlerini tetiklemiştir. Buzul devirlerinde ve özellikle Son Buzul Maksimumu içerisinde Akdeniz Bölgesi, Kafkaslar ve Anadolu karası türlerin kolonize olması için bir sığınak görevi görmüş ve bu hareketler uzun periyodları takiben genetik farklılaşmaya yol açmıştır. Buzullar arası dönemlerde ise türler, dağılım sınırlarını genişleterek eski yayılış alanlarına doğru tekrar kolonize olmuş ve buna bağlı olarak yakın ilişkili türler veya genetik olarak farklılaşmış soylar ile sekonder kontaklar oluşturarak hibridizasyon ve introgresyon örüntülerinin gözlemlendiği genetik etkileşimleri sergilemişlerdir (Hewitt 2011; Stöck vd., 2012; Dufresnes vd., 2014; Jandzik vd., 2018; Dufresnes vd., 2020c; Jablonski vd., 2021). Bahsedilen durumlar Anadolu ve Kafkasya içerisinde dağılışı gösteren amfibi ve sürüngen türleri için de rapor edilmiştir (Akın vd., 2010; Wielstra vd., 2010; Kornilios vd., 2012; Zinenko vd., 2015; Stümpel vd., 2016; Veith vd., 2020). Garcia-Porta vd. (2012)'ye göre *B. verrucosissimus* türünü temsil eden Kuzey Kafkasya, Güney Kafkasya ve Akdeniz soylarının meydana gelişi Kuvaterner Dönem içerisindeki buzul devirleriyle doğrudan ilişkili olup, Pleistosen Dönemi içerisinde Kafkasya coğrafyasında mevcut

sığınaklar üzerinden ardışık olarak gerçekleşen genişleme-çekilme hareketlerinin döngüsel tekrarıyla ilişkilidir. Aynı çalışmada, yaklaşık 18 bin yıl önce Doğu Karadeniz kıyı hattı boyunca mevcut olan dar bir orman kuşağının var olduğu belirtilerek bu alanın da *B. bufo* türü için buzul döneminde bir sığınak işlevi gördüğü not edilmiştir. Tez kapsamında yapılan EBSP analizi de Garcia-Porta vd. (2012)'yi doğrular şekilde Artvin-Rize sınırları ölçeğinde *B. verrucosissimus* türü için son 20 bin yıl içerisinde ani bir genişleme olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca, türler arasındaki düşük mitokondriyal farklılık derecesi, paylaşılan ortak alellerin mevcudiyeti ve nükleer DNA ile gözlenen uyumsuzluklar kuzeydoğudaki kontak ve hibrit zon varlığını destekleyen bulgular olarak sunulmuştur (Recuero vd., 2012; Arntzen vd., 2013a).

Mitokondriyal haplotiplere göre saf türleri temsil eden bireyler ve kontak bölgeye dahil olan bireyler arasında göz, timpaniyum, parotid bezleri ve iç metatarsal tüberküllerle ilişkili karakterlerin ortalaması bakımından anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Kontak bölge temsilcilerine ait ortalama değerler genel olarak saf tür olarak değerlendirilen bireylerin ortalama değerleri arasında veya her iki türden daha düşük ortalamaya sahiptir. Dursun (2018), Türkiye genelinde 25 ilden toplanmış *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerini morfolojik olarak kıyasladığı tez çalışmasında GG ve IMTBOY karakterlerini diyagnostik olarak tanımlamış ve *B. verrucosissimus* türünün daha ayırık gözler ve daha uzun iç metatarsal tüberküle sahip olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgularda aynı karakterlerin lokal ölçekte de ayırıcı diyagnostik karakterler olduğunu teyit etmektedir.

Arntzen vd. (2016) ve Trujillo vd. (2017) Fransa'nın kuzeybatısında *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zonları inceledikleri çalışmalarında hibrit bireylerin parotidler ve iç metatarsal tüberküller bakımından iki türün arasında ortalama değerler aldıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, *B. bufo* türünde daha küçük ve yuvarlak tüberküller ile paralel konumlu parotidlerin var olduğunu, *B. spinosus* türünde ise daha dar ve uzun tüberküller ve dışbükey parotidlerin var olduğunu bildirmişlerdir. Mitokondriyal saf tür gruplarına göre, *B. verrucosissimus* türü *B. bufo* türüne kıyasla daha uzun parotidlere ve iç metatarsal tüberküle sahiptir, fakat parotid eni daha dardır. Kontak bölge bireyleri ise ara değerler almıştır. Özdemir vd. (2020), Akdeniz Bölgesi ve Artvin ilindeki iki farklı *B. verrucosissimus* soyunu kıyaslayarak,

Artvin örneklerinin (Borçka Karagöl) daha dar ve paralel pozisyonlu parotidlere sahip olduğunu belirtmiştir. Sinsch vd. (2009)'de *B. verrucosissimus* türüne ait kuzey soyunu kapsayan Kafkasya popölasyonlarında benzer parotid karakteristiklerini raporlamıştır. Bu tez çalışmasında incelenen popölasyonlar göz önüne alındığında paralel pozisyonlu parotidlerin Murgul, Borçka Karagöl ve Şavşat içerisinde örneklenmiş bireylerde görüldüğü, Hopa ilçesinden mitokondriyal kontak alanı olan Pazar ilçesine kadar uzanan alanda ise daha dışbükey parotid yapısının öne çıktığı tespit edilmiştir. Bu durum, popölasyonlar üzerinden gerçekleşen gen akışıyla meydana gelebilecek bir karakter değişimi olarak yorumlanabilir.

Yapılan PCA analizine göre grupların morfouzayda parotidler ve iç metatarsal tüberkül ile ilgili değişkenlerin katkısıyla ayrıştığı ve ek olarak VU, DD ve BU değişkenlerinin de saf tür ve kontak zon bireylerini ayırmada etkili olduğu görülmüştür. Kontak zon içerisindeki bireyler türler arası bir alana yerleşmiştir. LDA analizi de yüksek doğrulama oranı ile gruplar arasındaki farklılaşmayı doğrulamıştır. LDA morfouzayında erkekler için daha net bir ayrışım meydana gelmiş, dişilerde ise sınırlı bir çakışma oluşmuştur. LDA analizindeki yanlış sınıflandırılan birey sayısına bakınca, 23 birey içeren gruptaki 6 birey *B. verrucosissimus* kümesi içerisine atanmıştır. Amfibilerde yapılan çalışmalarda, genetik karışım gösteren bireylere ait grupların ara karakterler almanın yanı sıra, bir saf ebeveyn türe de yakın morfoloji sergileyebileceği vurgulanmıştır (Smith vd., 2012; Bell ve Irian 2019; Niedzicka vd., 2020; Fahrbach vd., 2021). Majtyka vd. (2022)'nin Polonya içerisinde *Hyla arborea* ve *H. orientalis* türleri arasındaki kontak zon boyunca meydana gelen morfolojik varyasyonları incelediği çalışmada, saf tür ve hibrit bireylerin çok değişkenli analizlerde ayrıştığı fakat ortalama değerlere bakıldığında, hibrit bireylerin *H. orientalis* türü ile benzeştiğini bildirmiştir. Benkovský vd. (2021) ise *Anguis fragilis* ve *A. colchica* türlerini ele aldıkları çalışmada metrik ve meristik karakterler bakımından hibrit bireylerin hem ara karakterler hem de *A. colchica* türü ile benzeşik karakterler sergilediklerini kayda geçirmiştir. Araştırmacı ayrıca amfibi ve sürüngen türlerinin Batı Paleartik boyunca gösterdiği yayılımın birçok farklılaşmış soy ile açıklandığını, bunun sebebinin ise Kuvaterner Dönem iklimsel dalgalanmaları ve kolonizasyon hareketlerine bağlı olarak şekillenen potansiyel hibrit zonlardan ötürü olduğu üzerine durmuştur. Bu bakımdan literatür bulguları kontak bölge bireylerinin

ara karakterleri ve *B. verrucosissimus* türü ile benzeşmeyi desteklemektedir.

4.2. Mikrosatellit DNA Verileri

Bu tez çalışması, literatür içerisinde *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasındaki hibrit zonu detaylı şekilde karakterize eden ilk çalışmadır. Yapılan kapsamlı coğrafik örnekleme ve yüksek polimorfizm derecesi gösteren mikrosatellitler ile yapılan klin analizi hibrit zonun yapısına ve *B. bufo* tür grubu içerisinde taksonomik açıdan mevcut olan son belirsizliğe ışık tutmuştur.

Temel popülasyon genetiği indekslerine göre popülasyonlar için gözlenen heterozigotluk değerleri, beklenen heterozigotluk değerlerinden daha yüksek değerler almıştır. Gözlenen heterozigotluk değerlerinin beklenen değerlerden büyük olması üreme bariyerini kıran etkilerin var olduğunu gösteren bir durum olup daha önceden izole olan popülasyonlar arasında karışımın var olduğunu kanıtlar niteliktedir. Wu ve Hu (2010), Çin içerisinde *Bufo gargarizans* türüne ait popülasyonların genetik çeşitliliğini incelediği çalışmasında *Bbufu11* ve *Bbufu49* belirteçleri için daha yüksek gözlenen heterozigotluk değerleri hesaplamışlardır. Arntzen vd. (2016) *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zon üzerine yaptığı araştırmada tez çalışmamızda kullanılan lokuslar ile popülasyonlar için beklenen heterozigotluk değerlerini 0,46 ve 0,75 arasında, gözlenen heterozigotluk değerlerini ise 0,41 ve 0,68 arasında hesaplamıştır. Popülasyonların geneli için gözlenen heterozigotluk değerleri daha düşük seviyede kalmıştır. Çalışma alanı 500 km uzunluğunda bir hat üzerinde planlanmış, 17 popülasyonun 10 tanesi ise saf türleri temsil edecek şekilde uç alanlardan örneklenmiştir. Bu bağlamda, tez çalışmasındaki coğrafik hat 228 km olup, ardışık şekilde örneklenmiş olduğundan ötürü popülasyonlar arası gen akışına bağlı olarak gözlenen heterozigotluk değerlerinin daha büyük olduğuna dair kanaat oluşmuştur. Roth ve Jehle (2016), Norveç takımadaları içerisinde yaşayan *B. bufo* popülasyonları için deniz seviyesine bağlı olarak meydana gelen doğal habitat parçalanmalarının genetik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında *Bbufu11*, *Bbufu13* ve *Bbufu49* lokuslarını da içeren 9 belirteç kullanmış ve 19 ayrı popülasyonu incelemişlerdir. Adalar arası mesafe 1,20 ve 73,78 km arasında değişiklik göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre bütün popülasyonlarda daha düşük gözlenen heterozigotluk değerleri tespit edilmiştir. Bu durumum habitat parçalanması ve gen akışının

kesilmesine bağlı olarak meydana gelen yüksek genetik çeşitlilikle ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Trujillo vd. (2017) araştırmasında Arntzen vd. (2016)'in çalışma alanını kapsayan bölgeyi yeniden değerlendirmiş, hibrit zon bölgesinden ise tek bir popülasyonu örneklemiştir. Elde edilen bulgulara göre iki türü temsil eden uç bölgelerdeki 5 saf popülasyona ait beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri her bir belirteç için karma bir örüntü sergilemiş, fakat hibrit zonu temsil eden Moyaux popülasyonunda ise beklenen heterozigotluk değeri 0,32-0,92 arasında, gözlenen heterozigotluk değeri ise 0,33-1 arasında hesaplanmıştır. Bulgular beraberce değerlendirildiğinde tez çalışmasında da *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasındaki hibrit zonu ve ayrıca yakın popülasyonlar arası gen akışını destekleyecek sonuçların elde edildiği görülmektedir. Öte yandan, belirteçler için elde edilen skorlar, Trujillo vd. (2017)'nin hesapladığı değerlerin altında kalmıştır. Bunun sebebi ise lokusları çoğaltmak için kullanılan primerlerin *B. spinosus* türüne özgü olmasıdır.

Tez kapsamında incelenen popülasyonlarda alelik zenginlik değerleri 2,57 ve 6,57 arasında değişmekte olup, bu sayı 15 popülasyon için 4'n üzerine çıkmıştır. En yüksek alelik zenginlik değeri ise YAY popülasyonu içerisinde belirlenmiştir. Roth ve Jehle (2016)'nin çalışmasında *B. bufo* popülasyonları için gözlenen alelik zenginlik 2,09 ve 3,55 arasında değişmiştir. Macdonald vd. (2020) ise *B. bufo* türü için farklı üreme alanlarından örnekleme yapılan popülasyonlarda değerlerin 7,9 ve 9,5 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Wen vd. (2015) ise Çin'in batısında incelediği *B. gargarizans* popülasyonları için hesaplanan değerlerin 2,00 ve 6,04 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Alelik zenginliğe dayalı olarak genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi koruma genetiği ve belirteç yardımıyla metotlar ile ölçülen genetik arka planı araştırmak için önemli bir kaynak olup, özellikle popülasyonlar içerisinde meydana gelmiş darboğaz olaylarını ve küçülmeyi anlamakta yardımcı rol üstlenmektedir. Ayrıca, uzun zamansal perspektifte seçilime bağlı olarak alelik kompozisyonda meydana gelen değişimleri, gen akışı ve introgresyon olaylarını değerlendirmede yardımcı kaynak olarak yararlanılabilir (Foulley ve Ollivier, 2006). Chiocchio vd. (2021) İtalya içerisindeki *B. bufo* poplasyonlarında buzul dönemi sığınakları ve sonrasında gerçekleşen dispersal hareketlerinin etkisine bağlı meydana gelen genetik çeşitliliği değerlendirdiği çalışmasında alelik zenginlik değerlerini 2,51-4,05 arasında hesaplamış, kuzeyden güneye doğru gidildikçe genetik çeşitliliğin

azaldığını, fakat farklı soyların kesiştiği alan olan orta hat boyunca genetik çeşitliliğin daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca kuzeybatı ucundaki genetik çeşitliğinde *B. bufo* ve *B. spinosus* türlerinin dağılım alanlarının kesişim noktasına bağlı olarak arttığı görülmüştür. Tez çalışması kapsamında en yüksek alelik zenginlik değeri de hibrit zon merkezi olarak belirlenen YAY popülasyonunda hesaplanmış ve 14 lokus için toplam 92 alel belirlenmiştir ve özgü alel içermemektedir. Dolayısıyla yüksek genetik çeşitlilik indeksleri hibrit zonu doğrulayan kanıtlar açığa çıkarmıştır.

Popülasyonlar arası ikili F_{ST} değerleri 0 ve 0,325 arasında değişiklik göstermiştir ve popülasyonlar arasında genetik açıdan genelde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. F_{ST} değerleri, popülasyon içerisindeki birey sayısının 10 ve altında, kullanılan lokus sayısının ise 20 ve altında olduğu durumlarda gen akışını tahmin etmede kullanılması uygun bir metottur (Gaggiotti vd.,1999). Elde edilen bulgular, yakın coğrafi konumlu popülasyonlar arasında daha düşük değerlerin gözlendiğini ve coğrafi olarak uzak olan popülasyonlar arasında bu değerlerin daha yüksek seviyede olduğunu işaret etmiştir. Mantel testleri sonucunda tespit edilen mesafeye bağlı genetik izolasyonda F_{ST} bulgularını destekleyici niteliktedir. Ayrıca türleri temsil edecek şekilde ayrılan gen havuzları için de benzer genetik şemalar açığa çıkmıştır. Hibrit zon merkezi olan YAY popülasyonu için elde edilen farklılaşma derecesi ise maksimum 0,184 olarak hesaplanmış ve kalan 21 popülasyon ile arasında sınırlı derecede genetik farklılaşma olduğu tespit edilmiştir. Seppa ve Laurila (1999), Baltık Denizi boyunca var olan adalarda kolonize olmuş *B. bufo* popülasyonları arasındaki genetik çeşitliliği incelediği çalışmasında adalar arası F_{ST} ortalamasını 0,019 olarak belirlemiş ve popülasyonlar arasında genetik bakımdan anlamlı bir farklılığın olmadığını öne sürmüştür. Macdonald vd. (2020) Britanya içerisindeki tarımsal alanlarda heterojen çevre yapısı ve hat boyu coğrafi mesafenin *B. bufo* türü popülasyonları üzerinde oluşturduğu genetik farklılaşmayı araştırdığı çalışmasında popülasyonlar arasındaki F_{ST} değerlerinin 0,003 ve 0,044 arasında değiştiğini hesaplamış, bireylerin tarımdan kaynaklı olarak azalan üreme havuzlarına ulaşabilmek için uzun menzilli göçler ile dispersal gerçekleştirdiğini ve bundan dolayı düşük seviyede genetik farklılaşmanın var olduğunu açıklamıştır. O'Brein vd. (2021) İskoçya iç kıyılarında *B. bufo* türüne ait popülasyonların kolonizasyon hikayesi üzerine yaptığı araştırmada 12 popülasyon arasındaki F_{ST} değerlerinin 0 ve 0,50 arasında değiştiğini

rapor etmiş ve STRUCTURE analizi sonuçlarına bağlı olarak 4 genetik grubun var olduğunu belirlemiştir. Ana karalardan izole olmuş olan ada popülasyonları düşük alelik zenginlik ve yüksek F_{ST} değerleri ile karakterize edilirken, gen akışının mevcut olduğu popülasyonlar arasında ise düşük seviyede F_{ST} değerleri tespit edilmiştir. Literatür göz önüne alınınca, tez çalışmasında değerlendirilen yakın popülasyonlar arasında göçe bağlı veya coğrafi bariyerlerle sınırlanmış alan çerçevesinde genetik benzerliklerin oluştuğu sonucuna varılmaktadır, fakat YAY popülasyonundaki düşük seviyedeki farklılaşmanın sebebi ise hibridizasyona bağlı olarak her iki türe ait genetik yapıyı taşımasından ötürüdür.

