

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DEKİ *Acanthodactylus* CİNSİNDE
DNA BARKODLAMA YÖNTEMİ KULLANARAK
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe TEMBELO

Ekim, 2023

İZMİR

**TÜRKİYE’DEKİ *Acanthodactylus* CİNSİNDE DNA
BARKODLAMA YÖNTEMİ KULLANARAK
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN ARAŞTIRILMASI**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ayşe TEMBELO

Ekim, 2023

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

AYŞE TEMBELO tarafından PROF. DR. YUSUF KUMLUTAŞ yönetiminde hazırlanan “TÜRKİYE’DEKİ *Acanthodactylus* CİNSİNDE DNA BARKODLAMA YÖNTEMİ KULLANARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf KUMLUTAŞ

Danışman

Prof. Dr. Aziz AVCI

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Kamil CANDAN

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Okan FISTIKOĞLU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, vaktini ve desteğini esirgemeyen, her zorlukta pozitif yaklaşımıyla ve çözüm yollarıyla bana destek verip yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Yusuf KUMLUTAŞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım sürecimde bana her an destek olan ve yol gösteren, yardım istediğimde hiçbir zaman cevapsız bırakmayan değerli hocam Doç. Dr. Kamil CANDAN'a teşekkür ederim.

Hayattaki zorluklara karşı mücadele verirken varlıklarından güç aldığım ve her koşulda yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2022-2577 kodlu BAP projesi ile desteklenmiştir.

Ayşe TEMBELO

TÜRKİYE'DEKİ *Acanthodactylus* CİNSİNDE DNA BARKODLAMA YÖNTEMİ KULLANARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Lacertidae familyasının bir üyesi olan *Acanthodactylus* cinsi 45 tür içermektedir. Bu cinsin *A. boskianus*, *A. schreiberi*, *A. harranensis* ve *A. ilgazi* türleri ülkemizde yaşamaktadır. Bu cinse ait taksonlar arasında karmaşıklık söz konusudur. Bu karmaşıklığın giderilmesi için moleküler belirteçlere dayalı birçok çalışma olmasına rağmen, DNA barkodlama yaklaşımının kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, barkodlama tekniğinin uygulanabilmesi için *sitokrom c oksidaz subunit I (COI)* gen bölgesi tercih edilmiş ve ülkemizde yayılış gösteren *Acanthodactylus* cinsine ait türlerin taksonomik durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Toplamda 4 lokaliteden 22 örnek değerlendirilmiş olup, *COI* gen bölgesinin 594 baz çiftlik kısmı dizisi analiz edilmiştir. Analizlerde yer alan veri setinin toplamda 5 farklı haplotip içerdiği belirlenmiştir. Öncelikle türler arasında doğru bir filogenetik yapılandırma oluşturmak için gen ağacı (*Neighbour-Joining*, *Maximum Likelihood* ve *Bayesian Inference*) analizleri yürütülmüştür. Sonrasında tür ağacı analizleri ile (ABGD, bPTP, mPTP, GMYC ve TCS) ortaya çıkan monofiletik grupların bir türü temsil etme potansiyelleri test edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda elde edilen ağaç topolojilerinde çalışmadaki her bir türün ayrı bir monofiletik grup olarak dallandığı görülmüştür. Tür ağacı analizleri sonucunda ABGD, bPTP ve GMYC analizlerinin her bir monofiletik grubu tür olarak ayırdığı tespit edilmiştir. Diğer açıdan mPTP analizinin çalışma grubunu 2'ye, TCS analizinin ise 5'e ayırdığı gözlenmiştir. Barkod analizi sonuçlarında birbirine en yakın akraba türler *A. boskianus* ve *A. schreiberi*, en uzak türler ise *A. ilgazi* ve *A. schreiberi*'dir. Bu çalışma, herpetofauna açısından ülkemizin biyolojik zenginliklerinden biri olan *Acanthodactylus* türleriyle ilgili doğru bir taksonomik düzenleme için daha detaylı yeni çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acanthodactylus*, DNA barkodlama, moleküler filogenetik, kertenkele

RESEARCH ON GENETIC DIVERSITY OF THE GENUS *Acanthodactylus* IN TURKEY BY USING DNA BARCODING METHOD

ABSTRACT

The genus *Acanthodactylus*, a member of the Lacertidae family, includes 45 species. Of this genus *A. boskianus*, *A. schreiberi*, *A. harranensis* and *A. ilgazi* species live in our country. There is complexity among the taxa of this genus. Although there are many studies based on molecular markers to remove this complexity, there is not study using the DNA barcoding approach. In this study, the cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) gene region was preferred for the application of barcoding technique and it was aimed to determine the taxonomic status of the species belonging to the genus *Acanthodactylus*, which is widespread in our country. In total, 22 samples from 4 localities were evaluated, and the 594 base pair partial sequence of the *COI* gene region was analyzed. It was determined that the data set included in the analyses contains 5 different haplotypes in total. First of all, gene tree (*Neighbour-Joining*, *Maximum Likelihood* and *Bayesian Inference*) analyses were carried out to establish an accurate phylogenetic configuration among species. Afterwards, the potential of the resulting monophyletic groups to represent a species was tested by species delimitation (ABGD, bPTP, mPTP, GMYC and TCS). In the tree topologies obtained as a result of phylogenetic analyses, it was observed that each species in the study branched as a separate monophyletic group. As a result of the species tree analyses, it was found that ABGD, bPTP and GMYC analyses distinguish each monophyletic group as a species. On the other hand, it was observed that mPTP analysis divided the study group into 2 species and TCS analysis divided the study group into 5 species. In the results of barcode analysis, the closest related species are *A. boskianus* and *A. schreiberi*, while the most distant species are *A. ilgazi* and *A. schreiberi*. This study requires more detailed new studies for an accurate taxonomic arrangement of *Acanthodactylus* species, which is one of the biological riches of our country in terms of herpetofauna.

Keywords: *Acanthodactylus*, DNA barcoding, molecular phylogenetics, lizard

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
SEMBOLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
BÖLÜM BİR – GİRİŞ	1
1.1 <i>Acanthodactylus</i> Cinsinin Taksonomik Durumu	1
1.1.2 <i>Acanthodactylus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	4
1.1.3 Türkiye’de Yaşayan <i>Acanthodactylus</i> Türlerinin Korunma Durumları ..	5
1.2 Genetik Barkodlama	6
1.2.1 DNA Barkodlama Nedir?	6
BÖLÜM İKİ - MATERYAL VE METOT	8
2.1 Araştırma Bölgesinin Tanıtımı	8
2.2 Örneklerin Temini	13
2.3 Laboratuvar Çalışması	15
2.3.1 DNA Ekstraksiyonu	16
2.3.1.1 GeneAll DNA Ekstraksiyon Kiti ile DNA İzolasyonu	16
2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	16
2.4 Filogenetik Analizler	17
2.5 <i>Barcode Gap Analysis</i> (Barkod Boşluk Analizi)	19
BÖLÜM ÜÇ – BULGULAR	20

3.1 Genetik uzaklık analizi ile ağaç oluşturulması (<i>Neighbour-Joining</i>).....	20
3.2 Maksimum olasılık analizi ile ağaç oluşturulması (ML)	21
3.3 Bayesian yaklaşımı analizi ile ağaç oluşturulması (BI)	22
3.4 Tür ağacı analizleri (<i>Species Delimitation</i>)	23
3.5 COI gen bölgesinin haplotip <i>network</i> sonucu	24
3.6 <i>Barcode Gap Analysis</i> (Barkod Boşluk Analizi) Sonuçları	25
BÖLÜM DÖRT – SONUÇ VE TARTIŞMA	26
KAYNAKLAR	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 <i>Acanthodactylus</i> cinsinin moleküler belirteçlere dayalı gerçekleştirilen yapılandırması ve soy hatlarının dağılışı	2
Şekil 1.2 <i>Acanthodactylus harranensis</i> a) Başın üstten görünümü b) Başın sağ yandan görünümü c) başın alttan görünümü d) Ayak parmakta bulunan tarak yapısı	4
Şekil 2.1 <i>Acanthodactylus boskianus</i>	9
Şekil 2.2 <i>Acanthodactylus boskianus</i> türünün habitata	10
Şekil 2.3 <i>Acanthodactylus schreiberi</i>	10
Şekil 2.4 <i>Acanthodactylus schreiberi</i> türünün habitata	11
Şekil 2.5 <i>Acanthodactylus harranensis</i>	11
Şekil 2.6 <i>Acanthodactylus harranensis</i> türünün habitata	12
Şekil 2.7 <i>Acanthodactylus ilgazi</i>	12
Şekil 2.8 <i>Acanthodactylus ilgazi</i> türünün habitata	13
Şekil 2.9 Çalışma kapsamında kullanılan popülasyonların lokaliteleri (1: <i>A. schreiberi</i> ; 2: <i>A. boskianus</i> ; 3: <i>A. harranensis</i> ; 4: <i>A. ilgazi</i>)	15
Şekil 3.1 NJ analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç	21
Şekil 3.2 ML analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç	22
Şekil 3.3 BI analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç	23
Şekil 3.4 COI geni kullanılarak oluşturulan haplotip network	24

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Tez çalışmasında kullanılan örneklere ait lokalite bilgileri ve moleküler analizlerdeki kodları	14
Tablo 2.2 COI gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler	17
Tablo 3.1 Türler arası genetik uzaklık değerleri	20
Tablo 3.2 Çalışılan türlerin COI gen bölgesindeki K2P mesafeleri	25



SEMBOLLER LİSTESİ

% : Yüzde sembolü

°C : Celsius ölçeği

MgCl₂ : Magnezyum klorür

dNTP : Dinükleotittrifosfat

H_d : Haplotip çeşitlilik oranı



KISALTMALAR

BI	: Bayesian Inference (Bayesian Yaklaşımı)
BIN	: Barkod Dizin Numarası
BOLD	: Barcode Gap Analysis (Barkod Boşluk Analizi)
COI	: Sitokrom c oksidaz alt ünite I
CR	: Critically (Kritik Derecede Tehlike Altında)
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNN	: En Yakın Akrabaya Olan Genetik Uzaklık
Dk	: Dakika
EN	: Endangered (Tehlike Altında)
G	: Gram
IUCN	: International Union for Conservation (Dünya Doğayı Koruma Birliği)
K2P	: Kimura-2-Parametresi
LC	: Least Concern (Düşük Endişe)
Max.	: Maksimum değer
Min.	: Minimum değer
ML	: Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık Analizi)
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribo nükleik asit
NJ	: Neighbour-Joining
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
Sn	: Saniye
TBE	: Tris:Boris:EDTA
µl	: Mikrolitre

