

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE TATLI SULARINDAKİ DİŞLİ SAZAN GENUSU
***Aphanius* Nardo, 1827 (Actinopterygii: Cyprinodontidae)**
FİLOGENİSİ

MEHMET KUYUMCU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YUSUF BEKTAŞ
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. DAVUT TURAN
DR. ÖGR. ÜYESİ ŞEBNEM ATASARAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

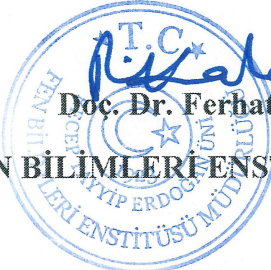
**TÜRKİYE TATLI SULARINDAKİ DİŞLİ SAZAN GENUSU *Aphanius Nardo*,
1827 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) FİLOGENİSİ**

Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ danışmanlığında, Mehmet KUYUMCU tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/09/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	:Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ
Üye	:Prof. Dr. Davut TURAN
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Şebnem ATASARAL

İmzası





Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

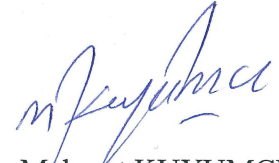
“Türkiye Tatlı Sulardaki Dişli Sazan Genusu *Aphanius* Nardo, 1827 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) Filogenisi” adlı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ’a, deneyimlerinden yararlandığım, laboratuvar çalışmalarında ve örneklemelerde yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. İsmail AKSU’ya, Yüksek Lisans çalışmalarını birlikte yaptığım Hande ŞERİFOĞLU RAKICI ve hayatımın her anında ilgilerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm aileme çok teşekkür ederim.

Mehmet KUYUMCU

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Türkiye Tatlı Sulardaki Dişli Sazan Genusu *Aphanius* Nardo, 1827 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) Filogenisi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 20/ 06 / 2019



Mehmet KUYUMCU

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

ÖZET

TÜRKİYE TATLI SULARINDAKİ DIŞLI SAZAN GENUSU *Aphanius* Nardo, 1827 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) FİLOGENİSİ

Mehmet KUYUMCU

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ

Anadolu'daki *Aphanius* (Balıklar: Cyprinodontiformes) cinsinin filogenetik ilişkilerini test etmek için on dokuz *Aphanius* türünün 29 popülasyonunu temsilen 107 dişli sazan bireyinin sitokrom b geninin 1065 hizalanmış baz çiftini analiz ettik. Elde edilen haplotipler (h: 44) kesinlikle yereldi ve türler arasında paylaşılmamıştır. Komşu birleştirme, maksimum olasılık ve maksimum tutumluluk yöntemleri ile oluşturulan filogenetik ilişkiler birbirleriyle tamamen uyumludur, üç ana grubun ortaya çıktığını göstermiştir. Türler ve gruplar, jeolojik olarak iyi tanımlanmış birimlerle sınırlandırılmıştır ve birbirlerinden belirgin şekilde farklılaşmıştır. Sonuçlarımız, Pliosen orojenik olayları tarafından şekillendirilen bir çeşitlendirme modeli gösteren *Aphanius*'un daha önceki çalışmaları ile de uyumaktadır. Mevcut sonuçlar, mitokondriyal sitokrom b gen dizilerinin, *Aphanius* türlerin tanımlanması ve filogenetik analizi için etkili olduğunu göstermektedir.

2019, 65 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sitokrom b, MtDNA, Filogeni, Dişli sazan, Anadolu

ABSTRACT

THE PHYLOGENY OF KILLIFISH GENUS *Aphanius* Nardo, 1827 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) IN TURKISH FRESHWATER

Mehmet KUYUMCU

Recep Tayyip Erdogan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ

We investigated the phylogenetic relationships of *Aphanius* (Pisces: Cyprinodontiformes) genus in Anatolia by analysing 1065 base pair fragment of the mitochondrial cytochrome b gene of 107 samples representing 29 populations of nineteen *Aphanius* species. The derived haplotypes (h: 44) were strictly local and were not shared between species. Phylogenetic relationships reconstructed by neighbor joining, maximum likelihood and maximum parsimony methods are fully congruent, showed the occurrence of three main groups. Species and groups are restricted to geologically well-defined units, and are deeply divergent from each other. Our results are in agreement with a previous study of *Aphanius* that also shows a diversification pattern driven by the Pliocene orogenic events. Present results indicate the effectiveness of mitochondrial cytochrome b gene sequences for species identification and the phylogenetic analysis of *Aphanius* species.

2019, 65 pages

Keyword: Cytochrome b, MtDNA, Phylogeny, Killifish, Anatolia

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Cyprinodontidae Familyasının Genel Özellikleri	3
1.3. <i>Aphanius</i> Cinsinin Genel Özellikleri ve Sistematığı	4
1.4. Anadolu’da Bulunan Bazı <i>Aphanius</i> Türleri	7
1.4.1. <i>Aphanius fasciatus</i> (Valenciennes, 1821)	7
1.4.2. <i>Aphanius mentoides</i> (Akşiray, 1948)	8
1.4.3. <i>Aphanius asquamatus</i> (Sözer, 1942)	9
1.4.4. <i>Aphanius danfordii</i> (Boulenger, 1890)	10
1.4.5. <i>Aphanius splendes</i> (Kosswig & Sözer, 1945)	11
1.4.6. <i>Aphanius anatoliae</i> (Leidenfrost, 1912)	11
1.4.7. <i>Aphanius transgrediens</i> (Ermin, 1946)	12
1.4.8. <i>Aphanius sureyanus</i> (Neu, 1937)	13
1.4.9. <i>Aphanius villwocki</i> (Hrbek and Wildekamp, 2003)	13
1.4.10. <i>Aphanius marassantensis</i> (Pfleiderer, Geiger & Herder, 2014)	14
1.4.11. <i>Aphanius iconii</i> (Akşiray, 1948)	15
1.4.12. <i>Aphanius irregularis</i> (Yoğurtçuoğlu & Freyhof, 2018)	15
1.5. Sistematikte Kullanılan Genetik Teknikler	16
1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	16
1.5.2. DNA Dizi Analizi	18
1.5.2.1. Sanger Zincir Sonlama Yöntemi	18
1.5.2.2. Maxam ve Gilbert’in Kimyasal Yöntemi	19
1.6. Filogenetik Analiz Metotları	20
1.6.1. Mesafe Temelli Yöntemler	21

1.6.1.1.	UPGMA (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup) Metodu ...	21
1.6.1.2	Neighbor-Joining (Komşu Katılım) Metodu	22
1.6.2.	Karakter Temelli Yöntemler	22
1.6.2.1.	Maksimum Parsimoni (Farklılıkları En Az İndirme Yöntemi)	22
1.6.2.2.	Maksimum Likelihood (En Yüksek Olasılık Yöntemi)	22
1.6.2.3.	Bayesian Çıkarsama Metodu	23
1.7.	Mitokondri DNA (mtDNA)	23
1.8.	Literatür Özeti	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	37
2.1.	Materyal	37
2.2.	Yöntem	37
2.2.1.	Total DNA Eldesi	37
2.2.2.	Total DNA ve PZR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	38
2.2.3.	PZR Uygulamaları	40
2.2.4.	DNA Dizin Analizi	41
2.2.5.	Dizi Hizalama ve Filogenetik Analizi	41
3.	BULGULAR	43
3.1.	Genetik Çeşitlilik	43
3.2.	Filogenetik İlişkiler	46
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	50
5.	ÖNERİLER	54
	KAYNAKLAR	55
	ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Türkiye içsularında <i>A. asquamatus</i> , <i>A. splendens</i> , <i>A. danfordii</i> , <i>A. transgrediens</i> , <i>A. sureyanus</i> , <i>A. villwocki</i> , <i>A. anatoliae</i> ve <i>A. fasciatus</i> türlerinin yayılış alanı (Güçlü, 2003)	5
Şekil 2.	<i>Aphanius fasciatus</i> görünümü (URL-1)	7
Şekil 3.	<i>Aphanius mentoides</i> 'in Türkiye'de bulunduğu yerler (Güçlü, 2003)	8
Şekil 4.	<i>Aphanius mentoides</i> dişi birey görünümü (URL-2)	9
Şekil 5.	<i>Aphanius asquamatus</i> (Seegers, 1997)	10
Şekil 6.	<i>Aphanius donfordii</i> görünümü (URL-3)	10
Şekil 7.	<i>Aphanius splendens</i> (Seegers, 1997).....	11
Şekil 8.	<i>Aphanius anatoliae</i> (Seegers, 1997)	12
Şekil 9.	<i>Aphanius transgrediens</i> (Seegers, 1997)	12
Şekil 10.	<i>Aphanius sureyanus</i> (Seegers, 1997)	13
Şekil 11.	<i>Aphanius villwocki</i> (Hrbek ve Wildekamp, 2003)	14
Şekil 12.	<i>Aphanius marassantensis</i> erkek birey ve dişi birey görünümü	14
Şekil 13.	<i>Aphanius iconii</i> dişi birey (üstteki) ve erkek birey (alttaki) görünümü	15
Şekil 14.	<i>Aphanius irregularis</i> dişi birey (üstteki) erkek birey (alttaki) görünümü	16
Şekil 15.	Charles Darwin'in "Türler kökeni (1859)" bölüm IV'de kullandığı yaşam ağacı	20
Şekil 16.	Mitokondri DNA (Taylor ve Turnbull, 2005)	24
Şekil 17.	<i>Aphanius</i> türlerine ait mtDNA Cyt b dizilerinden belirlenen 44 adet haplotipin komşu katılım (NJ) metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi	47
Şekil 18.	<i>Aphanius</i> türlerine ait mtDNA Cyt b dizilerinden belirlenen 44 adet haplotipin maksimum olasılık (MP) metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi	48
Şekil 19.	<i>Aphanius</i> türlerine ait mtDNA Cyt b dizilerinden belirlenen 44 adet haplotipin maksimum tutumluluk (ML) metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Türkiye’de yaşayan <i>Aphanius</i> türlerinin sistematigi	6
Tablo 2. <i>Aphanius</i> genusuna ait türlerin toplandığı istasyonlar, koordinatları ve örnek sayıları (N)	39
Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları	40
Tablo 4. PZR döngü koşulları	40
Tablo 5. <i>Aphanius</i> genusuna ait türlerin örnek sayıları (N),haplotip sayıları (HN), haplotip çeşitlilik (Hd) ve nükleotit çeşitlilik (Pi) değerleri.....	44
Tablo 6. <i>Aphanius</i> genusuna ait tür içi ve türler arasındaki ikili dizin farklılığı değerleri	45

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
IUCN	Uluslararası Doğa Koruma Birliği
CR	Kritik Düzeyde Tehlikede
EN	Bir Türü Tehlikede
EX	Bir Türün Soyu Tükenmiş
DD	Diğer Türler Hakkında Yetersiz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Tm	Primerlerin Erime Sıcaklığı
RAPD	Rasgele Artırılmış Polimorfik DNA
AFLP	Artırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
dNTP	Deoksiribonükleozit Trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleozit Trifosfat
UPGMA	Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup
MP	Maksimum Parsimoni
ML	Maksimum Likelihood
BI	Bayesian Çıkarsama
NJ	Komşu Birleştirme
mtDNA	Mitokondriyal Deoksiribonükleik Asit
bç	Baz Çifti
D-loop	Kontrol Bölgesi
RNA	Ribonükleik Asit
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
ATP	Adenozin Trifosfat
°C	Santigrad Derece
AMOVA	Moleküler Varyans Analizi
16S RNA	16S Ribonükleik Asit

COI	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I
mg	Miligram
μ l	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
ml	Mililitre
TAE	Tris Asetik Asit-Etilendiamintetraasetik Asit
ddH ₂ O	İki Distile Su
vd	Ve Diğerleri
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
dNTP	Deoksiribonükleozit Trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleozit Trifosfat
Cyt b	Sitokrom b
N	Örnek Sayıları
HN	Haplotip Sayıları
Hd	Haplotik Çeşitlilik
Pi	Nükleotit Çeşitlilik
Ts	Transisyon
Tv	Transversiyon

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Türkiye, iklimsel özellikler bakımından değişiklikler içeren bölgeler barındırması, Asya ve Avrupa ana kıtalarının birleşme bölgesinde yer alması ve üç bilinen zoocoğrafik bölgeyi içinde bulundurması nedeniyle biyoçeşitlilik anlamında dünyanın önemli bölgelerinden biridir (Bogutskaya, 1992). Yüksek biyoçeşitlilik seviyesi, Türkiye’ye bir yandan sosyo-kültürel, bilimsel ve iktisadi açıdan önemli olanaklar sağlarken öte yandan da önemli sorumluluklar yüklemektedir. Mevcut biyoçeşitliliğin korunması için en büyük tehdit olmaya devam eden insan kaynaklı çevresel etkiler göz önüne alındığında, Dünya’nın biyolojik çeşitliliğinin sürdürülebilirliği büyük önem taşımaktadır (Freyhof ve Brooks, 2011).

Uzun yıllar boyunca doğa bilimcileri dünyadaki biyolojik çeşitliliği saptamaya, tanımaya ve açıklamaya çalışmışlardır. Bunun için onlara adlar vererek benzerlerinden ayırma yoluna gitmişler ve aralarında benzerlik oluşturabildikleri canlılara ortak gruplar içine temelleştirerek ilk sınıflandırma çalışmalarını başlamışlardır. Zamanla canlılarla ilgili bilgilerin artmasına bağlı olarak “sistematik” adıyla yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Günümüzde çok sayıda farklı sistematik anlayışlar bulunmakla birlikte bunların tümü Skelton’un (1993) “ortak bir evrimsel tarihi paylaşan bireyler bütünü” kavramını esas almakla olup, insanoğlunun bilimsel serüvenine yeni bilgilerin katılmasına devam edilmektedir. İlk dönemlerdeki genetik çeşitliliklerin tanımlaması ve sınıflandırması evrimsel teoriden bağımsız olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarla filogenetik akrabalıklara bağlı olarak canlıların sınıflandırılmasına çalışılmaktadır.

Akdeniz bölgesi içinde bulunan, iyi çalışılmış ve zengin bir jeolojik geçmişi olan Türkiye’de, Tetis Denizi’nin kapanmasıyla şekillenen jeolojik oluşum süreci içinde coğrafik türleşmede önemli roller üstlenmiştir (Hrbek ve Meyer, 2003). Anadolu’nun güneydoğusunda, içine alan Mezopotamya Havzası, Orta Doğu’nun tüm sularını bir araya toplayarak, Pliyosen rojenlerinden önce Karadeniz ve Hazar Denizi’yle bağlantılı olan ilksel Fırat’ı (Proto-Euphrates) kapsayan, bu özelliğiyle de tatlısu faunası için çok önemli olan bir merkez olarak karşımıza çıkmaktadır (Pro ve Dimentman, 1989; Bardakcı

vd., 2006). Anadolu’da varlığı en eskiye dayanan tatlısu balıklarından birinin *Aphanius* genusu olduğu düşünülmektedir. *Aphanius* genusun üyeleri relik tır olup, yayılış alanı erken Eosen’den Miyose’ye kadar, Avrupa’nın büyük bir kısmını kaplayan Tetis ve Paratetis ile çakışır. Bu genusun fosillerine Paris çöküntüsü ve Transkaspiyan (Hazar Denizi civarı) çöküntüsü sedimanlarının her ikisinde de rastlanmıştır. Bunlar günümüzde, Akdeniz’i çevreleyen birkaç ülkede kaldıklarından tipik bir Tetis kalıntısı olarak tanımlanır. Bu cinsin üyelerinin Tetis Denizi’nin çevresi etrafında dağılmış ortak bir atadan evrimleştiği düşünülmektedir. Bu hipotez, cins üzerinden uygulanan mitokondriyal DNA genlerinin yeni bir moleküler analizi ile desteklenmektedir. Bulunan en eski fosil yaklaşık 30 milyon yıl olduğu tahmin edilmektedir (Hrbek ve Meyer, 2003). Türkiye’de yapılan jeolojik çalışmalar sonucunda ise Anadolu’da dağılım gösteren *Aphanius spp.* türlerinin yaklaşık olarak 14 milyon yaşında olduğu tespit edilmiştir (Demirsoy, 1999; Bardakçı vd., 2004).

Birçok türü tehlike altında olan *Aphanius* genusuna ait taksonların özellikle endemik olanlarının kırmızı listedeki varlığı incelendiğinde yaklaşık olarak %10’unun Cyprinodontidae familyasına ait olduğu, bu familyanın da kendi içindeki endemizm oranının %78 olduğu tespit edilmiştir (Küçük, 2006). Uluslararası Doğa Koruma birliği (IUCN)’nin 2013 tehdit altındaki türler listesine göz atıldığında, Türkiye’de bulunan 14 *Aphanius* türünün 9’unun listede olduğu, hatta bunlardan 2 türün kritik seviyede tehlike altında (CR) olduğu, bir türün tehlikede (EN) olduğu, bir türün ise soyunun yok olduğu (EX) geri kalanlar hakkında ise yetersiz veri (DD) olduğu rapor belirlenmiştir (Freyhof, 2014).

Aphanius genusu için türleşme merkezi olarak kabul edilen Anadolu’daki tür çeşitliliğinin ortaya konulması, filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, morfolojik özellikleri konusunda betimleyici manada kapsamlı bilimsel çalışmalar yürütülmüştür. Moleküler genetik uygulamaların yaygınlaşmaya başlaması ile, *Aphanius* tür ve popülasyonları hem paleocoğrafik sürecin etkisiyle hem de dışsal etkilerin neden olduğu farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Moleküler genetik alanındaki gelişmelerin sonrasında taksonomi ve genetik alanında çalışan araştırmacılar, türleri tanımlama konusunda her bir türün sahip olduğu farklı genetik yapıdan yararlanma yolunu seçmişlerdir. Farklı türler arasındaki anatomik ve morfolojik farklılıklar, bazı durumlarda canlıların taksonomik

pozisyonlarının belirlenebilmesi için yeterli olamamaktadır. Aynı türün farklı habitatlarda yaşamlarını sürdüren bireyleri, ortama uyum sonucu anatomik ve morfolojik yapıları bakımından birbirlerinden farklılık gösterebilirler. Genotipik yapının fenotipik yapıya oranla daha kararlı olması ve sadece morfoloji yoluyla elde edilen bilgilerin yeterli olmaması araştırmacıları taksonomik çalışmalarda genetik karakterlerden faydalanmaya yönlendirmiştir (Klug ve Cummings, 2000).

Bu nedenlerden dolayı günümüzde taksonomi ve filogeni alanında yapılan çalışmalarda DNA'yı özellikle de mitokondri DNA'yı araç edinen moleküler teknikler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Mitokondri DNA yapısı, gen düzeni ve ikincil yapısı balıklarda ve hatta diğer omurgalılarda büyük oranda korunmuş olup mitokondriyal DNA evrimi balıklarda nispeten iyi çalışılmıştır (Wilson vd., 1985). Sadece bir genin değişim hikayesi genomun tamamının hikayesinden farklı olabileceğinden, popülasyonun tarihini yansıtan mitokondriyal gen ağaçlarının değerlendirilmesinde dikkat edilmelidir. Bu nedenle, bu DNA tipi yakın akraba türlerin filogenetik durumlarını incelemek için oldukça müsaittir (Presa vd., 2002).

1.2. Cyprinodontidae Familyasının Genel Özellikleri

Dünyada 9 cins ve 100 türü bulunan Cyprinodontidae familyası Güney Asya, Kuzey, Orta ve Güney Amerika'daki denizlerin kıyısal alanlarında, Karayip Adaları, Kuzey Afrika ve Anadolu'da yayılış gösterir (Güçlü, 2003). Genellikle Akdeniz Bölgesi'ndeki sakin, sığ, yosun ve bitkilerle kaplı olan sahillerindeki körfez, liman ve kanalların yanı sıra lagünlerde de pelajik olarak yaşarlar. Geniş bir sıcaklık ve tuzluluk toleransına sahip olan familyanın üyeleri tatlı sulara da rahatlıkla girebilmektedir (Akşiray, 1987).

Cyprinodontidae ailesi üyeleri morfolojik olarak sazansı ailesine benzese de, en fazla 10 cm'lik maksimum boyları ve çenelerindeki maksil dişlerin varlığı nedeniyle “dişli sazancıklar” adını alıp onlardan ayrılırlar (Geldiay ve Balık, 2007). Demirsoy (1997)'a göre (palatinum hariç) ağız, çene ve yutak kemikleri üzerinde dişler bulunur. Omurları 24-53 arasında değişiklik gösterir. Yuvarlak ya da düz kuyruk yüzgecine sahiptirler (Güçlü, 2003). Yüzgeçlerde sert dikensi ışınlar bulunmaz. Baş biraz düz ve

ağıza doğru eğimlidir (Golani vd., 2006). Dorsal yüzgeç vücudun arka yarısında yer alır. Yan çizgiler bulunmaz. Vücut genelde pullarla örtülmüş olmakla birlikte pulsuz bölgeler de bulunabilir. Oldukça basitleşmiş küçük bir hava keseleri vardır, körbağırsakları yoktur. Erkek ve dişi bireyler arasında renk ve desen yönünden farklılıklar görülür (Geldiay ve Balık, 1996). Dünyadaki dişli sazancık türlerinin bazıları 22 cm'ye ulaşırken, ülkemizdeki türler en fazla 8 cm'ye kadar ulaşabilmektedir (Akşiray, 1987).