PCA ve DAPC metotları kullanılarak yapılan çok değişkenli genetik analiz sonuçları hem popülasyonlar hem de STRUCTURE atamalarına göre belirlenen genetik gruplar için iki ayrı kümenin var olduğunu kanıtlayıcı bulgular sunmuştur. Popülasyon bazında en batı uç olan KAL popülasyonundan YAY popülasyonlarına kadar olan gruplar genetik uzayda birbirine daha yakın kümelenmiş ve *B. bufo* türüne ait gen havuzunu temsil etmişlerdir. En doğu uç olan MES popülasyonundan YAY popülasyonuna kadar olan gruplar ise *B. verrucosissimus* türünü temsil edecek şekilde yakın bir saçılım göstermiştir. YAY popülasyonu ise koordinat eksenlerinin kesiştiği orta konuma yerleşerek ara karakterde saçılım göstermiştir. STRUCTURE sonuçlarına göre oluşturulan gruplarda da PCA genetik uzayı hibrit YAY popülasyonunun ara konumuyla temsil edilmiş, DAPC genetik uzayında saf türler net bir şekilde ayrılmış, hibrit YAY popülasyonu da *B. verrucosissimus* kümesine daha yakın bir saçılım göstermiştir. Trujillo vd. (2017), Fransa içerisindeki 500 km'lik örnekleme hattı üzerindeki 6 popülasyona ait bireyleri 14 mikrosatellit lokusu için genotiplemiş ve oluşturduğu genetik uzayda üç ayrı grubun var olduğunu belirlemiştir. Buna göre, batı hattında yer alan 3 popülasyonun beraberce saçılım gösterdiği ve *B. spinosus* türünü temsil ettiğini, doğu hattında yer alan iki popülasyonun ise *B. bufo* türünü temsil ettiğini söylemiştir. Hibrit zon olarak değerlendirilen Moyaux popülasyonu ise ara konumlu bir saçılım göstermiştir. Van Riemsdijk vd. (2023) *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki 900 kilometrelik hibrit zon hattı boyunca 1200 ayrı ddRADSeq belirteci kullanarak oluşturduğu saçılım grafiğinde karışım gösteren 6 hibrit popülasyonun PCA genetik uzayında saf türler arasında konumlanmış şekilde saçılım gösterdiğini belirlemiş ve genetik karışımın seviyesine bağlı olarak türler arası

kademeli bir geçişin var olduğunu gözlemişlerdir. Benzer genetik şemalar farklı anur cinsleri içinde rapor edilmiştir. Örneğin, Dufresnes vd. (2015) *Hyla arborea* tür grubu içerisinde sekonder kontaklara bağlı olarak meydana gelen türleşme olayının zaman dilimleri üzerine yaptığı araştırmada, *H. orientalis* ve *H. arborea* türlerini Balkanlar civarında iki ayrı hat üzerinden ele almıştır. Örneklem grubu ise 97 lokalite ve 588 bireyi kapsamıştır. Çalışma sonucunda hatlar üzerinde yaklaşık olarak 30 km'lik hibrit zon alanı tespit edilmiş, bu örnekler genetik uzayda saf türlerden ayrı ara bir konum almıştır. Diğer bir çalışmada ise, Dufresnes vd. (2020a)'in buzul dönemi sığınaklarının türleşme ve sitonükleer uyumsuzluklar için sıcak nokta olduğunu hipotezini test etmek amacıyla İspanya'daki ranid kurbağalar üzerine eğildi çalışmasında 261 birey 566 diyagnostik SNP verisi ile değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma sonucunda *Rana parvipalmata* ve *Rana temporaria* türleri arasında 25 km'lik bir hibrit zon varlığı tespit edilmiş ve bu alan içerisindeki bireyler coğrafi geçişle uyumlu şekilde genetik uzayda türler arası saçılım göstermiştir. Çalışmamızda gözlemlendiği üzere hibrit zon merkezi olarak belirlenen YAY popülasyonuna dahil bireylerin genetik uzayda sergilediği ara konumlu saçılımlarda rapor edilen durumlar ile benzeşmekte olup, hibrit zon alanı literatür desteği ile coğrafi açıdan doğrulanmaktadır.

Yapısal genetik analizler *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerini temsil eden ve net bir şekilde ayrılan iki farklı genetik kümenin varlığını ortaya koymuş, batı-doğu hattını takip eden şekilde genetik geçiş tespit edilmiş ve Fındıklı Yaylacılar alanında (YAY) hibrit zonu kanıtlayacak şekilde ara seviyede genetik karışım gösteren bireyler tespit edilmiştir. YAY popülasyonun batısında kalan popülasyonlar STRUCTURE skorlarına göre saf *B. bufo* ($Q>0,8$), doğusunda kalan popülasyonlar ise saf *B. verrucosissimus* ($Q<0,2$) türü olarak belirlenmiştir. Doğu alanındaki tek istisna ise STRUCTURE analizinde nispeten daha yüksek karışım oranı gösteren CFT popülasyonu olmuştur. Arntzen vd. (2016) hibrit zon değerlendirmesi kapsamında örnekledikleri popülasyonlar için oluşturduğu STRUCTURE modelinde, optimum küme sayısını $K=2$ olarak belirlemiş, popülasyonların büyük bir kısmının saf türler olarak atandığını ve sınırlı ara genetik yapı gösteren hibrit popülasyonları var olduğunu söylemiştir. Trujillo vd. (2017)'nin çalışmasında da incelenen 6 popülasyon için oluşturulan STRUCTURE modelinde *B. bufo* ve *B. spinosus* türlerini temsil eden iki gen havuzunun olduğu belirlenmiş, ara genetik karakter gösteren hibrit

popülasyonun ise oransal olarak *B. bufo* türüne daha yakın olduğu söylenmiştir. Van Riemsdijk vd. (2019, 2023) Fransa'nın batısından İspanya'nın doğu sınırları içerisine kadar daha geniş bir alandan örneklediği popülasyonlar için alelik ve genomik veriler kullanarak oluşturduğu STRUCTURE modelleri için de benzer şekilde *B. bufo* ve *B. spinous* türlerine denk gelen iki kümenin oluştuğunu bildirmiştir. Bu bakımdan, tez kapsamında oluşturulan en uygun STRUCTURE modeli tür grubunun batı kontak zonunda elde edilen modeller ile örtüşmekte ve iki türü temsil eden gen havuzu ile sınırlı bir hibrit zonun varlığını doğrulamaktadır. Model bar grafiğine göre hibrit zon merkezi olan YAY popülasyonunun doğu ve batısında yer alan FIN ve ARD popülasyonlarında ise çok sınırlı seviyede introgresyon gözlenmiştir. Dufresnes vd. (2015) Balkanlar içerisinde konumlanan *Hyla arborea/Hyla orientalis* hibrit zonu için güçlü bir üreme izolasyonunun var olduğunu kanıtlayacak şekilde hibrit zon etrafında çok sınırlı bir introgresyon gözlendiğini belirterek, popülasyonların büyük bir kısmının coğrafik tür sınırlarına uygun şekilde farklı genetik üniteleri temsil ettiğini açıklamıştır. Benzer şekilde Çoruh Nehri'nin arka yakasına kalan AKH, MES ve BOR popülasyonları ise yüksek saf tür skorları ile göze çarpmaktadır. Sağlam vd. (2014) Artvin ve Rize illerinde dağılışı gösteren *Phonochorion* cinsine dahil cırcırböceklerinin türleşme hikayesi üzerine yaptığı çalışmada türleşme tarihinin Pleistosen Dönemi buzun döngüleriyle ilişkili olduğunu, Artvin ilinin iç kısmında yayılışı gösteren *Ph. satunini* türünün diğer taksonlardan Çoruh Vadisi boyunca oluşan düşük rakıma dayalı coğrafi bariyer ile izole olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde, Kurnaz vd. (2019) kırmızı karınlı kertenkelelerin filocoğrafyası üzerine çalıştığı araştırmasında *Darevskia parvula*, *Darevskia adjarica* ve *Darevskia tuniyevi* türlerinin Artvin içerisinde Çoruh Nehri'nin etkisiyle coğrafik olarak ayrıştığını ifade etmiştir. Çalışmamız içerisinde K=2 kümesindeki yüksek saflık skoru değerleri, K=5 ve K=9 kümelerinde gözlediğimiz çeşitlilik göz önüne alınca bahsedilen coğrafi bariyerin *B. verrucosissimus* türü içerisinde gözlenen çeşitlilikte ana rolü üstlendiği düşünülmektedir.

Batı Paleartik anur türleri arasında, 3 milyon yıldan daha erken türleşme geçmişine sahip olan taksonların doğal ortamda genetik olarak karışma ve geniş ölçüde hibritleşme eğiliminde oldukları bilinmektedir (Colliard, 2010; Dufresnes vd., 2015; Dufresnes vd., 2021a). Bu tez kapsamında incelenen türleri konu edinen diğer

çalışmalara göre taksonların ayrışma tarihi 2,5-2,75 milyon yıl önceye dayanmaktadır fakat veriler lokal ölçekte zayıf kaldığı için sınırlı bir genetik karışımın varlığı rapor edilmiştir (Recuero vd., 2012; Garcia-Porta vd., 2012). Kuvaterner Dönem boyunca meydana gelen iklimsel salınımlar türlerin coğrafi dağılımlarını etkileyerek, sekonder kontakların ortaya çıkmasını tetiklemiştir (Hewitt, 1999, 2011). Kuzey yarımkürede ana sığınak alanları İber Yarımadası, Balkanlar, İtalya, Anadolu ve Kafkaslar içerisinde konumlanmıştır. Ilık periyodlar boyunca uygun habitat şartlarının etkisiyle sığınaklardaki popülasyonların buzul sonrası dönemi takiben genişlemesi genetik olarak farklılaşmış soyların tekrar kaynaşması, hibridizasyon ve introgresyon örüntüleri ile sonuçlanmıştır (Stöck vd., 2012; Litvinchuk vd., 2013; D'Aoust-Messier ve Lesbarrères, 2015; Benkovský vd., 2021). Sütur zon olarak bilinen Karadeniz'in güney kıyıları Anadolu ve Kafkas sığınaklarının kesişim alanını oluşturmuştur ve bu alan Artvin-Rize il sınırlarını içerisinde barındırmaktadır. Bahsedilen alan yüksek dağ sıraları, nehirler ve akarsulara sahip bir topografik yapı göstermektedir ve popülasyon farklılaşmasına yol açan coğrafi bariyerleri ihtiva etmektedir. Garcia-Porta vd. (2012), oluşturduğu ekolojik niş modeline göre *B. bufo* türünün dağılımını etkileyen temel iklimsel faktörün mevsimsel sıcaklık değerleri, *B. verrucosissimus* türünün dağılımını etkileyen faktörün ise yağış miktarı olduğunu söylemiştir. Arntzen vd. (2020a) *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zon hattını etkileyen çevresel faktörleri araştırdıkları çalışmada sıcaklık değişimleri ve yağış miktarının hibrit zonun konumunu etkileyen başlıca etkenler olduğu bulgusuna ulaşmışlardır. Lin vd. (2023) Xizang Alpin Kara Kurbağası *Scutiger boulengeri* türü popülasyonları için rapor edilen sitonükleer uyumsuzlukları ve belirsiz coğrafik yapıyı ele aldığı çalışmada genetik olarak belirlenen soyların ilk olarak Çin'in güneybatısında bir hibrit zon oluşturduğunu ve sitonükleer uyumsuzlukların coğrafik izolasyondan ötürü meydana geldiğini, fakat daha sonraki süreçte genişleyen hibrit zonun yağış rejimlerine bağlı olarak değişim gösterdiğini ifade etmiştir. Gül vd. (2023)'ün ekolojik niş modellemesine göre *B. bufo* türü dağılımını etkileyen faktörün mevsimsel sıcaklık olduğu, *B. verrucosissimus* dağılımını ise yıllık yağış miktarının ve en kurak çeyrekteki yağış miktarının etkilediği sonucuna kanaat getirilmiştir. Aynı çalışmadaki modelleme haritalarına bakıldığında ise *B. verrucosissimus* türü için Kafkasya bölgesine ek olarak Rize ve Artvin il sınırlarının geniş bir kısmı uygun habitatlar

olarak belirlenmiş, *B. bufo* türü için ise Karadeniz'in batısından doğusuna doğru daralan bir şekilde Artvin ve Rize illerindeki kıyısal alanları kapsayan, Kafkasya içerisinde ise sadece Büyük Kafkas Dağları civarına tekabül eden sınırlı bir alanın uygun habitat olduğu görülmektedir. Bu bağlamda hibrit zon merkezi olarak bulunan YAY popülasyonun dağıldığı alan türlerin birlikte bulunması için en uygun bölgelerden biri olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca, yüksek saflık skoruna sahip MES, AKH ve BOR popülasyonlarının dağılışı gösterdiği ve *B. bufo* için uygun olmayan habitatlar olarak belirlenen alanlar yarı karasal iklimin gözlendiği ve yağış rejiminin değiştiği bölgeler olduğundan ötürü, çevresel şartların özellikle kıyısal zonda hibrit zon oluşumuna ve genetik karışımın seviyesine doğrudan etki gösterdiği düşünülmektedir.

STRUCTURE analizi ile elde edilen bar grafik şekilsel olarak bimodal bir dağılımın oluştuğunu göstermiştir. Bimodal hibrit zonlar içerisindeki popülasyonların baskın bir kısmı ebeveyn türlerin genetik yansımasını temsil eder ve ara karakter gösteren bireyler sınırlı bir alana yerleşir. Coğrafik olarak yığılma olması halinde heterozigot eksikliği meydana geleceğinden, bimodal zonlardaki hibrit örneklerin genellikle tek bir lokal popülasyon içerisine sıkışması beklenir (Jiggins ve Mallet, 2000). Ayrıca bimodal zonlar sekonder kontaklar sonrasında meydana gelmiş üreme izolasyonunu yansıtan gerilim bölgesi karakteristikleri göstermektedir. Dufresnes vd. (2021a) amfibilerdeki türleşme hikayelerinin genomik detaylarını ele aldığı çalışmada amfibi hibrit zonları içerisinde gözlenen bimodal örüntülerin genellikle hibrit bireylerin düşük uyum gücü veya türler arasında meydana gelen sınırlı seviyedeki çiftleşmeden kaynaklandığına dair fikir yürütmüştür. Babik ve Rafiński (2004) Polonya'nın güneyinde *Triturus vulgaris* ve *T. montandoni* türlerine ait hibrit zon karakteristiklerini incelemiş, çoğu popülasyonun ebeveyn veya ebeveynlere yakın bir genetik yapıya sahip olduğunu, ara karakter gösteren hibrit bireylerin ise popülasyonlar içerisinde az sayıda bulunduğunu belirlemişlerdir. Bimodal hibrit zonun ise yakın tarihteki kurulan sekonder kontakla bağlı olduğunu, ebeveyn genotiplerinin yaygın olmasının ise türler arasındaki kuvvetli üreme izolasyonundan ötürü meydana geldiğini açıklamışlardır. Smith vd. (2013), Avusturya ağaç kurbağaları *Litoria ewingii* ve *L. paraewingii* arasındaki hibrit zonu ve introgresyonun moleküler şemalarını değerlendirdikleri çalışmada türlerin bir şekilde ayrılan iki genetik havuz

ile temsil edildiğini, kontak zon içerisinde sınırlı seviyede hibridizasyon belirlendiğini ve bimodal bir bar dağılımı tespit edildiğini belirtmiştir. Buna bağlı olarak zonun gerilim bölgesi olarak tanımlanmış, sınırlı hibridizasyonu türler arasında az bir seviyede çiftleşme gerçekleştirmesine bağlamıştır. Asztalos vd. (2020), Fransa-İspanya sınırında *Natrix astreptophora* ve *Natrix helvetica* türleri arasında inceledikleri 94,10 km genişliğindeki hibrit zonun bimodal olarak tanımlanmışlardır. Alan içerisinde ise saf ebeveyn ve hibrit genotiplerin beraberce bulunduğunu belirterek, sınırlı hibridizasyon ile oluşan şemanın iki takson için ayrı türler olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında da bimodal dağılım gösteren bir hibrit zonun işaret etmiştir. Bu bağlamda sınırlı gerçekleşen hibridizasyonun türler arasındaki güçlü üreme bariyeri veya seçici bir çiftleşmeden ötürü oluştuğu ve yalnız YAY popülasyonu içerisinde gözlenen ara genotiplerin ise gerilim bölgesini temsil ettiği sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla her iki taksonun genetik açıdan net şekilde ayrılan türler olduğu ispatlanmıştır.