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

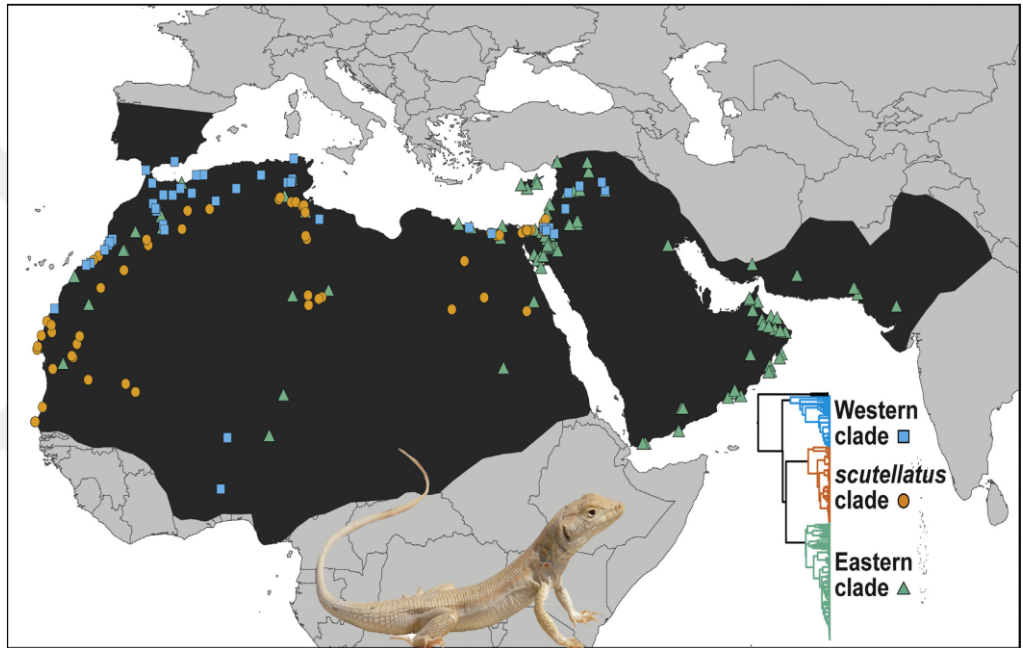
1.1 *Acanthodactylus* Cinsinin Taksonomik Durumu

Saçak parmaklı kertenkeleler olarak bilinen *Acanthodactylus* cinsi Lacertidae familyasında yer almakta olup, tür çeşitliliği bakımından sahip olduğu 45 tür ile oldukça zengin bir gruptur (Uetz vd, 2023). Yayılış sahası detaylı olarak incelendiğinde İber Yarımadası'ndan Kuzey Afrika ve Arap Yarımadası ile Batı Hindistan'a kadar uzandığı görülmektedir (Salvador, 1982; Arnold, 1983; Schleich vd., 1996; Sindaco ve Jeremčenko, 2008). Cins içerisindeki kertenkeleler özellikle kurak ekosistem olmak üzere açık ormanlık alanlar, savan ve kumluk bölgelerde yaşamlarını devam ettirmeye adapte olmuşlardır (Tamar vd., 2016; Uetz vd, 2023; Baran vd, 2021).

Acanthodactylus cinsine ait ilk tür tanımı Daudin (1802) tarafından Santa Domingo Adası'nda "*Lacerta boskiana*" olarak yapılmıştır. Boulenger (1878) cins içerisinde *A. scutellatus*, *A. boskianus*, *A. vulgari*, *A. micropholis*, *A. syriacus*, *A. cantoris*, *A. schreiben*, *A. bedriagai*, *A. tristrami* ve *A. lineomaculatus* isimli on tür listelemiştir.

Acanthodactylus cinsi için yürütülen taksonomik çalışmalar dikkate alındığında grubun karmaşık yapısının ön plana çıktığı ve morfolojik farklılıkların açık bir şekilde ortaya çıkarılmasında birçok zorluğun olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte özellikle bazı türler için tür içi farklılıkların da bulunduğu belirtilmektedir (Salvador, 1982; Arnold, 1983). Söz konusu taksonomik karmaşıklığın başlıca sebepleri arasında morfolojik benzerlikler (Tamar vd., 2014), kompleks mikroevoim ve tür içi varyasyon (Schleich vd., 1996) yer almaktadır. *Acanthodactylus* cinsi üzerine morfolojik belirteçlere dayalı olarak yürütülen çalışmalara göre tür grupları şeklinde bazı soy hatları tanımlanmıştır. Bu morfolojik soylar, Doğu kuşağı olarak kabul gören ve çoğunlukla Güneybatı Asya'da yaşayanlar (*boskianus*, *micropholis*, *grandis*, *cantis* ve *opheodurus*), Batı kuşağı olarak bilinen ve Orta Doğu'da

bulunanlar (*tristrami*) ve Kuzey Afrika kıyıları ve Sahra altı bölgesinde dağılışı gösterenlerden (*erythrurus* ve *pardalis*) oluşmaktadır. Ayrıca Kuzey Afrika'nın kumlu bölgelerinde *scutellatus* olarak tanımlanmış bir soy daha yer almaktadır. Her ne kadar tüm bu morfolojik soy hatları pek çok çalışma ile desteklenmiş olsa da bazı grupların durumu tartışmalıdır (Salvador, 1982; Arnold, 1983; Harris ve Arnold, 2000). Son olarak, *Acanthodactylus* için cins düzeyinde yapılan ilk moleküler filogeni çalışmasında bu taksonun 3 farklı soy hattına ayrıldığı (Doğu, Batı ve *scutellatus*) ortaya konulmuştur (Tamar vd., 2016, Şekil 1.1).



Şekil 1.1 *Acanthodactylus* cinsinin moleküler belirteçlere dayalı gerçekleştirilen yapılandırması ve soy hatlarının dağılışı (Tamar vd., 2016)

Acanthodactylus cinsinin Anadolu'dan ilk kaydı Böhme (1973) tarafından *A. boskianus* (Tarak Parmaklı Kertenkele) olarak Şanlıurfa, Birecik'ten (Fırat Nehri kenarından) toplanan örneklerle yapılan çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. Ülkemiz kertenkeleleri listesine *A. boskianus*'un dahil edildiği bilgisi Başoğlu ve Baran (1977) tarafından da kabul edilmiştir. Yakın zamana kadar ülkemizdeki *Acanthodactylus* cinsinin dağılımının 3 tür (*A. boskianus* Daudin, 1802; *A. schreiberi* Boulenger, 1878; *A. harranensis* Baran, Kumlutaş, Lanza, Sindaco, Ilgaz, Avcı & Crucitti, 2005) ile temsil edildiği bilinmekteydi (Baran vd., 2005; Yalçinkaya ve

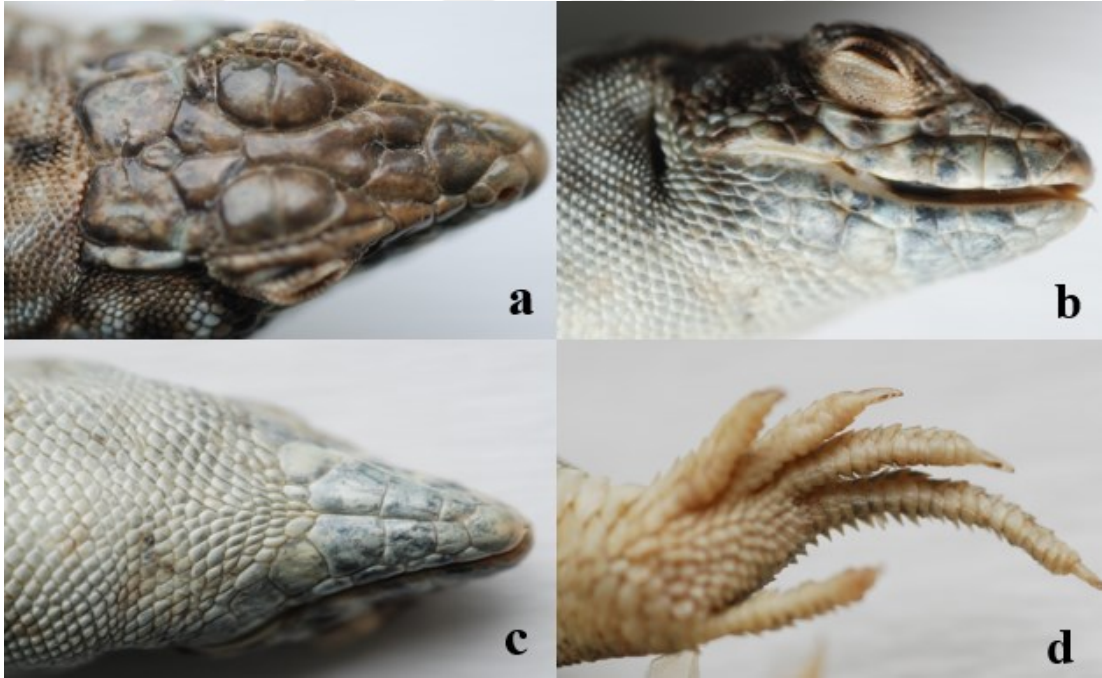
Göçmen, 2012; Kurnaz, 2020; Baran vd., 2021). Bununla birlikte son dönemde gerçekleştirilen bir çalışma ile ülkemizdeki bu cinse ait olan tür sayısı *A. ilgazi* olarak tanımlanan yeni bir tür ile 4'e çıkartılmıştır (Kurnaz ve Şahin, 2021).