Cyprinodontidae familyasına mensup türler genellikle bulundukları kıyılara bağlı olarak yaşarlar ve karnivor ağırlıklı beslenme özelliği gösterirler. Başlıca besinlerini, yosunlar arasında yaşayan Crustacealar, kurtçuklar, böcek larvaları, plankton vb. küçük omurgasızlar ile balık larvaları oluşturur (Akşiray, 1987).

Familya içinde bulunan türlerin insan besini olarak ekonomik önemi yoktur. Ancak bazı türler akvaryumlarda süs balığı olarak yetiştirilir ve bilimsel materyal olarak genetik çalışmalarda kullanılır (Güçlü, 2003).

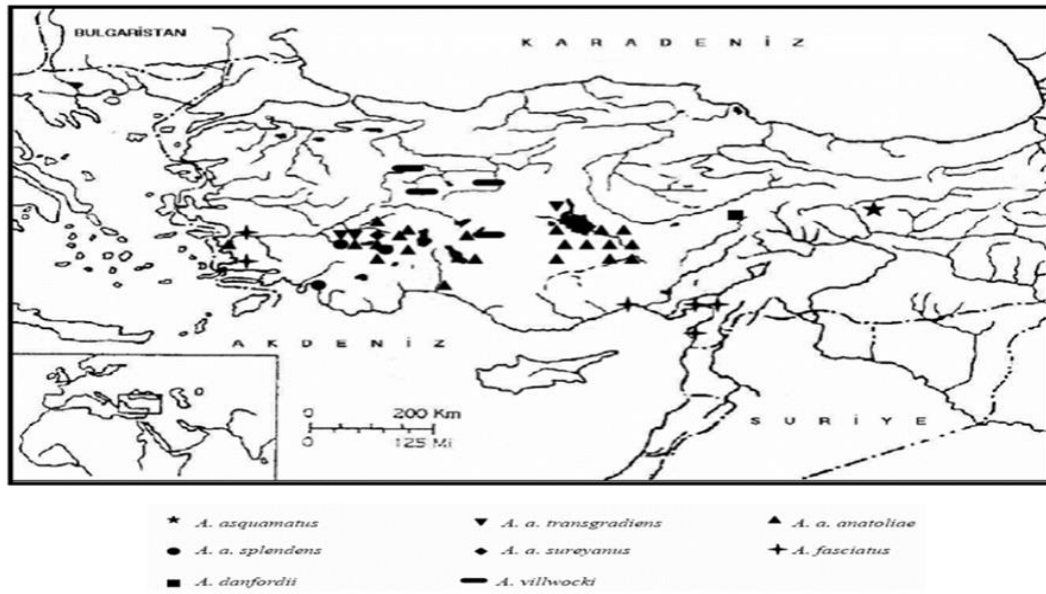
1.3. *Aphanius* Cinsinin Genel Özellikleri ve Sistematığı

Sıcaklık seviyesi genelde mevsimlere dayalı çok değişiklik sergilemeyen kaynak sular dışında tuzlu, acı veya sıcak su kaynaklarında yaşarlar (Geldiay ve Balık, 1996). *Aphanius* cinsi içerdiği 33 türle Güney Avrupa, Doğu Akdeniz ülkeleri, Kuzey ve Doğu Afrika'dan Somali'ye kadar geniş bir coğrafyada dağılım gösterir (Hrbek ve Meyer, 2003).

Acı su ve örihalin kıyasal çevrelerde yaşayan türler ile tatlı su, kaynak, dere, bataklık ve göllerde yaşayan türler olmak üzere *Aphanius* cinsi iki ekolojik gruba ayrılmaktadır (Hrbek ve Meyer, 2003). Acısu ve eurihalin ortamlarda bulunan türlerin oldukça geniş bir tuzluluk hoşgörüsü vardır. Tatlısu, kaynak veya göl ortamında bulunan türler ise genellikle yalıtılmış populasyonlar olduğundan dağılım alanları kısıtlıdır (Leonardos ve Sinis, 2008).

İkincil tatlı su formları olarak bilinen bu balıkların Tetis Denizi'nin (eski jeolojik devirlerde kıta hareketleri sonucu Avrasya ile Afrika kıtaları arasında olduğu düşünülen

ve bugünkü Akdeniz'in atası sayılan büyük deniz) kalıntısı olduğu bilinmektedir (Geldiay ve Balık, 1996). Jeolojik bulgulara dayanılarak, cinsin yaklaşık 37 milyon yaşında olduğu düşünülmekle birlikte, bulunan en eski fosil yaklaşık 30 milyon yaşında olduğu belirtilmektedir (Bardakçı vd., 2004). Ülkemiz iç sularında bulunan *Aphanius* cinsi 10 tür ve 4 alttürle temsil edilmektedir. Cyprinodontidae familyasının Anadolu'da bu kadar fazla alttür içeriyor olması, Tetis Denizi kalıntısı olduğu onaylanan bu canlı çeşitlerinin, oldukça eski bir ekolojik devirlerde Anadolu'nun deniz seviyesinde bulunan günümüzde ise yüksek dağların iç kesimlerine kadar ilerleyerek göl ve akarsularda farklılaşmasıyla izah edilmektedir (Kuru, 2004). Küçük balıklar olmaları, dağılım kabiliyetlerinin düşük oluşu, popülasyonlarının yalıtılmış olması, bulundukları habitat ve yaşadıkları alanların küçük olması bu balık grubunun coğrafik sınırlı dar endemik türlere dönüşmelerine neden olmuştur (Kottelat vd., 2007).



Şekil 1. Türkiye içsularında *A. asquamatus*, *A. splendens*, *A. danfordii*, *A. transgradiens*, *A. sureyanus*, *A. villwocki*, *A. anatoliae* ve *A. fasciatus* türlerinin yayılış alanı (Güçlü, 2003).

Vücut genellikle kısa ve oval yapılı olup, düz kenarlı büyük pullarla kaplıdır. Başın üst tarafı hafifçe yassılaşmış, ağız uç kısmında olup, yukarıya doğru yönelmiştir. Ağızda, her birinin üçer çıkıntısı olan 1-3 sıra halinde dizilmiş küçük sivri dişler bulunur. Dorsal yüzgeç anal yüzgece nazaran biraz daha önden başlar. Kuyruk yüzgeç daima tek loplulu olup, serbest kenarı düz veya yuvarlaktır. Dorsal ve anal yüzgeçler erkeklerde, dişilere oranla daha uzun ve daha geniştir. Yan çizgi belirgin değildir ya da hiç

bulunmamaktadır (Geldiay ve Balık, 1996). Dişiler erkeklere göre daha büyük olup yan çizgide 26-29 adet pul bulunur. Ancak bazı türlerde pullar dökülmüştür (Güçlü, 2003). Renklenme türlere ve cinsiyete göre oldukça önemli farklılık sergiler (Geldiay ve Balık, 1996). Erkekler sıklıkla dorsal ve anal yüzgeçlerin büyüklüğü ve parlak renkleri ile dişi bireylerden ayrılır (Wildekamp vd., 1999). Beslenme özellikleri açısından omnivor özellik gösterirler. Çeşitli sucul omurgasızlar, diatomlar, sivrisinek erginleri ve larvaları başlıca besinlerini oluşturur (Leonardos ve Sinis, 2008).

Türkiye’de yaşayan *Aphanius* türlerin sistematigi aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Yalnızca *Aphanius fasciatus* ve *Aphanius mentoides* hem Türkiye’de hem de diğer ülkelerdeki sularında da yayılış göstermektedir.

Tablo 1. Türkiye’de yaşayan *Aphanius* türlerinin sistematigi.

Bilimsel	Sınıflandırma
Alem	Animalia (Hayvanlar)
Şube	Chordata (Kordalılar)
Grup	Craniata (Gerçek kafataslılar)
AltŞube	Gnathostomata (Gerçek çeneliler)
Üstsınıf	Pisces (Balıklar)
Sınıf	Osteichthyes (Kemikli balıklar)
AltSınıf	Actinopterygii (Işınsal yüzgeçli)
ÜstTakım	Teleostei (Gerçek kemikli balıklar)
Takım	Cyprinodontiformes (Dşli sazancıklar)
Aile	Cyprinodontidae
Cins	<i>Aphanius</i>
Tür	<i>Aphanius maendricus</i> (Akşiray, 1948) <i>Aphanius fasciatus</i> (Valenciennes, 1821) <i>Aphanius mentoides</i> (Akşiray,1948) <i>Aphanius asquamatus</i> (Sözer, 1942) <i>Aphanius danfordii</i> (Boulenger, 1890) <i>Aphanius splendens</i> (Kosswig ve Sözer, 1945) <i>Aphanius anatoliae</i> (Leidenfrost, 1912) <i>Aphanius transgrediens</i> (Ermin, 1946)

Tablo 1. (Devam). Türkiye’de yaşayan *Aphanius* türlerinin sistematığı.

Bilimsel	Sınıflandırma
	<i>Aphanius alexandri</i> (Akşiray, 1948)
	<i>Aphanius villwocki</i> (Hrbek ve Wildekamp,2003)
	<i>Aphanius sureyanus</i> (Neu, 1937)
	<i>Aphanius iconii</i> (Akşiray, 1948)
	<i>Aphanius saldae</i> (Akşiray, 1955)
	<i>Aphanius fontinalis</i> (Akşiray, 1948)
	<i>Aphanius marassantensis</i> (Pfleiderer, Geiger & Herder,2014)
	<i>Aphanius similis</i> (Akşiray, 1948)
	<i>Aphanius orantis</i> (Akşiray, 1948)
	<i>Aphanius irregularis</i> (Yogurtcuoglu & Freyhof, 2018)
	<i>Aphanius boulengeri</i> (Akşiray, 1948)
	<i>Aphanius meridionalis</i> (Akşiray, 1948)

1.4. Anadolu’da Bulunan Bazı *Aphanius* Türleri

1.4.1. *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821)

Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerin kıyı bölgelerdeki acı sularında ve iç sularında dağılım göstermektedir. Son zamanlarda kıyı bölgelerin bozulması ve yüzyıl başında sivrisinek mücadelesi dolayısıyla da Malarya hastalığını önlemek amacıyla getirilen *Gambusia affinis* ile yarış halinde olması nedeniyle tehlike altında olan türler listesinde bulunmaktadır (Maltagliati, 1999).

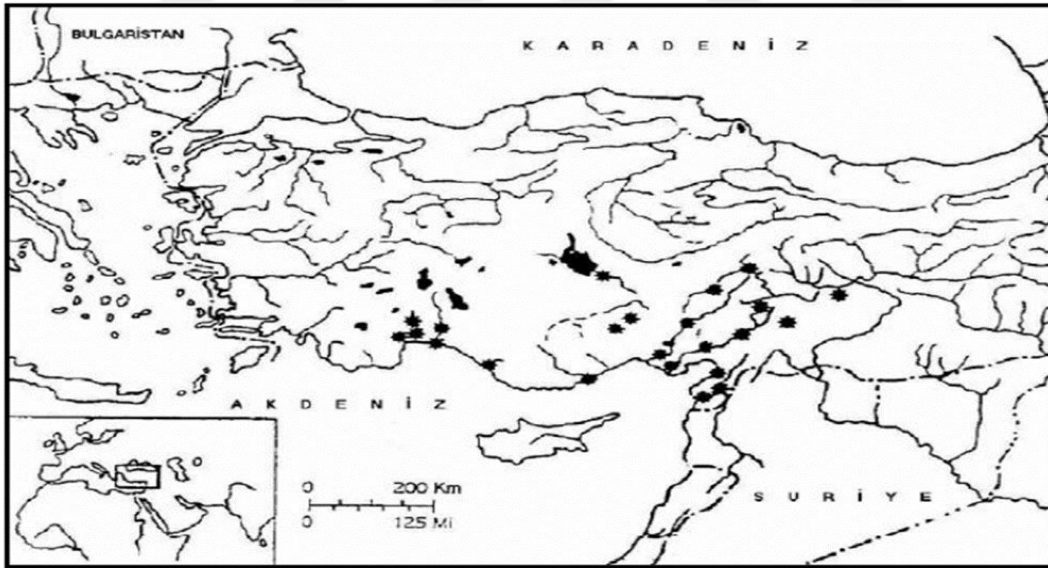


Şekil 2. *Aphanius fasciatus* görünümü (URL-1).

Boyu en fazla 7-8 cm'dır. Vücut yapısı kısa oval bir yapıya sahip olan bu balıkların üzeri pullarla kaplıdır. Kuyruk yüzgeci düz ve tek lopludur. Dişilerin sırtı yeşilimsi veya kahverengi yan tarafı ve karın bölgesi gümüş beyazı renktedir. Yüzgeçler tamamen renksizdir. Erkeklerin, dişilerdekine benzer sırt rengine sahiptir. Dişilerden farklı olarak sırt yüzgecin yan tarafına kadar boyuna uzanan bir bant bulunur. Sırt yüzgeci dişilerdekine kıyasla biraz daha uzundur (Alagöz vd., 2006).

1.4.2. *Aphanius mentoides* (Akşiray, 1948)

Irak'ın güneydoğusu ve batısında, Arabistan Yarımadası'nın kuzeyinde, Suriye, Lübnan ve İsrail'deki kıyasal nehir sistemleriyle Ürdün'ün Batısında ve Ölüdeniz (Lut Gölü)'e dökülen derelerde yayılım gösterir. Türkiye'de Seyhan Nehri'nin nehir ağzı bölgesinde, Fırat Nehri'nin kollarında, Ceyhan Nehri'nin Yeşilada Gölü'nde, Ereğli yakınlarındaki Akgöl'de (Konya), Kırkgöz Kaynağı (Antalya) ve Aksu Çayı (Antalya)'nın Karaöz Beldesi yakınlarında yayılım gösterir (Güçlü, 2003).



Şekil 3. *Aphanius mentoides*'in Türkiye'de bulunduğu yerler (Güçlü, 2003).

Daha önce bulunmamasına rağmen *Gambusia* ile birlikte Nemrut Krater Gölü'ne de girdiği bildirilmiştir (İnnal ve Erk'akan, 2006). Vücut yapısı kalın, kısa yapılı ve üzeri tamamen pullarla örtülüdür. Kuyruksuz vücut boyu yaklaşık olarak yüksekliğin 2,5-3,0 katıdır. Baş uzunluğu yaklaşık olarak vücut yüksekliğine eşittir. Ağız yukarı doğru yöneliktir. Her bir çene üzerinde, sayıları 15-21 civarında olan üç çatalı maksilla dişleri

bulunur. Bu dişlerde orta çıkıntının boyu, yandakilerden iki misli daha uzundur. Yan çizgi belirgin değildir. Sırt yüzgeç, kuyruk yüzgeci başlangıcına ve gözlerin ortasına eşit uzaklıkta bulunur. Pektoral yüzgeçler yuvarlak şekillidir. Kuyruk yüzgeci bir loplulu ve yan tarafı hafif ovaldır (Geldiay ve Balık, 1996; Küçük ve İkiz, 2004).



Şekil 4. *Aphantius mentoides* dişi birey görünümü (URL-2).

1.4.3. *Aphantius asquamatus* (Sözer, 1942)

Elazığ İli Hazar Gölü'nde bulunan endemik bir türdür. Yanlarda gümüşü-gri olan renk sırtta koyu gri, karında ise gümüş rengini alır. Vücut üzerinde 11-15 arasında değişen koyu renkli enine bantlar ve yüzgeç kenarlarında küçük noktacıklar şeklinde yoğunlaşmalar gösterir. Sırt yüzgeci gri olup, orta bölümde dikine uzayan siyah bantlar vardır. Bu bantların şekli erkek bireylerde biraz farklılık gösterebilir. Erkek balıklar üreme zamanı hemen hemen siyah bir renk alır. Dişilerde vücut rengi gri, yanlarda koyu, karın kısmı ise açık renklidir. Bütün yüzgeçler renksizdir. Genellikle kıyıya yakın yaşayan balık sürüleri içinde bulunurlar. Üreme zamanı bitkili çalılı kayalar etrafındaki bölgelerde yoğunlaşırlar.

Gölde oluşan doğa tahribatı, meydana gelen ani su azalması ve drenaj kanalları nedeniyle, Uluslararası Doğa Koruma Birliği'nce (IUCN) hazırlanan Kırmızı Liste'de (Red List) tehlike altındaki balık türleri kategorisinde değerlendirilmektedir (Wildekamp vd., 1999).



Şekil 5. *Aphanius asquamatus* (Seegers, 1997).

1.4.4. *Aphanius danfordii* (Boulenger, 1890)

Bu türün dağılım alanları kesin olarak bilinmemekle birlikte; Kızılırmak Nehri'ne bağlı küçük akıntılar, küçük kaynaklar, sulama kanalları ve ırmak koyları ile Kızılırmak'ın Karadeniz'e dökülen deltasının yanı sıra yukarı Seyhan Nehri ve Kayseri'nin güneyinde bulunduğu bildirilmiştir.



Şekil 6. *Aphanius danfordii* görünümü (URL-3).

Erkekleri dişiler arasında farklılıklar bulunur. Erkeklerde vücudun yan kısımları açık gümüş-gri renkte olup 9-12 koyu gri dikey bant bulunur. Bu bantların şekil, desen ve sayısı bireyden bireye değişiklik gösterebilmektedir. Kuyruk yüzgeci renksiz veya soluk beyaz üzerine koyu dikey bantlardan oluşmuştur. Dişilerde ise vücut gümüş-gri renkte olup griden siyaha değişen farklı şekil ve büyüklükte lekeler bulunur. En büyük ve en belirgin leke kuyruk yüzgecinin hemen bazal kısmında yer alır. Dorsal yüzgeç açık kahverengi, diğer yüzgeçler ise genelde renksizdir (Wildekamp, 1993).

1.4.5. *Aphanius splendes* (Kosswig ve Sözer, 1945)

Türü tehlike altında bulunan bu tür, Burdur İli Salda Gölü'ne endemiktir. Dorsal yüzgeçte 9-10 adet yumuşak ışıın bulunur. Erkeklerde enine bantlar genç bireylerde kahverengi olurken, yetişkinlerde siyaha dönüşür. Kuyruk üzerinde 2 adedi belirgin olmak üzere toplam 3 adet bant bulunur, dişilerde ise bant yoktur. Karın bölgesi beyaz, esmer renkli, gövde ve sırt bölgesinde gri benekler bulunur. 5 cm uzunluğa erişebilen bu balıkların ömrü 3-4 yıldır (Anonim, 2010c).



Şekil 7. *Aphanius splendes* (Seegers, 1997).

1.4.6. *Aphanius anatoliae* (Leidenfrost, 1912)

Tatlı su gözleri, küçük ırmaklar ve göllerde bulunan bu tür, ülkemizde Tuz Gölü, Beyşehir Gölü, Eğirdir Gölü, Büyük Menderes ve Sakarya Nehri ile Konya ve Niğde'deki küçük nehirlerde dağılım gösterir.

Erkek ve dişilerin renklenmesi popülasyonun durumuna göre değişiklik gösterebilir. Erkeklerde vücut açık gümüş-gri renktedir. Kenarlarda karından sırtta doğru uzanan 6-10 adet koyu gri dikey bantlar önemlidir. Üreme zamanında erkekler parlak gri bantta ve siyah sırt yüzgecine sahiptir. Anal yüzgeç kenarlarından siyah çerçeve ve limon sarısı renk vardır. Dişilerde ise solgun renkli olup, vücut üzerindeki koyu gri benekler yoğunlaşmıştır. Bütün yüzgeçler renksizdir (Wildekamp vd., 1999).



Şekil 8. *Aphanius anatoliae* (Seegers, 1997).

1.4.7. *Aphanius transgrediens* (Ermin, 1946)

Afyon Acı göl ve civarındaki acı su kaynaklarına endemik bir türdür. Sürekli olarak gölde yaşamazlar, yaz aylarında tuzluluğun artmasıyla gölü terk edip yağmur mevsiminde geri dönerler.

Erkek ve dişilerin renklenmesi popülasyonun durumuna göre değişiklik gösterebilir. Açık gümüş-gri vücut rengi üzerinde düzensiz, sayıları 8-11 arasında olan ve koyu griden siyah renge kadar değişen dikine bantlar bulunur. Sırt ve anal yüzgeçlerin vücuda yakın bölgeleri siyah bantla sınırlanmış ve renksizdir. Üreme zamanında bu sınırlar genişleyerek tamamen siyah renk alır. Dişilerde koyu kahverengiden griye kadar değişen düzensiz, gümüş renkli ve genelde yan orta kısımda yoğunlaşmış benekler bulunur. Tüm yüzgeçleri renksizdir (Wildekamp vd., 1999).



Şekil 9. *Aphanius transgrediens* (Seegers, 1997).

1.4.8. *Aphanius sureyanus* (Neu, 1937)

Burdur Gölü'ne endemik olan tür kıyı kesiminde balık sürüleri halinde bulunur. Erkekler genellikle büyük algler ve kayaların bulunduğu kıyı kısımlarında yaşarlar. Erkeklerde dikine bantlaşma bireyden bireye değişiklik gösterebilir. Vücudu parlak gümüş-gri renklidir. Sayıları bireylere göre farklı olabilen ve rengi koyu griden siyaha kadar değişen bantlara sahiptir. Sırt ve anal yüzgeçler birbirine benzer ve gövdeye yakın kısımları parlak-gri kenarları ise siyah renklidir. Kuyruk yüzgeci renksiz olup, iki adet dikine koyu bant bulundurur.



Şekil 10. *Aphanius sureyanus* (Seegers, 1997).

Dişilerde, parlak gümüş renkli vücut üzerinde 6-8 adet olan, büyük ve koyu kahverenginden koyu griye kadar değişebilen beneklere sahip bantlar bulunmaktadır. Tüm yüzgeçler renksizdir (Wildekamp vd., 1999).