NewHybrids analizi STRUCTURE sonuçlarına benzer şekilde popülasyonların büyük bir kısmını saf tür olarak atamıştır. Analiz sonuçlarına göre geri çapraz bir birey tespit edilmemiştir. Geri çapraz bireylerin olmayışı türler arasında gerçekleşen geniş bir introgresyonun olmadığını ispatlamaktadır çünkü türler arasında gerçekleşen introgresyon genel olarak F₁ bireylerin ebeveynler ile çiftleşmesi ile meydana gelecek gen akışıyla sağlanmaktadır. Capula (2002) *Podarcis sicula* ve *Podarcis tiliguerta* türleri arasındaki hibrit zon üzerine yaptığı değerlendirmede karışım gösteren bireyler için geri çapraz tespit etmemiş ve türlerin kendi aralarında serbestçe çiftleşmelerinin muhtemel olmadığını üzerine durmuştur. Arntzen vd. (2014) Avrupa içerisinde *Triturus* cinsine ait 9 tür arasındaki hibrit zon modalitelerini değerlendirdiği çalışmada, 12 ayrı hat üzerinde çalışmış ve 3 adet bimodal hibrit zon rapor etmiştir. Bu hatlardan *T. dobrogicus* ve *T. ivanbureschi* türleri arasındaki hibrit zonda ise bireylerin hiçbirisi geri çapraz olarak atanmamıştır ve zonun sınırlı bir alandaki lokal hibridizasyonu yansıttığı belirtilmiştir. NewHybrids analizine göre hibrit olarak belirlenen bireylerin tamamı F₂ kategorisi içerisine atanmıştır. Hibrit zon olarak belirlenen YAY popülasyonu içerisindeki 10 bireyden 7'si doğrudan F₂ olarak, 3 birey ise *B. bufo* olarak atanmıştır. Bu durum türler arasında üretilen F₁ hibritlerin

ebeveyn türler yerine kendi aralarında çiftleştiğini göstermektedir. Geri çapraz olarak sınıflandırılan hibrit bireylerin olmayışı da bu durumu doğrulamaktadır. Pisanets (2001, 2002) yaptığı çalışmalarda Ukrayna'dan örneklenmiş *B. bufo* örnekleri ve Güney Rusya (Kafkasya) sınırlarından örneklenmiş *B. verrucosissimus* türlerini laboratuvar ortamında çiftleştirmiştir. Çalışmanın sonucunda verimli F₁ döllerin oluştuğu ve çiftleşen bu bireylerden oluşan F₂ nesil hibritlerde ise postzigotik bir mekanizma olan düşük hibrit yaşayabilirliği rapor edilmiştir. Sonuçlar türler arasındaki sınırlı hibritleşmeyi destekleyen üreme izolasyonu için belgeleyici bir kanıttır. Trujillo vd. (2017) *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri için Moyaux şehrinde belirlediği hibrit zondaki bireylerin %64'ünü geri çapraz, %27'sini F₂, %9'unu ise *B. bufo* olarak atamıştır. Popülasyon içerisinde yüksek oranda geri çapraz ve belli ölçüde F₂ bireylerinin bulunması fakat F₁ bireylerin var olmayışı rastgele çiftleşmenin meydana geldiği ve gen akışını engelleyen bir durum olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Arntzen vd. (2016) aynı hat üzerinde yaptığı çalışmada hibrit zonun merkezini oluşturan Beaulieu popülasyonu ve çevresindeki örnekleme alanlarından elde edilmiş bireylerin genellikle F₂ ve geri çapraz olarak atandığını söylemiştir. Bahsedilen hibrit zonun görece daha eski tarihli olduğunu ve sekonder kontak sonrasında geçen zamandan dolayı üreyen nesil sayısına paralel olarak geri çaprazlarında F₂ içerisinde kümelenmiş olabileceğini ifade etmiştir. Bu bağlamda, *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında geri çapraz hibrit bireylerin bulunmayışı türler arasındaki seçici çiftleşme ile sınırlanmış hibridizasyonu destekler yöndedir, ayrıca *B. spinosus* türüne kıyasla daha yeni tarihli türleşme öyküsüne sahip *B. verrucosissimus* – *B. bufo* türleri arasında oluşan yakın tarihli kantağa bağı olarak genişleyen introgresyon ile meydana gelecek panmiktik popülasyonların oluşmasını sınırlandırmıştır.

Genetik verilerin mekânsal örüntülerini ele alan TESS analizi *B. bufo* gen havuzundan *B. verrucosissimus* gen havuzuna doğru kademeli bir gen geçişinin olduğunu işaret etmiştir ve oluşturulan enterpolasyon haritasına göre hibrit zonun merkezi YAY popülasyonu olarak belirlenmiştir. Oluşturulan bar grafik STRUCTURE analizi ile uyumlu şekilde BOR ve MES popülasyonlarının Çoruh Nehri etkisi ile izole bir yapı sergilediğini doğrulamıştır. Öte yandan, coğrafik alan, mitokondriyal haplotipler ve STRUCTURE analizinde *B. verrucosissimus* içerisine

dahil olan CFT popülasyonu, NewHybrids analizine benzer şekilde mekânsal analizlerde *B. bufo* genetik kümesi içerisine yerleşmiştir. Ayrıca MUR popülasyonunda da *B. bufo* genetik kümesine benzeşme oranı diğer popülasyonlara kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Öte yandan, TESS analizi ile ortaya çıkan genetik şemalar diğer bir mekânsal analiz olan sPCA metodu ile de desteklenmiştir. Oluşturulan enterpolasyon skor haritasında nötral alan YAY popülasyonu civarındadır ve izohips eğri değerinin 0 olduğu hat YAY popülasyonu üzerinden geçmektedir fakat *B. bufo* genetik kümesi için oluşan coğrafik alan ORT, MUR ve CFT popülasyonlarını kapsayacak şekilde *B. verrucosissimus* genetik kümesi için oluşan coğrafik alanın içerisine doğru sızmıştır. Bu durumda iki ayrı senaryo ortaya çıkmaktadır.

Birinci senaryoda *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerinin Türkiye'nin kuzeydoğusunda mozaik bir hibrit zonla temsil edildiği düşünülebilir. Bu tip zonlar hibritleşen taksonların yamalı ve parçalanmış habitatlar içerisinde dağılmasından kaynaklı ve klinal olmayan geçişlerle ortaya çıkan, çevresel faktörlerin aktif rol oynadığı alanlardır. Batı Paleartik amfibileri için özellikle *Bombina* ve *Triturus* cinsi içerisinde benzer hibrit zon örüntüleri rapor edilmiştir. Arntzen ve Wallis (1991), Batı Fransa hattı üzerinde *Triturus cristatus* ve *T. marmoratus* türleri arasındaki hibrit zon hareketini değerlendirdikleri araştırmada, parapatrik dağılıma bağlı olarak kesikli bir hibrit zon oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, hibrit bireylerin F₁ olarak atandığı ve türler arasında introgresyon gözlenmediğini belirterek, alanı hem klinal hem de mozaik hibrit zon özellikleri gösterdiği için retikülat hibrit zon olarak tanımlamışlardır. Babik vd. (2003) Karpat Dağları civarında *Triturus vulgaris* ve *T. montandoni* türlerinin hibritleşme potansiyeli üzerine yaptıkları araştırmada, türler için belirlenen hibrit zonların coğrafi hatlardan bağımsız şekilde mozaik genetik örüntü sergilediğini belirlemiştir. Araştırmacıları, ebeveyn türlerin farklı çevre şartları ve değişen habitatlar içerisinde yüksek uyum gücüne dayalı olarak hayatta kalabilme yetisinden dolayı mozaik hibrit zonlu şekillendirdiklerini ve rekolonize olarak zonun devamlılığının sağlandığını belirtmişlerdir. Dufresnes vd. (2021b) *Bombina bombina* ve *Bombina variegata* türleri arasında rapor edilmiş olan hibrit zon alanlarını bütüncül olarak ele aldığı çalışmada, türler için oluşan dik klinlerin iki ayrı taksonu işaret ettiğini, fakat genetik sızmaya neden olan zayıf bariyerlerin genellikle lokal çevre şartları ile ilişkili olduğunu belirtmiş, özellikle belirli alanlarda sıkışmış izole

popülasyonların aralıklı introgresyondan kaynaklı olarak genetik bütünlüğünü kaybettiğini öne sürmüştür. Tez çalışması için oluşan örüntüde ise yapısal analizlerde bahsedildiği gibi çevre şartlarının türlerin mozaik hibrit zon oluşturmalarını desteklemediği görülmektedir. Ayrıca türler arasındaki genetik geçişin klinal olduğu ve genişleyen bir introgresyon gözlenmediği dikkate alınınca mozaik zon oluşumu zayıf bir ihtimal olarak değerlendirilmiştir.

İkinci senaryo ise CFT popülasyonunun yakın ilişkili olduğu *B. verrucosissimus* türü tarafından kuşatılmış ve genetik olarak izole kalmış olan anklav bir *B. bufo* popülasyonu olduğudur. Anklavlar yabancı türün dağılım alanını genişleterek yerleşik türün dağılım alanına girmesiyle veya geçmişte daha geniş bir dağılışa sahip olan türün relik bir popülasyonu olarak sınırlı bir alanda hapsolmesiyle oluşabilmektedir ve amfibiler için sıkça rapor edilmiştir (Arntzen, 1978; Vörös vd., 2016; Wielstra, 2019; Arntzen vd., 2021; López-Delgado vd., 2021). Themudo ve Arntzen (2007) *Triturus pygmaeus* türünün demografik genişlemesini ele aldıkları çalışmada *T. marmoratus* türü ile dağılım alanının kesiştiği bölge üzerinde 31 ayrı popülasyonu incelemiş ve sınırlı bir hibridizasyonun varlığını belirlemişlerdir. Çalışma alanının orta hattında ise genetik olarak *T. marmoratus* türüne benzeyen ve *T. pygmaeus* türü tarafından kuşatılmış bir popülasyonun var olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar popülasyonda gözlenen *T. marmoratus* genetik ayak izinin geçmiş dönemde gerçekleşmiş hibrit zon hareketi ve çevresel şartlarda meydana gelen değişimlerden kaynaklı oluşabileceğini ifade etmiştir. Sequeria vd. (2022) *Chioglossa lusitanica* alttürleri arasında parçalanmış habitatlara bağlı olarak meydana gelmiş hibrit zon hareketini ele aldığı çalışmada, yer değişen mtDNA klin merkezlerine dayalı olarak hibrit zon hareketini tespit etmiş fakat çevresel etkenlere bağlı seçilimden ötürü lokal ölçekli uygun habitatlar içerisinde anklav popülasyonların var olduğunu tespit etmiştir. Wielstra vd. (2017) pürtüklü semender türlerinin geçmiş dağılım örüntülerini ve hibrit zon hareketini anlamak için biyocoğrafik dinamiklerin izini sürdüğü çalışmasında, tarihsel olarak parapatrik pozisyonlu dağılım değişimlerinden türevlenmiş anklav popülasyonların varlığını tespit etmiştir. Arntzen (2019) ise Britanya sınırları dahilinde *B. spinosus* türüne ait tek bir anklav popülasyonunun varlığını belirlemiş, bu durumun ise hibrit zon hareketine bağlı olarak türün tarihsel olarak eski dağılım alanı içerisinde sürüldüğünü öne sürmüştür. Literatür göz önüne

alınınca, nükleer ve mitokondriyal klinler arasındaki genetik geçişi, *Bufo* cinsinin dispersal kapasitesi ve popülasyonun hibrit zon merkezine olan uzaklığına dayanarak CFT popülasyonunda gözlenen yüksek derecedeki derin genetik ayak izi popülasyonun aşınmış bir anklav olabileceğini göstermektedir. Dikkat edilmesi gereken diğer bir husus ise tez çalışmamız kapsamında Gürcistan içerisindeki popülasyonlardan örnekleme yapılmamış olmasıdır. Mitokondriyal DNA verilerine göre *B. verrucosissimus* olarak belirlenen fakat *B. bufo* nükleer DNA ceplerini oluşturan PAZ, ARD, KAP ve CFT popülasyonları kısmen aşınmış anklavları temsil etmektedir. Bahsedilen durum Gürcistan içerisinde de mevcut olan popülasyonlarda da gözlenebilir. Oluşan örüntü ise mozaik zondan ziyade aşınmış anklavların belirli genetik cepler içine sıkıştığı “Alel Adaları (*Islands of Alleles*)” konseptini temsil edebilir (Macholán vd., 2011). Türlerin sınırlı dispersal mesafesi ve kolonizasyon kapasitesi göz önüne alındığında, mitokondriyal genişlemeyi destekler şekilde *B. verrucosissimus* türü *B. bufo* alanına girip tarihsel olarak batı yönlü bir hibrit zon hareketi oluşturmuş olabilir. Aynı zamanda, mtDNA introgresyonu hibrit zon önünden ilerlemiş olabilir fakat bu durumun tespiti için Gürcistan genelini kapsayan daha detaylı bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

Nükleer lokuslara dayalı olarak yapılan coğrafik klin analizleri daha önceki bulgularla uyumlu şekilde YAY popülasyonunun hibrit zon merkezi olduğunu işaret eden, dar ve dik şekle sahip eğrilerle karakterize edilen bir genetik geçişi açığa çıkarmıştır. Dar hibrit zonlar boyunca oluşan dik klinler hibritlere karşı işleyen güçlü seçilimin varlığını ve postzigotik bir mekanizma olan düşük hibrit uyum gücünü kanıtlayıcı niteliktedir. Arntzen vd. (2016) Kuzeybatı Fransa üzerinde *Bufo bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zonlu ilk kez raporladıkları çalışmada, STRUCTURE skorları ile oluşturulmuş klin için fixN modeli ve 30,3 km genişlik, mitokondriyal frekanslara dayalı klin için ise typN modeli ve 43,5 km genişlik belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar dar klinlerin türler arası serbest gen akışına karşı oluşan bariyerlerin mevcut olabileceği şeklinde değerlendirmiştir. Arntzen vd. (2018) *B. bufo* ve *B. spinosus* türlerinin Fransa boyunca dağılımlarını ve hibrit zonlarını haritaladıkları çalışmada İtalya’nın Akdeniz kıyı hattına kadar uzanan 900 kilometrelik bir hibrit zon hattı çizilmiş, Fransa ortasındaki hibrit hattın mtDNA verilerine göre 10 km, nükleer verilere göre ise 61 km genişliğinde olduğu

söylenmiştir. Hibrit zonun pozisyonunun ekolojik heterojenite ilişkili olduğu, dağ ve nehir hatlarının zonu yapılandırıldığını belirtmiştir.

Gül vd. (2023), Rize-Artvin hattında *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* türlerinin dağılışını iklimsel faktörlere ek olarak dağ serilerinin oluşturduğu topografik karakterlerinde etkilediğini belirtmiştir. Tez çalışması kapsamında oluşturulan modellerde her bir belirteç için Arntzen vd. (2016)'ın çalışmasıyla eş sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla dar klinler türler için mevcut olan güçlü seçim ve postzigotik izolasyonu doğrulamaktadır. Öte yandan, yapısal genetik analizler ve mekânsal analizlerin sonuçlarıyla örtüşür şekilde topografik yapının hibrit zonu sahil kuşağı üzerinde şekillendirdiği kanaatine ulaşılmıştır. Dufresnes vd. (2020b) *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri arasındaki hibrit zon örüntülerini RADseq verileriyle test etmiş, STRUCTURE Q skoruna göre 8,6 km genişliğinde, SNP verilerine göre 11 km ve ayna kuyruklu modeller elde etmiştir. Modellerin türler arasındaki dinamik gerilim bölgesini desteklediğini ve zon üzerinde işleyen postzigotik seçilimin ebeveyn türlerin genomlarının karışmasını engellediğini söylemiştir. Zonun meydana geldiği coğrafik alanı ise sığınaklara bağlı olarak Geç Kuvaterner içerisinde meydana gelen demografik süreçlerle ilişkilendirmiştir. Arntzen vd. (2020b) de İtalya içerisinde *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri için belirlediği 24 km genişliğindeki hibrit zon için Alp Dağları hattındaki sığınaklardan buzul dönemini takiben gerçekleşen genişleme hareketine bağlı olarak meydana gelen sekonder kontak üzerinden oluştuğunu söylemiştir. Çalışmamızda oluşturulan klin modelleri de rapor edilen çalışmalara benzer şekilde dar ve dik geçişler sergilemiş olduğundan ötürü, türleşme tarihini de göz önüne alarak hibrit zonun buzul dönemini takiben gerçekleşen demografik süreçler ile ilişkili olduğu da düşünülmektedir.

