



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



Doktora Tezi

**TÜRKİYE DENİZLERİ'NDE YAŞAYAN MUTUR'LARIN *Phocoena
phocoena* (LINNAEUS, 1758) GENETİK YAPILARININ
İNCELENMESİ**

Begüm UZUN

Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı

Deniz Biyolojisi Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bayram ÖZTÜRK**

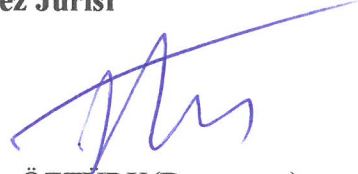
**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim Raşit BİLGİN**

Ocak, 2020

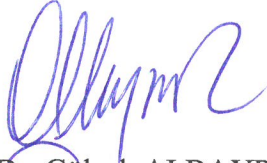
İSTANBUL

Bu çalışma, 27.01.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı, Deniz Biyolojisi Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

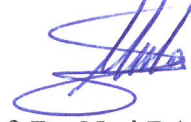
Tez Jürisi



Prof. Dr. Bayram ÖZTÜRK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nuri BAŞUSTA
Fırat Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Ertuğ DÜZGÜNEŞ
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi



Doç. Dr. Mehmet Arda TONAY
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 51782 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 114Y568 numaralı TÜBİTAK 1001 – Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu doktora tezi süreci boyunca desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Bayram ÖZTÜRK'e, ikinci danışmanım Prof. Dr. İbrahim Raşit BİLGİN'e, her süreçte destek olan ve tüm sorularıma yanıt arayan Doç. Dr. Mehmet Arda TONAY'a, Dr. Ayaka A. ÖZTÜRK'e ve Doç. Dr. Ayhan DEDE'ye teşekkür ederim.

Benden hayatın ve bu tezin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY'a çok teşekkür ederim.

Deniz Biyolojisi laboratuvar üyeleri Esin YÜKSEL ve Onur DOĞAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca örneklerin toplanması için senelerdir emek sarf eden tekrar Arda, Ayhan ve Ayaka hocalarıma, Vet. Hek. Dr. Erdem DANYER, Vet. Hek. Işıl AYTEMİZ DANYER'e ve tüm gönüllülere özellikle teşekkür ederim.

Tez sürecinde her kritik zamanda yardıma koşan Doç. Dr. Onur GÖNÜLAL'a, tezin önemli kısımlarını düzenleyen Elanur YILMAZ'a, her zaman destek veren Suna TÜZÜN'e, her saat her sorumu yanıtlayan Talya AKAR'a, arkadaştan öte desteği için Ece SÖNMEZ'e teşekkür ederim. Tanıştığımız günden beri kendimin en iyi versiyonu olmam için çabalayan sevgili Sevcan KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Kelimelerle ifade edemeyeceğim destekleri ile buraya geldiğim annem Hatice Ayla UZUN'a ve babam Sami UZUN'a minnettarım.

Çalışmamı 51782 proje numarası ile destekleyen İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne ve 114Y568 proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK 1001 – Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı'na teşekkür ederim.

Ocak 2020

Begüm UZUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1 MUTUR, <i>PHOCOENA PHOCOENA</i> (LİNNAEUS, 1758)	4
2.1.1 Sistematik Bilgisi	4
2.1.2 Fiziksel Özellikleri	4
2.1.3 Beslenmesi	5
2.1.4 Habitat ve Ekoloji Bilgileri.....	5
2.1.5 Yaşam ve Dağılım Alanları	5
2.2 KARADENİZ MUTUR POPÜLASYONU, <i>PHOCOENA PHOCOENA RELICTA</i> ABEL, 1905.....	8
2.3 KARADENİZ MUTUR POPÜLASYONU ÜZERİNE YAPILAN GENETİK ÇALIŞMALAR	9
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1 ÖRNEKLEME.....	15
3.2 LABORATUVAR ANALİZLERİ	15
3.2.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA) Laboratuvar Analizi	15
3.2.1.1 DNA İzolasyonu	15
3.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile mtDNA D-halka bölgesinin çoğaltılması	17
3.2.1.3 DNA Dizilemesi	19
3.2.2 Çift Enzim RAD dizileme (ddRAD) Laboratuvar Analizi	19
3.2.2.1 DNA İzolasyonu	19
3.2.2.2 Genomik DNA'nın iki yerden enzimle kesilmesi.....	20

3.2.2.3 Illumina Adaptörlerinin Bağlanması	21
3.2.2.4 Jel Elektroforezi ve Boyut seçimi	22
3.2.2.5 Illumina dizileme kütüphanesini oluşturmak için boyut seçimi yapılan bölgenin PZR Çoğaltımı	24
3.2.2.6 PZR ürünlerinin manyetik boncuklar ile saflaştırılması	25
3.3 VERİ ANALİZLERİ	27
3.3.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA) Verilerinin İstatistiksel Analizi	27
3.3.2 Çift Enzim RAD dizileme (ddRAD) Verilerinin İstatistiksel Analizi	31
4. BULGULAR	36
4.1 MİTOKONDRIYAL (MTDNA) DİZİLEME SONUÇLARI	36
4.1.1 Ortaya Çıkarılan Haplotiplerin Dağılımı	36
4.1.2 Oluşturulan Ağ Örgüsü	40
4.1.3 Φ_{st} sonuçları	41
4.1.4 Haplotip ve Nükleotid Çeşitliliği	42
4.2 ÇİFT ENZİM RAD (DDRAD) DİZİLEME SONUÇLARI	42
4.2.1 İstatistiksel ve Taksonomik Analizler	42
4.2.1.1 <i>Fst</i> Sonuçları	42
4.2.1.2 Filogenetik Ağaç Analizi Sonuçları	52
4.2.1.3 Structure Analizi	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR	61
EKLER	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Mutur.....	5
Şekil 2.2: Mutur Dağılım Haritası (Hammond ve diğ., 2008; © IUCN).....	6
Şekil 2.3: Muturun (<i>Phocoena phocoena</i>) dağılımı; farklı alt türler farklı renklerle belirtilmiştir (Fontaine, 2016).....	7
Şekil 2.4: Türk Boğazlar Sistemi (TBS) derinlik haritası.....	12
Şekil 3.1: DNA izolasyonu yapılan mutur DNA'larının NanoDrop sonucundan bir örnek.....	16
Şekil 3.2: PZR sonucu çoğaltılan mutur türüne ait mtDNA D-halka bölgesine ait 507 bçlık ürünlerin agaroz jelde görüntüsü (100bç: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100- 1000bç).....	18
Şekil 3.3: mtDNA dizisi elde edilen mutur bireylerinin örneklenme mevkileri.....	19
Şekil 3.4: Jelden kesilen DNA'ların ultrapure agaroz jelde görüntüsü.....	23
Şekil 3.5: DNA'ların Qiagen MinElute Gel Extraction Kit ile temizlenme aşaması; DNA üzerine eklenen Buffer PB'yi gösteren adım.....	23
Şekil 3.6: Qubit'te ölçülen konsantrasyon sonucu.....	25
Şekil 3.7: a) Çalışan bir mutur DNA'sını gösteren bioanalyzer sonucu, b) Çalışmayan bir mutur DNA'sını gösteren bioanalyzer sonucu.....	27
Şekil 3.8: Dizilerindeki her bir nükleotidi kontrol edilen mutur bireylerine ait mtDNA dizilerinin bir kısmının görüntüsü.....	28
Şekil 3.9: Mutur bireyine (örnek no: 12053) ait mtDNA dizisinin bir kısmının kromotogram görüntüsü.....	28
Şekil 3.10: p1-p109 kodlu bireyler tez çalışması süresince elde edilen mutur mtDNA dizileridir. I-XVIII ve XXXII kodlu haplotipler Viaud-Martinez ve diğ. (2007)'deki haplotipleri ifade eder, 33, 34, 35, 36, 37 Tonay ve diğ. (2017b)'de bulunan yeni haplotipleri gösterir.....	29
Şekil 3.11: mtDNA istatistiksel analizlerine dahil edilen mutur örneklerinin bölgelere göre dağılımı. Yuvarlak içerisindekiler tez çalışmasında dizisi elde edilen muturları, kare ile gösterilenlerse literatürde bulunan ve analizlere dahil edilen dizileri ifade eder.....	30

Şekil 3.12: Analizlere dahil edilen özgün haplotip (Hap XVIII)'e sahip mutur bireylerinin örneklenme mevkiileri.....	30
Şekil 3.13: RAD veri seti elde edilen mutur bireylerinin örneklenme mevkiileri.	31
Şekil 3.14: MEGA'da yakın bağlantı ağacı çizilirken kullanılan seçenekler.	35
Şekil 4.1: Mutur bireyleri için oluşturulan ağ örgüsü.....	40
Şekil 4.2: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu Doğu Karadeniz (DK), Batı Karadeniz (BK) ve Ege Denizi (E) popülasyonları için hesaplanan Fst'ler.	46
Şekil 4.3: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu H18 (özgün XVIII haplotipine sahip Türk Boğazlar Sistemi'nde örneklenen bireyleri içeren) ve diğer popülasyonlar arasında hesaplanan Fst'ler.	47
Şekil 4.4: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu TBS ve diğer popülasyonlar için hesaplanan Fst'ler.	48
Şekil 4.5: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu Gen ve Haplotip çeşitliliği sonuçlarını gösteren grafikler.	49
Şekil 4.6: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu popülasyonlar bazında ortaya çıkarılan polimorfik lokus yüzdesi ve popülasyona özel alel sayısı.	50
Şekil 4.7: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu popülasyonlar bazında hesaplanan gözlenen ve beklenen heterozigotluk, gözlenen ve beklenen homozigotluk, Pi ve Fis değerleri.	51
Şekil 4.8: Mutur için MEGA'da oluşturulan yakın bağlantı ağacı; kırmızılar Batı Karadeniz bireylerini, sarılar Doğu Karadeniz bireylerini, açık mavi H18'e sahip bireyleri, koyu mavi TBS'deki bireyleri, morlar Ege bireylerini, yeşiller de tırtakları ifade eder.	52
Şekil 4.9: <i>Structure</i> ile yapılan analizin bar plot ile gösterimi. K=2, K=3, K=4 ve K=5 kümelenmesinde popülasyonlar arası karışımın görüntülenmesi, kümeleme analizi.	54

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Karadeniz ve komşu sulardaki muturların popülasyon genetik yapısı sonuçları.	10
Tablo 3.1: Qiagen MagAttract HMW DNA Kit ile izole edilen mutur DNA'larının konsantrasyon sonucu.	16
Tablo 3.2: Polimeraz Zincir Reaksiyonu yükseltgenme koşulları (Rosel ve diğ., 1999).....	17
Tablo 3.3: PZR ile yükseltgenme bileşenleri.....	18
Tablo 3.4: Kütüphane oluşturması yapılan 12 adet mutur genomik DNA'sı ve yapılan hesaplamalar.	20
Tablo 3.5: Genomik DNA'nın parçalanmasında kullanılan bileşenler.	21
Tablo 3.6: Parçalanmış genomik DNA'ya adaptörlerin bağlanması aşamasında kullanılan bileşenler.	21
Tablo 3.7: Kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu çoğaltma koşulları.	24
Tablo 3.8: PZR ile çoğaltma bileşenleri.	24
Tablo 3.9: Kütüphane oluşturması yapılan 12 adet mutur genomik DNA'sı ve yapılan hesaplamalar.	26
Tablo 3.10: STACKS programında yapılan analiz sırası.	32
Tablo 3.11: STACKS programında yapılan analiz sürecinde kullanılan komutlar.	32
Tablo 3.12: Kullanılan filtreler, filtreleme seçenekleri ve parametreler.	33
Tablo 3.13: Kullanılan parametlerin açıklaması.	33
Tablo 4.1: Haplotiplerin dağılımı (Hap I, VIII, X, XI, XV, XVI, XVII, XVIII, XXXII, Viaud-Martinez ve diğ. (2007) ve Tonay ve diğ. (2017b)'deki haplotipler; (BK: Batı Karadeniz, DK: Doğu Karadeniz, TBS: Türk Boğazlar Sistemi, E: Ege Denizi).	36
Tablo 4.2: Mutur için Φ_{st} değerleri.	41
Tablo 4.3: Mutur'da haplotip ve nükleotid çeşitliliği (N: Örnek sayısı-Genbank'tan alınan bireyler de dahil edilmiştir, H: Haplotip sayısı, Hd: Haplotip çeşitliliği, π : Nükleotid çeşitliliği, S.D.: Standart sapma).	42
Tablo 4.4: Filtre 1 sonucu popülasyonlar arası F_{st} değerleri.	43

Tablo 4.5: Filtre 2 sonucu popülasyonlar arası Fst değerleri.	43
Tablo 4.6: Filtre 3 sonucu popülasyonlar arası Fst değerleri.	44
Tablo 4.7: Filtre 1 sonucu popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri.	44
Tablo 4.8: Filtre 2 sonucu popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri.	45
Tablo 4.9: Filtre 3 sonucu popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri.	45



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat Derece
H ₂ O	: Su

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ACCOBAMS	: Karadeniz, Akdeniz ve Sınırdış Atlantik Bölgesinde Yaşayan Cetacea Türlerinin Korunması Anlaşması
CBD	: Biyolojik Çeşitlilik Konvansiyonu
CMS	: Yaban Hayvanların Göçmen Türlerinin Korunmasına İlişkin Bonn Sözleşmesi
TBS	: Türk Boğazlar Sistemi
TBMM	: Türkiye Büyük Millet Meclisi
IUCN	: International Union for Conservation of Nature
cm	: Santimetre
m	: Metre
km	: Kilometre
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
bç	: baz çifti

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE DENİZLERİ'NDE YAŞAYAN MUTUR'LARIN *Phocoena phocoena* (LINNAEUS, 1758) GENETİK YAPILARININ İNCELENMESİ

Begüm UZUN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Bayram ÖZTÜRK

II. Danışman : Prof. Dr. İbrahim Raşit BİLGİN

Türkiye denizlerinde Cetacea takımına (balinalar ve yunuslar) ait 10 türün yaşadığı bilinmektedir. Phocoenidae familyasından ise mutur - *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758) Türkiye Denizleri'nde en sık görülen üç yunus türünden biridir. Mutur, Kuzey Yarımküre'de görülen kozmopolitan bir türdür. Kuzey Atlantik'te, Kuzey Pasifik'te ve Karadeniz'de yaygın, Marmara Denizi'nde ise ender olarak bulunduğu bilinmektedir. Ege Denizi'nde canlı gözlem, canlı ve ölü karaya vurma kayıtları bildirilmiştir. Türün artık Akdeniz'de dağılım göstermediği bilinmektedir.

Muturlar üç alt türe ayrılmaktadır; Kuzey Pasifik'teki *Phocoena phocoena vomeria*, Kuzey Atlantik'teki *Phocoena phocoena phocoena* ve Karadeniz'deki *Phocoena phocoena relicta*'dır. Bunların yanı sıra, İberya ve Moritanya kıyılarındaki mutur popülasyonu *Phocoena phocoena meridionalis* olarak adlandırılmış ve yukarıdaki üç alt türden farklı bir alt tür ile temsil edildiği önerilmiştir. Karadeniz mutur popülasyonunun Atlantik mutur popülasyonundan morfolojik ve genetik olarak ayrı olduğu ve *Phocoena phocoena relicta* Abel, 1905 alt türü ile temsil edildiği belirlenmiştir. Muturun, ulusal ve uluslararası çalışmalar ile Türkiye'de bu güne kadar mtDNA ve nükleer DNA belirteçleri kullanılarak türün genetik yapısı anlaşılmaya çalışılmıştır. Marmara Denizi'nde özellikle İzmit Körfezi'nde örneklenen muturlar üzerine mtDNA belirteci ile yapılan genetik çalışmalar sonucunda, bazı bireylerde tespit edilen benzersiz haplotip

varlığı, bu alandaki muturların genetik olarak farklılaşmış olabileceğini göstermekte, yani, Marmara Denizi'nde izole bir mutur popülasyonu olabileceği fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmanın amacı; 1999-2018 yılları arasında Türkiye kıyılarında örneklenmiş mutur (*Phocoena phocoena*) türüne ait deri dokularından DNA örneği izole ederek, elde edilen DNA örneklerinin mitokondriyal DNA (mtDNA) ve çekirdek DNA'sı (RAD Dizileme) belirteçlerini kullanarak muturların genetik yapılarını incelemektir. Türkiye denizlerinde yaşayan mutur popülasyonları üzerine aynı belirteçle yapılan çalışmalara katkı sağlamak amacı ile mtDNA analizleri uygulanmış, mtDNA analiz sonuçları ışığında, Marmara Denizi'nde izole bir popülasyonu olduğu tahmin edilen mutur örneklerinin çekirdek DNA analizleri yapılmış ve mtDNA sonuçlarının yanı sıra RAD dizileme sonuçları da yorumlanmıştır.

Bu çalışmada, toplam 88 adet (Batı Karadeniz:48, Doğu Karadeniz:19, TBS:19, Ege Denizi:2) mutur türüne ait mtDNA dizisi elde edilmiştir. 14 farklı mtDNA haplotip varlığı ortaya çıkarılmış ve bu haplotiplerden beş tanesinin daha önce herhangi bir çalışmada bulunmayan yeni haplotipler olduğu anlaşılmıştır. Φ_{st} hesaplamaları sonucu, Marmara Denizi'ndeki mutur alt popülasyonunun Karadeniz'deki diğer mutur alt popülasyonlarından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılaşma gösterdiği gösterilmiştir. En yüksek haplotip ve nükleotid çeşitliliği, Türk Boğazlar Sistemi (TBS)'de görülmektedir. Batı Karadeniz'deki haplotip ve nükleotid çeşitliliği de TBS'den sonra en yüksek olarak bulunmuştur.

Çift enzim RAD (ddRAD) dizileme sonuçlarına bakıldığında, genetik çeşitlilik oranı en yüksek Batı Karadeniz'de (çeşitlilik gösteren SNP oranı: %28), akabinde TBS'de (24'lük değer ile) görülmüştür. Yapılan *Structure* analiz sonuçları filogenetik ağaç analiz sonuçlarını desteklemektedir. *Structure* sonucu özgün XVIII haplotipine sahip bireylerin diğer popülasyondaki bireylerden farklılaştığı görülmektedir.

Bu çalışmada yapılan hem mtDNA belirteci analiz sonuçları hem de ddRAD sonuçları ışığında Marmara Denizi'nde bir mutur alt popülasyonu varlığından bahsedilmektedir. Marmara Denizi'ndeki özgün haplotipin varlığının korunması için mevcut bölgedeki popülasyon için hassas bir koruma stratejisi gerekmektedir.

Mevcut çalışma sonucunda özellikle şimdiye kadar herhangi bir çalışmada bulunmamış yeni mtDNA haplotiplerinin ortaya çıkarılması bundan sonra hem Türkiye'de hem Dünya'da yapılacak çalışmalar için verilerin karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Türkiye'de daha önce Türk Boğazlar Sistemi (TBS) ve Ege Denizi'nde yaşayan muturların genetik yapısının belirlenmesinde RAD Dizileme'nin kullanılmamış olması sebebiyle mevcut çalışma, ilk çalışma niteliğindedir.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 51782.

Ocak 2020, 86 sayfa.

Anahtar kelimeler: Cetacea, *Phocoena phocoena*, popülasyon genetiği, mitokondriyal DNA, RAD Dizileme

SUMMARY

Ph.D. THESIS

GENETIC INVESTIGATION ON THE POPULATION STRUCTURE OF THE HARBOUR PORPOISE *Phocoena phocoena* (LINNAEUS, 1758) LIVING IN TURKISH WATERS

Begüm UZUN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Marine and Freshwater Resources Management

Supervisor : Prof. Dr. Bayram ÖZTÜRK

Co-Supervisor : Prof. Dr. Raşit BİLGİN

It is known that 10 species have been living in Turkish Seas belonging to Ordo: Cetacea (dolphins and whales). Harbour Porpoise, *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758) is one of the most common species of cetaceans in Turkey. Harbour porpoise is a cosmopolitan species distributed in the Northern Hemisphere. It is known to be widespread in the North Atlantic, North Pacific and Black Sea, and rarely in the Sea of Marmara. Live observation, live and dead stranding records have been reported in the Aegean Sea. The species is not recorded in the Mediterranean Sea anymore.

Harbour porpoises are divided into three sub-species; *Phocoena phocoena vomeria* in the North Pacific, *Phocoena phocoena phocoena* in the North Atlantic and *Phocoena phocoena relicta* in the Black Sea. In addition, the porpoise population which lives in Iberia and Mauritania coasts has been suggested to be represented by a different subspecies which is named; *Phocoena phocoena meridionalis*. The Black Sea harbour porpoise population is found to be morphologically and genetically separated from the Atlantic harbour porpoise population and represented by the *Phocoena phocoena relicta* Abel, 1905.

Genetic structure of this species has been studied using mtDNA and nuclear DNA markers in Turkey. The unique haplotype detected in some individuals in the Marmara Sea, especially in the Gulf of Izmit, indicates that the porpoises in this area may be genetically differentiated, in other words, there might be an isolated harbour porpoise population in the Marmara Sea.

The aim of this study is to isolate DNA from the skin tissues of harbour porpoises sampled in Turkish coasts between 1999-2018, and investigate the genetic structure of the species using mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (RAD sequencing) markers.

In this study, a total of 88 (Western Black Sea: 48, Eastern Black Sea: 19, Turkish Straits System (TSS): 19, Aegean Sea: 2) harbour porpoise mtDNA sequences are obtained. The presence of 14 different mtDNA haplotypes are revealed and five of these haplotypes are found to be new that were not found in any other previous studies. According to Φ_{st} calculations, it is shown that the harbour porpoise subpopulation in the Marmara Sea show a statistically significant differentiation from other subpopulations in the Black Sea. The highest haplotype and nucleotide diversity is observed in the TSS. Haplotype and nucleotide diversity in the Western Black Sea subpopulation is also found to be the highest after the TSS subpopulation.

According to the double digest RAD (ddRAD) sequencing results, the highest genetic diversity is observed in the Western Black Sea (SNP ratio: 28%), followed by the Turkish Straits System (TSS) (with the ratio of 24%). It is identified that the individuals with the unique XVIII haplotype is separated from other individuals. *Structure* analysis results support the phylogenetic tree analysis results.

As a result of mtDNA and ddRAD analysis results, it is mentioned that there is a harbour porpoise subpopulation in the Marmara Sea. In order to preserve the existence of the unique haplotype in the area, a sensitive conservation strategy is required for the harbour porpoise subpopulation in the Marmara Sea.

The finding of new mtDNA haplotypes, that are only found in this study, will allow the comparison of data between further studies both in Turkey and in the world.

This study is the first study, in which the RAD sequencing is used in harbour porpoise samples in the Turkish Straits System (TSS) and the Aegean Sea in order to determine the genetic structure of the species.

This study is supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: 51782.

January 2020, 86 pages.

Keywords: Cetacean, *Phocoena phocoena*, population genetics, mitochondrial DNA, RAD Sequencing

1. GİRİŞ

Cetacea, deniz memelilerine dahil, tamamen suda yaşayan bir canlı takımıdır (Evans ve Raga, 2001). İki alt takıma ayrılmaktadır; 68-72 tür ile dişli balinalar (odontoceti) ve 11-12 tür ile dişsiz balinalar (mysticeti). (Jefferson ve diğ., 1993). Bu iki alt takım iki farklı yönle birbirinden ayırt edilmektedir. İlk olarak, dişsiz balinalar çoğunlukla 10 m'den daha büyüktür ve plankton ve küçük balıkları filtrelemek için keratin plakalara (balen) sahiptir; diğer tarafta, dişli balinalar, bazen gaga şeklinde uzayan, dişli çenelere ve sadece bir adet hava deliğine sahiptir. Dişsiz balinalarda ise, iki adet hava deliği bulunmaktadır (Evans ve Raga, 2001).

Türkiye denizlerinde Cetacea takımına (balinalar ve yunuslar) ait 10 türün yaşadığı bilinmektedir (Öztürk, 1996). Delphinidae familyasından afalina - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) ve tırtak – *Delphinus delphis* Linnaeus, 1758, Phocoenidae familyasından ise mutur - *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758). Türkiye Denizleri'nde en sık görülen üç yunus türüdür.

