



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

**TÜRKİYE'DEKİ KEREVİT TÜRLERİNİN
(*Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius torrentium*)
PZR-RFLP YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI**

GÖKHAN KALAYCI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

RİZE - 2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEKİ KEREVİT TÜRLERİNİN
(Astacus leptodactylus, Austropotamobius torrentium)
PZR-RFLP YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI

Gökhan KALAYCI
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Süleyman AKHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE - 2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'DEKİ KEREVİT TÜRLERİNİN (*Astacus leptodactylus*,
Austropotamobius torrentium) PZR-RFLP YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI

Gökhan KALAYCI

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13/06/2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 06/07/2011

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Süleyman AKHAN

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Yusuf BEKTAŞ

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Fatih YILMAZ



RİZE 2011

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Rize Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmış ve Türkiye'de dağılım gösteren tatlı su ıstakozu tür ve alt türlerinin genetik olarak tanımlanmasını amaçlamıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu süre boyunca deneyim ve önerilerini esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç.Dr. Süleyman AKHAN'a yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Yusuf BEKTAŞ'a, gerek bilgi paylaşımı ve gerekse bana laboratuvarlarında çalışma imkanı veren değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ ve Balıkçılık Teknolojisi Yüksek Mühendisi Oğuzhan EROĞLU'na, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Atilla ÖZDEMİR'e, yardımlarını gördüğüm ve deneyimlerinden yararlandığım Doç.Dr. Cemalettin ŞAHİN, Yrd. Doç.Dr. Fikri BALTA, Yrd. Doç.Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ, Yrd. Doç.Dr. Hakan KARAOĞLU'na ve hayatımın her aşamasında bana yol gösteren ve destek olan Yrd. Doç.Dr. Ferhat KALAYCI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan İsmail AKSU, Esmanur İÇEN ve Mehmet Nuri BOZYEL'e ve Rize Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugün aramızda olmasa da her konuda, ışığından, yaptıklarından örnek ve ilham aldığım, yolumu aydınlatan merhum hocamız Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ'u rahmet, sevgi ve saygıyla yad ederim.

Hayatımın her anında karşılaştığım güçlüklerde desteklerini, ilgilerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Gökhan KALAYCI

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| ÖNSÖZ..... | I |
| İÇİNDEKİLER | II |
| ÖZET..... | IV |
| SUMMARY | V |
| SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | VI |
| SEKİLLER DİZİNİ..... | VII |
| TABLolar DİZİNİ | VIII |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. Tatlı Su Istakozlarının Taksonomik Durumu..... | 3 |
| 1.3. Tatlı Su Istakozlarının Dünya ve Avrupa'daki Dağılımı ve Genel Özellikleri..... | 4 |
| 1.4. Tatlı Su Istakozlarının Ülkemizdeki Dağılımı..... | 5 |
| 1.5. Tür, Alttür Kavramı ve Oluşumu..... | 8 |
| 1.6. Genetik Varyasyon; Nedenleri, Belirlenmesi ve Muhafazası..... | 9 |
| 1.7. Genetik Varyasyonun Tahmininde Kullanılan Teknikler..... | 10 |
| 1.7.1. Protein elektroforezi..... | 12 |
| 1.7.2. DNA belirteçleri ve gelişimi..... | 13 |
| 1.7.2.1. RFLP: Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi..... | 14 |
| 1.7.2.2. RAPDs: Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA..... | 16 |
| 1.7.2.3. Satelit DNA belirteçleri..... | 17 |
| 1.7.2.4. Minisatellit DNA belirteçleri..... | 17 |
| 1.7.2.5. Mikrosatellit DNA belirteçleri..... | 19 |
| 1.7.2.6. SNP: Tek Nükleotit Polimorfizmi | 21 |
| 1.8. Mitokondriyal DNA..... | 22 |
| 1.9. Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi..... | 24 |
| 1.10. Önceki Çalışmalar..... | 24 |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 26 |
| 2.1. Örneklerin Toplanması..... | 26 |
| 2.2. DNA izolasyonu..... | 27 |
| 2.3. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi..... | 28 |
| 2.3.1. Agaroz jel elektroforezi ile toplam DNA'nın varlığının kontrolü..... | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.3.2. | Spektrofotometre ile DNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi..... | 29 |
| 2.4. | PZR Uygulamaları..... | 29 |
| 2.5. | PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü..... | 31 |
| 2.6. | PZR-RFLP Uygulamaları..... | 32 |
| 2.6.1. | RFLP sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde kontrolü..... | 33 |
| 2.6.2. | Agaroz jel sonuçlarının nükleotit dizisi sonuçları ile doğrulanması..... | 33 |
| 3. | BULGULAR..... | 34 |
| 3.1. | Toplam DNA İzolasyonuna İlişkin Bulgular..... | 34 |
| 3.2. | PZR Uygulamalarına İlişkin Bulgular..... | 36 |
| 3.3. | RFLP Uygulamalarına İlişkin Bulgular..... | 36 |
| 4. | TARTIŞMA..... | 41 |
| 5. | SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 44 |
| | KAYNAKLAR..... | 45 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 54 |

ÖZET

Kerevitler dünyanın birçok bölgesinde ve ülkemizde dağılım gösteren yüksek derecede ekonomik, ticari ve ekolojik öneme sahip omurgasız hayvanlardır. Türkiye’de *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 (Türk kereviti) ve *Austropotamobius torrentium* Nordmann, 1842 (Taş kereviti) olmak üzere iki tür kerevit dağılım göstermektedir. *Astacus leptodactylus*’un ülkemizde iki alt türe sahip olduğu bildirilmiş olup (*Astacus leptodactylus leptodactylus*, *Astacus leptodactylus salinus*) Anadolu’daki birçok iç su kaynağında doğal olarak yayılım gösteren tek tür olma özelliğine sahiptir. *Austropotamobius torrentium* ise ülkemizin doğal olmayan tek kerevit türü olup ilk kez 2005 yılında Kırklareli sınırları içindeki Velika Deresinden, 2007 yılında da Madara Çayıdan kayıt verilmiştir.

Mevcut türler ve alt türlerin farklılıklarını ortaya koymak için yapılan çalışmalar, sadece diagnostik veya biyo-ekolojik karakterlere dayanmakta olup alt türlerin varlığı, dağılım alanı ve diğer türden ayrılması hususunda kesin ve net bir yargıya varılmasını güçleştirmiştir. Bu nedenle tür içi veya türler arası bölgesel farklılıkları veya benzerlikleri ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmaların genetik çalışmalarla mutlaka desteklenmesi gerekmektedir.

Türlerin tanımlanmasında moleküler belirteç kullanılarak farklılığın ortaya çıkarılması amacıyla, türler ve alt türleri temsil edecek şekilde seçilen istasyonlardan örneklemeler yapılmıştır. Türlerin genetik olarak tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler belirteçlerden biri olan PZR-RFLP tekniği uygulanmıştır. On sekiz adet kesim enzimi kullanılmış olup bunlardan hiçbiri *Astacus leptodactylus* türünde tanıma bulamamıştır. Üç kesim enzimi ise *Austropotamobius torrentium* türünde kesim bölgesi bulmuştur ve iki bant vermiştir.

Bu çalışma ülkemizde dağılım gösteren kerevit türlerinin ve tartışmalı olan alt türlerinin DNA’ya dayalı moleküler belirteçler kullanılarak tanımlanmasına yönelik yapılan ilk çalışmadır. Çalışmada seçilen PZR-RFLP tekniği türleri başarılı şekilde ayırmış olmasına rağmen alttürler arasında varyasyon belirlenememiştir.

Anahtar kelimeler: *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius torrentium*, kerevit, PZR-RFLP, dağılım, genetik tanımlama, genetik belirteç

SUMMARY

IDENTIFICATION OF CRAYFISH SPECIES IN TURKEY (*Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius torrentium*) by PCR-RFLP METHOD

Crayfish shows distribution in many parts of the world and our country is the invertebrate animals that has an economic, commercial and ecological importance . In Turkey it has two species, which are *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 and *Austropotamobius torrentium* Nordmann, 1842. Two sub-species have been reported for *Astacus leptodactylus* (*Astacus leptodactylus leptodactylus*, *Astacus leptodactylus salinus*) and also in Anatolia, it has a quality that only species in the source of many inland water as a natural distribution. *Austropotamobius torrentium* is the only species that not natural for inland waters in Turkey and first time recorded 2005 within the boundaries of Kirklareli Velika brook, and Madara creek in 2007.

The studies carried out showing the differences between current species and sub-species based on only diagnostic or bio-ecological characters and were hampered for regarding definite and clear judgement presence of sub-species, distribution area and separating from other species. For this reason, studies that purpose bring out regional differences or similarities between intra-or inter-species have to be supported by genetic studies.

In order to identify the species and subspecies by using molecular markers, sampling stations were selected to represent the species and subspecies. PCR-RFLP technique which is commonly used the molecular markers for genetic identification of species was used. Eighteen restriction endonucleases was used, none of these find recognition site for *A.leptodactylus*. Three restriction endonucleases have found a recognition site and gave two fragments for *A. torrentium*.

This is the first on identification of crayfish species and it's controversial subspecies based on DNA markers Although PCR-RFLP technique used in this study differentiated the species sucesfully, variation was not found between subspecies.

Keywords: *Astacus leptodactylus*, *Austropotamobius torrentium*, crayfish, PCR-RFLP, distribution, genetic identification, genetic marker

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------|---|
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RAPD | : Random Amplified Polimorfic DNA (Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA) |
| RFLP | : Restriction Fragment Lenght Polimorfizm (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) |
| VNTR | : Variable Number of Tandem Repeat (Sıralı Tekrarların Değişken Sayıları) |
| SNP | : Single Nucleotide Polimorfizm (Tek Nükleotit Polimorfizmi) |
| ICS | : Indigenous crayfish species (Doğal kerevit türü) |
| mtDNA | : mitokondriyal DNA |
| kb | : kilobaz |
| bç | : baz çifti |
| μ l | : mikrolitre |
| ml | : mililitre |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 1. <i>Astacus leptodactylus</i> 'un dorsal görünümü..... | 6 |
| Şekil 2. <i>Astacus leptodactylus</i> 'un ventral görünümü..... | 6 |
| Şekil 3. <i>Austropotamobius torrentium</i> 'un dorsal görünümü..... | 7 |
| Şekil 4. <i>Austropotamobius torrentium</i> 'un ventral görünümü..... | 7 |
| Şekil 5. RFLP tekniği ile canlılar arasındaki genetik farklılığın tespiti..... | 15 |
| Şekil 6. Hayvan mitokondriyal genomu..... | 23 |
| Şekil 7. Örnekleme yapılan bölgeler..... | 26 |
| Şekil 8. Kerevitlerin abdomeninden kas dokusunun alınması..... | 27 |
| Şekil 9. Kesim enzimlerinin nükleotit dizisi üzerindeki kesim noktaları | 33 |
| Şekil 10. DNA izolasyonunun % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde kontrolü..... | 34 |
| Şekil 11. PZR ürününün %1'lik agaroz jel elektroforezinde görünümü..... | 36 |
| Şekil 12. SspI Enzimi ile Reaksiyona Tabi Tutulmuş PZR ürününün % 1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü..... | 37 |
| Şekil 13. <i>Austropotamobius torrentium</i> örneklerine ait PZR ürünlerinin SspI kesim enzimi tarafından tanınan bölgesinin nükleotit dizisi..... | 37 |
| Şekil 14. RsaI enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş PZR ürününün % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü..... | 38 |
| Şekil 15. <i>Austropotamobius torrentium</i> örneklerine ait PZR ürünlerinin RsaI kesim enzimi tarafından tanınan bölgesinin nükleotit dizisi..... | 38 |
| Şekil 16. KpnI enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş PZR ürününün % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü..... | 39 |
| Şekil 17. <i>Austropotamobius torrentium</i> örneklerine ait PZR ürünlerinin KpnI kesim enzimi tarafından tanınan bölgesinin nükleotit dizisi..... | 39 |

TABLolar DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Tablo 1. Kerevitlerin familya, cins ve tür sayıları..... | 4 |
| Tablo 2. Balıkçılık ve yetiştiricilikte kullanılan bazı genetik belirteçlerinin avantaj ve dezavantajları..... | 12 |
| Tablo 3. mtDNA sitokrom oksidaz geni üniversal primerleri..... | 29 |
| Tablo 4. PZR karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları..... | 30 |
| Tablo 5. Gradient PZR döngü koşulları..... | 30 |
| Tablo 6. Gradient PZR'da 54 °C ve 15 gradientte kolonlardaki yapışma sıcaklıkları..... | 31 |
| Tablo 7. PZR döngü koşulları..... | 31 |
| Tablo 8. Kullanılan kesim enzimleri, tanıma bölgeleri ve inkübasyon sıcaklıkları.. | 32 |
| Tablo 9. Kesim uygulamasında (RFLP) kullanılan bileşenler ve miktarları..... | 32 |
| Tablo 10. İzole edilen toplam DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri..... | 35 |
| Tablo 11. Çalışılan kesim enzimlerinin ortaya çıkardığı fragmentler..... | 40 |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kerevitler dünyanın birçok bölgesinde ve ülkemizde dağılım gösteren yüksek derecede ekonomik öneme sahip omurgasız canlılardır. Dünya üzerinde yaklaşık olarak 600 farklı türü olduğu bilinmektedir (Crandall ve Buhay, 2008). Ülkemizde ise biri doğal olmak üzere iki tür ile temsil edilmektedir. Türk kereviti, Galiçya kereviti ya da bataklık kereviti olarak adlandırılan *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 türünün ülkemizin farklı bölgelerinde doğal dağılım gösteren iki alttürü mevcuttur. Bunlardan ilki olan *Astacus leptodactylus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 Kuzey Anadolu ve Trakya'da, *Astacus leptodactylus salinus* Nordmann, 1842, ise Orta ve Batı Anadolu'da dağılım göstermektedirler (Holthius, 1961; Geldiay ve Kocataş, 1970). Dünya üzerinde *Astacus leptodactylus* türü, başta Rusya ve Ukrayna içsuları olmak üzere Doğu Avrupa'dan Türkmenistan'a kadar, Karadeniz, Baltık Denizi ve Hazar Denizine akan nehirler, orta ve aşağı Tuna Havzası göl ve nehirlerinde dağılım göstermektedir (Köksal, 1988). Ülkemizdeki ikinci tür olan *Austropotamobius torrentium* ise, Avrupanın doğal türlerinden biri olup, ülkemizin Trakya bölgesinde yer alan Velika Nehri ve Madara Çayı'ndan rapor edilmiştir (Trontelj ve ark, 2005; Machino ve Füreder, 2005; Harlıoğlu ve Güner, 2007).

Birçok türde olduğu gibi, kerevitler arasındaki genetik varyasyon ve tür tayini araştırmaları ve çalışmaları moleküler tekniklerin gelişimiyle birlikte büyük bir aşama kaydetmiştir. Bir dizi moleküler metot birçok kerevit taksonlarındaki sistematik ve türün teşhisi ile ilgili problemleri çözmek için kullanılmıştır (Fetzner ve Crandall, 2001). Bununla birlikte son dönemlerde yapılan çalışmaların çoğunluğunda DNA'ya dayalı belirteç sistemleri kullanılmaktadır. Moleküler biyolojinin gelişimi sayesinde çok sayıda DNA belirtecinin gelişimi mümkün olmuştur. Bu metotlar taksonlar arasındaki genetik ilişkiyi belirleme, filogenetik ve biyoçeşitlilik açılarından bilgi sahibi olunmasına imkan vermektedir.

Araştırmacılar, 1980 yılı ortalarından beri dünyada tatlı su ıstakozu türlerinin genetik yapısını ortaya koymak için çalışmaktadır. Bu amaç için farklı metotlar uygulanmaktadır. İlk çalışmalar Avrupa kerevit popülasyonları arasında düşük seviyede varyasyon gösteren protein elektroforez teknikleri kullanılarak yapılmıştır (Attard ve Vianet, 1985; Fevolden ve Hessen, 1989; Agerberg, 1990; Fevolden ve ark., 1994). Son yıllarda daha yüksek

varyasyon gösteren yeni teknikler geliştirilmiş ve bu teknikler kerevit populasyonlarına başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Populasyonlar arası farklılıkları belirlemek için mitokondrial DNA (Souty-Grosset ve ark., 1997; Grandjean ve ark., 2000; Largiader ve ark., 2000), RAPD-PZR (Macaranas ve ark., 1995; Schulz, 2000; Gouin ve ark., 2001; 2003), AFLP (Fetzner ve Crandall, 1999), RFLP (Gouin ve ark., 2003; Soroka, 2008) ve mikrosatellit (Gouin ve ark., 2000; 2002) belirteçleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Filogenetik çalışmalar (Grandjean ve ark., 2000), filocoğrafya çalışmaları (Grandjean ve ark., 2002) mitokondriyal DNA varyasyonu ortaya konularak gerçekleştirilmiştir. Avrupa kerevitlerinde yapılan bu çalışmalar diğer kerevit türleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Folmer ve ark., (1994) Decapoda dahil olmak üzere omurgasızların 11 sınıfının mitokondriyal sitokrom oksidaz geni 1. alt ünitesinin PZR vasıtasıyla çoğaltılmasını sağlayan universal primerler tasarlamıştır. Sonrasında mitokondriyal sitokrom oksidaz geni filogenetik araştırmalarda ve gelişiminin çeşitli aşamalarında morfolojik olarak değişen bireylerin taksonomik olarak tanımlanmasına yönelik çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmıştır. Sitokrom oksidaz geni çoğaltılarak PZR-RFLP metodu ile *Dreissena polymorpha* ve *Dreissena bugensis* türlerine ait midyelerin hem ergin hem de genç bireylerinde ve larva formlarında etkili şekilde kullanılmıştır (Claxton ve ark., 1997; Claxton ve Boulding, 1998).

Türkiye’de dağılım gösteren *Astacus leptodactylus* türü ile yapılmış genetik çalışmalara ise rastlanılamamıştır. Yapılan çalışmalar genellikle türün biyo-ekolojik özellikleri (Holthius, 1961; Geldiay ve Kocataş, 1970; Köksal, 1988; Harlıoğlu ve Güner, 2007), morfometri ve taksonomi (Geldiay, 1949; Tortonese, 1952; Erençin ve Köksal, 1977; Köksal 1980; Starobogatov, 1995) ve yetiştiricilik (Köksal, 1985; Harlıoğlu ve Holdich, 2001; Mazlum, 2007; Mazlum ve Uzun, 2008) ile ilgili çalışmalardır.

Son zamanlarda yaygın olarak kullanılan moleküler metotların başında mitokondriyal DNA (mtDNA) dizilimi veya RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizi, RAPD, minisatellit ve mikrosatellit DNA belirteçlerini araç olarak kullanan çalışmalar gelmektedir. Bu metotlardan biri olan PZR-RFLP nispeten düşük maliyetli olması, uygulanabilirliği, kısa zamanda sonuç alınabilmesi ve güvenilirliği açısından daha çok tercih edilmektedir. Çoğu DNA genetik analizinin ana ilkesinde olduğu gibi değişik uzunlukta parçacıklar vermesine dayanır. DNA’daki 4-6 nükleotit uzunluğundaki özel bölgeleri tanıyıp kesen kesim enzimleri aracılığıyla PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılan bölge kesilerek, kesim noktalarının farklılığına göre bireylerin veya

populasyonların filogenetik ilişkilerinin ve taksonomik durumunun analizi yapılabilir. En önemlisi özellikle morfolojik olarak benzeyen türlerin birbirinden kolayca ayırt edilmesine ve tanımlanmasına olanak sağlayabilir.

