

**T.C.**  
**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANADOLU DAĞ KURBAĞALARININ GENETİK**  
**ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**TUĞBA ERGÜL KALAYCI**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. NURHAYAT ÖZDEMİR**

**TEZ JÜRİLERİ**

**PROF. DR. BİLAL KUTRUP**

**PROF. DR. MURAT TOSUNOĞLU**

**DOÇ. DR. YUSUF BEKTAŞ**

**DOÇ. DR. ÇİĞDEM GÜL**

**DOKTORA TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RİZE-2017**


**Her Hakkı Saklıdır**

T.C.  
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANADOLU DAĞ KURBAĞALARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN  
BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR danışmanlığında, Tuğba ERGÜL KALAYCI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/06/2017 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Murat TOSUNOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Bilal KUTRUP	
Üye	: Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR	
Üye	: Doç. Dr. Çiğdem GÜL	

  
Doç. Dr. Ferhat KALAYCI  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## ÖNSÖZ

Anadolu dağ kurbağalarının (*Rana macrocnemis*, *Rana camerani*, *Rana holtzi* ve *Rana tavasensis*) sistematik durumu ve populasyon genetiğinin mitokondriyal, nükleer ve mikrosatellit DNA belirteçleri ile incelendiği bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Doktora Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi aşaması başta olmak üzere akademik hayatım boyunca gösterdiği sabrı, ilgisi ve önderliği için danışman hocam sayın Doç. Dr. Nurhayat Özdemir'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bu çalışmayı destekleyen, değerli fikirlerini paylaşan, sabırla yardımcı olan tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Doç. Dr. Yusuf Bektaş'a ve Prof. Dr. Bilal Kutrup'a teşekkürlerimi sunarım.

Arazi çalışmalarında bile maddi manevi desteklerini esirgemeyen, annem Songül Ergül ve babam Emin Ergül'e; laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen İsmail Aksu ve güler yüzlü RTEÜ Su Ürünleri Fakültesi, Genetik laboratuvarı öğrencilerine teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince beni sabırla bekleyen fedakar oğlum Göktuğ Deniz Kalaycı'ya ve bütün bu süre boyunca yanımda olan bana katlanan, her türlü desteğini esirgemeyen sevgili eşim Gökhan Kalaycı'ya tüm kalbimle teşekkür ederim. Manevi desteğini esirgemeyen kardeşim Tolga Ergül'e teşekkür ederim. Öğrenim hayatım boyunca beni destekleyen, yanımda olan, her zaman sevgisini ve ilgisini yanımda hissettiğim, her an özlem ile andığım canım dedem rahmetli Hüseyin Ergül'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Doktora tezi R.T.E.Ü. BAP tarafından 2013.102.03.10 ve 2015.53001.102.03.05 nolu projeler ile desteklenmiştir.

Tuğba ERGÜL KALAYCI

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Anadolu Dağ Kurbağalarının Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 05/06/2017

  
Tuğba ERGÜL KALAYCI

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

## ÖZET

### ANADOLU DAĞ KURBAĞALARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Tuğba ERGÜL KALAYCI

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi  
Danışmanı: Doç. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

Anadolu dağ kurbağaları (*Rana macrocnemis*, *Rana camerani*, *Rana holtzi* ve *Rana tavasensis*) Kafkasya, İran, Irak'ın bazı bölgeleri ve Anadolu'da yayılım göstermektedir. Literatürde türlerin taksonomik durumlarını belirten çalışmalar çoğunlukla morfolojik özelliklere dayalı olup, bu gruba ait populasyon genetiği çalışması ise bulunmamaktadır. Bu çalışmada Anadolu'dan 31 farklı populyasyondan toplanan 132 örneğin mtDNA (cyt b ve COI) ve nDNA (RAG1 ve POMC) baz sıralarına dayalı filogenetik ve 6 farklı mikrosatellit lokusuna dayalı populasyon genetiği analizleri yapılmıştır. Her iki mtDNA gen bölgesi maksimum tutumluluk, bayesiyen çıkarsama yaklaşımı ve maksimum benzerlik analizleri yüksek seç-bağla ve posterior olasılık değerleri ile (cyt b için; 99/1,0/88; MP/BI/MB, COI için; 100/1,0/100; MP/BI/MB) *R. tavasensis* türü diğer Anadolu dağ kurbağalarından ayrılırken, *R. holtzi*, *R. camerani* ve *R. macrocnemis* türleri arasında herhangi bir genetik farklılık elde edilmemiştir. İncelenen nDNA genleri bakımından bu tür grubunun üyeleri arasında farklılık arz eden bir genetik yapılanma tespit edilmemiştir. Populasyon genetiği analizleri sonucunda, Anadolu dağ kurbağaları arasında incelenen mikrosatellit DNA lokusları bakımından benzer genetik yapılanma gözlenmiştir. Elde ettiğimiz temel bilgiler ışığında; *R. tavasensis* türü de dahil bazı gruplarımızda etkili populasyon büyüklüğünün yeterli olmadığı ve bazı lokuslarda anlamlı darboğaz tespit edilmiştir. Genetik uzaklık analizleri sonucunda, coğrafik yapı ile genetik yapı arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, mtDNA bakımından Anadolu dağ kurbağaları iki türe ayrılmıştır. nDNA bakımından ise genetik bir yapılanma göstermemiştir.

2017, 117 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Anadolu Dağ Kurbağaları, mtDNA, Filogenetik, nDNA, Populasyon Genetiği.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF GENETIC VARIATION IN ANATOLIAN MOUNTAIN FROGS

Tuğba ERGÜL KALAYCI

Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Ph. D. Thesis  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

Anatolian mountain frogs (*Rana macrocnemis*, *Rana camerani*, *Rana holtzi* and *Rana tavasensis*) are distributed in some regions of the Caucasus, Iran, Iraq and Anatolia. The studies that indicate the taxonomic status of species in the literature are mostly based on morphological characteristics and there is no population genetic study of this group. In this study, we collected 132 specimens from 31 different populations of Anatolia and phylogenetic and population genetic analyzes were performed based on base sequences of mtDNA (cyt b and COI) and nDNA (RAG1 and POMC) and 6 different microsatellite locus. The high bootstrap and posterior probability values of the Maximum parsimony, Bayesian inferences and Maximum likelihood analyzes of both mtDNA gene regions (for cyt b: 99/1.0/72; MP / BI / MB, for COI: 100/1.0/100; MP / BI / MB) shows that the while *R. tavasensis* species separated from other Anatolian mountain also, no genetic difference was obtained among other Anatolian mountain frogs *R. holtzi*, *R. camerani* and *R. macrocnemis* species. No distinct genetic structuring has been identified among the members of this group in terms of the nDNA genes examined. As a result of the population genetic analysis, a similar genetic structure was observed among Anatolian mountain frogs in terms of microsatellite DNA locus examined. In the light of the basic information we have obtained, including *R. tavasensis* species; in some of our groups, effective population size was not sufficient and significant bottlenecks were identified in some locus. As a result of genetic distance analysis, no significant correlation between geographical structure and genetic structure was found. As a result, Anatolian mountain frogs are divided into two species in terms of mtDNA. In terms of nDNA, it has not shown a genetic structuring.