Besin zincirinin en üstünde yer alan Setaseler, deniz ekosisteminin ekosistem dinamikleri ve ekolojik dengesinde büyük öneme sahiptir (Radu ve diğ., 2013).

Karadeniz'deki mutur popülasyonlarını tehdit eden bazı faktörler bulunmaktadır. Bunlar; tesadüfi ağa yakalanma (bycatch), aşırı balıkçılığa bağlı besin azalması, kirlilik ve hastalıklara bağlı toplu ölümlerdir (Öztürk, 1996; Bearzi ve diğ., 2004; Reeves ve Notarbartolo di Sciara, 2006). Tesadüfi ağa yakalanmanın muturlar için insan kaynaklı en önemli ölüm sebebi olduğu bilinmektedir. Birçok nedenle nesilleri tehdit altında olan Karadeniz muturlarının genetik yapılarının anlaşılması, tür koruma stratejilerinin geliştirilmesi için gereklidir.

Bölgemizde yaşayan Cetacea türleri Biyolojik Çeşitlilik Konvansiyonu (Convention on Biological Diversity (CBD)), Yaban Hayvanların Göçmen Türlerinin Korunmasına İlişkin Bonn Sözleşmesi (Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals (CMS)), Avrupa'nın Yaban Hayatı ve Yaşam Ortamlarını Koruma Sözleşmesi (Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention)), Karadeniz'in Kirliliğe Karşı Korunması Konvansiyonu (Convention on the Protection of the Black Sea Against Pollution (Bucharest Convention)), Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki

Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) ve Mucavir Atlantik Deniz Bölgesi, Akdeniz ve Karadeniz'deki Deniz Memelilerinin Korunmasına Dair Anlaşma (the Agreement on the Conservation of Cetaceans in the Black Sea, Mediterranean Sea and Contiguous Atlantic Area (ACCOBAMS) gibi uluslararası antlaşmalar ile korunmaktadır.

Ülkemizde ise, başta 1380 sayılı Su Ürünleri Kanunu ve taraf olduğumuz uluslararası antlaşmalar ile koruma altındadırlar. Ayrıca, Bakanlar Kurulu'nun 23.10.2012 tarihinde imzaladığı (TBMM, 2012), 04.04.2017 tarih ve 30028 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe giren ACCOBAMS antlaşmasına göre, tarafların karaya vuran deniz memelileri hakkında sistematik araştırma programı geliştirmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında; 1999-2015 ve 2018 yılları arasında Türkiye kıyılarında halihazırda örneklenmiş ve 2015-2017 yılları arasında da TUBİTAK CetaGen projesinin periyodik saha çalışmaları ve ihbarlar ile toplanmış mutur (*Phocoena phocoena*) türüne ait deri dokularından DNA örneği izole edilmiş, elde edilen DNA örneklerinin mitokondriyal DNA (mtDNA) ve çekirdek DNA'sı belirteçlerinden RAD Dizileme yaklaşımını kullanarak muturların genetik yapılarını incelenmiştir. Türkiye denizlerinde yaşayan mutur popülasyonları üzerine aynı belirteçle yapılan çalışmalara katkı sağlamak amacı ile mtDNA analizleri uygulanmış, mtDNA analiz sonuçları ışığında, Marmara Denizi'nde izole bir popülasyonu olduğu tahmin edilen mutur örneklerinin çekirdek DNA analizleri yapılmış ve mtDNA sonuçlarının yanı sıra RAD dizileme sonuçları da yorumlanmıştır.

Muturun, ulusal ve uluslararası çalışmalar ile Türkiye'de bugüne kadar mtDNA ve nükleer DNA belirteçleri kullanılarak türün genetik yapısı araştırılmıştır. Ne var ki, Türkiye Denizleri'nde yaşayan mutur popülasyonları için, çekirdek DNA belirteçleri kullanılarak yapılan çalışmalar kısıtlıdır ve örnekleme dar bir coğrafi alanı kapsamaktadır. Bu sebeple, ülkemizdeki popülasyonların diğer küresel ve yerel popülasyonlar ile ilişkileri yeterince iyi araştırılamamakta ve demografi tahminleri yapılamamaktadır. Mevcut tez çalışması, Türkiye denizlerinde yaşayan mutur türünün genetik yapısıyla ilgili eksik bilgilerin tamamlanmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, ileriki yıllarda yine moleküler belirteçler kullanılarak yapılabilecek çalışmalar ile devamlılığı sağlanacaktır.

Tezin önemi; mutur popülasyonlarının genetik olarak dünyada aynı belirteç açısından çalışılmış diğer Akdeniz, Atlantik ve Pasifik popülasyonları ile karşılaştırılmasına olanak sağlayacağından, coğrafi konumuyla son derece önem arz eden Türk Boğazlar Sistemi'nin deniz memeli türlerinin genetik yapılarına etkilerinin araştırılacak ve sistemin bir geçiş bölgesi olup olmadığı ve ayrıca popülasyonlar arası gen akışına olan etkisinin anlaşılacak olmasıdır.

Aynı zamanda, Türkiye'de yeni nesil RAD Dizileme yöntemi Karadeniz'de ve ilk defa Türk Boğazlar Sistemi (TBS) ve Ege'deki mutur örneklerinin çekirdek DNA'sı üzerinde kullanılmış ve yüksek örnek sayısı ile tutarlı ve kapsamlı genetik analizler yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar ışığında, Türkiye denizlerinde yaşayan ve Dünya'da çeşitli anlaşmalar ile koruma altında olan mutur türünün koruma stratejilerine yönelik temel veri sağlanmıştır. Bu veri sonraki bilimsel araştırmalar için kaynak oluşturacaktır.

Doktora tezinde, şimdiye kadar yapılan çalışmalara katkı sağlamak amacı ile yine mtDNA analizleri uygulanmıştır. Ayrıca, yüksek örnek sayısı ile yeni bir nesil dizileme yöntemi olan ve genom düzeyinde milyonlarca baz dizilik veriye ulaşılmasına olanak sağlayan restriksiyon enzimi ilişkili DNA (restriction enzyme associated DNA/RAD) dizilemenin kullanılmış olması, Türkiye denizlerindeki mutur popülasyonlarıyla ilgili mtDNA belirteçleri kullanılması sonucu oluşturulan hipotezlerin test edilmesini sağlamıştır. Elde edilen veriler ışığında Karadeniz'in Türkiye kıyılarında yaşayan mutur popülasyonlarının arasında anlamlı genetik farklılıklar olup olmadığı araştırılmış ve tek bir alt türe ait olup olmadıkları tartışılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 MUTUR, *PHOCOENA PHOCOENA* (LİNNAEUS, 1758)

Mutur (*Phocoena phocoena*) Türkiye Denizleri'nde en sık görülen üç yunus türünden biridir (Öztürk, 1996). Akdeniz havzasında sadece Marmara ve Karadeniz'de görülen bu tür, havzanın en küçük Cetacea türüdür.

2.1.1 Sistematik Bilgisi

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Classis: Mammalia

Ordo: Cetacea

Subordo: Odontoceti

Family: Phocoenidae

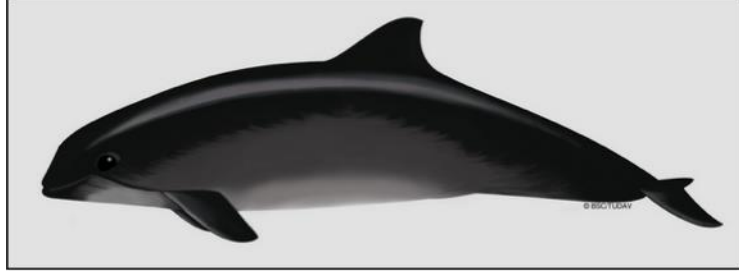
Cins: *Phocoena*

Tür: *Phocoena phocoena*

2.1.2 Fiziksel Özellikleri

Vücut şekli diğer yunuslara göre daha toparlak olup, kafa küçük, melon ve gaga yoktur. Dorsal kısım koyu gri, siyah, kül rengi, karın kısmı açık beyazdır, göğüs yüzgeçleri kısadır, dorsal yüzgeç kısa üçgenimsidir (Öztürk, 1996; Jefferson ve diğ., 1993) (Şekil 2.1). Yeni doğanlar 70-90 cm, yetişkinler 1,4-1,8 m (Karadeniz'de genellikle 1,5 m'den kısa) uzunlukta olurlar. Ağırlıkları ise, 40-90 kg arasında olabilir (Bjørge ve Tolley, 2009). Şimdiye kadar bilinen en büyük birey 200 cm'den uzun 70 kg bir dişidir (Bjørge ve Tolley, 2009). Vücut büyüklüklerine oranla oldukça kalın bir yağ tabakasına (blubber) sahiptir, bu da soğuk sularda

termoregülasyona olanak sağlayan bir adaptasyondur. Bilinen ve en uzun yaşamış birey 23 yaşındadır (Björge ve Tolley, 2009).



Şekil 2.1: Mutur.

2.1.3 Beslenmesi

Mutur, çoğunlukla küçük bentik, bentopelajik ve sürü oluşturan pelajik balıklar beslenir. Yapılan mide içeriği çalışmaları sonucu bahar - yaz döneminde Batı Karadeniz’de besinlerinin %64’ünü çaça (*Sprattus sprattus*), %24’ünü ise mezgitin (*Merlangius merlangus*) oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır (Tonay ve diğ., 2007a). Marmara Denizi’nde tesadüfi ağa yakalanan muturların mide içerikleri incelendiğinde, istavrit (*Trachurus trachurus*), çaça (*Sprattus sprattus*) ve kayabalığı (*Gobiidae sp.*) ile beslendikleri görüldü. Türün ilk defa istavrit ile beslediği ve istavritin diyetlerindeki en önemli balık türü olduğu bulundu (Tonay ve diğ., 2007b).

2.1.4 Habitat ve Ekoloji Bilgileri

Muturlar, çoğunlukla Karadeniz’in tüm çevresi boyunca kıta sahanlığı üzerinde çoğunlukla sığ sularda (0-200 m derinlikte) yaşamalarına rağmen; daha derin sularda kıyından oldukça uzakta da gözlenmektedirler. Örneğin, Eylül ayı sonlarında - Ekim 2005 başında, Karadeniz’in orta kesiminde, 450-2,170 m derinliğindeki sularda en yakın sahile yaklaşık 38-215 km uzaklıktaki sahanlığın ötesinde büyük gruplar halinde gözlemlenmiştir (Krivokhizhin ve diğ., 2006).

2.1.5 Yaşam ve Dağılım Alanları

Mutur, Kuzey Yarımküre’de görülen kozmopolitan bir türdür (Autenrieth ve diğ., 2018). Kuzey Atlantik’te, Kuzey Pasifik’te ve Karadeniz’de yaygın, Marmara Denizi’nde ise ender olarak bulunduğu bilinmektedir, ancak Ege Denizi’nde ve Akdeniz’deki durumu tam belirgin değildir.

(Şekil 2.2). Ege Denizi’nde 1980-2013 yılları arasında canlı gözlem, canlı ve ölü karaya vurma olmak üzere toplam 19 adet kaydı bildirilmiş ve bunların neredeyse hepsi kuzey Ege’de gerçekleşmiştir (Frantzis ve diğ., 2001; Güçlüsoy, 2007; Tonay ve Dede, 2013). Ayrıca, 2013 yazında Ege Denizi’nde gerçekleştirilen araştırma seferinde mutur türü için en yüksek akustik yoğunluk özellikle Saroz Körfezi’nde tespit edilmiş, körfezde 14 gün içinde iki kez küçük sürü halinde (birinde anne ve yavru birlikte) gözlenmiştir (Cucknell ve diğ., 2016). Türün “çok ender” olarak Akdeniz’de bulunduğu belirtilse de (Deveciyan, 1926) artık Akdeniz’de dağılım göstermedikleri bilinmektedir (Fontaine ve diğ., 2007, 2010, 2014; Fontaine, 2016).

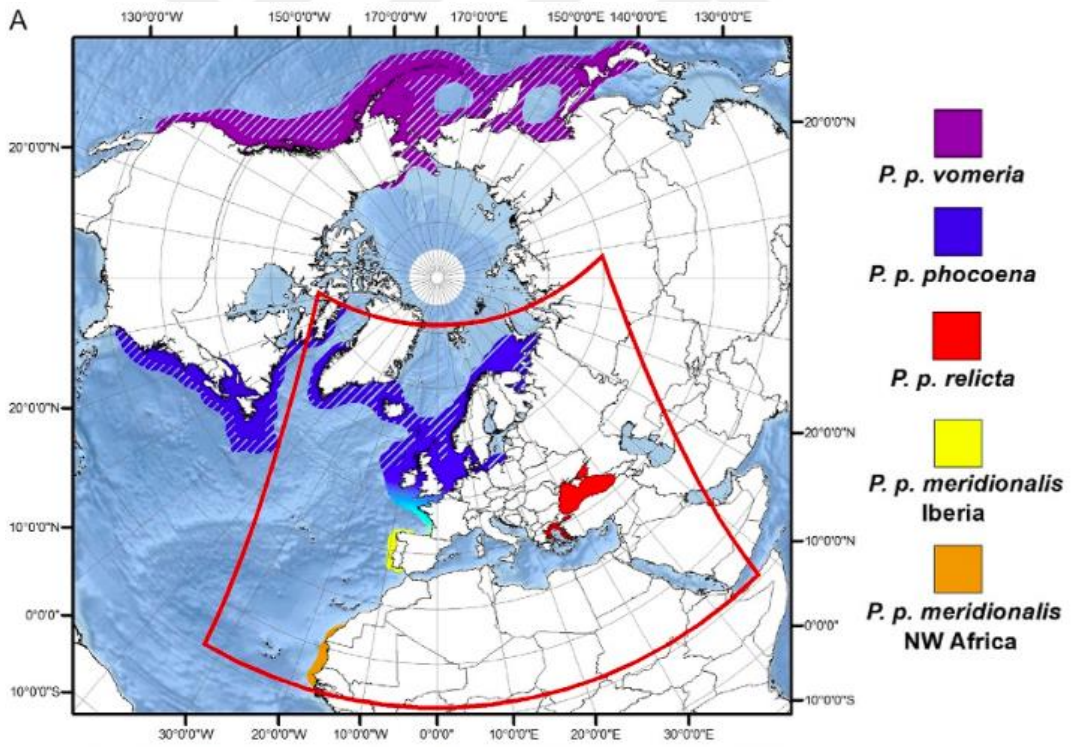


Şekil 2.2: Mutur Dağılım Haritası (Hammond ve diğ., 2008; © IUCN).

Şu an Akdeniz’de bulunmadıkları (Fontaine, 2016) tespit edilen muturların şimdiki dağılımlarının oluşumu ile ilgili bazı hipotezler bulunmaktadır. Bunlardan ilki, mutur kolonilerinin Pleistosenin ikinci yarısında (21.000-600.000 yıl önce) ilk önce Akdeniz’de

oluşup Marmara Denizi ve Karadeniz'e 21.000 veya 150.000 yıl önce girdiklerini önerirken (Fontaine, 2016), diğer hipotez, yaklaşık 7000 yıl önce Akdeniz ve Karadeniz'in birleşmesi zamanına odaklanmıştır (Frantzis ve diğ., 2001). Bunların yanı sıra, Akdeniz mutur popülasyonlarının dağılımının, besin açısından zengin geç buzul döneminin bitiminden yaklaşık 5000 yıl önce olan ılık orta holosen tarafından tetiklendiği öne sürülmektedir (Fontaine ve diğ., 2010).

Muturlar üç alt türe ayrılmaktadır; Kuzey Pasifik'teki *Phocoena phocoena vomeria*, Kuzey Atlantik'teki *Phocoena phocoena phocoena* (Fontaine ve diğ., 2014) ve Karadeniz'deki *Phocoena phocoena relict*'dir (Notarbartolo di Sciara ve Birkun, 2010; Fontaine ve diğ., 2014). Bunların yanı sıra, Fontaine ve diğ. (2014), İberya ve Moritanya kıyılarındaki mutur popülasyonunun yukarıdaki üç alt türden farklı bir alt türü temsil ettiğini önermiş ve *Phocoena phocoena meridionalis* olarak adlandırmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Muturun (*Phocoena phocoena*) dağılımı; farklı alt türler farklı renklerle belirtilmiştir (Fontaine, 2016).

2.2 KARADENİZ MUTUR POPÜLASYONU, *PHOCOENA PHOCOENA RELICTA* ABEL, 1905

Karadeniz mutur popülasyonunun Atlantik mutur popülasyonundan morfolojik (Kleinenberg, 1956; Galatius ve Gol'din, 2011) ve genetik (Rosel ve diğ., 1995; 2003) olarak ayrı olduğu ve *Phocoena phocoena relict* Abel, 1905 alt türü ile temsil edildiği belirlenmiştir (Birkun ve Frantzis, 2006; Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Perrin ve diğ., 2009; Fontaine, 2016). Karadeniz ve Atlantik muturlarının birbirinden günümüzden yaklaşık 7000 yıl önce ayrıldıklarını ve bağımsız evrimsel yollar izledikleri tahmin edilmektedir (Frantzis ve diğ., 2001; Fontaine ve diğ., 2007, 2010, 2014; Fontaine, 2016).

Karadeniz ve Ege Denizi muturlarının birbiriyle rastgele çiftleşen bir popülasyon oluşturdıkları tahmin edilmektedir (Fontaine ve diğ., 2012). Başka bir deyişle, Kuzey Ege'de karaya vuran muturlar üzerine yapılmış genetik çalışmalar, Ege muturlarının Karadeniz muturları ile aynı genetik havuzdan geldiklerini göstermektedir (Rosel ve diğ., 2003; Fontaine ve diğ., 2012; Viaud-Martinez ve diğ., 2007). Ege muturları muhtemelen Karadeniz'den Marmara Denizi'ne ve kuzey Ege Denizi'ne akan yüzey sularını takip etmektedir (Frantzis ve diğ., 2001). Aslında Kuzey Ege havzası Karadeniz'den dökülen soğuk ve düşük tuzluluk oranına sahip suların etkisindedir. Bu sular Ege'nin kuzey ve batı bölgelerini etkileyen bir siklonik akıntıya dönüşür ve kuzey havzasının güney havzasından ekolojik izolasyonuna neden olur (Theocharis ve diğ., 1993).

Karadeniz muturları, Azak Denizi ve Kuzeybatı Karadeniz'den kış başında ayrılır ve ilkbaharda geri döner (Slastenenko, 1955). Popülasyonun en önemli kışlama alanı Güneydoğu Karadeniz kıyılarıdır. Bu bölge aynı zamanda hamsinin (*Engraulis encrasicolus*) de kışlama alanıdır (Birkun, 2008), muturların beslenmek için hamsi peşinde Güneydoğu Karadeniz'e göç etmeleri şaşırtılmayacak bir durumdur. Muturlar İstanbul Boğazı'nda da balık göçleri ile birlikte Mart ayından Temmuz ayına kadar gözlenmektedir (Dede ve diğ., 2008). İlkbahar ve sonbaharda Marmara Denizi'nde tesadüfi ağa yakalandıkları bildirilmiştir (Tonay ve diğ., 2007b).

Karadeniz muturlarının sayısı, 20. yüzyıldaki yunus avcılığı nedeni ile ciddi şekilde azalmıştır. Karadeniz'de, 1870 yılından beri yunus avcılığı (Slastenenko, 1955) yapılmıyordu. Avcılık, Et Balık Kurumu'nun kurulmasıyla 1930 ve 1950'lerde zirve yapmış, bu yoğun avcılık nedeni ile stoklar aşırı derecede yıpranmış, Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği (SSCB), Bulgaristan

ve Romanya’da, 1966’da, Türkiye’de ise 1983 yılında avcılık yasaklanmıştır (Tonay ve Öztürk, 2012). 2300 yıldan fazla süren yunus avcılığı sırasında sadece 20. yüzyılda 4-5 milyon bireyin öldürüldüğü tahmin edilmektedir (Birkun, 2006). Türkiye’deki toplam yunus avının 1976-1981 yılları arasında %80’ini muturun oluşturduğu bildirilmiştir (Tonay ve Öztürk, 2012). Yapılan bir genetik çalışma sonucunda, popülasyonun son 50 yılda yunus avcılığı ve tesadüfi ağa yakalanma sebebiyle neredeyse %90 oranında azaldığı belirtilmiştir (Fontaine ve diğ., 2012). Son 20 yılda kaçak avcılık bildirilmemiş olsa da, bu süre bir popülasyonun kendini toparlaması için yeterli bir zaman değildir (Birkun, 2008; Fontaine ve diğ., 2012).

Dip uzatma ağları ile yapılan kalkan balıkçılığında en fazla etkilenen tür muturdur, kalkan balığı av yasağı dönemini kapsayan bahar ve yaz mevsiminde kumsallarda da ölüm frekansı en yüksek olan türdür (Tonay ve Öztürk, 2003; Tonay, 2016). Türkiye’nin Batı Karadeniz kıyısında 2003-2016 yılları arasında toplam 1243 adet (%77 mutur, %10 afalina, %7 tırtak ve %6 tanımlanamayan) karaya vuran cetacea kaydedilmiştir (Tonay ve diğ., 2017a). Doğu Karadeniz’de 2010-2011 yılları arasında 71 mutur bireyinin kalkan dip uzatma ağına takılıp boğulduğu bildirilmiştir (Bilgin ve diğ., 2018). 2003, 2009 ve 2016 yıllarının yaz mevsiminde sebebi tespit edilemeyen olağandışı toplu ölüm vakası görülmüştür (Tonay ve diğ., 2012a, 2017a).

Karadeniz mutur popülasyonu, IUCN (Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği) Kırmızı Listesi’nde, “nesli tehlike altında - endangered (EN)” statüsünde yer almaktadır (Birkun ve Frantzis, 2008).

2.3 KARADENİZ MUTUR POPÜLASYONU ÜZERİNE YAPILAN GENETİK ÇALIŞMALAR

Şimdiye kadar Cetacea’lardaki taksonomik çalışmalar, hakkında en çok bilgi sahibi olunan türler için bile, karasal memelilere kıyasla daha sınırlı ve tartışmalıdır (Weber ve diğ., 2007). Ne var ki, mtDNA’nın ve çekirdek DNA’sının beraber analiz edilmesi, özellikle türlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin incelenmesine ve tür tayini yapılmasına, bunları takiben, bu belirteçlerin kullanılarak popülasyonların genetik yapıları hakkında çıkarımlar yapılmasına olanak sağlamıştır (Reich ve diğ., 1999).

Muturun, ulusal ve uluslararası çalışmalar ile Türkiye’de bugüne kadar mtDNA ve nükleer DNA belirteçleri kullanılarak türün genetik yapısı anlaşılmaya çalışılmıştır (Tablo 2.1). Bu

zamana kadar Karadeniz muturları ile ilgili mikrosatelit belirteçleri ile çekirdek DNA'sının analiz edilmesiyle yapılmış çalışmalar, Karadeniz kıyıları boyunca yaşayan tüm mutur popülasyonlarının birbiriyle genetik olarak çok benzer olduğunu ve tek bir alt tür ile (*Phocoena phocoena relicta*) temsil edildiklerini göstermektedir (Fontaine ve diğ., 2007, 2014; Lah ve diğ., 2016; Cheida ve diğ., 2019). Ayrıca, Karadeniz'in Türkiye kıyılarında örneklenen dört adet mutur bireyinde RAD dizileme yönteminin kullanıldığı Lah ve diğ. (2016) sonuçlarına bakıldığında, Karadeniz alt popülasyonunun diğer alt popülasyonlardan anlamlı olarak farklılaştığı görülmüştür ve bireylerin (*Phocoena phocoena relicta*) alt türüne ait oldukları belirlenmiştir (Lah ve diğ., 2016).