Ülkemizin de içinde bulunduğu Lübnan, Suriye, Kuzey Irak'ı içine alan Kuzey Ortadoğu'da bulunan *Acanthodactylus* türleri *boskianus*, *grandis* ve *tristrami* olarak tanımlanan soyları kapsamaktadır (Salvador, 1982; Arnold, 1983; Tamar vd., 2016). Buna bağlı olarak bugüne kadar Türkiye'de bulunan *Acanthodactylus* türleri içerisinde *A. harranensis*'in *grandis*; *A. boskianus* ve *A. schreiberi*'nin *boskianus* ve son tanımlanan tür olan *A. ilgazi*'nin *tristrami* grubunda olduğu öne sürülmektedir (Kurnaz ve Şahin, 2021). *A. boskianus* ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Birecik'te (Şanlıurfa) Fırat nehri boyunca kayıt altına alınmıştır (Böhme, 1973). Aynı cinse ait başka bir tür olan *A. schreiberi* Yukarı Burnaz (Hatay) ve Ceyhan BOTAŞ civarında (Adana) tespit edilmiştir (Franzen, 1998). Daha önceleri Kıbrıs'ta endemik olduğu bilinen bu türün Türkiye'de bulunmasıyla birlikte endemizm durumunda değişikliğe gidilmiştir. Sonraki çalışmalarla İsrail ve Lübnan da yayılış alanına dahil edilerek türün dağılış alanı genişlemiştir (Salvador, 1982; Göçmen vd., 1996). Bir diğer Tarak Parmaklı Kertenkele olan *A. harranensis* ise Harran'da (Şanlıurfa) bulunan Harran harabeleri arasında çok kısıtlı bir alanda kayıt edilmiştir (Baran vd., 2005). Bu tür bugüne kadar ülkemiz için endemik olarak kabul edilse de yeni yayınlanan bir çalışma sonucunda Suriye'de de bulunduğu ortaya konulmaktadır (Mulder, 2021). Bu üç türün ülkemizdeki dağılış alanının Güney ve Güneydoğu Anadolu olarak sınırlandığı görülmektedir. Bu türlere ait kertenkeleler 600 metre rakıma kadar olan yerlerde yaşayabilmektedirler (Baran vd., 2021). Yeni tanımlanan *A. ilgazi*'nin ise, diğer *Acanthodactylus* türlerinin bulundukları lokaliteler dikkate alındığında yaklaşık 250 km kuzeyde bulunan Yazıhan (Malatya)'da yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Kurnaz ve Şahin, 2021).

1.1.2 *Acanthodactylus* Cinsinin Genel Özellikleri

Acanthodactylus isminin anlamı *acantho* = diken *dactylus* = parmak olarak ifade edilip, Türkçe olarak cinse ait türlerde bulunan kertenkelelerin arka ayağın 4. parmağında tarak benzeri art arda sıralanmış çıkıntıların bulunması sebebiyle diken parmaklı ya da tarak parmaklı olarak isimlendirilmektedir (Başoğlu ve Baran, 1977).

Acanthodactylus cinsi üyelerinde Occipital plak mevcut değildir. Parmaklarda üç veya dört dizi pul bulunur. Ventralde (karın bölgesinde) düz plaklar mevcuttur. Collar (yaka) plakları bulunur. Ayak parmakları az ya da çok gelişmiş tarak şekline sahiptir. Femoral por (gözenek) bulunur. Parietal foramen bulunur. Tüm bu özellikler *Acanthodactylus* cinsi üyeleri için geçerlidir (Salvador, 1982). Bu cinse mensup taksonların teşhisi için önemli olan morfolojik özelliklerin durumu Şekil 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.2 *Acanthodactylus harranensis* a) Başın üstten görünümü b) Başın sağ yandan görünümü c) başın alttan görünümü d) Ayak parmakta bulunan tarak yapısı

1.1.3 Türkiye’de Yaşayan *Acanthodactylus* Türlerinin Korunma Durumları

Sürüngeçler ana kara parçalarının tümünün üzerinde bulunmalarına rağmen korunma durumlarına bakıldığında diğer omurgalı gruplarının gerisinde kalmışlardır (Böhm vd., 2013). Dünya üzerindeki sürüngeç türlerinin sadece %40’ı Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (*International Union for the Conservation of Nature - IUCN*) tarafından kategorilendirilen ve değerlendirilen korunma statülerine sahiptir ve 1500 tür yok olma tehlikesi yaşamaktadır. Bu yok olma tehlikesi yaşayan türlerin büyük bir bölümünü de endemik olanlar teşkil etmektedir (Böhm vd., 2013; Meiri ve Chapple, 2016). Ele alınan bir çalışmada kertenkelelerle ilgili olarak 6338 mevcut türün yalnızca %36’sının korunma statülerinden herhangi birine sahip olduğu görülmüştür (Meiri ve Chappel, 2016). Gibbons vd., 2000’e göre çevre kirliliği, istilacı türler, habitat kaybı ve bozulması, küresel iklim değişikliği, sürdürülemez kullanım ve hastalık günümüzde yeryüzünde yaşayan sürüngeç türlerine karşı ortaya çıkan başlıca tehditlerdir.

Ülkemizde yayılış gösteren *Acanthodactylus* türleri dar bir yayılış sahasında yer almaktadır. Bu türlerden *A. harranensis* tek bir lokaliteden, Harran (Şanlıurfa) bilinmekte olup IUCN kırmızı liste kategorisinden Kritik Tehlike Altında (*Critically Endangered-CR*) yer almaktadır. Bu durum diğer türlere göre bu türü daha hassas bir hale getirmektedir. Son yıllara kadar *A. harranensis* ülkemiz için endemik ve koruma altında olarak kabul görmekteydi fakat yeni yapılan bir çalışma bu türün ülkemiz sınırları dışında Suriye’de de bulunma durumunu ortaya çıkardı (Mulder, 2021). Bu endemizm durumunun değişmesi *A. harranensis* için korunma altında bulunma açısından değişiklik göstermemesi gerekmektedir. *A. schreiberi* ülkemizde Yukarı Burnaz (Hatay) ve Ceyhan BOTAŞ (Adana) civarında dağılışı göstermektedir. IUCN kırmızı listesinde ise Tehlike altında (*Endangered-EN*) kategorisinde yer almaktadır (Akman, 2019). Bir diğer tür olan *A. boskianus* ise Düşük Endişe (*Least concern-LC*) kategorisinde bulunmaktadır (IUCN, 2023). Ülkemizdeki *Acanthodactylus* cinsine mensup ve yeni tanımlanmış

takson olan *A. ilgazi* için korunma durumu açısından herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır.

1.2 Genetik Barkodlama

1.2.1 DNA Barkodlama Nedir?

DNA Barkodlama yöntemi türleri tanımlamada ve ayırmada kullanılmaktadır ve yalnızca türlere özgü DNA profillerini ortaya çıkarmaya dayanır. DNA barkodlama yöntemi hem tür içi hem de türler arası genetik çeşitliliğin tespitini ortaya koyan bir yöntemdir. Bu yöntem, mitokondriyal DNA’da (mtDNA) bulunan *COI* (*Sitokrom c oksidaz alt ünite I*) genine ait yaklaşık 600-700 baz çifti uzunluğunda olan kısmi dizisinin elde edilmesini gerektirmektedir. Bu DNA fragmanı hızlı, güvenilir ve doğru bir tür tespiti yapmaya yardımcı olmaktadır (Keskin ve Atar, 2013). Türlerle özgü DNA profillerini ortaya koymayı amaçlayan bu yöntem, tür teşhisini kolaylaştırmak için DNA dizisi farklılıklarını bir barkod bölgesi olarak kullanmayı hedeflemektedir. Kuşlar, kelebekler ve balıklar gibi farklı canlı gruplarında tür tespiti boyutu olarak yüksek başarı gösterdiği ortaya konulan *COI* geninin kısmi dizisi, içinde bulunduğumuz son yıllarda sürüngenler için de popüler olan bu alanda yaygın olarak yer almaktadır (Nagy vd., 2012; Chambers ve Hebert, 2016; Hawlitschek vd., 2016; Zangl vd., 2020). *COI* geni, tür içi ile türler arasında çakışma barındırmayan genetik uzaklığın belirgin bir ayırım gücüne sahiptir. Öyle ki, “barkodlama açıklığı” olarak isimlendirilen bu durum türlerin tespitinde barkodlama yönteminin kullanımının temel unsurunu oluşturmaktadır (Meyer ve Paulay, 2005). Geçmiş yıllardan günümüze kadar filogenetik çalışmalarda ve populasyon genetiği çalışmalarında mtDNA tercih edilmiş bir moleküler belirteçtir. Çalışmalarda kullanılmasının başlıca sebepleri arasında mitokondriyal genomda herhangi bir intronun bulunmaması, yüksek seviyede rekombinasyon içermemesi, aynı şekilde bu genom üzerindeki genlerin dizilişinin ve gen içeriğinin yüksek oranda korunması ve her hücre içerisinde çoklu kopya halinde bulunması yer almaktadır (Avise, 2004; Freeland, 2005). Ayrıca, mitokondriyal genomdaki nükleotit yer değiştirmelerinin oranının (mutasyon sıklığı) çekirdek genom ile karşılaştırılması yapıldığında oldukça

hızlı olduğu söylenebilir. Bu durum genomun içerdđđi genlerin korunmuş bir yapısı olmasına rağmen, yüksek mutasyon oranını barındırdığını gösterir (Brown vd., 1979; Meyer, 1993). Böylelikle, hem genlerin korunmuş yapısı omurgasızlardan omurgalılarına kadar faydalı olabilen evrensel primer çiftlerinin ortaya çıkmasına olanak sağlamakta hem de genlerin hızlı evrimleşme oranı günümüze daha yakın olan zaman dilimlerinde çeşitlenen (tür içi veya türler arası) soy hatlarını belirlemeye yönelik çalışmalar için faydalı hale gelmektedir (Brown vd., 1979; Freeland, 2005).

Popölasyon genetiği ve filogenetik çalışmalar göz önüne alındığında sürüngenlerle ilgili olarak *ND4* (*NADH dehidrogenaz altünite-4*), *Cyt-b* (*sitokrom b*) ve *COI* gibi mitokondriyal genomda bulunan ve öteki protein kodlayan genlere göre daha hızlı evrimleşme potansiyeli olan dizilerin geniş çaplı kullanıldığı görölmektedir. Bundan dolayı, bu bahsedilen gen bölgeleri yakın türler arasındaki akrabalık ilişkileri araştırmalarında (Kapli vd., 2012; Poulakakis vd., 2013) ya da tür içi filogenetik çalışmalarda (Kyriazi vd., 2008) yararlı moleküler belirteçlerdir (Starkey vd., 2003; Spinks ve Shaffer, 2005). *COI* geni fazlaca varyatif özellikte olmasından dolayı bir yandan sürüngen filogenisi çalışmalarda (Kyriazi vd., 2008; Kapli vd., 2012; Kornilios vd., 2013; Candan vd., 2021) kullanılmakta diğer yandan “DNA Barkodlama” çalışmalarının ana moleküler belirteci konumunda bulunmaktadır (Nagy vd., 2012).