2017, 117 pages

**Keywords:** Anatolian Mountain Frogs, mtDNA, Phylogenetic, nDNA, Population Genetic.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ .....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
TABLolar DİZİNİ .....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Anadolu Dağ Kurbağalarının Dağılım Alanları.....	3
1.3. Anadolu Dağ Kurbağaları ile İlgili Yapılan Çalışmalar .....	6
1.4. Amfibilerin ve Kökeni.....	15
1.5. Anadolu Biyocoğrafyası .....	16
1.6. Kullanılan Moleküler Belirteçler.....	21
1.6.1. Mitokondriyal DNA ve Yapısı .....	21
1.6.2. Ranidae Familyasında Sıkça Kullanılan mtDNA Gen Bölgeleri.....	22
1.6.2.1. Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I (COI) Geni.....	23
1.6.2.2. Sitokrom b (cyt b) Geni .....	23
1.6.3. Nükleer DNA ve Yapısı .....	24
1.6.4. Ranidae Familyasında Sıkça Kullanılan nDNA Gen Bölgeleri.....	25
1.6.4.1. Rekombinasyon Aktivasyon Geni (RAG1) .....	25
1.6.4.2. Proopiomelanokortin (POMC) Geni .....	26
1.6.5. Mikrosatellitler .....	26
1.7. Filogenetik Analizler .....	29
1.7.1. Evrimsel Analiz için Model Seçimi.....	29
1.7.2. Bootstrapping (Seç-Bağla) Analizi .....	29
1.7.3. Filogenetik Ağaçların Oluşturulması.....	30
1.7.3.1. Maksimum Tutumluluk (Parsimoni) .....	31
1.7.3.2. Maksimum Benzerlik .....	32
1.7.3.3. Bayesiyen Çıkarsama Yaklaşımı.....	32

1.7.4.	Genetik Mesafe .....	33
1.8.	Populasyon Genetiği Analizleri .....	33
1.8.1.	Hardy-Weinberg Dengesi .....	33
1.8.2.	Mesafe İzolasyonu .....	34
1.8.3.	Etkili Populasyon Büyüklüğü ( $N_e$ ) .....	34
1.8.4.	Gen Akışı .....	35
1.8.5.	Darboğaz.....	36
1.8.6.	F istatistiği .....	37
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	39
2.1.	Materyal.....	39
2.2.	Metod.....	44
2.2.1.	Genomik DNA İzolasyonu .....	44
2.2.2.	mtDNA ve nDNA Genlerinin PZR Yardımı ile Çoğaltılması.....	44
2.2.3.	DNA Dizin Analizi .....	45
2.2.4.	mtDNA ve nDNA Verilerinin Analizi.....	46
2.2.5.	Mikrosatellit Fragmentlerin Eldesi.....	49
2.2.6.	Mikrosatellit Verilerinin Analizi.....	51
3.	BULGULAR .....	55
3.1.	Filogenetik Analizler .....	55
3.1.1.	cyt b Gen Bölgesi Dizin Analizi .....	55
3.1.2.	COI Gen Bölgesi Dizin Analizi .....	61
3.1.3.	Nükleer DNA Gen Bölgelerinin Dizin Analizi.....	67
3.1.3.1.	RAG1 Gen Bölgesi Dizin Analizi .....	67
3.1.3.2.	POMC Gen Bölgesi Dizin Analizi.....	70
3.2.	Mikrosatellit DNA Verilerinin Analizi.....	73
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR .....	87
5.	ÖNERİLER .....	99
	KAYNAKLAR .....	100
	ÖZGEÇMİŞ .....	117



## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** IUCN Kırmızı Listesi veri tabanına göre *R. macrocnemis* ve *R. camerani* türü dağılım alanı ..... 4
- Şekil 2.** IUCN Kırmızı Listesi veri tabanına göre *R. holtzi* türü dağılım alanı ..... 5
- Şekil 3.** IUCN Kırmızı Listesi veri tabanına göre *R. tavasensis* türü dağılım alanı ... 5
- Şekil 4.** Picariello vd. (2016) S1 satellit DNA farklılıklarına göre örnekleme alanlarındaki Anadolu dağ kurbağaları türlerinin taksonomik durumu (*R. macrocnemis*) (1:Bursa 2:Eskişehir 3:Bolu 4:Amasya 5:Kayseri 6:Karagöl;Ereğli 7:Erzurum 8:Kars 9:Bitlis 10:Van 11:Denizli 12: Afyon) 14
- Şekil 5.** Veith vd. (2003) 16S rRNA gen bölgesi sonucuna göre örnekleme alanlarındaki Anadolu dağ kurbağaları türlerinin taksonomik durumu (*R. macrocnemis*, *R. tavasensis*) (1:Denizli 2:Bursa 3:Konya 4:Aksaray 5:Niğde 6:Mersin 7: Adana 8:Osmaniye 9:Kahramanmaraş 10:Kayseri 11:Van 12:Artvin 13:Rize 14:Giresun 15:Gümüşhane 16:Giresun 17:Kastamonu 18:Sinop) ..... 14
- Şekil 6.** Batı Akdeniz bölgesi tektonik (neotektonik bölgeler) harita taslağı (Robertson vd., 2012) ..... 17
- Şekil 7.** A. Oligosen'deki Türkiye'nin paleocoğrafik haritası B. Miyosen'deki Türkiye'nin paleocoğrafik haritası C. Pliyosen'deki Türkiye'nin paleocoğrafik haritası D. Türkiye'nin şimdiki zamandaki tektonik haritası (Gürer ve Gürer, 1999)..... 19
- Şekil 8.** Türlerin Anadoluya giriş yolları (Demirsoy, 2008) ..... 20
- Şekil 9.** Mitokondriyal DNA dizilimi (17.804 bç) (Sumida vd., 2001) ..... 22
- Şekil 10.** Kurbağalarda mitokondriyal Sitokrom oksidaz alt ünite I geni primerleri baz dizisi pozisyonları (Hillis vd., 1998)..... 23
- Şekil 11.** Kurbağalarda mitokondriyal cyt b geni primerleri baz dizisi pozisyonları (Hillis vd., 1998)..... 24
- Şekil 12.** Nükleer RAG1 genin yapısı (Temel çekirdek bölge koyu gri ile belirtilmiş (384-1008) ve proteinin N-terminal sonlanması ilk önce RING motifi ile tanımlanmış bunu WW-like alanı takip etmiştir) (Maitra ve Sadofsky, 2009)..... 25
- Şekil 13.** Nükleer POMC geninin yapısı ve şimdiye kadar tanımlanmış bütün homozigot ve heterozigot bileşikleri (Farooqi vd., 2006)..... 26
- Şekil 14.** Bir populasyondaki homozigot ve heterozigot bireylere ait mikrosatellit lokuslarının PZR görüntüsü (Korkmaz Ağaoğlu ve Ertuğrul, 2010)..... 27

<b>Şekil 15.</b>	Bazı ana faktörler tarafından etkilenen populasyon içinde genetik farklılık seviyelerinin gözden geçirilmesi (Freeland, 2005).....	35
<b>Şekil 16.</b>	Adana İnderesi lokalitesinden örneklenen <i>R. macrocnemis</i> türüne ait birey. ....	40
<b>Şekil 17.</b>	Van Bahçesaray lokalitesinden örneklenen <i>R. camerani</i> türüne ait birey....	40
<b>Şekil 18.</b>	Mersin Yanpınar lokalitesinden örneklenen <i>R. holtzi</i> türüne ait bireyler....	41
<b>Şekil 19.</b>	Denizli Çakıroluk lokalitesinden örneklenen <i>R. tavasensis</i> türüne ait birey.....	41
<b>Şekil 20.</b>	Örnekleme yapıldığı lokaliteler ( <i>R. macrocnemis</i> , <i>R. camerani</i> , <i>R. holtzi</i> , <i>R. tavasensis</i> ). ....	44
<b>Şekil 21.</b>	Bioedit programı ile hizalanmış sekans dizileri.....	46
<b>Şekil 22.</b>	PZR ile çoğaltılmış mikrosatellit lokuslarının agaroz jeldeki görünümü ....	51
<b>Şekil 23.</b>	GeneMarker programında mikrosatellit lokuslarının görüntülenmesi.....	53
<b>Şekil 24.</b>	GeneMarker programında mikrosatellit lokuslarının görüntülenmesi.....	54
<b>Şekil 25.</b>	cyt b gen bölgesi haplotip ağı .....	57
<b>Şekil 26.</b>	Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin cyt b genine dayalı filogenetik ağacı (MP/BI/MB).....	59
<b>Şekil 27.</b>	COI gen bölgesi haplotip ağı .....	63
<b>Şekil 28.</b>	Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin COI genine dayalı filogenetik ağacı (MP/BI/MB).....	65
<b>Şekil 29.</b>	RAG1 gen bölgesi haplotip ağı.....	69
<b>Şekil 30.</b>	Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin RAG1 genine dayalı filogenetik ağacı (MB).....	69
<b>Şekil 31.</b>	POMC gen bölgesi haplotip ağı.....	72
<b>Şekil 32.</b>	Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin POMC genine dayalı filogenetik ağacı (MB).....	72
<b>Şekil 33.</b>	Populasyonlar arası alelik dağılım grafiği .....	77
<b>Şekil 34.</b>	Populasyonlara ve lokuslara göre alel frekansları .....	78
<b>Şekil 35.</b>	Anadolu dağ kurbağaları gruplarının populasyon genetik yapılarını gösteren Structure bar grafiği.....	83
<b>Şekil 36.</b>	Coğrafik mesafe mekânsal yapı analizi .....	84