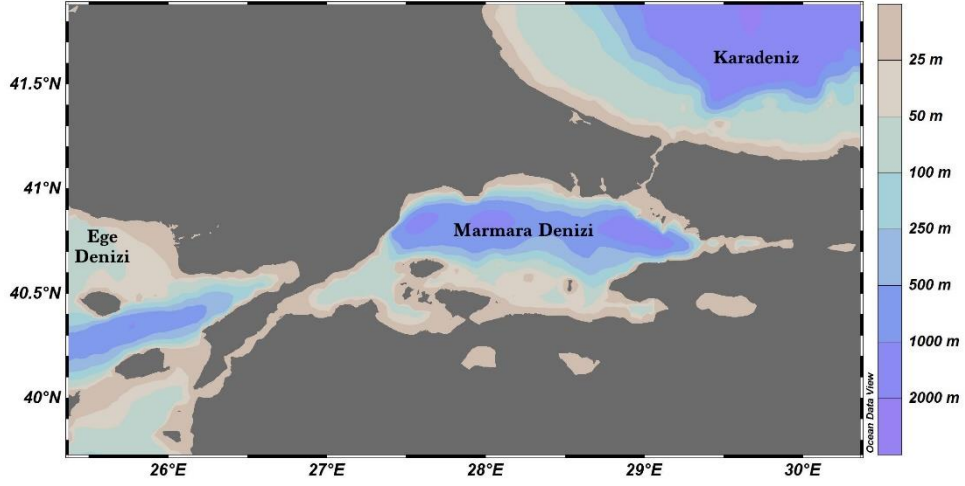
Muturların mtDNA kontrol bölgesine dayalı haplotip tayin çalışmaları sonucunda ise, Karadeniz ve Ege Denizi'nde bulunan mtDNA haplotipleri beraber kümelenmiştir (Rosel ve diğ., 2003). Başka bir deyişle, Kuzey ve Güney Ege'de örneklenen bireylerinin Karadeniz popülasyonuna ait olduğu anlaşılmaktadır (Rosel ve diğ., 2003; Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Tonay ve diğ., 2012b, 2014). Aynı zamanda, Karadeniz ve Ege haplotiplerinin daha önceden Ukrayna'nın Karadeniz kıyısındaki bireylerde bulunmuş olanlarla aynı olması ve Türk Boğazlar Sistemi (TBS)'nde örneklenen bireylerde de Karadeniz haplotiplerinin bulunması Karadeniz'deki muturların Ege Denizi'ne İstanbul ve Çanakkale Boğazları üzerinden geçtikleri fikrini desteklemektedir (Tonay ve diğ., 2017b).

Tablo 2.1: Karadeniz ve komşu sulardaki muturların popülasyon genetik yapısı sonuçları.

Metod	Örnekler			Birbirinden farklı haplotip sayısı	Çalışmalar
	Karadeniz	Marmara	Ege Denizi		
mtDNA-CR-394 bp	9	-	-	4	Rosel ve diğ. (1995)
mtDNA-CR	-	-	2	0	Rosel ve diğ. (2003)
mtDNA-CR-394 bp	140	9	6	25	Viaud-Martinez ve diğ. (2007) Tonay ve diğ. (2012b)

					Tonay ve diğ. (2014)
mtDNA-CR- 607 bp 16S rDNA COI regions	47	-	1	12	Sönmez, R. (2011)
mtDNA-CR- 705 bp 10 mikrosatelit lokusu	54	-	10	32	Fontaine ve diğ. (2012)
mtDNA-CR - 5085 bp	75	3	-	11	Fontaine ve diğ. (2014)
10 mikrosatelit lokusu	75	3	-	-	Fontaine ve diğ. (2007)
10 mikrosatelit lokusu	16	-	-	-	Llavona ve diğ. (2014)
mtDNA-CR- 394 bp	58	11	1		Tonay ve diğ. (2017b)
RAD Dizileme	4	-	-	19	Lah ve diğ.. (2016)
mtDNA-CR- 3904 bp 10 mikrosatellit lokusu	65	-	-	-	Chehida ve diğ. (2019)
Toplam	mtDNA: 310 birey 10 mikrosatelit lokusu: 159 birey RAD Dizileme: 4 birey			Karadeniz: 360 birey Marmara Denizi: 20 birey İstanbul Boğazı: 5 birey Çanakkale Boğazı: 1 birey Ege Denizi: 14 birey	

Türk Boğazlar Sistemi (TBS), Karadeniz ve Ege havzalarının önemli bir bileşeni, Karadeniz ile Akdeniz arasındaki tek bağlantıdır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Türk Boğazlar Sistemi (TBS) derinlik haritası.

Türk Boğazlar Sistemi (TBS), iki tabakadan oluşur, üst tabaka Karadeniz kökenli acı su tabakasıdır, alt tabaka ise, daha fazla tuzlu olan Akdeniz kökenli tabakadır. Marmara Denizi'nin (11 500 km² alana sahip) ve iki dar boğazın, deniz türleri için bir bariyer, bir koridor ve iklimlendirme bölgesi olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Öztürk ve Öztürk, 1996). Bununla birlikte, TBS'de durum daha ilginçtir. TBS'de tek yönlü bir gen akışı varlığından söz edilebilir, yani, sistem bir yönde bir koridor görevi görürken, diğer yönde bir bariyer görevi görmektedir. Bu durum, hamsi (Magoulas ve diğ., 2006) ve kara midyede (Kalkan, 2013) bildirilmiştir. Yunuslar da TBS'yi göçmen pelajik balıklarla beslenmek için doğal bir tuzak olarak kullanır (Dede ve diğ., 2016). Yarı kapalı denizlerin, diğer denizlerle bağlantısı olmalarından dolayı bu alanlarda genetik olarak farklılaşmış alt popülasyonların bulunma ihtimali beklenemeyebilir.

Ancak, Marmara Denizi'nde özellikle İzmit Körfezi'nde örneklenen muturlar üzerine mtDNA belirteci ile yapılan genetik çalışmalar sonucunda, bazı bireylerde tespit edilen benzersiz haplotip varlığı, bu alandaki muturların hem Karadeniz hem de Kuzey Ege Denizi alt popülasyonlarından genetik olarak farklılaşmış olabileceğini göstermekte, yani, Marmara Denizi'nde izole bir mutur popülasyonu olabileceği fikrini desteklemektedir (Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Tonay ve diğ., 2012b, 2014, 2017b). Her ne kadar Karadeniz'de görülen bazı haplotipler Marmara Denizi'ndeki mutur bireylerinde de görülse de, haplotiplerin genel dağılımına bakıldığında Marmara'da istatistiksel olarak anlamlı olarak farklılaşmış ayrı bir mutur popülasyonu olduğu söylenebilir (Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Tonay ve diğ., 2017b).

Genel olarak, mtDNA, nükleer genetik belirteçlere göre iki önemli avantaj sunar. Birincisi, anasal (maternal) kalıtılması ve rekombinasyonun olmaması nedeniyle, mtDNA sekansları filogenetik ilişkiyi, bir popülasyon veya tür içindeki maternal soyların tarihini, yani, geçmişini yansıtmaktadır (Baker ve Dalebout, 2009). Bunun yanı sıra, mtDNA genomlarının efektif popülasyon büyüklüğü, otozomal nükleer genlerin dörtte biri kadardır ve rastgele genetik sürüklenme oranları orantılı olarak daha yüksektir. Bu, nükleer genlere kıyasla, popülasyonlar arasında mtDNA soylarının daha hızlı bir şekilde farklılaşmasına ve sonuçta daha yakın tarihli tarihsel demografik veya türleşme olaylarının hassas tespitine olanak sağlamaktadır (Baker ve Dalebout, 2009). Ayrıca, mtDNA'nın kontrol bölgesi bir protein veya RNA için kodlama yapmaz ve bu kısıtlamaların olmadığı bu bölgede mutasyon değişimlerin birikmesi diğer mtDNA bölgelerine kıyasla daha hızlıdır. Bu nedenle, mtDNA cetaceaların ve pinnipedlerin popülasyon yapısındaki bir çok çalışma için tercih edilen bir genetik belirteç olmuştur (Baker ve Dalebout, 2009; Lee ve diğ., 2018; Shan ve diğ., 2019).

mtDNA çoğunlukla anadan çocuklara aktarıldığından (Palumbi ve Baker, 1994) bir türün evrimsel sürecinin sadece bir kısmını açıklayabilmektedir. mtDNA belirteciyle ortaya konan bu genetik farklılığın çekirdek DNA'sının analiz edilmesiyle desteklenmesi bir türün moleküler evriminin anlaşılması için gerekli ve şarttır. Önceki çalışmalarda (Fontaine ve diğ., 2007) Marmara Denizi'nde örneklenen sadece üç mutur bireyinde mikrosatelit belirteci kullanılarak analizler yapılmış; fakat mtDNA genomundaki ayrım çekirdek genomunda tespit edilememiş, Marmara'daki bireyler de Karadeniz popülasyonu ile beraber kümelenmiştir.

Yeni nesil dizileme teknolojileri, çekirdek DNA'sının ayrıntılı şekilde incelenmesine olanak sağlamak ve yüksek verimlilik ve düşük maliyetin yanı sıra araştırmacılara, keşfedilmemiş genomik veriler sunabilmektedir (Willette ve diğ., 2014; Arnason ve diğ., 2018; Autenrieth ve diğ., 2018). RAD dizileme, bitki (Yang ve diğ., 2016) ve hayvan (Souza ve diğ., 2017) popülasyon genetiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan genotiplendirme yöntemlerden biri haline gelmiştir (Davey ve diğ., 2011; Peterson ve diğ., 2012). RAD dizileme, restriksiyon enzim kesim bölgelerinin kenar dizilerine yoğunlaşarak, tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism/SNP) tespiti için çoklu örneklemelerle derin okumalar sağlayabilmektedir (Chutimanitsakun ve diğ., 2011).

RAD dizileme, birçok bireyin genomunda binlerce SNP tespit edebildiğinden bireyler/popülasyonlar arasındaki bu SNP'lerin sıklığı ve dağılımı, popülasyonları birbirinden

ayırabilmekte ve popölasyon genetiği ve taksonomik çalışmalara katkı sağlamaktadır (Davey ve Blaxter, 2010; Rubin ve diğ., 2012; Taniel ve diğ., 2016; Rochette ve Catchen, 2017; Paris ve diğ., 2017).

Türkiye’de daha önce TBS ve Ege Denizi’nde yaşayan muturların genetik yapısının belirlenmesinde RAD dizilemenin kullanılmamış olması sebebiyle mevcut çalışma, ilk çalışma niteliğindedir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Karaya vuran yunusların örneklenmesi için saha çalışmaları; periyodik arazi tarama çalışmalarıyla birlikte bütün Türkiye kıyılarında karaya vuran yunus ihbarlarının değerlendirilmesi şeklinde yürütüldü.

3.1 ÖRNEKLEME

TUBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (Proje no: 114Y568) çerçevesinde 2015-2017 yılları arasında yapılan saha çalışmaları ve bu projede çalışan araştırma ekibinin proje öncesi 1999 yılından beri sürdürdüğü arazi çalışmaları sonucu karaya vuran mutur bireyleri araştırma ekibi tarafından örnekledi. Muturların fotoğrafı çekilip, tam boyu ölçüldü, mümkünse cinsiyeti belirlendi, Rowles ve diğ. (2001)'nin sınıflandırmasına göre bozulma derecesi belirlendi. Bozulma derecesinin izin verdiği ölçüde, Geraci ve Lounsbury (2005)'de belirtilen protokole uygun olarak deri ve/veya kalp dokusundan 1x1cm dokular steril bisturi ile alınıp, NaCl'ye doyurulmuş %20'lik DMSO çözeltisinde Falcon tüplerle laboratuvara getirildi. Çalışmaya dahil edilen, ekibin daha önceki arazi çalışmalarından elde edilen örnekler de yukarıda anlatıldığı şekilde örnekledi. İhbar edilen yunuslardan yollanan örnekler ise metil alkol veya sofr tuzu içerisinde yollandı. Örnekler laboratuvara getirildikten sonra bir parçası alkolde bırakıldı, diğer kısmı yine NaCl'ye doyurulmuş %20'lik DMSO çözeltisinde Falcon tüplere konup oda sıcaklığında saklandı.

3.2 LABORATUVAR ANALİZLERİ

3.2.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA) Laboratuvar Analizi

3.2.1.1 DNA İzolasyonu

Örnekleme tarihinden itibaren Geraci ve Lounsbury (2005)'de önerilen metoda ve yapılacak analizlere uygun olarak sodyum klorür (NaCl)'e doyurulmuş %5-20'lik dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisinde 15 ml'lik falkon tüpler içerisinde muhafaza edilen mutur türüne ait 88 adet deri doku örneğinden DNA izolasyonu için DNA Ekstraksiyon Kiti (Roche, Indianapolis, ABD), DNeasy Kan ve Doku Kiti (Qiagen, Valencia, CA) ve dokudan DNA'nın manyetik boncuklara bağlanarak muhafaza edilmesi yöntemini esas alan ticari kit "Qiagen MagAttract

HMW” DNA Kit kullanıldı ve üretici protokolleri uygulandı. Elde edilen bazı DNA’ların konsantrasyonu NanoDrop cihazında kontrol edildi (Şekil 3.1).

Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type
99002	reyhan	29.07.2016 16.05	23,1	ng/ul	0.462	0.256	1.80	2.08	DNA
99002	reyhan	29.07.2016 16.06	22,9	ng/ul	0.457	0.241	1.90	2.26	DNA
99003	reyhan	29.07.2016 16.06	27,8	ng/ul	0.557	0.305	1.82	2.13	DNA
02008	reyhan	29.07.2016 16.07	40,5	ng/ul	0.809	0.516	1.57	1.02	DNA
03002	reyhan	29.07.2016 16.08	9,1	ng/ul	0.182	0.149	1.22	0.28	DNA
07011	reyhan	29.07.2016 16.08	9,4	ng/ul	0.189	0.139	1.35	0.63	DNA
07017	reyhan	29.07.2016 16.09	42,1	ng/ul	0.841	0.621	1.36	0.63	DNA
07021	reyhan	29.07.2016 16.10	16,1	ng/ul	0.322	0.236	1.36	0.58	DNA
08010	reyhan	29.07.2016 16.10	13,0	ng/ul	0.260	0.187	1.39	0.79	DNA
08017	reyhan	29.07.2016 16.11	14,5	ng/ul	0.290	0.187	1.55	0.77	DNA
08018	reyhan	29.07.2016 16.11	25,9	ng/ul	0.517	0.360	1.43	0.70	DNA
08026	reyhan	29.07.2016 16.12	5,2	ng/ul	0.104	0.059	1.76	0.69	DNA
08026	reyhan	29.07.2016 16.12	5,5	ng/ul	0.110	0.068	1.66	0.73	DNA
09012	reyhan	29.07.2016 16.13	21,7	ng/ul	0.434	0.295	1.47	0.74	DNA
09034	reyhan	29.07.2016 16.14	53,6	ng/ul	1.073	0.751	1.43	0.68	DNA
09035	reyhan	29.07.2016 16.14	6,2	ng/ul	0.124	0.085	1.46	0.39	DNA
10006	reyhan	29.07.2016 16.15	86,2	ng/ul	1.725	0.937	1.84	1.58	DNA
10011	reyhan	29.07.2016 16.16	39,7	ng/ul	0.793	0.538	1.47	0.70	DNA
10019	reyhan	29.07.2016 16.16	17,7	ng/ul	0.353	0.256	1.38	0.67	DNA
10019	reyhan	29.07.2016 16.16	19,0	ng/ul	0.380	0.270	1.41	0.68	DNA
10033	reyhan	29.07.2016 16.17	166,0	ng/ul	3.321	2.353	1.41	0.66	DNA
13020	reyhan	29.07.2016 16.18	3,7	ng/ul	0.074	0.052	1.40	0.56	DNA
13020	reyhan	29.07.2016 16.18	3,3	ng/ul	0.067	0.045	1.47	0.55	DNA
16002	reyhan	29.07.2016 16.19	77,4	ng/ul	1.548	0.824	1.88	1.93	DNA
16016	reyhan	29.07.2016 16.19	35,4	ng/ul	0.707	0.389	1.82	0.92	DNA
16018	reyhan	29.07.2016 16.20	10,2	ng/ul	0.203	0.101	2.02	0.96	DNA
16018	reyhan	29.07.2016 16.20	10,2	ng/ul	0.203	0.109	1.86	0.92	DNA
16021	reyhan	29.07.2016 16.21	31,3	ng/ul	0.626	0.336	1.87	1.51	DNA
16022	reyhan	29.07.2016 16.21	12,0	ng/ul	0.240	0.127	1.89	1.09	DNA
16022	reyhan	29.07.2016 16.21	12,8	ng/ul	0.256	0.128	2,00	1,03	DNA

Şekil 3.1: DNA izolasyonu yapılan mutur DNA’larının NanoDrop sonucundan bir örnek.

2017 ve 2018 yılında örneklenen mutur DNA dokularından elde edilen DNA’ların konsantrasyonu hassas DNA konsantrasyon ölçümü yapabilen Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) cihazında kontrol edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Qiagen MagAttract HMW DNA Kit ile izole edilen mutur DNA’larının konsantrasyon sonucu.

Örnek No	Lokasyon	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/ul)
17001	Türk Boğazlar Sistemi	77,6
17006	Batı Karadeniz	59,8
17007	Doğu Karadeniz	47,4
17010	Doğu Karadeniz	83
17011	Batı Karadeniz	105,3
17014	Batı Karadeniz	100,1
17016	Doğu Karadeniz	77,2

17024	Batı Karadeniz	77
17028	Türk Boğazlar Sistemi	88,5
18003	Türk Boğazlar Sistemi	63
18007	Doğu Karadeniz	90,4
18011	Doğu Karadeniz	106
18017	Türk Boğazlar Sistemi	58,5
18022	Türk Boğazlar Sistemi	72,9
18027	Doğu Karadeniz	111

3.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile mtDNA D-halka bölgesinin çoğaltılması

DNA izolasyonu sonucu elde edilen 88 adet mutur DNA'sının, mtDNA kontrol bölgesinin yaklaşık 507 bp uzunluğundaki parçası Rosel ve diğ. (1999) tarafından geliştirilen bir çift primer ile yükseltgendi. Primer dizileri aşağıdaki gibidir:

L15824: 5'-CCTC ACTCCTCCCTAAGACT-3'

H16265: 5'-GCCCGGTGCGAGAAGAGG-3'

Mutur bireylerinin mtDNA çoğaltımında kullanılan PZR koşulları Tablo 3.2'de, PZR bileşenleri Tablo 3.3'de verilmiştir.

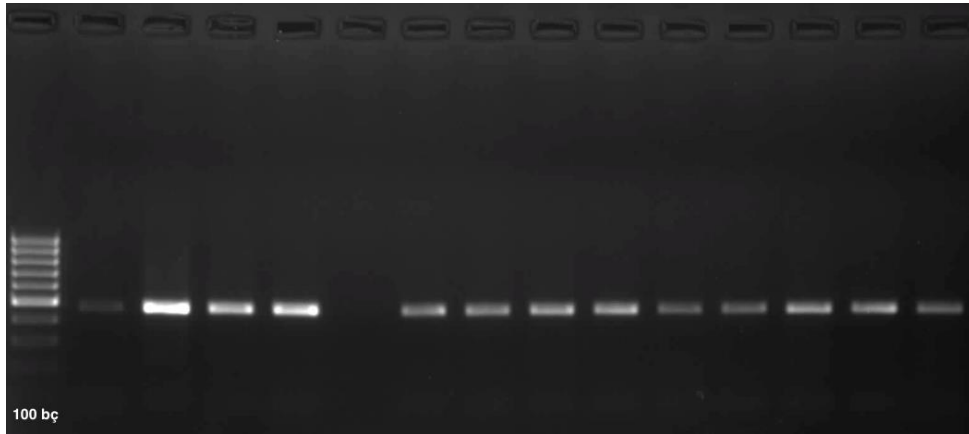
Tablo 3.2: Polimeraz Zincir Reaksiyonu yükseltgenme koşulları (Rosel ve diğ., 1999).

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü
1.Basamak	94 C ⁰ 'de	5 dakika	1
2.Basamak	94 C ⁰ 'de	30 saniye	35
	59 C ⁰ 'de	1 dakika	
	72 C ⁰ 'de	1 dakika	
3.Basamak	72C ⁰ 'de	10 dakika	1

Tablo 3.3: PZR ile yükseltgenme bileşenleri.

Bileşenler	PZR bileşimine konulan miktar (µL)
1x KCL Buffer	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Primer F+R	4 µl
Taq Enzimi	0,3 µl
DNA	3 µl
d(H ₂ O)	27,7 µl
Toplam Hacim	50 µl

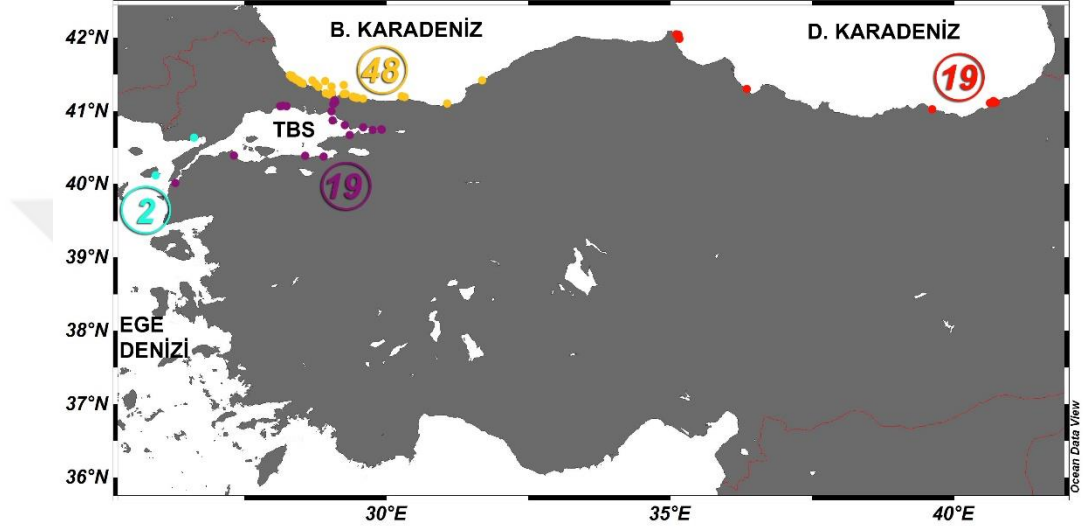
Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülüp, boyama için etidyum bromid (EtBr) kullanıldı. Agaroz jele 5 µL PZR ürünü ve 5 µL yükleme tamponu (1X loading dye) birlikte karıştırılarak yüklendi. PZR ürünü bandın uzunluğunu kontrol edebilmek amacı ile 3 µL 1000 bç'lik işaretleyici (M) yüklendi ve ayrıca negatif kontrol kullanıldı (Şekil 3.2). Toplam 88 adet bireyin PZR ürünü elde edildi.



Şekil 3.2: PZR sonucu çoğaltılan mutur türüne ait mtDNA D-halka bölgesine ait 507 bçlik ürünlerin agaroz jelde görüntüsü (100bç: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100- 1000bç).

3.2.1.3 DNA Dizilemesi

PZR ürün varlığı tespit edilen mutur türüne ait toplam 88 adet örnek dizileme işlemlerinin yapılması için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi. Baz dizileme reaksiyonlarında PZR'larda kullanılan primerler kullanıldı. Toplam 88 adet (Batı Karadeniz:48, Doğu Karadeniz:19, TBS:19, Ege Denizi:2) mutur türüne ait mtDNA dizisi elde edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: mtDNA dizisi elde edilen mutur bireylerinin örneklenme mevkiileri.

3.2.2 Çift Enzim RAD dizileme (ddRAD) Laboratuvar Analizi

3.2.2.1 DNA İzolasyonu

Çift enzim RAD dizileme analizi için proje öncesinde mevcut bulunan ve proje süresinde örneklenen ve manyetik boncuklara bağlanarak muhafaza edilme yöntemini esas alan Qiagen MagAttract HMW DNA Kit kullanılarak üretici protokolüne göre DNA izolasyonu yapıldı. 84 adet mutur bireyinden elde edilen DNA'ların jelde kontrolleri yapıldı ve hassas DNA konsantrasyon ölçümü yapabilen Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) cihazında DNA konsantrasyonları ölçüldü. Konsantrasyonları ölçülen DNA'lar 12'şerlik örnekler halinde gruplanarak kütüphane oluşturması için analizlere başlandı.

12'şerlik örneklerden oluşan kütüphane oluşturması için DNA konsantrasyonu bazıları yüksek, bazıları düşük konsantrasyonlu olan örnekler bir araya getirilecek şekilde seçildi. İki yerden restriksiyon enzimleri ile kesilmesi noktasında hazırlanması gereken karışıma maksimum 150

ng DNA konulacak şekilde her bir DNA'dan kaç μ l alınması gerektiğine dair hesaplamalar yapıldı (DaCosta ve Sorenso, 2014). Aynı zamanda bir sonraki aşamada detaylı olarak anlatılan genomik DNA'nın iki yerden restriksiyon enzimleri ile kesilmesi noktasında hazırlanması gereken karışıma ne kadar su konulması gerektiği de hesaplandı. 1 adet kütüphane oluşturmak için seçilen 12 bireyin hesaplamalarını gösteren tablosu aşağıdaki gibidir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Kütüphane oluşturması yapılan 12 adet mutur genomik DNA'sı ve yapılan hesaplamalar.