Bu çalışmanın amacı, ölkemiz biyoçeşitliliğinin önemli bir parçası konumundaki *Acanthodactylus* taksonlarının geçerliliğinin ortaya konulması, ölkemizdeki dağılışıının net bir şekilde ortaya çıkarılması ve filogenetik ilişkilerinin saptanmasıdır.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL VE METOT

2.1 Araştırma Bölgesinin Tanıtımı

Acanthodactylus cinsi kertenkeleleri Türkiye'nin güneydoğusu ve doğusunda yayılış göstermektedir. Bu cinsin türlerinden *Acanthodactylus boskianus* ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Birecik'te (Şanlıurfa) Fırat nehri boyunca kayıt altına alınmıştır (Böhme, 1973). Şanlıurfa iline bağlı Birecik ilçesi Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin Orta Fırat Bölümünde ve nehir kıyısında bir ilçedir. Birecik ilçesi Doğudan Arat ve Babadağları, Güneydoğu yönünden Suruç sınırında bulunan Beko Dağları ve Kuzeybatı yönünden Kalazan Dağı ile çevrelenmiştir. Kara ve nehir ticaretinde bu yöre önemli bir noktadadır (Wikipedia, 2023). Aynı cinse ait başka bir tür olan *A. schreiberi* Hatay'ın Yukarı Burnaz ve Adana'nın Ceyhan BOTAŞ civarında tespit edilmiştir (Franzen, 1998). Yukarı Burnaz Hatay'nın Erzin ilçesine bağlı olup Erzin köyleri mevkiinde yer almaktadır. Bu mevki Erzin ilçe merkezine yaklaşık 13 km, il merkezine ise yaklaşık 83 km uzaklıkta bulunmaktadır (HaritaTR, 2023). Bir diğer Tarak Parmaklı Kertenkele *A. harranensis* ise Harran (Şanlıurfa)'da eski üniversite civarında bulunan harabelerde çok kısıtlı bir alana dağılmıştır (Baran vd., 2005). Harran Harabeleri Harran Ovası içerisinde yer alan Harran ilçe merkezinde bulunmakta olup, bu ilçe merkezi içerisindeki antik kent kalıntılarını ve yakın çevresinde bulunan mera alanlarını kapsamaktadır. Harran Ovası Dünyanın ilk uygarlıklarına ve ilk üniversitesine ev sahipliği yaptığı için arkeolojik açıdan büyük bir öneme sahiptir. *A. harranensis*'in yaşam alanı olan bu bölge düz ve kayalık ova bozkırını barındırmaktadır. Seyrek bitkilerin bulunduğu alanda kumluk ve taşlık kesimler vardır. Türün yuvaları bu alanda baskın bir bitki türü olan üzerlik (*Potamogeton sp.*) diplerinde bulunmaktadır (Lise, 2023). Bu üç türe bakıldığında ortak özellikleri Anadolu'da Güney ve Güneydoğu'da bulunuyor olmalarıdır ve bu üç türe ait kertenkeleler 600 metre yüksekliğe kadar olan yerlerde yaşayabilmektedirler (Baran vd., 2021). Ülkemizde Doğu Anadolu Bölgesi'nde yaşayan bir diğer tür *A. ilgazi*'nin ise diğer *Acanthodactylus* cinslerinin dağılışı

alanlarına göre 250 km uzakta olan Yazıhan (Malatya)'da yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Kurnaz ve Şahin, 2021). Malatya iline bağlı bir ilçe olan Yazıhan il merkezine 40 km uzaklıkta olup yaklaşık 900 rakımdadır. Yazıhan'ın doğusunda Elazığ il sınırı ve Kuruçay (Fırat Nehri'nin kolu), batısında ise Hekimhan yer almaktadır. Yine Yazıhan'ın güneyinde Malatya il merkezi ile Akçadağ yer alırken kuzeyinde Arguvan-Hekimhan vardır. İlçe yeryüzü şekli olarak güneyden kuzeye doğru eğim göstermektedir. Kuzey bölümünde vadiler ve dağlar arazinin yarısını oluşturmaktadır (Wikipedia, 2023).



Şekil 2.1 *Acanthodactylus boskianus* (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.2 *Acanthodactylus boskianus* türünün habitatı (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.3 *Acanthodactylus schreiberi* (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.4 *Acanthodactylus schreiberi* türünün habitatı (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.5 *Acanthodactylus harranensis* (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.6 *Acanthodactylus harranensis* türünün habitatı (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.7 *Acanthodactylus ilgazi* (Foto: Yusuf Kumlutaş)



Şekil 2.8 *Acanthodactylus ilgazi* türünün habitata (Foto: Yusuf Kumlutaş)

2.2 Örneklerin Temini

Ülkemizde 4 tür ile temsil edilen *Acanthodactylus* cinsi kertenkelelerinden *A. boskianus*, *A. schreiberi* ve *A. harranensis* türleri IUCN (Uluslararası Dünya Koruma Birliği) tarafından sırasıyla Düşük Endişe (LC), Tehlike altında (EN) ve Kritik Tehlike Altında (CR) korunma kategorileri altında değerlendirilmektedirler (IUCN, 2023). Bu çalışmanın yapılabilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 02.06.2021 tarihli toplantıda görüşülerek karar verilen 33/2021 numaralı Etik Kurul Belgesi alınmıştır. Bununla birlikte T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesindeki Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nce de çalışmanın yapılabilmesi için gerekli başvuru 16.07.2021 tarihli onay ile uygun görülmüştür.

Çalışmayı oluşturan *A. boskianus*'a ait kertenkele örnekleri Yurtbağı-Karkamış (Şanlıurfa)'dan, *A. ilgazi*'ye ait kertenkele örnekleri ise Boztepe-Yazıhan (Malatya)'dan temin edilmiştir. Bu bölgelerde 18-23 Mayıs 2022 tarihinde ve hayvanların aktif olduğu saatlerde yürütülen arazi çalışmaları ile örnekler elle canlı yakalanarak bez torbalara konulmuştur. Bununla birlikte arazi çalışmaları sırasında

A. schreiberi ve *A. harranensis* türlerine ait herhangi bir kertenkele örneği tespit edilememiştir. Bu sebeple söz konusu türler açısından değerlendirme yapılabilmesi için geçmiş yıllarda farklı projeler kapsamında toplanan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde hayvan koleksiyonu olarak saklanan kertenkele örnekleri kullanılmıştır. Böylece bu tez çalışması kapsamında toplamda 22 örnek değerlendirilmiş olup, bu örneklerle ait lokalite bilgileri Tablo 2.1 ve Şekil 2.9'da verilmiştir.

Tablo 2.1 Tez çalışmasında kullanılan örneklerle ait lokalite bilgileri ve moleküler analizlerdeki kodları

Türler	Lokalite	DNA Kodu	Toplayan	Toplanma Tarihi
<i>A. boskianus</i>	Yurtbağı, Karkamış, Şanlıurfa	Abos15	Yusuf Kumlutaş, Kamil Candan	19.05.2022
		Abos17		
		Abos18		
		Abos19		
		Abos20		
		Abos21		
<i>A. schreiberi</i>	Aşağıburnaz, Erzin, Hatay	Asch1	Yusuf Kumlutaş, Çetin Ilgaz, Kamil Candan	05.05.2016
		Asch2		
		Asch3		
		Asch4		
		Asch6		
		Asch7		
		Asch8		
<i>A. harranensis</i>	Harran, Şanlıurfa	Ahar8	Yusuf Kumlutaş, Çetin Ilgaz, Kamil Candan	02.05.2016
		Ahar11		
		Ahar12		
		Ahar13		
<i>A. ilgazi</i>	Boztepe, Yazıhan, Malatya	Ailg9	Yusuf Kumlutaş, Kamil Candan	22.05.2022
		Ailg10		
		Ailg11		
		Ailg12		
		Ailg13		



Şekil 2.9 Çalışma kapsamında kullanılan popülasyonların lokaliteleri (1: *A. schreiberi*; 2: *A. boskianus*; 3: *A. harranensis*; 4: *A. ilgazi*)

Tüm bu örneklerden elde edilen genetik belirteç dizisi, tür gruplarının sınırlarının çizilmesi ve evrimsel akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla moleküler çalışmalar kapsamında kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle istenilen veri setinin oluşturulması için laboratuvar çalışmaları yürütülmüş sonra elde edilen DNA dizilerinin kullanıldığı soyağaçları oluşturulmuş ve barkodlama tekniği uygulanmıştır.

2.3 Laboratuvar Çalışması

Tez çalışmasının moleküler basamağının gerçekleştirilebilmesi için hem daha önceden yakalanan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde saklanan hem de arazi çalışması sonucunda elde edilen örnekler kullanılmıştır. Her bir örneğe ait kuyruk dokusu temin edilerek %96'lık alkol içine konulmuş ve -20 °C'deki derin dondurucuda saklanmıştır. Alınan doku örneklerinin hayvan ile ilişkilendirilebilmesi için her bir numuneye bir kod verilmiştir.

2.3.1 DNA Ekstraksiyonu

Moleküler çalışmaların ilk basamağında DNA ekstraksiyonu için her bir doku örneği steril bisturi ile mekanik olarak parçalanarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır. Bu mekanik parçalamalarla küçülmüş dokulardan GeneAll DNA izolasyonu kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.3.1.1 GeneAll DNA Ekstraksiyon Kiti ile DNA İzolasyonu

- Mekanik olarak küçük parçalara ayrılmış dokuların her birine 200 µl Buffer CL eklenerek vortekslenmiştir.
- Her bir örneğe 20 µl Proteinase K eklenerek vortekslenmiştir. Sonrasında 56 °C'de 900 rpm çalkalanma hızıyla 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonrası örneklerin her birine 200 µl Buffer BL eklenerek vortekslenmiştir. Sonrasında 70 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
- Her bir örneğe 200 µl etanol eklenerek vortekslenmiştir.
- Ependorf tüp içindeki örnekler spin kolona aktarılarak 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Her bir örneğe 600 µl Buffer BW eklenerek 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Her bir örneğe 700 µl Buffer TW eklenerek 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Son olarak 13000 g hızda 1 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon yeni bir ependorf tüp içine konulmuştur.
- Her bir örnek için 100 µl Buffer AE eklenerek 13000 g'de 1 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA numuneleri için içinde bulundukları tüpler isimlendirilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışma kapsamında mitokondriyal genomda bulunan sitokrom oksidaz subunit I (*COI*) geninin moleküler belirteç olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu gen

bölgesine ait DNA dizisinin elde edilebilmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiş ve oluşturulan PCR ürünleri dizileme analizinde kullanılmıştır. *COI* gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler Tablo 2.2’ de verilmiştir.

Tablo 2.2 *COI* gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler

Primer Kodu	Primer Dizisi (5'-...-3')	Kaynak
RepCOI-F	tntmtcaacnaaccacaaaga	Nagy vd., 2012
RepCOI-R	acttctgggtgkccaaaraatca	

Her bir örnek için kullanılan reaksiyon karışımı ortalama olarak 2 µl kalıp DNA, 2,5 µl PCR tampon, 1,5 µl MgCl₂, 2 µl dNTP, 0,5 µl primer, , 0,3 µl Taq DNA polimeraz ve toplam reaksiyon hacmini 25 µl’ ye tamamlayacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun uygulanmış koşulları şu şekildedir: 95°C 5 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C 30 sn denatürasyon, 46°C 45 sn yapışma, 72°C 1 dk uzama ve 72°C 7 dk son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. Bu döngü 30 defa tekrarlanmıştır.