Su ürünleri alanında RFLP tekniği ile populasyonlar arasındaki ve türlerdeki genetik varyasyon değerleri hesaplanarak mevcut gen kaynakları tespit edilebilir, soy ağacı oluşturularak taksonlar arasında genetik benzerlikler hesaplanabilir, morfolojik özelliklerine göre ayırımı yapılamayan su canlılarının ve ayırt edilemeyecek yaş veya büyüklükteki örneklerin ayırımı yapılarak taksonomik açıdan yaşanan sıkıntılar aşılabılır. Taze, dondurulmuş hatta işlenmiş örneklerin orjini rahatlıkla tespit edilebilir. Ekonomik öneme sahip olmayan su canlılarına ait ürünlerin ekonomik öneme sahip olan canlılarına ait ürün olarak pazarlanması gibi ticari sahtekarlık olayları belirlenebilir. Seleksiyon uygulamalarında ve mutasyon taramalarında kullanılabilir. Basit, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir metottur. Kullanımı çok yaygındır, bilim alanındaki kabul edilebilirlik oranı ve popülaritesi oldukça yüksektir (Aksakal, 2005).

1.2. Kerevitlerin Taksonomik Durumu

Kerevitler, Decapoda (onayaklı kabuklu) takımının son derece çeşitlilik gösteren grubudur. Taksonomik olarak, Kuzey yarımkürede bulunanlar Astacoidea ve Güney yarımküredeki ise Parastacoidea olmak üzere iki süper familyaya ayrılmışlardır. Astacoidea, Cambridae (12 cins ve 423 tür) ve Astacidae (6 cins, 39 tür) olmak üzere iki familyaya bölünmüştür (Hoobs, 1989). Parastacoidea ise yalnızca Parastacidae (15 cins, 176 tür) familyası ile temsil edilmektedir (Crandall ve Buhay, 2008). Dünya üzerinde dağılım gösteren kerevit familyaları, cinsleri ve tür sayıları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kerevitlerin Familya, Cins ve Tür Sayıları (Crandall ve Buhay, 2008)

| Familya | Cins | Tür Sayısı | Toplam |
|---------------------|------------------|------------|------------|
| Astacidae | Astacus | 5 | 39 |
| | Atlantoastacus | 8 | |
| | Austropotamobius | 7 | |
| | Caspiastacus | 2 | |
| | Pacifastacus | 8 | |
| | Pontastacus | 9 | |
| Cambaridae | Barbicambarus | 1 | 423 |
| | Bouchardina | 1 | |
| | Cambarellus | 17 | |
| | Cambaroides | 7 | |
| | Cambarus | 95 | |
| | Distocambarus | 5 | |
| | Fallicambarus | 18 | |
| | Faxonella | 4 | |
| | Hobbseus | 7 | |
| | Orconectes | 89 | |
| | Procambarus | 177 | |
| | Troglocambarus | 2 | |
| Parastacidae | Astacoides | 9 | 176 |
| | Astacopsis | 3 | |
| | Cherax | 45 | |
| | Engaeus | 39 | |
| | Engaewa | 5 | |
| | Euastacus | 43 | |
| | Geocharax | 2 | |
| | Gramastacus | 1 | |
| | Ombrastacoides | 11 | |
| | Paranephrops | 2 | |
| | Parastacus | 8 | |
| | Samastacus | 1 | |
| | Spinastacoides | 3 | |
| | Tenuibranchiurus | 1 | |
| Virilastacus | 3 | | |
| GENEL TOPLAM | | | 638 |

1.3. Kerevitlerin Dünya ve Avrupa'daki Dağılımı ve Genel Özellikleri

Dünyada yaklaşık olarak 600 tür kerevit vardır ve yılda ortalama 5-10 tür tanımlanmaktadır (Taylor, 2002; Crandall ve Buhay, 2008). Kerevitler tüm Kuzey Amerika, Avustralya, Güney Amerika'nın güneyi, Asya, Avrupa, Madagaskar ve Yeni Zelanda'ya kadar yayılmışlardır (URL-1). Çeşitliliğin iki merkezi vardır. Birincisi; Güneydoğu Amerika'nın Güney Appalachia dağları (Kuzey yarımküre merkezi) diğeri ise Güneydoğu Avustralya'dır (Güney yarımküre merkezi).

Avrupa kıtasına özgü 5 doğal tür vardır. Bunlar; *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Caspiastacus pachypus*, *Austropotamobius torrentium*, *Austropotamobius pallipes*'tir. (Ackefors, 1999; Holdich, 2002; Trontelj ve ark., 2005; Machino ve Füreder, 2005; Machino ve Holdich, 2006, Souty-Grosset ve ark., 2006). Bu doğal türlerle birlikte, dört Amerikan (*Orconectes limosus*, *O. immunis*, *P. leniusculus* ve *P. clarkii*) ve üç Avustralya (*C. destructor*, *C. tenuimanus* ve *C. quadricarinatus*) orijinli kerevit türü Avrupa'ya stoklanmış (Holdich ve ark., 1999). *Austropotamobius pallipes* popülasyonunun ortadan kalkmış olduğu Portekiz haricinde, (Machino ve Holdich, 2006) Avrupa'nın çoğu ülkesinde en azından bir doğal (ICS) kerevit türü bulunmaktadır. Muhtemelen doğal kerevit türüne sahip olmayan ülkeler; Kıbrıs, Malta, Monaco gibi ülkelere ek olarak kıyıdan uzak olan Atlantik Okyanusu'ndaki Portekiz'e ait olan Asor adaları, Valencia'nın açığındaki Balerik adaları, Kanarya adaları, Yunan ve İtalyan Adaları ve Madeira Adaları'dır. Baltık Denizi'ndeki bazı adalar *Astacus astacus* popülasyonlarına sahiptir fakat bunlar doğal stok değildir (Holdich, 2009).

Kerevitler sucul ekosistemlerde temel tür olarak önemli görevlere sahiptir, fakat birkaç kerevit türü büyük ölçüde yayılımcıdır ve hassas tatlı su habitatları üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir (Taylor, 2002). Her bir habitat tipi farklı morfolojik adaptasyonlara sahiptir. Kerevitler oyuk, çukur, akıntı ve gölde yaşarlar. Güçlü oyuk yapanlar su seviyesine kadar oyuk açabilirler ya da ihtiyaçları olan nemliliği sağlayacak ölçüde yeterince bol yağmurlu karasal habitatlarda yaşayabilirler (Crandall ve Buhay, 2008).

1.4. Kerevitlerin Ülkemizdeki Dağılımı

Ülkemizde doğal olarak dağılım gösteren tek kerevit türü *Astacus leptodactylus*'tur (Şekil 1, 2) (Holthuis, 1961; Geldiay ve Kocataş, 1970; Köksal, 1988; Harlıoğlu, 2004; Harlıoğlu ve Güner, 2006, 2007; Güner ve Harlıoğlu, 2010). Buna ek olarak son zamanlarda Avrupa kökenli olan *Austropotamobius torrentium* türüne ait kerevitler Türkiye'nin Avrupa yakasında bulunan Velika Çayı ve Madara deresinde gözlenmiştir (Şekil 3, 4) (Trontelj ve ark., 2005; Machino ve Holdich, 2006; Harlıoğlu ve Güner, 2006, 2007).



Şekil 1. *Astacus leptodactylus*'un dorsal görünümü



Şekil 2. *Astacus leptodactylus*'un ventral görünümü



Şekil 3. *Austropotamobius torrentium*'un dorsal görünümü



Şekil 4. *Austropotamobius torrentium*'un ventral görünümü

Anadolu'da kerevitler üzerine yapılan taksonomik çalışmalarda farklı lokalitelerden farklı türler rapor edilmiştir. Türkiye'de *Astacus leptodactylus*'a ilişkin ilk çalışma olan Ninni (1923)'e göre ülkemizdeki kerevitleri *Astacus fluviatilis*, *Astacus pallipes* ve *Astacus leptodactylus* olarak tanımlanmış olup, Apolyont ve Manyas Göllerinden *Astacus astacus* ve *A. pallipes* (Geldiay ve Kocataş, 1970), Çubuk Barajı'ndan *Potamobius (Astacus) fluviatilis* (Geldiay, 1949), Kayseri, Bursa ve İstanbul illerinden *Astacus (Pontastacus) leptodactylus* (Bott, 1950), Sapanca Gölü'nden *Potamobius leptodactylus* (Tortonese,

1952), Ünye'den *Astacus colchicus* (Holthius, 1961) olarak kayıt verilmiştir. Karaman, (1962); (1963)'a göre ise çeşitli lokalitelerden elde ettiği örnekleri *Astacus (Pontastacus) leptodactylus salinus* ve *Astacus (Pontastacus) leptodactylus natio intermedius* türlerini ve Pınarbaşı Gölü'nden (Afyon) *Astacus leptodactylus pallipes natio salinus* alt türlerini rapor etmiştir. Geldiay ve Kocataş (1970) oldukça ayrıntılı olan çalışmalarında Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bulunan lokalitelerden yakaladıkları örnekleri değerlendirerek, *Astacus (Pontastacus) leptodactylus salinus* ve *Astacus (Pontastacus) leptodactylus leptodactylus* alttürlerinin varlığını bildirmişlerdir. Erençin ve Köksal (1977) ile Köksal (1980) *A. leptodactylus* türünün Türkiye'nin tek yerli türü olduğunu ve farklı bölgelerde dağılım gösteren *A. leptodactylus leptodactylus* ve *A. leptodactylus salinus* adlı iki alt türünün varlığını bildirmişlerdir. Ancak, Starobogatov (1995) *A. leptodactylus salinus* alt türünün Türkiye'deki populasyonlarının muhtemel olarak *Pontastacus intermedius* türüne ait olabileceğini belirtmiştir. Aynı çalışmada *A. colchicus* türünün İstanbul'da bulunabileceğinden bahsetmiştir. Bu türün Türkiye'ye Kura Nehri yoluyla girmiş olabileceğini öne sürmüştür. Albrecht (1983) ise *A. colchicus*'un, *A. astacus*'un alt türü olabileceğini bildirmiştir. Bu araştırmalar söz konusu türün Türkiye'de olabileceğini öngörmektedir ancak yakın zamana kadar bunu doğrular bir kayıta rastlanılmamıştır. Holdich (2002) ülkemizde *Astacus leptodactylus*'un iki alt türü olduğunu bildirmiştir. Bunlar; *A. leptodactylus leptodactylus* (İzmit, Terkos, Çivril ve Tunca gölleri, Meriç Nehri, Cori ve Gelemen dereleri) ve *A. leptodactylus salinus* (Manyas, Eğridir, Beyşehir, Apolyont, Eber, Akşehir, Gölcük gölleri ve Miliç Çayı) alt türleridir. Mevcut çalışmalar doğrultusunda, özellikle son yıllarda Türkiye'de kerevitlerin tek doğal türle (*A. leptodactylus*) temsil edildiği görüşü benimsenmiştir. Bununla birlikte Machino ve Füreder (2005)'e göre ilk olarak 1996 yılında Kırklareli sınırları içerisindeki Velika deresinde Avrupa'nın doğal kerevit türlerinden biri olan *Austropotamobius torrentium* (Shrank, 1803) türüne ait bireyler gözlemlenmiştir. Machino ve Füreder, (2005) ve Trontelj ve ark., (2005) bu türün Türkiye sınırları içerisinde bulunduğunu ortaya koyan ilk çalışmaları yapmışlardır. Harlıoğlu ve Güner (2007) Velika Nehri' nin haricinde ilk olarak Madara Çayı'ndan türün varlığını rapor etmişlerdir.

1.5. Tür, Alt tür Kavramı ve Oluşumu

Tür kavramında araştırmacılar arasında temel ilkeler açısından fikir birliğine varılmış olmasına rağmen, değerlendirme yöntemleri ve özelliklerin seçimi konusunda birçok fikir ayrılığı mevcuttur. Tür, yapısal özellikleriyle genetik karakterleri birbirine benzeyen ve yine aynı genetik karakterde yeni kuşaklar verebilen bireylerin tümü şeklinde tanımlanmaktadır (Kühn, 1964; Hadorn ve Wehner, 1974). Ayrıca, “Yapısal ve işlevsel özellikleri yönünden birbirine benzeyen ve aynı çevresel koşullara benzer tepki gösteren doğal koşullarda serbest olarak birbirleriyle çiftleşip verimli yavrular oluşturabilen bireyler topluluğu” şeklinde de türün tanımı yapılmaktadır. Tür, dinamik bir varlıktır yeni döller oluşturarak varlığını devam ettirir. Yeni döllerin oluşumu sürecinde, gen havuzu içeriğinde farklı ya da aynı alanlarda olan değişimler, türleri kendi içerisinde bir alt birimleşmeye götürür ve alt birimleşmenin tamamlanmasıyla yeni türler oluşur (Ergüden, 2007).

Türler genellikle kendi içerisinde fenotipik ve genetik olarak farklılaşmış gruplara veya popülasyonlara bölünmüştür. Türü meydana getiren popülasyondaki bireyler birbirinin aynısı değil benzeri olurlar. Yani, anatomik, fizyolojik özellikleri, protein yapısı ve davranışları bakımından belirli değişimler (varyasyonlar) gösterirler. Değişim faktörü türlerin temel özelliklerinden birini oluşturur. Ancak, aynı türe ait bireyler arasındaki değişimler, farklı türlere ait bireyler arasındaki değişimlere göre çok daha azdır. Başka bir ifadeyle iki farklı tür arasında gen akışı tamamen kesilmiş, yani eşeyssel yalıtım (izolasyon) sağlanmış durumdadır. Bunun yanında istisnai bir durum olarak ikiz türler ve hatta bazen birbirine oldukça uzak akraba olan türler arasında karşılıklı döllenme ve yavru meydana getirme görülebilir. Fakat gen ve kromozom dağılımındaki dengesizliklerden dolayı bu yavrular verimli olmazlar (Demirsoy, 1998; Kocataş, 2003; Ergüden, 2007).

Bir türe ait bireyler buldukları çevrede aynı gen havuzuna sahip bir ekolojik birlik (popülasyon) oluştururlar. Böylece her bir tür birçok bölgesel popülasyonlardan oluşur. Bunlardan bazıları birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu bireylerin oluşturdukları tür altı gruplara alt tür (subspecies) denilmektedir. Bir türün içerisinde genellikle coğrafik yalıtım, dolayısıyla coğrafik ırklara bağımlı olarak alt türler oluşabilir. Bunlar türün diğer popülasyonlarından taksonomik olarak farklıdır. Alt türler, kendi içlerinde kısmi yalıtımdan dolayı, gen bileşimi bakımından birbirlerine daha çok benzeyen gruplardan meydana gelmiştir. Böyle bir politipik tür’ün (iki veya daha fazla alttüre sahip) alttürleri ilke olarak gen bileşimleri bakımından farklı olmakla beraber, bir araya getirildiklerinde başarılı olarak çiftleşebilirler ve verimli döller meydana getirebilirler (Demirsoy, 1998).

1.6. Genetik Varyasyon

Ekolojik ve biyolojik açıdan bakıldığında çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle oluşan fenotipik varyasyonun belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Morfolojik karakterlerin incelenmesine yönelik geleneksel çalışmalarda genel olarak çevre ve genetiğin etkisini ayırabilmek zordur. Genetik tekniklerin kullanımından önce, morfolojik farklılığın tamamıyla genetik farklılaşmadan kaynaklandığı sanılmakta ve stokların tespiti, genellikle morfolojik özellikler kullanarak yapılmaktaydı (Marr, 1957). Fakat, fenotipik tekniklerin kullanımı, bir türe ait populasyon tespitinde fenotipik değişimin direk olarak genetik kontrolün etkisi altında olmayışı ve çevresel faktörlerin değişiminden etkilenmesinden dolayı sınırlı hale gelmiştir (Allendorf ve ark., 1987). Çünkü genetik tekniklerin kullanımı ile daha önce fenotipik olarak farklı olan birçok populasyon veya türün genetik olarak farklı olmadığı ortaya çıkmıştır (Ergüden, 2007).

Ekonomik öneme sahip olan ve baskı altında bulunan türlerin genetik yapılarının analizinde çoğunlukla kullanılan moleküler metotlar arasında mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın nükleotit diziliminin belirlenmesi, Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA), Minisatellit ve Mikrosatellit DNA belirteç çalışmaları başta gelmektedir (Okumuş ve Çiftci, 2003). Bu tekniklerin kullanımı, populasyon içinde bireyler arasında, aynı türün populasyonları arasında ve taksonomik seviyede farklı türler arasında genetik varyasyonun tahminini mümkün kılmıştır. Bu tip çalışmaların sonucunda çoğu lokal populasyonların ve sucül türlerin üreme farklılıkları gösteren, izole halde küçük gruplara bölünmüş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalar lokal çevreye adaptasyonun ve genetik farklılaşmanın delili olarak görülmektedir. Böylece bir veya birden fazla ayrı üreme davranışı gösteren izole grupların kaybolması tür içindeki genetik varyasyonun seviyesinin düşmesine neden olmakta ve tamamıyla nadir bulunan genetik karakterlerin kaybolmasıyla sonuçlanabilmektedir.

Doğal çeşitliliği korumanın temel yaklaşımı populasyonlardaki genetik varyasyonun korunması olmaktadır. Diğer bir deyişle, çevresel korumanın temeli türün evrimiyle etkileşim içinde olduğu bilinen ekosistemin muhafazasıdır. Bu yaklaşım, dünya çapındaki doğal rezervlerin ve park alanlarının yaratılması ve işletim prensibinin altının çizilmesini sağlar. Bu tip korumanın oluşturulduğu yerlerde, ekonomik olarak önemli türlerin populasyon yapılarıyla ilişkili olarak sıkı bir avcılık yönetimine ihtiyaç duyulmaktadır.