1.4.9. *Aphanius villwocki* (Hrbek ve Wildekamp, 2003)

Dişilerin sırt tarafı koyu yeşil-kahverengi, yan taraflarda doğru renk daha açıktır, karın kısmı ise sarıdır. Vücusun üstünde düzensiz şekilde dağılmış ufak benekler bulunur. Kuyruk yüzgecinin başlangıcından yan çizgi bitimine kadar olan bölgede siyah renkte benek vardır. Kuyruk yüzgeci ve sırt yüzgeci koyu sarı yeşil renkte, geri kalan yüzgeçler ise renksizdir. Erkeklerin sırt kısmı koyu yeşil-kahverengidir. Yan taraflara doğru renk açılır, karın kısmı sarıdır. Vücut üzerinde bulunan enine ince 13-15 arasında değişen sayıda bant bulunur. Pektoral yüzgeci ise renksizdir. Sırt ve kuyruk yüzgeci üzerinde

enine çizgi halinde bantlar bulunur. Anal yüzgeci koyu sarı renkte olup, serbest kenarda ince siyah bir bant vardır (Yeğen vd., 2007).



Şekil 11. *Aphanius villwocki* (Hrbek ve Wildekamp, 2003).

Aphanius villwocki sadece, Çavuşçu Gölü dahil, yukarı Sakarya Nehri Havzası'nda bilinmektedir (Hrbek ve Wildekamp, 2003).

1.4.10. *Aphanius marassantensis* (Pfleiderer, Geiger & Herder, 2014)

Aphanius marassantensis, özellikle Hirfanlı barajı ve Bafra bölgesinde (Kızılırmak nehrinin deltası) dağılım göstermektedir (Yoğurtçuoğlu and Ekmekçi, 2013; Pfleiderer vd., 2014).



Şekil 12. *Aphanius marassantensis* erkek birey ve dişi birey görünümü.

Erkeklerde 8-13 koyu-kahverengi yan çubukları vardır. Kuyruk yüzgecindeki dikey sıralar, siyah dorsal yüzgeci, bazen dar beyazımsı-gri bir tabanı olan, siyah kenarlı bazı

bireylerde 1-3 sıra siyah benekli beyaz bir yüzgeç ve şeffaf pelvik yüzgeçleri bulunur. Dişiler, kuyruk veya anal yüzgeçlerde dikey koyu kahverengi lekeler dizisine sahip değildir. Ancak dorsal yüzgeç yanlarında koyu kahve lekeler vardır (Pfleiderer vd., 2014).

1.4.11. *Aphanius iconii* (Akşiray, 1948)

Aphanius iconii yaygın olarak Isparta Eğirdir Gölü ve ayrıca gölün yakın civarındaki Kovada'da dağılım göstermektedir. Erkek birey baş ve yan kısmı simli veya sarımsı kahverengidir. Baş ve yan tarafta birçok küçük siyah nokta var. Vücut kahverengi veya sarımsı-kahverengi çubuklar şeklinde sırt ile birleşir. Göğüs yüzgeci hiyalin veya sarı renkli, dorsal yüzgeç siyah, siyah bir taban ile ve yüzgecin ortasının altında geniş, hiyalin veya sarı, kuyruk yüzgeci 1-2 kalın siyah bantlı hiyalin veya sarı renktedir. Dişilerde, vücut soluk gri, baş ve yan kısımlarda çok sayıda, küçük, koyu kahverengi veya siyah lekeler bulunur (Freyhof vd, 2017).



Şekil 13. *Aphanius iconii* dişi birey (üstteki) ve erkek birey (alttaki) görünümü.

1.4.12. *Aphanius irregularis* (Yogurtçuoglu & Freyhof, 2018)

Aphanius irregularis, Büyük Menderes Nehri Kaklık kaynaklarından tanımlanmaktadır.

Aphanius irregularis'in erkekleri, düzensiz şekilde set ve şekillendirilmiş koyu kahverengi yan çubuklarla sık sık birbirine kaynaştırılarak, dikey olarak uzatılmış gümüş benek lekeleri ve birçok küçük gümüş benek lekeleri veya alanını oluşturarak ayırt edilirler.

Aphanius irregularis erkekleri, *Aphanius anatoliae* grubunun diğer bazı türlerinin erkeklerinden, genellikle küçük kişilerde kesintiye uğrayan, geniş, tozlu gri veya siyah bir anal yüzgeci kenarına sahip olarak ayırt edilir; siyah sırt yüzgeci tabanındaki dar, beyaz bir şerit veya bir dizi beyaz lekeler ve genellikle sırt yüzgecinin ortasında bazı beyaz lekeler bulunur. *Aphanius irregularis*'in dişileri, genellikle orta-yanal kısa çizgiler dizisi ile kahverengi renk desenine sahip olarak ayırt edilir. *Aphanius maeandricus* ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Yogurtcuoglu & Freyhof, 2018).



Şekil 14. *Aphanius irregularis* dişi birey (üstteki) erkek birey (alttaki) görünümü.

1.5. Sistematikte Kullanılan Genetik Teknikler

1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, ABD'nin Cetus şirketinden Mullis vd. (1986) tarafında ilk uygulaması yapılan ve belirli bir DNA parçasının milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını in vitro ortamda kimyasal olarak kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonu, evrimden, moleküler biyolojiye, insan genetiğinden, gelişim ve adli tıpa kadar birçok konuda uygulama alanı bulmuştur (Klug ve Cummings, 2000).

PZR, bir seri reaksiyon döngüsünden oluşur. Her bir döngü (1) hedef nükleik asitin tek zincirini (kalıp DNA) veren zincir ayrılması basamağıyla başlar. (2) Bunu takip eden primer bağlanması basamağı sırasında, serbest 3'-OH ucu taşıyan tek zincirli bir oligonükleotit olan primer, tamamlayıcısı olan kalıp DNA dizisine bağlanır. (3) Sonunda da her bir primer hedef bölgedeki DNA polimeraz aktivitesiyle uzatılır. Bu üç basamaklı

döngü yeterli miktarda ürün elde edilinceye kadar tekrarlanır (Mullis vd., 1986; Saiki vd., 1988; White vd., 1989; Arheim ve Erlich, 1992; Avise, 1994).

PZR tekniğinin ilk adımında, ilgili DNA molekülü denatürasyon yolu ile tek zincirli hale getirilir. Bu işlemin gerçekleşebilmesi için 90-94°C’de, 4-5 dakikalığına çift zincirli yapıya sahip olan DNA tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Takiben ortam sıcaklığı primerlerin içeriğine bağlı olarak hesaplanan ve primer bağlanma sıcaklığı (T_m) denilen 45-65°C’ arasında bir sıcaklık derecesine düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA molekülüne özgün olarak bağlanmasına olanak sağlanır. Bağlanan bu primerler 15-30 nükleotit uzunluğuna sahip sentetik oligonükleotitler olup çoğaltılacak hedef DNA parçasına komşu bölgelerdeki tamamlayıcı dizileri özgül olarak tanır ve bağlanır. İşte bu özgün primerler, kalıp DNA’dan hedef DNA parçasının sentezlenmesi için, sentez başlama bölgesi olarak rol oynar. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık, bu polimerizasyonun (zincir uzamasının) gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa çıkarılır. Son basamakta ise PCR solüsyonundaki DNA polimeraz enzimi primerlerin arasında kalan bölgeyi 72°C de sentezler. DNA polimeraz, primerlerin bağlanma bölgesinin önünden itibaren nükleotitleri DNA molekülünde 5’→3’ yönünde ekleyerek hedef DNA parçasının bir kopyasını oluşturacak uzamayı sağlamış olur ve bu sayede hedef DNA’nın iki zincirli kopyasını oluşturulmuş olur (Klug ve Cummings, 2000). Gerekli olan sıcaklık değişimleri ise ısı döngüleyici olan thermal cycler sayesinde gerçekleştirilir. Bu evrede, DNA polimeraz olarak isimlendirilen ve *Thermus aquaticus* isimli bir bakteriden elde edilen yüksek sıcaklık aktif Taq DNA polimeraz enziminden faydalanılır (Mullis ve Faloona, 1987).

Bu üç aşama ile gerçekleştirilen PZR; çift zincirli DNA’nın tek zincirli hale getirilmesi, primerlerin uygun sıcaklıkta kalıp DNA’ya bağlanması ve DNA polimeraz enzimi yardımıyla istenilen hedef DNA parçasının uzaması bir PZR döngüsü olarak bilinir. PZR bir zincirleme reaksiyondur, zira yeni DNA molekülü sayısı her döngü sonunda ikiye katlanır ve oluşan yeni zincirler de bir sonraki döngüde kalıp görevi yaparlar. PZR döngüsü dört veya beş dakika sürebilir ve bu işlem genellikle ortalama 30-50 döngü arasında tekrarlanabilir (Klug ve Cummings, 2000).

PZR ürünleri genellikle jel elektroforezi ile analiz edilir. Elektroforezden sonra etidiyum bromid ile boyanarak elde edilen DNA bantları kolaylıkla okunabilir.

PZR dayalı moleküler belirteç üretmek için yaygın kullanılan iki yöntem, RAPD (Rasgele Artırılmış Polimorfik DNA) ve AFLP (Artırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)'dir. RAPD tekniğiyle kısa (genellikle 10 baz uzunluğunda) olan sentetik, rastgele dizili primerler kullanılarak, genomik DNA, düşük primer bağlanma sıcaklığında PZR ile çoğaltılır (Williams vd., 1990). AFLP metodunda, genomik DNA biri seyrek ve diğeri ise sık kesen iki ayrı restriksiyon endonükleaz ile kesilir. Kesim sonucunda oluşan DNA parçalarının kesim bölgelerine, PZR ile çoğaltmada primer tanıma yeri olarak rol alacak olan adaptörler bağlanır. Adaptörler enzimi kestiği DNA dizilerine uygun olarak hazırlanırlar. Adaptör dizilerine ilaveten rasgele üç nükleotidin primer baz dizisine ilave edilmesi, kesin sonucunda oluşan DNA parçalarının sadece bir kısmının seçici olarak çoğaltılmasını sağlar.

1.5.2. DNA Dizi Analizi

İlgilendiğimiz DNA bölgesinin nükleotit sırasının ortaya konulmasında uygulanan yöntemdir. DNA dizi analizi bir nükleik asidin diğerine hibridzasyonuna dayalıdır. Gerçekleştirilen bu işlem esnasında radyoaktif olan ya da olmayan maddelerle nükleotitler işaretlenir.

Bu yöntemlerden biri olan Sanger zincir sonlama yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.5.2.1. Sanger Zincir Sonlama Yöntemi

Sanger zincir sonlandırma yöntemi günümüzden yaygın kullanılan DNA dizi analiz tekniğidir ve enzimatik DNA sentezine dayanır. Tehlikeli kimyasallardan uzak, verimli, hızlı bir yöntem ve radyoaktivite gerektirdiği için kısa sürede hızla yaygınlaştı. Sanger zincir sonlama yönteminde dizisi deşifre edilecek olan DNA parçası yeni sentezlenecek zincir için kalıp olarak kullanılır. Sanger zincir sonlama yöntemi için; tek

iplikçi kalıp DNA, dNTP, ddNTP, Klenow, *Taq* DNA Polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden biri ve Serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır.

Yöntem, DNA polimerazın hem dNTP'leri hem de deoksiribozun 3' pozisyonundaki hidroksi grubu olmayan ddNTP'leri substrat olarak kullanabilme esasına dayanmaktadır. Sentezlenmekte olan DNA zincirine DNA polimeraz tarafından herhangi bir ddNTP'nin eklenmesi nedeniyle 3' ucunda hidroksi grubu eksik olduğu için sentezi durmaktadır. Reaksiyonların her birinde eser miktarda değiştirilmiş nükleotit kullanılmasından dolayı yeniz zincir sentezi gelişigüzel sonlandırılarak bir sıra DNA parçası meydana gelmektedir (Klug ve Cummings, 2000). PCR reaksiyonu ile elde edilen DNA fragmentleri elektrik alana maruz bırakılarak koşturulur. Yürütülen elektriksel alanda DNA parçacıkları büyüklükleriyle ters orantılı olarak göç ederek jelde merdivenvari bir görüntüsü oluşur. İşaretleme tercihinine bağlı olarak jelde görüntülenen fragmentler reaksiyon karışımına eklenen ddNTP'nin çeşidine göre okunur (Klug ve Cummings, 2000).

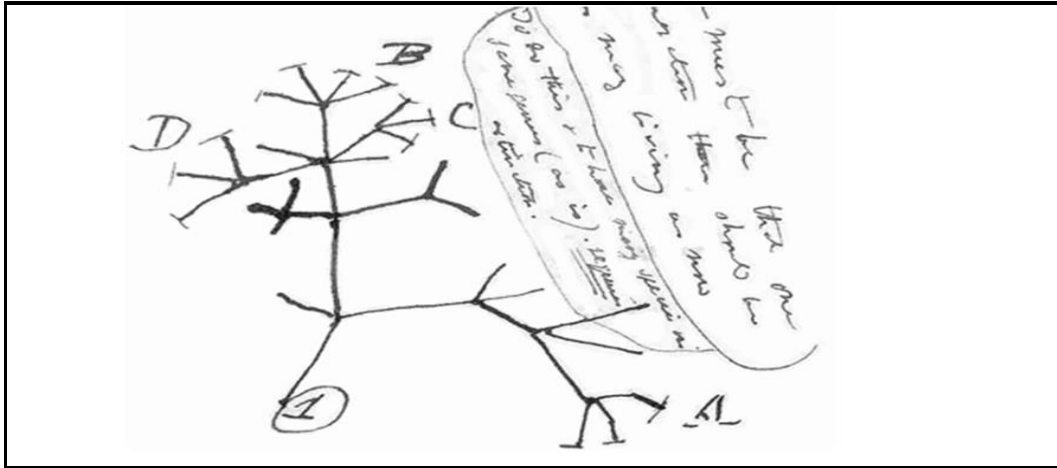
1.5.2.2. Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Yöntemi

Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi, farklı uzunluktaki DNA parçalarının üretilmesi ile sonuçlanan, DNA zincirini kesmek için kimyasal muamelesinin (Hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit) kullanıldığı yöntemdir. Bu yöntemin esas amacı DNA'da bulunan bazların kimyasallar kullanılarak değiştirilmesine ve daha sonra değişikliğe uğramış nükleotidlerin (Piperidin) bulunduğu noktalardan zinciri kırması esasına dayanmaktadır. Maxam-Gilbert metodunda nükleotit dizisi deşifre edilmek istenen DNA parçası, öncelikle 5' ucundan ³²P veya floresan boya ile işaretlenir. Çift haldeki DNA zinciri birbirinden veya DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA'nın sadece bir ucundan işaretlenmesi sağlanır. İşaretleme yapıldıktan sonra DNA molekülleri dört tüpe ayrılır. Her bir örneğe A, C, G ya da T nükleotitlerinden birini değiştirmek ve kırmak için gerekli olan kimyasallar eklenir. Reaksiyon için sınırlı zaman ayrılarak her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotitlerden kırılmış olan DNA parçaları üretilir. Sonuçta kırılmanın olduğu pozisyona göre 5'- pozisyonlarından işaretli fakat boyları birbirinden farklı bir dizi DNA fragmenti elde edilir. DNA fragmentinden elde edilen farklı büyüklükteki DNA dizileri, jel elektroforezinde yan yana yürütülmesi

sağlanarak birbirleri arasında büyüklüklerine göre ayrılır. Jel üzerindeki pozisyonlarının tespiti için otoradyografik görüntüleme yapılır (Klug vd., 2000).

1.6. Filogenetik Analiz Metotları

Filogenetik, tüm organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi ata-soy ilişkileri şeklinde ortaya çıkarmayı amaçlar. Organizmaların sahip olduğu moleküler mekanizmalar, tek bir ataya sahip olduklarını göstermektedir. Ortak atadan evrimleşmeleri sayesinde türler, birbirleriyle ilişkilendirilebilir (Singh, 2015). Filogenetik sistematığının kurucularından Alman biyolog Henning, bu ilişkilendirmenin; türler arası morfolojik, fizyolojik, genetik, coğrafik ve ekolojik farklılıklar dikkate alınarak gerçekleştirilebileceğini ortaya koymuştur (Onursal ve Avni, 1997). Saptanan filogenetik ilişkinin, grafiksel olarak gösterimi “filogenetik ağaçlar” aracılığıyla olur. Organizmalar arası evrimsel ilişkileri gösteren bu filogeniler “evrim ağacı ya da yaşam ağacı” olarak da bilinmektedir. Yaşam ağacı kavramı, tek atadan köken almış ve dallanarak farklılaşmış türleri tek bir konsept halinde göstermek için, ilk kez İngiliz biyolog Charles Darwin tarafından (1809-1882) evrim teori kapsamında kullanılmıştır (Şekil 11).



Şekil 15. Charles Darwin'in “Türler kökeni (1859)” bölüm IV’de kullandığı yaşam ağacı.

Alman biyolog Haeckel, Darwin’in görüşlerini benimseyerek biyogenetiğin temelini attığı çalışmalarda daha kapsamlı ve ayrıntılı yaşam ağaçları oluşturmuştur.

Filogenetik analizin amacı türler arasında olan ilişkiyi ortaya koymaktır. Moleküler filogeni çalışmalarının amacı ise DNA ve proteinlerdeki değişimlerin süratını ve karakterini belirlemek ve böylece gen ve organizmaların değişimsel geçmişini araştırmaktır. Sistematik ile çalışanlar, sistematikçiler; bir grup organizmanın evrimsel tarihi ve ilişkileri filogenetik ağaçlar yardımıyla tanımlarlar. Çoğu sistematikçi, evrimsel ilişkileri sınıflandırmada bu ağaçları temel alır ve kullanırlar (Saitou ve Imanishi, 1989). Filogenetik ağaç oluşturma metotları mesafe temelli ve karakter temelli olmak üzere iki ana kategori içerisinde sınıflandırılabilir.

1.6.1. Mesafe Temelli Yöntemler

Tüm taksonların aralarındaki uzaklıklar dikkate alınarak yerleştirildiği filogenetik ağaçlardır. Genetik mesafe metodu, filogenetik ağaç oluşturulması için veri setinde her bir dizi çifti arasındaki nükleotit farklılığı sayısının belirlenmesi dayalıdır. Nispeten genetik mesafesi en düşük olan türlerden başlayarak bir ilişki ağacı oluşturulur. Uzaklık metotları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşması sağlanır (Mount, 2001). Uzaklık metotları, diğer yöntemlerden daha kolay ve hızlıdır (Freeman ve Herron, 1999). Mesafe temelli yöntemlerden bazıları; UPGMA ve Neighbour joining yöntemleridir.

1.6.1.1.UPGMA (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup) Metodu

Köklü ağaçlar oluşturan ultrametrik (kökten tüm uçlara eşit uzunlukta dalları olan) bir ağaçlandırma bir metottur. Verileri uzaklık bakımından algoritmik olarak düzenleyerek taksonları kümeleyen bu metot, bu uzaklığı elde ederken bir formül kullanır (Xiong, 2006).

En yakın iki taksonun gruplandırılmasından başlar. Artan uzaklık dikkate alınarak, tüm taksonları gruplamaya dayanır. Kademeli olarak uzaklık arttıkça taksonlar yeni gruplara girmeye ve birbirinden farklılaşmaya başlar (Morrison, 1996). Veriler, genetik uzaklık bakımından kümeleyerek analiz eden bu kümelendirme metodu, evrimsel saate dayandırılmadığı için köksüz ağaçlar oluşturulur. Köksüz filogenetik ağaç oluşturan en basit metottur.

1.6.1.2. Neighbor-Joining (Komşu Katılım) Metodu

Komşu katılım yönteminde ile yalnızca bir tane ağaç oluşturulur ve diğer olası ağaç topolojileri test edilemez. Bu problemin giderilmesi için komşu katılım metodu geliştirilmiştir. Komşu katılım metodu bilgisayarlı hesaplama yoluyla hızlı ve yüksek kesinlikli filogenetik sonuçlar verdiği için ağaç oluşturmada çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar ve Gadagkar, 2000).

1.6.2. Karakter Temelli Yöntemler

Bu yöntemler, atasal ilişkileri belirlemek için bilinen bütün evrimsel bilgiyi kullanır. Bu evrimsel bilgi diziler arasındaki bireysel değişimler olabilir. Dizilerde biriken mutasyonların sayılmasına dayanırlar. Bu yöntem mesafeye dayalı yöntemlere kıyasla daha yavaştır ve daha çok bilgisayar işlemi gerektirir (Li, 2004). Karakter temelli yöntemlerden bazıları; Maksimum parsimoni (MP), Maksimum likelihood (ML) ve Bayesian çıkarsama (BI) metodudur.

1.6.2.1. Maksimum Parsimoni (Farklılıkları En Az İndirme Yöntemi)

Karmaşık olarak açıklanması “parsimoni” şeklinde tanımlanır. Bu nedenle bu ağaçlandırma yöntemi incelenen dizilerle birlikte uyum gösteren bir ağaç eldesi için gerekli en kısa mutasyonal adımın saptanmasını esas alır. Biyolojik değişim süreci boyunca karmaşık yerine basit bir açıklama yaparak verilerin yorumlanmasıdır. Bu yöntemi uygularken, dizi pozisyonlarının farklı puanlamaları seçilebilir. Örneğin; muhafaza edilmiş bölgede meydana gelen baz değişimleri, değişken bölgedeki mutasyonlardan daha çok öne çıkartılmak istenebilir. Maksimum parsimoni metodu ile filogenetik ağaçların oluşturulmasında kesin ve tahmini yaklaşım söz konusu olmaktadır (Freeman ve Herron, 1999).