PCR işlemi yapıldıktan sonra oluşan ürünlerin kontrol edilmesi için %2’lik agaroz jel hazırlanmıştır ve elde edilen ürünler jelde yürütülmüştür. DNA örneklerinde ulaşılması amaçlanan gen dizisinin PCR yoluyla çoğaltılma (amplifikasyon) işlemi tamamlandıktan sonra, elde edilen ürünler dizi analizi için özel bir firmaya gönderilmiştir.

2.4 Filogenetik Analizler

MAFFT v7 (Katoh ve Standley, 2013) programı kullanılarak dizi setlerinin hizalanması gerçekleştirilmiştir. Nükleotid sıklığı ve yer değiştirme heterojenitesi hesaplanması için MEGA X (Kumar vd., 2018) programı kullanılmış olup diziler arasında evrimsel uzaklık matrisi belirlenmiştir.

Filogenetik ağaç topolojisini oluşturacak olan analizlerin yapılabilmesi için uygun dış gruplar, çalışma konusunu oluşturan *Acanthodactylus* cinsine ait türler ile yakından ilişkili olan türler göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur. Bu amaçla, *Mesalina guttulata* (ON943683, ON943681), *Mesalina olivieri* (ON943687, MN015083) ve *Ophisops elegans* (MN536543, MN536538) türleri dış grup olarak veri setine eklenmiştir.

DnaSP v6 (Rozas vd., 2017) programı kullanılarak mtDNA gen dizilerinin barındırdığı nükleotid çeşitliliği, insersiyon-delesyon sayıları, haplotip çeşitliliği ve sayısı belirlenmiştir. IQ-TREE programının online versiyonu üzerinden (Trifinopoulos vd., 2016-<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) en uygun baz değişim modeli Maximum Olasılık (ML) için TIM2, Bayesian Yaklaşımı için GTR+I+gamma olarak belirlenmiştir. Filogenetik ağaçları oluşturmak için Neighbour-Joining (NJ), Maximum Olasılık (ML) ve Bayesian Yaklaşımı (BI) , analizleri kullanılmıştır. NJ analizi Mega X (Kumar vd., 2018) programı ile p-distance evrim modeli altında ve bootstrap 1000 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Maksimum Olasılık analizi (ML) IQ-TREE programının online versiyonu üzerinden (Trifinopoulos vd., 2016-<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) bootstrap değeri 10000 olacak şekilde ultrafast algoritması ile gerçekleştirilmiştir. BI analizi ise MrBayes v3.2.6 (Ronquist vd., 2012) programı ile yürütülmüştür. Bu analiz için her bir döngüde 2×10^7 jenerasyon olacak şekilde ve her 100 jenerasyonda bir ağaç topolojisi kayıt edilerek sonuçlar elde edilmiştir.

Tür ağacı analizleri (*species delimitation*) olarak ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) analizi <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html> sitesi üzerinden online olarak yürütülmüştür (Puillandre vd., 2012). PTP (*Poisson Tree Processes*) analizi <https://species.h-its.org/ptp> sitesi üzerinden online olarak yürütülmüştür (Zhang vd., 2013). Bu analizin gerçekleştirilmesi için ML analizi ile elde edilen filogenetik ağaç kullanılmıştır. mPTP (*Multi-rate Poisson Tree Processes*) analizi <https://mptp.hits.org/#/tree> sitesi kullanılarak online olarak yürütülmüştür (Kapli vd., 2017). Bu analizin gerçekleştirilmesi için PTP'ye benzer olarak ML analizi ile elde edilen filogenetik ağaç test edilmiştir. GMYC

(*Generalized Mixed Yule-coalescent analysis*) analizinde kullanılmak üzere bir ultrametrik ağaç oluşturmak için BEAST v1.10.4 (Suchard vd., 2018) programı kullanılmış olup yürütülen analizlerin başarısı Tracer v1.7.1 (Rambaut vd., 2018) programı ile kontrol edilmiştir. Analiz sonuçları LogCombiner v1.10.4 ile bir araya getirilmiştir. Daha sonra birleştirilmiş sonuç dosyasından TreeAnnotator v1.10.4 programı ile son bir ağaç elde edilmiştir. Bu ağaç ile R v4.1.2 (R Core Team, 2021) programında analiz yürütülmüştür (Pons vd., 2006). Haplotipler arasındaki soy akrabalığı TCS v1.2 programı kullanılarak istatistiksel parsimoni algoritması ile bağlantı sınırı %90 olacak şekilde yürütülmüştür (Clement vd., 2000). Tüm bu analizler kullanılarak mevcut türlerin durumları netleştirilmeye çalışılmıştır.

Haplotipler arasındaki soy akrabalığını araştırmak için PopART v1.7 (Leigh ve Bryant, 2015) programı kullanılmıştır.

2.5 Barcode Gap Analysis (Barkod Boşluk Analizi)

Kimura 2 parametresi (K2P) altında barkod bölgesindeki dizi sapmaları (ortalama ve maksimum tür içi çeşitlilik ve en yakın komşu türe minimum genetik uzaklık) BOLD (<https://boldsystems.org/index.php>) barkod veri sistemi üzerinde ‘‘Barkod Boşluk Analizi’’ aracı kullanılarak hesaplanmıştır (Puillandre vd., 2012). Dizi hizalaması için MUSCLE (Edgar, 2004) seçeneği tercih edilmiştir. Tekrar BOLD üzerinde K2P’den yararlanarak neighbour-joining (NJ) metodu ile bir Takson ID ağacı yapılmıştır.

BOLD uygulaması üzerindeki ‘‘BIN Discordance’’ analizi türlere BIN (Barkod Dizin Numarası) atamak için kullanılmıştır. BIN (Ratnasingham ve Hebert 2013), DNA barkodlarını baz alan türler için evrensel olarak bir tanımlayıcıdır.

BÖLÜM ÜÇ

BULGULAR

Çalışma kapsamında toplam 22 örneğe ait *COI* gen bölgesinin 594 baz çiftlik kısmi dizisi kullanılmıştır. *A. harranensis*, *A. boskianus* ve *A. schreiberi* türlerinin her birinin tek bir haplotip ile temsil edildikleri görülmüştür. *A. ilgazi*'de ise 2 haplotip tespit edilmiş olup, haplotip çeşitliliği (H_d) 0,4 olarak bulunmuştur.

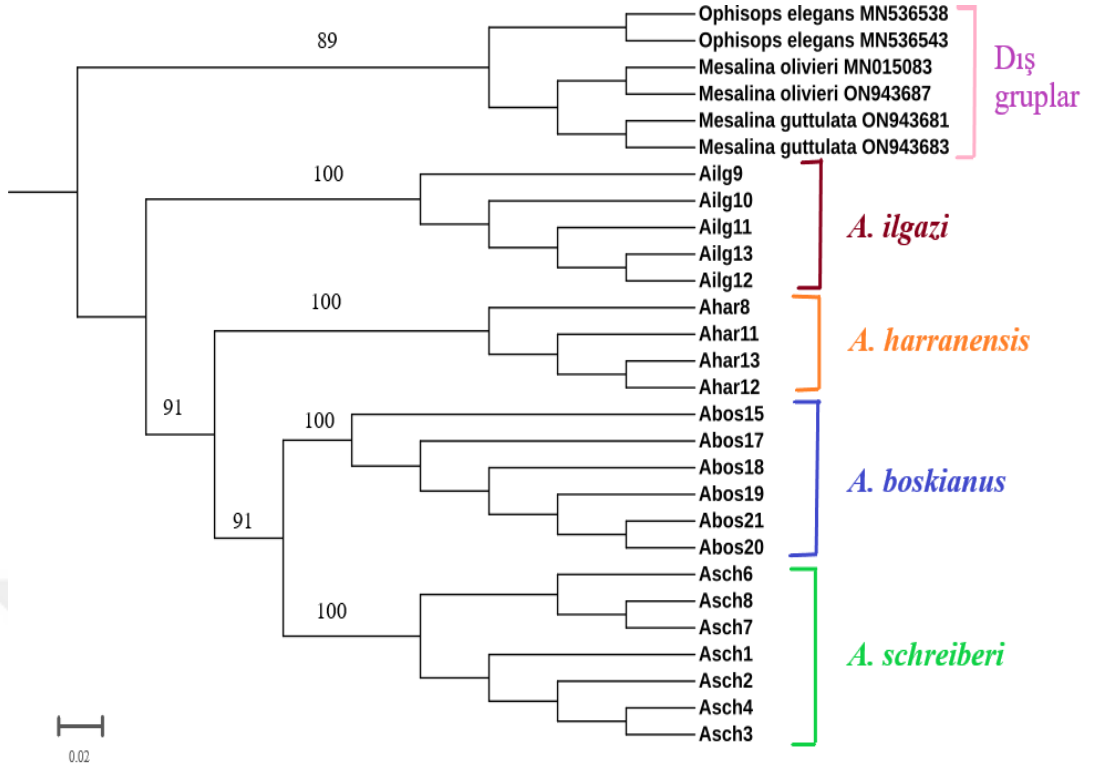
Türler arası genetik uzaklık değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Buna göre genetik olarak birbirine en yakın türlerin *A. schreiberi* ve *A. boskianus* olduğu görülmektedir. *A. harranensis*, *A. schreiberi* ve *A. boskianus* türlerine daha yakinken *A. ilgazi*'ye daha uzaktır. Birbirlerine en uzak türler ise *A. ilgazi* ve *A. harranensis* olarak görülmektedir.