Coğrafik klin analizi ile ortaya çıkan önemli bir bulgu ise nükleer ve mitokondriyal klinlerin nispeten uyumlu fakat yer değişen örüntüleridir. Mitokondriyal kontak zon merkezi nükleer hibrit zon merkezine kıyasla 33 km batı yönünde Pazar ilçesinde konumlanmıştır. Fındıklı ve Pazar-Suçatı arasında kalan ARD, PAZ ve KAP popülasyonları mikrosatellit verilerine göre *B. bufo* olarak kümelenmiştir, fakat mitokondriyal haplotipleri *B. verrucosissimus* kümesi içinde yer almıştır. Mitokondriyal ve nükleer DNA klinleri arasındaki uyumsuzluk genellikle bir türün diğer türün alanına girişiyle meydana gelen genetik karışım veya eşey yanlı

dispersale bağılı olarak meydana gelen hızlı mitokondriyal genom geçişi gibi asimetrik introgresyon senaryoları ile açıklanmaktadır (Currat vd., 2008; Wielstra ve Arntzen, 2012). Arntzen vd. (2016) oluşturulan klinler arasındaki kısmi uyumsuzlukları F₁ hibritlere karşı işleyen güçlü seçim, eşey yanlı dispersal ve asimetrik genetik uyumsuzluklar nedeniyle gözlenebileceğini söylemiştir. Arntzen vd. (2018) benzer şekilde mitokondriyal ve nükleer klinler arasında oluşan asimetrik farklılıkların *B. bufo* türünün *B. spinosus* türüne ait dağılış alanına girerek introgresyon yoluyla genetik izini bırakmasından kaynaklı oluşabileceği fikrini öne sürmüştür. Dolayısıyla, uyumsuz klinler *B. bufo* türünün erkek eşey yanlı dispersaline bağılı olarak devam eden genişlemesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Asimetrik DNA introgresyonu hibrit zonlar içerisinde en sık görülen uyumsuzluklardan olup, genellikle nükleer klinlere kıyasla daha dar mtDNA klinleri gözlenmektedir (Toews ve Brelsford, 2012). Örneğin, Qi vd. (2014), *Rana chensinensis* ve *R. kukunoris* türleri arasındaki hibridizasyon örüntülerini incelediği çalışmada, mtDNA ve nDNA bakımından 95 km mesafeli uyumsuz klin merkezlerinin var olduğunu tespit etmiş, bu farklılıkları asimetrik gen akışı ve eşey yanlı dispersale bağlamıştır. Johnson vd. (2015) *Ambystoma maculatum* türüne ait genetik soylar arasında nükleer ve mitokondriyal introgresyonu ele aldığı çalışmada, kontak zonlar arasındaki mesafelerin 60 ve 72 km arasında değiştiğini, gözlenen durumun ise popülasyon genişlemesi ve eş seçimine bağılı çiftleşme karakteristikleri nedeniyle oluştuğunu söylemiştir. Van Riemsdijk vd. (2019) *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri için oluşturulan mitokondriyal ve nükleer klinlerin arasında gözlenen asimetrik şemaların geçmiş dönem içerisinde meydana gelmiş hibrit zon hareketinden dolayı oluşabileceği üzerine durmuştur. Arntzen vd. (2017)'de Güneydoğu Fransa içerisindeki zonda gözlenen sitonükleer uyumsuzlukların son buzul dönemi içerisinde dağılım sınırlarında meydana gelmiş olan ardışık değişimler tarafından tetiklenmiş olabileceğini söylemiştir. Dolayısıyla, eşey yanlı dispersale alternatif olarak düşünülmesi gereken senaryoda Pazar-Fındıklı hattında yer alan ara popülasyonların bulunduğu coğrafik alan geçmiş dönem içerisinde nükleer hibrit zona ev sahipliği yapmış olabilir ve türlere ait dağılım sınırlarının değişmesi zon merkezini doğuya kaydırmış olabilir.

Genomik klin analizi sonuçları, coğrafik klinler ile örtüşecek şekilde introgresyon kuyruğu üzerinde yer alan ARD ve FIN popülasyonları ile hibrit zonun

merkezini oluşturan YAY popülasyonuna ait bireyler genomik olarak ara karışımı yansıtan oran olan 0,5 civarına denk düşmüştür ve değerlendirilen 14 lokusun %85,71’inde hibritler üzerine işleyen güçlü seçim belirlenmiştir. Saarman ve Pogson (2015) Orta Kaliforniya bölgesi içerisinde *Mytilus* türleri arasındaki introgresyon örüntülerini inceledikleri çalışmada nötral beklentilerden yüksek seviyede sapma olduğunu ve oluşan dik genomik klin şeklinin türler arasında sınırlı bir gen alışverişini işaret ettiğini söylemişlerdir. Larson vd. (2013) *Gryllus pennsylvanicus* ve *Gryllus firmus* cırcırböceği türleri arasındaki mozaik hibrit zonu yorumladığı çalışmada 125 farklı gen kullanarak genomik klinler oluşturmuş ve 83 tanesinin (%66,40) nötral beklentilerden saptığını bulmuştur. Ayrıca sınırlı F₁ oluşumunun gen akışına karşı işleyen güçlü üreme bariyerlerinin varlığını doğruladığı söylemiştir. Benzer şekilde, tez çalışması verilerinde F₁ hibrit bulunmayışı, türler arası oluşan dik genomik klin, lokuslar için oluşan sapma eğrileri türler için introgresyonu kısıtlayan genomik bariyerlerin varlığını desteklemektedir. Oluşturulan coğrafik klin modelleri de introgresyon kuyruklarına sahip olmadığından ötürü, hibrit zonun YAY popülasyonu içerisinde kısıtlı kalması, genomik klinler ile elde edilen örüntüleri desteklemektedir.

Yapılan tek ve çok değişkenli morfolojik analizler saf türlerin ve nükleer hibritlerin göz, arka bacak, iç metatarsal tüberkül ve parotidler bakımından ayrıştığını ortaya koymuştur. Saf türler için gözlenen farklılıklar mitokondriyal gruplar için elde edilen sonuçlar ile birebir örtüşmektedir. Hibrit bireyler ise beklenenin aksine ara değerlerden ziyade ebeveynlerden daha büyük değerler almıştır. Arntzen vd. (2018) 900 kilometre uzunluğundaki hibrit zon hattında *B. bufo* ve *B. spinosus* türleri için rapor edilen diyagnostik karakterlerin ayırma gücünü değerlendirmiş ve sadece morfolojik karakterlere dayalı olarak yapılan hibrit birey teşhislerinin yanı sıra itebileceğini belirtmiştir. Parotoid ve içmetatarsal tüberkülün Britanya, Kuzeybatı ve Güneydoğu Fransa’da diyagnostik karakter işlevi gördüğünü, fakat İtalya’da ise etkin olmadığını söylenmiştir. Arntzen vd. (2016) *B. bufo* ve *B. spinosus* türlerini morfolojik olarak ayırtıran diyagnostik karakterlerin, farklı genlerin beraberce etkileşiminin bir sonucu olabileceğini ve kompleks çevre şartlarıyla beraber şekillenebileceğini söylemiştir. Örneklem çeşitliliği ve mikro seviyedeki çevresel seçilimin de morfolojik geçişi gözlemlemekte sapmalar yaratabileceği not edilmiştir. Trujillo vd. (2017)’da parotid ve iç metatarsal tüberkülün saf türleri net şekilde ayırdığını, fakat

hibrit zonlarda oluşan genetik örüntülerin hibrit bireyler için beklenenden farklı morfolojik durumlara yol açabileceğini belirtmiştir. Arntzen vd. (2017) Kuzeybatı İtalya içerisinde Alp Dağları'nın doğu ve batı yakalarına tekabül eden iki hibrit zon için batı hattında türlerin parotid ve i metatarsal tüberküller ile ayrıştığını, fakat doğu hattında karakterlerin her iki tür içinde benzeştiğini söylemiştir. Araştırmacı siğilli kurbağalarda çiftleşmenin boya bağımlı ve seçici olarak gerçekleştiğini ve bu durumun hibrit zonlar içerisindeki farklı kesitlerde üreme izolasyonuna değişken ölçüde katkı sunduğunu belirtmiştir. Tez içerisinde değerlendirilen *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* saf popülasyonları beklendiği üzere parotidler, i metatarsal tüberkül ve gözler bakımından ayrışsa da hibrit bireylerde gözlenen sapmalar, asimetrik hibrit zon örüntüleri, eşey bazlı dispersal ve hibrit zonun oluşmasını etkileyen çevresel şartlar ekseninde gen akışında meydana gelen varyasyonlar ile şekillenmiş olabilir.

Hibrit zonlarda ara karakterler harici meydana gelebilecek olan diğer senaryo hibrit bireylerin ebeveyn morfolojilerine kıyasla daha büyük değerler aldığı transgresif karakter durumudur. Transgresif karakterler epistasi ve komplementer alellerin ayrışmasından dolayı meydana gelmektedir (Majtyka vd., 2022). Amfibilerde yapılan hibrit zon çalışmalarında bahsedilen morfolojik durum doğrudan bir araştırma konusu olmasa da diğer omurgalı grupları için benzer durumlar literatür içerisinde mevcuttur. Örneğin, Robbins vd. (2014) *Sceloporus undulatus* ve *Sceloporus woodi* türü kertenkelelerinde hibrit zonun ekolojik dinamiklerini araştırmış, özellikle eş seçiminin transgresif karakter oluşumunda etkin olduğunu, buna bağlı olarak hibrit bireylerin daha büyük bir baş yapısı ve agregasyon seviyesine sahip olduklarını belirtmiştir. Araştırmacılar ayrıca hibrit bireyler için ara karakterlerin bulunmasının bir zorunluluk olmadığının da altını çizmiştir. Campagna vd. (2018) *Sporophila* cinsi kuş türleri arasında oluşan hibrit bireylerde renklenme ve desenlenme bakımından ebeveyn türlerden farklı tonaj ve büyüklerde fenotipik karakterler sergilediğini söyleyerek bu durumu transgresif karakter olarak nitelendirmiştir. Stelkens vd. (2009) iklet balıklarıyla yaptığı çalışmada türler arasında meydana gelen F₂ hibritlerinin %78'inde ebeveyn karakterlerinden daha büyük değerler alan transgresif fenotipler belirlemiş ve türler arasındaki genetik mesafe ile doğrusal bir şekilde karakterlerde meydana gelen farklılıkların artmakta olduğunu tespit etmiştir. Bu tez çalışmasında, YAY popülasyonu içerisinde belirlenen hibritlerin büyük bir kısmı F₂ olarak atanmıştır ve

benzer şekilde ebeveyn saf tür popülasyonlarına kıyasla daha büyük morfolojik ölçüm değerlerine sahiplerdir. Dolayısıyla, mikrosatellit lokuslarına dayalı olarak belirlenen hibrit bireylerdeki ekstrem morfolojik fenotipler literatür ile desteklenmiştir.

4.3. Sonuçlar

1. Kuvaterner Dönem içerisinde meydana gelen buzul dönemleri ve buzullar arası periyotlar taksonların türleşme tarihini ve dağılımını sığınaklar üzerinden şekillendirmiştir, sekonder kontak ise buzul dönemlerinin bitişini takiben oluşmuştur.
2. Sitokrom b gen bölgesi için oluşan mitokondriyal haplotiplere göre *B. verrucosissimus* taksonu Şavşat-Ardeşen, *B. bufo* taksonu ise İyidere-Çayeli boyunca kesintisiz bir dağılım sergilemiştir. Pazar, Hemşin ve Çamlıhemşin ilçeleri ise her iki taksona ait mitokondriyal haplotiplerin bulunduğu ilçeler olarak belirlenmiştir.
3. Mitokondriyal verilere dayalı demografik analiz sonuçlarına göre her iki takson belli ölçüde genişleme örüntüleri göstermiştir. Yüksek haplotip ve düşük nükleotid çeşitliliği, filogenetik örüntüler ve taksonlara ait haplotipler için elde edilen genetik mesafe taksonların yakın türleşme tarihini ve genişlemeyi desteklemiştir.
4. Temel popülasyon genetiği ve çok değişkenli genetik analizlere göre Fındıklı Yaylacılar (YAY) popülasyonunun genetik uzayda ara konuma yerleştiği, temel genetik çeşitlilik indeksleri bakımından da genetik karışımı yansıttığı tespit edilmiştir.
5. STRUCTURE programı ile oluşan yapısal genetik örüntülere göre *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* taksonlarını temsil eden iki ayrı gen havuzunun var olduğu teyit edilmiş, hibrit zonu yansıtacak genetik karışım ise YAY popülasyonunda gözlenmiştir. NewHybrids analizi de YAY popülasyonundaki bireylerin sonraki nesil hibrit bireyler (F₂) olduğunu desteklemiştir. Bar dağılımları ise sınırlı bir alana sıkışmış ve güçlü seçilim ile sınırlanmış olan gerilim bölgelerini yansıtan bimodal zonu temsil etmiştir.
6. Mekânsal genetik analizler, yapısal genetik analizlerle uygun şekilde bütün popülasyonları iki genetik küme içerisinde değerlendirmiş ve YAY popülasyonunun hibrit zon merkezi olduğunu doğrulamıştır. NewHybrids analizinde gözlenen CFT popülasyonunun *B. bufo* kümesi için gösterdiği yüksek benzeşme oranı bu analizler içerisinde de ortaya çıkmış, dolayısıyla popülasyonun eski bir anklav olduğuna işaret etmiştir.
7. STRUCTURE Q skorlarından yararlanılarak oluşturulan coğrafik klin modellerine

göre *B. bufo* ve *B. verrucosissimus* arasındaki hibrit zon coğrafi olarak YAY popülasyonunu temsil etmektedir. Zonun genişliği 17,43 km olup gerilim bölgesi olarak sınıflandırılmıştır. Dar ve dik şekle sahip eğriler ise hibritlere karşı işleyen güçlü seçilimin varlığını ve düşük hibrit uyum gücünü yansıtmıştır. STRUCTURE sonuçlarını destekleyecek şekilde türler arası gerçekleşen geniş ölçekli introgresyonu yansıtan uzun klin kuyrukları oluşmamıştır.

8. Nükleer ve mitokondriyal klinler nispeten uyumlu fakat yer değişen örüntüler sergilemiştir. Ortaya çıkan asimetric şemaların *B. bufo* türünün erkek eşey yanlı dispersaline bağlı olarak devam eden genişlemesinin veya tarihsel olarak doğu yönlü bir hibrit zon hareketinin sonucunda meydana gelmiş olabileceği fikrine varılmıştır.

9. Genomik klin analizleri, diğer bütün analizlerle uyumlu şekilde YAY popülasyonunu hibrit zon olarak işaret etmiştir. Lokuslarda gözlenen genetik sapmalar türler arası işleyen güçlü genetik seçilimi ve zayıf introgresyonu ortaya çıkarmıştır.

10. Mitokondriyal ve mikrosatellit DNA verileri ile oluşturulan morfolojik gruplar, saf türlerin literatürde rapor edildiği gibi gözler, iç metatarsal tüberkül ve parotidler bakımından ayrıştığı, fakat hibritler için karakterlerin aynı ölçüde diyagnostik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

4.4. Öneriler

Bu tez çalışmasında ilk kez *Bufo bufo* ve *B. verrucosissimus* türleri arasında bir hibrit zonun varlığı açığa çıkarılmıştır. Gelecekte yapılacak çalışmalar RADseq ve yeni nesil dizileme metotlarına dayalı daha yüksek kapsamlı genomik veri setleri oluşturarak, hibrit zonun boyutsal ve tarihsel dinamiklerini inceleyebilir. Ayrıca, sitonükleer uyumsuzluklara neden olan ve genetik karışımı etkileyen çevresel faktörler ve mekânsal dinamiklerin rolü belirlenebilir. Son olarak Türkiye'nin güneybatısında Alanya-Isparta hattı içerisindeki potansiyel kontak alanlar, hibrit zon ve tür dağılımlarının lokal sınırları hala belirsizliğini korumaktadır. Bahsedilen alan, tez çalışmasında oluşturulan metodoloji takip edilerek ele alınabilir.

KAYNAKÇA

- Abbott, R. J., Barton, N. H. ve Good, J. M. (2016). Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. *Molecular Ecology*, 25(11), 2325-2332.
- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., J. Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Most, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A. W., Parisod, C., Pfennig, K., Rice, A. M., Ritchie, M. G., Seifert, B., Smadja, M. C., Stelkens, R., Szymura, J. M., Vainola, R., Wolf, J. B. W. ve Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229-246
- Abaza, S. (2020). What is and why do we have to know the phylogenetic tree?. *Parasitologists United Journal*, 13(2), 68-71.
- Abdelaziz, M., Munoz-Pajares, A. J., Berbel, M., García-Muñoz, A., Gómez, J. M. ve Perfectti, F. (2021). Asymmetric reproductive barriers and gene flow promote the rise of a stable hybrid zone in the Mediterranean high mountain. *Frontiers in Plant Science*, 12, 687094.
- Afsar, M. ve Tok, C. V. (2011). The herpetofauna of the Sultan Mountains (Afyon-konya-ısparta), Turkey. *Turkish journal of Zoology*, 35(4), 491-501.
- Afsar, M., Dinçer, A. Y. A. Z., Afsar, B., Çiçek, K. ve Tok, C. (2012). Camili Biyosfer Rezerv Alanı'nın (Borçka, Artvin, Türkiye) Herpetofaunası. *Anadolu University Journal of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology*, 2(1), 41-49.
- Afsar, M., Afsar, B., Dinçer, A., Çiçek, K. ve Tok, C. V. (2018). Borçka-Karagöl Tabiat Parkı (Artvin/Türkiye) ve Çevresinin Kurbağaları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(2), 49-55.
- Aguillon, S. M. ve Rohwer, V. G. (2022). Revisiting a classic hybrid zone: movement of the northern flicker hybrid zone in contemporary times. *Evolution*, 76(5), 1082-1090.
- Ahmadzadeh, F., Flecks, M., Rödder, D., Böhme, W., Ilgaz, Ç., Harris, D. J., Engler, J. O., Üzümlü, N. ve Carretero, M. A. (2013). Multiple dispersal out of Anatolia: biogeography and evolution of oriental green lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110(2), 398-408.
- Ahrens, D., Monaghan, M. T. ve Vogler, A. P. (2007). DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 436-449.