1.6.2.2. Maksimum Likelihood (En Yüksek Olasılık Yöntemi)

Maksimum likelihood (ML), maksimum parsimoniye alternatif olarak 1981 yılında Joseph Felsenstein tarafından ortaya konulmuş bir yöntemdir (Felsenstein, 1987).

Birçok olası ağaç içerisinde en iyi ağacın seçilmesinde istatistiksel testler kullanarak ortaya konmuştur. Bu nedenle, MP metodu, her bir ağaç topolojisinin değerlendirmesini yapar veya gözlenen verinin oluşturulma olasılığını hesaplar. Şayet ağaç doğruysa her bir dalın meydana gelme olasılıkları toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını kabul eder. Bu olasılık, ağaçların meydana gelme olasılığı olarak kabul edilir. En iyi sonucu ve en bilgilendirici ağacı vermesine rağmen ML yöntemi çok yavaş ve oldukça yoğun bir matematiksel işlem gerektirir (Li, 2004).

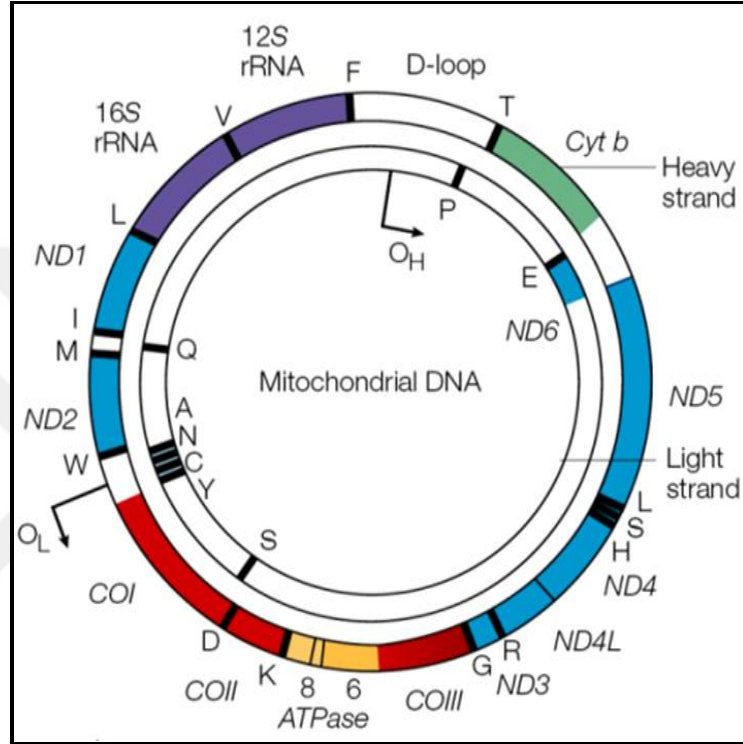
1.6.2.3. Bayesian Çıkarsama Metodu

1981 yılında Joseph Felsenstein tarafından maksimum parsimoniye alternatif olarak açıklanmış bir yöntemdir (Felsenstein, 1987). Filogenetik de kullanılan en yaygın metot olarak kabul edilir. Esas olarak maksimum likelihood metoduna benzerlik gösterir ancak sonraki olasılık kullanımı ile bu yöntemden farklılık gösterir. Bayesian çıkarma yönteminin amacı sadece bir doğru filogeniyi bulmak değil, oluşabilecek bütün filogenilerin sonsal olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. Bunun için bazı evrimsel parametrelerin olasılıklarını ve önceki olasılık dağılımlarını kullanır. Çok sayıda oluşabilecek olan ağacın analizi için Monte Carlo algoritmasına dayanan metotlar kullanılır (Larget ve Simon, 1999; Yang ve Rannala, 1997).

1.7. Mitokondri DNA (mtDNA)

Mitokondri; kromozomal DNA'dan fiziksel olarak değişik olan ve mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak isimlendirilen kendi DNA'sına sahiptir. İnsandaki mtDNA çift sarmallı ve halkasal, 16 569 baz çifti (bp) uzunluğunda olup 37 gen ve 1 tanesi de kontrol bölgesi (D-loop) olmak üzere 38 bölgeden oluşur. Otuz yedi genin 28'i ağır zincirinde (H), 9'u hafif zincirinde (L) yer almaktadır (Lewin, 1997; Wallace, 1999). Çift sarmal yapıdaki DNA iplikçiklerinin her birinin baz kompozisyonunun farklı olması ve bu nedenle meydana gelen moleküller ağırlıktaki farktan dolayı zincirlerden biri H zincir diğeri ise L zincir olarak bilinmektedir. Kodlama yapmayan, mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun başlaması ve düzenlenmesinde görev alan Displacement loop (D-loop) kontrol bölgesi denilen bir bölge bulunmaktadır. Gen kodlamayan ve ileri derece polimorfizm gösteren bu bölgede ilk önce ağır zincirin replikasyon orijininin 5'-3'

yönünde DNA sentezi başlar. Mitokondri DNA'nın %5-7'sini kapsayan kontrol kodlama yapmaz. Mitokondri DNA'sında genler arası bölgeler ve genler içerisinde intronlar yoktur (Lewin, 1997; Strachan ve Read, 1996). Her hücrede bir adet bulunan nükleer DNA'nın tersine hücre başına 100-10.000 kopyaya ve her bir mitokondri de 2 ile 10 arasında kopya mtDNA molekülüne sahiptir (Saara, 1999).



Şekil 16. Mitokondri DNA (Taylor ve Turnbull, 2005).

Özellikle son yirmi yılda mitokondri DNA'sı, evrimsel temelli çalışmalar için oldukça güçlü bir yöntem haline gelmiştir. Bu çalışmalar kapsamında mtDNA dizilerinin analizi ile türlerin populasyon yapısı, populasyonlar arası gen akışı, hibridizasyon ve filogenetik akrabalıkların tespiti için veri üretimine katkı sağlanmıştır (Moritz, 1994a).

Mitokondri DNA evrim çalışmalarında en çok kullanılan bir moleküldür. Mitokondri DNA oldukça yüksek evrimleşme hızına sahip olması, yakın ilişkili türleri ve bir türün populasyonlarının kıyaslanmasında oldukça faydalı olunmuştur (Harrison, 1989). Bundan dolayı mitokondri DNA'nın mutasyon hızı nükleer DNA'nın ki ile mukayese edildiğinde 5-10 kat daha yüksek olması ve ortalama değişme oranı bir milyon yılda yaklaşık olarak %2'dir ve bu da nispeten sabittir. Bunun nedeni mtDNA molekülünün oksijen radikallerine maruz kalması, koruyucu ve tamir mekanizmalarının

olmamasındandır. Bundan dolayı mtDNA molekölü mutasyona daha açık haldedir. Ayrıca klonal kalıtım özelliği taşıması, rekombinasyon göstermemesi ve haploid özellik göstermesi gibi avantajlarından dolayı tercih edilir (Cann vd., 1987; Rokas vd., 2003). Genetik sürüklenme nükleer DNA'ya kıyasla mitokondri genomu üstünde çok etkili bir süreç olduğundan popülasyonlara özgü mtDNA molekölü markırlar tasarlamak daha mümkündür. Tür üstü seviyede sistematik birimlerin mukayesesinde mtDNA genlerine ait DNA dizileri belli sistematik kategorilerdeki taksonları ayırt etmek için güçlü DNA markırlardır. Mitokondri genomu, filogenetik çalışmalarda kullanmak için faydalı pek çok özelliklere sahiptir (Avise, 1994). MtDNA birkaç türü paternal (babadan) sızıntılar gösterse de genellikle maternal (anasal) olarak katılır. Hücre bölünmesi esnasında mitokondriler ve genomları yavru hücrelere replikatif segregasyon ile gelişigüzel dağılmaktadır. Nükleer DNA'dan bağımsız olarak replike olan mitogenom bu özelliği sayesinde hücre bölünmesi sırasında heteoplazmik bir segregasyon gösterebilir. Bir hücredeki tüm mtDNA'ların aynı olması homoplazmi, mutant ve normal mtDNA'ların bir arada bulunmasına ise heteroplazmi olarak isimlendirilmektedir. MtDNA yapısı, gen düzeni ve ikincil balıklarda büyük oranda korunmuş olup, mtDNA'nın evrimi balıklarda nispeten iyi çalışılmıştır. Balık mitokondri genomu haploid özelliğe sahiptir, yani her bir organizma yalnızca bir çeşit mtDNA bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, heteroplazmi (bir bireyde birden fazla mtDNA çeşidinin bulunması) olduğü belirtilmiştir (Moritz vd., 1987; Bentzen vd., 1988; Moritz, 1991). Heteroplazmi, tirsi (Bermingham vd., 1986), Atlantik ringası (Bentzen vd., 1988), hamsi (Magoulas ve Zouros, 1993) ve mersin balığında (Eroğlu, 2009) olmak üzere birkaç balık türünde görölmüşür.

Yalnızca bir genin evrimsel değişimi tüm genomun tarihinden farklı olabileceğinden, popölasyon tarihini yansıtan mitokondriyal gen ağaçlarının değerlendirilmesinde dikkat edilmelidir. Bu özelliğinden bakımından, yakın akaraba türler ve popölasyonların filogenetik ilişkilerini çalışmak için uygundur. Filogenetik analizler için iyi bir moleköl belirteç olan mtDNA günümüzde PZR yöntemleriyle çalışılmakta, evrensel ve spesifik mtDNA primerleri kullanılarak mtDNA genomunun spesifik bölgeleri çoğaltılabilmekte ve sonraki aşamada hem dizi belirlenmesi hem de restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi çalışmaları yapılabilmektedir. Bu yöntemlerle mitokondrinin protein kodlayan bölgesi, kodlama yapmayan bölgesi ve transkribe olmayan kontrol bölgesinin popölasyon, cins ve tür gibi yakın zamanda ayrılmış

taksonların ilişkilerini analiz etmek için kullanışlı olduğu belirtilmiştir (Miyamoto ve Fitch, 1995).

MtDNA'nın değişik bölgeleri arasındaki evrim hızı farklılığı, taksonomik düzeyde birkaç balık grubunun taksonları arasındaki genetik çalışmaları gerçekleştirmek için uygun bir yol sağlar (Kocher ve Stepien, 1997). Mitokondri DNA, türlerin ve alt türlerinin biyocoğrafyaya bağlı olaylarını incelemek için mükemmel bir araçtır (Avice, 1994).

1.8. Literatür Özeti

Perdices vd., (2001) *Aphanius iberus* türünün İberya popülasyonlarının moleküler varyansı ve filogenetik ilişkilerini, allozimler ve sitokrom b gen dizisi kullanılarak ortaya çıkarmışlardır. Hem nükleer hem de mitokondri moleküler belirteçlerle uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Akdeniz ve Atlantik popülasyonları açıkça iki bağımsız soya ayrılmıştır. Onların yüksek moleküler ayrışması, erken bir izolasyon olduğunu gösterir ve popülasyonlar arasında gen akışının olmaması, onların bağımsız evrimlerini göstermektedir. Nükleer ve mitokondri verileri, iki coğrafi soyun monofitik kümelenmesini ortaya koymaktadır, ancak popülasyon içindeki ilişkilerine zayıf destek sağlıyor. Bununla birlikte, mitokondri sonuçları Villena popülasyonunu Akdeniz grubu içinde ayrı bir mitokondri birim olarak ayırmıştır. Coğrafi olarak *A. iberus*'un dağılım alanlarındaki geniş çaplı çalışmalar, bu türlerin çeşitlilik modellerinin aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. Atlantik ve Akdeniz popülasyonları arasında bulunan genetik farklılık, bilinen Cyprinodontid türleri arasında bulunanlarla aynı sıradadır. İki evrimsel soyun tanımlanmasının, bu türün korunmasında önemli etkilere sahip olduğunu, çünkü geri kazanımı, doğal çeşitliliğin tanınmasını ve korunmasını gerektirdiğini belirtmişlerdir. Akdeniz ve Atlantik soyları, genetik kimliklerini kaybetmemek için ayrı ayrı yönetilmesi gerektiğini ve genetik çeşitliliğin kaynağı olarak vahşi stoklar kullanılarak popülasyonların genetik benzersizliğinin korunması gerektiğini belirtmişlerdir.

Hrbek vd., (2002) yapmış oldukları çalışmada Orta Anadolu'daki *Aphanius* genusuna ait türlerin filogenetik ilişkilerini, erken Pliyosen de orojenik olayların neden

olduğu coğrafi özelliklerin hipotezine göre morfolojik benzerliklerini test etmek için incelemiştir. Bu hipotezi test etmek için üç türün 36 popülasyonunu ve altı dış grup türünü temsil eden 42 örnekten 3434 baz çiftlik mitokondri DNA dizisini analiz etmişlerdir. Analiz edilen genler arasında 12S ve 16S ribozomal RNA'larını kodlayanlar; valin, lösin, izolösin, glutamin, metiyonin, triptofan, alanin, asparagin, sistein ve tirozin kodlayan transfer RNA'ları ve NADH dehidrojenaz alt birimleri I ve II bulunmaktadır. Mesafeye dayalı maksimum olasılık analizleri *Aphanius danfordii*, *Aphanius* sp. ve *Aphanius anatoliae* türünü içermektedir. Filogenetik sonuçlar, hibridizasyon çalışmaları (Villwock, 1964) ve Anadolu'nun jeolojik tarihi ile desteklenmektedir. Bununla birlikte, altı klad arasındaki filogenetik ilişkiler sadece zayıf şekilde desteklenir, ancak analitik yöntemler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle, altı orta Anadolu kladı arasındaki eşzamanlı çeşitlenme hipotezini test etmişler ve bu durumu destekleyen sonuçlara ulaşamamışlardır.

Hrbek ve Meyer (2003) Tethys Denizi'nin kapanmasının jeolojik kanıtlarından türetilen vikaryans türleşme hipotezlerini test etmek için, *Aphanius*'un 13 türünün 49 popülasyonunu temsil eden örneklerden 3263 bp mitokondri DNA'sı ile filogenetik ilişkilerini yeniden oluşturmuşlardır. Grup dışı taksonları olarak ek 11 cyprinodontid türü kullanmışlar. Analiz edilen genler arasında kısmi 12S ve 16S ribozomal RNA'ları kodlayanlar; valin, lösin, izolösin, glutamin, metiyonin, triptofan, alanin, asparagin, sistein ve tirozin için transfer RNA'ları; ve tamamlanmış nikotinamid adenin dinükleotit dehidrojenaz alt birimi I ve II. Bu DNA bölgesi için moleküler ikame oranının 9 baz çiftinin 1 milyon yıl olduğu tahmin edilmektedir ve Kızıl Deniz'in 13 milyon yıl önce Ürdün'deki Wadi Sirhan'a çok iyi tarihlenen bir dönüşümünden türetilmiştir; fosil kayıtlarından, alternatif bir 8 ikame baz çiftinin 1 milyon yıl oranı tahmin edilmektedir. *Aphanius*, eski doğu ve batı Tetis Denizine karşılık gelen iki ana bölüm oluşturur. Doğu kanadında, Oligosen, Arap Yarımadası'nda yaşayan bir tatlı su kanadına ve Pakistan'dan Somali'ye kadar kıyı bölgelerinde yaşayan bir eurihalin kanadına sapma gözlemlendi. Batı Tetis Denizi kanadında, İber Yarımadası ve Atlas Dağları ile Türkiye ve İran bölgelerinde orta Oligosen sapması gözlemlenmiştir. Türkiye'de geç Miyosen orojenik olaylarıyla ilişkili çok miktarda genetik farklılaşma gözlemlenmiştir. Filogenetik ilişkilerin kalıplarının uyumu ve jeolojik ve fosil verilerden türetilen alan ilişkilerinin yanı sıra bu kalıpların zamansal uyumuna dayanarak *Aphanius* cinsi için baskın olarak temkinli bir

türleşme hipotezini destekliyor. Bu örüntüye bir istisna, çok az genetik farklılaşma veya populasyon yapılanması gösteren, Avrupalı bir Akdeniz-türü olan *A. fasciatus*'un ana kaynağını oluşturur, böylece Messinian tuzluluk kriziyle ilişkili coğrafi bir farklılaşması olduğu hipotezini desteklemez. Filogenetik olarak en derin iki olay, muhtemelen Tetis Denizi'nin kapanmasıyla ilişkili ekolojik değişikliklerden de kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Blanco vd., (2006), yeni bir dişli sazancık türü olan *Aphanius saourensis*'i morfolojik ve genetik karakterlere dayanılarak tanımlamışlardır. Canlı erkek bireylerde vücut pigmentasyonu, dikey çizgileri olmayan, bolca benekli mavi ve gümüş desenden oluşmaktadır. Dişiler belirgin siyah noktalardan yoksundur. Yeni tür, sitokrom b genindeki 26 nükleotit pozisyonunda her iki kardeş taksonundan (*Aphanius iberus* ve *A. baeticus*) farklıdır. *Aphanius iberus* ve *Aphanius saourensis* arasında genetik mesafe sitokrom b geni için % 4.9-5.8 ve *Aphanius baeticus* ve *Aphanius saourensis* arasında ise %6.3-6.5 değişmektedir.

Hrbek vd., (2006) yapmış oldukları çalışmada yeni bir dişli sazancık türü olan *Aphanius isfahanensis*, türünü İran'ın İsfahan havzasından tanımlanmışlardır. Yetişkin bireylerde renk desenleri, mitokondri DNA dizi verilerinin moleküler karakter durumları ve çok değişkenli morfometrik ve meristik uzamda diğer İran da dağılım gösteren *Aphanius* türlerinden ayırt edildiğini belirtmişlerdir.

Babbucci vd., (2007) sekiz polimorfik mikrosatellit markır seti ile Akdeniz kıyılarında yaygın olarak dağılım gösteren *A. fasciatus*'un (Teleostei, Cyprinodontidae) AC motifini zenginleştiren kısmi genomik bir kütüphaneden başarıyla optimize etmişlerdir. Geliştirilen lokusların, polimorfik olduğu ve lokus başına iki ila altı alel gösterdiği ve beklenen heterozigotluğu 0.277 ila 0.752 arasında değiştiğini gösterdi. Tüm lokuslar Hardy-Weinberg dengesinin altında olduğu, ancak önemli heterozigot eksikliği gösteren Af8 hariç ve herhangi bir lokus çifti arasında bağlantı ilişkisi kanıtının olmadığını rapor etmişlerdir. Burada bildirilen belirteçler, bu türdeki genetik populasyon yapısının izlenmesinde potansiyel olarak faydalı olacağını söylemişlerdir.

Rocco vd., (2007) yaşam alanlarının doğal parçalanması nedeniyle, kıyı tuzlu su habitatlarında yaşayan bir Cyprinodontid olan *A. fasciatus*, popülasyonlarının belirgin bir şekilde yalıtılmasıyla süresiz bir şekilde dağılmış ve aralarında yüksek derecede osteolojik ve genetik farklılaşma ile karakterize edilmiştir. İtalya bölgesinde dağılım gösteren dört farklı popülasyondaki genetik ilişkiler, kontrol bölgesi (D-loop) mitokondri DNA dizisi ve RAPD-PCR tarafından üretilen polimorfizmler kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, yüksek Gst ve Fst değerleri ile de doğrulanan iyi tanımlanmış bir genetik yapılanmayı ve Ganzirri ve Lesina toplulukları ile diğer iki Sicilya popülasyonunun izolasyonu arasındaki yakın ilişkiyi ortaya koymuştur. Ayrıca, mitokondri DNA analizlerine göre, toplam genetik varyans popülasyonlar arasında daha yüksek olduğunu, ancak RAPD polimorfizmlerinde daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Annabi vd., (2012) *A. fasciatus*, orta ve doğu Akdeniz'in tuzlu kıyı sularında ve bazen de iç sularda dağıtılan bir cyprinodont'dur. Çalışmada, Tunus kıyılarından yakalanan *A. fasciatus* popülasyonunun genetik yapısını araştırmışlardır. Mitokondri NADH dehidrojenaz alt ünite 1'in (965bp) genetik çeşitliliği, üç *Aphanius* popülasyonunun 17 örneğinde ele alınmıştır. Maksimum olabilirlik (ML) ve komşu birleştirme (NJ) gibi filogenetik analizler tamamen uyumlu ve iki ana grubun varlığını gösterdi. İlk grup kıyı popülasyonlarını (Luza ve Sfax bölgeleri), ikincisi ise haliçten gelen bir popülasyonu (Oued Hamdoun bölgesi, Tunus) içermektedir. Moleküler varyans analizi (AMOVA), gruplar arasındaki varyasyon yüzdesinin popülasyonlara (%34,32) göre oldukça yüksek (%72,8) olduğunu göstermiştir. Genel Fst değeri (0.65; $p = 0.01$) iki şeridin geniş bir genetik yapısını destekler. Bu veriler, *A. fasciatus*'un coğrafi çeşitliliğine yönelik bir girişimi temsil eder ve bu türlerde meydana gelen evrimsel süreçler ve genetik yapı kalıpları hakkında yeni bilgiler sağladığını belirtmişlerdir.