- Şekil 37.** Anadolu dağ kurbağalarında temel koordinat analizine göre mikrosatellit varyasyonu (E: Eğriğöl, YP: Yanpınar, K: Karağöl, M: Murgul, B: Balıklığöl..... 85
- Şekil 38.** Genetik uzaklık ve coğrafik uzaklığın arasındaki ilişkinin grafiği..... 85
- Şekil 39.** Mikrosatellit lokuslarından oluşturulan UPGMA dendogramı..... 86



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Anadolu dağ kurbağaları örneklerine ait lokalite bilgileri.....	43
<b>Tablo 2.</b>	mtDNA ve nDNA primerlerinin baz dizileri ve PZR koşulları.....	45
<b>Tablo 3.</b>	mtDNA (Cyt b ve COI) ve nDNA (POMC ve RAG1) gen bölgeleri analizlerinde kullanılan birey sayısı (n=birey sayısı) .....	47
<b>Tablo 4.</b>	Çalışmada kullanılan mikrosatellit primerler ve özellikleri.....	50
<b>Tablo 5.</b>	Mikrosatellit primerlerinin baz dizilimi.....	50
<b>Tablo 6.</b>	cyt b gen bölgesi haplotip dağılımı .....	56
<b>Tablo 7.</b>	cyt b gen bölgesine göre gruplar arası AMOVA varyasyon değerleri.....	60
<b>Tablo 8.</b>	cyt b gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri.	61
<b>Tablo 9.</b>	COI gen bölgesi haplotip dağılımı .....	62
<b>Tablo 10.</b>	COI gen bölgesine göre gruplar arası AMOVA varyasyon değerleri.....	66
<b>Tablo 11.</b>	COI gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri..	67
<b>Tablo 12.</b>	RAG1 gen bölgesi haplotip dağılımı .....	68
<b>Tablo 13.</b>	RAG1 gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri .....	70
<b>Tablo 14.</b>	POMC gen bölgesi haplotip dağılımı .....	71
<b>Tablo 15.</b>	POMC gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri .....	73
<b>Tablo 16.</b>	Gruplara göre mikrosatellit lokuslarının birey sayısı (N), alellik zenginlik (AZ), alel sayısı (AS), gözlenen ( $H_G$ ) ve beklenen ( $H_B$ ) heterozigotluk, soyiçi üreme ( $F_{IS}$ ), Hardy-Weinberg dengesine dayalı alel sıklığı anlamlılığı (p) ve nul alel (NA) değerleri .....	75
<b>Tablo 17.</b>	$F_{ST}$ (alt diyagonal) ve $R_{ST}$ (üst diyagonal) değerleri.....	79
<b>Tablo 18.</b>	Bonferroni doğrulaması yapılmamış $F_{ST}$ (alt diyagonal), ENA doğrulaması yapılmış $F_{ST}$ (üst diyagonal) değerleri .....	79
<b>Tablo 19.</b>	Anadolu dağ kurbağaları popülasyonları arasındaki gen akışını gösteren $N_m$ değerleri .....	80
<b>Tablo 20.</b>	Mikrosatellit lokuslarına göre gruplar ve popülasyonlar arasında varyans analizi değerleri (AMOVA) .....	80
<b>Tablo 21.</b>	Anadolu dağ kurbağa gruplarının etkili popülasyon büyüklüklerinin ( $N_e$ ) karşılaştırılması .....	81
<b>Tablo 22.</b>	Anadolu dağ kurbağaları darboğaz varlığı anlam sıklığı değerleri ( $p<0,05$ ).....	81
<b>Tablo 23.</b>	Anadolu dağ kurbağa gruplarına ait heterozigotluk başarısı ( $H_e$ ) ve başarısızlık ( $H_d$ ) değerleri.....	81

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
bç	Baz Çifti
BI	Bayesian Inference
C	Sitozin
COI	Sitokrom Oksidaz
CTP	Sitidin Trifosfat
cyt b	Sitokrom b
ddH <sub>2</sub> O	Distile su
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dATP	Adenozin Trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleotit Trifosfat
EM	Expectation Maximization
F <sub>ST</sub>	Fiksasyon İndeksi
G	Guanin
GTR	General Time Reversible
GTP	Guanozin Trifosfat
Hd	Haplotip çeşitliliği
HKY	Hasegawa, Kishino and Yano
IUCN	International Union for Conservation of Nature
km	Kilometre
lnL	Log-likelihood
m	Metre
MB	Maksimum Benzerlik
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
Mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
ml	Mililitre

MP	Maksimum Tutumluluk
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NA	Nul Alel Değeri
NaCl	Sodyum Klorür
nDNA	Nükleer DNA
PAUP	Pylogenetic Analysis Using Parsimony Program
PCoA	Principal Coordinates Analysis
Pi	Nükleotit Çeşitliliği
POMC	Proopiomelanokortin Geni
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAG1	Rekombinasyon-aktivasyon 1 Geni
RNA	Ribo Nükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS-Page	Sodyum Dodesil Sülfat poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMM	Stepwise Mutation Model
T	Timin
TAE	Tris-acetate-EDTA
TPM	Two Phase Model
TTP	Timidin Trifosfat
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	Ultraviyole

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Canlıların fenotipik özelliklerine bakılarak yapılan sınıflandırma halen kullanılmasına rağmen, bu özellikler birbirine çok benzeyen organizmaların ayrılmasında ve canlıların filogenetik akrabalıklarının çıkarılmasında başarılı olamamaktadır. Bu tip problemlerin çözümlerinde genomik ilişkilerin kullanılması çok daha fazla fayda sağlamaktadır. Genetik yöntemler, özellikle türlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin incelenmesi ve tür tayini gibi konularda morfolojik, ekolojik ve davranışsal özelliklere ek olarak kullanılarak morfolojik olarak ayırt edilemeyen, birbirine yakın türlerin keşfedilmesini sağlamıştır (Wilcox vd., 1997; Rocha-Olivares vd., 1999; Johnson ve Cicero, 2004; Lee ve Foighil, 2004). Ayrıca endemik ve tehdit altındaki türlerin filocoğrafik öykülerinin ve populasyonların genetik farklılaşmalarının tanımlanması için genetik çalışmalar önem arz etmektedir. Ülkemizde ise amfibi populasyonlarının genetik yapıları ve coğrafik uzaklıkları arasındaki ilişkileri inceleyen çalışmalar az sayıdadır (Veith vd., 2003; Akın vd., 2010; Gvozdik vd., 2010; Gül vd., 2012).

Ülkemizde yüksek rakımda yaşayan amfibilerden olan Anadolu dağ kurbağaları (kahverengi kurbağalar olarak da adlandırılmaktadırlar) grubuna ait türlerin ilk ayrımları; vücut kısımları, desen renklenmeleri ve deri yapısı farklılıklarına göre yapılmıştır (Baran ve Atatür, 1986). *Rana* cinsine ait Anadolu dağ kurbağaları Türkiye'nin dağlık alanlarında, Kafkasya yarımadası, Kuzey İran ve muhtemelen Kuzey Irak'ta dağılım göstermektedir (Çevik vd., 2006). Anadolu'da bu grubu temsil eden türler; *Rana macrocnemis* (Boulenger, 1885), *Rana camerani* (Boulenger, 1886), *Rana holtzi* (Werner, 1898) ve *Rana tavasensis*'tir (Baran ve Atatür, 1986). IUCN'in Kırmızı listesine göre bu türlerden *Rana holtzi* kritik tehlikede ve *Rana tavasensis* tehlike altındaki endemik taksonlardandır (Olgun vd., 2009; Kaska vd., 2009 IUCN Kırmızı listesi).