1.7. Genetik Varyasyonun Tahmininde Kullanılan Teknikler

1960'lı yılların ortalarına kadar populasyonlar arası ve populasyon içi varyasyonun tespiti için genel olarak biyo-ekolojik özellikler, markalama, parazit dağılımı, fizyolojik ve davranış özellikleri, morfolojik veya meristik karakterler kullanılmaktaydı (Lewontin, 1964). Bilindiği gibi bu tip belirteçler genetik anlamda açık değildir. Bu nedenle son yıllarda balıkçılıkta moleküler genetik çalışmalar büyük ilgi kazanmıştır. Günümüzde bu çalışmalar temel olarak protein ve DNA olmak üzere iki tür genetik belirteç sistemi kullanılarak yapılmaktadır. Protein elektroforezi ile yapılan çalışmaların en büyük avantajı hızlı, ucuz olması ve çok fazla laboratuvar malzemesi gerektirmemesidir. Buna karşın kullanılan örneklerin taze olması zorunluluğu, DNA çalışmalarına göre çok sayıda örneğe ihtiyaç duyulması ve bu örneklerin genellikle öldürülmesi, en önemlisi bazı populasyon ve türlerde DNA çalışmalarına göre çok düşük seviyede polimorfik olması protein elektroforez tekniğinin sınırlayıcı özellikleridir. Bu nedenle son dönemlerde çalışmaların çoğunluğu DNA belirteç sistemleri kullanılarak yapılmaktadır. Son zamanlardaki Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) kullanımı özellikle DNA çalışmalarına ayrı bir ivme kazandırmış olup, 100 yıl veya daha öncesinden saklanmış balık pulu örnekleri ile bile çalışma imkânı sağlamıştır. Ayrıca çok az miktarda ve canlıyı öldürmeden alınan doku parçasıyla bile çalışma imkânı vermesi önemli bir avantaj sağlamaktadır (Çiftci, 2006). Bu günlerde çoğunlukla kullanılan moleküler metotlar arasında mitokondrial DNA (mtDNA) dizilimi veya RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizi, minisatellit ve mikrosatellit DNA belirteç çalışmaları gelmektedir. Bu teknikler uygun laboratuvar koşulları oluşturulduğunda nispeten ucuz ve çok kısa süre içerisinde çok fazla miktarda örnek çalışılmasına imkân vermektedir. Genetik çalışmalarda bu teknikler kullanılarak büyük miktarda gen bölgesini izlenebilir, taksonomik seviyede aynı ve farklı türler arasında ve içinde hatta bireyler arası ve içinde farklılık seviyesini tahmin edebilir, generasyonlar arasındaki allel frekansları değişiminden efektif populasyon büyüklüğünü tahmin edebilir, kuluçkahanede yetiştirilmiş balıkların herhangi bir markalamaya gerek duymadan hangi anne ve babaya ait olduğunu tespit edebilir, genin kromozom üzerindeki yeri yani gen haritasını çıkarabilir, populasyonlar arasındaki göç miktarları yani gen akışını belirleyebilir, kültürü yapılan tür için anaç seçimi yapılmasında kullanılarak yetiştiricilere yardım edebilir. Balıkçılık ve yetiştiricilikte kullanılan bazı genetik belirteçlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2'de verilmiştir. Omurgasız hayvanlarda ve diğer canlılarda

genetik varyasyonun belirlenmesinde kullanılan moleküler teknikler aşağıda tek tek ele alınmıştır (Çiftçi, 2006).

Tablo 2. Balıkçılık ve yetiştiricilikte kullanılan bazı genetik belirteçlerinin avantaj ve dezavantajları (Beaumont ve Hoare, 2003).

| | DNA sekansı | RFLP | VNTR | RADP | AFLP | Allozim |
|------------------------------------|-------------|------|------|------|------|---------|
| Pedigree veya ana, babanın tahmini | + | + | +++ | + | + | ++ |
| Tür içi popülasyonlar | + | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| Cins veya tür seviyesi ilişkiler | +++ | ++ | + | ++ | ++ | +++ |
| QTL | - | - | ++ | +++ | +++ | + |
| Maliyet | Y | M | Y | M | Y | D/M |
| Doku isteği | A | N | D | D | D | M |
| Kodominant veya dominant veri | - | B | K | B | B | K |
| Nötral | D | D | E | D | D | H |

+++ : Yüksek oranda bilgi verici, ++ : Bilgi verici, + : Çok az bilgi verici, - : Uygun değil, Yüksek, M: Makul, ılımlı, A: Az, D: Değişken, K: Kodominant, B: Başat, E: Evet, H: Hayır

1.7.1. Protein elektroforezi

İlk uygulanabilir genetik belirteç sistemi 1960'lı yıllarda geliştirilen protein elektroforezi olmuştur (Buth, 1990). Bu teknik sayesinde yapısal gen lokuslarında varyasyon olup olmadığı belirlenir. Protein kodlayan lokusların ürünleri elektrik yükü ve büyüklük gibi yapısal özelliklerine bağlı olarak ayrışır. Bu yalnızca spesifik protein kodlayan genlerin araştırılmasında değil ayrıca her bir lokusta farklı allellerin frekanslarının tespitinde de yardımcı olur (Markert ve Moller, 1959; Çiftçi 2006).

Transferin ve hemoglobin gibi enzimatik olmayan proteinleri kullanan çalışmaların yanında, enzimler incelenen proteinlerin en yaygın formudur. Enzimlerin biyokimyasal reaksiyon verdiği maddeyi içeren farklı histokimyasal boyaların kullanımıyla, lokusların ayrı olarak incelenmesi mümkündür. İki farklı şekilde veri elde edilir. İzozimler, fonksiyonel olarak enzimin benzer formlarıdır, farklı lokuslar tarafından üretilir (Çiftçi, 2006).

Allozimlerin veya izozimlerin ayrımı lokusta allelik varyasyon tarafından üretilen farklı proteinlerdir. İzozimler genellikle dokuya özeldir, hücrenin spesifik kısmında ve yalnızca gelişimin spesifik safhasında ifade edilebilir. Allozime dayalı allel frekansları

zamansal ve alansal indislerin hesaplanmasında ve populasyonların tanımlanmasında kullanılabilir. Zaman içinde allel frekanslarındaki değişim gen difüzyonu veya balıklandırmanın etkisinin tahmininde kullanılabilir. Ayrıca heterozigotluğun lokal olarak yok olması populasyon içindeki varyasyonun azalmasının göstergesidir (Çiftci, 2006).

Yaklaşık yirmi yıldır genetikçiler farklı türlerde populasyon düzeyinde genetik farklılıkları karakterize edebilmek için protein elektroforezlerini ana araç olarak kullanmaktadırlar. Bu teknik ilk başlarda insanlarda kan gruplarının tetkikinde kullanılmıştır. Fakat daha sonra diğer türlerde de uyarlanmıştır. Nispeten ucuz olması, çok az özel geliştirilmiş aletlere ihtiyaç duyması, geniş çapta ve hızlı bir işleme sahip olması ve genom içerisinde yayılmış ve birbirinden ayrı lokusların eşzamanlı olarak izlenmesine imkan tanınması bu tekniği genetik çalışmalarda avantajlı kılmaktadır. Birçok çalışmada stoklar arasındaki protein allel frekansları arasındaki farklılıkların belirlenmesi, gen akışı ve genetik mesafenin hesaplanmasının kullanımıyla makro ve mikro coğrafik populasyon yapılaşmasının araştırılmasında protein elektroforezlerini yararlı bir belirteç haline getirmiştir (Çiftci, 2006).

Bütün bunlarla birlikte allozim çalışmalarının bazı dezavantajları da söz konusudur. Yeni bir allel yalnızca nukleotid diziliminde meydana gelecek değişikliklerle birlikte oluşacak amino asit değişiklikleriyle molekülün elektroforetik hareketliliğindeki değişim yoluyla yeni bir allel polimorfik olarak tespit edilebilir. Yalnızca 64 kodonun 20 tane amino asiti kodlaması ve amino asitlerin her birinin değişimi elektrik yükünde değişiklik meydana getirmemesi ve yalnızca nükleotidlerin % 30'nun değişiminin ancak elektroforetik olarak tespit edilmesi sınırlayıcı etkenlerdendir. Teorik olarak DNA ile yapılan çalışmalar proteine göre daha polimorfiktirler. Allozim elektroforezlerinin kullanımı genomun yalnız belirli bir kısmındaki değişikliklerini belirlemekle sınırlıdır. Kullanılan doku tipleri (Kas, ciğer, göz, kalp gibi) genellikle örnek toplarken canlının öldürülmesini gerektirmektedir. Ayrıca örneklerin saklanması bir aya kadar -20 °C'de, daha uzun süreler için -70 °C'de olmalıdır (Çiftci, 2006).

1.7.2. DNA belirteçleri ve gelişimi

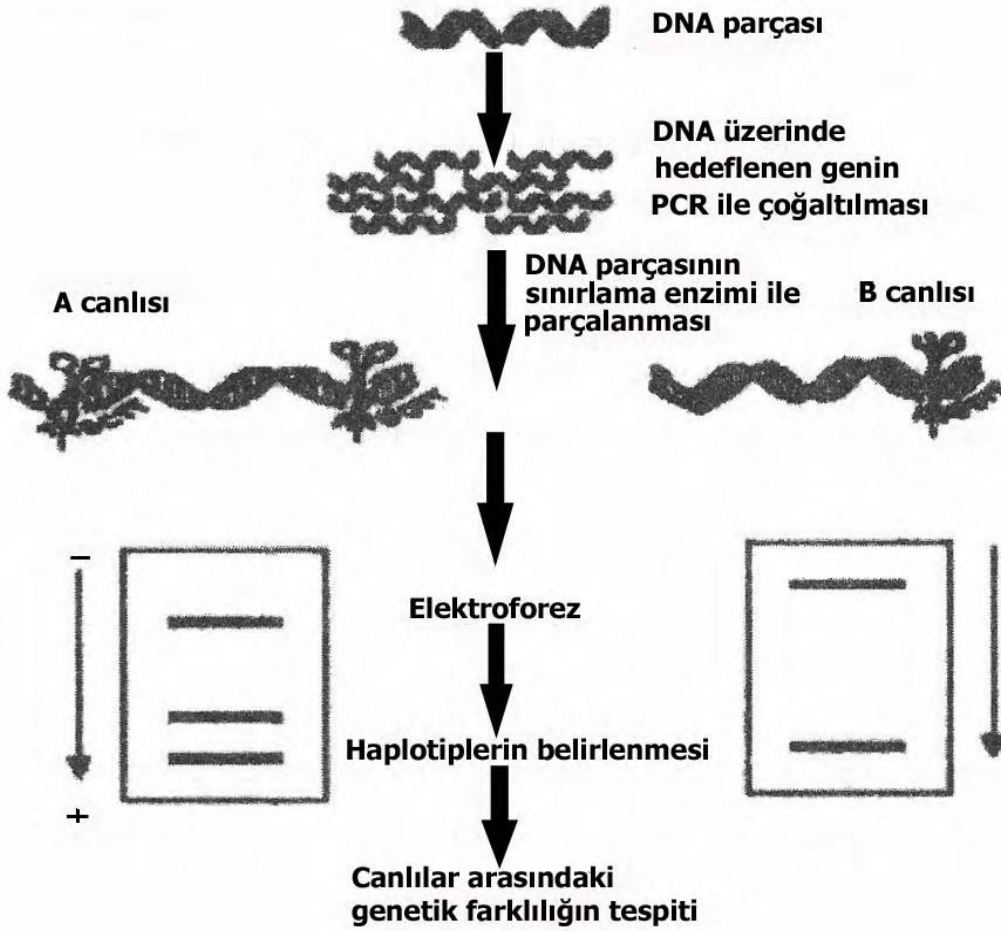
Son zamanlarda moleküler biyolojideki yeni tekniklerin gelişimi DNA'daki varyasyonun incelenmesini mümkün kılmaktadır. Genomun bir parçası olan kodlanmayan kısımlardaki varyasyonun doğrudan incelenmesiyle, tüm baz değişiklikleri tespit edilebilir. DNA elementleri genel olarak farklı oranlarda evrimleştiğinden (örnek olarak

mitokondriyal genler yapısal nükleer genlere oranla daha hızlı evrimleşmektedir ve ayrıca tekrar gösteren DNA tekrar göstermeyenlere göre daha hızlı değişim gösterir), ya filogenetik ya da populasyon seviyesi araştırmalar için uygun belirteç seçimi mümkündür. İsoenzim çalışmaları için gerekli dokunun alınmasında canlının öldürülmesi gerekmektedir. Özellikle yok olma tehdidi altındaki türlerle yapılan çalışmalarda bu durum bu yöntemi sınırlamaktadır. Bunun aksine DNA, canlıyı öldürmeksizin alınan küçük parça dokudan elde edilebilir. Ayrıca DNA uzun süreli saklamaya uygundur ve hatta uzun süredir fikse edilmiş dokulardan da elde edilebilir (Çiftçi, 2006). DNA belirteçleri tarihi gelişimlerine göre ele alınırsa;

1.7.2.1. RFLP: Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi

Kesilmiş (restriksiyon) Parça Uzunluk Polimorfizmi tekniği geniş ölçüde türler ve populasyonlarının genetik yapılarının belirlenmesinde ve morfolojik olarak benzer özelliklere sahip türlerin ayrılmasında en çok başvurulan tekniklerden biridir. Ayrıca bu teknik türler arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kesici enzimlerin 1960 ve 1970’li yılların başında tanımlanması DNA’nın kullanımını mümkün kılan anahtar keşif olmuştur. Çoğu bakteri türünde kesici-modifikasyon sistemleri bulunmaktadır ve hücre içine yabancı DNA’ların girişine karşı savunma mekanizması oluşturur. Bunlar iki bileşene sahiptir; ilki kesici endonükleaz olup, kısa ve simetrik DNA nükleotit dizilimini tanırlar ve DNA’nın ikili iplikçliğini tanıdıkları bölgeden keserler (hidrolize ederler). Böylece yabancı DNA nispeten küçük parçacıklara ayrılır. Sistemin ikinci bileşeni “metilaz”dır ki bu da hücresel DNA’nın tanınan bölgesinde bulunan C ve A nükleotitlerine metil grubunu ilave eder. Bu modifikasyon, endonükleaz enzimlerine karşı DNA’nın direnç göstermesine yardımcı olur. Çoğu DNA genetik analizinin ana ilkesi değişik fragment parçaları vermesi için DNA’nın enzimler yardımıyla kesilmesine dayanmıştır. Kesici enzimler genellikle 4-6 bp’den oluşan spesifik olarak tanıdığı yerlerden DNA’yı keser. Örneğin; KpnI enziminin tanıma dizisi, GGTAC[^]C’dir ve DNA üzerinde aynı dizilerin olduğu bir DNA zincirine rastlandığında ok işaretinin olduğu bölgeden DNA’yı keser. Enzim muamelesi sonucu oluşan parçalar, Jel elektroforezi yoluyla jel üzerinde birbirinden ayrıştırılabilir. Sonrasında karakteristik yapılar ethidium bromid boyama yoluyla, parçacıkların uç kısımlarının florasen veya radyoaktif olarak boyanması veya ilgilenilen DNA sekansının radyoaktif olarak işaretlenmiş prob hibridizasyonu yoluyla görüntülemek mümkündür. Bu parçalar

arasındaki fark, yer değiştirme veya mutasyon sonucu, DNA üzerinde tanınma bölgesinin kazanılması veya kaybedilmesi sonucudur (Turan, 2002). RFLP tekniği ile canlılar arasındaki genetik farklılığın tespiti Şekil 5'te Őematik olarak gösterilmiştir. Çoğu RFLP alışması mitokondri veya kloroplast gibi ekstra nükleer organel DNA'sını kullanır.



Şekil 5. RFLP tekniği ile canlılar arasındaki genetik farklılığın tespiti (Turan, 2002).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğinin gelişimi mtDNA RFLP analiz yönteminin kullanım alanını genişletmiştir. Bazların kısa dizilimlerinden oluşan primerler arttırılmak istenen DNA bölgesinin iki ucundaki dizilere homolog olarak dizayn edilir. Genomik DNA denatürasyona tabi tutulur ve primerler istenilen bölgenin kopyasını çıkarmak üzere tanıdığı bölgelere ilişir. Tek iplikekli DNA'nın polimerizasyonunu sağlayacak enzimin ortamda bulunmasıyla genomik DNA'da istenilen bölge üzerinde primer sekansı uzamaya başlar, böylece istenilen bölgenin kopya sayısı ikiye katlanmış olur. Boyama yöntemiyle direk olarak görüntülemeye yetecek DNA elde edilene kadar bu döngüler katlanarak devam ettirilir. Farklı türlerden çıkarılmış veya birbirinden uzak

türlerde bile çalışan universal PZR primerlerinin kullanımı, çalışılacak tür için yeniden primer dizayn edilmesi işlemini ortadan kaldırır. Örnek olarak korunmuş mtDNA bölgesini arttıran primerler memeliler, kuşlar, sürüngenler, böcekler ve salmonidler gibi balıkların benzer bölgelerini başarılı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur (Kocher ve ark., 1989). Çalışılacak bölgenin küçük olmasından dolayı bu teknik parçalanmış DNA'lar üzerinde de kullanıma uygundur. Uzun süreden beri saklanan örnekler üzerinde de istenilen mtDNA bölgesi başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Populasyon genetiği çalışmalarında mtDNA'yı çok bilgi verici yapan karakteristikler, aynı zamanda onun kullanılabilirliğini de sınırlar. Düşük seviyede değişkenlik gösteren nükleer genlerin görüntülenmesi evolüsyonun yavaş olan hızına karşı gelebilir. Familyaya has gerçekleşen özel ölüm durumu, tüm populasyonda oransız olarak çeşitliliğin büyük oranda azalmasına neden olabilir.

1.7.2.2. RAPD: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

Adından da anlaşılacağı gibi bu metot bilinmeyen DNA parçalarının PZR ile çoğaltılması ile ilgilidir. Ayrıca AP-PZR (Arbitrarily Primed Polymerase Zincir Reaksiyon) ve DAF (DNA Amplification Fingerprinting) gibi iki metot daha bulunmaktadır. Gerçekte bu üç metot çalışma prensibi olarak aynı ve birbirlerinin varyasyonlarıdır. Bu metotların üçünde de temel prensip PZR'nin tek primerle kullanımına dayanır. RAPDs ve AP-PZR arasındaki temel fark PZR amplifikasyonunda kullanılan primerin nükleotit uzunluğudur. AP-PZR tekniğinde 15-25 bp'lik primer kullanılırken RAPDs de 10-12 bp'lik primerler kullanılır. DAF tekniğinde ise 5-10 bp'lik primer kullanılır ve diğerlerine göre daha fazla DNA parçasının amplifikasyonu sağlanır. AP-PZR ayrıca PZR kondisyonu bakımından da diğerlerinden farklılık gösterir. Kullanılan bu teknikler basit ve ucuz oldukları için çok tercih edilmektedirler ve çoğunlukla taksonomik çalışmalarda, gen akışının analizinde, hibrit çalışmalarında ve karışık genom örneklerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kısa primerlerin ve düşük "annealing" sıcaklıklarının kullanımı genom içine tesadüfi dağılmış çeşitli kısımların fazla miktarda amplifikasyonunu sağlar. Fertler arasındaki nükleotit dizilimi farkından oluşan polimorfizm, RAPD bantlarının olup olmayışlarına göre belirlenir. RAPDs dominant genetik belirteç olarak kabul edilir ve gen haritası çıkarılması çalışmalarında bu hesaba katılır. Bu üç teknik için asıl sorun oluşan bant yapısının kullanılan DNA'nın kalitesine, PZR sıcaklık profiline ve reaksiyon kondisyonuna bağlı olarak hassasiyet göstermesidir. Hatta bazı araştırmacılara göre RAPD parmakizi yapısının, kullanılan polimeraz enziminin tipine göre de farklılık gösterdiği

rapor edilmiştir. Yukarıda sözü edilen parametrelerin hepsi kontrol altına alınsa bile bu teknikler için bir diğer dezavantaj homozigotluk ve heterozigotluğun tespit edilememesidir. Son olarak RAPD'lerin mutasyon oranı hakkında şu ana kadar herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (Çiftci, 2006).