Ferrito vd., (2013) Akdeniz dişli sazancığı *A. fasciatus*'un genetik yapısını çalışmışlar ve mitokondri kontrol bölgesinin 372-bp'lik bir bölümünü dizilemişlerdir. Tiren kıyıları, Sardunya, Sicilya, Adriyatik kıyıları, Malta, Tunus ve Yunanistan olmak üzere 27 örnekleme alanından 623 örneğin dizi varyasyonundan elde edilen haplotiplerin çoğu benzersizdir ve sadece %15'i farklı popülasyonlar arasında paylaşılmaktadır. Yüksek FST değeri (= 0.80), güçlü bir popülasyon genetik yapılanmasını göstermektedir. Bayesian çıkarımı, maksimum olabilirlik ve maksimum parsimoni ve medyan birleştirme

ağına dayanan filojetik analiz, Güneydoğu Sicilya populasyonlarının (Hyblean bölgesine ait) ve diğer Tunus populasyonunun keskin bir şekilde ayrıldığını göstermektedir. Adriyatik, Doğu Sicilya ve Yunan populasyonları iyi bir şekilde ayırt edilirken, Orta-Batı Akdeniz'den gelen populasyon grubu net bir farklılaşma modeli göstermemektedir. Bulgularında, *A. fasciatus*'un şu anki genetik yapılanmasının, Akdeniz havzasında Geç Miyosen'den Pleistosen'e kadar meydana gelen tarihi coğrafi desenleri yansıttığını belirtmişlerdir.

Gholami vd., (2013), günümüzde *Aphanius* türü olarak kabul edilen *Aphanius sophiae*'un morfolojik olarak benzer populasyonları, Zagros Dağları'ndaki endorik Kor Nehri Havzası'nda yaşamaktadır. Morfolojinin (morfometri, malistikler, otolitler) incelenmesi ile birlikte mtDNA (sitokrom b) bazlı genetik analiz kullanılarak, *A. sophiae* olduğu düşünülen bireylerin *A. shirini* olarak tanımlanan yeni bir türü daha içerdiğini keşfetmişler. Yeni türlerin erkekleri, İran'ın *Aphanius* türleri arasında en düşük yan çubuk sayısı olan, yalnızca 7-10 tane tanımlanmış beyaz yan çubuklara sahip olan diğer İran *Aphanius* türlerinden ayırt edilebilir. Hem erkekler hem de dişiler, diğer tüm İran iç *Aphanius* türlerinden önemli ölçüde daha uzun bir kaudal sapı ve daha küçük bir sırt yüzgeci derinliğine sahip olarak farklılık gösterir. PhyML ve Bayesian ağaçlarına dayanan *A. shirini*, Zagros Dağları'ndaki Karoun Havzası'ndan *A. vladkovi*'nin kız kardeşidir. Elde ettikleri sonuçlar, antik bir exorheic Kor Nehri Havzasının Geç Miyosen ve Pliyosen'de bulunduğunu göstermektedir. *A. shirini* ve *A. vladkovi* arasındaki yakın filogenetik ilişki, antik Kor Nehri Havzası'ndaki Pliyosen öncesi drenajın günümüzde olduğu gibi güneybatıya (Karoun Havzası'na) yönlendirilmediğini göstermektedir. Hem *A. shirini* hem de *A. vladkovi*, *Aphanius* için en yüksek irtifa kayıtlarını temsil ediyor. *A. shirini* ve *A. vladkovi*'nin parçalarının, Zagros Dağları'ndaki en yüksek irtifaları (> 3000 m) yaratan ve nüfusların izolasyonuna yol açan Orta ila Geç Miyosen'deki tektonik olaylarla bağlantılı olabileceği sonucuna varmışlardır. Günümüzdeki endorik Kor Havzasının Geç Pleistosen veya Erken Holosen'de oluştuğu bilinmektedir ve “genç” *A. sophiae* yaşı bu tarihle açıkça ilişkilidir. Sonuçları, İran'ın tektonik olarak faal Zagros Dağları'ndaki jeolojik tarih ile günümüzdeki tür çeşitliliği arasındaki bağlantıyı aydınlatmaya katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Alavi-Yeganeh vd., (2014) yapmış oldukları çalışmada *Aphanius mesopotamicus* Coad, 2009'un cytb dizileri (1140 bp) arasındaki varyasyon ve bu taksonun morfolojik özelliklere dayalı yeni tarif edilmiş bir dişli sazancık olarak geçerliliğini araştırmak için yakından ilişkili türlerle karşılaştırmışlardır. Maksimum olasılık ve Bayesian ağaçları, *A. mesopotamicus*'un monofiletik olduğu ve kardeş grubu *A. sophiae* ile olan ilişkisini desteklediğini ve *A. sophiae*'nin dört farklı popülasyon örneğiyle karşılaştırıldığında 10-16 baz farkı bulundu, ancak spesifik olmayan farklar sadece 6 bp'ye kadar olduğunu belirtmişlerdir. Bu mesafeler, yaklaşık 1 milyon yıl önce *A. sophiae* ile ortak bir atadan sapma olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, yeni bir türleşme olayını gösteren morfoloji temelli hipotezlerle uyumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Esmaili vd., (2014) iki yeni *Aphanius* türünü, İran'ın güneyindeki kol drenajından (*Aphanius darabensis* n. sp.) ve kuzey İran'daki endorjenik Kavir Havzası'ndan (*A. kavirensis* n. sp.) tanımlamış ve sekiz yakın tür ile karşılaştırmıştır. *Aphanius darabensis* sp. moleküler karakterlerle (sitokrom b) ve üç morfolojik karakterin kombinasyonu ile ayırt edildiği *A. shirini*'nin kardeş taksonudur. *Aphanius kavirensis* sp. *S. sophiae*, *A. mesopotamicus* ve *A. pluristriatus* içeren bir grup ile yakından ilgilidir, bunlardan sitokrom b karakterleri ve üç morfolojik karakterin kombinasyonu ile ayırt edilir. Sitokrom b verilerine dayanan ağaçları, İran dağılım gösteren *Aphanius* türlerinin (IIRAS) üç alt kuşakla (*A. vladykovi* -, *A. shirini* -, *A. sophiae* alt klavuzları) monofiletik bir klon oluşturduğunu göstermektedir. Üç alt diziden en çeşitli olan *A. sophiae* alt tabakası, üç soya bölünebilir (*A. isfahanensis* -, *A. farsicus* -, *A. sophiae* soyları). IIRAS kanadının zamansal çeşitliliği tartışılmış ve *Aphanius*'un iki evrimsel grubu tasvir edilmiştir. *Aphanius vladykovi*, *A. shirini*, *A. darabensis* n. sp. ve *A. isfahanensis* “eski” evrim grubunu karakterize eder. Farklılaşmalarının 10-5 milyon (Geç Miyosen-Erken Pliosen) olmuş olabileceğini belirtmişleridir. *Aphanius farsicus*, *A. arakensis*, *A. sophiae*, *A. mesopotamicus* ve *A. pluristriatus*, *Aphanius kavirensis* n. sp., Geç Pleistosen (100,000–11,700 yıl) ve Erken ila Orta Holosen (yaklaşık 11,700–4,000 yıl) arasında gelişen “genç” evrimsel grubu temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Geiger vd., (2014) biyoçeşitlilik konusundaki eksik bilginin, koruma planlaması için engel teşkil ettiğini ve hatta küresel olarak önemli Biyoçeşitlilik Sıcak Noktalarında (BH) meydana gelir. Her ne kadar teknik gelişmeler moleküler biyoçeşitlilik

değerlendirmelerinin gücünü arttırmış olsa da, DNA sekansları ile türleri ayırt etmek çok önemlidir. Bu çalışmada, Akdeniz BH'nin (526 spp.) Tatlı su balığı faunası için ilk DNA barkod kütüphanesinin bir analizini sunmuşlar, neredeyse tamamen tüm türleri çalışmışlardır. Korunmayı destekleyen bir tanımlama sistemi oluşturmak için, taksonomistlerin tür tayinini 3165 örnek için DNA barkodlarının çoklu kümeleme analizleriyle karşılaştırmışlar. Barkod kümelerinin morfolojik belirleme ile uyumu, kümelenme belirleme yöntemine güçlü bir şekilde bağlı olduğunu, ancak genel karışık Yule-birleştirici (GMYC) model-bazlı yaklaşımla (GMYC varlığı olarak geri kazanılan tüm türlerin%83'ü) en yüksek seviyede idi. Genel olarak, genetik morfolojik süreksizlik, önceden tanınmayan 64 aday türünün varlığını göstermektedir. Tüm nehir barkod veri tabanını kullanırken, bireysel nehir havzaları için veri tabanları üzerinde yapılan analizlere kıyasla, düşük tanımlama doğruluğunu bulmuşlardır. Bu ölçek etkisinin barkod değerlendirmeleri için önemli etkileri vardır ve oldukça basit tanımlama yerel uygulamalarda yeterli çözünürlük sağladığını öne sürmüşlerdir. Koruma önceliği adaylarını belirlemek için Evrimsel Olarak Farklı ve Küresel Tehlike Altındaki puanları hesaplamış ve gelecekteki IUCN değerlendirmeleri için öncelikli türleri tespit etmek için barkod verilerinin evrimsel içeriğinin kullanılabileceğini savunmuşlardır. Karmaşık taksonların büyük ölçekli barkod envanterlerinin mümkün olduğunu ve koruma önceliklerinin değerlendirilmesine doğrudan katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.

Gholami vd., (2014) Güneybatı İran'ın endorjenik Maharlu Havzasına endemik olan *Aphanius farsicus*'un otolit verileri de dahil olmak üzere metrik ve meristik özelliklerini, DNA dizi verileri (sitokrom b geni) ile birlikte toplamda 92 örnek üzerinden analiz etmişlerdir. Bazı fenotipik varyasyonlar tespit edilmiş, ancak genetik veriler popülasyonlar arasındaki bağlantıyı açıkça göstermediğini belirtmişler. Fenotipik değişkenlik ile su sıcaklığı, habitat büyüklüğü ve avcılarının ve rakiplerinin yokluğu veya varlığı gibi çevresel değişkenler arasındaki olası bağlantılar tartışılmıştır. Literatür taraması ve yeni verilere dayanarak, mevcut endorhenik Maharlu Havzası'nın oluşturulduğu Pliyosen'den erken Pleistosen'e kadar oluşan büyük akiferler aracılığıyla kuraklık zamanlarında popülasyon bağlantısının korunduğu sonucuna varılmıştır. Burada ve önceki çalışmalarda sunulan yeni verilere dayanarak, *Aphanius* türlerinde plastisite ve sabit özelliklerin mevcut olduğu ve eğer bir popülasyon izole edilirse, belirli bir evrim

eğiliminin taksonomik olarak yararlı bir özelliğe yol açabileceğinin açık olduğunu belirtmişlerdir.

Gonzalez vd., (2014) Batı-İber Yarımadası havzasının yüksek tuzlu su toleransına ekolojik adaptasyondaki benzersizliğine rağmen, populasyon dinamikleri ve evrimsel tarih hakkında çok az şey bilindiğini belirtmişler. *Aphanius baeticus* (Cyprinodontidae), İspanya'nın güney Atlantik kıyı şeridinde “Tehlike Altında” sayılan endemik bir türdür. Bu çalışmada, *A. baeticus*'un genetik yapısı, çeşitliliği ve tarihi demografisi mitokondri sitokrom b (N = 131) ve nükleer belirteçler (test edilen 19 mikrosatellitten 4'ü, N = 288) kullanılarak incelenmiştir. Filogenetik ve ağ oluşturma rekonstrüksiyonu ince filogenetik yapılanmayı ortaya koymuştur. Periyodik sel baskınlarının neden olduğu posterior neslinin tükenmesi ve kolonizasyon olayları ile birlikte dağınık dönemlerin başındaki dağınık bir genişleme, populasyonlar arasında iyi tanımlanmış filogenetik ilişkilerin olmadığını açıklayabilir. Ayrıca, çok düşük genetik çeşitlilik değerleri ve zayıf bir populasyon farklılaşması tespit edildi. Nehir drenajlarını birbirine bağlayan periyodik taşkınların izin verdiği dağılımların, populasyonlar arasında geniş bir genetik değişime yol açabileceğini ve bu populasyonların mevcut genetik ilişkilerine katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir.

Pfleiderer vd., (2014) yeni bir tür olan *A. marassantensis* türünü, renklendirme, meristik ve morfometrik karakterlere ve mtDNA COI barkod bölgesine dayalı olarak Kuzey Anadolu'daki Kızılırmak Nehri drenajından tanımlamışlardır. Diğer Anadolu *Aphanius*'larından, aşağıdaki karakterlerden biri veya birkaçı ile ayırt edilmektedir: bir kalın gövde şekli (BD / SL 28.2 39.6), komple ölçek kapağı ve yanal çizgi boyunca 25–28 ölçek. Erkeklerde 8-13 koyu-kahverengi yan çizgileri vardır, bunlardan kaudal yüzgeci tabanının önündeki antentultimate çubuğu, kaudal yüzgecinin ön beyaz iç boşluğundan 0.9–1.8 kat daha geniş, kaudal yüzgecindeki dikey dikey sıralar, siyah dorsal yüzgeci, bazen dar beyazımsı-gri bir tabanı olan, siyah kenarlı bazı bireylerde 1-3 sıra siyah benekli beyaz bir yüzgeç ve hiyalin pelvik yüzgeçleri. Dişiler, kaudal veya anal yüzgeçlerde dikey koyu kahverengi lekeler dizisine sahip değildir, ancak dorsal yüzgeç tabanından bir dikey arkasında arkasında 1-3 yanal sıralarda düzenlenmiş, yanlarda koyu kahverengi lekeler vardır. Sırt yüzgeci ışınları ve membranlarda minik koyu kahverengi lekelerle sahip hiyalindir; pektoral yüzgeçler, kaudal ve anal yüzgeçler hiyalindir ve

belirgin bir büyük koyu kahverengi leke hipural plaka üzerinde orta-lateral pozisyonda bulunur. Yeni tür ayrıca mtDNA COI barkod bölgesinde 11 sabit, tanısal nükleotit ikamesi ile de ayırt edilir. Anadolu *Aphanius* türlerinin sayısını 12'ye getiren bu yeni türün tanımı, Anadolu'nun olağanüstü yüksek biyoçeşitliliğin bir bölgesi olarak karakterinin altını çizdiğini belirtmişler.

Buj vd., (2015) Güney Avrupa da dağılım gösteren *Aphanius fasciatus* türünün filocoğrafyası ve populasyon genetik yapısını incelemek için, iki Adriyatik kıyı şeridindeki örneklerin (sitokrom b ve mtDNA kontrol bölgesi) gen sekanslarını, doğu Adriyatik kıyısı boyunca sekiz bölgeden alınan numunelerle birlikte analiz etmişler. Güney Avrupa dışı sazancığı esas olarak aşırı su kütlelerinde yaşadığından, kolonizasyon ve değişken koşullara adapte edilmiş türlerin dağılımını anlamak için iyi bir model türdür. Doğu Adriyatik populasyonları genetik olarak ilişkili populasyonlardan oluşan iki gruba ayrılmaktadır. Kuzey grubu Sečovlje, Pag, Dinjiška, Nin ve Pantan populasyonlarını, Güney grubu Ston, Ulcinj ve Narta populasyonlarını içermektedir. Iraksaklık olaylarının çoğu Pleistosen dönemine kadar uzanır ve buzul döngüleri sırasında deniz seviyesindeki değişimlerin bu türün son zamanlardaki genetik yapısını şekillendirmede önemli bir rol oynaması muhtemeldir. Sonuç olarak, bu türün spesifik olmayan yapılanmasını ifade ederken, büyük çevresel farklılıklar, *A. fasciatus*'un diğer Akdeniz balıklarında görüldüğünden daha küçük bir tür içi genetik çeşitlilikle sonuçlandığını belirtmişlerdir.

Pappalardo vd., (2015) Bu çalışmalarında, benzer ekolojik özelliklerle nitelendirilen *Aphanius fasciatus* ve *Aphanius iberus*'ta genetik çeşitliliği, Akdeniz bölgesinde çok farklı dağılım aralıkları ile değerlendirmiştir. Beş'er *A. iberus* ve *A. fasciatus* populasyonu, beş polimorfik mikrosatellit lokus ve kısmi mitokondri kontrol bölgesi (D-loop) sekansları kullanılarak analiz etmişlerdir. Hem nükleer hem de mitokondri moleküler belirteçler ile uyumlu sonuçlar bulmuşlar. Sonuçlar, mitokondri kontrol bölgesi sekanslarına dayanan benzer genetik sapma seviyelerinin, *A. iberus*'un populasyonları arasında ve iki türün populasyonları arasında var olan çok farklı coğrafi mesafelere rağmen *A. fasciatus* populasyonları arasında bulunduğunu göstermiştir. Muhtemelen, *A. iberus* populasyonlarının *A. fasciatus* populasyonlarından daha uzun bir süre izole edilmiş olabileceği, soy içindeki *A. iberus*'a giden bölünmenin *A. fasciatus* 'a giden soydaki bölünmeden daha eski olduğu hipotezini desteklemiştir. *A. fasciatus*'un

geniş Akdeniz çevresinin dağılımının, bazı durumlarda yerel farklılaşmayı önleyen populasyonlarının yüksek bağlanabilirliğini sağlaması olasılığı göz ardı edilemez.

Cavraro vd., (2017), *A. fasciatus* populasyonlarının genetik yapısı, Venedik lagününden, Comacchio ve Corsica'dan toplamda dokuz bölgeden toplanan örneklerden elde edilen iki mitokondri DNA (mtDNA) belirteci (16S rRNA ve D-loop) kullanılarak analiz etmişler. Sonuçları Akdeniz ölçeğinde genişletmek için mevcut GenBank dizileri de dahil etmişlerdir. Venedik lagünü'ndeki genetik polimorfizmi çok düşük bulmuşlardır. Analiz edilen numunelerin çoğunda (16S rRNA için %66 ve D-loop için %83) her iki belirteç için aynı haplotipi paylaşıyordu. Venedik Lagünü'nde bulunan genetik homojenlik, Son Buzul Çağından'dan sonra güney Adriyatik populasyonlarının kuzeye göç etmesinin bir sonucu olabilir. Uyumsuzluk analizi, hızlı bir demografik ve mekansal genişlemenin açıkça belirtileri göstermiştir. Bu genetik homojenliği açıklamak için, acı su habitatlarının yüksek değişkenliğine adaptasyon ve yapay tanıtımlar gibi başka hipotezler önerilmiştir. Akdeniz ölçeğinde filogenetik analizler beş ayrı coğrafi soyun varlığını göstermiştir: Ege Denizi, İyonya Denizi'nin Yunan sahilleri, Adriyatik Denizi, Tiren Denizi ve Güney Sicilya. Moleküler varyans analizi, büyük olasılıkla geç Miyosen jeolojik olaylarına bağlı olarak gruplar arasındaki farklara bağlı olarak genetik bir bölünmeye neden olurken, gruplar ve populasyonlarda daha az polimorfizm varlığını tespit etmişlerdir.

Freyhof vd., (2017) *Aphanius dispar* grubunun sekiz türü mevcuttur. Kızıldeniz ve Akdeniz havzalarından *Aphanius dispar*, *A. stoliczkanus*, Arap / Basra Körfezi kıyı bölgelerinde, kuzey Arabistan Denizi'nin doğusundaki Hindistan'da Gujarat'a, Umman Körfezi ve İran ve Pakistan'da bazı endorik havzalarda, *A. richardhardsoni*'de Ürdün ve İsrail'deki Ölü Deniz havzasında, Ürdün'deki Azrak Vahasından *A. sirhani*, İran'daki bir ilkbahardan *A. ginaonis*, İran'daki az sayıdaki akarsulardan *A. furcatus* ve Etiyopya'daki bir gölden *A. stiassnyae*. Umman'ın kuzeyindeki Wadi al Batha drenajından yeni türler olan *Aphanius kruppi*, erkeklerin yanlarında 9-14 kahverengi veya gri yan çubuklarla, yuvarlak, elmas şeklinde veya biraz dikey olarak uzunlamasına bitişik olarak bitişik *A. stoliczkanus*'tan ayrılır. Dişi kaudal yüzgeci tabanına ortalanmış leke ve kaudal yüzgeci tabanı üzerinde 2-3 ölçek sıraları bulunur. *A. dispar* türünün mevcut moleküler genetik

verileri, Orta Doğu'daki tek yaygın kıyı türlerinin varlığının hipotezini reddetmekte ve tanımlanamayan iki türün Kızıldeniz havzasında ortaya çıkma ihtimalini azaltmaktadır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

1.1. Materyal

Aphanius genusunun türlerine ait örneklerin toplanılması, ülkemiz iç sularında nehir, dere ve göllerden biyolojik ve ekolojik özellikleri dikkate alınarak her bir türü temsil edecek sayıda Antalya, Burdur, Isparta, Denizli, Afyon, Eskişehir, Konya, Ankara, Kırşehir, Aksaray, Kayseri, Elazığ, Bitlis, Adıyaman, Kahramanmaraş, Adana ve Hatay olmak üzere 17 ilden toplamda 28 istasyondan gerçekleştirildi (Tablo 2).