Tablo 3.1 Türler arası genetik uzaklık değerleri

Türler arası genetik uzaklık değerleri			
	1	2	3
<i>Acanthodactylus boskianus</i> (1)			
<i>Acanthodactylus schreiberi</i> (2)	0.121		
<i>Acanthodactylus harranensis</i> (3)	0.163	0.162	
<i>Acanthodactylus ilgazi</i> (4)	0.203	0.191	0.208

3.1 Genetik uzaklık analizi ile ağaç oluşturulması (Neighbour-Joining)

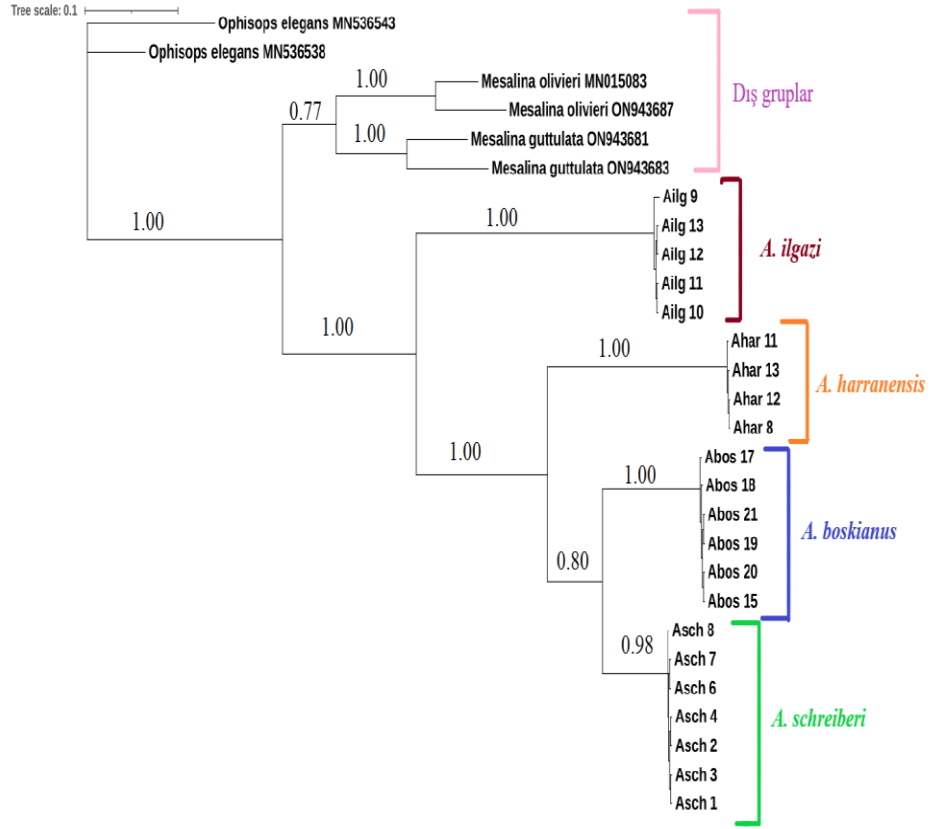
NJ analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 3.1'de verilmiştir. Ortaya çıkan filogenetik ağaca göre *Acanthodactylus* cinsinin 4 ayrı monofiletik soya ayrıldığı görülmektedir. Bu 4 monofiletik soyun ayrılmasında görülen bootstrap değerlerinin her bir tür için 100 olduğu görülmektedir. Bu değerin yüksek olması her bir türün farklı soy olduklarını desteklemektedir.



Şekil 3.1 NJ analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç (Dallar üzerindeki sayılar bootstrap değeridir; 50< değerler şeklinde gösterilmiştir)

3.2 Maksimum olasılık analizi ile ağaç oluşturulması (ML)

ML analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 3.2’de verilmiştir. ML analizi sonucunda *A. ilgazi*, *A. harranensis*, *A. boskianus* ve *A. schreiberi* türlerini içeren soy hatları açık bir şekilde ayrılmıştır. Bu durumu destekleyen bootstrap değerleri her bir türün ayrı soy hatlarına ayrılmasında yüksek değerler içermektedir. Filogenetik ağaca göre *A. schreiberi* ve *A. boskianus* türlerini içeren soy hatları birbirine daha yakinken, *A. ilgazi*’nin soy hattı *A. harranensis*, *A. boskianus* ve *A. schreiberi* türlerinin soy hatlarından daha uzak olduğu görülmektedir.



Şekil 3.3 BI analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaç (Dallar üzerindeki sayılar posterior probability değeridir)

3.4 Tür ağacı analizleri (*Species Delimitation*)

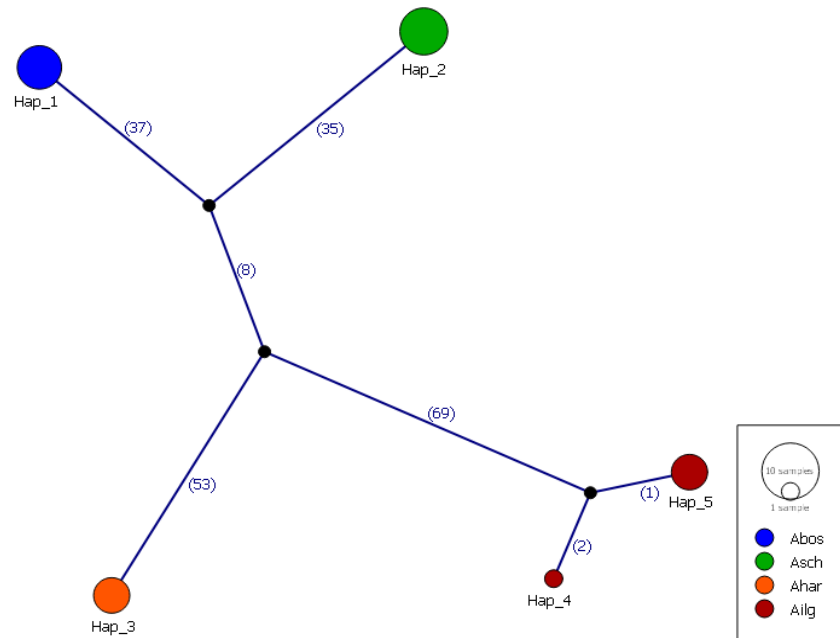
Tez çalışması kapsamında yürütülen tür ağacı analizlerinin sonuçları değerlendirilerek filogenetik ağaçlar üzerinde oluşan her bir dalın bir türü temsil etme potansiyeli ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

PTP analizi sonucunda 4 tür grubu oluşmuştur. İlk tür grubunun *A. ilgazi*'ye ait olduğu ve 2, 3, 4. tür gruplarının ise sırasıyla *A. harranensis*, *A. schreiberi* ve *A. boskianus*'a ait olduğu ortaya konulmuştur. mPTP analizi sonucunda tüm popülasyonlar için 2 tür grubu ortaya çıkmaktadır. 1. tür grubunda *A. boskianus*, *A. schreiberi* ve *A. harranensis* 2. tür grubunda ise *A. ilgazi* yer almaktadır. ABGD analizi sonucunda 4 tür grubu oluşmuştur. İlk tür grubunda *A. boskianus*

bulunmaktadır ve 2, 3, 4. tür gruplarında ise sırasıyla *A. schreiberi*, *A. harranensis* ve *A. ilgazi* olduğu ortaya konulmuştur. GMYC analizi sonucunda 4 tür grubu oluşmuştur. Oluşan tür gruplarında yer alan türler sırasıyla *A. boskianus*, *A. schreiberi*, *A. harranensis* ve *A. ilgazi*'dir. TCS analizi sonucunda türler 5 tür grubuna ayrılmış olup 1. tür grubunda *A. boskianus*, 2. tür grubunda *A. schreiberi*, 3. tür grubunda *A. harranensis* yer alırken 4. ve 5. tür grubunda *A. ilgazi* bulunmaktadır.

3.5 COI gen bölgesinin haplotip network sonucu

Haplotip network analizi sonucunda ülkemizde dağılışı gösteren *Acanthodactylus* cinsi popülasyonlarının toplamda 5 haplotip içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.4). Analiz sonucunda 4 türün de birbirinden ayrıldığı görülmektedir. *A. boskianus* Hap-1' de, *A. schreiberi* Hap-2'de, *A. harranensis* Hap-3'de yer alırken *A. ilgazi*'ye ait Ailg9 DNA kodlu örneğin Hap-4'de, Ailg10, Ailg11, Ailg12, Ailg13 DNA koduna sahip örneklerin Hap-5'de yer aldığı görülmektedir.



Şekil 3.4 COI geni kullanılarak oluşturulan haplotip network (Abos: *A. boskianus*, Asch: *A. schreiberi*, Ahar: *A. harranensis*, Ailg: *A. ilgazi*'ye ait kısaltmaları ve renkleri ifade etmektedir)

3.6 Barcode Gap Analysis (Barkod Boşluk Analizi) Sonuçları

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen türlerin *COI* gen bölgesinin K2P açısından uzaklık değerleri ve barkod numaraları Tablo 3.2’de verilmiştir. Analiz sonucunda ortaya konulan ortalama ve maksimum tür içi çeşitlilik değerleri *A. boskianus*, *A. harranensis* ve *A. schreiberi* için N/A ve 0 iken *A. ilgazi*’nin değerleri 0.5’tir. *A. boskianus*, *A. harranensis*, ve *A. schreiberi* türlerinin barkod dizi sayıları tekil (singleton) durumdayken *A. ilgazi* 2 dizi sayısı bulundurmaktadır. En yakın komşu türler *A. boskianus*, *A. harranensis*, *A. ilgazi* türleri için *A. schreiberi* ve *A. schreiberi* için *A. boskianus* olarak belirlenmiştir. En yakın komşu türe olan minimum genetik uzaklık değerleri en yakın değer olan 13.49 ile *A. boskianus* ve *A. schreiberi* iken en uzak değer 22.04 ile *A. ilgazi* ve *A. schreiberi* türleri arasındadır.