1.7.2.3. Satelit DNA belirteçleri

Çok hücrelilerde sıralı tekrar gösteren nukleotid dizilimlerinin bulunduğu 1968 yılında yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu nukleotit dizilimleri kompleks ökaryotik genomunun sezyum klorür santrifüjü ile belirlenmiş ve orijinal olarak satelit bantlar diye tanımlanmışlardır. Bu şekilde yapılan bir santrifüj işleminden sonra DNA'nın G-C içeriğine bağlı olarak genomik DNA bu şekilde bir yapı göstermektedir. Satelit DNA'ların analizi sonucunda bunların çoğunlukla sıralı tekrar eden nukleotit dizilimlerinden meydana geldiği ortaya konulmuştur (Çiftci, 2006).

Satellitler minisatellit ve mikrosatellit olarak ikiye ayrılırlar. Minisatellitlerin oluşturduğu tekrar dizilimleri genellikle 9-64 bp'lik motiflerden oluşmakta ve 0.1 ile 7 kb'a kadar ulaşabilmektedir. Bunlar ayrıca VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) olarak da bilinmektedir. Mikrosatellitler ise genellikle 100-200 bp'e ulaşan kısa yapılara sahiptir. Tekrar motifleri ise ikili, üçlü, dördü veya beşli şekilde olabilir ((CA)_n veya (AGC)_n gibi) (Çiftci, 2006).

1.7.2.4. Minisatellit DNA belirteçleri

Nükleer genomda aşırı farklılık gösteren minisatellit lokusların ortaya çıkarılması genetik belirteç sistemler içersinde yeni değişikliklere neden olmuştur. Kodlama yapmayan bölgelerin farklılıklarının gözlenmesi yalnızca populasyon ve filogenetik çalışmaları değil, ayrıca doğal populasyondaki familyaları, akrabalık derecelerini ve fertlerin pozitif olarak tanınmasını da mümkün kılmıştır. Minisatellit veya VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) lokusları birkaç yüz tekrara kadar ulaşan kısa nukleotid dizilimlerine (9-64) sahiptir. Minisatellit DNA'nın genom içindeki varlığı 1980'li yılların başından beri bilinmekle birlikte, bu yalnızca insan minisatellit probunun izolasyonu ile gerçekleşmiştir (Jeffreys ve ark., 1985). Multi lokus probolar birden fazla lokusta bulunan sıralı tekrar içeren nukleotid dizilimlerinin merkezinin hibridizasyonunda kullanılmaktadır. Tekrar sayılarındaki farklılıkların eşit olmayan kromatid değişikliğinden ve replikasyon sırasında DNA kaymasından meydana geldiği düşünülmektedir (Jeffreys ve ark., 1990). Düşük iyon

konsantrasyon şartlarında proplar istenilen nükleotit dizilimlerinin bulunduğu çok fazla sayıda lokusa hibridize olur ve DNA parmakizini oluşturur (Çiftci, 2006). En iyi bilinen insan minisatellit propları 33.6 ve 33.15, ökaryotların çoğunun DNA'sını hibridize ettiği tespit edilmiştir. Bunlar ve bunun gibi multilokus proplar (MLP) geniş bir alana yayılmış şekilde bitki, kuş ve hayvan türlerinde popülasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Burke ve Bruford, 1987; Hanotte ve ark., 1991; Hauser ve ark., 1992). Polimorfizm, çalışılan bölgelerde tekrar gösteren nükleotit diziliminin sayısında meydana gelen, eşit olmayan parça değişiminden ve DNA replikasyonu sırasında DNA kaymasından dolayı olur. Multilokus polimorfik belirteçler genetik çalışmalarda geniş bir yere sahip olmalarına rağmen çok fazla sayıda bant oluşması nedeniyle heterozigotluğun veya homozigotluğun tespitinin mümkün olmaması ve aynı lokustan gelen bantların veya farklı lokuslardan benzer büyüklükteki DNA parçalarının jel üzerinde aynı şekilde yer değiştirmesi genetik hesaplamalarda belirsizlikler yaratır, böylece allel ve genotip frekansları hesaplanamamaktadır. Bu mevcut istatistiki analizlerin kullanımını olanaksız kılmaktadır (Lynch, 1991). Tek lokus parmakizi veya profil çıkarma yöntemi bu problemlerin üstesinden gelmektedir ve potansiyel olarak popülasyon genetiği çalışmaları için çok uygundur. Eş zamanlı olarak çok fazla lokusun merkez sekansının hibridize edilmesinin dışında yüksek iyon konsantrasyon şartlarında, lokus spesifik proplar tek lokus veya minisatellit bölgenin tekrar göstermeyen uç kısımlarına hibridize olurlar. Bireyler aynı miktarda sıralı tekrar ile ya homozigottur ya da farklı sayıda sıralı tekrar ile iki farklı bant üreterek heterozigot olurlar (Çiftci, 2006). Multilokus DNA parmakizi problemlerinin aksine tek lokus probu yeter miktarda sekans benzerliğine sahip olabilmek için yakın ilişkili organizmadan veya çalışılan türün kendisinden izole edilmelidir (Wong ve ark., 1987). Bu türden genomik kütüphane oluşturulmasını ve klondan uygun probun izolasyonunu gerektirir. Bu uzun süreli protokol başlangıçta insan üzerine yapılan çalışmalarla sınırlıydı. Fakat son zamanlarda yaşanan moleküler protokollerdeki gelişmeler diğer canlılar üzerinde de bu çalışmaları mümkün kılmıştır ve tek lokus minisatellit lokus varyasyonu bir çok türde çalışılmıştır (Bruford ve Burke, 1991; Gilbert ve ark., 1991; May ve ark., 1993). Tek lokus minisatellit verileri izozim verilerinde olduğu gibi aynı yolla değerlendirilebilir ve gen akışı, genetik mesafe ve heterozigotluğun ölçülmesi gibi işlemler yapılabilir. Son zamanlarda rapor edilen çoğu çalışmadan minisatellit lokusta çok fazla sayıda 20 veya üzeri allel gözlenmiştir. Popülasyon çalışmaları için tek lokus minisatellitlerinin nötr genetik belirteç olarak kullanımlarına ilaveten, akrabalık derecesinin belirlenmesi

çalışmalarında ve birey tanımlanmasında tek lokus minisatellit kombinasyonlarının kullanılması mümkündür (Çiftci, 2006).

DNA parmakizi çalışmalarından elde edilen sonuçlar izozim çalışmalarından elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Parmakizi sonuçlarından elde edilen genetik uzaklık değeri (Nei, 1972) izozim çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre daha büyük olmasına rağmen, morflar arası gen akışının ölçümü karşılaştırılabilir (Çiftci, 2006).

1.7.2.5. Mikrosatellit DNA belirteçleri

Mikrosatellitler ökaryotik genoma geniş bir şekilde yayılmış ve bol olarak bulunurlar fakat bunun aksine minisatellitler, kromozomların telomerik ve sentromerik bölgelerinde toplanma eğilimindedirler. Bu bilgilerin ışığı altında, mikrosatellit DNA çok farklı şekillerde isimlendirilmiştir: STRs (Simple Sequence, Short Tandem Repeats), SSRs (Simple Sequence Repeats). Bunların hepsi mikrosatellit terimine ek olarak yaygın kullanılan isimlendirmelerdir. Ayrıca SSLPs (Single Sequence Length Polymorphism) mini ve mikrosatellit lokuslar için birlikte kullanılmaktadır (Çiftci, 2006). Mikrosatellitler çalışılan çoğu lokusta tekrar bölgesinin sayısında çok farklılıklar göstermesinden dolayı genetiğin birçok alanında moleküler belirteç olarak önem arz etmektedir. Bu güne kadar mikrosatellit varyasyonunun en gelişmiş çalışmaları lokusun tipi ve bilgilendirme derecesi, nükleotit diziliminin boyu ve tekrarlanan nükleotitler arası ilişkilerin araştırılması ile yapılmaktadır. Mikrosatellitler, kusursuz, kusurlu ve bileşik motif olarak üç gruba ayrılmışlardır. Burada mikrosatellitin nükleotit diziliminde ana motifi bozan nükleotitlerin bulunması onun kusurlu dizilim gösterdiği anlamındadır. Ayrıca eğer birbiriyle bitişik iki farklı motif bulunuyorsa bu da bileşik motif olarak isimlendirilir. Bu tekrarlar arasında her türlü kombinasyon mümkündür. Ana motif içerisinde meydana gelen bozukluklar tekrar sıralarını korumaktadırlar ve kusursuz motiflere göre bu şekildeki bozuk motifler daha az varyasyon gösterir. Ayrıca uzun tekrarların daha polimorfik olmaları beklenir (Çiftci, 2006). Mikrosatellit tekrarların bulunduğu genom bölgelerindeki genetik varyasyonlar genellikle DNA kayması sonucunda meydana gelir.

Mikrosatellit lokuslardaki mutasyonların, DNA replikasyonu sırasında, tekrarın bulunduğu kısımda yanlış eşleşme veya bir tekrarın atlanması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir. Diğer bir deyişle replikasyon sırasında DNA'nın iki iplikçisindeki tekrar kısmı beklenmedik bir eşleme yapabilir ve daha sonra bunun tamiri mikrosatellit lokusun uzaması veya kısılması ile sonuçlanır. En yaygın değişim yalnızca tek bir tekrar ünitesinin

kaybı veya fazladan oluşması ile olur. Populasyon içi varyasyonun belirlenmesinde en önemli unsur mutasyon oranıdır. Bu oranın mikrosatellit lokuslarda 10^{-3} ile 10^{-4} arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Goldstein ve ark., 1995). Tekrar bölgelerinin her iki tarafında bulunan bölgeler flanking (uç) bölgesi olarak isimlendirilir ve buralarda meydana gelecek mutasyonlar çok önemlidir. Çünkü buralar primerlerin bağlanma noktalarıdır ve null allel oluşumuna neden olur. Null alleller allozim ve minisatellit çalışmalarında çok iyi bilinmesine rağmen mikrosatellit lokuslarda da görülmektedir. Primer bölgelerinde meydana gelen nükleotit eklenmeleri veya çıkmaları (insertion ve deletion) mikrosatellit allellerin amplifike olmamasına neden olacaktır. Birçok canlı ve bitki türünde (pirinç, tavşan, fare, arı ve kuş gibi) yapılan çalışmalarda mikrosatellitlerin yüksek seviyeli polimorfizm gösterdiği rapor edilmiştir (Çiftci, 2006). Mikrosatellit lokuslar kodominant belirteçlerdir, yani heterozigotlar homozigotlardan ayırt edilebilir ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon) kullanımı ve allellerin jel üzerine seperasyonunun yapılmasıyla tüm genetik bilgilere ulaşmak mümkündür. Mikrosatellitler ayrıca evolüsyonla ilgili çalışmalarda, kriminolojik çalışmalarda, fertlerin akrabalık seviyelerinin ve ana ve babalarının belirlenmesinde, genomdaki genlerin haritalarının çıkarılmasında, populasyonun genetik parametrelerinin (gen akışı ve etkili populasyon büyüklüğü gibi) tahmini ve populasyon farklılıklarının belirlenmesi gibi çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Queller ve ark., 1993). Bunun nedeni mikrosatellitlerin genomda yoğun bir şekilde dağılmış olmaları ve işlemlerinin kolay ve otomatik bir şekilde yapılabilmesidir. Canlıların genomunda yoğun olarak bulunan mikrosatellitlerin, son yapılan çalışmalara göre türlere bağlı olarak farklı frekanslarda farklı motiflere sahip oldukları tespit edilmiştir. İki nükleotitli tekrarlar dikkate alındığında (CA/GT)_n nükleotit tekrarı memelilerin genomunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu tip tekrar memeli genomunda her bir 50-150 kb'de bir olmaktadır.

Son zamanlarda bilim adamları üç nükleotitli mikrosatellitler üzerine yoğunlaşmıştır çünkü üçlü nükleotit dizilimlerin insanlarda görülen hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Örnek olarak Fragile X, Myotonic Dystrophy ve Huntington Chorea hastalıklarının temel nedeni üç nükleotitli mikrosatellitlerdir. Üçlü nükleotitler hastalıkla bağıntılı olarak büyük bir uzunluğa ulaşmasına rağmen ikili nükleotitler kadar da polimorfiktirler. Mikrosatellitler farklı genetik çalışmaları için çok güçlü tek lokus genetik belirteç olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, allellerin PZR amplifikasyonu için türe has primer geliştirilmesi çok pahalı çalışmalar gerektirmektedir. Bir diğer önemli dezavantaj

ise alleller denatüre olmuş poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırıldığı zaman genellikle merdiven veya gölge şeklinde bantlar oluşturmaktadırlar. Bu istenmeyen bantların, amplifikasyon ürünlerinin denatürasyonunun tamamlanmamış olmasından veya PZR aşamasında oluşan yanlış eşleşmelerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu durum allellerin okunması esnasında genellikle problem yaratmaktadır. Fakat bunun yanında üç veya dört nükleotitli mikrosatellitlerde bu durum pek görülmez. Son dezavantaj ise önceden de bahsedildiği gibi null allellerin oluşmasıdır (Çiftci, 2006).

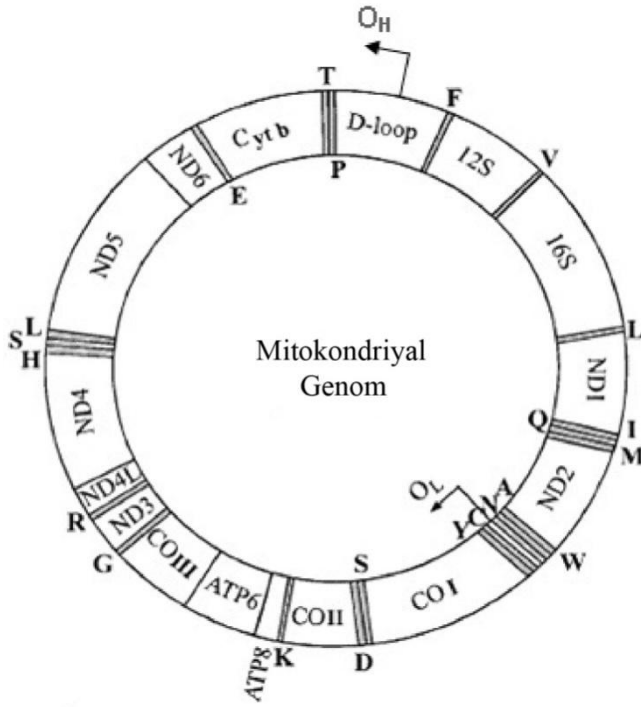
1.7.2.6. SNP: Tek Nükleotit Polimorfizmi

Son yıllardaki DNA dizileme tekniğindeki gelişimler DNA dizi analizini popülasyonların filogenetik geçmişlerinin çıkarılmasında önemli yaklaşımlar arasına sokmuştur (Hillis ve ark., 1990). Bu tekniğin ana cazibesi canlıların çözümlenmiş temel birimi olan nükleotitleri içermesidir. Filogenetik ve sistematik çalışmalarda nükleotit dizilerinin kullanımı homolog dizilerin karşılaştırılmasını mümkün kılar. Nükleik asit dizi bilgileri artarak düzenli bir şekilde çeşitli bilgi bankalarında (Genbank, Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı) toplanmaktadır. Fakat toplanan bu sekans çalışmalarının çoğu tıbbi veya ticari olarak önemli türler üzerine yapılmaktadır. Böylece üzerinde çalışılan organizmalar için karşılaştırma amaçlı bu dizi bilgilerine ulaşmak mümkündür ve teknik bilgi gerektiren sekans çalışmaları için fazladan zaman ve para harcamaya gerek yoktur. Çok fazla örnek gerektiren coğrafik varyasyon, üreme stratejisi, heterozigotluk tahmini ve hibriditasyon gibi çalışmalar için dizi analizi dışındaki diğer metotlar tercih edilir. DNA sekansının kullanımındaki sınırlama yalnız başına sekans değildir. Dizi analizi yapılacak gen bölgesinin de buna ilave edilmesi gerekir. Geçmişte bu işlem gen klonlama aşamasını gerektirmekteydi. Bunun yanında PZR tekniğindeki son gelişimler rekombinant DNA teknolojisine gerek kalmadan spesifik gen bölgesinin yükseltgenmesini mümkün kılmıştır. Başlangıç araştırmaları nispeten küçük ve yoğun olarak çalışılan mitokondriyal genomun elde edilmesi ve dizisinin alınması üzerine yoğunluk kazanmıştır. Çok fazla sayıda laboratuvarın nükleotit dizi bilgisi toplaması ve metotdaki otomasyonla birlikte yaşanan devamlı gelişmeler bu teknolojiyi rutin hale getirmiştir (Hillis ve ark., 1990)

1.8. Mitokondriyal DNA

Çoğu kez hücrenin güç santrali olarak düşünülen mitokondriler, solunum olarak bilinen kimyasal tepkimelerin meydana geldiği bölgelerdir. Mitokondri hücre solunumu ve diğer fonksiyonlar için hayati olan genleri içeren kendi DNA'sına sahiptir. Hücrenin DNA'sından fiziksel olarak ayrılmıştır. Yani nükleusun dışında bulunur. Populasyon çalışmalarında mtDNA'nın tercih edilmesi için çok sayıda faktör bulunmaktadır. Ufak bir moleküldür, yaklaşık olarak 16-17 kb büyüklüğündedir ve genomun %1'den daha küçük olduğu hesaplanmıştır (Davidson ve ark., 1989) ve saf olarak izole edilmesi nispeten kolaydır. Yüksek omurgalılarda, kalıtım yalnızca maternal yolla yani anneden olur (parental sızıntı veya uzunluk farklılıklarından dolayı bazı türlerde nadiren heteroplazmi olabilir). Rekombinasyonun olmaması filogenetik çalışmalar için (Avisé ve ark., 1990; Harrison, 1989; Moritz ve ark., 1987), veya ortama aşıl原因an populasyonların etkisinin ortaya çıkarılması için (Ferris ve Berg, 1987; Gyllensten, 1985) mtDNA'yı önemli kılmaktadır. Cinsiyet oranını eşit kabul edildiğinde etkili populasyon büyüklüğü nükleer genlerin 1/4'üdür ve bu durum mtDNA varyasyonunu, yakın zamanlardaki populasyon olayları ve genetik varyasyondaki azalma gibi olaylara karşı hassas kılar. Populasyonlar arası mitokondriyal farklılığın ölçümü yalnızca etkili dişi bireylerin gen akışının ölçümünü sağlar. Göç eden erkek bireylerin populasyonların mitokondriyal gen havuzuna katkısı olmaz.

Baz değişiminin yüksek seviyede olmasından dolayı mitokondriyal genom, kodlanan nükleer DNA ile karşılaştırıldığında yüksek evölüsyon oranına sahiptir (Meyer, 1993). Mitokondriyal genomun farklı bölgeleri farklı oranda değişim gösterdiğinden, çalışma tipine bağlı olarak analiz için diziyeye hedeflenmek mümkündür. Örnek olarak, birkaç türde ND ve sitokrom b protein kodlayan genlerde populasyonlar arası varyasyon bulunmuştur (Park ve Moran, 1994). Kerevitlerde ise sitokrom oksidaz geni varyasyonun tespitinde kullanılmıştır (Trontelj ve ark., 2005). Mitokondriyal RNA genleri transfer ve ribozomal olmak üzere yüksek oranda farklılık gösterdiği bulunmuştur ve kendi nükleer eşlerinden 100 kat daha hızlı evrimleşirler (Meyer, 1993).