Çalışma için toplamda 107 örnek elektroşoker yardımıyla toplandı. Her bir türün örnek sayıları Tablo 2’de verilmiştir. Örneklenen balıklar tür tayin anahtarına göre sınıflandırılarak etiketlenmiştir. 25-50 mg yüzgeç dokusu kesilerek %96’lık etil alkolde fikse edildi ve çalışmanın yapılacağı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Genetik Laboratuvar’ına getirildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Total DNA Eldesi

Aphanius örneklerinin yüzgeç dokusundan total DNA eldesi, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) protokolüne göre yapıldı. 10-25 mg yüzgeç dokusu alınıp 1,5 ml’lik eppendorf tüpüne konuldu. Örnek başına 180 µl Buffer ATL ve 20 µl proteinaz K çözeltileri tüpün içerisine ilave edilip ısıtılmalı çalkalayıcı cihazında 55°C’ de ve 1000 rpm’de doku tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 3 saat inkübe edildi. 3 µl RNase solusyonu eklenip tüpün iyice karışması için birkaç defa ters düz edilip 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışımın içerisine 200 µl Buffer AL çözeltilisi eklenip yüksek hızda 20 saniye vortekslendikten sonra 10 dakika 80 °C’de bekletildi. Karışımın tamamı bir pipet yardımıyla filtreli tüpe aktarıldı ve 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. Bu aşamada DNA filtrede tutunurken diğer hücre materyalleri filtreden geçerek tüpün alt kısmında toplandı. Akabinde 500 µl Buffer AW1 çözeltilisi eklenip 5 dakika beklendikten sonra 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. Bu işlemin ardından 500 µl Buffer AW2 çözeltilisi eklenip 5 dakika beklendikten sonra 3 dakika

14000 rpm’de santrifüj edildi ve bu işlemler sonucunda DNA kalan safsızlıklardan temizlenmiş olmaktadır. En son aşamada ise 200 µl Buffer AE ilave edilerek 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi ve filtrede tutunan DNA’nın alt kısımda bulunan 1,5 ml’lik eppendorf tüpüne aktarılması sağlanmış oldu. İzole edilen DNA kısa süreli muhafaza için 2-8 °C’de, uzun süreli muhafaza için ise -20 °C’de saklandı.

2.2.2. Total DNA ve PZR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Total DNA ve PZR ürünlerinin varlığı ve büyüklüğünün tespiti için % 0.8 ve 1.2’lik etidyum bromür ile boyanmış 1X TAE-Agaroz karışımı hazırlandı. 1X TAE tamponunu içeren elektroforez küvetinde 100 voltta 15 dakika elektrik alana maruz bırakıldı. Örneklerin yürütüldüğü agaroz jelin görüntülenmesi işlemi Quantum-Capt ST4 sistem (Vilber Lourmat, France)’deki ultraviyole transillüminatör cihazında gerçekleştirildi. Total DNA ve PZR ürünlerinin konsantrasyonunu, saflığı ve kalitesi Nanodrop 2000C model spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) cihazında belirlendi.

Tablo 2. *Aphanius* genusuna ait türlerin toplandığı istasyonlar, koordinatları ve örnek sayıları (N).

Türler	Istasyonlar	Koordinatlar	N
<i>Aphanius anatoliae</i>	İnsuvu Cayı, Cihanbevi, Konya	38°43'22.2"K 32°43'02.7"D	6
<i>Aphanius alexandri</i>	Çöçelli Mahallesi, Pazarcık, Kahramanmaraş	37°16'23.5"K 37°06'50.6"D	2
<i>Aphanius asquamatus</i>	Behramaz Çayı, Maden, Elazığ	38°28'27.5"K 39°33'26.6"D	5
<i>Aphanius boulengeri</i>	Gölbaşı Gölü, Adıyaman	37°48'00.6"K 37°38'40.0"D	4
<i>Aphanius danfordii</i>	Yay Gölü, Develi, Kayseri	38°19'47.1"K 35°17'40.4"D	6
<i>Aphanius fasciatus</i>	Tuz Gölü, Karataş, Adana	36°42'20.8"K 35°03'08.2"D	3
<i>Aphanius fontinalis</i>	Salda Gölü, Yeşilova, Burdur	37°31'35.0"K 29°40'29.8"D	4
	Karaevli Kaynağı, Burdur	37°34'46.7"K 30°24'02.5"D	2
<i>Aphanius iconii</i>	Eğirdir Gölü, Isparta	37°50'48.5"K 30°52'14.9"D	2
	Yeşilyurt Köyü, Sütçüler, Isparta	37°31'57.5"K 30°51'53.0"D	2
<i>Aphanius irregularis</i>	Aksu Çayı, Kaklık, Denizli	37°50'08.3"K 29°26'02.6"D	2
<i>Aphanius maeandricus</i>	Su çıkan Deresi, Dinar, Afyon	38°04'54.7"K 30°09'35.3"D	3
<i>Aphanius marassantensis</i>	Hirfali Barajı, Kırşehir	39°01'59.5"K 33°59'24.6"D	3
	Tuz Gölü, Şerflikoçhisar, Ankara	38°54'11.8"K 33°24'58.6"D	4
<i>Aphanius mentoides</i>	Nemrut Gölü, Tatvan, Bitlis	38°37'07.6"K 42°12'39.1"D	5
	Kırkgöz Gölü, Döşemealtı, Antalya	37°04'32.0"K 30°34'14.4"D	2
	Düden Çayı, Kepez, Antalya	36°57'11.9"K 30°44'26.0"D	5
<i>Aphanius meridionalis</i>	Çataloluk Deresi, Söğüt, Burdur	37°01'31.1"K 29°50'12.5"D	3
	Gavurçay Deresi, Elmalı, Antalya	36°38'21.8"K 29°45'13.6"D	4
	Akçay Deresi, Elmalı, Antalya	36°37'53.2"K 29°49'42.5"D	6
	Aslanlı Çayı, Sorkun Köyü, Gölhisar, Burdur	37°09'15.9"K 29°34'34.5"D	2
<i>Aphanius orontis</i>	Asi Nehri, Samandağ, Hatay	36°04'57.1"K 35°57'07.8"D	2
<i>Aphanius saldae</i>	Salda Gölü, Yeşilova, Burdur	37°31'35.0"K 29°40'29.8"D	4
<i>Aphanius similis</i>	Bağlı Köyü, Aksaray	38°16'29.9"K 34°03'34.4"D	2
<i>Aphanius sureyanus</i>	Eren Çayı, Burdur Gölü, Burdur	37°37'45.5"K 30°04'45.6"D	9
<i>Aphanius transgrediens</i>	Acıgöl, Akpınar Köyü, Başmakçı, Afyon	37°49'46.7"K 29°53'33.9"D	2
<i>Aphanius villwocki</i>	Özyurt, Polatlı, Ankara	39°12'38.5"K 32°04'12.8"D	3
	Seydi Çayı, Çifteler, Eskişehir	39°24'46.2"K 31°07'43.3"D	9
	Beşgöz Göleti, Sarayönü, Konya	38°16'23.9"K 32°20'45.9"D	1
Toplam			107

2.2.3. PZR Uygulamaları

Örneklerin izolasyonundan elde edilen total DNA'lardan mitokondriyal DNA'ya ait sitokrom b geninin (Cyt b) kısmi bölgesinin (1065 bp) kopyalanması için Polimeraz Zincir Reaksiyonunda gerekli kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 3'te verilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonunu gerçekleştirmek için T100TM PCR Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA) model PZR cihazı kullanıldı.

Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasallar	Konsantrasyon	Cyt b
10X PZR tamponu		5µl
dNTP karışımı	10 mM	8µl
MgCl ₂	25 mM	5µl
Primerler*	10 pmol	1µl +1µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.2µl
Total DNA	50 (ng/ml)	3µl
ddH ₂ O		26.8µl
Toplam		50µl

*İleri ve geri primerler

Primerlerin erime sıcaklığının (T_m) ve PZR için gerekli olan bileşenlerin miktarlarının optimizasyonu için gradient reaksiyonlar oluşturuldu. MtDNA Cyt b geni için L14724: 5'-GTGACTTGAAAAACCAACCGTTG-3'; H15915: 5'-CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC-3' (Anderson vd., 1981) erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak her iki çift primer için oluşturulan gradient reaksiyonlarda 55.0 °C değerinin uygun olduğu belirlendi. Reaksiyon için uygun erime sıcaklığı belirlendikten sonra Tablo 3'te verilen konsantrasyonlardaki kimyasallar ile Tablo 4'teki döngü koşulları kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 4. PZR döngü koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	94	3 dk	1
Ayrılma	94	30 sn	
Yapışma	61	30 sn	35
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	5 dk	1
	12	∞	

PZR uygulamalarında oluşabilecek bir kirlenmenin olup olmadığını anlayabilmek amacıyla her uygulamada, total DNA içermeyen negatif kontroller kullanıldı.

PZR ürünlerinin kontrolünü gerçekleştirmek için total DNA'nın kalitesinin belirlenmesinde yapılan işlemler % 1,2'lik agaroz jel hazırlanarak tekrarlandı. PZR ürünleri 100 bp'lik DNA Leader (Promega) ile yürütülerek büyüklükleri belirlendi. Bütün işlemler tamamlandıktan sonra istenilen konsantrasyon ve büyüklükte olduğu tespit edilen PZR ürünleri DNA dizin analizi işlemine kadar -20 °C de muhafaza edildi.

2.2.4. DNA Dizin Analizi

Aphanius türlerine ait mtDNA Cyt b geninden kopyalanan PZR ürünlerinin dizin analizleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) kullanarak ABI PRISM 3730x1 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) ile MacroGen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'da gerçekleştirildi.

2.2.5. Dizi Hizalama ve Filogenetik Analiz

MtDNA Cyt b geni dizin analizi sonucunda elde edilen ham verileri filogenetik analizlerde kullanılmak üzere uygun hale getirmek için Bioedit versiyon 7.0.0 (Hall, 1999) programı kullanıldı. Haplotiplerin sayısı, haplotip çeşitlilik ve nükleotit çeşitlilik değerlerinin belirlenmesi işlemleri DnaSP v5 (Librado ve Rozas, 2009) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişkiler, tür içi ve türler arası genetik varyasyon ve polimorfizmin tüm ölçümleri MEGA versiyon X (Kumar vd., 2018) tarafından hesaplandı. Tür içi ve türler arası genetik mesafe Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre hesaplandı. En uygun evrimsel metodun tespitinin yapılabilmesi için Akaike Bilgi Kriteri (AIC) jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) programı yardımıyla belirlendi. TN93+G+I en uygun baz değişim modeli ile maksimum olasılık (ML: Maximum Likelihood) metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçlar 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi ile analizlenmiştir. Komşu katılım (NJ: Neighbour-Joining) metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçlar Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi ile analizlenmiştir. Maksimum tutumluluk (MP: Maximum Parsimony) analizleri buluşsal metoda göre 10 rasgele ilave

kopya, TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi ve 100 tekrarlı seç-bağla testi ile analizlenmiştir. Tüm filogenetik analizler için *Cyprinodon variegatus* (GenBank erişim numarası: NC028088) dış grup olarak kullanılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Genetik Çeşitlilik

Aphanius türlerine ait mtDNA Cyt b geninin 1065 bç'lik dizin analizi, Anadolu'da göl ve nehir sistemlerinde dağılım gösterdikleri toplam 28 istasyondan örneklenen 107 birey için gerçekleştirildi (Tablo 2). Çalışılan türler için kısmi mtDNA Cyt b nükleotit dizisinin 683'ünün korunmuş (%64,1), 382'sinin değişken (%35,9) ve 382'sinin (%35,9) parsimonik bilgi verici olduğu belirlenmiştir. Polimorfik nükleotit pozisyonları için 92 transisyon, 39 transversiyon belirlenmiş olup transisyonun transversiyona oranı $Ts/Tv=2,36$ olarak hesaplanmıştır. Mitokondri DNA sitokrom b geni dizileri için gerçekleştirilen haplotip belirleme analizi sonucu 19 *Aphanius* türünü temsile eden haplotip sayıları Tablo 5' te verilmiştir. Anadolu'da dağılım gösteren *Aphanius* genusuna ait toplamda 44 haplotipin olduğu belirlenmiştir.

Aphanius genusunun Anadolu'da dağılım gösteren türleri için gerçekleştirilen genetik çeşitlilik düzeyini belirlemeye yönelik analizlerde *A. alexandri*, *A. bouleengeri*, *A. fasciatus*, *A. fontinalis*, *A. iconii*, *A. irregularis*, *A. maeandricus*, *A. marassantensis*, *A. orontis* ve *A. similis* düşük haplotip ve nükleotit çeşitlilik göstermiştir ($Hd= 0.00000$ ve $Pi= 0.00000$; Tablo 5). Belirlenen en yüksek haplotip çeşitliliğin *A. saldae* ve *A. transgrediens* ($Hd= 1,00000$) türlerine ait olduğu, en yüksek nükleotit çeşitliliğin ise *A. meridionalis* ($Pi= 0,00858$) türünde görüldüğü belirlenmiştir (Tablo 5).

Aphanius türleri arasındaki mtDNA Cyt b geni haplotipleri ikili dizin ayırımına bakıldığında türler arası genetik mesafenin en düşük %0,13 ile *A. fontinalis* ve *A. sureyanus* ve %0,57 ile *A. maeandricus* ve *A. irregularis* türleri arasında ve en yüksek ise %24,52 ile *A. villwocki* ve *A. mentoides* arasında olmak üzere geniş bir değer aralığında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 6). Diğer bir taraftan *Aphanius* genusuna ait tür içi ikili dizin farklılığı değerleri ise en düşük %0 (*A. bouleengeri*, *A. marassantensis*, *A. iconii*, *A. fontinalis*, *A. maeandricus*, *A. similis*, *A. irregularis*, *A. orontis*, *A. alexandri* ve *A. fasciatus*) ile en yüksek %0,87 (*A. meridionalis*) değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 5. *Aphanius* genusuna ait türlerin örnek sayıları (N), haplotip sayıları (HN), haplotip çeşitlilik (Hd) ve nükleotit çeşitlilik (Pi) değerleri.

Türler	N	HN	Hd	Pi
<i>Aphanius anatoliae</i>	6	4	0,80000	0,00200
<i>Aphanius alexandri</i>	2	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius asquamatus</i>	5	4	0,90000	0,00300
<i>Aphanius boulengeri</i>	4	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius danfordii</i>	6	2	0,53333	0,00050
<i>Aphanius fasciatus</i>	3	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius fontinalis</i>	6	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius iconii</i>	4	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius irregularis</i>	2	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius maeandricus</i>	3	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius marassantensis</i>	7	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius mentoides</i>	12	3	0,62121	0,00127
<i>Aphanius meridionalis</i>	15	9	0,88571	0,00858
<i>Aphanius orontis</i>	2	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius saldae</i>	4	4	1,00000	0,00203
<i>Aphanius similis</i>	2	1	0,00000	0,00000
<i>Aphanius sureyanus</i>	9	2	0,50000	0,00047
<i>Aphanius transgrediens</i>	2	2	1,00000	0,00094
<i>Aphanius villwocki</i>	13	4	0,79487	0,00195
TOPLAM	107	44		

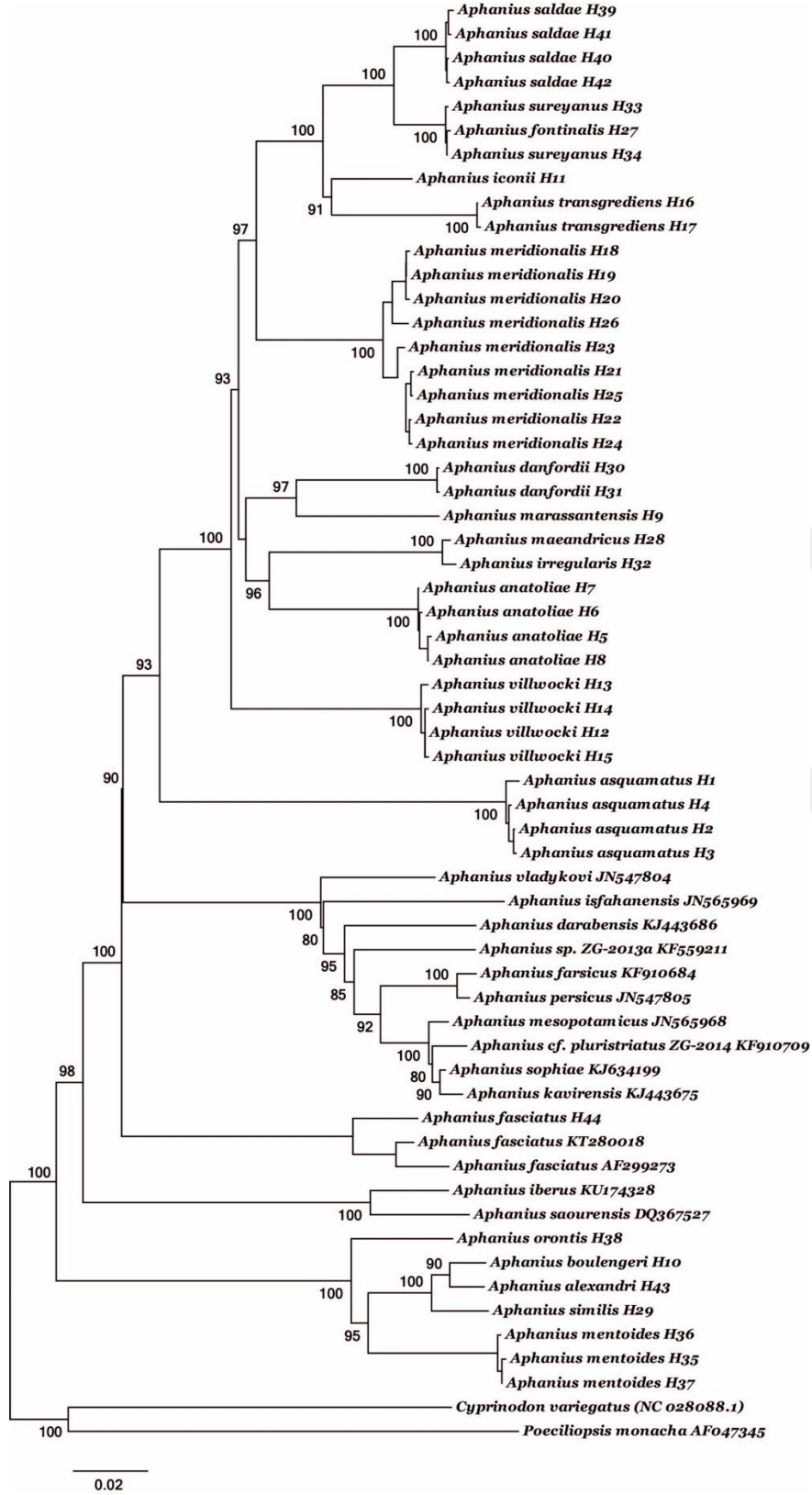
Tablo 6. *Aphanius* genusuna ait tür içi ve türler arasındaki ikili dizin farklılığı değerleri.