Tablo 3.2 *COI* gen bölgesi için K2P mesafeleri

Tür	BIN	N	Tür içi Ortalama Değer	Tür içi Maksimum Değer	En Yakın Akraba	DNN
<i>A. boskianus</i>	BOLD:AFF3732	1	N/A	0	<i>A. schreiberi</i>	13.49
<i>A. harranensis</i>	BOLD:AFG4693	1	N/A	0	<i>A. schreiberi</i>	18.4
<i>A. schreiberi</i>	BOLD:AFG1514	1	N/A	0	<i>A. boskianus</i>	13.49
<i>A. ilgazi</i>	BOLD:AFF4436	2	0.5	0.5	<i>A. schreiberi</i>	22.04

(BIN: Türler için BOLD tarafından tanımlanan Barkod Dizin Numarası, N: Barkod dizi sayısı, DNN: En yakın akrabaya ortalama genetik uzaklık)

BÖLÜM DÖRT

SONUÇ VE TARTIŞMA

Günümüze kadar *Acanthodactylus* türleri ile ilgili olarak hem morfolojik hem de moleküler belirteçlere dayalı olarak birçok çalışmanın bulunduğu görülmektedir (Salvador, 1982; Arnold, 1983, Tamar vd., 2016, Kurnaz ve Şahin, 2021). Ancak yürütülen bu çalışmalar dikkate alındığında özellikle ülkemizde yayılış gösteren popülasyonlar açısından barkodlama yönteminin kullanıldığı kapsamlı bir genetik çeşitlilik değerlendirmesi mevcut değildir. Özellikle karmaşık taksonomik yapıya sahip sürüngen ve amfibi grupları açısından barkodlama tekniğinin başarılı bir şekilde uygulandığı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Almanya herpetofaunasına mensup türler üzerine yapılan bir çalışmada analize dahil edilen tüm taksonların %100 oranda barkodlanması gerçekleştirilmiştir (Hawlitschek vd, 2016). Bir başka kapsamlı çalışmada, mini barkod primerleri kullanılarak çöl sürüngenleri, kuşlar ve memelilerin durumu değerlendirilmiş ve çalışma kapsamında analiz edilen türler açısından barkodlama tekniğinin başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Öyle ki, bu başarı oranı sürüngenlerde %45,5 olarak tespit edilmiştir (Arif vd, 2011). Bir diğer çalışmada Batı Sahra bölgesindeki sürüngen türleri için DNA barkod referans kitaplığı oluşturulmuş ve çalışma içerisinde *Acanthodactylus* türlerinden *A. aureus*, *A. boskianus*, *A. busacki*, *A. dumerilii*, *A. longipes*, *A. scutellatus* ve *A. taghitensis* kullanılmıştır. Çalışmanın veri setinde kullanılan sürüngenlerin çoğunda örneklerin tanımlanması için *COI*'in güvenilir bir araç olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak çalışma sonuçları arasında *Acanthodactylus* türlerinden *A. boskianus*, *A. longipes* ve *A. taghitensis* 'in gizli (kriptik) genetik çeşitlilik içerdiği tespit edilmiştir (Velo-Antón vd, 2022).

Bu çalışmada ülkemizde dar yayılış gösteren *Acanthodactylus* türlerinin birbirleri arasındaki filogenetik ilişkiler ve mevcut popülasyonların genetik çeşitlilikleri barkod bölgesi olarak yaygın kullanılan bir genetik belirtece (*COI*) dayalı şekilde ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, her bir tür için birer popülasyon olacak şekilde toplamda 4 farklı popülasyondan 22 örnek kullanılmış ve yürütülen gen ağacı analizleri sonucunda ülkemizde yayılış gösteren

Acanthodactylus türlerinin 4 farklı soy hattı ile temsil edildiği gösterilmiştir (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3). Her bir soy hattı yüksek bir bootstrap ve posterior probability değeri ile desteklenmiş olup, *A. boskianus* ve *A. schreiberi* türlerinin birbirleri ile daha yakın oldukları, *A. ilgazi*'nin ise diğerlerin göre daha uzak bir akraba olduğu ortaya konulmuştur. Bu durum söz konusu cinsin ülkemizdeki türlerini de kapsayan ve *A. ilgazi*'nin ilk kez tanımlandığı çalışmada oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi ile uyum göstermektedir (Kurnaz ve Şahin, 2021).

Gerçekleştirilen tür ağacı analizleri dikkate alındığında, bunlar içinden PTP, ABGD ve GMYC analizlerinin mevcut türleri temsil eden her bir monofiletik grubu desteklediği ve çalışma grubunu buna uygun şekilde 4 türe ayırdığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, mPTP analizi çalışmadaki türleri sadece 2 tür grubuna ayırmıştır. Bu gruplardan birinde *A. boskianus*, *A. schreiberi* ve *A. harranensis* birlikte bulunurken *A. ilgazi* ayrı olarak yer almaktadır. Son olarak tür ağacı analizleri kapsamında yürütülen yaklaşımlardan biri olan TCS analizi çalışmadaki türleri 5 gruba ayırmıştır. *A. boskianus*, *A. schreiberi* ve *A. harranensis*'i ayrı olarak destekleyen bu analiz *A. ilgazi*'yi iki ayrı gruba ayırmıştır. Genel olarak gerçekleştirilen tür ağacı analizlerinin mevcut taksonomik yapıyı desteklediği görülmektedir. Ortaya çıkan bazı farklılıklar kabul edilebilir olup, gen ağacı ile tür ağacı analizlerinin birbirleriyle uyuşmadığı durumlar özellikle kertenkele taksonlarında oldukça yaygındır (Arribas vd, 2022). Bununla birlikte barkodlama yönteminin kullanıldığı bir çalışmada da tür ağacı yaklaşımı olarak başvurulmuş bPTP analizinin 422 haplotip içinde sadece 193'ünün geçerli bir tür olabileceğine işaret etmiştir (Cardoso, 2017).

Tez çalışması kapsamında elde edilen 5 haplotip için oluşturulan network analizi sonucunda ülkemizde dağılışı gösteren 4 *Acanthodactylus* türünün birbirinden açık bir şekilde ayrıldığı görülmektedir (Şekil 3.4). Bu bağlamda *A. harranensis*, *A. boskianus* ve *A. schreiberi* türlerinde genetik varyasyon tespit edilmemiştir ve her bir türün tek bir haplotip ile temsil edildiği tespit edilmiştir. Diğerlerinden farklı olarak *A. ilgazi*'de ise polimorfik bir durum söz konusu olup 2 haplotip ile temsil edildiği bulunmuştur (Hd: 0,4).

Barkod Boşluk Analizi (*Barcode Gap Analysis*) sonucunda ortaya konulan ortalama ve maksimum tür içi çeşitlilik değerleri incelendiğinde, tek bir haplotip ile temsil edildikleri için *A. boskianus*, *A. harranensis* ve *A. schreiberi* türlerinde çeşitlilik bulunmazken, *A. ilgazi*'nin çeşitlilik değerleri 0.5 olarak tespit edilmiştir. Bu kapsamda değerlendirildiğinde *A. ilgazi* için 2 farklı barkod dizisi mevcutken, diğer türler açısından tek bir dizi ile temsil edilme durumu söz konusudur. Bu sonuç, ülkemizdeki yayılış gösteren *Acanthodactylus* türlerinin barkodlama yapılabilecek nitelikte bir genetik yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Barkodlama tekniğinin başarılı bir şekilde uygulandığı bir çalışmada, analize dahil edilen taksonlardan sadece birkaçı bu yapıya sahipken genel olarak iki veya daha fazla DNA barkod dizisine sahip olma durumunun olduğu gösterilmiştir (Hawlitschek vd, 2016).

Tez çalışması kapsamında yürütülen barkodlama analizleri neticesinde mevcut türlerin akrabalık durumları dikkate alındığında birbirine en yakın akrabalar *A. boskianus* ve *A. schreiberi* (DNN: 13.49), en uzak olanlar ise *A. ilgazi* ve *A. schreiberi* (DNN: 22.04) olarak bulunmuştur. Sürüngen türleri açısından değerlendirildiğinde, tür içi genetik mesafenin %0 ile %20.7 arasında değişmekte olduğu ileri sürülmüştür (Velo-Antón vd, 2022). Diğer açıdan Batı Sahra bölgesindeki sürüngen türlerinin çeşitliliği, dağılımı, ve korunması ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, en yakın genetik uzaklık (DNN) değerlendirirken örneklerin yalnızca %10'unu tanımlayabildiği ve *COI* barkod bölgesinin buradaki türlerin ayırımında yeterli olmadığı vurgusu yapılmıştır (Cardoso, 2017). Bu çalışma kapsamına elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, ülkemizde yayılış gösteren *Acanthodactylus* türlerinin başarılı bir şekilde genetik barkodlamalarının yapılabildiği anlaşılmaktadır. Böylece söz konusu cinse mensup ve karmaşık yapı sergileyen diğer tür gruplarının da *COI* barkod bölgelerinin değerlendirmeye katılması hem taksonomik pozisyonların doğru bir şekilde oluşturulması hem de ileriye dönük doğru koruma stratejilerinin geliştirilmesi adına katkı sunar nitelikte olacaktır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması sayesinde ülkemizde yayılış gösteren *Acanthodactylus* cinsine ait türlerin barkodlaması gerçekleştirilmiş ve bunlar BOLD

veri tabanına kaydedilmiştir. Böylece bu türlere ait oluşturulan barkod dizileri daha sonra yapılacak çalışmalarda referans diziler olarak kullanılabilir. Bu çalışma ile ülkemiz biyoçeşitliliğinin önemli bir parçası konumunda olan *Acanthodactylus* taksonlarının geçerliliği ortaya konulmaya çalışılmış ve her birinin ayrı bir türü temsil ettiği desteklenerek kabul edilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen tüm sonuçlar *Acanthodactylus* cinsine ait taksonların yapılandırılması ve korumaya yönelik tedbirlerin uygun bir şekilde oluşturulması için yürütülecek sonraki çalışmalara katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Akman, B. (2019). "Distribution and some ecological features of *Acanthodactylus schreiberi* Boulenger, 1878 in Anatolia". *Biological Diversity and Conservation*, 12(2), 1-8.
- Arif, I. A., Khan, H. A., Al Sadoon, M. ve Shobrak, M. (2011). "Limited efficiency of universal mini-barcode primers for DNA amplification from desert reptiles, birds and mammals", *Genet Mol Res*, 10(4), 3559-64.
- Arnold, E. N. (1983). "Osteology, genitalia and the relationships of *Acanthodactylus* (Reptilia: Lacertidae)" Bull. British Mus. (Natural History) Zool. London, 44, pp. 291-339.
- Arribas, O., Candan, K., Kornilos, P., Ayaz, D., Kumlutaş, Y., Gül, S., Yılmaz, C., Caynak, E. Y. ve Ilgaz, Ç. (2022). "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), 001-068.
- Awise, J. C. (2004). "Molecular Markers, Natural History, and Evolution", Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Baran, İ., Kumlutaş, Y., Lanza, B., Sindaco, R., Ilgaz, Ç, Avcı, A. ve Crucitti, P. (2005). "Acanthodactylus harranensis, a new species of lizard from southeastern Turkey (Reptilia: Sauria: Lacertidae)". *Bollettino Museo Regionale di Scienze Naturali Torino*, 23, 323–341.
- Baran, İ., Avcı, A., Kumlutaş, Y., Olgun, K. ve Ilgaz, Ç. (2021). "Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri", Palme yayınevi, Ankara.

Başıoğlu, M. ve Baran, İ. (1977). “Türkiye Sürüngenleri. Kısım I. Kaplumbağa ve Kertenkeleler”, The reptiles of Turkey, Part I, The turtles and lizards, Bornova – İzmir ilker Matbaası, VI, 272 pp.

Birecik. (7 Mayıs 2023). *Wikipedia*. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Birecik>

Boulenger, G. A. (1878). “Sur les especes d'Acanthodactyles des bords de la Mediterranee.” *Bull. Soc. zool. France* 3: 179—197.