Şekil 6. Hayvan Mitokondriyal Genomu (Wilhelm ve ark., 2003)

Hayvan mtDNA'sı 22 tRNA, 2 rRNA, 13 elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan ve 13 mRNA'yı kodlayan toplam 37 genden oluşan kapalı halkasal bir moleküldür (Wallace, 1986); (Şekil 6). Yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan kontrol bölgesi replikasyonun başladığı bölgedir. Mitokondriyal DNA'da genlerin düzeni genellikle sabittir; ancak gen organizasyonu bazı hayvan taksonlarını ayırabilir (Desjardins ve Morais, 1990).

Nükleer genomun aksine, hayvanların mitokondriyal genomu çok etkindir. Nadiren dublikasyon veya kodlanmayan sekans içerirler. Mitokondriyal protein kodlayan genler intron içermez ve genler genellikle 10 bazdan daha az olarak ayrışır. İki gen, aralarında genler arası ayırıcı bulunmadan bitişik olabilir ve bazı durumlarda bir kaç baz üst üste çıkışabilir. Transfer RNA genleri ve protein kodlayan genler önemli derecede çakışabilir (Clary ve Wolstenholme, 1985).

Farklı mtDNA genleri, farklı oranlarda evrimleştikleri için, genellikle yapılan çalışmaya ve türe uygun mtDNA geni seçilmektedir. Tatlı su ıstakozları için düşünülecek olursa, sitokrom oksidaz (Trontelj ve ark, 2005; Soroka, 2008), 12S ve 16S (Largiadér ve ark., 2000; Grandjean ve ark., 2000, 2002) genleri kullanılmıştır. Mitokondriyal DNA genleri birçok tür ve populasyon çalışmaları için incelenmiş ve bu genlerin tür ve

populasyonlar arasındaki farklılıkların tespitinde oldukça başarılı sonuçlar verdikleri rapor edilmiştir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Türkiye’de dağılım gösteren kerevit türlerinin farklılıklarının moleküler olarak belirlenmesinin yanında bu güne kadar morfolojik veya biyo-ekolojik özellikleri göz önüne alınarak tanımlanan tür veya alt türlerin ayırımında kullanılabilecek moleküler bir belirtecin ortaya çıkarılmaya amaçlanmıştır.

1.10. Önceki Çalışmalar

Ülkemizde dağılım gösteren tatlı su ıstakozları hakkında ülkemizde yapılmış genetik çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmalar genellikle morfolojik, meristik, ekolojik veya diagnostik karakterlere dayanmaktadır. Bununla birlikte dünya genelinde yapılan bilimsel çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Soroka, (2008) PZR-RFLP metodunu kullanarak, *Astacus astacus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus* ve *Astacus leptodactylus* türlerine ait 4 kerevit taksonunu birbirinden moleküler olarak ayırmıştır. Mitokondriyal DNA’daki sitokrom oksidaz geninin 730 bp’lik kısmı çoğaltıldıktan sonra 5 adet restriksiyon endonükleaz enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş ve bu enzimlerden biri olan AluI enzimi ile 4 türde de farklı kesim noktası tespit edilmiş ve 4 farklı morf gözlenmiştir.

Trontelj ve ark., (2005) mitokondriyal sitokrom oksidaz geninin dizi analizi aracılığıyla tüm Avrupa’daki Austropotamobius cinsine ait türlerin filogenetik ve filocoğrafik ilişkilerini ortaya koymuştur. En yaygın iki tür olan *Austropotamobius pallipes* ve *Austropotamobius torrentium*’un monofiletik ve benzer genetik çeşitlilik değerine sahip olduğu belirlenmiştir. *Austropotamobius pallipes* en yüksek çeşitlilik değerine muhtemelen yayılımının birincil merkezini oluşturan İstra bölgesinde ulaşmıştır. *Austropotamobius torrentium* için genetik çeşitlilik merkezi Balkan Yarımadası olarak belirlenmiştir. Yayılımının üç ana periyodu belirlenmiştir. Ana soygruplarının ve türlerin çeşitliliği için geç Miocene/erken Pliocene, Aplerin güneyindeki populasyonlar içindeki çeşitlilik için Pleistocene ve Kuzey ve Batı Alplerden genişlemesi için ise Geç Pleistocene olarak ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca Türkiye’den *Austropotamobius torrentium* türüne ait bireyler ilk defa kayıt altına alınmıştır.

Largiadér ve ark., (2000) genetik olarak farklı 5 *Austropotamobius pallipes* grubunun mitokondriyal 16S ve 12S genlerinin PZR-RFLP ve sekans analizinin yanı sıra nükleer allozim belirteçlerinin birleşik analizini yapmıştır. Lineageler içinde düşük seviyede varyasyon belirlenmiştir. Bazı popülasyonlarda bu iki belirtecin kombinasyonu doğal ve yapay orjinlerinin yakınlıkları hakkında ek bilgiler vermiştir. *Austropotamobius pallipes* ve *Austropotamobius berndhauseri* arasında Geneva gölü bölgesinde hibrit zon belirlenmiştir. Beş evrimsel soyun mozaik dağılımı yerel popülasyonlar seviyesinde koruma faaliyetlerinin gerçekleştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

Gouin ve ark., (2003) İrlanda' daki *Austropotamobius pallipes* türünün orjinini ve kolonizasyonunu belirlemek için mtDNA RFLP ve RAPD yöntemini kullanmıştır. İki belirtecin kombinasyonu yapılmıştır. Tüm mitokondriyal DNA kullanılarak yapılan RFLP analizinde, İrlanda popülasyonları içinde ve arasında bir polimorfizmin olmadığı belirlenmiştir. İrlanda RFLP haplotipleri Batı Fransa popülasyonlarıyla aynı olmasına karşın, İngiliz popülasyonlarından farklılık göstermektedir. Bu sonuç insan aracılığıyla Batı Fransa popülasyonlarından İrlandaya kerevit getirilmesiyle açıklanabilir. RAPD analizi İrlanda popülasyonları içinde güneyden kuzeye doğru genetik çeşitlilikte azalma göstermektedir.

Crandall ve ark., (2000) dünya üzerindeki 520'den fazla türü olduğu bilinen tatlı kerevit familyalarının filogenetik durumunu ortaya koymak amacıyla nükleer 18S, 28S ve mitokondriyal 16S genlerinin dizi analizini yapmıştır. Sonuç olarak kerevitlerin monofiletik olduğu ve kerevitlerle pençeli istakozlar arasında kardeş grup ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Astacoidea ve Parastacoidea süperfamilyalarının da monofiletik olduğu ortaya konmuştur.

Grandjean ve ark., (1997) İngiltere ve Galler'de koruma programları başlamadan önce türü tehlike altında olan *Austropotamobius pallipes pallipes* popülasyonları hakkında bilgi edinmek için mtDNA RFLP metodunu kullanmıştır. Araştırmada kullanılan 12 restriksiyon endonükleaz enzimi İngiltere popülasyonlarında 3 haplotip ortaya çıkarmıştır. Coğrafik olarak uzak popülasyonlar arasında düşük genetik varyasyon belirlenmiştir. Üstelik İngiliz popülasyonlarında bulunan en yaygın haplotipe benzer bir haplotip Fransız popülasyonları için de belirlenmiştir. Buna ilaveten İngiliz popülasyonunda nadir bulunan haplotiplerden birisi Fransız popülasyonları için yaygın olduğu ortaya konmuştur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Örneklerin Toplanması

Örneklemeler Türkiye’de dağılım gösteren kerevit türleri ve alt türlerini temsil edecek şekilde yapılmıştır. *Astacus leptodactylus leptodactylus* alt türünün mevcut olduğu iki farklı popülasyondan, *Astacus leptodactylus salinus* alt türünün bulunduğu iki popülasyondan ve *Austropotamobius torrentium* türüne ait bir lokasyondan örneklemeler yapılmıştır. Örneklemeler *Astacus leptodactylus salinus* alt türüne ait bireylerin bulunduğu Manyas (Balıkesir) ve Eğirdir göllerinden (Isparta); *Astacus leptodactylus leptodactylus* türüne ait bireylerin bulunduğu İznik (Bursa) ve Terkos (İstanbul) göllerinden; *Austropotamobius torrentium* türüne ait bireyler ise Kırklareli sınırları içerisinde geçen Velika deresinden yapılmıştır (Şekil 7). Materyaller canlı ya da dondurulmuş halde ivedilikle laboratuvara intikal ettirilmiştir. Örnekler fikse edilinceye kadar -20 °C’de tutulmuşlardır. Materyallerden DNA izolasyonu yapmak amacıyla abdomen kısmından belli bir miktar kas dokusu makas ve pens aracılığıyla alınmış ve % 70’lik etanolde DNA izolasyonu yapılınca kadar saklanmıştır (Şekil 8).



Şekil 7. Örneklemeye yapılan bölgeler



Şekil 8. Kerevitlerin abdomeninden kas dokusunun alınması

2.2. DNA izolasyonu

Örneklerin genomik DNA izolasyonları %70'lik etanolde tutulan kerevitlerin kas dokusundan yapılmıştır. Toplam DNA izolasyonu Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kiti aracılığıyla yapılmıştır. İzolasyon protokolü üretici firma talimatlarına göre yapılmıştır. İzolasyon aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

1. Etanolde muhafaza edilmiş olan kas dokusundan 10-20 mg veya 1,5 cm³ kadar alınıp 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne konulmuştur.
2. Örnek başına 500 µl Nuclei Lizis solusyonu ve 120 µl EDTA (pH=8) solusyonu karıştırılıp buza konulmuş ve donma sınırına gelinceye kadar yaklaşık 15 dakika beklenmiştir.
3. Nuclei Lizis ve EDTA karışımından 600 µl alınıp örneklerin olduğu santrifüj tüpüne konulmuştur.
4. Tüpe 20 mg/ml konsantrasyonundaki Proteinaz K' dan 20 µl eklenmiştir.
5. Isıtmalı çalkalayıcı (Thermo shaker) cihazında 55 °C' de ve 550 rpm 'de doku tamamen parçalanıncaya kadar (yaklaşık 3 saat) inkübe edilmiştir.
6. 3 µl RNase solusyonu eklenip tüpün iyice karışması için 2-5 defa tersyüz edilip 15-30 dakika 37 °C 'de inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyondan sonra karışımın oda sıcaklığına inmesi için 5 dakika bekletilmiştir.
8. Oda sıcaklığındaki örneğe 200 µl protein presipitation solusyonu eklenip yüksek hızda 20 saniye vortekslendikten sonra 5 dakika için buza konulmuştur.

9. 4 dakika 16000 rpm' de santrifüj yapılmıştır. (Bu aşamada çökmüş protein küçük beyaz bir pellet halinde görünmektedir).
10. DNA içeren süpernatant dikkatlice alınarak 600 µl izopropanol konulmuş olan mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
11. DNA' nın beyaz iplikçikli yapısı görününceye kadar nazikçe tersyüz etmek suretiyle karıştırılmıştır.
12. 16000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra DNA küçük beyaz bir pellet olarak görünmektedir.
13. Süpernatant dikkatlice dökülerek 600 µl etanol eklenir. DNA'nın iyice yıkanması için tüp birkaç defa alt-üst edilmiştir.
14. 16000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir ve etanol mikropipet yardımıyla dikkatlice alınır. Etanolü tamamen ortamdan uzaklaştırmak için 37 °C deki etüve tüpler ters çevrili halde 10-20 dakika bekletilmiştir.
15. Etanol tamamen uzaklaştıktan sonra 100 µl DNA Rehidrasyon solusyonu eklenip 65 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır. Solusyonun iyice karışması için periyodik olarak tüp nazikçe çalkalanmıştır.
16. Kısa süreli muhafaza için 2-8 °C'de, uzun süreli muhafazada ise -20 °C'de tutulmuştur.

2.3. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

2.3.1. Agaroz jel elektroforezi ile toplam DNA'nın varlığının kontrolü

İzole edilen toplam genomik DNA % 0,8'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. % 0,8 agaroz jel elektroforezi hazırlamak için 0,56 g agaroz ve 70 ml 1X TAE tamponu erlenmayerde iyice karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Soğumaya başladıktan hemen sonra 3 µl EtBr (10 mg/ml) konulmuştur. Döküm sıcaklığına soğutulan agaroz elektroforez küveti içine dökülmüştür. Daha sonra taraklar yerleştirilerek soğumaya bırakılmıştır. Donduktan sonra jel üzerindeki taraklar çıkarılarak örnek yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Her bir kuyucuğa 7 µl örnek ve 1 µl yükleme tamponu konulmuş ve 90 V 'da 30 dakika yürütülmüştür.

2.3.2. Spektrofotometre ile DNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi

DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığının tahmini UV/visible spektrofotometre (BIO-RAD, The SmartSpec Plus) kullanılarak, 260 ve 280 nm dalga boyunda absorpsiyonunun okunmasıyla tahmin edilmiştir. 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon (OD) değeri nükleik asitlerin her ikisinin (DNA ve RNA) hesaplanmasını sağlar. 280 nm dalga boyu ise örnekteki protein miktarını belirler. 260 nm ve 280 nm okumaları arasındaki oran ile izole edilen nükleik asidin saflığı tahmin edilmiştir. Saf olan DNA için OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı 1,8–2,0 arasındadır. Eğer protein kontaminasyonu varsa bu oran 1,8'den küçüktür (Çiftçi, 2006).

Bu işlem için izole edilen DNA numuneleri 1:50 oranında sulandırılarak ölçüm yapılır. Örneklerin konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

DNA konsantrasyonu (µg/ml) = OD₂₆₀ x 50 (dilüsyon faktörü) x 50 µg/ml (çift iplikçikli DNA için dönüştürme faktörü)

OD₂₆₀ = 260 nm' deki absorpsiyon değeri

2.4. PZR Uygulamaları

Mitokondriyal genlerden biri olan sitokrom oksidaz (COI) geninin 1. alt ünitesinin 650-700 nükleotitlik kısmının Polimeraz Zincir Reaksiyonu vasıtasıyla amplifikasyonunu sağlamak amacıyla Folmer ve ark. (1994) tarafından dizayn edilen universal primerler kullanılmıştır. Kullanılmış olan primer çiftlerinin nükleotit dizisi Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. mtDNA sitokrom oksidaz geni universal primerleri

| | |
|---------|-----------------------------------|
| LCO1490 | 5'- GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3' |
| HCO2198 | 5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA- 3' |

Mitokondriyal DNA'nın sitokrom oksidaz geninin 1. alt ünitesinin çoğaltılması amacıyla PZR karışımında, Promega firmasının ürettiği GoTaq Flexi Taq DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır. PZR karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. PZR karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları ve miktarları

| Kimyasallar | Konsantrasyon | Miktarı (µl) |
|--------------------|----------------------|---------------------|
| 10X PZR tamponu | | 10 |
| dNTP karışımı | 10 mM | 2 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 5 |
| Primer Karışımı | 40 mM | 1 |
| Taq DNA polimeraz | 5 u/µl | 0,25 |
| Kalıp DNA | 50 mM (ng/ml) | 5 |
| dH ₂ O | | 26,75 |
| Toplam | | 50 |

Polimeraz Zincir Reaksiyonunu gerçekleştirmek için Techne marka gradient özellikli PZR cihazı kullanılmıştır. PZR optimizasyonunu sağlamak ve primerlerin yapışma sıcaklığını belirlemek için Tablo 5’de verilen gradient PZR döngü koşulları kullanılmıştır. Gradient PZR da 54 °C ve 15 gradientte (46-61 °C) kolonlardaki yapışma sıcaklıkları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 5. Gradient PZR döngü koşulları

| | Sıcaklık (°C) | Zaman | Döngü Sayısı |
|-------------|----------------------|--------------|---------------------|
| İlk Ayrılma | 94 | 3 dk | 1 |
| Ayrılma | 94 | 45 sn | |
| Yapışma | 46-61 | 45sn | 35 |
| Uzama | 72 | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 | 5 dk | 1 |
| | 4 | ∞ | |

Tablo 6. Gradient PZR’da 54 °C ve 15 gradientte kolonlardaki yapışma sıcaklıkları

| Kolon no | Sıcaklık (°C) |
|----------|---------------|
| 1 | 46,7 |
| 2 | 47,8 |
| 3 | 49,7 |
| 4 | 52,2 |
| 5 | 54,7 |
| 6 | 57,2 |
| 7 | 59,1 |
| 8 | 60,4 |

Gradient PZR sonuçları değerlendirilerek en iyi amplifikasyonun 2. ve 3. kolonlarda olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca dayanılarak primerlerin yapışma sıcaklığı 48 °C olarak kullanılmıştır.

Mitokondriyal DNA’nın sitokrom oksidaz geninin 1. alt ünitesinin yaklaşık 700 bp’lik kısmını çoğaltmak için gerekli olan yapışma sıcaklığı belirlendikten sonra Tablo 7’deki döngü koşulları kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. PZR döngü koşulları

| | Sıcaklık (°C) | Zaman | Döngü Sayısı |
|-------------|---------------|-------|--------------|
| İlk Ayrılma | 94 | 3 dk | 1 |
| Ayrılma | 94 | 45 sn | |
| Yapışma | 48 | 45 sn | 35 |
| Uzama | 72 | 1 dk | |
| Son Uzama | 72 | 5 dk | 1 |
| | 4 | ∞ | |

2.5. PZR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Kontrolü

PZR ürününün kontrolünde % 1’lik agaroz jelde 90 V 40 dk yürütülerek kontrol edilmiştir.