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>A._asquamatus</i>	0,003																		
2. <i>A._anatoliae</i>	0,165	0,002																	
3. <i>A._marassantensis</i>	01,164	0,104	0,000																
4. <i>A._boulengeri</i>	0,219	0,206	0,220	0,000															
5. <i>A._iconii</i>	0,155	0,088	0,113	0,221	0,000														
6. <i>A._villwocki</i>	0,166	0,107	0,113	0,228	0,109	0,002													
7. <i>A._transgrediens</i>	0,179	0,104	0,120	0,221	0,061	0,115	0,001												
8. <i>A._meridionalis</i>	0,165	0,097	0,099	0,219	0,082	0,101	0,105	0,008											
9. <i>A._fontinalis</i>	0,175	0,105	0,122	0,222	0,064	0,115	0,076	0,093	0,000										
10. <i>A._maeandricus</i>	0,176	0,092	0,102	0,228	0,101	0,114	0,116	0,103	0,115	0,000									
11. <i>A._similis</i>	0,219	0,203	0,224	0,027	0,214	0,229	0,220	0,214	0,220	0,232	0,000								
12. <i>A._danfordii</i>	0,169	0,101	0,077	0,213	0,106	0,108	0,121	0,101	0,104	0,109	0,216	0,000							
13. <i>A._irregularis</i>	0,177	0,093	0,102	0,228	0,103	0,114	0,119	0,105	0,117	0,005	0,235	0,109	0,000						
14. <i>A._sureyanus</i>	0,174	0,104	0,121	0,223	0,063	0,114	0,075	0,092	0,001	0,116	0,221	0,105	0,118	0,001					
15. <i>A._mentoides</i>	0,222	0,212	0,218	0,065	0,223	0,245	0,217	0,224	0,222	0,222	0,071	0,216	0,227	0,223	0,001				
16. <i>A._orontis</i>	0,198	0,193	0,206	0,059	0,205	0,218	0,198	0,207	0,212	0,211	0,075	0,215	0,211	0,214	0,064	0,000			
17. <i>A._saldae</i>	0,171	0,106	0,126	0,222	0,061	0,120	0,070	0,093	0,030	0,120	0,220	0,110	0,122	0,029	0,216	0,208	0,002		
18. <i>A._alexandri</i>	0,216	0,206	0,214	0,019	0,228	0,228	0,220	0,215	0,220	0,229	0,031	0,217	0,229	0,222	0,065	0,062	0,223	0,000	
19. <i>A._fasciatus</i>	0,183	0,168	0,156	0,227	0,173	0,164	0,179	0,152	0,174	0,180	0,226	0,160	0,183	0,172	0,236	0,214	0,171	0,222	0,000

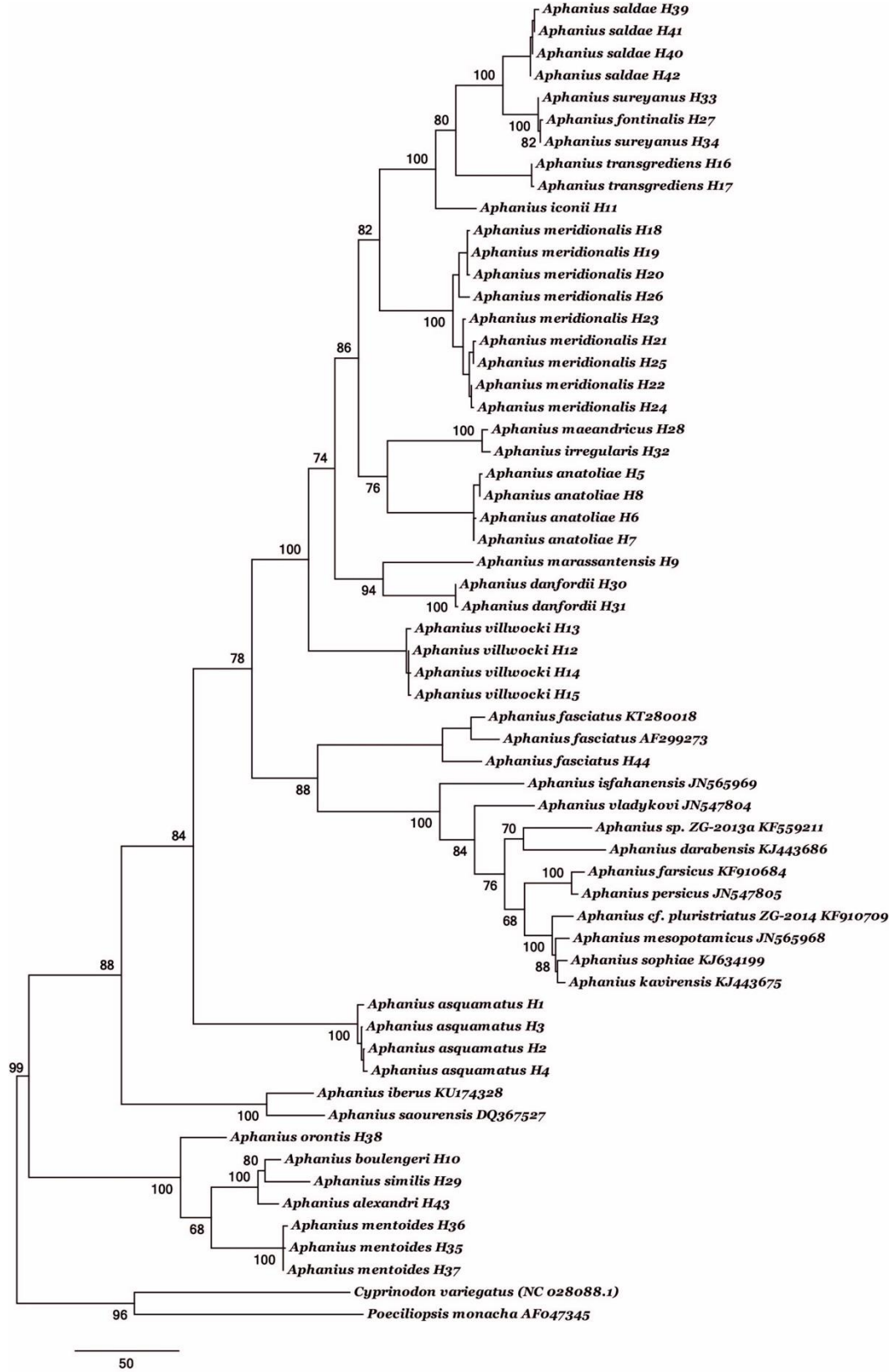
3.2. Filogenetik İlişkiler

Aphanius genusuna ait bireyler ile mtDNA Cyt b geni kısmi dizisi (1065 bp) üzerinden yapılan filogenik analizlerde genusun monofiletik bir yapı gösterdiği ve Anadolu *Aphanius* türlerinin Merkezi Anadolu (*A. saldae*, *A. sureyanus*, *A. fontinalis*, *A. transgradiens*, *A. iconii*, *A. meridionalis*, *A. irregularis*, *A. marassantensis* ve *A. danfordii*), Fırat (*A. asquamatus*), *A. fasciatus* ve Akdeniz (*A. boulengeri*, *A. similis*, *A. orontis*, *A. alexandri* ve *A. mentoides*) olmak üzere üç soy grubu oluşturdukları görülmektedir (Şekil 17-18-19). Bu üç soy grubu arasındaki genetik mesafenin %16,6 ile %23,1 arasında değişen ciddi bir değer olduğu belirlenmiştir.

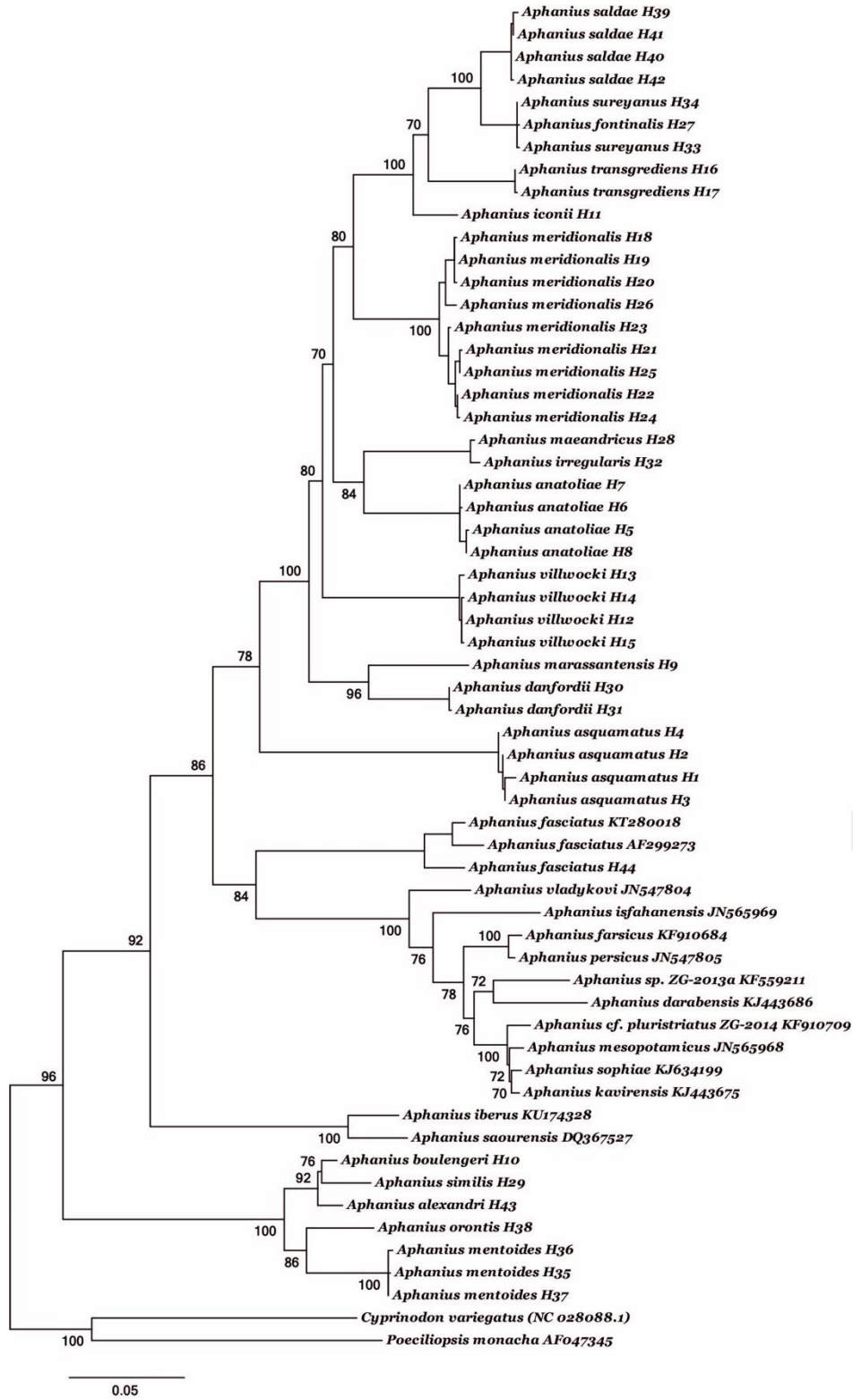




Şekil 17. *Aphanis* türlerine ait mtDNA Cyt b dizilerinden belirlenen 44 adet haplotipin komşu katılım (NJ) metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi.



Şekil 18. *Aphanius* türlerine ait mtDNA Cyt b dizilerinden belirlenen 44 adet haplotipin maksimum olasılık (MP) metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi.



Şekil 19. *Aphanis* türlerine ait mtDNA Cyt b dizilerinden belirlenen 44 adet haplotipin maksimum tutumluluk (ML) metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağaç topolojisi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bu çalışma, çoğu türü tehlike altındaki Anadolu dişli sazan türleri içindeki ve arasındaki genetik yapılanmanın mtDNA sitokrom b geni dizileri kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

Anadoluda dağılım gösteren 19 *Aphanius* türüne ait mtDNA cyt b geninin 1065 bp'lik dizin analizi sonucu belirlenen 44 haplotip'in herbirinin sadece 1 türe ait olduğu diğer bir deyişle anasal olarak kalıtılan mitogenoma ait diziler itibarıyla dişli sazan türlerinin haplotip paylaşmadıkları belirlenmiştir. Teoride transversiyon/ transisyon oranı çoğu zaman 0.5'ten büyük olmalıdır. Hem kodlama yapan hem de kodlama yapmayan bölgelerdeki polimerazların transisyon mutasyon oranlarının (Ts), transversiyon (Tv) oranlarından daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (Zhang ve Gerstein, 2003; Jiamg ve Zhao, 2006). Transversiyonların, DNA omurgasının şeklinde daha büyük değişikliklere neden olması diğer bir deyişle proteinlerin amino asit sekanslarını transisyonlardan daha fazla değiştirme ihtimallerinin bulunması Tv'lerin gen ifadesi üzerinde daha büyük etkileri olacağı varsayılmıştır. Ts:Tv oranındaki yerel sapmalar genlerdeki evrimsel seçimin göstergesidir. Dolayısıyla, filogenetik ağaç oluşturulması ve ayrılma tahmini gibi birçok çalışmada Ti/Tv oranı önemli bir parametre olarak kullanılmıştır. Ts:Tv oranı bu nedenle iki dizinin ortak atalarından bu yana meydana gelen çoklu baz değişimi derecesini ölçmenin de bir yoludur (Kocher ve Stepien, 1997). Dolayısıyla, polimorfik nükleotit pozisyonları için belirlenmiş olan Ts/Tv oranı (2.36) Anadolu dişli sazan türleri içinde düşük seviyede genetik sapma olduğunu göstermektedir.

Aphanius genusunun Anadolu'da dağılım gösteren türleri için gerçekleştirilen genetik çeşitlilik düzeyini belirlemeye yönelik analizlerde Fırat havzasındaki *A. asquamatus* türüne ilaveten *A. anatoliae*, *A. asquamatus*, *A. danfordii*, *A. meridionalis*, *A. saldae*, *A. sureyanus*, *A. transgrediens*, ve *A. villwocki* gibi Orta Anadolu dişli sazan türleri için yüksek haplotip ve düşük nükleotit çeşitlilik göstermiş olması (Tablo 5), diğer Anadolu bölgelerine göre daha yakın zamanda şekillenmiş olduğu bilinen göller bölgesini de içeren İç Anadolu platosunda dağılım gösteren türlere ait popülasyonların genetik darboğazı takiben hızlı bir popülasyon genişlemesi ve mutasyon birikimi göstermiş

olabilecekleri anlamına gelmektedir. Zaten Anadolu *Pseudophoxinus* (Hrbek vd., 2004) ve *Aphanius anatoliae* (Hrbek vd., 2002) tür komplekslerinin evrimsel hikayeleri hemen hemen aynı paraleldedir. Geri kalan Anadolu dişli sazan türleri için belirlenen düşük haplotip ve nükleotit çeşitlilik değerlerinin örnek sayısının azlığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Aphanius türleri arasındaki mtDNA Cyt b geni haplotipleri ikili dizin ayrımına dayalı olarak hesaplanmış olan türler arası genetik mesafe değerlerinin (Tablo 6) gerek Bardakçı vd (2004) tarafından RAPD analizine dayalı olarak belirlenen akrabalık ilişkileri modeli ile gerekse Hrbek vd (2002) tarafından *Aphanius* tür kompleksinin 2 ribozomal RNA kodlayan mitokondri dizisine dayalı analizinden elde edilen ikili dizin farklılığı değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Dişli sazan cinsi *Aphanius* (Nardo, 1827)'un Tetis Denizinin çevresine dağılmış ortak bir atadan evrimleştiği sanılan bir Tetis kalıntısı olarak kabul edilir (Kosswig, 1967; Por & Dimentman, 1989). Bu hipotez, cinsin mitokondri DNA genlerinin moleküler analizi ile desteklenmektedir (Hrbek ve Meyer, 2003). Jeolojik kanıtlara dayanarak, en yaşlı fosiller yaklaşık 30 milyon yıllık olmakla birlikte cins yaklaşık 37 milyon yaşında olduğu tahmin edilmektedir (Gaudant, 1982).

Aphanius genusunun killifish'leri Batı Palearktiğin tüm güney kısmı boyunca dağılım göstermektedir. Özellikle Doğu Akdeniz havzasında ve özellikle iç Anadolu'da tür bakımından oldukça zengindirler (Yoğurtcuoğlu ve Freyhof, 2018). *A. anatoliae* (Leidenfrost, 1912), *A. danfordii* (Boulenger, 1890) ve *A. villwocki*'den (Hrbek ve Wildekamp, 2003) oluşan Orta Anadolu topluluğunun, yaklaşık 14 milyon yaşında, *A. asquamatus* (Sozer, 1942)'a bir kardeş klad oluşturduğu ve bu kladın çeşitlenme zamanının, çeşitli jeolojik engeller ve mikrokıtaların katılmasının sonucu Türkiye'nin jeolojik tarihi ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Hrbek ve Meyer, 2003). Türkiye'nin diğer iki türü *A. fasciatus* (Valenciennes, 1821) ve *A. mento*'dur (Heckel, 1843). Mitokondri DNA analizine dayanarak *A. fasciatus*, *A. asquamatus* dahil olmak üzere tüm Orta Anadolu *Aphanius* türlerine kardeş bir klad oluşturduğu bildirilmiştir (Hrbek ve Meyer, 2003) ki filogenetik analizlerimizden elde ettiğimiz ağaç topolojilerimizin hepsinde bu durum yüksek güvenilirlik değerleri (Şekil 17-18-19) ile desteklenmiştir.

Aphanius fasciatus'un iç su populasyon için kayıtları (Parenti ve Tigano, 1993) olmasına rağmen genellikle kıyı havuzları ve lagünler gibi acı ortamlarda yaşar ki özellikle geniş sıcaklık (5-39 °C) ve tuzluluk (0-180 psu) dereceleri aralığı gibi çok çeşitli fizikokimyasal parametreleri tolere edebilmektedir (Triantafyllidis vd., 2007). Büyük yapışkan yumurtalar, kısa üretim süresi, yüksek üreme hızı ve özellikle larvaların dağılma evrelerinin olmaması gibi yaşam öyküsü özellikleri nedeniyle, bu tür genetik kayma, seçim ve etkilerinin araştırılması için ideal bir organizma olarak kabul edilir (Triantafyllidis vd., 2007). *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827, genellikle büyük popülasyonlarda bulunan kıyı acı su habitatlarında meydana gelen bir Akdeniz'e endemik cyprinodont balığıdır. Zira, Karadeniz hariç tüm denizlerimizin kıyısallık bölgelerindeki acısu karakterli lagünlerde dağılım gösteren (Geldiay ve Balık 2007) *A. fasciatus* 'un Hırvatistan ve Yunanistan gibi günümüzde Anadolu'dan izole coğrafyalardaki dağılımına ilaveten doğu Akdeniz kıyılarındaki (Tuz gölü, Karataş, Adana; Tablo 2) varlığı, yaşam alanlarının doğal parçalanmasının neden olduğu kesintili dağılım (Maltagliati 1998a,b, 1999) karakteri ile açıklanabilir.

Rocco vd. (2007) ve Triantafyllidis vd. (2007) *A. fasciatus* popülasyonları arasında belirgin bir genetik yapılanmayı rapor etmiş olsalarda, Hrbek ve Meyer (2003), bu türün popülasyonları arasında, geniş dağılımlarına ve Akdeniz vikaryans (coğrafik bariyerle ayrılma) olaylarına bağımlılığına rağmen düşük genetik çeşitlilik bulmuşlardır. Genbank veribankasında analiz kapsamına dahil ettiğimiz Hırvatistan ve Yunanistan kıyılarından haplotipler ile Anadolu'dan *A. fasciatus* populasyonlarını temsil eden haplotipler arasındaki nispeten yüksek genetik benzerlik, Hrbek ve Meyer (2003)'ün görüşünü destekler niteliktedir. Zira, Messinian tuzluluk krizinin Yunanistan ve Türkiye'deki populasyonların günümüz nüfus genetik yapılarını şekillendirmede en önemli olay olduğu hipotezi (Triantafyllidis vd., 2007) ve Anadolu *Aphanius* populasyonları arasında sınırlı gen akışı olduğu (Bardakci vd., 2004) görüşlerine göre aşırı habitat koşulları, kuaterner paleoiklim değişiklikleri ve genetik sürüklenmeden dolayı *Aphanius* popülasyonlarının büyük ölçüde küçülmesinin tür içi çeşitliliği azalmasına neden olduğunu varsaymaktadırlar.

Konya beşgöz göleti dışı sazan örnekleri yakın coğrafik konumlu göller bölgesindeki diğer tüm dışı sazan türlerinden (*A. saldae*, *A. sureyanus*, *A. fontinalis*, *A.*

transgradiens, *A. iconii*, *A. meridionalis*, *A. irregularis*, *A. marassantensis* ve *A. danfordii*) ayrılırken Hrbek ve Wildekamp (2003) tarafından Sakarya havzasında tanımlanan *A. villwockii* türünün tip lokalitesinden örneklerle birlikte kümelenmiştir (Şekil 17-18-19). Freyhof (2014)'un daha önce *Aphanius villwocki*'nin Sakarya ve Ilgın dağılımına sahip olduğunu rapor etmiş olması da bu yakın ilişkiyi desteklemektedir. Benzer şekilde, Geiger vd. (2014) tarafından Sakarya nehri ile çok yakın tarihli biyocoğrafik bağlantıyı destekler şekilde Ilgın Gölü havzasındaki *Alburnus nassreddini* ve *Squalius recurvirostris*'in, Sakarya nehir drenajından *S. pursakensis* ve *A. escherichii* ile daha yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Yine, *G. fahrettini*'nin Ilgın popülasyonları, coğrafik olarak kendine daha yakın konumlu Göller Bölgesi'ndeki diğer türlere nazaran daha uzaktaki Sakarya Nehri havzasında dağılım gösteren *G. sakaryaensis* ile yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu olgular, üst Sakarya Havzası havzasının, Neojen döneminin sonuna kadar devam eden Orta Anadolu'daki büyük tatlı su paleogölünden Ilgın Gölü havzasına bağlanma olasılığı ile açıklanabilir (Popov vd., 2004).

5. ÖNERİLER

Türkiye barındırdığı 19 tür ve yüksek endemizm oranı ile gerçektende *Aphanius* genusu için bir türleşme merkezidir. Ancak, ekolojik öneme sahip bu genusun türleri çeşitli faktörler nedeniyle varlığını sürdürmemeye noktasına gelmiştir. İklim değişimi, sulak alanlara kimyasal ilaç ve gübre atıklarından kaynaklanan besin kirliliği, sulama projeleri nedeniyle yaşam alanı olan sazlıkların ve sulak alanların tahribata uğraması, tüm dünyada olduğu gibi sivrisinek ile biyolojik mücadele kapsamında ülkemize sokulan sivrisinek balığı *Gambusia holbrooki* gibi istilacı türlerin Anadolu *Aphanius* türleri üzerinde predasyon baskısı kurması ve besin rekabetine girmesi gibi sıralayabileceğimiz etmenler nedeniyle Anadolu *Aphanius*'ları tehdit altındadır hatta *A. splendens* gibi bazı türler çoktan yok olmuştur. Bu nedenle çoğu türü IUCN kırmızı listesinde tehdit altında türler olarak sınıflandırılmıştır.

Her ne kadar doğrudan ekonomik önemi olmasa da ekolojik yönden öneme sahip olması nedeniyle mevcut türlerin tanımlanması, tür çeşitliliğinin ve filogenilerinin belirlenmesi genusun iç sularımızdaki varlığının belirlenmesi, dağılım alanlarının kesin olarak tespiti ile habitatları ile birlikte koruma stratejilerinin geliştirilmesi için gereklidir.