- Akın, Ç., Bilgin, C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S. N., Uzzell, T., Bilgin, M., Hotz, H., Guex, G. D. ve Plötner, J. (2010). Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*, 37, 2111-2124.
- Aldrich, B. T. ve Kambhampati, S. (2009). Preliminary analysis of a hybrid zone between two subspecies of *Zootermopsis nevadensis*. *Insectes sociaux*, 56, 439-450.
- Allendorf, R. F., Leary, P., Spruell, J. K. ve Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 613-622.
- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. (2023). Berkeley, California: AmphibiaWeb.
- Andersen, J. C., Havill, N. P., Boettner, G. H., Chandler, J. L., Caccone, A. ve Elkinton, J. S. (2022). Real-time geographic settling of a hybrid zone between the invasive winter moth (*Operophtera brumata* L.) and the native Bruce spanworm (*O. bruceata* Hulst). *Molecular Ecology*, 31(24), 6617-6633.
- Anderson, E. C. ve Thompson, E. (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160(3), 1217-1229.
- Arnold, M. L. ve Martin, N. H. (2009). Adaptation by introgression. *Journal of Biology*, 8, 82.
- Arnold, M. L. ve Kunte, K. (2017). Adaptive genetic exchange: A tangled history of admixture and evolutionary innovation. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(8), 601-611.
- Arntzen, J. W., López-Delgado, J., van Riemsdijk, I. ve Wielstra, B. (2021). A genomic footprint of a moving hybrid zone in marbled newts. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59, 459-465.
- Arntzen, J. W., Wielstra, B. ve Wallis, G. P. (2014). The modality of nine *Triturus* newt hybrid zones assessed with nuclear, mitochondrial and morphological data. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(2), 604-622.
- Arntzen, J. W. (1978). Some hypotheses on postglacial migrations of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Linnaeus) and the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus). *Journal of Biogeography*, 5, 339-345.
- Arntzen, J. W. (2019). An amphibian species pushed out of Britain by a moving hybrid zone. *Molecular Ecology*, 28(23), 5145-5154.
- Arntzen, J. W. (2023). A two-species distribution model for parapatric newts, with inferences on their history of spatial replacement. *Biological Journal of the Linnean Society*, 138(1), 75-88.

- Arntzen, J. W., Canestrelli, D. ve Martínez-Solano, I. (2020a). Environmental correlates of the European common toad hybrid zone. *Contributions to Zoology*, 89(3), 270-281.
- Arntzen, J. W., de Vries, W., Canestrelli, D. ve Martínez-Solano, I. (2017). Hybrid zone formation and contrasting outcomes of secondary contact over transects in common toads. *Molecular Ecology*, 26(20), 5663-5675.
- Arntzen, J. W., de Vries, W., Canestrelli, D. ve Martínez-Solano, I. (2020b). Genetic and morphological differentiation of common toads in the Alps and the Apennines. P. Pontarotti (Ed), *Evolutionary Biology-A Transdisciplinary* (pp. 1-13). Springer.
- Arntzen, J. W., McAtear, J., Butot, R. ve Martínez-Solano, I. (2018). A common toad hybrid zone that runs from the Atlantic to the Mediterranean. *Amphibia-Reptilia*, 39(1), 41-50.
- Arntzen, J. W., Recuero, E., Canestrelli, D. ve Solano, I. M. (2013a). How complex is the *Bufo bufo* species group ?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 1203-1208.
- Arntzen, J. W., Trujillo, T., Butot, R., Vrieling, K., Schaap, O., Rodríguez, J. G. ve Solano, I. M. (2016). Concordant morphological and molecular clines in a contact zone of the Common and Spined toad (*Bufo bufo* and *B. spinosus*) in the northwest of France. *Frontiers in Zoology*, 13(52), 1-12.
- Arntzen, J. W. ve Wallis, G. P. (1991). Restricted gene flow in a moving hybrid zone of the newts *Triturus cristatus* and *T. marmoratus* in western France. *Evolution*, 45, 805-826.
- Arntzen, J. W. ve Espregueira Themudo, G. (2008). Environmental parameters that determine species geographical range limits as a matter of time and space. *Journal of Biogeography*, 35(7), 1177-1186.
- Arntzen, W. J., McAtear, J., Recuero, E., Ziermann J. M., Ohler, A., Van Alphen, J. ve Solano, I. M. (2013b). Morphological and genetic differentiation of *Bufo* toads: two cryptic species in Western Europe (Anura, Bufonidae). *Contributions to Zoology*, 82(4), 147-169.
- Arribas, O., Candan, K., Kornilios, P., Ayaz, D., Kumlutaş, Y., Gül, S., Yılmaz, C., Caynak, E. Y. ve Ilgaz, Ç. (2022a). Revising the taxonomy of *Darevskia valentini* (Boettger, 1892) and *Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886)(Squamata, Lacertidae): a morpho-phylogenetic integrated study in a complex Anatolian scenario. *Zootaxa*, 5224(1), 1-68.
- Arribas, O., Candan, K., Kurnaz, M., Kumlutaş, Y., Caynak, E. Y. ve Ilgaz, Ç. (2022b). A new cryptic species of the *Darevskia parvula* group from NE Anatolia (Squamata, Lacertidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 22(2), 475-490.

- Arslan, D., Oliver, A., Yaşar, Ç., İsmail, İ. B., Döndüren, Ö., Emoul, L., Beck, N. ve Çiçek, K. (2018). Distribution and current status of herpetofauna in the Gediz Delta (Western Anatolia, Turkey). *Herpetology Notes*, 11, 1-15.
- Asztalos, M., Schultze, N., Ihlow, F., Geniez, P., Berroneau, M., Delmas, C. Guiller, G., Legentilhomme, J. ve Fritz, U. (2020). How often do they do it? An in-depth analysis of the hybrid zone of two grass snake species (*Natrix astreptophora* and *Natrix helvetica*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 131(4), 756-773.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press, Cambridge. 447 pp.
- Baack, E. J. ve Rieseberg, L. H. (2007). A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17(6), 513-518.
- Babik, W. ve Rafiński, J. (2004). Relationship between morphometric and genetic variation in pure and hybrid populations of the smooth and Montandon's newt (*Triturus vulgaris* and *T. montandoni*). *Journal of Zoology*, 262(2), 135-143.
- Babik, W., Szymura, J. M. ve Rafiński, J. (2003). Nuclear markers, mitochondrial DNA and male secondary sexual traits variation in a newt hybrid zone (*Triturus vulgaris* x *T. montandoni*). *Molecular Ecology*, 12(7), 1913-1930.
- Baran, İ. (2005). *Türkiye Amfibileri ve Sürüngenleri*. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu yayınları, Ankara 165 s.
- Baran, İ., Tosunoğlu, M., Kaya, U. ve Kumlutaş, Y. (1997). Çamlıhemşin (Rize) Civarının Herpetofaunası Hakkında Bir Çalışma. *Turkish Journal of Biology*, 21, 409-416.
- Barton, N. H. ve Hewitt, G. M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 113-148.
- Barton, N. H. ve K. S. Gale. (1993). Genetic analysis of hybrid zones. R. G. Harrison (Ed), *Hybrid Zones and The Evolutionary Process* (pp. 13-45). Oxford University Press.
- Başoğlu, M. ve Özeti, N. (1973). Türkiye Amfibileri. Fen Fakültesi Kitapları Serisi, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir. 218 s.
- Bell, R. C. ve Irian, C. G. (2019). Phenotypic and genetic divergence in reed frogs across a mosaic hybrid zone on São Tomé Island. *Biological Journal of the Linnean Society*, 128(3), 672-680.
- Benkovský, N., Moravec, J., Javůrková, V. G., Šifrová, H., Gvoždík, V. ve Jandzik, D. (2021). Phenotypic differentiation of the slow worm lizards (Squamata: *Anguis*) across their contact zone in Central Europe. *PeerJ*, 9, e12482.

- Benson, J. F. Patterson, B. R. ve Wheeldon, T. J. (2012). Spatial genetic and morphologic structure of wolves and coyotes in relation to environmental heterogeneity in a *Canis* hybrid zone. *Molecular Ecology*, 21(24), 5934-5954.
- Beşir, İ. H. ve Gül, S. (2019). Mapping of distribution of amphibian species in Rize Province, Turkey. *Herpetology Notes*, 12, 45-51.
- Bilgin, R. (2011). Back to the suture: the distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 4080-4103.
- Birkhead, T. R. ve Brillard, J. P. (2007). Reproductive isolation in birds: postcopulatory prezygotic barriers. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(5), 266-272.
- Blaxter, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444), 669-679.
- Bodenheimer, F. S. (1994). Introduction into the Knowledge of the Amphibia and Reptilia of Turkey. *Review of the Faculty Science İstanbul*, 9(9), 1-78.
- Bouckaert, R. ve Drummond, A. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evolutionary Biology*, 17, 42.
- Bouckaert, R., Vaughan, T.G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N. ve Matschiner, M. (2019). BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 15(4), e1006650.
- Bozdag, G. O., Ono, J., Denton, J. A., Karakoc, E., Hunter, N., Leu, J. Y. ve Greig, D. (2021). Breaking a species barrier by enabling hybrid recombination. *Current Biology*, 31(4), R180-R181.
- Branicki, W., Kupiec, T. ve Pawlowski, R. (2003). Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Science*, 48(1), 1-5.
- Brede, E. G., Rowe, G., Trojanowski, J. ve Beebee, T. J. (2001). Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the common toad *Bufo bufo*. *Molecular Ecology Notes*, 1, 308-310.
- Brumfield R. T., Jernigan, R. W., McDonald, D. B. ve Braun, M. J. (2001). Evolutionary implications of divergent clines in an avian (Manacus: Aves) hybrid zone. *Evolution*, 55, 2070-2087.
- Buggs, R. J. A. (2007). Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity*, 99(3), 301-312.

- Burbrink, F. T. ve Ruane, S. (2021). Contemporary philosophy and methods for studying speciation and delimiting species. *Ichthyology & Herpetology*, 109(3), 874-894.
- Cahill, J. A., Heintzman, P. D., Harris, K., Teasdale, M., Kapp, J., Rodrigues Soares, A. E. ve Shapiro, B. (2017). Genomic evidence of globally widespread admixture from polar bears into brown bears during the last ice age. *Molecular Biology and Evolution*, 35(5), 1120-1129.
- Cahill, J. A., Stirling, I., Kistler, L., Salamzade, R., Ersmark, E., Fulton, T. L., Stiller, M., Green, R. E. ve Shapiro, B. (2015). Genomic evidence of geographically widespread effect of gene flow from polar bears into brown bears. *Molecular Ecology*, 24(6), 1205-1217.
- Campagna, L., Rodriguez, P. ve Mazzulla, J. C. (2018). Transgressive phenotypes and evidence of weak postzygotic isolation in F1 hybrids between closely related capuchino seedeaters. *PLoS One*, 13(6), e0199113.
- Capula, M. (2002). Genetic evidence of natural hybridization between *Podarcis sicula* and *Podarcis tiliguerta* (Reptilia: Lacertidae). *Amphibia-Reptilia*, 23(3), 313-321.
- Carling, M. D. ve Brumfield, R. T. (2008). Haldanes rule in an avian system: using cline theory and divergence population genetics to test for differential introgression of mitochondrial, autosomal, and sex-linked loci across the Passerina bunting hybrid zone. *Evolution*, 62, 2600-2615.
- Carling, M. D. ve Zuckerberg, B. (2011). Spatio-temporal changes in the genetic structure of the Passerina bunting hybrid zone. *Molecular Ecology*, 20, 1166-1175.
- Castellano, S. ve Giacoma, C. (1998). Morphological variation of the green toad, *Bufo viridis*, in Italy: a test of causation. *Journal of Herpetology*, 32(4), 540-550.
- Caye, K. ve Francois, O. (2016): tess3r: Inference of Spatial Population Genetic Structure. R package version 1.1.0.
- Chambers, E. A. ve Hillis, D. M. (2020). The multispecies coalescent over-splits species in the case of geographically widespread taxa. *Systematic Biology*, 69(1), 184-193.
- Chambers, E. A., Marshall, T. L. ve Hillis, D. M. (2023). The importance of contact zones for distinguishing interspecific from intraspecific geographic variation. *Systematic Biology*, 72(2), 357-371.
- Chan, K. O., Hertwig, S. T., Neokleous, D. N., Flury, J. M. ve Brown, R. M. (2022). Widely used, short 16S rRNA mitochondrial gene fragments yield poor and erratic results in phylogenetic estimation and species delimitation of amphibians. *BMC Ecology and Evolution*, 22(1), 1-9.

- Chiocchio, A., Arntzen, J. W., Martínez-Solano, I., de Vries, W., Bisconti, R., Pezzarossa, A., Maiorano, L. ve Canestrelli, D. (2021). Reconstructing hotspots of genetic diversity from glacial refugia and subsequent dispersal in Italian common toads (*Bufo bufo*). *Scientific reports*, 11(1), 260.
- Cinget, B., de Lafontaine, G., Gérardi, S. ve Bousquet, J. (2015). Integrating phylogeography and paleoecology to investigate the origin and dynamics of hybrid zones: insights from two widespread North American firs. *Molecular Ecology*, 24(11), 2856-2870.
- Clark, R. J. ve Clark, E. D. (1973). Collection of Amphibians and Reptiles from Turkey. *California Academy of Science*, 104, 1-62.
- Colliard, C., Sicilia, A., Turrisi, G. F., Arculeo, M., Perrin, N. ve Stöck, M. (2010). Strong reproductive barriers in a narrow hybrid zone of West-Mediterranean green toads (*Bufo viridis* subgroup) with Plio-Pleistocene divergence. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 1-16.
- Colvin, A. Z. (2018). Hybrid Speciation Schematic. Wikipedia.
- Cortés-Ortiz, L. (2017). Hybridization and hybrid zones. A. Fuentes (Ed), The international encyclopedia of primatology. John Wiley and Sons.
- Cortés-Ortiz, L., Roos, C. ve Zinner, D. (2019). Introduction to Special Issue on Primate Hybridization and Hybrid Zones. *International Journal of Primatology*, 40, 1-8.
- Coughlan, J. M. ve Matute, D. R. (2020). The importance of intrinsic postzygotic barriers throughout the speciation process. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1806), 20190533.
- Coyner, B. S., Murphy, P. J. ve Matocq, M. D. (2015). Hybridization and asymmetric introgression across a narrow zone of contact between *Neotoma fuscipes* and *N. macrotis* (Rodentia: Cricetidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 115(1), 162-172.
- Culumber, Z. W, Shepard, D. B., Coleman, S. W., Rosenthal, G. G. ve Tobler, M. (2012). Physiological adaptation along environmental gradients and replicated hybrid zone structure in swordtails (Teleostei: Xiphophorus). *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 1800-1814.
- Dakin, E. (2006). Cytonuclear disequilibria in a spatially structured hybrid zone. *Theoretical Population Biology*, 70(1), 82-91.
- De La Torre, A., Ingvarsson, P. K. ve Aitken, S. N. (2015). Genetic architecture and genomic patterns of gene flow between hybridizing species of *Picea*. *Heredity*, 115(2), 153-164.
- De Lange, L. (1973). A contribution to the intraspecific systematics of *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758)(Amphibia). *Beaufortia*, 21(280), 99-116.

- Derryberry, E.P., Derryberry, G.E., Maley, J. M. ve Brumfield, R.T. (2014). HZAR: hybrid zone analysis using an R software package. *Molecular Ecology Resources*, 14, 652-663.
- DeSalle, R. ve Goldstein, P. (2019). Review and interpretation of trends in DNA barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 302.
- Després, L. (2019). One, two or more species? Mitonuclear discordance and species delimitation. *Molecular Ecology*, 28, 3845-3847.
- Dönmez, F., Tosunoğlu, M. ve Gül, Ç. (2009). Hematological values in hermaphrodite, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758). *North-Western Journal of Zoology*, 5(1), 97-103.
- Dufresnes, C., Bonato, L., Novarini, N., Betto-Colliard, C., Perrin, N. ve Stöck, M. (2014). Inferring the degree of incipient speciation in secondary contact zones of closely related lineages of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). *Heredity*, 113(1), 9-20.
- Dufresnes, C., Brelsford, A., Crnobrnja-Isailović, J., Tzankov, N., Lymberakis, P. ve Perrin, N. (2015). Timeframe of speciation inferred from secondary contact zones in the European tree frog radiation (*Hyla arborea* group). *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 1-8.
- Dufresnes, C., Brelsford, A., Jeffries, D. L., Mazepa, G., Suchan, T., Canestrelli, D., Nicieza, A., Fumagalli, L., Dubey, S., Martínez-Solano, I., Litvinchuk, S. N., Vences, M., Perrin, N. ve Crochet, P. A (2021b). Mass of genes rather than master genes underlie the genomic architecture of amphibian speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(36), e2103963118.
- Dufresnes, C., Litvinchuk, S. N., Rozenblut-Kościsty, B., Rodrigues, N., Perrin, N., Crochet, P. A. ve Jeffries, D. L. (2020a). Hybridization and introgression between toads with different sex chromosome systems. *Evolution Letters*, 4(5), 444-456.
- Dufresnes, C., Mazepa, G., Jablonski, D., Caliar Oliveira, R., Wenseleers, T., Shabanov, D. A., Auer, M., Ernst, R., Koch, C., Ramírez-Chaves, H. E., Mulder, K.P., Simonov, E., Tiutenko, A., Kryvokhyzha, D., Wennekes, P. L., Zinenko, O. I., Korshunov, O. V., Al-Johany, A. M., Peregontsev, E. A., Masroor, R., Betto-Colliard, C., Denoël, M., Borkin, L. J., Skorinov, D. V., Pasyukova, R. A., Mazanaeva, L. F., Rosanov, J. M., Dubey, S. ve Litvinchuk, S. N. (2019). Fifteen shades of green: the evolution of *Bufo* toads revisited. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 141, 106615.
- Dufresnes, C., Nicieza, A. G., Litvinchuk, S. N., Rodrigues, N., Jeffries, D. L., Vences, M., Perrin, N. ve Martínez-Solano, I. (2020b). Are glacial refugia hotspots of speciation and cytonuclear discordances? Answers from the genomic phylogeography of Spanish common frogs. *Molecular Ecology*, 29(5), 986-1000.