2.6. PZR-RFLP Uygulamaları

RFLP uygulamasında kullanılan kesim enzimleri, tanıma bölgeleri ve inkübasyon sıcaklıkları Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Kullanılan kesim enzimleri, tanıma bölgeleri ve inkübasyon sıcaklıkları

| Sıra No | Kesim Enzimi | Tanıma Bölgesi | İnkübasyon sıcaklığı (°C) |
|---------|--------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | FspBI | C [^] TAG | 37 |
| 2 | SspI | AAT [^] ATT | 37 |
| 3 | XbaI | T [^] CTAGA | 37 |
| 4 | TruI | T [^] TAA | 37 |
| 5 | TaqI | T [^] CGA | 65 |
| 6 | RsaI | GT [^] AC | 37 |
| 7 | HinI | G [^] ANTC | 37 |
| 8 | EcoRI | G [^] AATTC | 37 |
| 9 | BcnI | CC [^] SGG | 37 |
| 10 | BsuRI | G G [^] C C | 37 |
| 11 | Kpn I | GGTAC [^] C | 37 |
| 12 | Bam HI | G [^] GATCC | 37 |
| 13 | XhoI | C [^] TCGAG | 37 |
| 14 | Hind III | A [^] AGCTT | 37 |
| 15 | Mls I | TGG [^] CCA | 37 |
| 16 | XcmI | CCANNNNN [^] NNNNTGG | 37 |
| 17 | BsrGI | T [^] GTACA | 37 |
| 18 | NdeI | CA [^] TATG | 37 |

PZR ürününün Restriksiyon Endonükleaz (Kesici Enzim) ile muamelesinde kullanılan reaksiyon şartları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Kesim uygulamasında (RFLP) kullanılan bileşenler ve miktarları

| Bileşen | Miktarı (µl) |
|----------------------------|--------------|
| Kesim Enzimi (10.000 u/µl) | 1 |
| Tampon | 1,3 |
| PZR ürünü | 1,5 |
| dH ₂ O | 9,2 |
| Toplam | 13 |

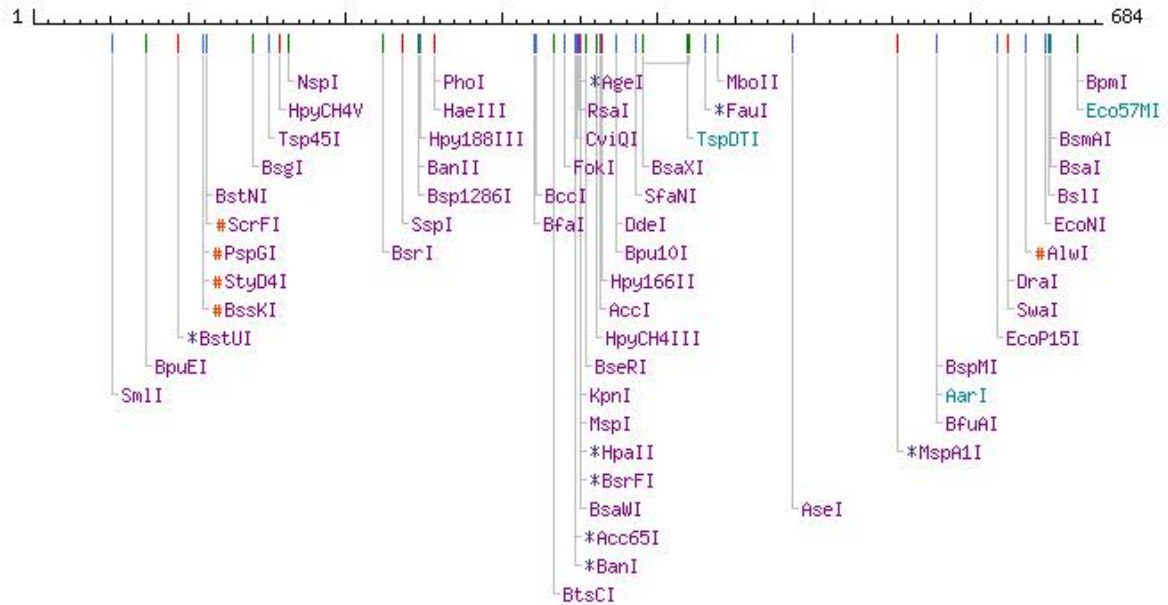
Toplam karışım hazırlandıktan sonra vorteksle karıştırılır ve mikrosantrifüj ile santrifüj edilir. Sonrasında restriksiyon endonükleaz enzimleriyle reaksiyona tabi tutulan PZR ürünleri uygun sıcaklıkta yaklaşık 10 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.6.1. RFLP sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde kontrolü

RFLP sonuçlarının kontrolünde; KpnI ve RsaI enzimi için % 2' lik, kullanılan diğer enzimler için ise % 1,5 lik agaroz jeli kullanılmıştır. Jelin her iki ucundaki kuyucuklara DNA işaretleyiciden (marker) 5'er µl ve 1 µl 6X yükleme tamponu yüklenmiştir. Her bir örneğe ait olan RFLP ürününün tamamı (13 µl) 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. %1,5 lik agaroz jeli 90 V da 40 dakika; % 2'lik agaroz jeli ise 70 V da 3 saat yürütülmüştür.

2.6.2. Agaroz jel sonuçlarının nükleotit dizisi sonuçları ile doğrulanması

PZR ürününün kesici enzimlerle kesildikten sonra agaroz jel elektroforezinde EtBr ile görüntülenmesinden elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla ilk olarak PZR ürünlerinin nükleotit dizilemesi yurtdışında ticari bir firmaya yaptırılmıştır. Kullanılan kesim enzimlerinin, PZR ürününün nükleotit dizisi üzerinde kesim bölgesi olup olmadığını veya varsa kaç tane olduğunu belirlemek amacıyla online erişim sağlanabilen NEB cutter (Vincze ve ark., 2003) programı kullanılmıştır (Şekil 9).

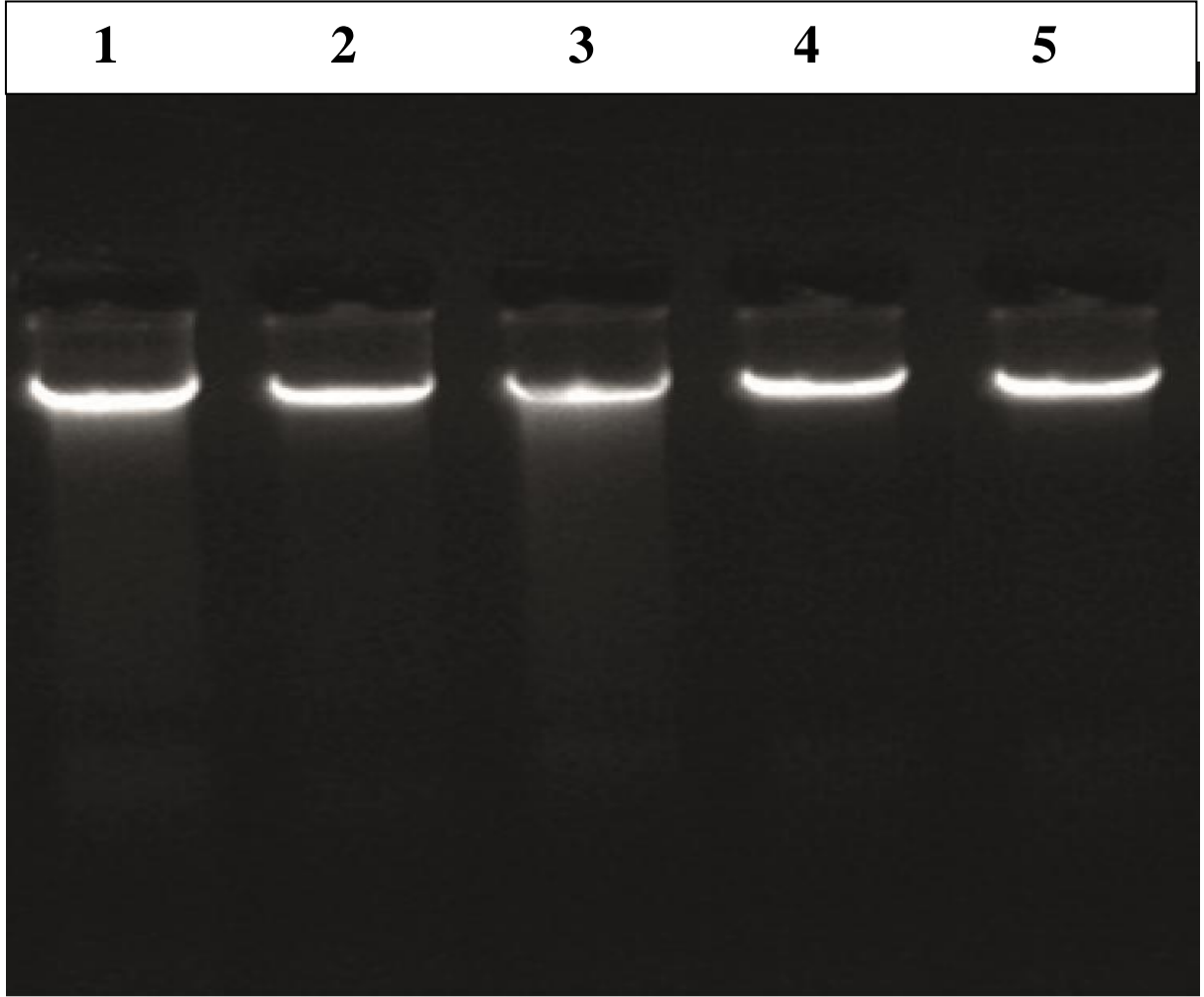


Şekil 9. Kesim enzimlerinin nükleotit dizisi üzerindeki kesim noktaları (URL-2)

3. BULGULAR

3.1. Toplam DNA İzolasyonuna İlişkin Bulgular

Kerevitlerden izole edilen toplam DNA'nın kalitesi ve varlığı % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. DNA izolasyonunun % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde kontrolü (1. *Astacus leptodactylus salinus* (Manyas); 2. *A. l. salinus* (Eğirdir) 3. *Austropotamobius torrentium* (Velika Deresi); 4. *A. leptodactylus leptodactylus* (İzник) 5. *A. l. leptodactylus* (Terkos))

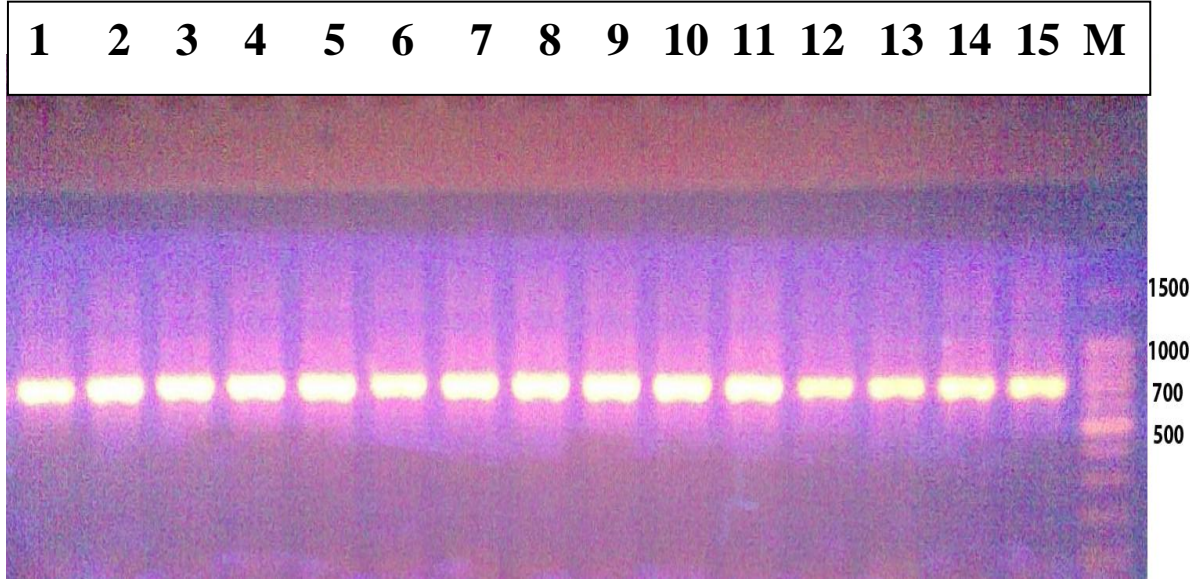
DNA izolasyonunun kontrolü, saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. İzole edilen toplam DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri

| Örnekler | | 260 nm | 280 nm | 260/280 | Konsantrasyon(µg/ml) |
|----------|-----------------|---------------|---------------|----------------|----------------------|
| Manyas1 | 1.Tekerrür | 0,132 | 0,075 | 1,7630 | 329,773 |
| | 2.Tekerrür | 0,130 | 0,070 | 1,8667 | 325,8136 |
| | Ortalama | 0,131 | 0,0725 | 1,81485 | 327,7933 |
| Manyas2 | 1.Tekerrür | 0,109 | 0,061 | 1,7910 | 273,4588 |
| | 2.Tekerrür | 0,112 | 0,064 | 1,7561 | 281,0175 |
| | Ortalama | 0,1105 | 0,0625 | 1,77355 | 277,2381 |
| Manyas3 | 1.Tekerrür | 0,131 | 0,075 | 1,7451 | 327,5087 |
| | 2.Tekerrür | 0,134 | 0,073 | 1,8492 | 335,4545 |
| | Ortalama | 0,1325 | 0,074 | 1,79715 | 331,4816 |
| Eğirdir1 | 1.Tekerrür | 0,146 | 0,077 | 1,8918 | 364,2998 |
| | 2.Tekerrür | 0,15 | 0,084 | 1,7863 | 376,0446 |
| | Ortalama | 0,148 | 0,0805 | 1,8395 | 370,1722 |
| Eğirdir2 | 1.Tekerrür | 0,12 | 0,068 | 1,7725 | 300,6556 |
| | 2.Tekerrür | 0,121 | 0,068 | 1,7868 | 302,4933 |
| | Ortalama | 0,1205 | 0,068 | 1,77965 | 301,57445 |
| Eğirdir3 | 1.Tekerrür | 0,081 | 0,045 | 1,8029 | 203,5353 |
| | 2.Tekerrür | 0,085 | 0,046 | 1,8465 | 213,6562 |
| | Ortalama | 0,083 | 0,0455 | 1,8247 | 208,59575 |
| Velika1 | 1.Tekerrür | 0,123 | 0,064 | 1,9135 | 306,7846 |
| | 2.Tekerrür | 0,128 | 0,064 | 1,9967 | 320,7439 |
| | Ortalama | 0,1255 | 0,064 | 1,9551 | 313,76425 |
| Velika2 | 1.Tekerrür | 0,126 | 0,07 | 1,8055 | 315,1386 |
| | 2.Tekerrür | 0,128 | 0,073 | 1,7651 | 320,7439 |
| | Ortalama | 0,127 | 0,0715 | 1,7853 | 317,94125 |
| Velika3 | 1.Tekerrür | 0,084 | 0,049 | 1,7325 | 210,9028 |
| | 2.Tekerrür | 0,088 | 0,05 | 1,7538 | 220,0701 |
| | Ortalama | 0,086 | 0,0495 | 1,74315 | 215,48645 |
| İznic1 | 1.Tekerrür | 0,113 | 0,063 | 1,812 | 283,6527 |
| | 2.Tekerrür | 0,117 | 0,067 | 1,7461 | 292,7283 |
| | Ortalama | 0,115 | 0,065 | 1,77905 | 288,1905 |
| İznic2 | 1.Tekerrür | 0,157 | 0,087 | 1,8106 | 393,5702 |
| | 2.Tekerrür | 0,153 | 0,084 | 1,8355 | 383,2851 |
| | Ortalama | 0,155 | 0,0855 | 1,82305 | 388,42765 |
| İznic3 | 1.Tekerrür | 0,137 | 0,074 | 1,8541 | 342,1379 |
| | 2.Tekerrür | 0,133 | 0,076 | 1,7545 | 331,3816 |
| | Ortalama | 0,135 | 0,075 | 1,8043 | 336,75975 |
| Terkos1 | 1.Tekerrür | 0,139 | 0,074 | 1,8646 | 346,532 |
| | 2.Tekerrür | 0,134 | 0,072 | 1,878 | 336,2233 |
| | Ortalama | 0,1365 | 0,073 | 1,8713 | 341,37765 |
| Terkos2 | 1.Tekerrür | 0,115 | 0,065 | 1,7659 | 287,2522 |
| | 2.Tekerrür | 0,119 | 0,063 | 1,8778 | 297,1041 |
| | Ortalama | 0,117 | 0,064 | 1,82185 | 292,17815 |
| Terkos3 | 1.Tekerrür | 0,09 | 0,048 | 1,8957 | 226,123 |
| | 2.Tekerrür | 0,089 | 0,046 | 1,9233 | 221,7692 |
| | Ortalama | 0,0895 | 0,047 | 1,9095 | 223,9461 |

3.2. PZR Uygulamalarına İlişkin Bulgular

Ülkemizde bulunan kerevit türlerinin mtDNA sitokrom oksidaz geninin 1. alt ünitesinin yaklaşık 700 bç'lik kısmı PZR vasıtasıyla çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 11'de verilmiştir.

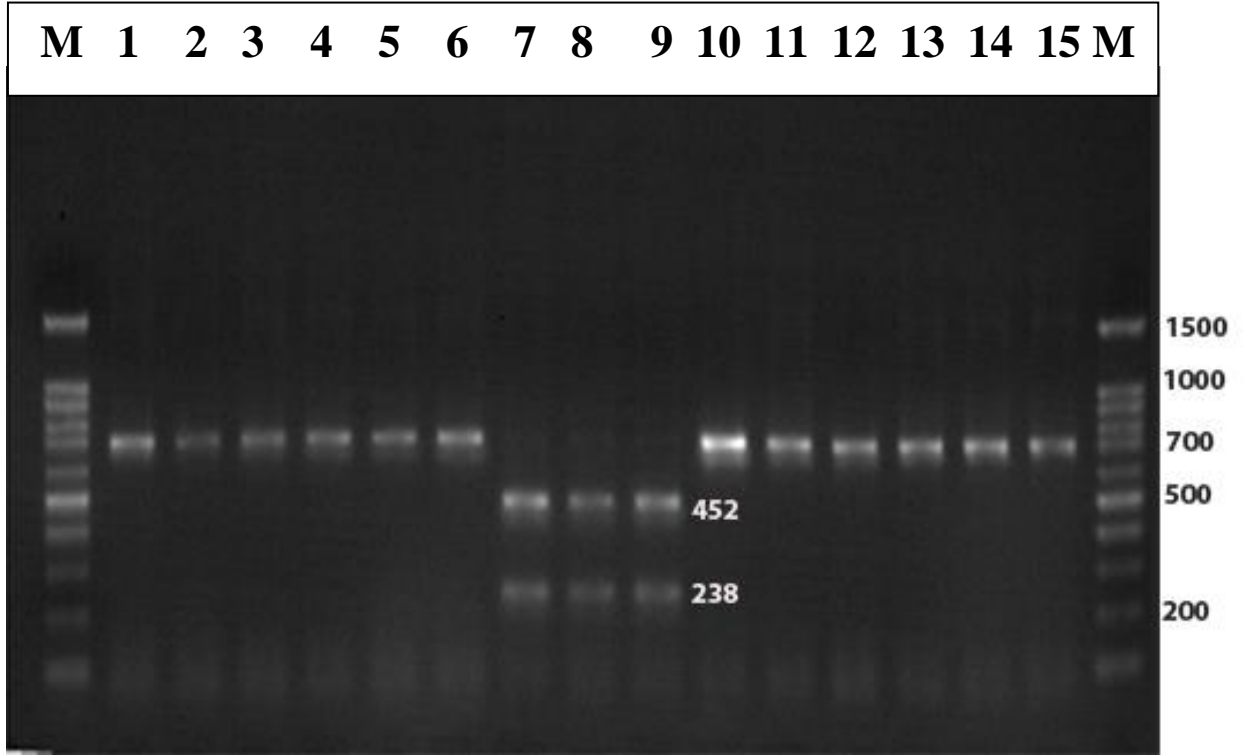


Şekil 11. PZR ürününün % 1'lik agaroz jel elektroforezinde görünümü (M: 100 bp DNA ladder ; 1,2,3 *Astacus leptodactylus salinus* (Manyas) ; 4,5,6 *A. l. salinus* (Eğirdir) ; 7,8,9 *Austropotamobius torrentium* (Velika Deresi); 10,11,12 *A. leptodactylus leptodactylus* (İznic) 13,14,15 *A. l. leptodactylus* (Terkos))