N	Örnek No	Konsantrasyon (ng/ μ l)	Gereken DNA (μ l)	Gereken Su Miktarı (μ l)
1	16045	59,8	2,5	41,3
2	11052	67,8	2,21	41,59
3	16051	83	1,8	42
4	12051	6,94	21,6	22,2
5	12071	69,6	2,16	41,64
6	13036	3,96	37,9	5,9
7	14008	4,62	32,5	11,3
8	15031	5	30	13,8
9	15039	72,4	2,07	41,73
10	16016	39,6	3,8	40
11	16018	11	13,6	30,2
12	16021	24,6	6,1	37,7

3.2.2.2 Genomik DNA'nın iki yerden enzimle kesilmesi

7 adet setten toplam 84 örneğin genomik DNA'larının kesimi için iki adet enzim kullanıldı. Kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.5: Genomik DNA'nın parçalanmasında kullanılan bileşenler.

Bileşenler	$\mu\text{L}/\text{reaksiyon}$
<i>EcoRI</i> -HF	1
<i>SbfI</i> -HF	1
NEBuffer 4	5
Genomik DNA	Her örnek için hesaplanan miktar
Su	Her örnek için hesaplanan miktar (50 μL 'ye tamamlamak için)

Genomik DNA'ya yukarıdaki bileşenler eklenerek ve PZR makinesinde aşağıdaki aşamalar uygulanarak parçalanması sağlandı.

1. 37°C'de 30 dakika parçalama,
2. 65°C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu,
3. Oda sıcaklığına kadar yavaş yavaş soğutma, 4°C'de kalma.

3.2.2.3 Illumina Adaptörlerinin Bağlanması

2 farklı enzimle kesime bırakılan genomik DNA parçalarına illumina adaptörleri bağlandı. Bunun için kullanılan bileşen tablosu Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6: Parçalanmış genomik DNA'ya adaptörlerin bağlanması aşamasında kullanılan bileşenler.

Bileşenler	$\mu\text{L}/\text{reaksiyon}$
Genomik DNA	50
10x NEBuffer 2	2
rATP	0,6
P1 adaptörü (barkod)	4
P2 adaptörü (indeks)	12
Su	0,4

T4 ligaz	1
----------	---

Elimizde mevcut parçalanmış olan 50 μ L genomik DNA'ya yukarıdaki bileşenler eklenerek PZR'da adaptörlerin bağlanması aşağıdaki aşamalar uygulanarak sağlandı:

1. 22°C'de 30 dakika bağlanma,
2. 65°C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu,
3. Oda sıcaklığına kadar yavaş yavaş soğutma, 4°C'de kalma.

Bu aşamadaki P2 adaptörü (index) her 12'şerlik kütüphaneye eklenen bir adet indeks'i (burada kullanılan indeksler: I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7) belirtirken, P1 adaptörü (barkod), 12'şerlik kütüphanenin her bireyine ayrı ayrı eklenen ve farklı DNA dizisine sahip 12 adet barkod'u (burada kullanılan barkodlar: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12) belirtmektedir.

3.2.2.4 Jel Elektroforezi ve Boyut seçimi

Bu adımda yine Da Costa ve Sorenson (2014)'daki yöntem izlenerek adaptörlerin bağlandığı örneklerin yürütüleceği, 45 μ L sybr green (10000X) boyası, 9 gram ultra saflıkta agaroz, 450 ml TAE kullanılarak bir jel hazırlandı. Jele ilk kuyucukta ladder, ikinci sırada DNA, üçüncü sırada yine ladder ve dördüncü sıra boş olacak şekilde 12 örneğin yüklemesi yapıldı.

Toplam 84 örnek için 7 farklı jel hazırlandı ve örnekler 110 V'da 1 buçuk saat jelde yürütüldü. Yürütülen jel E-Gel (invitrogen) görüntüleme cihazında görüntülenerek 300-450 bp aralığındaki DNA jelden kesildi (Şekil 3.4) ve DNA'lar ependorflara alındı ve ağırlıkları ölçüldü. Ependorf içerisindeki DNA'lar, Qiagen MinElute Gel Extraction Kit ile üretici protokol uygulanarak temizlendi (Şekil 3.5) ve 20 μ L DNA elde edildi.



Şekil 3.4: Jelden kesilen DNA'ların ultrapure agaroz jelde görüntüsü.



Şekil 3.5: DNA'ların Qiagen MinElute Gel Extraction Kit ile temizlenme aşaması; DNA üzerine eklenen Buffer PB'yi gösteren adım.

3.2.2.5 *Illümina dizileme kütüphanesini oluşturmak için boyut seçimi yapılan bölgenin PZR Çoğaltımı*

Elde edilen 20 µL DNA'nın çoğaltımında kullanılan primerler, PZR koşulları (Tablo 3.7) ve çoğaltım bileşenleri (Tablo 3.8) (DaCosta ve Sorenson, 2014) aşağıdaki gibidir. Kullanılan primerler:

RAD1.F: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAG-3'

RAD2.R: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAG-3'.

Tablo 3.7: Kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu çoğaltma koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü
1.Basamak	98 C°'de	30 saniye	1
2.Basamak	98 C°'de	10 saniye	20
	60 C°'de	30 saniye	
	72 C°'de	40 saniye	
3.Basamak	72 C°'de	5 dakika	1

Tablo 3.8: PZR ile çoğaltma bileşenleri.

Bileşenler	PZR bileşimine konulan miktar (µL)
DNA	15
Phusion Sx Buffer	12
dNTPs	1,2
RAD1-F primer	3
RAD2-R primer	3
Su	25,2
Phusion Taq Buffer	0,6

PZR sonrası örneklerin Qubit'te konsantrasyon ölçümü yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Qubit'te ölçülen konsantrasyon sonucu.

3.2.2.6 PZR ürünlerinin manyetik boncuklar ile saflaştırılması

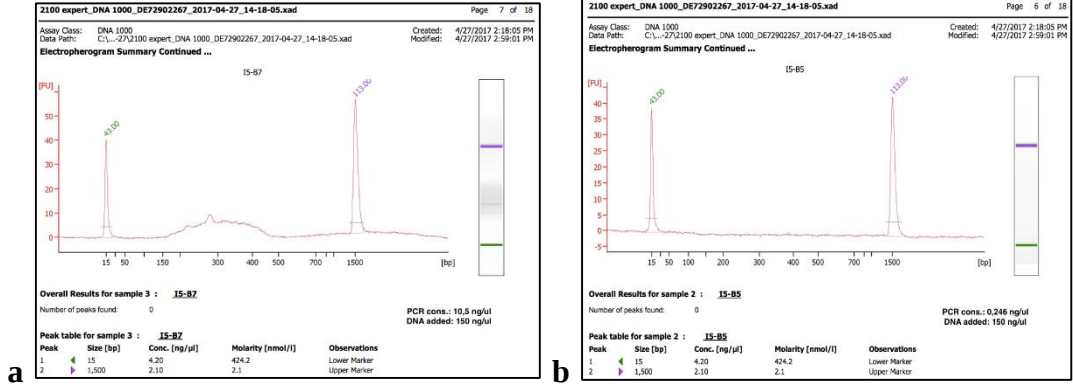
1. Elde edilen PZR ürünlerine 108 μ l manyetik boncukları içeren solüsyon eklendi.
2. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
3. Mikrotüpler manyetik tabakaya geçirilerek 2 dakika beklenildi ve boncukların solüsyondan ayrılması sağlandı.
4. Üzerlerine 200 μ l 70% etanol konularak oda sıcaklığında beklendi.
5. Mikrotüpler manyetik tabakadan ayrıldı ve üzerlerine 40'ar μ l elüsyon solüsyonu eklendi.
6. Mikrotüpler manyetik tabakaya son olarak yerleştirildi ve boncukların solüsyondan ayrılması bekledi.
7. Ayrılan solüsyon ependorf tüplere alındı.

Bu son aşama ile toplam 84 adet örneğin illümina dizileme kütüphanesi hazırlanmış oldu. Hazırlanan kütüphanelerden bir tanesinin elde edilen son tablosu ve hesaplamaları aşağıda verilmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.9: Kütüphane oluşturması yapılan 12 adet mutur genomik DNA'sı ve yapılan hesaplamalar.

Tüp ismi	Örnek No	Başlangıç DNA	Gereken DNA (ul)	Gereken Su (ul)	P2 Adaptörü	P1 Adaptörü	Adaptörlü DNA (ul)	PZR sonrası DNA (ul)
I7-B1	16008	36	4,2	39,6	I7	B1	1,75	4,46
I7-B2	16036	68,4	2,2	41,6	I7	B2	1,28	6,28
I7-B3	16037	12,2	12,3	31,5	I7	B3	1,45	3,02
I7-B4	16038	22,8	6,6	37,2	I7	B4	1,15	7,44
I7-B5	16039	86,4	1,73	42,07	I7	B5	1,35	5,54
I7-B6	16040	14	10,7	33,1	I7	B6	1,41	9,12
I7-B7	16044	100	1,5	42,3	I7	B7	5,38	7,78
I7-B8	16046	100	1,5	42,3	I7	B8	4,88	5,6
I7-B9	16048	99,6	1,5	42,3	I7	B9	4	4,52
I7-B10	16054	95,8	1,6	42,2	I7	B10	2,84	8,26
I7-B11	10011	3,3	43,8	0	I7	B11	2,24	0,33
I7-B12	4003	1,01	50	0	I7	B12	0,336	3,84

Kütüphanesi hazırlanan 84 örneğin bazıları PZR sonrası DNA konsantrasyonları dikkate alınarak ve farklı konsantrasyon aralıklarında bireyler seçilerek Agilent 2100 Bioanalyzer Sistemi'nde hedef bölgenin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi (Şekil 3.7).



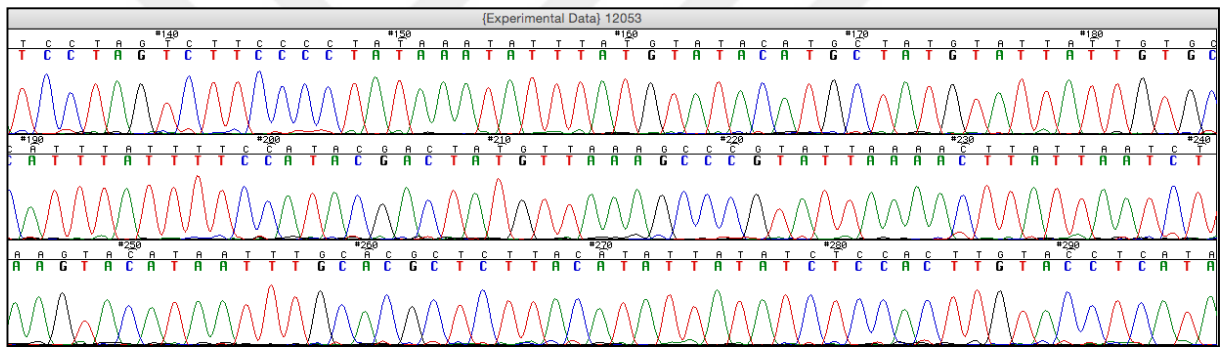
Şekil 3.7: a) Çalışan bir mutur DNA'sını gösteren bioanalizer sonucu, b) Çalışmayan bir mutur DNA'sını gösteren bioanalizer sonucu.

Bioanalizer sonuçlarına göre, PZR sonrası DNA konsantrasyonu en düşük 2,44 ng/μl olan bir bireyin hedef bölgesinin çalışmış olduğu tespit edildi. Bu nedenle, bu konsantrasyonun altındaki bireyler dizileme işlemine katılmadan ekarte edildi. Geriye kalan toplam 64 bireyin gerekli hesaplamaları yapılarak (DaCosta ve Sorenso, 2014), örnekler havuzlandı, yani birleştirildi. Illumina Hiseq 2500 dizileme makinesinde 100 bç çift yönlü okumalar yapılmak üzere MacroGen firmasına gönderildi.

3.3 VERİ ANALİZLERİ

3.3.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA) Verilerinin İstatistiksel Analizi

Elde edilen mutur türlerinin bireylerine ait mtDNA dizi verileri, Sequencher v. 4.1 (Gene Codes Corp.) programı kullanılarak temizlendi ve düzeltildi (Şekil 3.8, 3.9) ve yine aynı program kullanılarak birbirleriyle hizalandı.



GenBank'tan indirilerek analizlere dahil edilen dizilerin erişim numaraları şöyledir; U09689 -

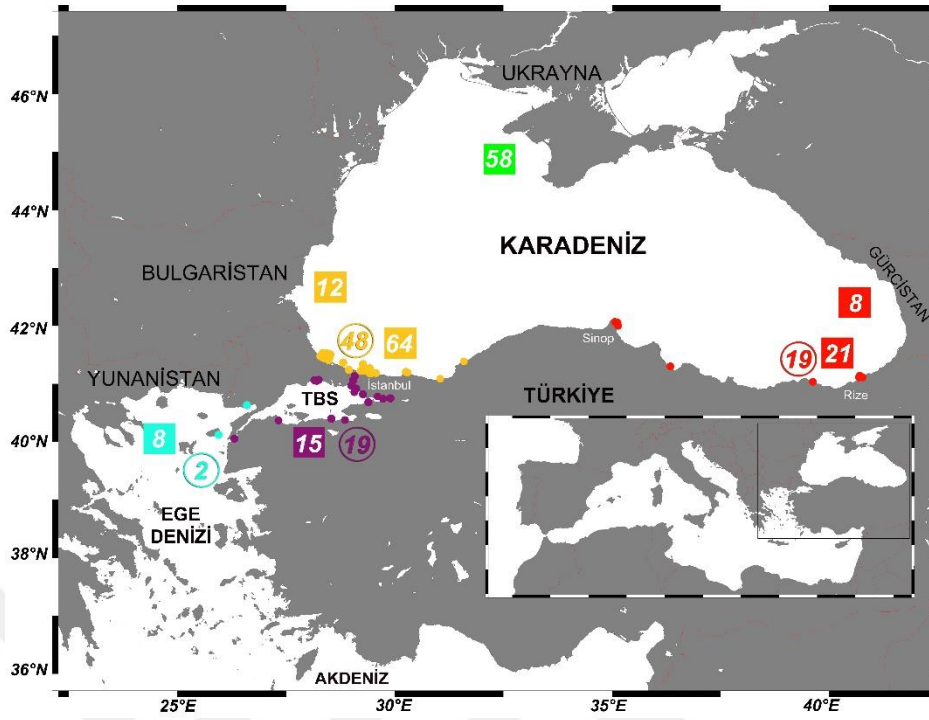
Hap. 1: 64 [p87_ p74 p6 p80 p77 p45 p65 p64 p79 p91 p93 p8 p9 p75 p62 p48 p46 p59 p66 p53 p18 p73 l p71 p69 p52 p37 p7 p67 p60 p61 p68 p32 p36 p44 p70 p10 p11 p17 p1 p41 p25 p34 p29 p15 p50 p39 p107 p109 p105 p101 p98 p99 p96 p106 p26 p28 p57 p51 p31 p30 p22 p24 p16]
Hap. 2: 1 [IV]
Hap. 3: 5 [p78 XI p47 p35 p63]
Hap. 4: 2 [VIII p58]
Hap. 5: 8 [p92 p42 p90 p103 p104 p89 XVIII p27]
Hap. 6: 3 [p94 XVII p49]
Hap. 7: 1 [XXI]
Hap. 8: 1 [XIII]
Hap. 9: 1 [34]
Hap. 10: 1 [XX]
Hap. 11: 1 [36]
Hap. 12: 1 [p81]
Hap. 13: 1 [XXVIII]
Hap. 14: 1 [33]
Hap. 15: 1 [XIV]
Hap. 16: 1 [VII]
Hap. 17: 1 [VI]
Hap. 18: 1 [V]
Hap. 19: 2 [XXII p97]
Hap. 20: 1 [II]
Hap. 21: 1 [XXX]
Hap. 22: 1 [XIX]
Hap. 23: 2 [p72 XV]
Hap. 24: 1 [XXIII]
Hap. 25: 1 [XXV]
Hap. 26: 1 [XII]
Hap. 27: 3 [p38 XVI p76]
Hap. 28: 1 [35]
Hap. 29: 3 [p33 X p23]
Hap. 30: 1 [p88]
Hap. 31: 1 [p108]
Hap. 32: 1 [p100]
Hap. 33: 1 [p102]
Hap. 34: 1 [XXIV]
Hap. 35: 1 [IX]
Hap. 36: 1 [37]
Hap. 37: 1 [III]
Hap. 38: 1 [XXII]
Hap. 39: 1 [XXIX]
Hap. 40: 1 [XXXI]
Hap. 41: 1 [XXVI]
Hap. 42: 1 [XXVII]

Şekil 3.10: p1-p109 kodlu bireyler tez çalışması süresince elde edilen mutur mtDNA dizileridir. I- XVIII ve XXXII kodlu haplotipler Viaud-Martinez ve diğ. (2007)'deki haplotipleri ifade eder, 33, 34, 35, 36, 37 Tonay ve diğ. (2017b)'de bulunan yeni haplotipleri gösterir.

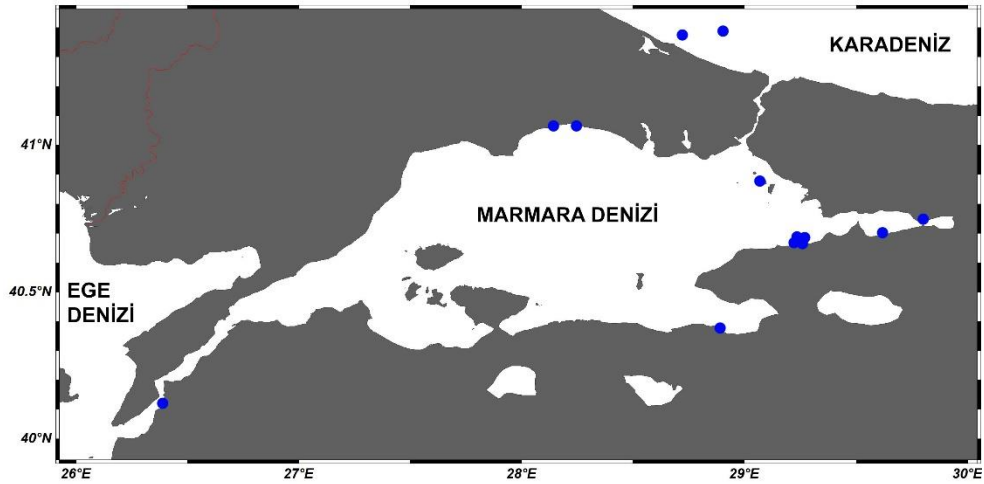
Literatürde bulunan tüm mutur örnekleri analizlere dahil edildi (Şekil 3.11, 3.12) ve örneklenme bölgelerine göre farklı alt popülasyonlarla ifade edildi. Burada “alt popülasyon” terimi, havzanın coğrafik ve ekolojik açıdan farklı bölgelerinde bulunan olası popülasyonları belirtir.

Arlequin (Excoffier ve Lischer, 2010) programı kullanılarak ve ikili gruplar oluşturularak Φ_{st} hesaplandı ve bu mutur alt popülasyonlarının birbirleriyle olan genetik izolasyonu incelendi.

Φ_{st} mtDNA çalışmalarında popülasyon yapısının tespitinde ve değerlendirilmesinde F_{st} 'nin analogudur (Holsinger ve Weir, 2009) ve popülasyonlar arasındaki mitokondriyal genetik farklılaşmanın ölçütüdür. Φ_{st} , 0-1 arasında bir değer alır. Popülasyonlar arası gen akışı varsa Φ_{st} 0 değerine, yakın olur ve popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma arttıkça değer sıfırdan uzaklaşır (Weir ve Cockerham, 1984).



Şekil 3.11: mtDNA istatistiksel analizlerine dahil edilen mutur örneklerinin bölgelere göre dağılımı. Yuvarlak içerisindekiler tez çalışmasında dizisi elde edilen muturları, kare ile gösterilenlerse literatürde bulunan ve analizlere dahil edilen dizileri ifade eder.

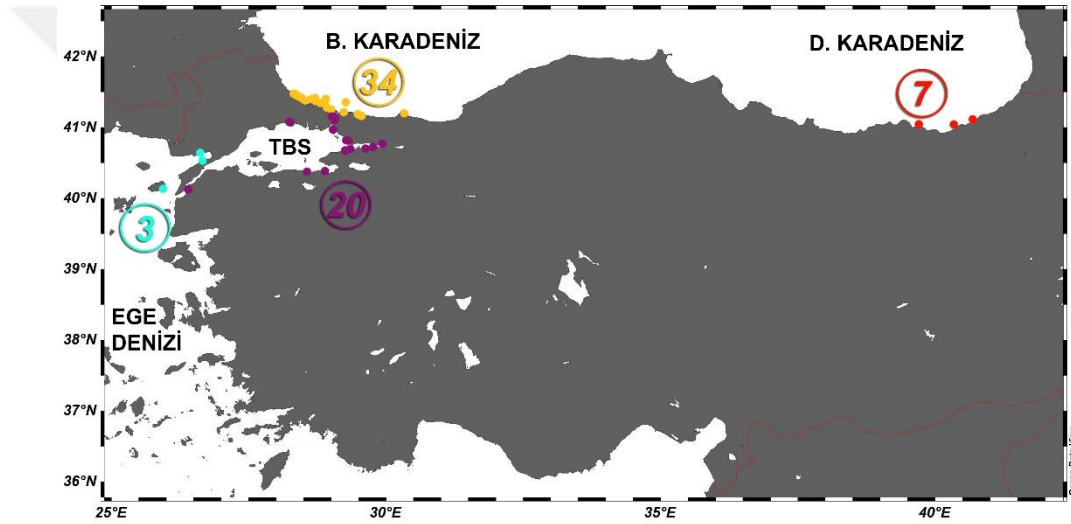


Şekil 3.12: Analizlere dahil edilen özgün haplotip (Hap XVIII)'e sahip mutur bireylerinin örneklenme mevkiileri.

PopART programı (2012) ile ağ örgüsü (network) oluşturuldu. Bölgelere göre ayrı ayrı olacak şekilde haplotip çeşitliliğini ve nükleotid çeşitliliğini tanımlayıcı istatistikleri de, DnaSP v.5 (Librado ve Rozas, 2009) programı kullanılarak hesaplandı ve çeşitlilik değerlerinin standart sapmaları da ayrıca belirtildi.

3.3.2 Çift Enzim RAD dizileme (ddRAD) Verilerinin İstatistiksel Analizi

Macrogen firmasından tarafımıza gönderilen ham Illumina dizi verileri STACKS programı (Catchen ve diğ., 2011, 2013) ile hizalandı. Bu işlemler sonrasında 64 birey (Batı Karadeniz:34, Doğu Karadeniz:7, TBS:20, Ege Denizi:3) için bir RAD veri seti elde edildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: RAD veri seti elde edilen mutur bireylerinin örneklenme mevkiileri.

Popülasyonlar arasında farklılaşmayı gösteren F_{st} değerleri de yine STACKS programı kullanılarak hesaplandı. STACKS programı analizleri Tablo 3.10'da verilen analiz sırası izlenerek, Tablo 3.11'de verilen komutlarla gerçekleştirildi.

Tablo 3.10: STACKS programında yapılan analiz sırası.