- Dufresnes, C., Pribille, M., Alard, B., Gonçalves, H., Amat, F., Crochet, P. A., Dubey, S., Perrin, N., Fumagalli, L., Vences, M. ve Martínez-Solano, I. (2020). Integrating hybrid zone analyses in species delimitation: Lessons from two anuran radiations of the Western Mediterranean. *Heredity*, 124, 423-438.
- Dufresnes, C., Suchan, T., Smirnov, N. A., Denoël, M., Rosanov, J. M. ve Litvinchuk, S. N. (2021a). Revisiting a speciation classic: comparative analyses support sharp but leaky transitions between *Bombina* toads. *Journal of Biogeography*, 48(3), 548-560.
- Durrett, R., Buttel, L. ve Harrison, R. (2000). Spatial models for hybrid zones. *Heredity*, 84, 9-19.
- Dursun, C. (2018). Türkiye'deki *Bufo Bufo* ve *Bufo verrucosissimus* türlerinin morfolojik yönden karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Dursun, C. ve Özdemir, N. (2022). Morphological variability and age structure in a population of *Bufo verrucosissimus* (Anura: Bufonidae) from Artvin, Turkey. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 21(1), 31-49.
- Dursun, C., Özdemir, N., Gül, S., Üzümlü, N. ve Kutrup, B. (2022). Intra-and interspecific and elevational variation in keratinized spines on the head in two closely related *Bufo* species. *South American Journal of Herpetology*, 25(1), 57-65.
- Earl, D. A. ve Von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources*, 4, 359-361.
- Edwards, D. L. ve Knowles, L. L. (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20132765.
- Eiset, J. (1965). Einige Amphibien und Reptilien aus der Nordoslichen Türkei, Gesammelt Von Herrn H. Steiner. *Annual Natural History Museum Wien*, 67, 387-389.
- Elmer, K. R., Recknagel, H., Thompson, A. ve Meyer, A. (2012). Asymmetric admixture and morphological variability at a suture zone: parapatric burbot subspecies (Pisces) in the Mackenzie River basin, Canada. *Hydrobiologia*, 683, 217-229.
- Endler, J. A. (1977). *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 262 pp.
- Engelbrechtsen, K. N., Barrow, L. N., Rittmeyer, E. N., Brown, J. M. ve Lemmon, E. M. (2016). Quantifying the spatiotemporal dynamics in a chorus frog (*Pseudacris*) hybrid zone over 30 years. *Ecology and Evolution*, 6(14), 5013-5031.

- Erdoğan, A., Öz, M., Sert, H. ve Tunç, M. R. (2002). Antalya-Yamansaz Gölü ve yakın çevresinin avifaunası ve herpetofaunası. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 11(43), 33-39.
- Espregueira Themudo, G., Nieman, A. ve Arntzen, J. W. (2012). Is dispersal guided by the environment? A comparison of interspecific gene flow estimates among differentiated regions of a newt hybrid zone. *Molecular Ecology*, 21, 5324-5335.
- Evanno, G., Regnaut, S. ve Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- Excoffier, L., Foll, M. ve Petit, R. J. (2009). Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 481-501.
- Fahrbach, M., Visser, M. D. ve Wielstra, B. (2021). The hybrid zone between the Italian and Northern Crested Newts (*Triturus carnifex* and *T. cristatus*) reaches Germany. *Salamandra: German journal of Herpetology*, 57(3), 428-434.
- Fitzpatrick, B. M. (2013). Alternative forms for genomic clines. *Ecology and Evolution*, 3(7), 1951-1966.
- Folk, R. A., Soltis Pamela, S., Soltis Douglas, E. ve Guralnick, R. (2018). New prospects in the detection and comparative analysis of hybridization in the tree of life. *American Journal of Botany*, 105, 364-375.
- Foulley, J. L. ve Ollivier, L. (2006). Estimating allelic richness and its diversity. *Livestock Science*, 101(1-3), 150-158.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Furman, B. L., Cauret, C. M., Colby, G. A., Measey, G. J. ve Evans, B. J. (2017). Limited genomic consequences of hybridization between two African clawed frogs, *Xenopus gilli* and *X. laevis* (Anura: Pipidae). *Scientific Reports*, 7, 1091.
- Gaggiotti, O. E., Lange, O., Rassmann, K. ve Gliddon, C. (1999). A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8(9), 1513-1520.
- Galbreath, K. E., Hafner, D. J. ve Zamudio, K. R. (2009). When cold is better: climate-driven elevation shifts yield complex patterns of diversification and demography in an alpine specialist (American pika, *Ochotona princeps*). *Evolution*, 63(11), 2848-2863.
- Garcia-Porta, J., Litvinchuk, S. N., Crochet, P. A., Geniez, P. H., Lo-Valvo, M., Lymberakis, P. ve Carranza, S. (2012). Molecular phylogenetics and historical biogeography of the west-palearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63, 113-130.

- Gay, L., Crochet, P. A., Bell, D. A. ve Lenormand, T. (2008). Comparing clines on molecular and phenotypic traits in hybrid zones: A window on tension zone models. *Evolution*, 62(11), 2789–2806.
- Gilbert, K. J., Moinet, A. ve Peischl, S. (2022). Gene surfing of underdominant alleles promotes formation of hybrid zones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1846), 20210006.
- Gilles, A., Thevenin, Y., Dione, F., Martin, J. F., Barascud, B., Chappaz, R. ve Pech, N. (2022). Breaking the reproductive barrier of divergent species to explore the genomic landscape. *Frontiers in Genetics*, 13, 963341.
- Goebel, A. M., Donnelly, J. M. ve Atz, M. E. (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 11, 163-199.
- Gompert, Z. ve Buerkle, C. (2012). bgc: Software for Bayesian estimation of genomic clines. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 1168-1176.
- Gompert, Z. ve Buerkle, C. A. (2011). Bayesian estimation of genomic clines. *Molecular Ecology*, 20(10), 2111-2127.
- Gompert, Z. ve Buerkle, C.A. (2009). A powerful regression-based method for admixture mapping of isolation across the genome of hybrids. *Molecular Ecology*, 18, 1207-1224.
- Gompert, Z. ve Alex Buerkle, C. (2010). INTROGRESS: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), 378-384.
- Gompert, Z. Mandeville, E. G. ve Buerkle, C. A. (2017). Analysis of population genomic data from hybrid zones. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48, 207-229.
- Goudet, J. ve Jombart, T. (2022). hierfstat: Estimation and tests of hierarchical F-statistics. R package version 0.5-11.
- Guillot, G., Renaud, S., Ledevin, R., Michaux, J. ve Claude, J. (2012). A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. *Systematic Biology*, 61, 897-911.
- Gül, S. (2020). The most northeastern record of the Turkish endemic viper, *Pelias barani* (Böhme and Joger, 1984), from northeastern Anatolia: two viper species in a valley. *Amphibian & Reptile Conservation*, 14(3), 218-225.
- Gül, S., Dursun, C., Kutrup, B., Üzümlü, N. ve Özdemir, N. (2023). Comparison of the ecological niche of two closely related toads (*Bufo bufo* and *Bufo verrucosissimus*). *Animal Biology*, 73(2), 213-223.

- Gvoždík, V., Moravec, J., Klütsch, C. ve Kotlík, P. (2010). Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 1146-1166.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hamilton, J. A. ve Miller, J. M. (2016). Adaptive introgression as a resource for management and genetic conservation in a changing climate. *Conservation Biology*, 30, 33-41
- Harrison, R. G. (1990). Hybrid zones: Windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 69-128.
- Harrison, R. G. ve Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809.
- Hashmi, B. S. (2016). Species and Speciation. <https://www.slideshare.net/badaralamdarhashmi/species-and-speciation-63224681> adresinden 20 Mayıs 2023 tarihinde alınmıştır.
- Hausdorf, B. ve Hennig, C. (2020). Species delimitation and geography. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 950-960.
- Hebbali, A. (2020). olsrr: Tools for Building OLS Regression Models. R package version 0.5.3.
- Hedrick, P. W. (2013). Adaptive introgression in animals: Examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology*, 22(18), 4606-4618.
- Hewitt, G. (2011). Quaternary phylogeography: The roots of hybrid zones. *Genetica*, 139(5), 617-638.
- Hewitt, G. M. (1988). Hybrid zones - natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*, 3(7), 158-167.
- Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society*, 68(1-2), 87-112.
- Hijmans, R. (2022). geosphere: Spherical Trigonometry. R package version 1.5-18
- Hillis, D. M. (2019). Species delimitation in herpetology. *Journal of Herpetology*, 53(1), 3-12.
- Hillis, D. M., Chambers, E. A. and Devitt, T. J. (2021). Contemporary Methods and Evidence for Species Delimitation. *Ichthyology & Herpetology*, 109(3), 895-903.

- Holleley, C. E. ve Geerts, P. G. (2009). Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*, 46, 511-517.
- Howard, D. J. and Berlocher, S. H. (1998). *Endless forms: Species and speciation*. Oxford University Press, New York. 470 pp.
- Iskanderov, T. (2009). Current Status of the Caucasus Toad (*Bufo verrucosissimus* Pall., 1814) and Caucasus Parsley Frog (*Pelodytes caucasicus* Boul., 1896) in Azerbaijan. N. Zazanashvili ve D. Mallon (Ed.), Status and Protection of Globally Threatened Species in the Caucasus (pp. 150-156). World Wildlife Fund.
- Jablonski, D. ve Sadek, R. A. (2019). The Caucasian Toad, *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) in the Levant: evidence from mitochondrial DNA. *Herpetozoa*, 32, 255-258.
- Jablonski, D., Sillero, N., Oskyrko, O., Bellati, A., Čeirāns, A., Cheylan, K., Cogălniceanu, D., Crnobrnja-Isailović, J., Crochet, P.A., Crottini, A., Doronin, I., Džukić, G., Geniez, P., Ilgaz, Ç., Iosif, R., Jandzik, D., Jelić, D., Litvinchuk, S., Ljubisavljević, K., Lymberakis, P., Mikulíček, P., Mizsei, E., Moravec, J., Najbar, B., Pabijan, M., Pupins, M., Sourrouille, P., Strachinis, I., Szabolcs, M., Thanou, E., Tzoras, E., Vergilov, V., Vörös, J. ve Gvoždík, V. (2021). The distribution and biogeography of slow worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones. *Amphibia-Reptilia*, 42(4), 519-530.
- Jandzik, D., Jablonski, D., Zinenko, O., Kukushkin, O. V., Moravec, J. ve Gvoždík, V. (2018). Pleistocene extinctions and recent expansions in an anguid lizard of the genus *Pseudopus*. *Zoologica Scripta*, 47(1), 21-32.
- Jiggins, C. D. ve Mallet, J. (2000). Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(6), 250-255.
- Johnson, B. B., White, T. A., Phillips, C. A. ve Zamudio, K. R. (2015). Asymmetric introgression in a spotted salamander hybrid zone. *Journal of Heredity*, 106(5), 608-617.
- Jombart, T. (2008): adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403-1405.
- Jones, O. R. ve Wang, J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10, 551-555.
- Kalayci, T. E., Gül, S., Dursun, C., Karaoğlu, H. ve Özdemir, N. (2019). Age structure and body size variation in common toad (*Bufo bufo*, Linnaeus 1758) from three different altitudes in Turkey. *Russian Journal of Ecology*, 50, 397-403.

- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F. ve Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281.
- Karataş, A., Filiz, H., Erciyas-Yavuz, K., Özeren, S. C. ve Tok, C. V. (2021). The vertebrate biodiversity of Turkey. Öztürk, M., V. Altay ve R. Efe (Ed.), *Biodiversity, Conservation and Sustainability in Asia: Volume 1: Prospects and Challenges in West Asia and Caucasus* (pp. 175-274). Springer International Publishing.
- Kassambara, A. ve Mundt, F. (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.
- Kawakami, T. ve Butlin, R. (2012): Hybrid zones. Jon Wiley & Sons. Ltd.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W. W. ve Prodöhl, P. A. (2013). diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 782-788.
- Kidov, A., (2009). Кавказская жаба *Bufo verrucosissimus* (Pallas, [1814]) (Amphibia, Anura, Bufonidae) в Западном и Центральном Предкавказье: замечания к распространению и таксономии. *Scientific Research in Zoological Parks*, 25, 170-179.
- Koç-Gür, H., Bülbül, U., Öztürk, İ. ve B Kutrup. (2020). High Mortality of Amphibians and Reptiles on Pazar-Hemşin Highway in Black Sea Region of Turkey. Benzer. S. ve B. Topuz (Ed.), *Contemporary Studies in Natural Sciences* (pp. 1-11). Akademisyen Publishing House.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. ve Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179-1191.
- Kornilios, P., Ilgaz, Ç., Kumlutas, Y., Lymberakis, P., Moravec, J., Sindaco, R., Rastegar-Pouyani, N., Afroosheh, M., Giokas, S., Fraguadakis-Tsolis, S. ve Chondropoulos, B. (2012). Neogene climatic oscillations shape the biogeography and evolutionary history of the Eurasian blindsnake. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 856–873.
- Köseoğlu, G. (2015). Amonyum Sülfat'ın Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*) Larvalarının Gelişimi Üzerindeki Akut Toksikolojik, Morfolojik ve Histopatolojik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Kuchta S, R. (2007). Contact zones and species limits: hybridization between lineages of the California Newt, *Taricha torosa*, in the southern Sierra Nevada. *Herpetologica*, 63, 332-350.

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. ve Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Kumlutaş, Y., Ilgaz, C. ve Yakar, O. (2017). Herpetofauna of Karabük province. *Acta Biologica Turcica*, 30(4), 102-107.
- Kumlutaş, Y., Ilgaz, Ç. ve Candan, K. (2015). Fethiye-Göcek (Muğla) özel çevre koruma bölgesinin herpetofaunik çeşitliliği. *Journal of Anatolian Natural Sciences*, 6(2), 155-162.
- Kumlutaş, Y., Tok, V. ve Türkozan, O. (1998). The herpetofauna of the Ordu-Giresun region. *Turkish Journal of Zoology*, 22(3), 199-202.
- Kurnaz, M. (2020). Species list of Amphibians and Reptiles from Turkey. *Journal of Animal Diversity*, 2(4), 10-32.
- Kurnaz, M., Kutrup, B., Hosseinian Yousefkhani, S. S., Koc, H., Bülbül, U. ve Eroğlu, A. İ. (2019). Phylogeography of the red-bellied lizard, *Darevskia parvula* in Turkey. *Mitochondrial DNA Part A*, 30(3), 556-566.
- Kutrup, B. (2001). On the amphibia and reptilia species of Murgul (Artvin). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(9), 1160-1164.
- Kutrup, B., Yilmaz, N., Canakci, S., Belduz, A. O. ve Doglio, S.,(2006). Intraspecific variation of *Bufo bufo*, based on 16S Ribosomal RNA sequences. *Amphibia-Reptilia*, 27, 268-273.
- Langone, J. A., Camargo, A. ve de Sá, R. O. (2016). High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867)(Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95, 137-151.
- Larson, E. L., Andrés, J. A., Bogdanowicz, S. M. ve Harrison, R. G. (2013). Differential introgression in a mosaic hybrid zone reveals candidate barrier genes. *Evolution*, 67(12), 3653-3661.
- Larson, E. L., Guilherme Becker, C., Bondra, E. R. ve Harrison, R. G. (2013). Structure of a mosaic hybrid zone between the field crickets *Gryllus firmus* and *G. pennsylvanicus*. *Ecology and Evolution*, 3(4), 985-1002.
- Lê, S., Josse, J. ve Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25, 1-18.
- Leigh, J. W. ve Bryant, D. (2015): POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110-1116.