3.3. RFLP Uygulamalarına İlişkin Bulgular

PZR aracılığıyla çoğaltılan mtDNA sitokrom oksidaz geninin 1. Alt ünitesinin 650-700 bç'lik kısmının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesime tabi tutulması sonucunda; FspBI, XbaI, TruI, TaqI, HinfI, EcoRI, BclI, BsuRI, Bam HI, XhoI, Hind III, Mls I, XcmI, BsrGI, NdeI enzimleri hiçbir türün örneklerini kesmemişlerdir. Buna karşın; SspI enzimi *Austropotamobius torrentium* örneklerini 238. baz pozisyonundan kesmiş ve 238 ve 452 bç'lik iki fragment vermiştir. *Astacus leptodactylus* örneklerinde ise kesim bölgesi bulamamıştır. SspI enziminin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 12'de ve enzimin kesim noktasındaki nükleotit dizisi ise Şekil 13'te verilmiştir. RsaI enzimi *Austropotamobius torrentium* türüne ait örneklerini 340. baz pozisyonundan kesmiş ve 340 bç ve 350 bç'lik iki bant vermiştir. *Astacus leptodactylus* türüne ait örnekleri ise kesmemiştir. RsaI enziminin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 14'te ve enzimin kesim noktasındaki nükleotit dizisi Şekil 15'te verilmiştir. KpnI enzimi de *Austropotamobius torrentium* türünün örneklerini 352. baz pozisyonundan kesmiş ve 352 ve

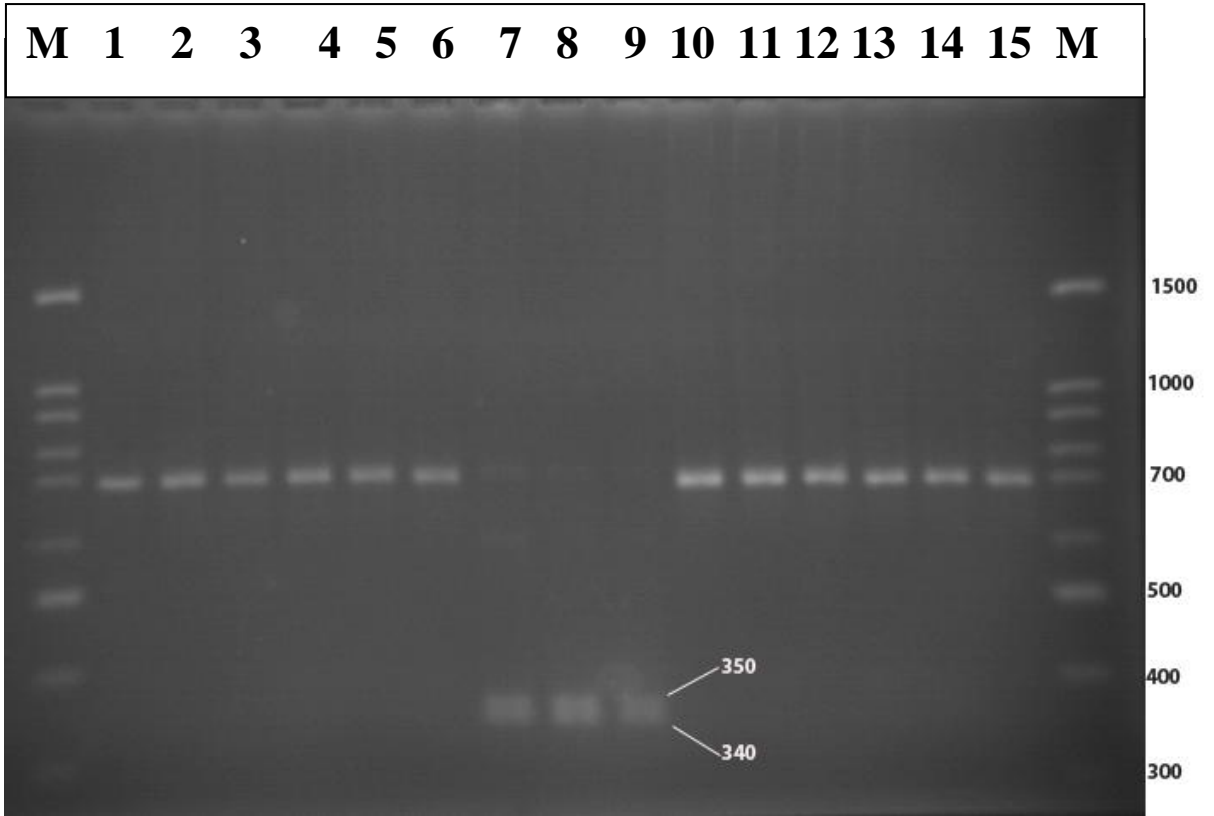
338 bp'lık iki bant vermiştir. KpnI enziminin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 16'da ve enzimin kesim noktasındaki nükleotit dizisi Şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 12. SspI enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş PZR ürününün % 1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. (M: 100 bp DNA ladder ; 1,2,3 *Astacus leptodactylus salinus* (Manyas) ; 4,5,6 *A. l. salinus* (Eğirdir) ; 7,8,9 *Austropotamobius torrentium* (Velika Deresi); 10,11,12 *A. leptodactylus leptodactylus* (İznik) 13,14,15 *A. l. leptodactylus* (Terkos))

5'.....225 TAGTTCCTCTAAT | ATTAGGGGCTCCT.....3'
238

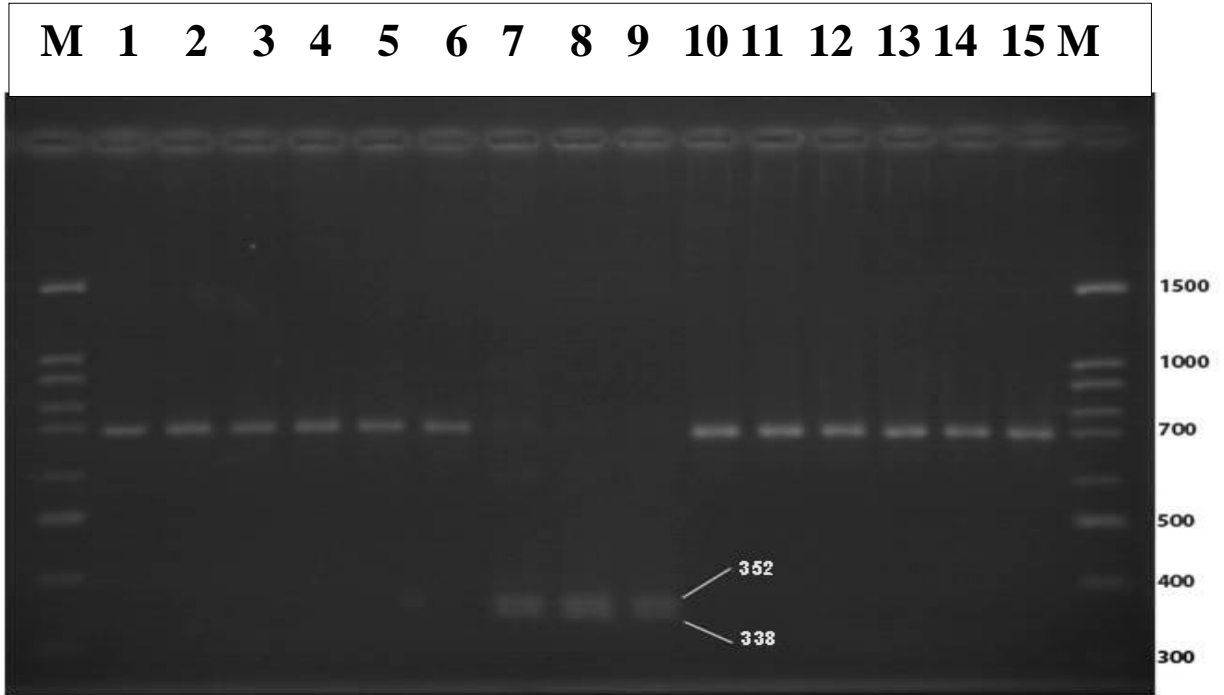
Şekil 13. *Austropotamobius torrentium* örneklerine ait PZR ürünlerinin SspI kesim enzimi tarafından tanınan bölgesinin nükleotit dizisi. (Kırmızı renkle yazılı nükleotitler enzimin spesifik tanıma bölgesini göstermektedir.)



Şekil 14. RsaI enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş PZR ürününün % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. (M: 100 bp DNA ladder ; 1,2,3 *Astacus leptodactylus salinus* (Manyas) ; 4,5,6 *A. l. salinus* (Eğirdir) ; 7,8,9 *Austropotamobius torrentium* (Velika Deresi); 10,11,12 *A. leptodactylus leptodactylus* (İznik) 13,14,15 *A. l. leptodactylus* (Terkos))

5'..... 338 AGAGGAGTGGGT | ACCGGTTGAACT 3'
350

Şekil 15. *Austropotamobius torrentium* örneklerine ait PZR ürünlerinin RsaI kesim enzimi tarafından tanınan bölgesinin nükleotit dizisi. (Kırmızı renkle yazılı nükleotitler enzimin spesifik kesim bölgesini göstermektedir.)



Şekil 16. KpnI enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuş PZR ürününün % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. (M: 100 bp DNA ladder ; 1,2,3 *Astacus leptodactylus salinus* (Manyas) ; 4,5,6 *A. l. salinus* (Eğirdir) ; 7,8,9 *Austropotamobius torrentium* (Velika Deresi); 10,11,12 *A. l. leptodactylus leptodactylus* (İznik) 13,14,15 *A. l. leptodactylus* (Terkos))

5'.....337 GAGAGGAGTGGGTAC | CGGTTGAACTG.....3'
352

Şekil 17. *Austropotamobius torrentium* örneklerine ait PZR ürünlerinin KpnI kesim enzimi tarafından tanınan bölgesinin nükleotit dizisi (Kırmızı renkle yazılı nükleotitler enzimin spesifik kesim bölgesini göstermektedir.)

Kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin Türkiye'de dağılım gösteren tatlı su ıstakozu türlerinin mtDNA sitokrom oksidaz geninin 690 bp' lik kısmı için meydana getirdiği fragmentler Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Çalışılan kesim enzimlerinin ortaya çıkardığı fragmentler

| Restriksiyon Endonükleaz | <i>Astacus leptodactylus salinus</i> | <i>Astacus leptodactylus leptodactylus</i> | <i>Austropotamobius torrentium</i> |
|--------------------------|--------------------------------------|--|------------------------------------|
| SspI | 690 bp | 690 bp | 238 bp 452 bp |
| RsaI | 690 bp | 690 bp | 340 bp 350 bp |
| KpnI | 690 bp | 690 bp | 352 bp 338 bp |

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada ülkemizde dağılım gösteren kerevit türleri ve alt türlerini genetik olarak tanımlamak amacıyla örneklenen kerevitlerden yüksek konsantrasyonda ve saflıkta toplam DNA elde edilmiştir. Mitokondriyal sitokrom oksidaz geninin 1. alt ünitesinin yaklaşık 700 bp'lik kısmı üniversal primerlerle çoğaltılmıştır. On sekiz adet kesim enzimi kullanılarak RFLP tekniği ile türlerin tanımlanması amaçlanmış olup üç kesim enzimi (SspI, KpnI, RsaI) farklı türlerde farklı tanıma bölgeleri bulmuştur ve farklı bant profilleri ortaya çıkarmıştır.

Dünya üzerinde özellikle nadir bulunan ve türü tehdit altında olan çeşitli kerevit türleri bilim insanlarının ilgisini çekmiştir ve özellikle son yıllarda genetik araştırmalar yapılmıştır (Busack, 1988; Fevolden ve Hessen, 1989; Grandjean ve Souty-grosset, 1997; Grandjean ve ark., 1997; Fetzner ve Crandall, 1999; Krane ve ark., 1999; Schulz, 2000; Gouin ve ark., 2000; 2001; 2002; 2003; Schulz ve ark., 2004; 2006; Alaranta ve ark., 2006; Soroka, 2008). Çeşitli türlerin gen havuzu yanlış restorasyon faaliyetleri yada illegal girişler nedeniyle geri dönülmez şekilde değişebileceği için birçok bilim insanı herhangi bir koruma veya yenileme programı başlatmadan önce kerevit populasyonlarının genetik yapısının net olarak belli olması gerektiğini düşünmektedirler (Fevolden ve ark., 1994; Grandjean ve ark., 1997). Koruma ve restorasyon sürecinde, fiziksel gelişimin her aşamasında türleri kesin olarak tespit etmek çok önemlidir. Moleküler analizler buna doğru ve hızlı bir şekilde imkan verdiği için önemli ölçüde değer taşımaktadırlar.

Çeşitli kerevit türlerine ait ilk genetik araştırmalar protein elektroforezi ile yapılmıştır. Protein elektroforezi kerevitlerin Avrupa populasyonları arasında düşük seviyede varyasyon gösterdiği görülmüştür (Busack, 1988; Fevolden ve Hessen, 1989; Agerberg, 1990; Fevolden ve ark., 1994). Mitokondriyal DNA ile ilgili çalışmalara ise son yıllarda başlanmıştır ve daha yüksek derecede varyasyon gösterdiği için birçok kerevit taksonuna başarılı şekilde uygulanmıştır (Crandall ve ark., 1995; Crandall ve Fitzpatric, 1996; Grandjean ve Souty-Grosset, 1997; Souty-Grosset ve ark., 1997; Fetzner ve Crandall, 1999; Grandjean ve ark., 2000).

Kerevit türleri üzerine yapılan modern genetik çalışmalar, protein elektroforezi analizi, mikrosatellit, ITS1 ve ITS2 bölgeleri ve 18S ve 28S rDNA genlerinin sekans analizlerini içermektedir (Crandall ve ark., 2000; Gouin ve ark., 2000; Harris ve Crandall,

2000; Largiadér ve ark., 2000; Alaranta ve ark., 2006). Mitokondriyal DNA ile ilişkin çalışmalar COI, 12S ve 16S genlerinin RFLP analizi ve sekans analizidir (Largiadér ve ark., 2000; Gouin ve ark., 2003; Grandjean ve ark., 2000; 2002; Soroka, 2008).

Soroka, 2008 PZR-RFLP metodunu kullanarak, *Astacus astacus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus* ve *Astacus leptodactylus* türlerine ait 4 istakoz taksonunu birbirinden moleküler olarak ayırmıştır. Mitokondriyal DNA'daki sitokrom oksidaz geninin 730 bp'lik kısmı çoğaltıldıktan sonra 5 adet restriksiyon endonükleaz enzimi ile reaksiyona tabi tutulmuşlardır. Bu enzimlerden biri olan AluI enzimi 4 türde de farklı kesim noktaları bulmuştur ve 4 farklı genotip oluşturmuştur. Soroka, (2008)' de kullanılan AluI enzimi, *Astacus leptodactylus* türünü 600 ve 110 bp'lik iki fragmente ayırırken, yaptığımız çalışmada AluI enzimi *Astacus leptodactylus* türünde tanıma bölgesi bulamamıştır. Bu fark türün farklı popülasyonlarda yer alması veya tür içi varyasyon olarak açıklanabilir. Ayrıca kullanılan BamHI restriksiyon endonükleaz enzimi, *Astacus leptodactylus* türüne ait bireylerin sitokrom oksidaz geninde kesim noktası bulamamıştır, bu sonuç yaptığımız çalışma ile uyumludur.

Bu teknik çeşitli canlıların dağılımının gözlenmesi ve sistematik olarak tanımlanması amacıyla rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca çeşitli laboratuarlarda sonuçların tekrar edilebilirliği göz önünde bulundurularak kolayca yapılabilir (Soroka ve Grygieńczo-Raźniewska, 2005).

Türkiye'deki doğal göllerde, nehirlerde, baraj ve göletlerde yaygın bir biçimde dağılım gösteren ve son yıllarda popülasyon yoğunluğunun daha da arttığı öngörülen Türk kerevitinin (*Astacus leptodactylus*) taksonomisi, dağılımı, biyolojisi, morfolojisi ve stok yapısı ile ilgili çok sayıda çalışma vardır (Geldiay ve Kocataş, 1970; Erençin ve Köksal, 1977; Harlıoğlu ve Türkgülü, 2000; Bolat, 2001; Harlıoğlu ve Holdich, 2001; Harlıoğlu, 2004). Ancak ülkemizde dağılım gösteren kerevit türlerine ilişkin moleküler çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma ile doğal olarak yayılım gösteren tek kerevit türü olma özelliği taşıyan, *Astacus leptodactylus leptodactylus* ve *Astacus leptodactylus salinus* olarak isimlendirilen iki alt türü bulunan *Astacus leptodactylus* ile Avrupa kökenli olup ülkemizde son yıllarda kaydı verilen ve Türkiye için doğal olmayan tek kerevit türü *Austropatamobius torrentium* arasındaki genetik farklılık PZR-RFLP yöntemiyle ortaya konulmuştur. Söz konusu türler ve alt türler arasındaki genetiksel farklılığın belirlenmesi ve türlerin moleküler olarak tanımlanmasına yönelik çalışma yapılmamış olmasından dolayı bu çalışma bir ilktir.

Bu çalışmada uygulanan teknik tür içindeki herhangi bir bireyde varyasyon göstermemiş ve bu türler arasındaki genetik farklılığı belirlemek için PZR-RFLP tekniğinin geçerliliğini ve kerevit türlerinin tanımlamak için kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

SspI, RsaI ve KpnI Restriksiyon endonükleaz enzimleri Türkiye’ de kaydı bulunan iki farklı tatlı su ıstakozu türü *Astacus leptodactylus* ve *Austropotamobius torrentium*’u birbirinden ayırmada moleküler belirteç olarak kullanılabilceği belirlenmiştir. SspI enzimi *Austropotamobius torrentium*’ un sitokrom oksidaz genini tek yerden keserek 238 bç ve 452 bç’ lik iki fragment ortaya çıkarmıştır. RsaI enzimi 340 ve 350 bç’lik iki fragment oluşturacak şekilde tek yerden kesmiştir. Benzer şekilde, KpnI enzimi de 352 ve 338 bç olmak üzere iki fragment ortaya çıkarmıştır. Sözü edilen üç enzim *Astacus leptodactylus* türüne ait bireylerin sitokrom oksidaz geninde tanıma bölgesi bulamamıştır.

Çalışmada kullanılmış olan diğer 15 restriksiyon endonükleaz enzimleri ise her iki türde de herhangi bir kesim noktası bulamamasından dolayı türlerin ayrılmasında kullanılamayacağı anlaşılmıştır. Ayrıca, kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri bazı araştırmacılar tarafından alt tür olduğu belirtilen *Astacus leptodactylus leptodactylus* ve *Astacus leptodactylus salinus*’un kesim bölgeleri arasında fark olmaması sebebiyle bu alt türleri ayıramamıştır. Bu iki alt türün aynı kesim morfunu sahip olması sebebiyle bunların farklı alt tür olarak isimlendirilmesine gerek olup olmadığı güvenilirliğin yüksek olduğu diğer DNA’ya dayalı belirteç sistemleri kullanılarak ortaya konulmalıdır.

Anadolu tatlı su ıstakozunun populasyon yapısını ve taksonomik yapısını daha iyi anlayabilmek için yüksek hassasiyete sahip mikrosatellit belirteçler ve ek mtDNA veya nükleer gen bölgeleri çalışılarak daha fazla bilgi elde edilebilir. Ayrıca, son buzul çağından sonra Anadolu’ya doğal kerevitlerin girişi ve yayılımının yanında doğal olmayan kerevitlerin bugünkü dağılımına ilişkin daha sağlıklı hipotezler oluşturulabilir.