BOLD (2023). “Barcode of life data system” <https://boldsystems.org/index.php>

Böhm, M., Collen, B., Baillie, J. E., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., ... ve Mateo, J. A. (2013). The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation*, 157, 372-385.

Böhme, W. (1973). “Erstnachweis zweier Eidechсengattungen für die Türkei. *Bonner Zoologische Beiträge*”, 24, 394-398.

Brown, W. M., George, M. Jr. ve Wilson, A. C. (1979). “Rapid evolution of animal mitochondrial DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76, 1967-1971.

Candan, K., Kornilios, P., Ayaz, D., Kumlutaş, Y., Gül, S., Yıldırım Caynak, E. Ve Ilgaz Ç. (2021). “Cryptic genetic structure within Valentin’s Lizard, *Darevskia valentini* (Boettger, 1892) (Squamata, Lacertidae), with implications for systematics and origins of parthenogenesis”, *Systematics and Biodiversity*, 19(7), DOI: 10.1080/14772000.2021.1909171

Cardoso, M. M. H. (2017). Diversity, distribution and conservation of reptiles in the West Sahara-Sahel.

- Chambers, E. A. ve Hebert, P. D. N. (2016). "Assessing DNA Barcodes for Species Identification in North American Reptiles and Amphibians in Natural History Collections", *PLoS ONE*, 11(4), e0154363
- Clement, M., Posada, D. ve Crandall, K. A. (2000). "TCS: a computer program to estimate gene genealogies", *Mol. Ecol.*, 9, 1657-1660
- Daudin, F. M. (1802). "*Histoire naturelle generale et particuliere des reptiles.*" Dufart, Paris.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Franzen, M. (1998). "Erstnachweis von *Acanthodactylus schreiberi schreiberi* Boulenger, 1879 für die Türkei". *Herpetozoa*, 11, 27-36.
- Freeland, J. R. (2005). "Molecular evolution", John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., Greene, J. L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S. ve Winne, C. T. (2000). "The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians". *Bioscience*, 50 (8), 653-666.
- Göçmen, B., Tok, C. V., Kaya, U. ve Tosunoğlu, M. (1996). "Kuzey Kıbrıs Herpetofaunası hakkında bir ön çalışma raporu", *Turkish J. Zool.*, 20, 161-176.
- Harris, D. J. ve Arnold, E. N. (2000). "Elucidation of the relationships of spiny-footed lizards, *Acanthodactylus* spp. (Reptilia: Lacertidae) using mitochondrial DNA sequence, with comments on their biogeography and evolution." *J. Zool.* 252, 351-362.

Hawltischek, O., Moriniere, J., Dunz, A., Franzen, M., Rödder, D., Glaw, F. Ve Haszprunar, G. (2016). “Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany”, *Molecular Ecology Resources*, 16, 242–253.

IUCN (2023). *IUCN Tehdit Altındaki Türlerin Kırmızı Listesi*. Sürüm 2022-2. <https://www.iucnredlist.org> ISSN 2307-8235

Kapli, P., Botoni, D., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Avcı, A., Rastegar-Pouyani, N., Fathinia, B., Lymberakis, P., Ahmadzadeh, F. ve Poulakakis, N. (2012). “Molecular phylogeny and historical biogeography of the Anatolian lizard *Apathya* (Squamata, Lacertidae)”, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 66, 992-1001.

Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A. ve Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for singlelocus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo, *Bioinformatics*, 33(11), 1630-1638 pp

Katoh, K. ve Standley, D. M. (2013). “MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability”, outlines version 7, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30, 772-780.

Keskin, E. ve Atar, H. H. (2013). DNA barkodlama: Mitokondriyal COI geni kullanılarak moleküler tanımlama. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 1-8.

Kornilios, P., Giokas, S., Lymberakis, P. ve Sindaco, R. (2013). “Phylogenetic position, origin and biogeography of Palearctic and Socotran blind-snakes (Serpentes: Typhlopidae)”, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 68, 35–41.

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.

- Kurnaz, M. (2020). "Species list of Amphibians and Reptiles from Turkey". *Journal of Animal Diversity*, 2(4), 10-32. <http://dx.doi.org/10.29252/JAD.2020.2.4.2>
- Kurnaz, M. ve Şahin, M. K. (2021). "Contribution to the taxonomic knowledge of *Acanthodactylus* (Squamata, Lacertidae): Description of a new lacertid lizard species from Eastern Anatolia, Turkey", *Journal of Wildlife and Biodiversity*, doi: 10.22120/jwb.2021.523523.1214
- Kyriazi, P., Poulakakis, N., Parmakelis, A., Crochet, P. A., Moravec, J., Rastegar Pouyani, N., Tsigenopoulos, C. S., Magoulas, A., Mylonas, M. Ve Lymberakis, P. (2008). "Mitochondrial DNA reveals the genealogical history of the snake-eyed lizards (*Ophisops elegans* and *O. occidentalis*) (Sauria: Lacertidae)", *Mol. Phylogenet. Evol.*, 49, 795–805.
- Leigh, J. W. ve Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Lise, Y. (7 Mayıs 2023). *Harran Harabeleri*. <https://www.dogadernegi.org/harran-harabeleri/>
- Meiri, S. ve Chapple, D. G. (2016). "Biases in the Current Knowledge of Threat Status in Lizards and Bridging the "Assessment Gap". *Biological Conservation*, 204: 6-7.
- Meyer, A. (1993). "Evolution of mitochondrial DNA of fishes, Biochemistry and molecular biology of fishes", *P.W. Hochachka, P. Mommsen, Elsevier Press*. pp. 1–38. Amsterdam.
- Meyer C. P. ve Paulay G. (2005). "DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling", *PLoS Biology*, 3(12), 2229-2238.

- Mulder, J. (2021). "Note on the Endemic Status of Harran Fringe-fingered Lizard, *Acanthodactylus harranensis* Baran, Kumlutaş, Lanza, Sindaco, Ilgaz, Avcı, & Crucitti, 2005", *Commagene Journal of Biology*, 5(1).
- Nagy, Z. T., Sonet, G., Glaw, F. ve Vences, M. (2012). "First Large-Scale DNA Barcoding Assessment of Reptiles in the Biodiversity Hotspot of Madagascar, Based on Newly Designed COI Primers", *PLOS ONE* 7(3), e34506.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D. ve Vogler, A. P. (2006). "Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects", *Syst. Biol.*, 55, 595–609.
- Poulakakis, N., Kapli, P., Kardamaki, A., Skourtanioti, E., Gocmen, B., Ilgaz, C., Kumlutaş, Y., Avcı, A. ve Lymberakis, P. (2013). "Comparative phylogeography of six herpetofauna species in Cyprus: late Miocene to Pleistocene colonization routes", *Biological Journal of Linnean Society*, 108, 619-635.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. ve Achaz, G. (2012). "ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation", *Molecular Ecology* 21(8): 1864–1877.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL:<https://www.Rproject.org/>
- Ratnasingham, S. ve Hebert, P. D. N. (2013). "A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) System". *PLoS ONE*, 8, e66213
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. ve Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7, *Systematic Biology*, syy032.

- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. I., Darling, A., Hohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. ve Huelsenbeck, J. P. (2012). “MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space”, *Syst. Biol.*, 61(3), 539-542 pp.
- 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 Datasets”, *Mol. Biol. Evol.*, 34, 3299-3302 pp.
- Salvador, A. (1982). “*A Revision of the Lizards of the Genus Acanthodactylus*. Zoolog. Forschungsinst. u. Museum Alexander Koenig.
- Schleich, H. H., Kästle, W. ve Kabisch, K. (1996). “Amphibians and Reptiles of North Africa”. Koeltz, Koenigstein.
- Sindaco, R. ve Jeremcenko, V. K. (2008). “The reptiles of the Western Palearctic. 1. Annotated check list and distributional atlas of the turtles, crocodiles, amphisbaenians and lizards of Europe, North Africa, Middle East and Central Asia”. *Monografiedella Societas Herpetologica Italica*, Edizioni Belvedere, Latina.
- Spinks, P. Q. ve Shaffer, H. B. (2005). “Range-wide molecular analysis of the western pond turtle (*Emys marmorata*): cryptic variation, isolation by distance, and their conservation implications”, *Molecular Ecology*, 14, 2047-2064.
- Starkey, D. E., Shaffer, H. B., Burke, R. L., Forstner, M. R. J., Iverson, J. B. Ve Jansen, F. J. (2003). “Molecular systematics, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex”, *Evolution*, 57, 119–128.

- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J. ve Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10, *Virus Evolution*, 4, vey016.
- Tamar, K., Carranza, S., Sindaco, R., Moravec, J. ve Meiri, S. (2014). “Systematics and phylogeography of *Acanthodactylus schreiberi* and its relationships with *Acanthodactylus boskianus* (Reptilia: Squamata: Lacertidae)”. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1-20.
- Tamar, K., Carranza, S., Sindaco, R., Moravec, J., Trape, J. F. ve Meiri, S. (2016). “Out of Africa: Phylogeny and biogeography of the widespread genus *Acanthodactylus* (Reptilia: Lacertidae)”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 103, 6–18, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.003>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., Von Haeseler, A. ve Minh, B. Q. (2016). “IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis”, *Nucl. Acids Res.*, 44(W1), 232-235 pp.
- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Reyes, F. ve Hošek, J. (2023). The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>
- Velo-Antón, G., Henrique, M., Liz, A.V., Martínez-Freiría, F., Pleguezuelos, J. M., Geniez, P., Crochet, P. ve Brito, J. C. (2022). “DNA barcode reference library for the West Sahara-Sahel reptiles”. *Sci Data* 9(459). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01582-1>
- Wiegmann, A. F. A. (1969). *Herpetologia mexicana* (No. 23). Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Yalçinkaya, D., ve Göçmen, B. (2012). “A new subspecies from Anatolia, *Acanthodactylus schreiberi* Boulenger, 1879 *ataturi* n. ssp. (Squamata: Lacertidae)”. *Biharean Biologist*, 6(1), 19-31.
- Yazıhan. (7 Mayıs 2023). *Wikipedia*. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Yaz%C4%B1han>

Yukarıburnaz Haritası, (7 Mayıs 2023). Harita TR
<https://www.haritatr.com/yukariburnaz-haritasi-m50c0>

Zangl L., Daill D., Schweiger S., Gassner G. ve Koblmüller S. (2020). “A reference DNA barcode library for Austrian amphibians and reptiles”, *PLoS ONE* 15(3), e0229353.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. ve Stamatakis, A. (2013). “A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements”, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(22), 2869-2876.3