- Lin, X. Q., Hou, Y. M., Yang, W. Z., Shi, S. C., Zheng, P. Y., Shih, C. K., Jiang, J. P. ve Xie, F. (2023). A wide hybrid zone mediated by precipitation contributed to confused geographical structure of *Scutiger boulengeri*. *Zoological Research*, 44(1), 3-19.
- Litvinchuk, N. S., Borkin, L., Skorinov, V. D. ve Rosanov, J. M., (2008). A new species of common toads from the talysh mountains, south-eastern caucasus: genome size, allozyme, and morphological evidences. *Russian Journal of Herpetology*, 15(1), 19-43.
- Lou, R. N., Fletcher, N. K., Wilder, A. P., Conover, D. O., Therkildsen, N. O. ve Searle, J. B. (2018). Full mitochondrial genome sequences reveal new insights about post-glacial expansion and regional phylogeographic structure in the Atlantic silverside (*Menidia menidia*). *Marine Biology*, 165, 1-18.
- López-Delgado, J., van Riemsdijk, I. ve Arntzen, J. W. (2021). Tracing species replacement in Iberian marbled newts. *Ecology and Evolution*, 11(1), 402-414.
- Lüscher, B., Grossenbacher, K. ve Scholl, A. (2001). Genetic Differentiation of the Common Toad (*Bufo bufo*) in the Swissh Alps. *Amphibia-Reptilia*, 22, 141-154.
- Macdonald, D. W., Salazar, R. D., Eynard, S. E., Rogers, A., Coles, R. S. ve Montgomery, R. A. (2020). The Genetic Differentiation of Common Toads on UK Farmland: The Effect of Straight-Line (Euclidean) Distance and Isolation by Barriers in a Heterogeneous Environment. *Journal of Herpetology*, 54(1), 118-124.
- Macey, J. R., Schulte II, J. A., Larson, A., Fang, Z., Wang, Y., Tuniyev, B. S. ve Papenfuss, T. J. (1998). Phylogenetic Relationships of Toads in the *Bufo bufo* Species Group from the Eastern Escarpment of the Tibetan Plateau: A Case of Vicariance and Dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 80-87.
- Macholán, M., Baird, S. J., Dufková, P., Munclinger, P., Bímová, B. V. ve Piálek, J. (2011). Assessing multilocus introgression patterns: a case study on the mouse X chromosome in central Europe. *Evolution*, 65(5), 1428-1446.
- Majtyka, T., Borczyk, B., Ogielska, M. ve Stöck, M. (2022). Morphometry of two cryptic tree frog species at their hybrid zone reveals neither intermediate nor transgressive morphotypes. *Ecology and Evolution*, 12(1), e8527.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5), 229-237.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279-283.
- Martin, D. ve Hong, H. (1991). The use of Bactine® in the treatment of open wounds and other lesions in captive anurans. *Herpetological Review*, 22(21), 462.

- Marzahn, E., Mayer, W., Joger, U., Ilgaz, Ç., Jablonski, D., Kindler, C., Kumlutaş, Y., Nistri, A., Schneeweiss, N., Vamberger, M., Žagar, A. ve Fritz, U. (2016). Phylogeography of the *Lacerta viridis* complex: mitochondrial and nuclear markers provide taxonomic insights. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54(2), 85-105.
- Mebert, K., Göçmen, B., İçci, N., Oğuz, M. A., Karış, M. ve Ursenbacher, S. (2015). New records and search for contact zones among parapatric vipers in the genus *Vipera* (*barani*, *kaznakovi*, *darevskii*, *eriwanensis*), *Montivipera* (*wagneri*, *raddei*), and *Macrovipera* (*lebetina*) in northeastern Anatolia. *The Herpetological Bulletin*, 133, 13-22.
- Méndez-Rodríguez, A., Juste, J., Centeno-Cuadros, A., Rodríguez-Gómez, F., Serrato-Díaz, A., García-Mudarra, J. L., Guevara-Chumacero, L. M. ve López-Wilchis, R. (2021). Genetic introgression and morphological variation in naked-back bats (Chiroptera: Mormoopidae: *Pteronotus* species) along their contact zone in Central America. *Diversity*, 13(5), 194.
- Mermer, A. (2018). Amphibians and Reptiles of Olympos-Beydağları (Antalya, Turkey) National Park and Its Vicinity. *Commagene Journal of Biology*, 2, 19-22.
- Mertens, R. ve Wermuth, H. (1960). *Die Amphibien und Reptilien Europas*. Verlag Valdemer Kramer, Frenkfurt, XII. 264 pp.
- Mettler, R. D. ve Spellman, G. M. (2009). A hybrid zone revisited: Molecular and morphological analysis of the maintenance, movement, and evolution of a Great Plains avian (Cardinalidae: *Pheucticus*) hybrid zone. *Molecular Ecology*, 18, 3256-3267.
- Modliszewski, J. L., Thomas, D. T., Fan, C., Crawford, D. J., de Pamphilis, C. W. ve Xiang, Q. Y. (2006). Ancestral chloroplast polymorphism and historical secondary contact in a broad hybrid zone of *Aesculus* (Sapindaceae). *American Journal of Botany*, 93(3), 377-388.
- Mooers, A. O. ve Heard, S. B. (1997). Inferring evolutionary process from phylogenetic tree shape. *The Quarterly Review of Biology*, 72(1), 31-54.
- Moore, W. S. (1977). An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *The Quarterly Review of Biology*, 52(3), 263-277.
- Morgan-Richards, M., Smisse, R. D., Shepherd L. D., Wallis, G. P., Haywards, J. J., Chan, C. H., Chambers, K. G. ve Chapman, H. M. (2009). A review of genetic analyses of hybridisation in New Zealand. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 39, 15-34.

- Najibzadeh, M., Gharzi, A., Rastegar-Pouyani, N., Rastegar-Pouyani, E. ve Pesarakloo, A. (2018). Genetic structure of the hyrcanian wood frog, *Rana pseudodalmatina* (Amphibia: Ranidae) using mtDNA gene sequences. *Russian Journal of Genetics*, 54(10), 1221-1228.
- Nalbantsoy, A., Karış, M., Yalcin, H. T. ve Göçmen, B. (2016). Biological activities of skin and parotoid gland secretions of bufonid toads (*Bufo bufo*, *Bufo verrucosissimus* and *Bufo variabilis*) from Turkey. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 80, 298-303.
- Niedzicka, M. E., Głowacki, B. M., Zieliński, P. ve Babik, W. (2020). Morphology is a poor predictor of interspecific admixture—the case of two naturally hybridizing newts *Lissotriton montandoni* and *Lissotriton vulgaris* (Caudata: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, 41(4), 489-500.
- Nikolakis, Z. L., Schield, D. R., Westfall, A. K., Perry, B. W., Ivey, K. N., Orton, R. W., Hales, N. R., Adams, R. H., Meik, J. M., Parker, J. M., Smith, C. F., Gompert, Z., Mackessy, S. P. ve Castoe, T. A. (2022). Evidence that genomic incompatibilities and other multilocus processes impact hybrid fitness in a rattlesnake hybrid zone. *Evolution*, 76(11), 2513-2530.
- Núñez, J. J., Wood, N. K., Rabanal, F. E., Fontanella, F. M. ve Sites Jr, J. W. (2011). Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(2), 343-352.
- Nürnberg, B., Lohse, K., Fijarczyk, A., Szymura, J. M. ve Blaxter, M. L. (2016). Para-allopatry in hybridizing fire-bellied toads (*Bombina bombina* and *B. variegata*): Inference from transcriptome-wide coalescence analyses. *Evolution*, 70(8), 1803-818.
- Nylander, J. A. A. (2004): MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University
- O'Brien, D., Hall, J., O'Brien, K., Smith, D., Angus, S., Joglekar, R. V. ve Jehle, R. (2021). How did the toad get over the sea to Skye? Tracing the colonisation of Scottish inshore islands by common toads (*Bufo bufo*). *Herpetological Journal*, 31, 204-213.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlinn, D., Ouellette, M., Ribeiro Cunha, E., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C. ve Weedon, J. (2022). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-2.

- Olgun, K., Arıkan, H., Tok, C. V. ve Çevik, İ. E. (2003). 33° 00'-36° 00'Doğu Boyamlar Arası Orta Toroslar'ın Amfibileri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(2), 181-188.
- Olson, E. O., Scott, P. A. ve Shaffer, H. B. (2021). Phylogeographic origin of California slender salamanders (*Batrachoseps attenuatus*) in the Sutter Buttes. *Journal of Herpetology*, 55(1), 38-45.
- Orlova, V. F. ve Tuniyev B. S., 1989. On the taxonomy of the Cacasian Common Toads belonging to the group *Bufo verrucosissimus verrucosissimus* (Pallas) (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Byulleten Moskovskogo Obshchestva Ispytatelei Prirody*, 94, 13-24.
- Orr, H. A. (1995). The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics*, 139(4), 1805-1813.
- Özdemir, A. ve Baran, İ., 2002. Research on the Herpetofauna of Murat Mountain (Kütahya-Uşak). *Turkish Journal of Zoology*, 26, 189-195.
- Özdemir, N. (2005). Siğilli Kurbağa (*Bufo bufo*)'nın Morfolojik ve Moleküler Açından İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Özdemir, N., Dursun, C., Üzüm, N., Kutrup, B. ve Gül, S. (2020). Taxonomic assessment and distribution of common toads (*Bufo bufo* and *B. verrucosissimus*) in Turkey based on morphological and molecular data. *Amphibia-Reptilia*, 41(3), 399-411.
- Özeti, N. ve Yılmaz, İ. (1994). Türkiye Amfibileri, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 221 s.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I. ve Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 1-14.
- Paradis E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419-420.
- Paradis, E., Blomberg, S., Bolker, B., Brown, J., Claude, J., Cuong, H. S. ve Desper, R. (2019). Package 'ape'. Analyses of phylogenetics and evolution, version.
- Payseur, B. A. (2010). Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation. *Molecular Ecology Resources*, 10(5), 806-820.
- Petit, C., Bretagnolle, F. ve Felber, F. (1999). Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 306-311.

- Pettengill, J. B. ve Moeller, D. A. (2012). Phylogeography of speciation: allopatric divergence and secondary contact between outcrossing and selfing *Clarkia*. *Molecular Ecology*, 21, 4578-4592.
- Phillott, A. D., Speare, R., Hines, H. B., Skerratt, L. F., Meyer, E., McDonald, K. R., Cashins, S. D., Mendez, D. ve Berger, L. (2010). Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(2-3), 175-185.
- Pisanets, E. M. (2001). Taxonomic relationships of the common toads (*Bufo bufo* complex) and some theoretical and practical problems of systematics. Communication 1. *Vestnik Zoology*, 35, 37-44.
- Pisanets E. M. (2002). Taxonomic relationships of the common toads (*Bufo bufo* complex) and some theoretical and practical problems of systematics. Communication 2. *Vestnik Zoolology*, 36, 61-68.
- Polechová, J. ve Barton, N. (2011). Genetic drift widens the expected cline but narrows the expected cline width. *Genetics*, 189(1), 227-235.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. ve Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Qi, Y., Lu, B., Gao, H., Hu, P. ve Fu, J. (2014): Hybridization and mitochondrial genome introgression between *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. *Molecular Ecology*, 23, 5575-5588.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rambaut, A. (2012). FigTree v1. 4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Edinburgh: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. ve Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901-904.
- Rangin, C., Bader, A. G., Pascal, G., Ecevitoglu, B. ve Görür, N. (2002). Deep structure of the Mid Black Sea High (offshore Turkey) imaged by multi-channel seismic survey (BLACKSIS cruise). *Marine Geology*, 182(3-4), 265-278.
- Rannala, B. ve Yang, Z. (2020). Species delimitation. C. Scornavacca, F. Delsuc and N. Galtier (Ed.), *Phylogenetics in the Genomic Era* (pp 5.5:1-5.5: 18). HAL.
- Ravinet, M., Faria, R., Butlin, R. K., Galindo, J., Bierne, N., Rafajlović, M., Noor, M. A. F., Mehlig, B. ve Westram, A. M. (2017). Interpreting the genomic landscape of speciation: a road map for finding barriers to gene flow. *Journal of Evolutional Biology*, 30, 1450-1477.

- Recuero, E., Canestrelli, D., Vörös, J., Szabo, K., Poyarkov, N. A., Arntzen J. W., Isalovic J. C., Kidov, A. A., Cogalniceanu, D., Caputo F. P., Nascetti, G. ve Solano, I. M. (2012). Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 71-86.
- Revelle, W. (2021) psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA.
- Ribeiro Jr, P. J., Diggle, P., Christensen, O., Schlather, M., Bivand, R. and Ripley, B. (2022). geoR: Analysis of Geostatistical Data. R package version 1.9-2.
- Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 351-358.
- Riquet, F., Haag-Liautard, C., Woodall, L., Bouza, C., Patrick, L., Hamer, B. ve Bierne, N. (2017). Parallel use of a shared genomic island of speciation in clinal and mosaic hybrid zones between cryptic seahorse lineages. *bioRxiv*, 161786.
- Rissler, L. J. ve Smith, W. H. (2010). Mapping amphibian contact zones and phylogeographical break hotspots across the United States. *Molecular Ecology*, 19(24), 5404-5416.
- Robbins, T. R., Walker, L. E., Gorospe, K. D., Karl, S. A., Schrey, A. W., McCoy, E. D. ve Mushinsky, H. R. (2014). Rise and fall of a hybrid zone: implications for the roles of aggression, mate choice, and secondary succession. *Journal of Heredity*, 105(2), 226-236.
- Rohwer, V. G., Callan, L. M., Kinsella, J. M. ve Ligon, R. A. (2022). No evidence that endohelminth parasites cause selection against hybrid orioles across the Baltimore–Bullock’s Oriole hybrid zone. *Ornithology*, 139(4), 1-13.
- Ronquist, F. ve Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137-138.
- Roth, S. ve Jehle, R. (2016). High genetic diversity of common toad (*Bufo bufo*) populations under strong natural fragmentation on a Northern archipelago. *Ecology and Evolution*, 6(6), 1626-1636.
- Rousset, F. (2008): genepop’007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Roy, J. S., O’Connor, D. ve Green, D. M. (2012). Oscillation of an Anuran Hybrid Zone: Morphological Evidence Spanning 50 Years. *PLoS ONE*, 7(12), e52819.

- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. ve Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Rudman, S. M. ve Schluter, D. (2016). Ecological impacts of reverse speciation in threespine stickleback. *Current Biology*, 26(4), 490-495.
- Runemark, A., Vallejo-Marin, M. ve Meier, J. I. (2019). Eukaryote hybrid genomes. *PLoS Genetics*, 15(11), e1008404.
- Ryan, S. F., Deines, J. M., Scriber, J. M., Pfrender, M. E., Jones, S. E., Emrich, S. J. ve Hellmann, J. J. (2018). Climate-mediated hybrid zone movement revealed with genomics, museum collection, and simulation modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), E2284–E2291.
- Sá-Pinto, A., Martínez-Fernández, M., López-Fernández, C., Ferreira, Z., Pereira, R., Gosálvez, J. ve Rolán-Alvarez, E. (2013). Incipient post-zygotic barrier in a model system of ecological speciation with gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(12), 2750-2756.
- Saarman, N. P. ve Pogson, G. H. (2015). Introgression between invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) in the central California hybrid zone. *Molecular Ecology*, 24(18), 4723-4738.
- Sağlam, İ. K., Küçükyıldırım, S. ve Çağlar, S. S. (2014). Diversification of montane species via elevation shifts: the case of the Kaçkar cricket *Phonochorion* (Orthoptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52(3), 177-189.
- Schmickl, R., Marburger, S., Bray, S. ve Yant, L. (2017). Hybrids and horizontal transfer: Introgression allows adaptive allele discovery. *Journal of Experimental Botany*, 68, 5453-5470.
- Schultze, N., Spitzweg, C., Corti, C., Delaugerre, M., Di Nicola, M.R., Geniez, P., Lapini, L., Liuzzi, C., Lunghi, E., Novarini, N., Picariello, O., Razzetti, E., Sperone, E., Stellati, L., Vignoli, L., Asztalos, M., Kindler, C. and Fritz, U. (2020). Mitochondrial ghost lineages blur phylogeography and taxonomy of *Natrix helvetica* ve *N. natrix* in Italy and Corsica. *Zoologica Scripta*, 49(4), 395-411.
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 198-207.
- Semenov, G. A., Curry, C. M., Patten, M. A., Weir, J. T. ve Taylor, S. A. (2023). Geographically consistent hybridization dynamics between the Black-crested and Tufted Titmouse with evidence of hybrid zone expansion. *Ornithology*, 140(3), 1-13.

- Seppa, P. ve Laurila, A. (1999). Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity*, 82, 309-317.
- Servedio, M. R. ve Sætre, G. P. (2003). Speciation as a positive feedback loop between postzygotic and prezygotic barriers to gene flow. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1523), 1473-1479.
- Sequeira, F., Arntzen, J. W., van Gulik, D., Hajema, S., Diaz, R. L., Wagt, M. ve van Riemsdijk, I. (2022). Genetic traces of hybrid zone movement across a fragmented habitat. *Journal of Evolutionary Biology*, 35(3), 400-412.
- Shapiro, B. J., Leducq, J. B. ve Mallet, J. (2016). What Is Speciation?. *PLoS Genetics*, 12, e1005860.
- Schwenk, K., Brede, N. ve Streit, B. (2008). Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1505), 2805-2811.
- Sinsch, U., Schneider, H. ve Tarkhnishvili, D. (2009). *Bufo bufo* Superspezies - Erdkröten-Artenkreis - taxon *bufo* (Linnaeus, 1758) - Erdkröte - taxon *gredosicola* L. Müller und Hellmich 1935 - Gredoserdkröte - taxon *spinosus* Daudin, 1803 - Riesenerdkröte - taxon *verrucosissimus* (Pallas, 1811). *Kolchische Erdkröte in. Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*, 5(2), 191-335.
- Smith, K. L., Hale, J. M., Kearney, M. R., Austin, J. J. ve Melville, J. (2013). Molecular patterns of introgression in a classic hybrid zone between the Australian tree frogs, *Litoria ewingii* and *L. paraewingii*: evidence of a tension zone. *Molecular Ecology*, 22, 1869-1883.
- Smith, K. L., Oliver, P. M. ve Littlejohn, M. J. (2012). Morphological and acoustic evidence for hybridisation between two broadly sympatric south-eastern Australian tree frogs *Litoria ewingii* and *L. verreauxii* (Anura: Hylidae). *Australian Journal of Zoology*, 60(1), 37-45.
- Smouse, R. P. P. ve Peakall, R. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539.
- Solak, H. Ö. (2013). Antalya/Boğazkent'te *Acrocephalus* Cinsine Ait Kuş Türlerinin Göç Fenolojilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Sparreboom, M. ve Arntzen, P. (1987). Über die Amphibien in der Umgebuung von Adapazarı, Türkei. *Herpetofauna*, 9, 27-34.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312-1313.