Analiz İsmi	Açıklama
Process_radtags	Analizlerin en baştaki belki de en önemli basamağıdır. Örneklerin barkod eşleştirmesine ve isimlendirmesine olanak sağlar.
Denovo_map	
ustacks	Kısa-okuma dizi setlerini input dosyası olarak alır ve tam olarak eşleşen yığınlar (stacks) veya varsayılan aleller ile align eder. Yığınların (stackslerin) karşılaştırılması, bir dizi varsayılan loci oluşturacak ve her bir locustaki SNP'leri maksimum olasılık çerçevesi kullanarak tespit edecektir.
ctacks	Ustacks veya pstacks programları tarafından oluşturulan ve işlem gören herhangi bir örnek kümesinden -bireylere ait okumalardan-bir katalog oluşturulabilir. Allelleri bir araya getirmek için bir dizi consensus loci oluşturacaktır.
sstacks	estacks ile lokusların kataloglarının oluşturulmasından sonra sstacks (set of catalogs) ile bu lokusların bireylerdeki dağılımı gerçekleştirilir. Bireylere ait lokuslar kataloglarla karşılaştırılır, lokuslar ve haplotipler inşa edilir.
populations	Filtrasyon. Bu basamakta population programı ile -p -m -r parametreleri ile filtrasyon yapılır.

Tablo 3.11: STACKS programında yapılan analiz sürecinde kullanılan komutlar.

Komut ismi	Komut Bloğu
process_radtags	process_radtags -1 input dosyası_1 -2 input dosyası_2 -b barcode dosyası -o output dosyası --renz_1 ecoRI --renz_2 sbfI -r -c -q -D --inline_index --adapter_1 AATTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC --adapter_2 GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT -- adapter_mm 2
denovo_map	denovo_map.pl -samples input dosyası --popmap harita dosyası -o output dosyası

populations	populations -P input dosyası -k -p -r -m --min_maf --structure
-------------	--

STACKS programında kullanılan populations komutu 3 farklı filtre kullanılarak uygulanmıştır. Uygulanan filtreler ve filtre seçenekleri Tablo 3.12’de verilmiştir. Parametrelerin açıklamaları Tablo 3.13’te verildi.

Tablo 3.12: Kullanılan filtreler, filtreleme seçenekleri ve parametreler.

	Filtre 1	Filtre 2	Filtre 3
k	Var	Var	Var
p	0	3	3
m	0	0	3
r	0	0.1	0.5
min-maf	0	0.1	0.25
structure	Evet	Evet	Evet
genepop	Evet	Evet	Evet
fstats	Evet	Evet	Evet
bootstrap	Evet	Evet	Evet

Tablo 3.13: Kullanılan parametlerin açıklaması.

Parametre	Açıklama
k	kernel smoothing
p	bir popülasyon içindeki paylaşılan lokus sayısı
m	her bir birey için minimum kapsama derinliği
r	bir popülasyon içindeki bireylerin minimum yüzdesi

min-maf	bir lokusta bir nükleotit bölgesini işlemek için gereken minimum minör alel frekansını belirtin
structure	structure analizi için çıktı dosyası oluşturma
genepop	genepop analizi için çıktı dosyası oluşturma
fstats	popülasyonlar arası farklılaşma
bootstrap	bootstrap metodu

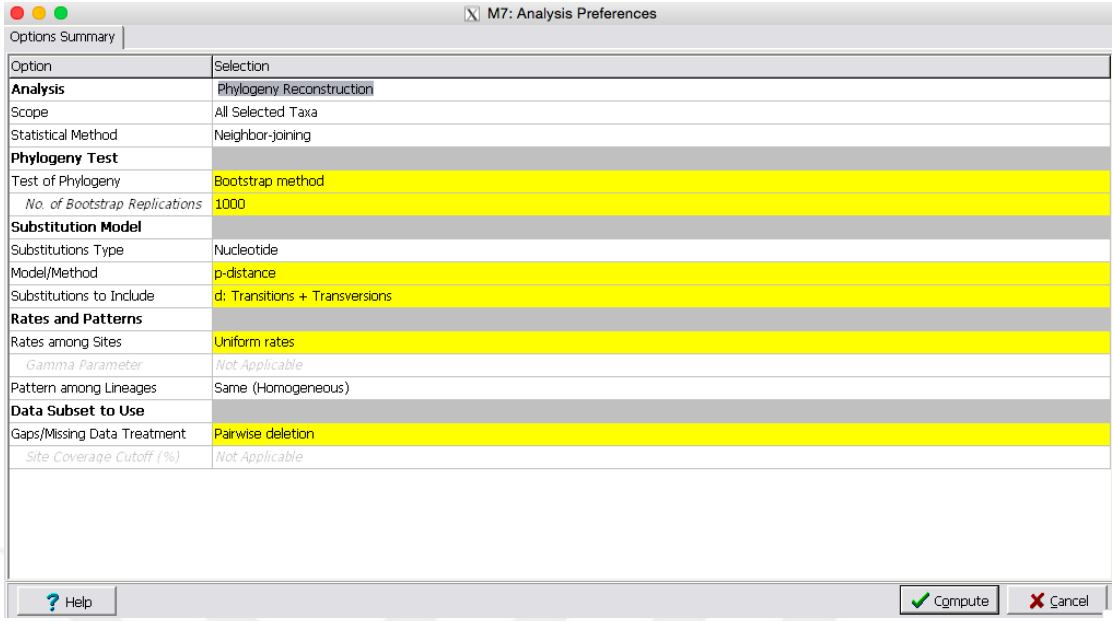
Popülasyonlar arasındaki farklılaşmaları gösteren Fst değerleri hesaplandı ve Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 için ayrı tablolarda gösterildi. Ek olarak farklı popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri her üç filtre için hesaplandı.

“Populations” komutuyla gerçekleştirilen filtreleme sonucunda oluşan sonuçlara göre, lokuslar üzerinden hesaplanan popülasyonlar arasındaki farklılık/benzerlik değerleri hesaplandı ve Fst değerlerine göre excel programı kullanılarak Fst grafikleri çizildi. Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 uygulanarak gen çeşitliliği ve haplotip çeşitliliğini ifade eden grafikler oluşturuldu.

Her üç filtre için popülasyonlardaki polimorfik lokus yüzdesi, popülasyona özel alel sayısı hesaplanıp grafikleri çizildi. Yine “populations” komutuyla gerçekleştirilen filtreleme sonucunda oluşan ve bireyler bazındaki lokuslardaki kayıp (missing) ve kayıp olmayan (non-missing) veri yüzdelere göre bazı bireyler değerlendirmeden çıkarıldı.

Bu aşamadan sonraki analizlere, 4 birey RAD veri setinden çıkarılarak %10 kayıp (missing) data yüzdesini sağlayan 60 bireylik bir RAD veri seti ile devam edildi.

En sıkı filtreleme seçeneği olan Filtre 3 sonucu oluşan veri dosyaları kullanılarak MEGA (Kumar, 2016) programında bootstrap metodu (1000 tekrarlı) ve pairwise deletion kullanılarak yakın bağlantı ağaçları çizildi. Kullanılan seçenekler Şekil 3.14’te verildi.



Şekil 3.14: MEGA’da yakın bağlantı ağacı çizilirken kullanılan seçenekler.

Daha sonra yine RAD veri seti kullanılarak genetik çeşitlilik analizi yapılmıştır.

Structure (Pritchard ve diğ., 2000) programı kullanılarak *Structure* Analizi yapıldı ve K değeri *Structure* Harvester programında hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1 MİTOKONDRIYAL (MTDNA) DİZİLEME SONUÇLARI

4.1.1 Ortaya Çıkarılan Haplotiplerin Dağılımı

Türkiye kıyılarından toplanan 88 adet mutur türüne ait doku örneklerinden elde edilen mtDNA dizileri, aynı zamanda, Viaud-Martinez ve diğ. (2007) ve Tonay ve diğ. (2017b) çalışmalarında bulunan haplotipler ile karşılaştırıldığında 14 farklı haplotip varlığı ortaya çıkarıldı ve bu haplotiplerden beş tanesinin daha önce herhangi bir çalışmada bulunmayan yeni haplotipler olduğu anlaşıldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Haplotiplerin dağılımı (Hap I, VIII, X, XI, XV, XVI, XVII, XVIII, XXXII, Viaud-Martinez ve diğ. (2007) ve Tonay ve diğ. (2017b)'deki haplotipler; (BK: Batı Karadeniz, DK: Doğu Karadeniz, TBS: Türk Boğazlar Sistemi, E: Ege Denizi).

Örnek No	Dizi Kodu	Bölge	Haplotip
7004	p1	BK	Hap I
10041	p6	DK	Hap I
10042	p7	DK	Hap I
10043	p8	DK	Hap I
10045	p9	DK	Hap I
10046	p10	DK	Hap I
10049	p11	DK	Hap I
11050	p15	DK	Hap I
11051	p16	DK	Hap I
11052	p17	DK	Hap I
11053	p18	DK	Hap I
13005	p22	TBS	Hap I
13031	p23	TBS	Hap X
13036	p24	TBS	Hap I

13056	p25	BK	Hap I
14002	p26	E	Hap I
14008	p27	TBS	HapXVIII
14021	p28	E	Hap I
15003	p29	TBS	Hap I
15009	p30	BK	Hap I
15011	p31	TBS	Hap I
15013	p32	TBS	Hap I
15017	p33	BK	Hap X
15018	p34	BK	Hap I
15022	p35	BK	Hap XI
15031	p36	BK	Hap I
15038	p37	BK	Hap I
15039	p38	BK	Hap XVI
99010	p39	BK	Hap I
7019	p41	BK	Hap I
8028	p42	BK	HapXVIII
11006	p44	BK	Hap I
11012	p45	BK	Hap I
11029	p46	BK	Hap I
11048	p47	DK	Hap XI
12052	p48	BK	Hap I
12053	p49	TBS	Hap XVII
12054	p50	BK	Hap I
12062	p51	BK	Hap I

12069	p52	BK	Hap I
12071	p53	BK	Hap I
8026	p57	BK	Hap I
9035	p58	BK	Hap VIII
10006	p59	DK	Hap I
10018	p60	BK	Hap I
16021	p61	BK	Hap I
16022	p62	BK	Hap I
16023	p63	BK	Hap XI
16024	p64	BK	Hap I
16025	p65	BK	Hap I
16026	p66	BK	Hap I
16027	p67	BK	Hap I
16028	p68	BK	Hap I
16029	p69	BK	Hap I
16031	p70	TBS	Hap I
16032	p71	BK	Hap I
16033	p72	BK	Hap XV
16034	p73	BK	Hap I
16035	p74	BK	Hap I
16036	p75	BK	Hap I
16037	p76	BK	Hap XVI
16038	p77	BK	Hap I
16039	p78	BK	Hap XI
16040	p79	BK	Hap I

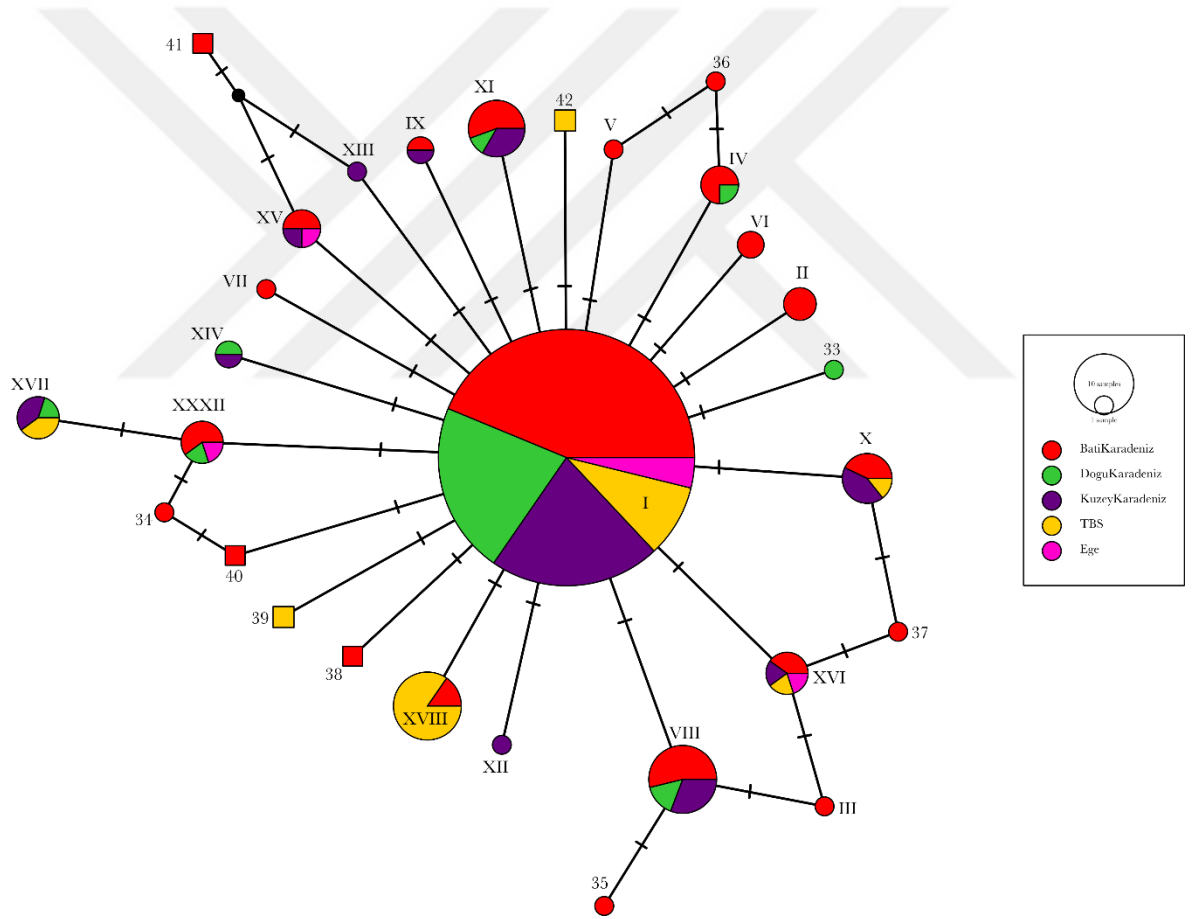
16044	p80	DK	Hap I
16043	p81	BK	38 (yeni)
13020	p87	TBS	Hap I
16002	p88	TBS	39 (yeni)
16016	p89	TBS	HapXVIII
16018	p90	TBS	HapXVIII
16045	p91	BK	Hap I
16049	p92	TBS	HapXVIII
16051	p93	BK	Hap I
16053	p94	TBS	Hap XVII
17006	p96	BK	Hap I
17007	p97	DK	HapXXXII
17010	p98	DK	Hap I
17011	p99	BK	Hap I
17014	p100	BK	40 (yeni)
17016	p101	DK	Hap I
17024	p102	BK	41 (yeni)
17028	p103	TBS	HapXVIII
18003	p104	TBS	HapXVIII
18007	p105	DK	Hap I
18011	p106	DK	Hap I
18017	p107	TBS	Hap I
18022	p108	TBS	42 (yeni)
18027	p109	DK	Hap I

En yaygın Karadeniz haplotipi olan Hap I'in 63 adet bireyde bulunduğu ortaya çıkarıldı. Daha önceki çalışmalar sonucu ağırlıklı olarak Marmara Denizi'nde bulunan özgün haplotip (Hap XVIII), bu proje çalışması sürecinde altı tanesi aynı bölgeden (TBS) olmak üzere toplam yedi adet bireyde daha görüldü.

Daha evvel herhangi bir çalışmada ortaya çıkarılmamış ve mevcut çalışmada bulunan beş yeni haplotipten (38, 39, 40, 41, 42), üç tanesi Batı Karadeniz'de diğer iki tanesi TBS'de bulundu.

4.1.2 Oluşturulan Ağ Örgüsü

PopART programı (2012) ile ağ örgüsü (network) oluşturuldu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Muttur bireyleri için oluşturulan ağ örgüsü.

Mutur bireyleri için oluşturulan ağ örgüsünde roma rakamı ile gösterilen haplotipler Viaud-Martinez ve diğ. (2007)'de, 33, 34, 35, 36 ve 37 numaralı haplotipler ise, Tonay ve diğ. (2017b)'de bulunan haplotipleri göstermektedir. 38, 39, 40, 41 ve 42 numaralı haplotipler mevcut tez çalışmasında bulunan ve daha önce başka herhangi bir çalışmada bulunmayan haplotipleri ifade etmektedir. Dairelerin boyutları her haplotipin frekansı ile doğru orantılıdır. Haplotipler arasındaki her çizgi, haplotipler arasındaki tek bir mutasyon basamağı temsil eder.

4.1.3 Φ_{st} sonuçları

Mevcut çalışmadaki ve daha önceki çalışmalardaki tüm mutur örnekleri analizlere dahil edildi ve örneklenme bölgelerine göre farklı alt popülasyonlarla ifade edildi; 1-Batı Karadeniz, 2-Doğu Karadeniz, 3- Kuzey Karadeniz, 4- Türk Boğazlar Sistemi (TBS), 5- Ege Denizi). Arlequin (Excoffier ve Lischer, 2010) programı kullanılarak ve ikili gruplar oluşturularak Φ_{st} hesaplandı ve mutur alt popülasyonlarının birbirleriyle olan genetik izolasyonu incelendi. Arlequin programında popülasyonlar arası ikili farklılıklara bakılarak hesaplanan Φ_{st} değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir. “*” istatistiksel olarak anlamlı bir genetik farklılaşma gösterir.

Tablo 4.2: Mutur için Φ_{st} değerleri.

	Batı Karadeniz	Doğu Karadeniz	Kuzey Karadeniz	TBS	Ege Denizi
Batı Karadeniz	0,00000				
Doğu Karadeniz	-0,00455	0,00000			
Kuzey Karadeniz	-0,00382	-0,00540	0,00000		
TBS	0,09589*	0,13203*	0,11547*	0,00000	
Ege Denizi	-0,02311	0,00149	-0,01280	0,07894	0,00000

Φ_{st} hesaplamaları, Marmara Denizi alt popülasyonunun (burada Türk Boğazlar Sistemi'nden tüm örnekler dahil edilerek TBS alt popülasyonu olarak ifade edilmiştir), Karadeniz'deki diğer mutur alt popülasyonlarından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılaşma gösterdiğini belirtmektedir.

4.1.4 Haplotip ve Nükleotid Çeşitliliği

Mutur dizilerinin birbiriyle hizalı dizi seti kullanılarak, haplotip çeşitliliğini ve nükleotid çeşitliliğini tanımlayıcı istatistikleri, DnaSP v.5 (Librado ve Rozas, 2009) programı kullanılarak hesaplandı ve çeşitlilik değerlerinin standart sapmaları da ayrıca belirtildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Mutur'da haplotip ve nükleotid çeşitliliği (N: Örnek sayısı-Genbank'tan alınan bireyler de dahil edilmiştir, H: Haplotip sayısı, Hd: Haplotip çeşitliliği, π : Nükleotid çeşitliliği, S.D.: Standart sapma).

Bölgeler	N	H	Hd	π
Tümü	274	29	0,538 (+0,037=1S.D.)	0,00205 (+0,00018=1S.D.)
Batı Karadeniz	124	22	0,569 (+0,054=1S.D.)	0,00224 (+0,00027=1S.D.)
Doğu Karadeniz	48	8	0,308 (+0,087=1S.D.)	0,00106 (+0,00037=1S.D.)
Kuzey Karadeniz	58	11	0,520 (+0,079=1S.D.)	0,00191 (+0,00037=1S.D.)
TBS	34	7	0,658 (+0,060=1S.D.)	0,00259 (+0,00050=1S.D.)
Ege Denizi	10	4	0,533 (+0,180=1S.D.)	0,00170 (+0,00067=1S.D.)

En yüksek haplotip ve nükleotid çeşitliliği, TBS'de görülmektedir. Batı Karadeniz'deki haplotip ve nükleotid çeşitliliği de TBS'den sonra en yüksek olarak bulunmuştur. Nükleotid çeşitliliği sonuçlarına bakıldığında, çeşitlilik TBS'de, Batı Karadeniz'de ve Kuzey Karadeniz'de diğer popülasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur.

4.2 ÇİFT ENZİM RAD (DDRAD) DİZİLEME SONUÇLARI

4.2.1 İstatistiksel ve Taksonomik Analizler

4.2.1.1 *Fst* Sonuçları

Popülasyonlar arasındaki farklılaşmaları gösteren *Fst* değerleri hesaplandı.

Filtre 1 sonucunda 16383 adet lokus kullanılarak hesaplanmış Fst değerleri Tablo 4.4'te, Filtre 2 sonucunda 5485 adet lokus kullanılarak hesaplanan değerler Tablo 4.5'te, Filtre 3 sonucunda 559 adet lokus kullanılarak hesaplanan değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Burada Hap XVIII, muturda bulunmuş olan ve Marmara Denizi'ndeki özgün haplotipe sahip bireyleri (n=9) göstermektedir.

Tablo 4.4: Filtre 1 sonucu popülasyonlar arası Fst değerleri.

Filtre 1	TBS	Doğu Karadeniz	Hap XVIII	Batı Karadeniz	Ege Denizi
Türk Boğazlar Sistemi (TBS)	0				
Doğu Karadeniz	0.233576	0			
Hap XVIII	0.205529	0.265252	0		
Batı Karadeniz	0.20992	0.223688	0.191491	0	
Ege Denizi	0.289806	0.307666	0.406881	0.256541	0

Filtre 1 sonucu Fst sonuçlar genel olarak yüksek değerlere işaret etmektedir.

Tablo 4.5: Filtre 2 sonucu popülasyonlar arası Fst değerleri.

Filtre 2	TBS	Doğu Karadeniz	Hap XVIII	Batı Karadeniz	Ege Denizi
Türk Boğazlar Sistemi (TBS)	0				
Doğu Karadeniz	0.130992	0			
Hap XVIII	0.101357	0.166861	0		
Batı Karadeniz	0.0622456	0.0927441	0.0654406	0	
Ege Denizi	0.20464	0.278191	0.320822	0.189835	0

Tablo 4.6: Filtre 3 sonucu popülasyonlar arası Fst değerleri.

Filtre 3	TBS	Doğu Karadeniz	Hap XVIII	Batı Karadeniz	Ege Denizi
Türk Boğazlar Sistemi (TBS)	0				
Doğu Karadeniz	0.0379673	0			
Hap XVIII	0.0468493	0.0696655	0		
Batı Karadeniz	0.0135879	0.0203899	0.029801	0	
Ege Denizi	0.0438059	0.0893321	0.0806704	0.0223834	0

Bunlara ek olarak da farklı popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri de Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 için olacak şekilde Tablo 4.7’de, Tablo 4.8’de ve Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Filtre 1 sonucu popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri.

Popülasyon	Popülasyona Özel SNPlar	Çeşitlilik gösteren SNP sayısı	Çeşitlilik Gösteren SNP Yüzdesi
Türk Boğazlar Sistemi (TBS)	5880	17552	0,0847
Doğu Karadeniz	6718	18215	0,0845
Hap XVIII	3592	9828	0,0651
Batı Karadeniz	17991	51738	0,0895
Ege Denizi	2008	4798	0,1241

Tablo 4.8: Filtre 2 sonucu popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri.