Anadolu dağ kurbağalarının taksonomik durumu 1900'lü yılların başından beri sorgulanmaktadır (Franzen vd., 2008). Bu grup; morfolojik olarak birbirine benzeyen

türler olan (Frost, 1985) yayılım alanı Palearktik bölge olan kahverengi kurbağaların Anadolu ayağını oluşturmaktadır. Bu türlerin taksonomik durumu hakkında birçok çalışma yapılmıştır (Boulenger, 1898; Bodenheimer, 1944; Baran, 1969; Baran ve Atatür, 1986; Ishchenko, 1978, 1987; Tarkhnishvili vd., 1999; Tarkhnishvili ve Gokhelasvili, 1999; Picariello vd., 1999; Tarkhnishvili vd., 2001), ancak bu çalışmalarla türleşme ve yayılış alanlarının sınırları konusunda kesin bir bilgiye varılamamıştır. Hatta grubun taksonomik durumunu belirleyen IUCN'in Kırmızı Listesinde de atıf yapılan çalışmalarda dahi (Veith vd., 2003; Çevik vd., 2006) türlerin isimlendirilmesinde farklılıklar mevcuttur.

16S haplotiplerine dayanarak Anadolu'dan farklı coğrafik lokasyonlarından alınan 30 populasyon ile yapılan çalışmada Veith vd., (2003); *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi* taksonlarının aynı haplotipik soy ile temsil edildiğini belirtmiştir. Bu çalışmaya göre, *Rana macrocnemis* ve *Rana tavasensis* olmak üzere Anadolu'da iki farklı tür tanımlanmıştır. Aynı çalışmada, *R. macrocnemis* ve *R. camerani* ile aynı haplotipik soyda çıkan *R. holtzi* bazı veri tabanlarında ayrı tür olarak kategorize edilmektedir, bu yüzden *R. holtzi*'nin taksonomik durumu tekrar ele alınması gerekmektedir. Planlanan bu çalışma ile mtDNA ve nDNA gen bölgeleri kullanılarak bu durum incelenecektir.

Veith vd., (2003)'ten farklı olarak, Çevik vd. (2006) *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi* türlerinin tanımlandığı lokalitelerden (Uludağ, Erciyes Dağı ve Karagöl) alınan örneklerin morfolojik özellikleri ve serum protein elektroforez ayrımlarına dayanarak, Anadolu'da *R. holtzi* ve *R. macronemis* olmak üzere iki farklı türün yaşadığını bildirmişlerdir. Bahsi geçen çalışmada *R. camerani* (Erciyes Dağı) türünün *R. macrocnemis*'in sinonimi olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmiş fakat *R. tavasensis*'e dair bilgi verilmemiştir. Ayrıca, çalışılan lokalite sayısı türlerin dağılım alanları ile ilgili kesin bir yargıya ulaşmak için yeterli olmamaktadır.

Literatürde yer alan bu iki çalışmada (Veith vd., 2003; Çevik vd., 2006) bahsedilen uyuşmazlıklar göze alınarak; Anadolu dağ kurbağalarına ait bu karmaşıklığa Türkiye'den 31 farklı lokaliteden alınan toplam 132 bireyin 6 farklı mikrosatellit lokus polimorfizmi ve bunlara ek olarak; iki mitokondriyal DNA bölgesi [Sitokrom b (cyt b) ve Sitokrom oksidaz (COI)] ve iki nükleer DNA [Rekombinasyon-aktivasyon geni 1



(RAG1) ve Proopiomelanokortin geni (POMC)] gen bölgeleri ile açıklık getirmek hedeflenmiştir.

Bu tür grubuna ait mikrosatellit belirteçler ile populasyon genetik yapısını belirleyici bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Populasyonun yapısını belirlemek adına daha önce yapılan çalışmalar markala-tekrar yakala metoduna dayalı çalışmalardır (Yıldız, 2010; Çapar ve Başkale; 2016). Allozim ve mtDNA çalışmaları populasyon yapısını tespit etmek için daha etkili sonuçlar sağlasada, ayrıca bu genetik düşünce içinde daima bir boşluk vardır (Wright, 1951; Mills ve Allendorf, 1996). Mikrosatellitlerin (nDNA belirteçleri) incelenmesiyle bu boşluklar kapanmaya başlamıştır.

Bu tez çalışması ile Anadolu'da dağılım gösteren bu gruba ait türlerin populasyonlarının genetik yapısı ilk kez mikrosatellit DNA belirteçleri ile ortaya konulacaktır. Mikrosatellit verileri özellikle fenotipik farklılık ve benzerlik içeren türleri ayırmak için kullanılmaktadır (Luquet vd., 2015). Populasyon farklılaşması veya filocoğrafya gibi birçok çalışmada kullanılan mikrosatellit belirteçler farklı uzunluklarda DNA'ya ait kısa tekrar dizileri olarak tanımlanmaktadır. Omurgalı genomuna özgü ve genellikle yüksek derecede polimorfizm göstermektedirler (Beckmann ve Weber, 1992). Düşük maliyette kolay çoğaltım özelliği mikrosatellitleri farklı birçok genetik çalışmalarında kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır. Amfibiler ile ilgili mikrosatellit çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Jehle ve Arntzen, 2002).

Sonuç olarak; bu çalışmada Anadolu dağ kurbağalarına ait tür olarak tanımlanmış birimlerin filogenetik yapıları arasındaki ilişkinin ilk defa kullanılacak nükleer ve mitokondriyal DNA belirteçleri tarafından yeniden yapılandırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, gruba ait türlerin populasyonlarının genetik yapıları ilk defa mikrosatellit belirteçler ile ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

## **1.2. Anadolu Dağ Kurbağalarının Dağılım Alanları**

*R. macrocnemis*, Kafkasya'da ve Anadolu'nun birçok bölgesinde bulunmaktadır. Rusya'nın Stavropolskii bölgesindeki Strizhament Dağ'ında izole bir populasyonu

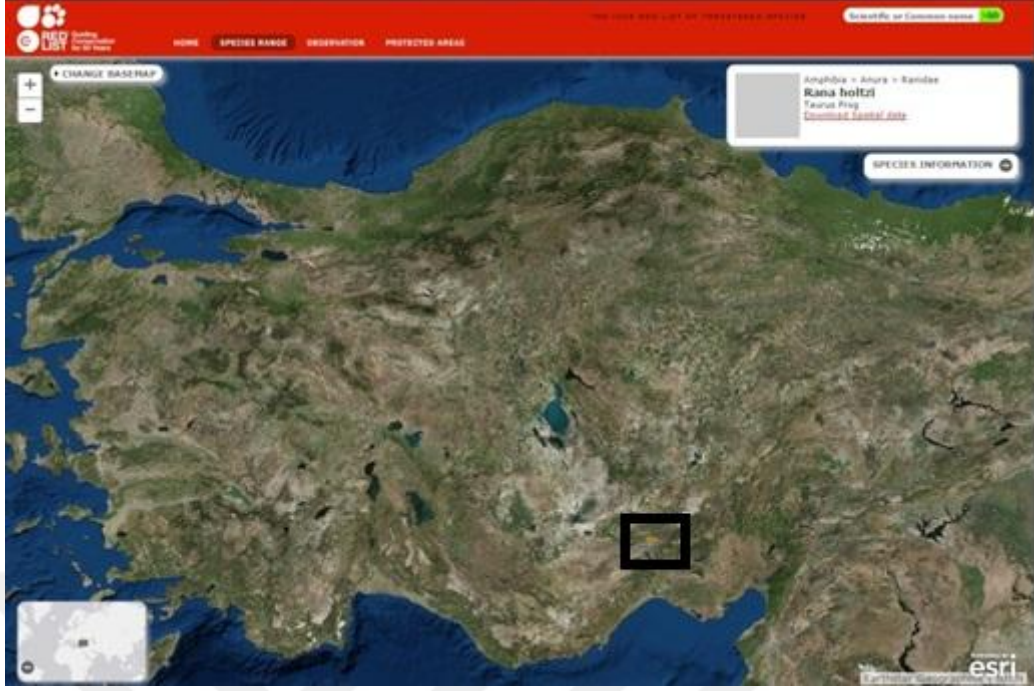
bulunmaktadır. Ayrıca Irak'da da kayıt gösterilmiştir (Kevork, 1972), fakat bu popülasyona ait daha fazla detay gerekmektedir ve IUCN haritasına dahil edilmemiştir. Bu tür deniz seviyesinden 3000 m rakıma kadar bulunan alanlarda dağılım gösterebilir (Kuzmin vd., 2009 IUCN Kırmızı Listesi).