Daha geniş bir coğrafyada daha büyük örneklem grubu ile morfolojik kriterler ve nükleer genom da ilave edilerek gerçekleştirilecek bütünleşik bir araştırmanın *Aphanius* popülasyonlarının sürdürülebilir yönetimine önemli katkıda bulunacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Akşiray, F., 1987.** Türkiye Deniz Balıkları ve Tayin Anahtarı İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları. 2. Baskı. No: 3490, İstanbul, 811 s.
- Alagöz, S., Ergüden, D., ve Göksu, M.Z.L., 2006.** Seyhan Baraj Gölü'nde (Adana) İlk Kez Tespit Edilen Balık Türleri. 1. Balıklandırma ve Rezervuar Yönetimi Sempozyumu Bildirileri. TKB Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü Yayınları, Antalya, No:1, 467-473.
- Alavi-Yeganeh, M.S., Seyfabadi, J., Keivany, Y., Kazemi, B. and Wallis, G.P., 2014.** Taxonomic validity and phylogenetic relationships of a newly-described tooth-carp, *Aphanius mesopotamicus* Coad, 2009 (Teleostei: Cyprinodontidae). <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3780.3.11>.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., and Young, I.G. 1981.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457–465.
- Annabi, A., Faleh, A.B., Deli, T., and Said, K., 2012.** Molecular analysis of the genetic differentiation among *Aphanius fasciatus* populations captured from Tunisian coastal and estuary sites. *Pakistan, Journal of Zoology*, 44(5), 1389-1396.
- Arnheim, N., and Erlich, H.A., 1992.** Polymerase chain reaction strategy. *Association Reviews of Biochemistry*, 61, 132-156.
- Avise, J. C., 1994.** Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, 511 s.
- Babbucci, M., Pappalardo, A.M., Ferrito, V., Barbisan, F., Patarnello, T., and Tigano, C., 2007.** Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers in *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 293–295.
- Bardakçı, F., Tatar, N., and Hrbek, T., 2004.** Genetic relationships between Anatolian species and subspecies of *Aphanius* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontiformes) based on RAPD markers. *Biologia*, 59(5), 559-566.
- Bardakçı, F., Değerli, N., Özdemir, O., and Başbüyük, H.H., 2006.** Phylogeography of the Turkish brown trout (*Salmo trutta* L.), Mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. *Journal of Fish Biology*, 68, 36–55.
- Bentzen, P., Legget, W.C., and Brown, G.G., 1988.** Length and Restriction Site Heteroplasmy in the Mitochondrial DNA of American Shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics*, 118, 509-518.

- Bermingham, E., Lamb, T. and Avise, J.C., 1986.** Size Polymorphism and Heteroplasmy in The Mitochondrial DNA of Lower Vertebrates. *Journal of Heredity*, 77, 249-252.
- Blanco, J.L., Hrbek, T., and Doadrio, I., 2006.** A new species of genus *Aphanius* (Nardo, 1832) (Actinopterygii, Cyprinodontidae) from Algeria. *Zootaxa*, 1158, 39-53.
- Bogutskaya, N.G., 1992.** A revision of species of the genus *Pseudophoxinus* (Leuciscinae, Cyprinidae) from Asia Minor. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*, 89, 261-290.
- Boulenger, G.A., 1890.** Description of two new Cyprinodontoid fish. *Annals and Magazine of Natural History* (6), 6, 169–170.
- Buj, I., Miočić-Stošić, J., Marčić, Z., Mustafić, P., Zanella, D., Mrakovčić, M., Mihinjač, T., and Čaleta, M., 2015.** Population genetic structure and demographic history of *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae: Cyprinodontiformes) from hypersaline habitats in the eastern Adriatic. *Scientia Marina*, 79, 399–408. DOI:10.3989/scimar.2015.79n4.
- Cann, R.L., Stoneking, M., and Wilson, A.C., 1987.** Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature*, 325, 31-36.
- Cavraro, F., Malavasi, S., Torricelli, P., Gkenas, C., Liouisa, V., Leonardos, I., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J. and Triantafyllid, A., 2017.** Genetic structure of the South European toothcarp *Aphanius fasciatus* (Actinopterygii: Cyprinodontidae) populations in the Mediterranean basin with a focus on the Venice lagoon.
- Demirsoy, A., 1997.** TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi. Sayı, 356, 34-40, Temmuz.
- Demirsoy, A., 1999.** Genel ve Türkiye Zoocoğrafyası “Hayvan Zoocoğrafyası”. Meteksan A.Ş. Ankara, 3. Baskı, Yayın no: 98-06-0057-01, ISBN: 975-7746-26-6.
- Eroğlu, O., 2009.** Karadeniz’in Türkiye Kıyılarında Dağılım Gösteren Mersin Balığı Türlerinin Mitokondriyal DNA Sekans Analizi Yöntemiyle Tamamlanması. *Sümae Yunus Araştırma Bülteni*, 9, 1-3.
- Esmaceli, H.R., Teimori, A., Sayyadzadeh, G., Masoudi, M. and Reichenbacher, B., 2014.** Phylogenetic relationships of the tooth-carp *Aphanius* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the river systems of southern and south-western Iran based on mtDNA sequences. *Zoology in the Middle East*, 60, 29–38.
- Ermin, R., 1946.** Cyprinodontid’lerde pul reduksiyonu. Schuppenreduktion bei Zahnkarpfen (Cyprinodontidae). *Revue de la Faculté des Sciences de l’Université d’Istanbul, Série B*, 10, 244–250.

- Felsenstein, J., 1987.** Estimation of Hominoid Phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*, 26, 123-31.
- Ferrito, V., Pappalardo, A.M., Canapa, A., Barucca, M., Doadrio, I., Olmo, E., and Tigano, C., 2013.** Mitochondrial phylogeography of the killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Cyprinodontidae) reveals highly divergent Mediterranean populations. *Marine Biology*, 160, 3193–3208. DOI:10.1007/s00227-013-2307-4.
- Freeman, S., and Herron, J. C., 1999.** Evrimsel Analiz. Çıplak, B., Başbüyük, H., Karaytuğ, S., ve Gündüz, İ., Palme Yayıncılık, Ankara, 28-29, 438-708.
- Freyhof, J. and Brooks, E., 2011.** European Red List of Freshwater Fishes Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Freyhof, J., Özuluğ, M., and Saç, G., 2017.** Neotype Designation of *Aphanius iconii*, first reviser action to stabilise the usage of *A. fontinalis* and *A. meridionalis* and comments on the family group names of fishes placed in Cyprinodontidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zootaxa*, 4294 (5), 573-585, DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4294.5.6>.
- Freyhof, J., 2014.** *Aphanius danfordii*, The IUCN Red List of Threatened Species. 3, DOI: 10.2305/IUCN.UK.2014-1.
- Gaudant, J., 1982.** *Prolebias catalaunicus* nov une nouvelle espece de poissons Cyprinodontidae del' Oligocène de Sarreal (Province de Tarragona, Catalogne). *Estudios Geológicos*, 38, 95-102.
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Casal-Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Kärst, H., Kottelat, M., Kovačić, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marčić, Z., Özuluğ, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Šanda, R., Schneider, M., Šlechtová, V., Stoumboudi, M., Walter, S., and Freyhof, J., 2014.** Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 14, 1210–1221.
- Geldiay, R., ve Balık, S., 1996.** Türkiye Tatlısu Balıkları (Ders Kitabı). Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, Yayın No:46, 644 s.
- Geldiay, R. ve Balık, S., 2007.** Türkiye Tatlısu Balıkları (Ders Kitabı). Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, Yayın No:46, 644 s.
- Golani, D., Öztürk, B. and Başusta, N., 2006.** Fishes of The Eastern Mediterranean. ISBN: 975 8825-12-7, 114 s.
- Gholami, Z., Teimori A., Esmaili, H.R., Schulz-Mirbach, T. and Reichenbacher, B., 2013.** Scale surface microstructure and scale size in the tooth-carp genus *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from endorheic basins in Southwest Iran.

- Gholami, Z., Esmaeili, H.R., Erpenbeck, D. and Reichenbacher, B., 2014.** Phylogenetic analysis of *Aphanius* from the endorheic Kor River Basin in the Zagros Mountains, Southwestern Iran (Teleostei: Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, in press.
- Gonzalez, E.G., Pedraza-Lara, C. and Doadrio, I., 2014.** Genetic Diversity and Population History of the Endangered Killifish *Aphanius baeticus*. *Journal of Heredity*, 105, 597-610.
- Güçlü, S.S., 2003.** Kırkgöz Kaynağı (Antalya)'nda Yaşayan *Aphanius mento* (Heckel in: Russegger, 1843)'nun Beslenme Büyüme ve Üreme Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Türkiye, 43 s.
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research*, 41, 95- 98.
- Harrison, R.G., 1989.** Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 6-11.
- Hrbek, T., Küçük, F., Frickey, T., Stölting, K.N., Wildekamp, R.H. and Meyer, A., 2002.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, cyprinodontiformes) species complex of Central Anatolia. Turkey, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 125–137.
- Hrbek, T. and Meyer, A., 2003.** Closing of the Tethys Sea and the phylogeny of eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Journal of Evolution Biology*, 16, 17-36.
- Hrbek, T. and Wildekamp, R.H., 2003.** *Aphanius villwocki*, a new species from the Sakarya basin of central Anatolian plain, Turkey (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Ichthyology Explorer Freshwater*, 14 (2), 137-144.
- Hrbek, T., Stölting, K. N., Bardakçı, F., Küçük, F., Wildekamp, R. H. And Meyer, A., 2004.** Plate tectonics and biogeographical patterns of the *Pseudophoxinus* (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia. Turkey, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 297-308.
- Hrbek, T., Keivany, Y. and Coad, B.W., 2006.** New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan Province of Iran and a reanalysis of other Iranian species. *Copeia*, 244–255.
- Jiang, C. and Zhao, Z., 2006.** Mutational spectrum in the recent human genome inferred by single nucleotide polymorphisms. *Genomics*, 88, 527–534.
- İnnal, D. ve Erk'akan, F., 2006.** Effects of exotic and translocated fish species in the inland waters of Turkey. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16, 39–50.

- Klug, W.S. and Cummings, M.R., 2000.** Concepts of genetics. 6th ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Klug, S.W. and Cummings, W.R., 2000.** DNA structure and analysis. 238-265 s. S.W. Klug (ed), Concept of Genetics, 2000, Prentice Hall, ISBN: 0073525332, 745 s.
- Kocher, T.D. and Stepien, C.A., 1997.** Overview of the Classification and Phylogeny of Fishes 29-30 s. Kocher, T.D. and Stepien, C.A. (Ç. Ed.), Molecular Systematics of Fishes, 1997, Academic Press, ISBN: 9780080536910, 314 s.
- Kosswig, C. and Sözer, F., 1945.** Nouveaux Cyprinodontidés de l'Anatolie centrale. Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul, Ser. B, 10, 77-81.
- Kosswig, C., 1967.** Tethys and its relation to the peri-Mediterranean faunas of freshwater fishes. In: Adams, C.G. and Ager, D.V. (Ç. Ed.), Aspects of Tethyan biogeography. Systematics Association Publication, 313-324.
- Kottelat, M., Barbieri, R. and Stoumboudi, M.Th., 2007.** *Aphanius almiriensis*, a new species of toothcarp from Greece (Teleostei: Cyprinodontidae). Revue Suisse de Zoologie, 114 (1), 13-31.
- Kumar, S. and Gadagkar, S.R., 2000.** Efficiency of the Neighbor-Joining Method in Reconstructing Deep and Shallow Evolutionary Relationships in Large Phylogenies. Journal of Molecular Evolution, 51, 544-553. DOI: 10.1007/s002390010118.
- Kumar, S. and Talreja, R., 2018.** Reducing Drilling Risks in J bend Wells Targeting Basement in Tectonic Area through Geomechanical Solutions. Search and Discovery Article, #42308. DOI:10.1306/42308Kumar2018.
- Kuru, M., 2004.** Türkiye içsu balıklarının son sistematik durumu. Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, Ankara, Türkiye, 24(3), 1-21.
- Küçük, F., İkiz, R., 2004.** Antalya Körfezi'ne Dökülen Akarsuların Balık Faunası. Ege Üniversitesi, İzmir, Turkey, Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 21, (3-4), 287- 294.
- Küçük, F., 2006.** Türkiye'deki Bazı İçsu Balıklarının Dünya Doğayı Koruma Birliği (IUCN) Ölçütlerine Göre Değerlendirilmesi, I. Balıklandırma ve Rezervuar Yönetimi Sempozyumu. Antalya, 7-9 Şubat, 72-127.
- Larget, B. and Simon, D., 1999.** Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution, 16, 750-759. DOI:10.1214/105051600000000538.
- Leidenfrost, G., 1912.** Kis-ázsiai halak (Fishes from Asia Minor). Allatani Közlemények, 11, 130-131.

- Leonardos, I. and Sinis, A., 2008.** The feeding ecology of *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) in the lagoonal system of Messolongi (western Greece), *Scientia Marina*, 72.
- Lewin, B., 1997.** Genes VI. Oxford University Press, New York.
- Li, Y., 2004.** How to Build a Phylogenetic Tree Phycs498BIO Assignment. Mary Ann Liebert, Incident, 195-212. DOI: 10.3133/of2007-1047.srp003.
- Magoulas, A. and Zouros, E., 1993.** Restriction site Heteroplasmy in Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Indicates Incidental Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA, *Molecular Biology Evolution*, 10, 319-325.
- Maltagliati, F., 1998a.** Does the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the onedimensional stepping-stone model of gene flow. *Environmental Biology of Fishes*, 53, 385–392.
- Maltagliati, F., 1998b.** A preliminary investigation of allozyme genetic variation and population geographical structure in *Aphanius fasciatus* from Italian brackish-water habitats. *Journal of Fish Biology*, 52, 1130–1140.
- Maltagliati F., 1999.** Lactate dehydrogenase isozyme pattern of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Italia, Journal of Zoology*, 66, 171-174.
- Maxam, A. and Gilbert, W., 1977.** A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-564.
- Miyamoto, M.M., and Fitch, W.M., 1995.** Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *System Biology*, 44, 64-76.
- Moritz, C., Dowling, T.E. and Brown, W.M., 1987.** Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology System*, 18, 269-292. DOI: 10.1146/annurev.es.18.110187.001413.
- Moritz, C., 1991.** The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): widespread clones. *Genetics*, 129, 211-219.
- Moritz, C., 1994a.** Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: A critical review. *Molecular Ecology*, 3, 401-411.
- Morrison, D.A., 1996.** Phylogenetic Tree-building. *International Journal for Parasitology*, ISSN: 0020-7519, 26, 589-617.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., 1986.** Specific Enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia*, 51, 263-273.

- Mullis, K. and Faloona, F., 1987.** Spesific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.
- Mount, D.W., 2001.** Bioinformatics Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, Chapter 3, Alignment of pairs of sequences, 52-137.
- Neu, W., 1937.** Burdur gölünden çıkan *Cyprinodon sureyanus* n. sp., aus dem Burdur Gölü. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, Turkey, 2 (2), 1–5.
- Onursal, S.S., ve Avni, U., 1997.** Böceklerin Filogenisi. *Türkiye Entomoloji Dergisi* 21(1), 65-80.
- Parenti, L.R. and Tigano, C., 1993.** Polymorphic skeletal characters in *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Copeia*, 4, 1132–1137.
- Pappalardo, A.M., Gonzalez, E.G., Tigano, C., Doadrio, I. and Ferrito, V., 2015.** Comparative pattern of genetic structure in two Mediterranean killifishes *Aphanius fasciatus* and *Aphanius iberus* inferred from both mitochondrial and nuclear data. *Journal of Fish Biology*, 87(1), 69-87.
- Perdices, A., Carmona, A.J., Fernandez-Delgado, C. and Doadrio, I., 2001.** Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killifish *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae), *Journal of Heredity*, 87, 314-324.
- Pfleiderer, S., Geiger, M. and Herder, F., 2014.** *Aphanius marassantensis*, a new toothcarp from the Kızılırmak drainage in northern Anatolia (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Zootaxa*, 3887(5), 569–582. DOI: 10.11646/Zootaxa.3887.5.4.
- Presa, P., Pardo, B.G., Marinez, P. and Bernatchez, L., 2002.** Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 2161-2175.
- Pro, F.D. and Dimentman, C., 1989.** The legacy of Tethys. An aquatic biogeography of the Levant, *Monographiae Biologicae*, 63, 214.
- Popov, S.V., Rögl, R., Rozanov, A.Y., Steininger, F.R., Shcherba, I.G. and Kovac, M., 2004.** Lithological-Paleogeographic maps of Paratethys. 10 maps Late Eocene to Pliocene. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, 250, 1–46.
- Posada, D., 2008.** Jmodeltest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology Evolution*, 25, 1253–1259.
- Rocco, L., Ferrito, V. and Costagliola, D., 2007.** Genetic divergence among and within four Italian populations of *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Cyprinodontiformes). *Italia, Journal of Zoology*, 74, 371-379.
- Rokas, A., Ladoukakis, E. and Zouros, E., 2003.** Animal mitochondrial recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(8), 411-417.

- Saara, F., 1999.** Phylogenetic Analysis of Mitochondrial DNA: Detection of mutations in patients with occipital stroke. Oulu University Library, Finland, ISBN: 951-42-5567-4, 69 s.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J. and Beddington, J.R., 1988.** Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Saitou, N. and Imanishi, T., 1989.** Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution*, 6, 514-525.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5470.
- Seegers, L., 1997.** Killifishes of The World Old World Killis II. Verlag A.C.S. gmbH, ISBN: 3931702308, 112s.
- Singh, G.B., 2015.** Fundamentals of Bioinformatics and Computational Biology, Methods and Exercises in Matlab. 6, 235-270.
- Skelton, P., 1993.** Evolution a biological and palaeontological approach. Addison Wesley, Harlow, England, ISBN: 0-201-54423-7.
- Sözer, F., 1942.** Türkiye Cyprinodontid'leri hakkında. Contributions à la connaissance des Cyprinodontidés de la Turquie. *Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul, Series B*, 7, 308-310.
- Strachan, T. and Read, A.P., 1996.** Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Limited, UK, ISBN:1 872748 69 4, 596 s.
- Taylor, R.W. And Turnbull, D.M., 2005.** Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6, 389-402.
- Triantafyllidis A., Leonardos, I., Bista, I., Kyriazis, I.D., Kappas, I., Amat, F., and Abatzopoulos, T.J., 2007.** Phylogeography and genetic structure of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae). *Marine Biology*, 152: 1159-1167.
- URL-1, 2019.** [https://yandex.com.tr/gorsel/search/text=aphanius fasciatus](https://yandex.com.tr/gorsel/search/text=aphanius%20fasciatus) (29 Ağustos 2019).
- URL-2, 2019.** [https://yandex.com.tr/gorsel/search/text=aphanius mentoides](https://yandex.com.tr/gorsel/search/text=aphanius%20mentoides) (05 Haziran 2019).
- URL-3, 2019.** [https://yandex.com.tr/gorsel/search/text=aphanius danfordii](https://yandex.com.tr/gorsel/search/text=aphanius%20danfordii) (05 Haziran 2019).

- Valenciennes, A., 1821.** Recherches sur les poissons fluviatiles de l'Amérique Équinoxiale. In: Voyage de Humboldt et Bonpland, Deuxième partie. Observations de Zoologie et d'Anatomie comparée. Paris, France, *Humboldt and Bonpland's*, 2, 145-216.
- Villwock, W., 1964.** Genetische Untersuchungen an altweltlichen Zahnkarpfen der Tribus Aphaniini (Pisces: Cyprinodontidae) nach Gesichtspunkten der neuen Systematik. *Journal of Zoology System Evolution Research*, 2, 267–382.
- Wallace, D.C., 1999.** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283, 1482-94.
- White, T.J., Arnheim, N. and Erlich, H.A., 1989.** The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics*, 5, 6, 185-189.
- Wildekamp, R.H., 1993.** A World of Killies, Atlas of the Oviparous Cyprinodontiform Fishes of the World, Volume I, The Genera *Adamas*, *Adinia*, *Aphanius*, *Aphyoplatys* and *Aphyosemion*, Published by the American Killifish Association. U.S.A., Inches, 311 s.
- Wildekamp, R.H., Küçük, F., Ünlüsayın, M. and Neer, W.V., 1999.** Species and subspecies of the genus *Aphanius* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in Turkey (Received; 1996). *Turkish Journal of Zoology*, 23, 23-44.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wilson, A.C., Cann R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllenstein, U.B., Helmychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D. and Stoneking, M., 1985.** Mitochondrial-DNA and Two Perspectives on Evolutionary Genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26, 375-400.
- Zhang, Z. and Gerstein, M., 2003.** Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes. *Nucleic Acids Research*, 3118, 5338–5348.
- Xiong J., 2006.** Essential Bioinformatics. ISBN: 978-0-521-60082-8, 362 s, 127-169.
- Yang, Z. and Rannala, B., 1997.** Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology Evolution*, 14, 717-724.
- Yeğen, V., Balık, S., Bilçen, E., Sarı, H.M., Uysal, R., İlhan, A. ve Bostan, H., 2007.** Afyonkarahisar Akarsularında Yayılış Gösteren Balık Türleri ve Dağılımları. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3-5 (5-8), 419-428.
- Yoğurtçuoğlu, B., 2010.** Dişlisazancık *Aphanius danfordii* (Boulenger, 1890)'nin Hirfanlı Baraj Gölü'ndeki (Kırşehir-Türkiye) populasyonunun üreme ve büyüme

özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, 4, 866-871.

Yoğurtçuoğlu, B. ve Ekmekçi, F.G., 2013. Life-history traits of *Aphanius danfordii* (Boulenger, 1890) (Pisces: Cyprinodontidae), endemic to Kızılırmak Basin. Turkey, Journal of Applied Ichthyology, 29(4), 866-871, DOI: 10.1111/jai.12036.

Yogurtçuoğlu, B. and Freyhof, J., 2018. *Aphanius irregularis*, güneybatı Anadolu'dan yeni bir kilivari (Cyprinodontiformes: Aphaniidae). DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4410.2.4>.



ÖZGEÇMİŞ

Mehmet KUYUMCU 20.01.1986 yılında Rize'nin Çamlıhemşin ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Ardeşen ilçesinde tamamladıktan sonra 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü lisans eğitimini kazandı ve 2013 yılında mezun olmuştur. 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir.