- Stankowski, S., Sobel, J. M. ve Streisfeld, M. A. (2017). Geographic cline analysis as a tool for studying genome-wide variation: a case study of pollinator-mediated divergence in a monkeyflower. *Molecular Ecology*, 26, 107-122.
- Stelkens, R. B., Schmid, C., Selz, O. ve Seehausen, O. (2009). Phenotypic novelty in experimental hybrids is predicted by the genetic distance between species of cichlid fish. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1-13.
- Stewart, K. A., Austin, J. D., Zamudio, K. R. ve Loughheed, S. C. (2016). Contact zone dynamics during early stages of speciation in a chorus frog (*Pseudacris crucifer*). *Heredity*, 116, 239-247.
- Stojak, J. ve Tarnowska, E. (2019). Polish suture zone as the goblet of truth in post-glacial history of mammals in Europe. *Mammal Research*, 64(4), 463-475.
- Storfer, A., Patton, A. ve Fraik, A. K. (2018). Navigating the interface between landscape genetics and landscape genomics. *Frontiers in Genetics*, 9, 68.
- Stöck, M., Dufresnes, C., Litvinchuk, S. N., Lymberakis, P., Biollay, S., Berroneau, M., Borzée, A., Ghali, K., Ogielska, M. ve Perrin, N. (2012). Cryptic diversity among Western Palearctic tree frogs: postglacial range expansion, range limits, and secondary contacts of three European tree frog lineages (*Hyla arborea* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 1-9.
- Stöck, M., Moritz, C., Hickerson, M., Frynta, D., Dujsebayeva, T., Eremchenko, V., Macey, J. R., Papenfuss, T. J. ve Wake, D. B. (2006). Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 663-689.
- Stümpel, N., Rajabizadeh, M., Avcı, A., Wüster, W. ve Joger, U. (2016). Phylogeny and diversification of mountain vipers (*Montivipera*, Nilson et al., 2001) triggered by multiple Plio–Pleistocene refugia and high-mountain topography in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 336-351.
- Sullivan, B. K., Wooten, J., Schwaner, T. D., Sullivan, K. O. ve Takahaski, M. (2015). Thirty years of hybridization between toads along the Agua Fria River in Arizona: I. Evidence from morphology and mtDNA. *Journal of Herpetology*, 49, 150-156.
- Szymura, J. M. ve N. H. Barton. (1986). Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution*, 40, 1141-1159.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.

- Tarkhnishvili, D. (1996). The distribution and ecology of the amphibians of Georgia and the Caucasus: a biogeographical analysis. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 3, 167-196.
- Tarkhnishvili, D. (2014). Historical biogeography of the Caucasus (No. A). Nova Science Publisher, New York. 234 pp.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H. ve Vogler, A. P. (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 70-74.
- Taylor, S. A., Larson, E. L. ve Harrison, R. G. (2015). Hybrid zones: Windows on climate change. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(7), 398-406.
- Thavornkanlapachai, R., Mills, H. R., Ottewell, K., Dunlop, J., Sims, C., Morris, K., Donaldson, F. ve Kennington, W. J. (2019). Mixing genetically and morphologically distinct populations in translocations: asymmetrical introgression in a newly established population of the boodie (*Bettongia lesueur*). *Genes*, 10(9), 729.
- Themudo, G. E. ve Arntzen, J. W. (2007). Newts under siege: range expansion of *Triturus pygmaeus* isolates populations of its sister species. *Diversity and Distributions*, 13(5), 580-586.
- Tobias, J. A., Seddon, N., Spottiswoode, C. N., Pilgrim, J. D., Fishpool, L. D. ve Collar, N. J. (2010). Quantitative criteria for species delimitation. *Ibis*, 152(4), 724-746.
- Toews, D. P. ve Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21(16), 3907-3930.
- Tok, C. V. (1999). Reşadiye (Datça) Yarımadası'nın Anura Türleri Hakkında Morfolojik Bir Araştırma (Anura: Bufonidae, Hylidae, Ranidae). *Turkish Journal of Zoology*, 23(2), 565-581.
- Tominaga, A., Matsui, M., Yoshikawa, N., Eto, K. ve Nishikawa, K. (2018). Genomic displacement and shift of the hybrid zone in the Japanese fire-bellied newt. *Journal of Heredity*, 109(3), 232-242.
- Toparslan, E., Karabag, K. ve Bilge, U. (2020). A workflow with R: Phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome b gene sequences. *PLoS One*, 15(12), e0243927.
- Tosunoglu, M. ve Taskavak, E. (2001). A serological investigation of the *Bufo bufo* (Anura, Bufonidae) populations in Southern Marmara (Manyas, Bahkesir) and Eastern Black Sea (Çamhemsin, Rize) region. *Italian Journal of Zoology*, 68, 165-168.

- Trujillo, T., Rodríguez, J. G., Arntzen J. W. ve Solano, I. M. (2017). Morphological and molecular data to describe a hybrid population of the Common toad (*Bufo bufo*) and the Spined toad (*Bufo spinosus*) in western France. *Contributions to Zoology*, 86(1), 1-10.
- Tunç, M. R. ve M. Yavuz. (2017). Phaselis Antik Kenti ve Beydağları'nın Herpetofaunası. *Phaselis*, 3, 315-327.
- Tuniyev, B. S, Tuniyev, S. B., Avcı, A. ve Ilgaz, Ç. (2014). Herpetological studies in eastern and north-eastern Turkey. *Current Herpetology*, 14, 44-53.
- Üzüm, N., Özdemir, N., Dursun, C., Kutrup, B. ve Gül, S. (2021). Interspecific and intraspecific size and shape variation in skull of two closely related species *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) and *Bufo verrucosissimus* (Pallas, 1814) from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 45(2), 91-101.
- Vaidya, G., Lohman, D. J. ve Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171-180.
- Vallejo-Marín, M. ve Hiscock, S. J. (2016). Hybridization and hybrid speciation under global change. *New Phytologist*, 211, 1170-1187.
- van den Burg, M. P., Herrando-Pérez, S. ve Vieites, D. R. (2020). ACDC, a global database of amphibian cytochrome-b sequences using reproducible curation for GenBank records. *Scientific Data*, 7(1), 1-6.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D. P. ve Shipley, P. (2004): MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- van Riemsdijk, I. (2019). Hybrid zone dynamics in amphibians. Doctoral Thesis. Leiden University, Faculty of Science, Leiden, The Netherlands.
- van Riemsdijk, I., Arntzen, J. W., Babik, W., Bogaerts, S., Franzen, M., Kalaentzis, K., Litvinchuk, S. N., Olgun, K., Wijnands, J. W. P. M. ve Wielstra, B. (2022). Next-generation phylogeography of the banded newts (*Ommatotriton*): A phylogenetic hypothesis for three ancient species with geographically restricted interspecific gene flow and deep intraspecific genetic structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 167, 107361.
- van Riemsdijk, I., Arntzen, J. W., Bogaerts, S., Franzen, M., Litvinchuk, S. N., Olgun, K. ve Wielstra, B. (2017). The Near East as a cradle of biodiversity: a phylogeography of banded newts (genus *Ommatotriton*) reveals extensive inter-and intraspecific genetic differentiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 114, 73-81.

- van Riemsdijk, I., Arntzen, J. W., Bucciarelli, G. M., McCartney-Melstad, E., Rafajlović, M., Scott, P. A., Toffelmier, E., Shaffer, H. B. ve Wielstra, B. (2023). Two transects reveal remarkable variation in gene flow on opposite ends of a European toad hybrid zone. *Heredity*, 131, 15-24.
- van Riemsdijk, I., Butlin, R., Wielstra, B. ve Arntzen, J. (2019). Testing a hypothesis of hybrid zone movement for toads in France. *Molecular Ecology*, 28(5), 1070-1083.
- Veith, M., Schmidler, J. F., Kosuch, J., Baran, I. ve Seitz, A. (2003). Palaeoclimatic changes explain Anatolian mountain frog evolution: a test for alternating vicariance and dispersal events. *Molecular Ecology*, 12(1), 185-199.
- Veith, M., Göçmen, B., Sotiropoulos, K., Eleftherakos, K., Lötters, S., Godmann, O., Karış, M., Oğuz, A. ve Ehl, S. (2020). Phylogeographic analyses point to long-term survival on the spot in micro-endemic Lycian salamanders. *PLoS ONE*, 15, e0226326.
- Venables, W. N. and Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York. 498 pp.
- Vines, T. H., Kohler, S. C., Thiel, M., Ghira, I., Sands, T. R., MacCallum, C. J., Barton, N. H. ve Nurnberger, B. (2003). The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Evolution*, 57(8), 1876-1888.
- Visser, M., de Leeuw, M., Zuiderwijk, A. ve Arntzen, J. W. (2017). Stabilization of a salamander moving hybrid zone. *Ecology and Evolution*, 7, 689-696.
- Vogel L. S. ve Johnson, S. G. (2008). Estimation of hybridization and introgression frequency in toads (genus: *Bufo*) using DNA sequence variation at mitochondrial and nuclear loci. *Journal of Herpetology*, 42, 61-75.
- Vörös, J., Mikulíček, P., Major, Á., Recuero, E. ve Arntzen, J. W. (2016). Phylogeographic analysis reveals northerly refugia for the riverine amphibian *Triturus dobrogicus* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(4), 974-991.
- Waldron, P. B., Kuchta, S. R., Hantak, M. M., Hickerson, Cari-Ann M. ve Anthony, C. D. (2019). Genetic Analysis of a Cryptic Contact Zone between Mitochondrial Clades of the Eastern Red-Backed Salamander, *Plethodon cinereus*. *Journal of Herpetology*, 53(2), 144-153.
- Wang, S., Xu, C., Zhang, J., Wang, S., Liu, X., Yang, X. ve Li, Y. (2021). Phylogeny and Biogeography of Common Toad (*Bufo bufo*) in Xinjiang, China. *Asian Herpetological Research*, 12(2), 201-212.
- Weir, B. S. ve Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.

- Wen, G., Yang, W. ve Fu, J. (2015). Population genetic structure and species status of Asiatic toads (*Bufo gargarizans*) in western China. *Zoological Science*, 32(5), 427-434.
- Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York, 213 pp.
- Wielstra, B. (2019). Historical hybrid zone movement: More pervasive than appreciated. *Journal of Biogeography*, 46, 1300-1305.
- Wielstra, B. ve Arntzen, J. W. (2016). Description of a new species of crested newt, previously subsumed in *Triturus ivanbureschi* (Amphibia: Caudata: Salamandridae). *Zootaxa*, 4109(1), 73-80.
- Wielstra, B. ve Arntzen, J.W. (2012): Postglacial species displacement in *Triturus* newts deduced from asymmetrically introgressed mitochondrial DNA and ecological niche models. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 1-12
- Wielstra, B., Bozkurt, E. ve Olgun, K. (2015). The distribution and taxonomy of *Lissotriton* newts in Turkey (Amphibia, Salamandridae). *ZooKeys*, 484, 11-23.
- Wielstra, B., Burke, T., Butlin, R. K. ve Arntzen, J. W. (2017). A signature of dynamic biogeography: Enclaves indicate past species replacement. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 284 (1868), 20172014.
- Wielstra, B., Litvinchuk, S. N., Naumov, B., Tzankov, N. ve Arntzen, J. W. (2013). A revised taxonomy of crested newts in the *Triturus karelinii* group (Amphibia: Caudata: Salamandridae), with the description of a new species. *Zootaxa*, 3682(3), 441-453.
- Wielstra, B., Themudo, G. E., Güçlü, Ö., Olgun, K., Poyarkov, N. A. ve Arntzen, J. W. (2010). Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition: the mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(3), 888-896.
- Wu, X. B. ve Hu, Y. L. (2010). Genetic diversity and molecular differentiation of Chinese toad based on microsatellite markers. *Molecular Biology Reports*, 37, 2379-2386.
- Yakar, O. (2016). İzmir Siğilli Kurbağa *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) Populasyonlarında Çağrı Davranışı Varyasyonunun İncelenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yakar, O., Kumlutaş, Y. ve Ilgaz, C. (2017). Advertisement and release call characteristics of the Common toad, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758), (Amphibia: Anura) from Karabük, Turkey. *Biharean Biologist*, 11(2), 85-87.
- Yalçinkaya, D., Yıldız, M. Z., Sami, E., Bozkurt, M. A., Üçeş, F. ve Özcan, A. (2022). Kahramanmaraş İlinin Kurbağa ve Sürüngen Çeşitliliği. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 15(1), 10-21.

- Yaşar, Ç., Çiçek, K., Mulder, J. ve Tok, C. V. (2021). The distribution and biogeography of amphibians and reptiles in Turkey. *North-Western Journal of Zoology*, 17(2), 232-275.
- Yılmaz, İ. ve Kumlutaş, Y. (1995). Türkiye’de Yaşayan *Bufo Bufo* (Linneaus) 1758’nun Dağılışı ve Taksonomik Durumu Hakkında Bir İnceleme. *Turkish Journal of Zoology*, 19, 277-284.
- Yılmaz, İ. (1984). Trakya Kuyruksuz Kurbağaları Üzerine Morfolojik ve Taksonomik Bir Araştırma (Anura: Discoglossidae, Pelobatidae, Bufonidae, Hylidae, Ranidae), *Doğa Bilim Dergisi TÜBİTAK*, 8, 244-264.
- Yılmaz, A., Adamia, S., Chabukiani, A., Chkhotua, T., Erdoğan, K., Tuzcu, S. ve Karabiyikoğlu, M. (2000). Structural correlation of the southern Transcaucasus (Georgia)-eastern Pontides (Turkey). *Geological Society, London, Special Publications*, 173(1), 171-182.
- Zamudio, K. R. ve Savage, W. K. (2003). Historical isolation, range expansion, and secondary contact of two highly divergent mitochondrial lineages in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Evolution*, 57(7), 1631-1652.
- Zhang, W., Luo, Z., Zhao, M. ve Wu, H. (2015). High genetic diversity in the endangered and narrowly distributed amphibian species *Leptobrachium leishanense*. *Integrative Zoology*, 10(5), 465-481.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. ve Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214.
- Zieliński, P., Nadachowska-Brzyska, K., Wielstra, B., Szkotak, R., Covaciu-Marcov, S. D., Cogălniceanu, D. ve Babik, W. (2013), No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Molecular Ecology*, 22, 1884-1903.
- Zinenko, O., Stumpel, N., Mazanaeva, L., Bakiev, A., Shiryaev, C., Pavlov, A., Kotenko, T., Kukushkin, O., Chikin, Y., Duisebayeva, T., Nilson, G., Orlov N. L., Tuniyev, S., Ananjeva, N. B., Murphy, R. W. ve Joger, U. (2015). Mitochondrial phylogeny shows multiple independent ecological transitions and northern dispersion despite of Pleistocene glaciations in meadow and steppe vipers (*Vipera ursinii* and *Vipera renardi*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 84, 85-100.

EKLER

Ek-1: Sitokrom b gen bölgesine ait dizilerin GenBank erişim numaraları

Örnek	Kod	Örnek	Kod	Örnek	Kod
MES01	ON564343	ARD04	ON564320	KAL02	ON564338
MES02	ON564344	SUC01	ON564364	KAL03	ON564339
MES03	ON564345	SUC02	ON564365	IKZ01	ON564335
SAV01	ON564346	SUC03	ON564366	IKZ02	ON564336
SAV02	ON564347	PAZ01	ON564354	IKZ03	ON564337
MUR01	ON564348	PAZ02	ON564355		
MUR02	ON564349	PAZ03	ON564356		
MUR03	ON564350	HEM01	ON564367		
AKH01	ON564311	HEM02	ON564368		
AKH02	ON564312	HEM04	ON564369		
AKH03	ON564313	KAP01	ON564340		
HOP01	ON564363	KAP02	ON564341		
CFT01	ON564324	KAP03	ON564342		
CFT02	ON564325	SEN01	ON564357		
CFT03	ON564326	SEN02	ON564358		
ORT01	ON564351	SEN03	ON564359		
ORT02	ON564352	ALI01	ON564314		
ORT03	ON564353	ALI02	ON564315		
YAY01	ON564360	ALI03	ON564316		
YAY02	ON564361	GUN03	ON564331		
YAY03	ON564362	GUN04	ON564332		
FIN01	ON564327	GUN01	ON564330		
FIN02	ON564328	GUN05	ON564333		
FIN03	ON564329	GUN06	ON564334		
ARD1	ON564317	CEV01	ON564321		
ARD2	ON564318	CEV02	ON564322		
ARD3	ON564319	CEV03	ON564323		