**Şekil 1.** IUCN Kırmızı Listesi veri tabanına göre *R. macrocnemis* ve *R. camerani* türü dağılım alanı

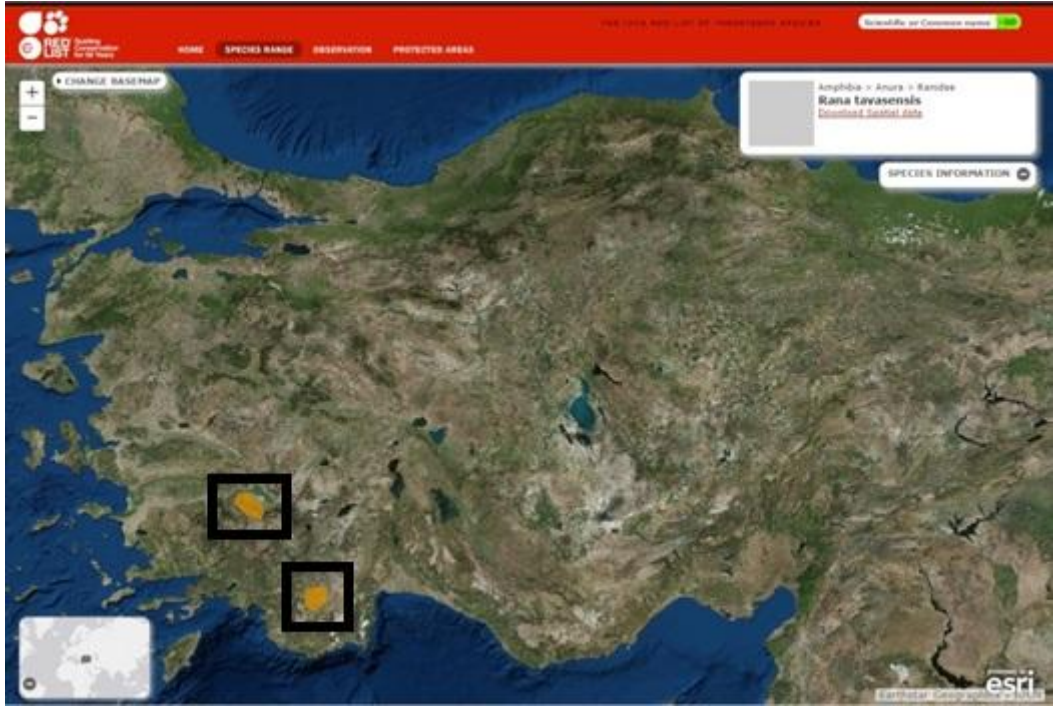
*R. camerani*, IUCN'in Kırmızı listesine göre *R. macrocnemis* türünün türdeşi olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca bu türün taksonomik statüsüne dair devam eden bir tartışmanın varlığından bahsedilmiştir (Kuzmin vd., 2009 IUCN Kırmızı Listesi).

*R. holtzi*, Türkiye'nin güneyinde Toros Dağları sınırları içerisinde yer alan Bolkar Dağı'na endemik bir türdür. Bu bölge sınırları içerisinde Karagöl (2500 m), Çiniligöl (2600 m) ve Eğrigöl (Karagöl'ün 16 km güneydoğusu, 3000 m)'de kayıtlarına rastlanmaktadır. Bu küçük bölge içerisinde gelişigüzel yayılım göstermektedir. Görünüşe göre bu tür için uygun habitat koşulları, Bolkar Dağlar'ındaki Çinili Göl gibi yüksek rakımlı alanlardan oluşmaktadır (Olgun vd., 2009 IUCN Kırmızı Listesi).



Şekil 2. IUCN Kırmızı Listesi veri tabanına göre *R. holtzi* türü dağılım alanı

*R. tavasensis* ise Türkiye'ye endemik bir tür olarak sadece Akdağ (Tavas, Denizli) ve Girdev Gölü ile onun yakınındaki Elmalı'nın batısında bulunmaktadır (Franzen vd., 2008). Akdağ lokasyonunda, Kızılcabölük kasabasında dere kenarlarında da bulunmuştur (Kaska vd., 2009 IUCN Kırmızı Listesi).



Şekil 3. IUCN Kırmızı Listesi veri tabanına göre *R. tavasensis* türü dağılım alanı

Bununla birlikte; IUCN'in Kırmızı listesi Anadolu dağ kurbağalarına ait 3 türü (*R. macrocnemis*, *R. holtzi* ve *R. tavasensis*) sistematik olarak tür kategorisinde değerlendirirken, amfibiler ile ilgili diğer bir veri tabanı olan "Amphibiaweb" ise Veith vd. (2003) çalışmasını temel alarak sadece *R. macrocnemis* ve *R. tavasensis* türlerinin bu grubu temsil ettiğini belirtmiştir (URL-1). *R. camerani* türünün ise; *R. macrocnemis* türünden farklı olarak ne coğrafik, ne morfolojik ne de üreme izolasyonuna sahip olduğunu ve başka araştırmacıların bahsettiği küçük morfolojik farklılıkları (bacak uzunluğu, vücut şekli vb.) ekolojik ve genetik faktörlerin sebep olduğunu bildirmişlerdir (URL-2). *R. holtzi* türünden ise sistematik olarak hiç bahsedilmemiştir.

### 1.3. Anadolu Dağ Kurbağaları ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Anadolu dağ kurbağaları hakkındaki taksonomik çalışmalar; *R. macrocnemis*'in Uludağ'da tanımlanması ile başlamıştır (Boulenger, 1885). Diğer bir tür olan *R. camerani*; Kafkasya'da Tabizhuri Gölü'nde ve Akhalkalaki'de tanımlanmıştır (Boulenger, 1886) ve daha sonra Anadolu'da Erciyes Dağ'ından da rapor edilmiştir (Werner, 1902). Bu türlerin tanımlanması, vücut kısımları, renk-desen farklılıkları ve deri yapısına göre yapılmıştır. Üçüncü bir tür olan *R. holtzi* ise Güney Anadolu'da Toros'lar da yer alan Maden Gölü'nde tanımlanmıştır (Werner, 1898).

Boettger (1892), Kafkasya'nın çeşitli bölgelerinde *R. macrocnemis* ve *R. camerani* türlerinin simpatrik yaşadığını bildirmiştir. Werner (1904) ise, Batı Anadolu'da yaptığı çalışmada Gökçekısıık (Eskişehir)'ta topladığı örnekleri *R. macrocnemis* olarak tanımlamış ve türe ait morfolojik özelliklerden bahsetmiştir.

Tanımlamaların ve türe ait önceki herpetofauna çalışmalarının ardından üç Anadolu Dağ kurbağasının taksonomik durumu farklı araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Boulenger (1898), *R. holtzi*'nin *R. camerani* ile sinonim olduğunu rapor etmiştir. Bu sonuç Werner (1902) tarafından da kabul edilmiştir. Bu türe ait çok sayıda örnek incelendikten sonra Werner (1914) *R. holtzi*'nin ayrı bir tür olduğunu bildirmiştir. Lantz ve Cyren (1913) ve Bodenheimer (1944); *R. camerani*'nin *R. macrocnemis* ile aynı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca Bodenheimer (1944) yaptığı çalışmada *R. holtzi* türünün bu iki türden (*R. macrocnemis* ve *R. camerani*) farklarını belirtmiştir. *R. holtzi*

türünü daha büyük baş genişliğine, çok koyu sırt beneklenmesine ve vücudun dorsalinde açık renkli vertebral şeridin belirtisinin bulunmayışı ile *R. camerani*'den ayırmıştır. Araştırmacı aynı çalışmasında Werner'in (1898) *R. holtzi*'e ait tür tanımlamasına da yer vermiştir. Buna göre; *R. holtzi*'nin *R. macrocnemis* ve *R. camerani* ile benzer olmasına rağmen geniş interorbital aralığı, daha büyük arka ayak uzunluğu, kulak zarı ve göz arası mesafenin daha kısa olması ve iki dorsolateral kıvrımın arasındaki mesafenin daha kısa olması ile bu iki türden ayrılmaktadır. Delwig (1928)'e göre ise *R. macrocnemis* ve *R. camerani* aynı türün lokal alt türleridir. Terent'ev ve Chernov (1949) bu iki türü birbirinden farklı bulurken, farklı araştırmalar ise (Başoğlu ve Helmich, 1959, 1970; Eiselt, 1965) bu karmaşıklığın açığa çıkması için daha çok sayıda materyalin incelenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bird (1936) ise yaptığı çalışmada Türkiye'ye ait gözlemlerini bildirmiş ve *R. macrocnemis*'in dağılım alanı olarak, Olympus (Antalya), Akşehir'i (Bursa); *R. camerani*'nin dağılım alanı olarak, Alayund, Maden gölü, Akşehir ve Erciyes Dağını, *R. holtzi*'nin dağılım alanı olarak, Maden Gölü ve Toroslar bildirmiştir.