Popülasyon	Popülasyona Özel SNPler	Çeşitlilik gösteren SNP sayısı	Çeşitlilik Gösteren SNP Yüzdesi
Türk Boğazlar Sistemi (TBS)	122	3870	0,2468
Doğu Karadeniz	98	3168	0,1947
Hap XVIII	44	2278	0,1943
Batı Karadeniz	395	4638	0,2859
Ege Denizi	87	651	0,1065

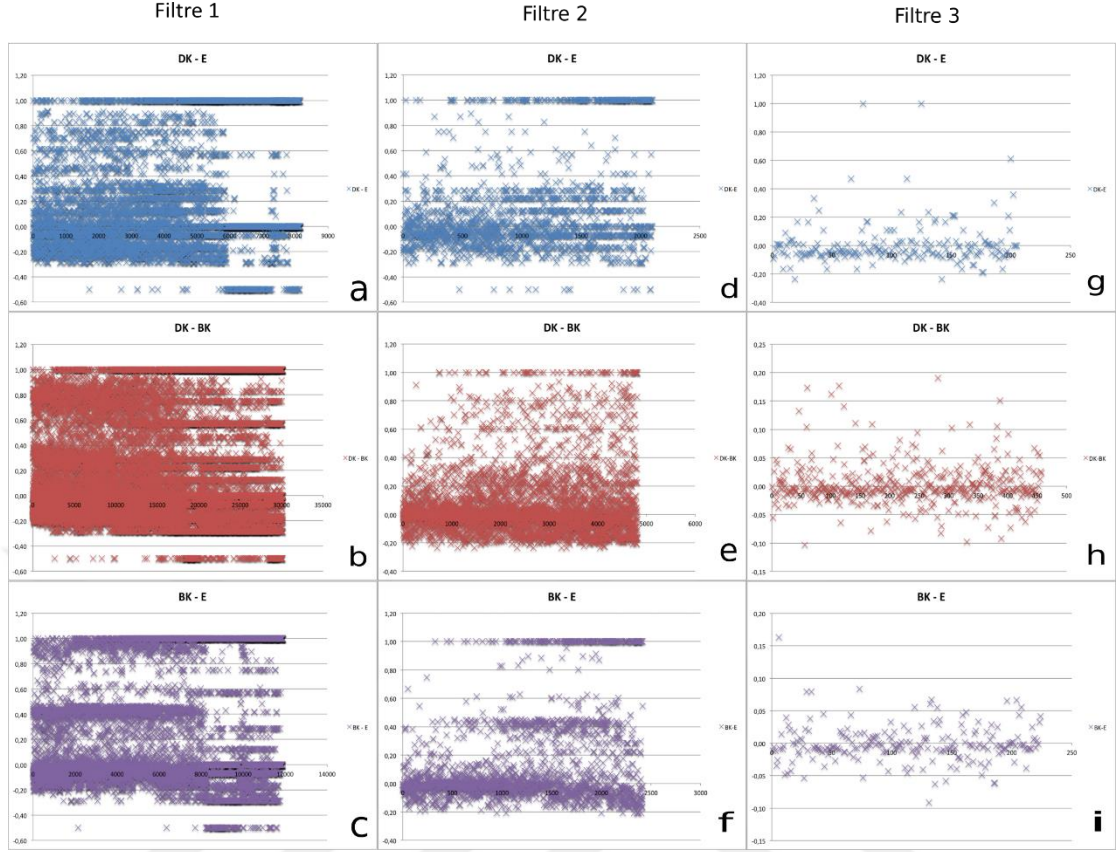
Tablo 4.9: Filtre 3 sonucu popülasyonlara ait genetik çeşitlilik değerleri.

Popülasyon	Popülasyona Özel SNPler	Çeşitlilik gösteren SNP sayısı	Çeşitlilik Gösteren SNP Yüzdesi
Türk Boğazlar Sistemi (TBS)	0	541	0,1644
Doğu Karadeniz	0	464	0,1547
Hap XVIII	0	435	0,1624
Batı Karadeniz	0	536	0,1626
Ege Denizi	0	190	0,1333

Filtre 3 sonucunda popülasyona özel SNP'lerin "0" olma nedeni, lokus sayısı azaldıkça ortak tutulan lokuslar seçiliyor ve bu durum da popülasyona özel alel sayısını azaltmaktadır.

Burada özellikle Filtre 2 sonucunda Batı Karadeniz'de çeşitlilik gösteren SNP yüzdesinin en yüksek olması (%28) ve bunu TBS'nin (%24) takip ettiği görülmüştür (Tablo 4.8). Yine popülasyonlara özel SNPler'de de aynı iki bölge en yüksek değerlere sahiptir.

Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucunda hesaplanan popülasyonlar arası farklılığı/benzerliği gösteren F_{st} değerleri Şekil 4.2'de grafik şeklinde verilmiştir.

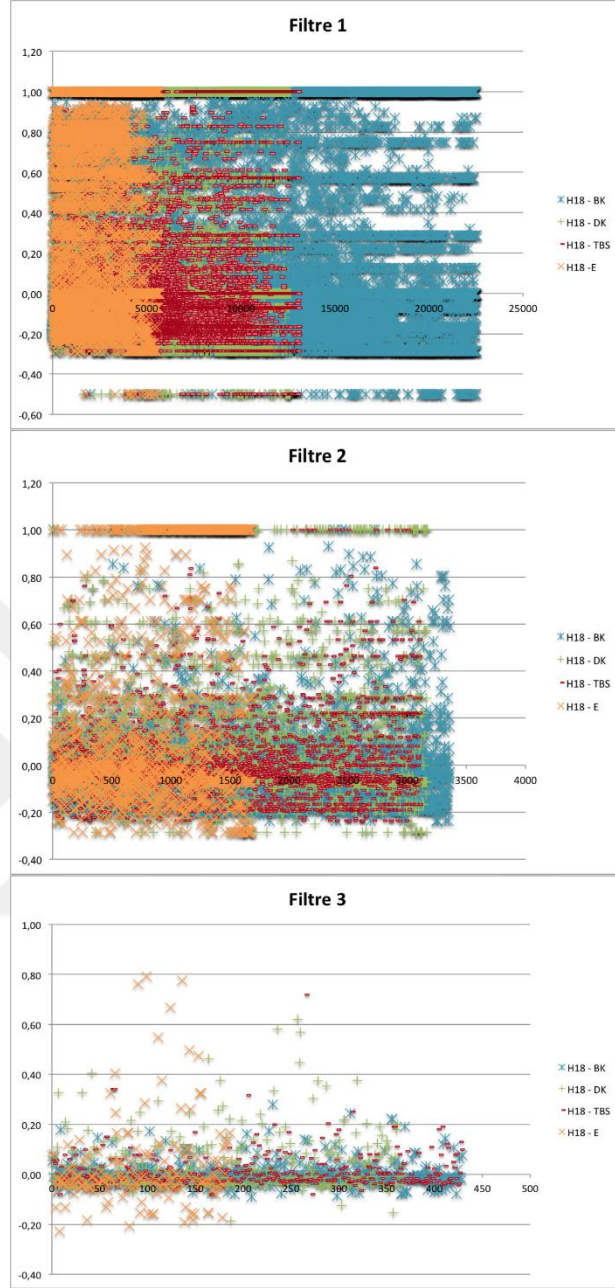


Şekil 4.2: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu Doğu Karadeniz (DK), Batı Karadeniz (BK) ve Ege Denizi (E) popülasyonları için hesaplanan Fst'ler.

Filtre 1, filtre 2, filtre 3 sonuçlarına bakıldığında, filtre 1 sonucunda Doğu Karadeniz ve Ege popülasyonlarının birbirinden genetik olarak farklı olup olmadıkları toplam 8150 lokus üzerinden Fst hesaplanarak ortaya çıkarıldı.

Filtre 2 için, aynı popülasyonlarda 2099 adet lokus analiz edilirken, filtre 3 için Fst hesaplanan lokus sayısı 206'dır. Filtre 1 uygulandığında, Doğu Karadeniz-Ege, Doğu Karadeniz-Batı Karadeniz, Batı Karadeniz-Ege şeklinde ikili popülasyon analizinde nispeten yüksek Fst değerlerinin mevcut olduğu görüldü, fakat, filtreleme seçenekleri sıkılaştıkça Fst değerlerinin düştüğü görüldü.

Burada Fst değerleri popülasyonlar arasındaki farklılaşmayı gösterir.

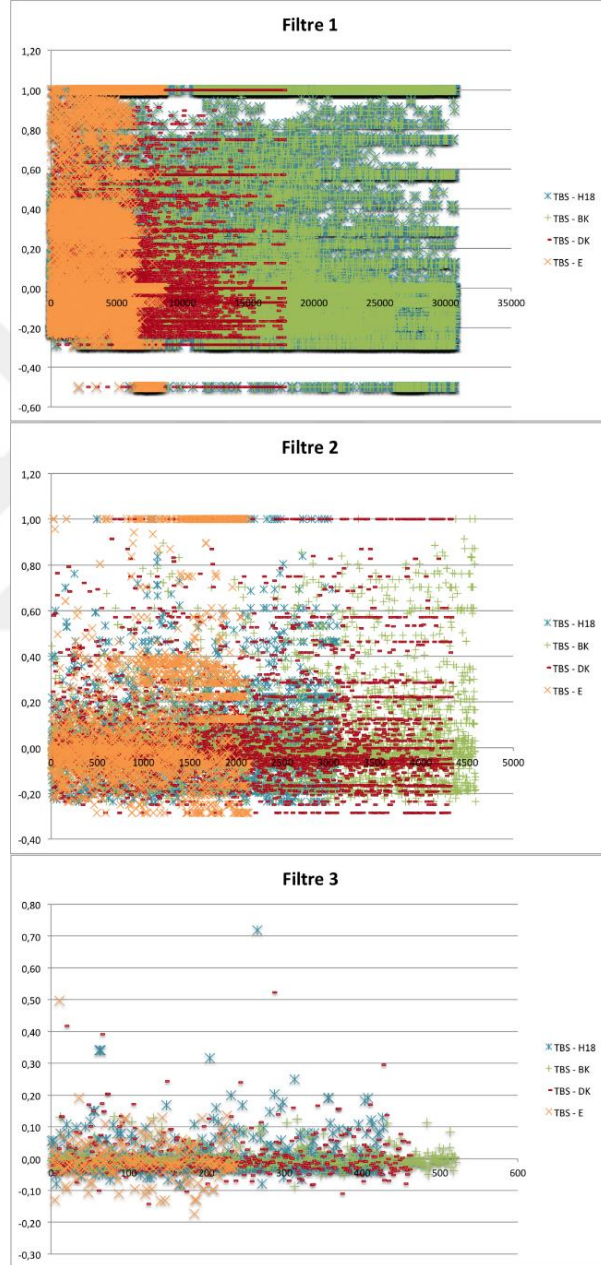


Şekil 4.3: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu H18 (özgün XVIII haplotipine sahip Türk Boğazlar Sistemi'nde örneklenen bireyleri içeren) ve diğer popülasyonlar arasında hesaplanan F_{st} 'ler.

Şimdiye kadar muturların üzerinde mtDNA belirteci kullanılarak yapılan çalışmalarda, sadece Marmara Denizi'ndeki bazı bireylerde saptanan eşsiz mtDNA haplotipi, Hap XVIII olarak tanımlandı ve bu haplotipe sahip 9 birey ddRAD dizileme analizlerindeki H18 isimli popülasyon olarak gösterildi.

H18 ve diğer popülasyonlar arasında hesaplanan Fst değerlerine bakıldığında, Filtre 1 ve Filtre 2 sonucunda, H18-Ege Denizi ikili popülasyon karşılaştırmasında yüksek Fst değerleri görüldü (Şekil 4.3).

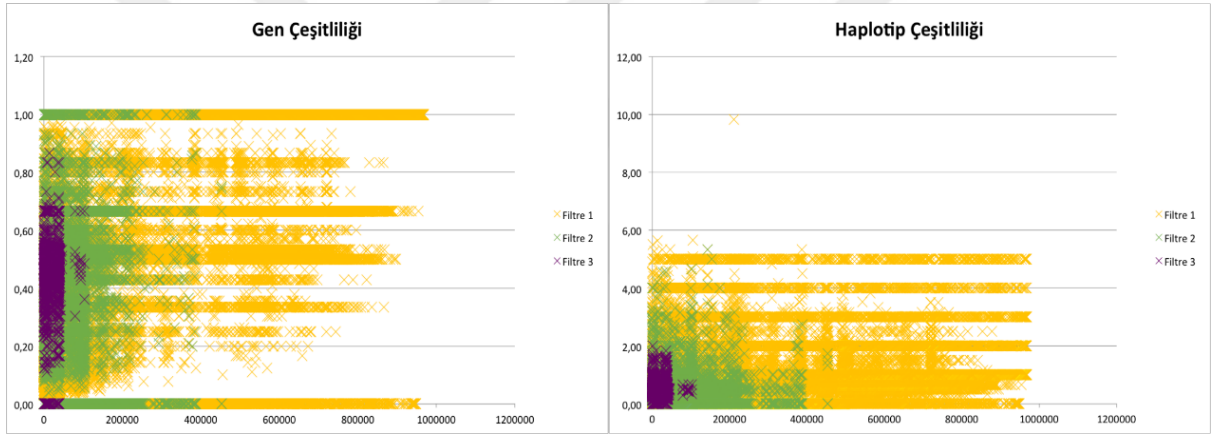
Filtre 3 sonucunda da, bazı lokuslar için nispeten yüksek Fst değerleri tespit edildi.



Şekil 4.4: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu TBS ve diğer popülasyonlar için hesaplanan Fst'ler.

Türk Boğazlar Sistemi ve diğer popülasyonlar arasında hesaplanan F_{st} 'lere bakıldığında, filtreleme seçeneklerinin en az sıkı olduğu seçenek olan Filtre 1 sonucunda, yüksek F_{st} değerleri tespit edildi (Şekil 4.4). Özellikle TBS-E ikili popülasyon karşılaştırması sonucunda F_{st} değerlerinin yüksek olduğu görüldü. Filtreleme seçenekleri sıkılaştıkça, daha düşük F_{st} değerlerinin ortaya çıktığı görüldü. Filtre 3 sonuçlarına bakıldığında, TBS-BK popülasyonları arasında F_{st} değerleri genelde 0 değerinde toplanırken, TBS-H18 ve TBS-DK popülasyonları arası F_{st} değerleri daha yüksek olarak ortaya çıkarılmıştır. TBS-E popülasyonları F_{st} sonuçlarında görüldüğü gibi az sayıda locus ortaya çıkmıştır, bu da az veri olduğunu göstermektedir. Bu popülasyonlarda örnek sayısı da diğer popülasyonlara göre azdır.

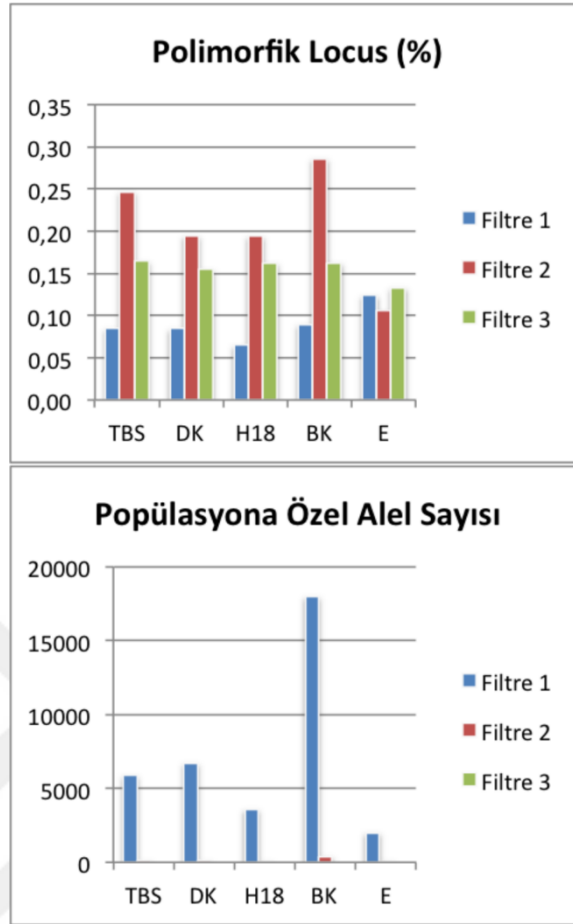
Her 3 filtre için gen çeşitliliği ve haplotip çeşitliliği grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu Gen ve Haplotip çeşitliliği sonuçlarını gösteren grafikler.

Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 uygulandığında en yüksek locus sayısının Filtre 1 sonucunda ortaya çıktığı görüldü. Yani, filtreleme seçenekleri, sıkılaştıkça locus sayısının azaldığı görüldü. Gen çeşitliliği her üç Filtre sonucunda da yüksek değerlerle ifade edildi. Haplotip çeşitliliği sonuçlarına bakıldığında, filtreleme seçenekleri, sıkılaştıkça hem locus sayısı hem de haplotip çeşitliliği azalmaktadır.

Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 uygulanarak popülasyonlardaki polimorfik lokus yüzdesi, popülasyona özel alel sayısı grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



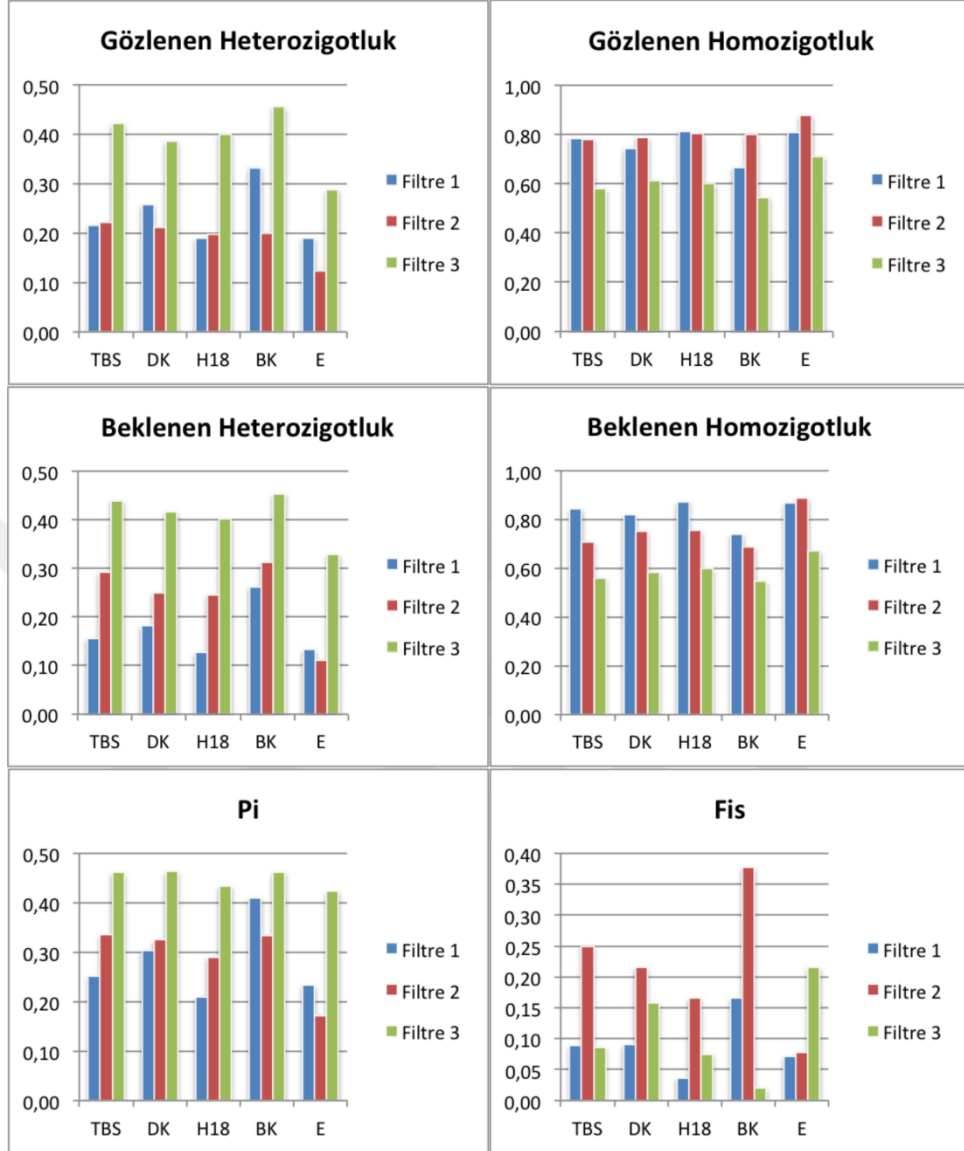
Şekil 4.6: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu popülasyonlar bazında ortaya çıkarılan polimorfik lokus yüzdesi ve popülasyona özel alel sayısı.

En yüksek polimorfik lokus yüzdesi değerleri orta sıklıkla ifade edilen Filtre 2 uygulanması sonucunda ortaya çıkarıldı. Popülasyonlar bazında bakıldığında en yüksek polimorfik lokus Batı Karadeniz popülasyonunda tespit edildi.

Filtreleme seçenekleri, sıkılaştıkça “popülasyona özel allel sayısı”nın azaldığı görüldü. Popülasyona özel en yüksek allel sayısı, en az sıkı olan Filtre 1 uygulandığında, Batı Karadeniz popülasyonunda tespit edildi. Sonrasında sırasıyla Doğu Karadeniz, TBS, H18 ve en düşük olarak da Ege popülasyonu bulundu.

Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 uygulanarak popülasyonlardaki gözlenen ve beklenen heterozigotluk, gözlenen ve beklenen homozigotluk, P_i ve F_{is} değerlerini gösteren grafikler Şekil 4.7’de verildi.

Değişken Pozisyonlar

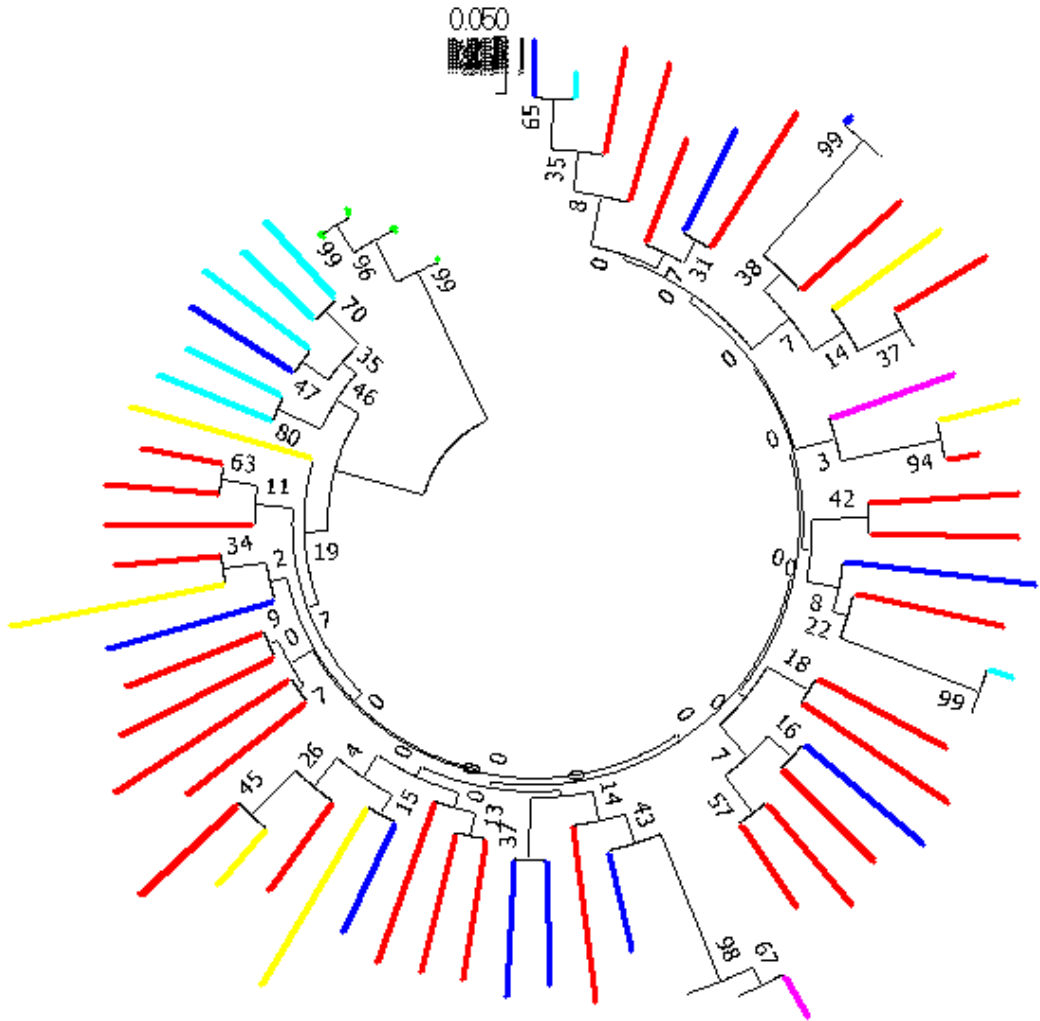


Şekil 4.7: Filtre 1, Filtre 2 ve Filtre 3 sonucu popülasyonlar bazında hesaplanan gözlenen ve beklenen heterozigotluk, gözlenen ve beklenen homozigotluk, Pi ve Fis değerleri.

En sıkı filtreleme seçeneğini içeren Filtre 3 sonucunda, gözlenen ve beklenen heterozigotluk yüksek bulundu. Aynı şekilde, Pi değeri de en sıkı filtre olan Filtre 3’de tespit edildi. Fis değerleri orta seviyede sıkı olan Filtre 2 uygulandığında en yüksek olarak bulundu.