KAYNAKLAR

Ackefors, H., 1999. The positive effects of established crayfish introductions in Europe. In: F. Gherardi, and D. Holdich, (eds.), *Crayfish in Europe as Alien Species. How to Make the Best of a Bad Situation*. Balkema Publisher, pp. 49–61.

Agerberg, A., 1990. Genetic variation in three species of freshwater crayfish, *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Aesch. and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis. *Hereditas*, 113, 101-108.

Aksakal, E., 2005. Aras, Karasu ve Çoruh Havzalarından Yakalanan *Capoeta* sp.'lerin MtDNA Sitokrom-b Bölgesinde PCR-RFLP Yöntemi ile Genetik Farklılığın Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Alaranta, A., Henttonen P., Jussila, J., Kokko, H., Presteggaard, T., Edsman L., and Halmekyto, M., 2006. Genetic differences among noble crayfish (*Astacus astacus*) stocks in Finland, Sweden and Estonia based on the ITS1 region. *Bull. Fr. Peche Piscic*, 380-381, 965-975.

Albrecht, H., 1983. Besiedlungsgeschichte und ursprünglich holozäne Verbreitung der europäischen Flusskrebse. *Spixiana*, 6, 61-67.

Allendorf, F.W., and Ryman, N., 1987. Genetic management of hatchery stocks, In: *Population Genetics and Fisheries Management*. N. Ryman and F. Utter, (eds.), University of Washington Press, 141-159.

Attard, J., and Vianet, R., 1985. Variabilité génétique et morphologique de cinq populations de l'écrevisse européenne *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet 1858) (Crustacea, Decapoda). *Canadian Journal of Zoology*, 63, 2933-2939.

Awise, J.C., Akney, C.D., and Nelson, W.S., 1990. Mitochondrial gene trees and the evolutionary relationship of mallard and black ducks. *Evolution*, 44, 1109-1119.

Beaumont, A.R., and Hoare, K., 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*, Blackwell Science Ltd., Oxford, s. 158.

Bott, R., 1950. Freshwater crayfish of Europe (Decapoda, Astacidae). *Abh Senckenberg Naturf Ges*, 483, 1–36.

Bolat, Y., 2001. Reproduction on the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) in Lake Eğirdir. *J. Inst. Natur. Appl. Sci.*, 5, 49-56.

Burke, T. and Bruford, M.W., 1987. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327, 149-152.

Busack C.A., 1988. Electrophoretic variation in the red swamp (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. acutus*) (Decapoda: Cambaridae). Aquaculture, 69, 211-226.

Buth, D.G., 1990. Genetic principles and the interpretation of electrophoretic data, In: D. H. Whitemore (eds), *Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management* CRC Press Inc, Boca Raton, 1-21.

Bruford, M.W., and Burke, T., 1991. Hypervariable DNA markers and their applications in the chicken, In: T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys and R. Wolff, (eds.), *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Basel, Birkhauser Verlag, pp. 230-242.

Clary, D.O., and Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide, gene organization and genetic code, J. Mol. Evol., 22, 252-271.

Claxton, W.T., Martel A., Dermott R.M., and Boulding E.G., 1997. Discrimination of field-collected juveniles of two introduced dreissenids (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) using mitochondrial DNA and shell morphology. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54, 1280-1288.

Claxton W.T., and Boulding E.G., 1998. A new molecular technique for identifying field collections of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and quagga mussel (*Dreissena bugensis*) veliger larvae applied to eastern Lake Erie, Lake Ontario, and Lake Simcoe. Can. J. Zool., 76, 194-198.

Crandall, K.A., Lawler S.H., and Austin, C., 1995. A preliminary examination of the molecular phylogenetic relationships of the crayfish genera of Australia (Decapoda: Parastacidae). Freshwater Crayfish, 10, 18-30.

Crandall, K.A., and Fitzpatrick J.F.Jr., 1996. Crayfish molecular systematic: Using a combination of procedures to estimate phylogeny. Systematic Biology, 45: 1-26.

Crandall, K.A., Harris D.J., and Fetzner JR J.W., 2000. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. Proc. R. Soc. London B, 267, 1679–1686.

Crandall, K. A., and Buhay J.E., 2008. Global diversity (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae-Decapoda) in freshwater. Hydrobiologia, 595, 295-301.

Çiftçi, Y., 2006. Türkiye Alabalık (*salmo trutta* linnaeus, 1758 ve *salmo platycephalus* behnke, 1968) Populasyonlarının Genetik Yapısının mtDNA-RFLP Analiz Yöntemiyle Belirlenmesi. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Davidson, W.S. Birt, T.P., and Green, J.M., 1989. Organization of the mitochondrial genome from Atlantic salmon (*Salmo salar*), Genome, 32, 340-342.

Demirsoy, A., 1998. Yaşamın Temel Kuralları. Cilt 3, Kısım 1, Ankara, 684 s.

Desjardins, P. and Morais, R., 1990. Sequence and Gene Organization of Chicken Mitochondrial Genome. J. Mol. Biol., 212: 599-634.

Erençin, Z., and Köksal, G., 1977. Studies on the freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) in Anatolia. Freshwater Crayfish 3,187-192.

Ergüden, D., 2007. Türkiye Denizlerindeki Tirsilerin (*Alosa spp.*) moleküler sistematığı. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Ferris, S.D. and Berg, W., 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management, In: Population Genetics and Fishery Management (N. Ryman ve F. Utter, Eds.), University of Washington Press, Seattle, 277-299.

Fetzner J.W.JR., and Crandall K.A., 1999. Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*): A comparison using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and mitochondrial 16S gene sequences. Freshwater Crayfish, 12: 396–412.

Fetzner J.W.J., and Crandall K.A., 2001. Genetic Variation. In: Holdich, D.M. (Ed.), Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Science, Oxford, 291-326.

Fevolden S.E., and Hessen D.O., 1989. Morphological and genetic differences among recently founded populations of noble crayfish (*Astacus astacus*). Hereditas, 110, 149-158.

Fevolden S.E., Taugbøl T., and Skurdal J., 1994. Allozymic variation among populations of noble crayfish, *Astacus astacus* L., in southern Norway: implications for management. Aquaculture and Fisheries Management, 25, 927-935.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotach., 3: 294–299.

Geldiay, R., 1949. Çubuk Barajı ve Emir Gölünün makro ve mikro faunasının mukayeseli incelenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Mecmuası, 2, 146-252

Geldiay, R., and Kocataş A., 1970. The preliminary report about the taxonomy and distribution of *Astacus* (Decapoda) of Turkey. Sci. Rep. Fac. Sci. Ege Üniversitesi Izmir, 94, 1-7

Gilbert, D.A., Packer, C., Pusey, A.E., Stephans, J.C. and O'Brien, S.J., 1991. Analytical DNA fingerprinting in lions: Parantage, genetic diversity and kinship, Journal of Heredity, 82, 378-386.

Grandjean, F., and Souty-Grosset C., 1997. Preliminary results on the genetic variability of mitochondrial DNA in the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana. C.R. Academie des Sciences Paris. Sciences de la vie / Life Sciences, 320: 551–556.

Grandjean, F., Souty-Grosset C., and Holdich D.M., 1997. Mitochondrial DNA variation in four British populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*: implications for management. Aquat. Living Resour., 10: 121–126.

Grandjean, F., Harris D.J., Souty-Grosset C., and Crandall K.A. 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). J. Crustacean Biology, 20, 522–529.

Grandjean F., Frelon-Raimond M., and Souty-Grosset C. 2002. Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several? Bull. Fr. Peche Piscic., 367, 671–680.

Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. and Feldman, M.W., 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics, 139, 463-471.

Gouin N., Grandjean F., and Souty-Grosset C. 2000. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. Mol. Ecol., 9, 629–644.

Gouin N., Grandjean F., Bouchon D., Reynolds J.D., and Souty-Grosset C., 2001. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers. Heredity, 87, 80-87.

Gouin N., Souty-Grosset C., Ropiquet A., and Grandjean F., 2002. High dispersal ability of *Austropotamobius pallipes* revealed by microsatellite markers in a French brook. Bull. Fr. Pêche Piscic., 367, 681-689.

Gouin, N., Grandjean, F., Pain, S., Souty-Grosset, C., and Reynolds, R., 2003. Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. Heredity, 91, 70-77.

Güner, U., and Harlioğlu, M.M., 2010. Status of Freshwater Crayfish Distribution in Thrace Region of Turkey. Reviews in Fisheries Science. 18(1), 1-6.

Gyllensten, U., 1985. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. Journal of Fish Biology, 26, 691-699.

Hadorn, E., and Wehner, R., 1974. Allgemeine Zoologie. Georg Thime Verlag. Stuttgart, s.533.

Hanotte, O., Burke, T., Armour, J.A.L. and Jeffreys, A.J., 1991. Cloning characterisation and evolution of Indian peafowl *Pavo christatus* minisatellite loci, In: DNA fingerprinting: Approaches and Applications (T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys ve R. Wolff, Eds.), Birkhauser Verlag, Boston, 193-216.

Harlioğlu, M. M., and Holdich, D. M. 2001. Meat yields in the introduced crayfish, *Pacifastacus leniusculus* and *Astacus leptodactylus*, from British waters, Aquaculture Research, 32,411-417.

Harlioğlu, M. M., 2004. The present situation of freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) in Turkey. Aquaculture 230: 181-187.

Harlioğlu, M. M., and U. Güner. 2006. Studies on the recently discovered crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Shrank, 1803), in Turkey: Morphological analysis and meat yield. Aquaculture Res., 37, 538-543

Harlioğlu, M. M., and Güner U., 2007. A new record of recently discovered crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Shrank, 1803), in Turkey. BFPP/Bull. Fr. Pêche Piscic., 387, 1-5 .

Harlioğlu, M. M., and Türkgülü, İ., 2000. The relationship between egg size and female size in freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*, Aquaculture International 8, 95-98.

Harris D.J., and Crandall K.A., 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. Mol. Biol. Evol., 17: 284-291.

Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology, Tree, 4, 6-11.

Hauser, L., Carvalho, G., Hughes, R. and Carter, R., 1992. Clonal structure of the introduced freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* as revealed by DNA fingerprintings, Proceedings of the Royal Society of London. 249B, 19-25.

Hillis, D.M., Larson, A., Davis S.K. and Zimmer, E.A., 1990. Nucleic Acids III:Sequencing, *In: Molecular Systematics* (D.M. Hillis ve C. Mortiz, Eds.), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 318-370.

Hobbs, H. H. Jr., 1989. An illustrated checklist of the American Crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). Smithsonian Contributions to Zoology 480, 1-236.

Holthuis, L. B., 1961. Report on a collection of Crustacea Decapoda and Stomatopoda from Turkey and the Balkans. Zoologische Verhandelingen, 47, 1-67.

Holdich D.M., Rogers W.D. and Reynolds J.D., 1999. Native and alien crayfish in the British Isles. In: Gherardi F. and Holdich D.M. (eds.), *Crayfish in Europe as alien species, how to make the best of a bad situation?*, A.A. Balkema, Rotterdam, 221–235.

Holdich, D. M., 2002. Present distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. Bull. Fr. Pêche Piscic. 367, 611–650

Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., and Sibley, P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 11, 394-395.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., and Thein, S.L., 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, Nature, 314, 67-73.

Jeffreys, A.J., Neumann, R. and Wilson, V., 1990. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis, Cell, 60, 473-485.

Karaman M.S., 1962. Ein Beitrag zur Systematik des Astacidae (Decapoda). Crustaceana, 3, 173-191.

Karaman M.S., 1963. Studie der Astacidae (Crustacea, Decapoda). Hydrobiologia (The Hague), 22, 111-132.

Kocataş, A., 2003. Ekoloji ve Çevre Biyolojisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları, No: 51, Bornova, İzmir, 597 s.

Kocher, T.D., Thomas, W.K. and Meyer, A., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6196-6200.

Köksal, G., 1980. Biometric analysis on the freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch 1823) which is produced in Turkey relationship between major body components and meat yields. J. Fac. Veteri. Medi. Univ. of Ankara, 26: 93-114

Köksal, G., 1985. Kültür Koşulları altında tatlı su İstakozunun (*Astacus leptodactylus salinus* Normdan, 1842) üreme randımanı üzerine incelemeler, Ege Üniv. Su ürünleri Yüksekokulu, Su Ürünleri Dergisi, 2, 42-56.

Köksal, G. 1988. *Astacus leptodactylus* in Europe. In: Holdich, D. M., and R. S. Lowery, (eds.), *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation* London: Croom Helm. 365–400

Krane D.E., Sternberg D.C., and Burton G.A., 1999. Randomly amplified polymorphic DNA profile-based measures of genetic diversity in crayfish correlated with environmental impacts. Environ. Toxicol. Chem., 18: 504–508.

Kühn, A., 1964. Grundriss der allgemeinen Zoologie. Georg Thieme Vrlg. 15, Aufl., Stuttgart, pp. 309.

Largiadér C.R., Herger F., Lörtscher, M., and Scholl A., 2000. Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species complex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers. Mol. Ecol., 9: 25–37.

Lewontin, R., 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations, heterotic models, Genetics, 49, 49-67.

Lynch, M., 1991. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys and R. Wolff (eds.) *DNA fingerprinting: Approaches and Applications*. Birkhauser Verlag, Basel, 113-126.

Macaranas J.M., Mather P.B., Hoeben P., and Capra M.F., 1995. Assessment of genetic variation in wild populations of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens 1868) by means of allozyme and RAPD-PCR markers. Marine and Freshwater Research, 46, 1217-1228.

Machino, Y., and Füreder, L., 2005. How to find a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803): A biogeographic study in Europe. Bull. Fr. Pêche Piscic., 376–377: 507–517.

Machino, Y., and Holdich D., 2006. Distribution of crayfish in Europe and adjacent countries: Updates and comments. Freshwater Crayfish, 15, 292–323 .

Marr, J.C., 1957. The Problem of Defining and Recognising Subpopulations of Fishes. U.S. Fish Wild. Serv. Spec. Sci. Rep., 208: 1-6.

Markert, C.L. and Moller, F., 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 45, 753-763.

May, C.A., Wetton, J.H., Davis, P.E., Brookfield, J.F.Y. and Parkin, D.T., 1993. Single locus profiling reveals loss of variation in inbred populations of the red kite (*Milvus milvus*), Proceedings of the Royal Society of London, 251B, 165-170.

Mazlum, Y., 2007. Stocking density affects the growth, survival, and cheliped injuries of third instars of narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 juveniles, Crustaceana, 80, 803-815.

Mazlum Y., ve Uzun C., 2008. Korunak tiplerinin *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) kerevitlerinin büyümesi, hayatta kalması ve yem değerlendirmesi üzerine etkileri. Journal of FisheriesSciences.com, 2, 321-328

Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondriyal DNA in fish, In: Biochemistry and Molecular Biology of Fish, (P.W. Hochachka ve P. Mommsen, Eds.), Elsevier Press, 2, 1-38.

Moritz, C., Dowling, T.E. and Brown, W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics, Annu. Rev. Ecol. Syst., 18, 269-292.

Nei, M., 1972. Genetic distance between populations, The American Naturalist, 106, 283-292.

Ninni E., 1923. Primo contributo allo studio dei pescie della pesca nelle acque dell'Imperio Ottomano. Missione Italiana per l'Esplorazione dei Mari di Levante (materiali raccolti durante la campagna talassografica. 1921-1922 a bordo della R. Nave L.F. Marsigli), 5, 1-187.

Okumuş, İ. and Çiftci, Y., 2003. Fish Population Genetics and Molecular Markers: II Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3, 51-79.

Park, L.K. and Moran, P., 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries, Rev. Fish. Biol. Fish., 4, 272-299.

Queller, D.C., Strassmann, J.E. and Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and kinship, Trends in Ecology & Evolution, 8, 285-288.

Schulz R., 2000. Status of the noble Crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: Monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations. Bull. Fr. Peche Piscic, 356, 123-138.

Schulz, H., Śmietana, P., Maiwald, T., Oidtmann, B., and Schulz, R., 2004. Case studies on the Co-occurrence of *Astacus astacus* (L.) and *Orconectes limosus* (Raf.), Snapshots of a Slow Displacement. Freshwater Crayfish, 15, 212-219.

Schulz H., Śmietana P., and Schulz R., 2006. Estimating the human impact on population of the endangered noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in north-western Poland. Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst, 16, 223-233.

Soroka M., and Grygieńczo-Raźniewska E., 2005. Mitochondrial DNA-based diagnostic molecular markers for freshwater bivalves. Folia Malacol., 13, 145-152.

Soroka, M., 2008. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species. Polish Journal of Natural Sciences., 23, 624-634

Souty-Grosset C., Grandjean F., Raimond R., Frelon M., Debenest C., and Bramard M., 1997. Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: the usefulness of the mitochondrial DNA marker. Bull. Fr. Pêche Piscic., 347, 677-692.

Souty-Grosset, C., D. Holdich, P. Noel, J. Reynolds, and P. Haffner 2006. (Eds.). *Atlas of Crayfish in Europe*, pp. 1–187. Paris, Museum National d'Histoire Naturelle.

Starobogatov, Y.I., 1995. Taxonomy and geographical distribution of of Asia and East Europe (Crustacea Decapoda Astacoidei). Arthropoda Selecta, 4, 3-25.

Taylor, C. A. 2002. Taxonomy and conservation of native crayfish stocks, pp. 467–510. In: *Biology of Freshwater Crayfish* (Holdich, D. M. Ed.). Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.

Tortonese E., 1952. Relazione preliminare di un viaggio a scopo zoologico attraverso l'Asia Minore. *Bollettino dell'Istituto e Museo di Zoologia della Università di Torino*, 3, 81-97 Torino.

Trontelj, P., Yoichi, M., and Boris, S., 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molec. Phylogen. Evol.* 34, 212-226

Turan, C., 2002. Genetik. Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı, Yayın No: 2, Hatay, 169 s.

Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucl. Acids Res., 31, 3688-3691.

URL-1, <http://crayfish.byu.edu/> (31 Mayıs 2011, 11:30)

URL-2, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> (12 Haziran 2011, 10:00)

Wallace, D.C., 1986. Mitochondrial Genes and Diseases. Hospital Practice, 21, 77-92.

Wilhelm, V., Villages, J., Miquel, Á., Engel, E., Bernales, S., Valenzuela, P.D.T. and Burzio, L.O., 2003. The complete sequence of the mitochondrial genome of the Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Biol. Res., 36, 223-231.

Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S. and Jeffreys, A.J., 1987. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. Annals of Human Genetics, 51, 269-288.

ÖZGEÇMİŞ

24.01.1984 tarihinde Trabzon'un Akçaabat ilçesinde doğdu. İlköğretim eğitimini Akçaabat Metinkale İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini Trabzon Lisesi'nde aldı. 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Edebiyat Fakültesinde Biyoloji Bölümü yüksek lisans programına kayıt yaptırdı ve İngilizce bilimsel hazırlık programına başladı. 2009 yılında Rize Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve yüksek lisans eğitimine Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında devam etti. 2010-2011 Güz yarıyılı YÖK tarafından verilen Yüksek Lisans araştırma bursunu kazanarak Amerika Toledo Üniversitesi'nde geçirdi. Halen Rize Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.