Mertens (1952), Uludağ (Bursa)'dan aldığı 4 adet *R. macrocnemis* örneğini ve Erciyes (Kayseri)'den aldığı 3 adet *R. camerani* örneğini inceleyerek taksonomik değerlendirmeler yapmıştır ve Rus herpetologlar Lantz ve Cyren'in (1913) tespitlerinin hatalı olduğunu, *R. camerani* ve *R. macrocnemis*'in ayrı birer tür olduklarını belirtmiştir. Fakat daha kesin bir sonuç için daha fazla materyalin incelenmesi gerektiğinden de bahsetmiştir.

Eiselt (1965), Anadolu'nun Kuzey doğusunda yaptığı çalışmada, *R. macrocnemis* ve *R. camerani* örneklerinin ekolojik ve yaşam alanı özelliklerini araştırmıştır. Ordu ilinin Ulubey ilçesindeki örnekleri *R. macrocnemis* olarak tanımlayan araştırmacı, aynı ilin Yeşilce ilçesinden topladığı örnekleri *R. camerani* olarak tanımlamıştır. Fakat araştırmacı bu iki lokaliteden toplanan örneklerin birbirine morfolojik olarak benzer olduğundan bahsetmiştir. Ayrıca Yalnızçam (Kars) ve Karagöl (Trabzon) lokalitelerinden topladığı örneklerin habitat özelliklerini inceleyerek bu örnekleri *R. camerani* olarak tanımlamıştır.

Baran (1969) ve Özeti (1970) Anadolu dağ kurbağalarına ait birçok örneğin morfolojik karakterlerini ve kemik yapılarını çalışmış ve Türkiye’de üç farklı türün (*R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi*) varlığından söz etmişlerdir.

Baran ve Atatür (1986) Sultan Dağları, Uludağ, Türkmen Dağı, Murat Dağı, Bozdağ, Alaçam Dağı, Akdağ, Sündiken Dağı, Muş, Bitlis ve Erciyes’ te nominat alttür olan *R. macrocnemis macrocnemis*’in, Akdağ (Denizli)’ da ise yeni bir alt tür olarak *R. macrocnemis tavasensis*’in dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu kayıt ile birlikte “*tavasensis*” türünün varlığından literatürde ilk defa bahsedilmiştir. Veith vd. (2003)’nin çalışmasından sonra “*tavasensis*” tür olarak değerlendirilmeye başlamıştır. Bunun sonucunda Anadolu dağ kurbağalarına ait taksonların sayısı 4’e yükselmiştir.

Uğurtaş (1989), Yılmaz (1989) ve Baran vd., (1992) yaptıkları çalışmalarda *R. macrocnemis* ve *R. camerani* türlerinin Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi’ndeki dağılımlarına ait karışıklıktan bahsetmişler ve bölgede ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekliliği vurgulamışlardır.

Ishchenko (1978, 1987) ise *R. camerani*’nin ne ayrı bir tür olduğunu ne de bir alttür olduğunu rapor etmiştir. Kafkasya’da sadece *R. macrocnemis*’in var olduğunu ve çok sayıda monotipik türe sahip olduğunu belirtmiştir. Teynie 1987-1989 yılları arasında Türkiye’de yaptığı arazi çalışmasında *R. camerani* ve *R. holtzi*’ye ait dağılım alanlarını belirtmiştir. Buna göre Murat Dağlarından (1828 m., Bingöl), Palandökenden (2300 m., Erzurum), Erzurum’un 30 km. kuzeyinde, Ardahan’da (2000 m.) ve Kars’ta (1950 m.) *R. camerani* türünün varlığından söz etmiştir. Maden Gölü ve Bolkar Dağlarında ise *R. holtzi* türünün varlığından bahsetmiştir. Bu çalışmada araştırmacının *R. camerani*’yi tür statüsünde ele aldığını görmekteyiz (Teynie, 1991). Schmidtler vd. (1990) Türkiye’nin güneyindeki Bolkar Dağları’nın subalpin bölgesinde yaptıkları çalışmada *R. holtzi* türüne ait taksonomik durum ve ekolojik özellikler tanımlanmış, kendilerinin çalışması ile daha aşağı bölgelerde *R. macrocnemis* türünün de varlığından söz etmişlerdir. Kumlutaş ve Tok (1998) ise yaptıkları herpetofauna çalışmasına göre; Giresun’un Bulancak ilçesinde tespit ettikleri örnekleri *R. macrocnemis* olarak tayin etmişlerdir.

Tarkhnishvili vd. (1999) ile Tarkhnishvili ve Gokhelasvili (1999) *macrocnemis* ve *camerani*'nin *R. macrocnemis*'e ait iki coğrafik alt tür olduğundan bahsetmişlerdir. Bu iki alt tür arasında deri yapısı, vertebral şeridin durumu ve metatarsal tüberkül büyüklüğü bakımından fark olduğunu bildirmişlerdir. *R. m. camerani*'de deri granüllü, dorsal lekelenmeler ayrı, vertebral şerit mevcut ve metatarsal tüberküller daha büyük, *R. m. macrocnemis*'in ise derisinin kaygan, dorsal lekelenmenin belirsiz, vertebral şeritinin olmadığı ve metatarsal tüberkülünün küçük olduğu rapor edilmiştir. Tarkhnishvili vd. (1999)'ne göre; sekiz ayırt edilebilir morfolojik karakterleriyle Kafkasya'da iki coğrafik takson bulunmaktadır; *R. m. macrocnemis* ve *R. m. camerani*.

Picariello vd. (1999), Anadolu dağ kurbağalarını (*R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi*) S1 satellit DNA ve morfolojik farklılıklarına göre incelemiş ve *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi*'nin tek bir tür olduğunu bildirmişlerdir.

Tarkhnishvili vd. (2001), yaptıkları çalışmada *R. macrocnemis* ve *R. camerani*'e ait mtDNA, allozim ve morfolojik verileri karşılaştırmış ve batı Kafkasya'nın güneyinde sınırlı alanda yüksek derecede benzer türler olduğunu belirtmişlerdir. Kalan dağılım alanlarında ise bu formların hibridizasyonlarından, bir ya da daha fazla karakteristiğinde dereceli varyasyonlar gözlemlenmiştir. Bu çalışmada; ilk defa *R. macrocnemis* ve *R. camerani* arasında hibridize formlardan bahsedilmiş ve bu iki türe ait Kafkasya'da kesin sınırlar çizilmiştir. Fakat bahsedilen iki tür için ülkemizde kesin bir sınır hattı çizilememiştir.

Arıkan vd. (2001), Orta Toroslarda Çamlıyayla, Bolkar ve Aladağ Dağlar'ından elde ettikleri dağ kurbağası örnekleri arasında belirgin morfolojik ve serolojik farklılığın olmadığını göstermişler ve sadece bazı desenlenme ve renklenme farklılıklarının mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Kutrup (2001) ise Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Artvin'e bağlı Murgul ilçesinde yaptığı herpetofauna çalışmasında bölgede *R. macrocnemis* türünün varlığından bahsetmiştir.

Özdemir ve Baran (2002), Kütahya ve Uşak illeri arasında uzanan Murat Dağı'nda yaptıkları herpetolojik çalışmada topladıkları dağ kurbağası örneklerini daha önceki çalışmalardan elde ettikleri Anadolu dağ kurbağalarına ait vücut ölçüm değerleri

ile karşılaştırmış ve bu bireylerin *R. macrocnemis* türüne ait olduklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca dağın kuzey ve güney tarafından topladıkları bireylerin renklenme ve çene veya boğaz granüllerinin bulunması bakımından farklı olduklarını tespit etmişlerdir. Fakat mevcut farklılığın bu iki popülasyonu farklı türler olarak değerlendirmeye yetmeyeceğini belirtmişler ve ayrıca bireylerin Murat Dağı'na en yakın bölge olan Akdağ'da yaşayan *R. tavasensis* türünden de belirgin derecede farklı olduklarını bildirmişlerdir.