4.2.1.2 Filogenetik Ağaç Analizi Sonuçları

MEGA programı kullanılarak çizilen yakın bağlantı ağacı (Şekil 4.8) aşağıda verilmiştir. Komşu birleştirme metodu (neighbor joining (NJ)) kullanılmıştır. Ağaç, filogenetik ağacı çizmek için kullanılan evrimsel uzaklıklarla aynı birimlerdeki dal uzunlukları ile ölçeklendirilir. Evrimsel uzaklıklar p-mesafe yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Analiz 64 nükleotid dizisini içerir. Tüm belirsiz pozisyonlar her bir dizi çifti için çıkarılmıştır. Son veri setinde toplam 559 pozisyon vardır.



Şekil 4.8: Mutur için MEGA’da oluşturulan yakın bağlantı ağacı; kırmızılar Batı Karadeniz bireylerini, sarılar Doğu Karadeniz bireylerini, açık mavi H18’e sahip bireyleri, koyu mavi TBS’deki bireyleri, morlar Ege bireylerini, yeşiller de tırtakları ifade eder.

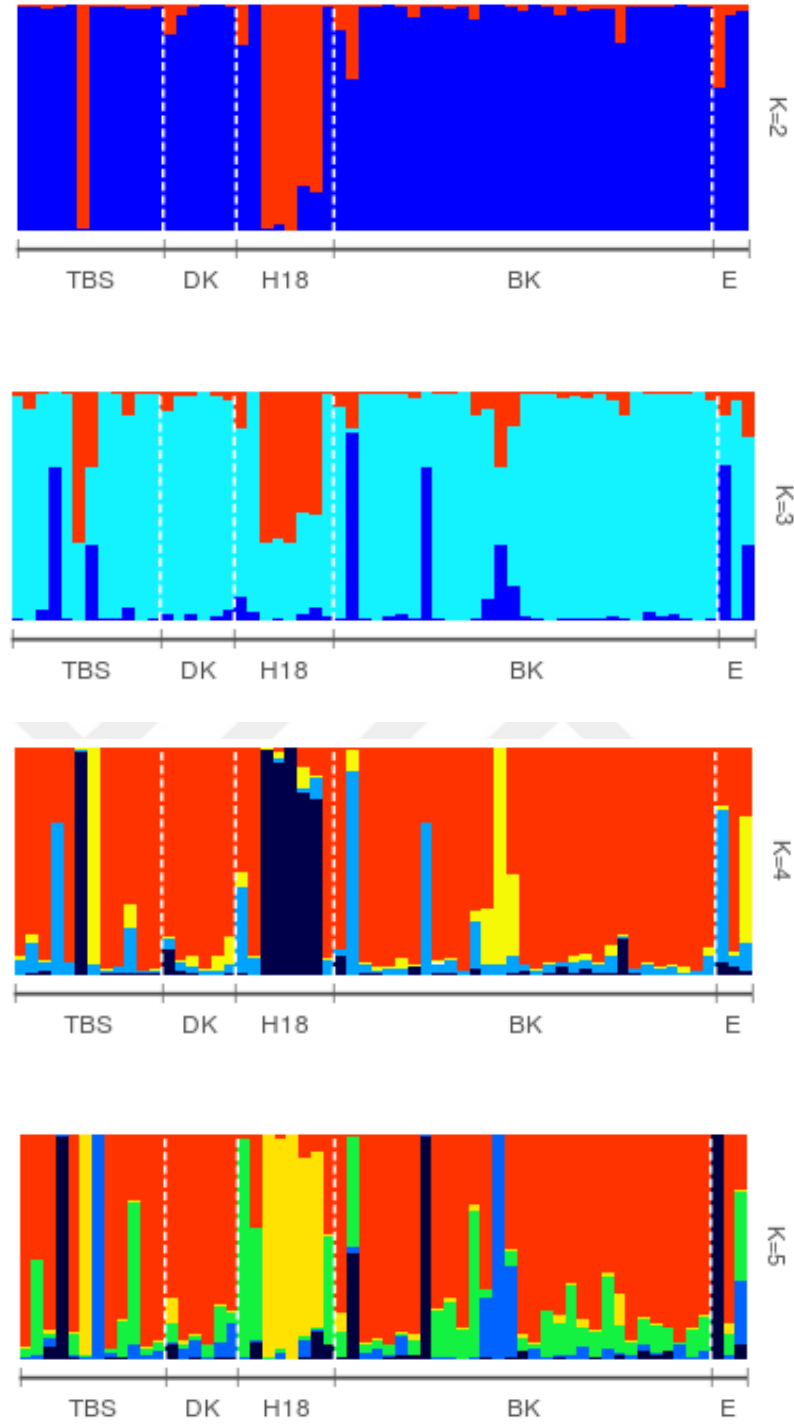
Oluşturulan yakın bağlantı ağaçlarında özellikle özgün XVIII haplotipine sahip bireylere (n=8) baktığımızda, bireylerden 5 tanesinin beraber gruplandığı görüldü. Bu 5 birey de TBS’de örneklenen bireylerdir. Bu bireyler yine TBS’de örneklenen bir başka mutur bireyi ile beraber kümelendi.

Özgün Hap XVIII’e sahip diğer 3 bireyin ağacın farklı dallarında kümelendikleri görüldü. Hap XVIII’e sahip TBS bireylerinin yakın gruplandığı bazı kladlar, bu bireylerin aralarında akrabalık ilişkileri olabileceğine işaret eder.

4.2.1.3 Structure Analizi

Structure programı kullanılarak *Structure* Analizi yapıldı ve K değeri hesaplamaları Structure Harvester programında belirlendi. Bir çubuk bir bireye ve renkler farklı kümelere karşılık gelmektedir. Her bireyin renginin oranı, karşılık gelen kümeler için üyelik olasılıklarına karşılık gelir.

Analiz sonucunda özellikle K=2’ye bakıldığında, Hap XVIII (H18)’e sahip bireylerin diğer denizlerde dağılım gösteren popülasyonlardan ayrıldıkları görüldü. TBS’de bulunan ve uzun kırmızı çubuk ile ifade edilen bireyin ve H18’deki uzun kırmızı çubuklar ile ifade edilen bireylerin aynı özellik bakımından o kümeye dahil olma olasılığı yüksektir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *Structure* ile yapılan analizin bar plot ile gösterimi. K=2, K=3, K=4 ve K=5 kümelenmesinde popülasyonlar arası karışımın görüntülenmesi, kümeleme analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Muturlar üç alt türe ayrılmaktadır. Bunlar; Kuzey Pasifik'teki *Phocoena phocoena vomeria*, Kuzey Atlantik'teki *Phocoena phocoena phocoena* (Fontaine ve diğ., 2014) ve Karadeniz'deki *Phocoena phocoena relict*'dir (Notarbartolo di Sciara ve Birkun, 2010; Fontaine ve diğ., 2014). İberya ve Moritanya kıyılarındaki mutur popülasyonunun ise yukarıdaki üç alt türden farklı bir alt tür ile temsil edildiği bildirilmiş ve *Phocoena phocoena meridionalis* olarak adlandırılmıştır (Fontaine ve diğ., 2014).

Bugüne kadar mtDNA sekansları ve mikrosatellit veri analiz çalışmaları da, bu morfolojik farklılıkları desteklemekte, Karadeniz ve Atlantik muturlarının birbirinden günümüzden yaklaşık 7000 yıl önce ayrıldıklarını ve bağımsız evrimsel yollar izlediklerini göstermektedir (Rosel ve diğ., 1995; Fontaine ve diğ., 2010, 2014). Türün Karadeniz popülasyonu, IUCN Kırmızı Listesi'nde, nesli tehlike altında (EN) statüsünde yer almaktadır (Birkun, 2008).

Bu zamana kadar Karadeniz muturları ile ilgili mikrosatellit belirteçleri ile çekirdek DNA'sının analiz edilmesiyle yapılmış çalışmalar, Karadeniz kıyıları boyunca yaşayan tüm mutur popülasyonlarının birbiriyle genetik olarak çok benzer olduğunu ve tek bir alt tür ile (*Phocoena phocoena relict*) temsil edildiklerini göstermektedir (Fontaine ve diğ., 2007, 2014; Lah ve diğ., 2016). Karadeniz, Azak Marmara ve Ege Denizi'nden 144 örneğin dahil edildiği, mtDNA genomunun ¼'ün ve 10 mikrosatellit lokusunun analiz edildiği bir çalışma sonucunda bu bölgelerdeki tüm popülasyonların bir genetik homojenlik içerisinde olduğu bildirilmektedir (Cheida ve diğ., 2019). Komşu denizler arasındaki bağlantı (Aydoğdu ve diğ., 2018), muturun diğer bölgelerde bildirilen çok geniş dağılıma yeteneği ve habitat işgali göz önüne alındığında, Karadeniz mutur popülasyonunda bu tür bir homojenlik beklenebilir (Nielsen ve diğ., 2018).

Mevcut doktora tezi sürecinde en yaygın Karadeniz haplotipi olan Hap I, 53 tanesi Karadeniz'den, 8 tanesi Türk Boğazlar Sistemi'nden (TBS), 2 tanesi de Ege Denizi'nden olmak üzere 63 adet mutur bireyinde bulundu. Bu yaygın haplotipin Türkiye sularındaki varlığı ve yüksek sayıda bireyde görülmesi şimdiye kadar yapılan önceki çalışmalar sonucunda da ortaya çıkarılmıştır (Tonay ve diğ., 2017b).

Bu yaygın haplotipin TBS'de bulunması, Karadeniz'deki muturların bu boğazlar aracılığıyla Ege Denizi'ne dağılmış olma fikrini desteklemektedir (Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Rosel ve diğ., 2003).

Marmara Denizi'nde özellikle İzmit Körfezi'nde örneklenen muturlar üzerine mtDNA belirteci ile yapılan genetik çalışmalar sonucunda, bazı bireylerde tespit edilen ve neredeyse sadece Marmara Denizi'nde görülen bir haplotipin (Hap XVIII) varlığı, izole bir mutur popülasyonu olabileceği fikrini desteklemektedir (Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Tonay ve diğ., 2012b, 2017b). Her ne kadar Karadeniz'de görülen bazı haplotipler Marmara Denizi'ndeki mutur bireylerinde de görülse de, haplotiplerin genel dağılımına bakıldığında Marmara'da istatistiksel olarak anlamlı olarak farklılaşmış ayrı bir mutur popülasyonu olduğu söylenebilir (Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Tonay ve diğ., 2017b).

Daha önceki çalışmalar sonucu (Viaud-Martinez ve diğ., 2007; Tonay ve diğ., 2012b, 2017b) ağırlıklı olarak Marmara Denizi'nde bulunan özgün haplotip (Hap XVIII), bu doktora tezi çalışması sürecinde altı tanesi aynı bölgeden -Marmara Denizi- olmak üzere toplam yedi adet bireyde daha gözlemlendi. Bu haplotipin Marmara Denizi'nden altı adet bireyde daha bulunması, aynı zamanda, haplotip frekansları üzerinden yapılan Φ_{st} sonuçlarına göre de TBS popülasyonunun diğer Karadeniz popülasyonlarından anlamlı ve genetik olarak farklı olması, Marmara Denizi'nde izole bir mutur popülasyonu olduğu fikrini desteklemektedir.

Bu özgün haplotipin 1999 yılında İstanbul Boğazı'nın Karadeniz çıkışında bir bireyde görülmüş olması (Tonay ve diğ., 2017b) ve mevcut tez çalışmasında İstanbul Boğazı'nın çıkışında bir bireyde daha kaydedilmesi Marmara Denizi'ndeki bu izole mutur popülasyonunun Marmara Denizi dışına yayılmasını gösteriyor olabilir. Fakat, bu haplotipin ne örnek sayısı az olan Ege Denizi'nde ne de yüksek örnek sayısı barındıran Karadeniz popülasyonunda bulunmamış ve sadece Marmara Denizi'nde bulunmuş olması Marmara Denizi'ndeki izole mutur alt popülasyonunun varlığını desteklemektedir.

mtDNA dizileri üzerinden belirlenen istatistiksel analizlere göre, en yüksek haplotip ve nükleotid çeşitliliğinin TBS'de görülmesi ve Batı Karadeniz'deki haplotip ve nükleotid çeşitliliğinin TBS'den sonra en yüksek olarak bulunması bu bölgelerdeki popülasyonların atasal popülasyon olabileceğini göstermektedir. Bu aynı durum Tonay ve diğ. (2017b) sonuçlarında da görülmektedir. Marmara Denizi'ndeki yüksek haplotip çeşitliliği, bu denizin

potansiyel izolasyonunun bir başka göstergesi olan özgün XVIII haplotipinin yüksek frekansından da kaynaklanmaktadır.

Öte yandan, Doğu Karadeniz'deki ve Ege Denizi'ndeki haplotip çeşitliliğinin nispeten düşük olması, bu bölgelerdeki alt popülasyonların daha yakın zamanda kurulmuş olabileceğini düşündürmektedir, ancak bu nokta üzerinde düşünülürken bu denizlerdeki örnek sayısının nispeten düşük olması dikkate alınmalıdır.

Daha evvel herhangi bir çalışmada ortaya çıkarılmamış ve mevcut çalışmada bulunan beş yeni haplotipten (38, 39, 40, 41, 42), üç tanesi Batı Karadeniz'de diğer iki tanesi TBS'de bulundu. Şimdiye kadar herhangi bir çalışmada bulunmamış yeni haplotiplerin ortaya çıkarılması bundan sonra yapılacak çalışmalar için veri tabanı oluşturacaktır.

Türkiye Denizleri'nde yaşayan muturların genetik yapısı aynı zamanda ddRAD dizileme belirteçleri kullanılarak da incelenmiştir.

Çift enzim RAD (ddRAD) dizileme sonucu yapılan genetik çeşitlilik analizlerinde de özellikle Batı Karadeniz'de genetik çeşitliliğin (çeşitlilik gösteren SNP oranının %28 oranı ile en yüksek çıkmış olması, bu bölgenin tarihsel olarak mutur popülasyonları için en eski atasal popülasyonların yaşadığı bölge olabileceği fikrine işaret etmektedir.

Buna paralel bir şekilde aynı istatistik için TBS'de görülen %24'lük değer de bu iki bölge arasında tarihsel ve eski bir bağlantıya işaret etmektedir. Buna karşın F_{st} değerlerinin bütün popülasyonlar arasında farklı çıkmış olması, daha yakın (ekolojik) zaman dönemlerinde bu popülasyonlar arasında gen akımının azalmış olabileceğine işaret etmektedir.

Aynı şekilde Batı Karadeniz ve TBS popülasyonlarına özel SNP'lerin sayılarının da en yüksek düzeyde olması genetik çeşitliliğe paralel bir sonuçtur. Genel anlamda da bütün popülasyonlarda bulunan, o popülasyona özel SNP sayılarının yükseklikleri de Φ_{st} değerlerindeki farklılaşmaya paraleldir ve büyük ihtimalle popülasyonlar arası Φ_{st} değerlerinin yüksek çıkmasının da sebeplerinden biridir.

Filogenetik ağaç analizlerine bakıldığında, tırtak bireyleri bir dış grup olarak kümelenirken özellikle özgün XVIII haplotipine sahip bireylere ($n=8$) baktığımızda, bireylerden 5 tanesinin beraber gruplandığı görüldü. Bu 5 bireyin de TBS'de örneklenen bireyler olması ve bu

bireylerin yine TBS’de örneklenen bir başka mutur bireyi ile beraber kümelenmesi bu bölgede - Marmara Denizi - diğer bölgelerden farklı ve diğer bölgelerde bulunmayan bireyleri barındıran bir mutur popülasyonu olduğunu göstermektedir. Hap XVIII’e sahip TBS bireylerinin yakın gruplandığı bazı kladlar, bu bireylerin aralarında akrabalık ilişkileri olabileceğine işaret eder. Bunların yanısıra, oluşturulan yakın bağlantı ağaçlarında Batı Karadeniz ve Türk Boğazlar Sistemi’nden örneklenen bireylerin yan yana dallarda beraber kümelenmeleri, daha uzun evrimsel zaman dilimlerinde popülasyonlar arası gen akımına işaret etmektedir. Başka bir deyişle, özgün XVIII haplotipine sahip ve TBS’den bazı bireylerin yakın gruplandığı bazı kladlar, bu bireylerin aralarında akrabalık ilişkileri olabileceğini göstermektedir.

Çift enzim RAD dizileme (ddRAD) dizileme sonucu yapılan *Structure* analiz sonuçları da filogenetik ağaç analizi sonuçlarını desteklemektedir. *Structure* sonucu özgün XVIII haplotipine sahip bireylerin diğer popülasyondaki bireylerden farklılaştığı görülmektedir. Aynı yöntem Lah ve diğ. (2016)’da Karadeniz popülasyonunu diğer popülasyonlardan ayırmaktadır.

Sonuç olarak; Karadeniz, Marmara Denizi ve Ege Denizi birbiriyle bağlantılı denizler olmasına rağmen mevcut doktora tezi sürecinde yapılan hem mtDNA belirteci analiz sonuçları hem de ddRAD sonuçları ışığında Marmara Denizi’nde bir mutur alt popülasyonu varlığından bahsedebiliriz. Başka bir deyişle, şimdiye kadar mtDNA’da bulunan farklılaşma çekirdek DNA’da da bulunmuştur.

İstanbul ve Çanakkale Boğazları, Kuvaterner döneminde periyodik olarak kapanıp açılmış, fakat yaklaşık 8400 yıl öncesinden bu yana daimi olarak açık bulunmaktadır (Major ve diğ., 2002; Rohling ve diğ., 2009). Fontaine ve diğ. (2010, 2012, 2014), buzul çağı ve buzulçağı sonrası dönemde, muturların Akdeniz’den Atlas Okyanusu’na (yani İber ve Moritanya upwelling bölgeleri) ve Karadeniz’e geçerek oralara yerleştiklerini önermektedir. Şu anda muturlar Akdeniz’de düzenli olarak gözlenmemektedir (Hammond ve diğ., 2008). Fontaine ve diğ. (2012) çok az mutur bireyinin yeni açılan boğazı geçerek Karadeniz’e gelebildiğini ve burada en fazla 7000 yıl önce demografik bir genişleme başlattığını önermektedir. Ayrıca, Karadeniz’in Akdeniz ile tekrar bağlantılı hale gelmesinden sonra, deniz koşullarının daha önceki hiposalin su kütlesinin sahip olduğu koşullara geri dönmesi (Rohling ve diğ., 2009), böylelikle muturların yerleşmesi ve yayılması için uygun habitat koşullarının sağlanması için biraz zaman gerektiği de iddia edilebilir. Bu durum ayrıca, Batı Karadeniz ve TBS alt

popülasyonlarının neden daha atasal olabileceğini açıklayabilir, çünkü bu 'göçmenler' başlangıçta Karadeniz'in geri kalanına dağılmadan önce bu alanlarda kalıp vakit geçirmiş olabilirler.

Marmara Denizi'nde bu türün bireyleri (muturun mtDNA ve ddRAD sonuçları ışığında farklı genetik yapıya sahip bireyler için ve bu alt popülasyondaki bu önemli haplotipin varlığının korunmasının sağlanması için hassas bir koruma stratejisi gerekmektedir. Marmara Denizi'nin doğusunda olan İzmit Körfezi, dip uzatma ağları ile balıkçılık yapılan bir bölgedir. Körfez içerisinde Yalova'da 3 adet mutur bireyinin dip uzatma ve fanyalı ağlarda tesadüfi ağa yakalandığı, bir diğer bireyde ise ağ izleri bulunduğu bildirilmiştir (Tonay ve diğ., 2007b).

Tür koruma stratejisi açısından, muturların tesadüfi ağa takılma önlemlerinin alınmasının bir an önce başlatılmasını ve/veya İzmit Körfezi'nden dip uzatma ağları ile yapılan balıkçılığın mutur popülasyonlarının üzerine etkisinin çalışılması ve gerekirse avcılığın sınırlandırılması önerilmektedir. Ayrıca Marmara Denizi'deki balık avcılığının takibi ve bölgede deniz koruma alanlarının oluşturulması önerilmektedir. TBS sistemi, Karadeniz ve Ege Denizi arasında yunuslar için bir göç yoludur, dolayısıyla buradaki yunus hareketlerinin uzun dönemli izleme çalışmalarının devam ettirilmesi önemlidir.

1983 yılına kadar yoğun avcılığı yapılan, günümüzde 1380 Sayılı Su Ürünleri Kanunu ile koruma altında olan yunus türleri üzerinde tehdit oluşturan tesadüfi ağa yakalanma, besin kaynaklarının azalması, habitat kaybı, su kirliliği ve kitlesel ölüm olaylarıyla sonuçlanan epizootik olaylar ne yazık ki devam etmektedir. Denizlerin sadece biyolojik çeşitliliği değil aynı zamanda türlerin genetik çeşitliliğinin de korunması gerekmektedir. Genetik çeşitliliğin korunması türlerin değişen çevre koşullarına uyum sağlama noktasında, uyarlanımsal potansiyelin korunması konusunda da önemlidir (Vachon ve diğ., 2018). Bu çeşitliliğin ortaya konması da ancak bu çalışma gibi daha fazla çalışmanın desteklenmesi ile elde edilebilecektir.

Mevcut çalışma sonucu elde edilen yeni mtDNA dizileri Genbank'a yüklenecek ve dizilerin erişim numaraları alınacaktır. Özellikle şimdiye kadar herhangi bir çalışmada bulunmamış yeni haplotiplerin ortaya çıkarılması bundan sonra yapılacak çalışmalar için önemlidir.

Haplotiplerin Genbank'a yüklenerek verinin görünür hale getirilmesi, bundan sonra hem Türkiye'de hem Dünya'da yapılacak çalışmalar için verilerin karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır. Böylelikle ilerde bu türler için yapılacak genetik çalışmalar az örnek içeriyor olsa

dahi verileri karşılaştırma imkanı olacağından önemli sonuçlar elde edilmesine imkan sağlanacaktır.



KAYNAKLAR

- Arnason, U., Lammers, F., Kumar, V., Nilsson, M.A., Janke, A., 2018, Whole-genome sequencing of the blue whale and other rorquals finds signatures for introgressive gene flow, *Science Advances*, 4, 4- eaap9873.
- Autenrieth, M., Hartmann, S., Lah, L., Roos, A., Alice B., Dennis, Ralph Tiedemann., 2018, High quality whole genome sequence of an abundant Holarctic odontocete, the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*), *Molecular Ecology Resources*, 18 (6), 1469-1481.
- Aydoğdu, A., Pinardi, N., Özsoy, E., Danabasoglu, G., Gürses, Ö., Karspeck, A., 2018, Circulation of the Turkish Straits System under interannual atmospheric forcing, *Ocean Sci*, 14, 999–1019.
- Baker, C.S., Dalebout, M.L., 2009, Forensic Genetics. Encyclopedia of marine mammals, In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M. (Eds.) Second Edition, *Academic Press*, USA, ISBN 978-0-12-373553-9, 530-533.
- Bearzi, G., Holcer, D., Notarbartolo di Sciara, G., 2004, The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 14, 363- 379.
- Bilgin, S., Onay, H., Köse, O., Yeşilçiçek, T., 2018 Karadeniz’de Karaya Vuran ve Kazara Yakalanan Yunuslar (Cetacea) Hakkında: Ölüm Nedenleri, Beslenme Özellikleri ve Gebelik Durumu, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(4), 447–454.
- Birkun, A.Jr., 2006, Black Sea Cetaceans: an overview of research and conservation aspects, *Abstract book of the Black Sea Ecosystem 2005 and Beyond. 1st Biannual Scientific Conference*. 8-10 May 2006, Istanbul, Turkey. Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution. 110-113.
- Birkun, A. Jr., Frantzis, A., 2006, *Harbour porpoise (Phocoena phocoena relicta) Black Sea subspecies*, The status and distribution of Cetaceans in the Black Sea and Mediterranean Sea., Reeves R., Notarbartolo di Sciara G. (compilers and editors), IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain.
- Birkun, A.Jr., 2008, *The state of Cetacean populations*, State of the environment of the Black Sea (2001-2006/7), Temel Oğuz (Ed), Chapter 10, Publication of the Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution (BSC), Istanbul, Turkey, ISBN: 978-9944-245-33-3.
- Birkun, Jr., A. A., Frantzis, A., 2008, *Phocoena phocoena ssp. relicta*, The IUCN Red List of Threatened Species 2008, <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T17030A6737111.en>, [Ziyaret tarihi: 26 Ocak 2020].
- Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W. Postlethwait, J. H., 2011, Stacks: Building and Genotyping Loci de Novo from Short-Read Sequences, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1, 171-182.

- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A., Cresko, W.A., 2013, Stacks: an analysis tool set for population genomics, *Molecular Ecology*, 22, 3124–3140.
- Chehida, B., Thumloup, Y., Vishnyakova, J. K., 2019, Genetic homogeneity in the face of morphological heterogeneity in the harbor porpoise from the Black Sea and adjacent waters (*Phocoena phocoena relicta*), *Heredity*. doi: 10.1038/s41437-019-0284-1.
- Chutimanitsakun, Y., Nipper, R.W., Cuesta-Marcos, A., Cistué, L., Corey, A., Filichkina, T., Johnson, E.A., Hayes, P.M., 2011, Construction and application for QTL analysis of a Restriction Site Associated DNA (RAD) linkage map in barley, *BMC Genomics*, 2011, 12:4.
- Cucknell, A., Frantzis, A., Boisseau, O., Romagosa, M., Ryan, C., Tonay, A., Alexiadou, P., Öztürk, A., Moscrop, A., 2016, Harbour porpoises in the Aegean Sea, Eastern Mediterranean: the species' presence is confirmed, *Marine Biodiversity Records*, 9, 72. 9:72 DOI 10.1186/s41200-016-0050-5.
- DaCosta ve Sorenson, 2014, Boston University ddRAD-seq laboratory protocol.
- Davey, J. W., Blaxter, M. L., 2010, Radseq: Next-Generation Population Genetics, *Briefings in Functional Genomics*, 9, 416-423.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., Blaxter, M. L., 2011, Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing, *Nat. Rev. Genet.*, 12, 499–510.
- Dede, A., Öztürk, A.A., Tonay, A. M., 2008, Cetacean Surveys in the Istanbul (Bosphorus) Strait in 2006, *Proc. 22nd Annual Conf. ECS*, Egmond aan Zee, the Netherlands.
- Dede, A., Tonay, A.M., Öztürk, A.A., Öztürk, B., 2016, *Status of the marine mammals population of the Sea of Marmara*, The Sea of Marmara Marine Biodiversity, Fisheries, Conservation and Governance, In: Özsoy, E., Çağatay, M.N., Balkıs, Ne., Balkıs, Nu., Öztürk, B. (Eds.), TÜDAV, İstanbul, ss.863-879.
- Deveciyan, K., 1926, *Türkiye’de balık ve balıkçılık*, Aras Yayıncılık, İstanbul, ISBN 975-7265-75-6.
- Evans, P.G.H., Raga, J.A., 2001, *Marine mammals: biology and conservation*, London & New York: Kluwer Academic/Plenum Press.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L., 2010, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Resour.*, 10, 564-7.
- Fontaine, M. C., Baird, S. J. E., Piry, S., Ray, N., Tolley, K. A., Duke, S., Birkun, A., Ferreira, M., Jauniaux, T., Llavona, A., Oztürk, B., Oztürk A. A., Ridoux, V., Rogan, E., Sequeira, M., Siebert, U., Vikingsson, G. A., Bouqueneau, J. M., Michaux, J. R., 2007, Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters, *BMC Biol.*, 5, 30. doi:10.1186/1741-7007-5-30.

- Fontaine, M. C., Tolley, K. A., Michaux, J. R., Birkun, J.A., Ferreira, M., Jouniaux, T., Llavona, A., Öztürk, B., Ayaka, A.Ö., Ridoux, V., Rogan, E., Sequeira, M., Bouquegneau, J.M., Baird, S.J.E., 2010, Genetic and historic evidence for climate-driven population fragmentation in a top cetacean predator: the harbour porpoises in European water, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277, 2829-2837.
- Fontaine, M.C., Alodie Snirc, A., Frantzis, A., Koutrakis, E., Birkun, A., Jr, Ozturk, B., Ozturk, A.A., Austerlitz, F., 2012, A history of expansion and anthropogenic collapse in a top marine predator of the Black Sea estimated from genetic data, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, E2569–E2576.
- Fontaine, M. C., Roland, K., Calves, I., Austerlitz, F., Palstra, F. P., Tolley, K. A., Ryan, S., Ferreira, M., Jauniaux, T., Llavona, A., Öztürk, B., Öztürk, A. A., Ridoux, V., Rogan, A., Sequeira, M., Siebert, U., Vikingsson, G. A., Borrell, A., Michaux, J. R., Aguilar, A., 2014, Postglacial climate changes and rise of three ecotypes of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in western Palearctic waters, *Molecular Ecology*, 23, 3306-3321.
- Fontaine, M.C., 2016, Harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in the Mediterranean Sea and adjacent regions: biogeographic relicts of the last glacial period), *Advances in Marine Biology*, 75: 333-358.
- Frantzis, A., Gordon, J., Hassidis, G., Kommenou, A., 2001, The enigma of harbor porpoise presence in the Mediterranean Sea, *Marine Mammal Science*, 17, 937–944.
- Galatius, A., Gol'din, P.E., 2011, Geographic variation of skeletal ontogeny and skull shape in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Canadian Journal of Zoology*, 89(9), 869-879.
- Geraci, R.J., Louninsbury, J.V., 2005, *Marine Mammals Ashore, A Field Guide for Strandings*, 2nd ed., U.S.A: National Aquarium in Baltimore.
- Güçlüsoy, H., 2007, The first confirmed report of the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the Turkish Aegean Sea, *JMBA2 - Biodiversity Records*. Published on-line.
- Hammond, P.S, Bearzi, G., Bjørge A., Forney, K., Karczmarski, L., Kasuya, T., Perrin, W.F, Scott, M.D, Wang, J.Y, Wells, R.S., Wilson, B., 2008, *Phocoena phocoena*. The IUCN Red List of Threatened Species, [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2019].
- Holsinger, K., Weir, B.S., 2009, Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} , *Nature Reviews Genetics*, 10, 639-65.
- Jefferson, A.T., Leatherwood, S., Webber A.M., 1993, *Marine Mammals of the World*, United Nations Environment Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, ISBN 92-5-103292-0.
- Kalkan, E., 2013, *Investigating the role of the Turkish straits system as a phylogeographical break in the mediterranean–Black Sea transition*, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi Çevre Bilimleri Enstitüsü.
- Kleinenberg, S. E., 1956., *Mammals of the Black Sea and Azov Sea*, 249 sayfa.

- Krivokhizhin, S., Birkun, A., Jr., Shpak, O., Mukhametov, L., 2006, Offshore harbour porpoises in the central Black Sea, In: *Abstr. 20th Annual Conf. of the European Cetacean Society* (Gdynia, 2-7 Nisan 2006).
- Kumar, S.S., 2016, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular biology and evolution*, 33 (7), 1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lah, L., Benke, H., Berggren, P., Gunnlaugsson, Þ., Lens, S., Lockyer, C., Öztürk, A. A., Öztürk, B., Pawliczka, I., Roos, A., Siebert, U., Skóra, K., Tiedemann, R., 2016, Spatially explicit analysis of genome-wide SNPs detects subtle population structure in a mobile marine mammal, the harbor porpoise, *PLoS ONE*, 11(10): e0162792.
- Lee, K., Lee, J., Cho, Y., Sohn, H., Choi, Y., Lim, S.R., Kim, H.K., Yoon, S.W., Jeong, D.G., Kim, J.H., 2018, Characterization of the complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of the common dolphin *Delphinus delphis* (Cetacea: Delphinidae), *Mitochondrial DNA Part B*, 3:2, 632-633.
- Librado, P., Rozas, J., 2009, DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Llavona, V.A., Ferreira, M., López, A., Vingada, J.V., Pierce, G.J., Dabin, W., Deaville, R., Jauniaux, T., Rogan, E., Tonay, A. M., Dede, A., Brownlow, A., Laria, L., Fernández, C., Cermeño, P., Piertney, S.B., 2014, Population genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* across Europe: implications for management, *Abstract book of 28th Annual Conf. European Cetacean Society*, Liege, Belgium, 77.
- Magoulas, A., Castilho, R., Caetano, S., Marcato, S., Patarnello, T., 2006, Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*), *Mol Phylogenet Evol.*, 39, 734-746.
- Major, C., Ryan, W., Lericolais, G., Hajdas, I., 2002, Constraints on Black Sea outflow to the Sea of Marmara during the last glacial-interglacial transition, *Mar Geol.*, 190, 19-34.
- Nielsen, N.H., Teilmann, J., Sveegaard, S., Hansen, R.G., Sinding, M., Dietz, R., Heide-Jørgensen, M.P., 2018, Oceanic movements, site fidelity and deep diving in harbour porpoises from Greenland show limited similarities to animals from the North Sea, *Marine Ecology Progress Series*, 597, 259-272.
- Notarbartolo-di Sciara, G., Birkun, A. Jr., 2010, Conserving whales, dolphins and porpoises in the Mediterranean and Black Seas, *ACCOBAMS status report*, ACCOBAMS, Monaco.
- Öztürk, B., 1996, *Balina ve Yunuslar-Setolojiye Giriş*, Anahtar Kitaplar Yayınevi, İstanbul.
- Öztürk, B., Öztürk, A.A., 1996, On the biology of the Turkish straits system, *Bulletin de l'Institut Oceanographique*, 205-221.
- Palumbi, S.R., Baker, C.S., 1994, Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales, *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 426-435.

- Paris, J., Stevens, J., Catchen, J., 2017, Lost in parameter space: a road map for Stacks, *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 1360–1373.
- Perrin, F.W., Geraci, R.J., Würsig, B., Thewissen, J. G. M., 2009, *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd Ed, Academic Press, USA.
- Peterson, B.K., Weber, J.N., Kay, E.H., Fisher, H.S., Hoekstra, H.E., 2012, Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species, *PLoS ONE*, 7(5), e37135.
- PopArt, 2012, Population analysis with reticulate trees, version 1.7.2 Dunedin, New Zealand, <http://popart.otago.ac.nz> [Ziyaret tarihi: 14 Nisan 2019].
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155: 945–959.
- Radu, G., Anton, E., Nenciu, M., Spînu, A.D., 2013, Distribution and Abundance of Cetaceans in the Romanian Marine Area, *Cercetări Marine*, 43, 320-341.
- Reeves, R.R., Notarbartolo di Sciara, G., 2006, *The Status and Distribution of Cetaceans in the Black Sea and Mediterranean Sea*, ACCOBAMS Workshop Report - Monaco 5-7 March 2006, IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain.
- Reich, D., Feldmanand, M., Goldstein, D., 1999, Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions, *Mol. Biol. Evol.*, 16, 453-466.
- Rohling, E. J., Abu-Zieb, R., Casford, J. L. S., Hayes, A., Hoogakker, B. A. A., 2009, *The marine environment: present and past*, In: Woodward JC, editor. In the physical geography of the Mediterranean, Oxford, UK: Oxford University Press, p. 33–67.
- Rosel, P.E., Dizon, A.E. Haygood, M.G., 1995, Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena*, on interoceanic and regional scales, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(6), 1210-1219.
- Rosel, P.E., Tiedemanná, R., Walton, M., 1999, Genetic evidence for limited trans-Atlantic movements of the harbor porpoise *Phocoena phocoena*, *Marine Biology*, 133, 583-591.
- Rosel, P.E., Frantzis, A., Lockyer, C., Komnenou, A., 2003, Source of Aegean Sea harbour porpoises, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 247: 257-261.
- Rochette, N.C., Catchen, J.M., 2017, Deriving genotypes from RAD-seq short-read data using Stacks, *Nature Protocols*, 12, 2640-2659.
- Rowles, T.K., Van Dolah, F.M., Hohn, A.A., 2001, *Gross necropsy and specimen collection protocols*, CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, In L.A. Dierauf, F.M.D. Gulland (Eds.), 2nd Ed, CRC Press, USA.
- Rubin, B. E. R., Ree, R. H., Moreau, C. S., 2012, Inferring Phylogenies from RAD Sequence Data, *PLoS ONE*, 7(4), e33394.

- Shan, L., Tian, R. Liu, Y., 2019, The complete mitochondrial genome of the dwarf sperm whale *Kogia sima* (Cetacea: Kogiidae), *Mitochondrial DNA Part B*, 4:1, 72-73.
- Slastenenko, E.P., 1955, Karadeniz Yunus Balıkları, Nakleden Altan, H., *Hidrobiologi Mecmuası*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobioloji Araştırma Enstitüsü Yayınlarından Seri A, Cilt III, Sayı 2, (Ayrı Baskı) s: 68-89 Fakülteler Matbaası, İstanbul.
- Souza, C.A., Murphy N, Villacorta-Rath C, Woodings LN, Ilyushkina I, Cristian E. Hernandez, Bridget S. Green, James J. Bell, Jan M. Strugnell., 2017, Efficiency of ddRAD target enriched sequencing across spiny rock lobster species (Palinuridae: Jasus), *Scientific Reports*, 7, 6781.
- Sönmez, R., 2011, *A Preliminary Investigation On Genetics of Small Cetaceans In Turkey*, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi.
- Tariel, J., Longo, G.C. Bernardi, G., 2016, Tempo and mode of speciation in *Holacanthus* angelfishes based on RADseq markers, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 98, 84–88.
- TBMM, 2012, *Türkiye Büyük Millet Meclisi*, <http://www.tbmm.gov.tr/d24/1/1-0704.pdf> [Ziyaret tarihi: 13 Nisan 2019].
- Theocharis, A., Georgopoulos, D., Lascaratos, A., Nittis, K., 1993, Water masses and circulation in the central region of the Eastern Mediterranean: eastern Ionian, South Aegean and Northwest Levantine, 1986–1987, *Deep Sea Res. Pt. II*, 40, 1121–1142.
- Tonay, A.M., 2010, *Batı Karadeniz’de karaya vuran Cetacea türlerinin kalkan balığı avcılığı ile etkileşimi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 117p.
- Tonay, A.M., 2016, Estimates of cetacean by-catch in the turbot fishery on the Turkish Western Black Sea Coast in 2007 and 2008, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(4), 993–998.
- Tonay, A.M., Öztürk, B., 2003, Cetacean bycatches in turbot fishery on the western coast of the Turkish Black Sea, *International Symposium of Fisheries and Zoology*, İstanbul, 131-138.
- Tonay, A.M., Öztürk, A.A., 2012, Historical records of cetacean fishery in the Turkish seas, *J. Black Sea/Mediterr. Environ.*, 18(3), 388-399.
- Tonay, A.M., Dede, A., 2013, First stranding record of a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the Southern Aegean Sea, *J. Black Sea/Mediterr. Environ.*, 19(1), 132-137.
- Tonay, A.M., Dede, A., Öztürk, A.A., Öztürk, B., 2007a, Stomach content of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Turkish western Black Sea in spring and early summer, *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 38, 616.
- Tonay, A. M., Dede, A., Öztürk, A.A., 2007b, Stomach contents of bycaught harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Marmara Sea, *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 38: 617.

- Tonay, A.M., Dede, A., Öztürk, A.A., Ercan, D., Fernández, A., Öztürk, B., 2012a, Unusual mass mortality of Cetaceans on the coast of the Turkish Western Black Sea in summer 2009, *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 18, 65-75.
- Tonay, A.M., Dede, A., Maracı, Ö., Bilgin, R., 2012b, A preliminary genetic study on the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the Turkish Seas, *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 18, 83-89.
- Tonay, A.M., Yazıcı, Ö., Dede, A., Bilgin, S., Maracı, Ö., Öztürk, A. A., Bilgin, R., 2014, Variability of the mitochondrial control region in the populations of the Black Sea harbour porpoise (*Phocoena phocoena relicta*) in the Turkish Seas, *Abstract book of 28th Annual Conf. ECS*, Liege, Belgium. 235pp.
- Tonay, M.A., Dede A., Öztürk, A.A., 2017a, *Marine Mammals in the Turkish Coast of the Black Sea*, In: Sezgin, M., Bat, I., Ürkmez, D., Arıcı, E., Öztürk, B.(eds.) *Black Sea Marine Environment: The Turkish Shelf*. Turkish Marine Research Foundation, 46: 269-288.
- Tonay, M.A., Yazıcı, Ö., Dede, A., Bilgin, S., Danyer, E., Aytemiz, I., Maracı, Ö., Öztürk, A.A., Öztürk B., Bilgin, R., 2017b, Is there a distinct harbor porpoise subpopulation in the Marmara Sea?, *Mitochondrial DNA Part A*, 28, 558-564.
- Vachon, F., Whitehead, H., Frasier., T.R., 2018, What factors shape genetic diversity in cetaceans?, *Ecology and Evolution*, 8: 1554-1572.
- Viaud-Martinez, K.A., Milmer, M., Goldin, E.P., Ridoux, V., Ozturk, A.A., Ozturk, B., Rosel, P.E., Frantzis, A., Komnenou, A., Bohonak, A.J., 2007, Morphological and genetic differentiation of the Black sea harbour porpoise *Phocoena phocoena*, *Marine Ecology Progress Series*, 338, 281-294.
- Yang, G., Yun-Mei Chen, Jin-Peng Wang, Cen Guo, Lei Zhao, Xiao-Yan Wang, Ying Guo, Li Li, De-Zhu Li and Zhen-Hua Guo, 2016, Development of a universal and simplified ddRAD library preparation approach for SNP discovery and genotyping in angiosperm plants, *Plant Methods*, 12:39, doi: 10.1186/s13007-016-0139-1.
- Weber, L.I., Jaccottet-de Luca, M., Barreto, A.S., Tolentino de Souza, T., 2007, Successful amplification of mitochondrial DNA from dentin of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 11-19.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984, Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure, *Evolution*, 38(6), 1358-370.
- Willette, D.A., Allendorf, F.W., Barber, P.H., Barshis, D.J., Carpenter, K.E., Crandall, E.D., Cresko, W.A., Fernandez-Silva, I., Matz, M.V., Meyer, E., Santos, M.D., Seeb, L.W., Seeb, J.E., 2014, So, you want to use next-generation sequencing in marine systems?, Insight from the Pan-Pacific Advanced Studies Institute, *Bull Mar Sci.*, 90(1), 79-122.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Begüm UZUN
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	05.09.1986
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05061311687
E-Posta Adresi	begum.uzun@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ankara Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.02.2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Biyoloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı
Programı	Deniz Biyolojisi Programı

Makale ve Bildiriler	
Tonay M.A., Uzun B., Öztürk A.A., Dede A., Danyer E., Aytemiz I., Bilgin S., Öztürk B., Bilgin R. 2016. Preliminary study on population structure of the short-beaked common dolphin (<i>Delphinus delphis</i>) in the Turkish Seas based on mtDNA sequences. 1. Uluslararası Akdeniz'deki Tırtakların (<i>Delphinus delphis</i>) Korunması ve Tür için Araştırma Ağı Kurulması Çalıştayı. 38-40pp. Fernandes, I., Uzun, B., Pascoal, C., Cassio, F. 2009. Sucul Mantar Komünitelerinin Yaprak Parçalanması Üzerinden Aşırı Sıcaklığa Tepkisi. International Review of Hydrobiology, vol. 94, issue 4, pp. 410-418. Tonay M.A., Uzun B., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Amaha (Öztürk) A., ve diğ. 2018. Genetic structure of the bottlenose dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>) in the	

Turkish waters based on mtDNA sequences. 5. Ekoloji ve Evrimsel Biyoloji Sempozyumu, İzmir, Türkiye, 18-20 Temmuz 2018, vol.5, pp. 20-21.

Uzun B., Tonay M.A., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Amaha (Öztürk) A., ve diğ. 2018. Genetic investigation on the population structure of the harbour porpoises living in Turkish waters by double digest restriction associated DNA (ddRAD) sequencing. 32. Avrupa Deniz Memelileri Topluluğu (ECS) Kongresi, La Spezia, İtalya, 6-10 Nisan, 2018, vol.32, pp.79.

Uzun, B., Tonay, A.M., Dede, A., Öztürk, A.A., Öztürk, B., Bilgin, R. 2017. Population Genetic Structure of Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) in the Turkish Waters, 4. Ekoloji ve Evrimsel Biyoloji Sempozyumu, Türkiye, 11-13 Temmuz, 2017.

Tonay M.A., Dede A., Öztürk A.A., Danyer E., Aytemiz I., Uzun B., ve diğ. 2016. "Cetacean Strandings Monitoring Studies on the Turkish Western Black Sea Coast During 2003-2016", 1. Ulusal Denizleri İzleme ve Değerlendirme Sempozyumu, Ankara, Türkiye, 21-23 Aralık, 2016, pp 156-159.

Ozkan, E., Uzun, B., Soysal, M. I., Ozkorkmaz Gokalp, E., Togan I. 2011. Türkiye Yerli Koyun Irklarında PrP Genine Dayalı Skrapı Hassasiyeti: Türkiye’de Skrapıye Dirençlilik için bir yetiştirme programına ihtiyaç var mı? 8. Dünya Hayvan Genetik Kaynakları (RBI) Koruma Konferansı, Tekirdağ, Türkiye, 4-8 Ekim, 2011.

Fernandes, I., Uzun, B., Pascoal, C., Cassio, F. 2008. Sucul Mantar Komünitelerinin Yaprak Parçalanması Üzerinden Aşırı Sıcaklığa Tepkisi. 5. PLPF Kongresi, Coimbra, Portekiz, 22-25 Temmuz, 2008.

Tonay, A.M., Karaman, K., Dede, A., Danyer, E., Aytemiz Danyer, I., Uzun, B., Meray, Y., Deval, C., Ozturk Amaha, A., Bilgin, R. 2019. Genetic investigation on Cuvier’s beaked whale, *Ziphius cavirostris* on the coast of Turkey and Northern Cyprus, based on mtDNA sequences. World Marine Mammal Conference, 9-12 December 2019, Barcelona, 924.

Uzun B., Tonay M.A., Dede A., Danyer E., Aytemiz I., Bilgin S., Öztürk, A.A., Öztürk, B., Bilgin, R. 2017. "Do we need to conserve the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) population in the Marmara Sea separately? ", 31. Avrupa Deniz Memelileri Topluluğu (ECS) Kongresi, Middelfart, Danimarka, 29 Nisan – 3 Mayıs, 2017, pp.154-154.

Tonay M.A., Uzun B., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Amaha (Ozturk) A., Bilgin S., Öztürk, B., Bilgin, R. 2017. "Genetic investigation on the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) and bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Turkish seas based on mtDNA sequences", 31. Avrupa Deniz Memelileri Topluluğu (ECS) Kongresi, Middelfart, Danimarka, 29 Nisan – 3 Mayıs, 2017, pp.181-181.

Tonay M.A., Uzun B., Amaha (Ozturk) A., Dede A., Danyer E., Aytemiz I., Bilgin S., Öztürk, B., Bilgin, R. 2016. "Preliminary study on population structure of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Turkish Seas based on mtDNA sequences. ", 1. Uluslararası Akdeniz'deki Tırtakların (*Delphinus delphis*) Korunması ve Tür için Araştırma Ağı Kurulması Çalıştayı, Ischia, İtalya, 13-15 Nisan, 2016, pp.38-40.

Tonay, A.M., Uzun, B., Dede, A., Danyer, E., Aytemiz, I., Bilgin, S., Öztürk, A.A., Öztürk, B., Bilgin, R. 2016. A preliminary genetic investigation on the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Turkish seas based on mtDNA sequences. 30. Avrupa Deniz Memelileri Topluluğu (ECS) Kongresi, Madeira, Portekiz, 121p.

Uzun, B., Tonay, A.M., Dede, A., Danyer, E., Aytemiz, I., Bilgin, S., Öztürk, A.A., Öztürk, B., Bilgin, R. 2016. Population genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* in Turkish waters-What does mtDNA control region say? 30. Avrupa Deniz Memelileri Topluluğu (ECS) Kongresi, Madeira, Portekiz, 236p.

Uzun B., Tonay M.A., Öztürk A.A., Bilgin R., "Karadeniz, Türk Boğazlar Sistemi ve Ege Denizi'ndeki Muturların (*Phocoena phocoena*) Genetik Yapısı – Şu Andaki Durum Nedir?", 29. Avrupa Deniz Memelileri Topluluğu (ECS) Kongresi, Malta, 23-25 Mart, 2015.

Uzun B., Ozkan E., Ozkorkmaz Gokalp E., Soysal M. I., Togan I. 2011. Türkiye Yerli Koyun Irklarında Prion Proteini (PrP) Gen Polimorfizmlerinin Taranması. Biyoloji Günü, Biyoloji Anabilim Dalı, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ), Ankara, Türkiye, 26 Mayıs, 2011.