Olgun vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada Orta Toroslar'da yaşayan Anadolu dağ kurbağaları popülasyonları arasında morfolojik ve serolojik yönden bir farklılık bulunamamıştır. Fakat, Karagöl ve Çinigöl popülasyonları vertebral şeridin bulunmayışı ve farklı sırt desen özellikleri ile diğer popülasyonlardan ayrılarak *R. holtzi* olarak değerlendirilmiştir. Ancak aynı çalışmada, bu farklılığın tür seviyesinden ziyade alttür seviyesinde olduğu vurgulanmıştır.

Veith vd. (2003), karşılaştırmalı morfolojinin *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi* türlerinin evrimsel bağlantılarını incelemede uygun bir araç olmadığını belirtmişlerdir. Mitokondriyal DNA'nın 16S bölgesine ait farklılıkları inceleyen bu araştırma, bu tür grubuna dair ilk detaylı genetik çalışmadır. Ayrıca *R. tavasensis* türünün geçerliliği bu çalışmadan sonra kesinlik kazanmıştır. Veith vd. (2003)'nin bu çalışmasında göre, Anadolu'da farklı 2 tür yaşamaktadır: *R. macrocnemis* ve *R. tavasensis*. Ayrıca bu çalışmada Anadolu'daki buzul dönemlerin türlerin ayrılmasındaki etkin rollerinden bahsedilmiştir. Bunun sonucu olarak güney batı sığınağında kalan *R. tavasensis* türünün farklı izolasyon mekanizmaları sonucunda nasıl farklılaştığına dair bilgiler sunulmuştur. Fakat araştırmacılar, bu yeni türün coğrafik olarak en yakın farklı türe ait popülasyonlarla arasındaki genetik farklılıklardan bahsetmemişlerdir. Ayrıca, bu gruba ait popülasyonların genetik yapısı hakkında da bilgi sağlamamışlardır.

Kumlutaş vd. (2004), batı Anadolu'da bulunan Bozdağ'ın herpetofaunasını araştırmış ve bu bölgede bulunan Anadolu dağ kurbağalarını *R. macrocnemis* olarak tanımlamışlardır.

Çevik vd. (2006); Uludağ, Erciyes Dağı ve Karagöl'de yaşayan dağ kurbağalarını



morfolojik karakterler ve serum protein elektroforez özelliklerine göre incelemiş ve *R. holtzi*'nin ayrı bir tür olarak tanımlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada Anadolu'da *R. holtzi* ve *R. macrocnemis* türlerinin varlığından söz edilmektedir. Ayrıca Çevik vd. (2006) tarafından Kafkasya'daki örneklerin taksonomik olarak tekrar gözden geçirilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Bahsedilen çalışma, *R. tavasensis*'e ait taksonomik durum bilgisi içermemektedir. Bu çalışmanın bir başka eksikliği de; Anadolu'da bahsedilen türlere ait sadece tip lokalitelerinden örnekleme yapılmasıdır. Fakat, IUCN'in Kırmızı listesi *R. holtzi*'yi bu çalışmanın sonuçlarına göre tür seviyesinde nitelendirmektedir.

Afşar (2006), Erciyes Dağı'ndan bilinen *R. camerani*'nin *R. macrocnemis*'in sinonimi olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Sultan Dağlar'ından örnekleme yapılan türlerin; morfolojik karakterlerine, renk ve desen farklılıklarına, habitat özelliklerine bakılmış ve taksonomik durumlarına açıklık getirilmeye çalışılmıştır. *R. macrocnemis* türü, 1100-2610 metre arasındaki doğal habitatlar ve Alpin sahalarında gözlemlenmiştir. Sultan Dağlar'ından topladıkları Anadolu dağ kurbağalarına ait örnekleri, vertebral şeridin varlığı bakımından *R. camerani* ile benzerlik gösterse de vücut oranları indeksleri bakımından Baran ve Atatür (1986) tarafından da belirtildiği gibi *R. macrocnemis*'e benzediğini bildirmiştir (Afşar, 2006).

Baran vd. (2007), yeni lokalitelerden topladıkları *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'ye ait örnekleri morfolojik karakterleri, deri özellikleri, renk ve desen farklılıkları bakımından değerlendirmişlerdir. Şimdiye kadar sadece Bolkar Dağı'nda bulunan Karagöl ve Çinigöl'den bilinen *R. holtzi* türünün, bu dağın yaklaşık 3000 m yüksekliğinde Eğrigöl mevkiinde de yaşamakta olduğu ilk kez bu çalışmada saptanmıştır. Böylece türün Bolkar Dağı'nda daha geniş bir bölgeye yayılmış olduğu meydana çıkarılmıştır. Ayrıca Bolkar Dağı'nın Konya-Ereğli tarafına yakın kısmında yaklaşık 2500 m yükseklikte Seviçova mevkiinden *R. macrocnemis* türünün varlığı ilk kez tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, Örtülü Köyü'nden (Maden-Elazığ) topladıkları örnekleri *R. macrocnemis* olarak değerlendirmiş ve mevcut lokalitenin bu türün yayılış alanının en güney sınırı olarak bildirmişlerdir.

Şahin (2008) tarafından İzmir ili, Ödemiş ilçesi Bozdağ mevkiindeki ve Denizli ili

Tavas ilçesi Akdağ'dan toplanan Anadolu dağ kurbağaları örnekleri arasında karşılaştırılmalı morfolojik ve renk-desen analizleri yapılmış ve sonuç olarak iki populusyona ait hayvanların farklı oldukları ve bu farklılığın alt tür seviyesinde olabileceği kanısına varılmıştır.

Baran vd. (2007) *R. holtzi* türü için, yeni lokaliteyi Çamlıyayla sınırları içerisinde 3000 m yükseklikte Eğrigöl kenarlarındaki pınarlar olarak rapor etseler de, Yıldız (2010) Ağustos 2008'de Mersin'e düzenlenen arazi çalışmasında Eğrigöl'ün tamamen kurduğunu, göl kenarında herhangi bir pınar olmadığını görmüş ve *R. holtzi* türüne rastlamamıştır. 2009 yılında yaptığı arazi çalışmasında ise en yakını Eğrigöl'e 1 km uzaklıkta olan ve Eğrigöl ile bağlantısı olmayan sekiz pınarın dördünde *R. holtzi*'ye rastlamıştır. Aynı zamanda Eğrigöl ve pınarların 3000 m yükseklikte ve Çamlıyayla sınırları içinde olmadığı, 2777 m yükseklikte ve Mersin-Merkez sınırları içinde kaldığı anlaşılmıştır. Bu çalışma ile birlikte, bu türün yalnızca göl kenarlarında değil, bu gölleri besleyen pınarlarda da dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Fakat bu çalışma da, literatürün büyük çoğunluğundaki diğer çalışmalar gibi türleri morfolojik karakterler bakımından ayıran bir çalışmadır. Başkale vd. (2012) ise Bolkar Dağlar'ında (Çamlıyayla/Mersin) *R. holtzi*'ye ait yeni lokaliteler tespit etmiştir.

Kaya (2012), Türkiye'deki *R. macrocnemis* türüne ait beş populusyonun, *R. camerani* türüne ait üç populusyonun ve *R. holtzi* türüne ait bir populusyonunun bireylerini iskelet kası protein bantlarının sayısına göre (SDS-PAGE yöntemi kullanılarak) karşılaştırmış ve *R. macrocnemis* ve *R. camerani* arasında herhangi bir biyokimyasal farklılık olmadığını, *R. holtzi*'nin ise diğer dağ kurbağalarından tek bir protein bant ile farklı olduğunu elde etmiştir.

Afşar vd. (2014), İç Anadolu Emir Dağlar'ından (Afyonkarahisar) topladıkları 24 Anadolu dağ kurbağasına ait örnekleri morfolojik, serolojik ve renk-desen özellikleri bakımından incelemişler ve bu örnekleri *R. macrocnemis* türü olarak bildirmişlerdir. Afşar vd. (2015) ise Berçelan yaylasından (Karadağ, Hakkari) topladıkları Anadolu dağ kurbağalarına ait örnekleri serolojik ve morfolojik yönden *R. macrocnemis* ve *R. holtzi*'nin tip lokalitelerinden alınan örneklerle karşılaştırmış ve Berçelan yaylası örneklerinin *R. macrocnemis* türüne benzediğini belirtmişlerdir.

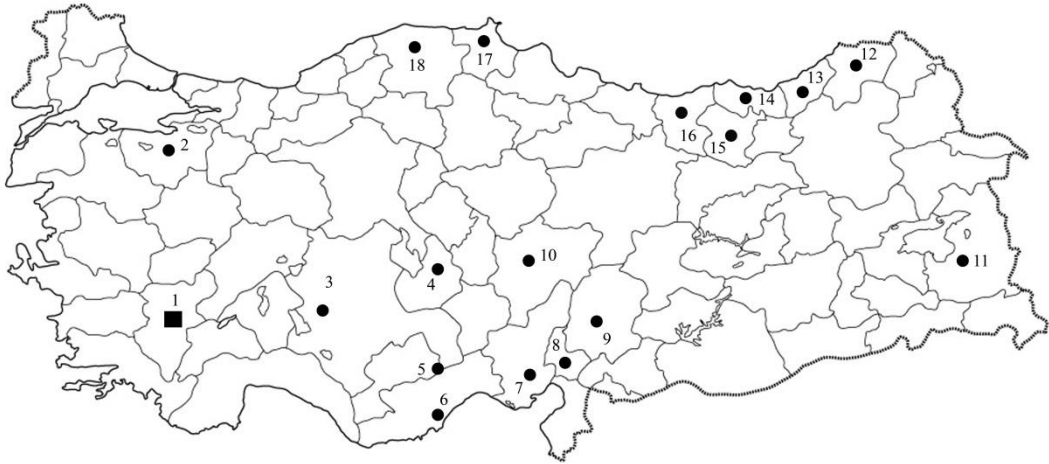
Çapar ve Başkale (2016); Tavas (Denizli)'ta *R. tavasensis* popülasyonuna ait demografik parametreleri çalışmış ve 4 yıl boyunca popülasyon büyüklüğünü; 398, 348, 275, ve 117 birey olarak tespit etmişlerdir. Yıllık hayatta kalma oranı ise ortalama 0,19 olarak bulunmuştur. Buna göre çalışmanın yapıldığı yıllar içerisinde *R. tavasensis* popülasyonuna ait demografik bir düşüşten bahsedilmiş ve bunun sebeplerini insani faktörlerle ve habitat yıkımları ile açıklamışlardır.

Picariello vd. (2016) Anadolu dağ kurbağalarına (*R. macrocnemis*, *R. camerani*, *R. holtzi* ve *R. tavasensis*) ait örnekleri S1 satellit DNA bakımından incelemiş ve aralarında bir fark bulamamıştır ve bu dört taksonun tek bir tür olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışma örnekleri sadece nükleer DNA bakımından incelendiği için güvenilirliği sorgulanmaktadır.

Literatüre bakıldığı zaman; türün dağılımını veren veri tabanlarının referans aldığı filogenetik çalışma (Veith vd., 2003) ile en güncel olan moleküler genetik tabanlı çalışmanın (Picariello vd., 2016) birbiri ile çeliştiğini görmekteyiz (Şekil 4, 5). Veith vd. (2003) mtDNA gen bölgeleri ile *R. tavasensis* türünü diğer Anadolu dağ kurbağalarından ayırmıştır. Bu sonucun başka mtDNA gen bölgeleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca en güncel çalışma olan Picariello vd. (2016) ise sadece nDNA gen bölgeleri kullanarak Anadolu dağ kurbağalarının tek bir tür altında toplanması gerektiğini bildirmiştir. mtDNA'ya göre daha yavaş evrimleşme hızına sahip olan nDNA gen bölgelerinin bu tür grubunun ayırımında yeterli olup olmadığı başka nDNA gen bölgeleri kullanılarak da kontrol edilmesi gerekmektedir. Mevcut iki çalışmanın sonuçlarına göre, hala hazırda Anadolu dağ kurbağaları türlerine ait filogenetik karmaşıklığın çözümlenmediği ve bu karmaşanın net bir sonuç kazanması gerektiği aşikardır.



**Şekil 4.** Picariello vd. (2016) S1 satellit DNA farklılıklarına göre örnekleme alanlarındaki Anadolu dağ kurbağaları türlerinin taksonomik durumu (● *R. macrocnemis*) (1:Bursa 2:Eskişehir 3:Bolu 4:Amasya 5:Kayseri 6:Karagöl;Ereğli 7:Erzurum 8:Kars 9:Bitlis 10:Van 11:Denizli 12: Afyon)



**Şekil 5.** Veith vd. (2003) 16S rRNA gen bölgesi sonucuna göre örnekleme alanlarındaki Anadolu dağ kurbağaları türlerinin taksonomik durumu (● *R. macrocnemis*, ■ *R. tavasensis*) (1:Denizli 2:Bursa 3:Konya 4:Aksaray 5:Niğde 6:Mersin 7: Adana 8:Osmaniye 9:Kahramanmaraş 10:Kayseri 11:Van 12:Artvin 13:Rize 14:Giresun 15:Gümüşhane 16:Giresun 17:Kastamonu 18:Sinop)

Anadolu dağ kurbağaları morfolojik ve moleküler karakterler bakımından incelense de, literatürde herhangi bir mikrosatellit belirteçler kullanılarak yapılan popülasyon genetiği çalışmasına rastlanmamıştır. Fakat bu gruba ait türlere genetik olarak en yakın tür olan *Rana dalmatina*'ya ait mikrosatellit tabanlı çalışmalar mevcuttur. Lesbarrères vd. (2006); yüksek trafikli yollardan ve otoyolların kenarından topladıkları *R. dalmatina* örneklerinde genetik çeşitlilik ve farklılaşmayı

karşılaştırmışlardır. Buna göre; otoyolların genetik çeşitliliği azalttığı ve yüksek derecede populasyon farklılaşmasına götürdüğü ortaya çıkmıştır.

Hauswaldt vd. (2008) ise *R. dalmatina*'ya ait 8 yeni polimorfik mikrosatellit lokusu izole etmişlerdir. Bu çalışmada her bir lokustaki alel sayısı ve gözlenen heterozigotluk ortaya koyulmuştur. Literatüre kazandırılan bu belirteçlerin, tehlike altındaki türlere ait populasyonların genetik analizinde kullanılabilirliğini ortaya koymuşlardır. Sarasola-Puente vd. (2012), 22 farklı üreme ortamından toplanan *R. dalmatina* örneklerine ait 12 farklı mikrosatellit lokusunda genetik farklılığı incelemişlerdir. Bu çalışmada mikrosatellit lokuslarında yapılan analizlere göre; *R. dalmatina* populasyonları arasında yüksek seviyede genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. Canestrelli vd. (2014) ise yaptıkları çalışmada 38 populasyondan toplanan 170 örneğin 6 farklı mikrosatellit lokusunu analiz ederek populasyonların genetik yapısı hakkında bilgi vermişlerdir.

#### **1.4. Amfibiler ve Kökeni**

Omurgalı hayvanlar 63.000'in üzerinde tür sayısına sahip olan ve 1 g ağırlıktan 100.000 g ağırlığa kadar üyesi olan olağanüstü bir çeşitliliğe sahiptir; ve bu çeşitlilik 500 milyon yıldan daha uzun süren bir evrimin sonucudur (Pough vd., 2013). Omurgalı hayvanlar arasında bir geçiş formu olan amfibiler, gerek anatomi gerekse fizyolojik açıdan balıklarla sürüngenler arasında bir özellik göstermektedir. Amfibiler omurgalıların su dışında yaşayan ilk grubunu oluşturmaktadır. Çoğunlukla karasal yaşama uyum sağlamış bu canlı grubunda solunum akciğer, solungaç, deri veya ağız boşluğu ile yapılmaktadır. Bazı fosil formlar dışında baş iskeleti tümüyle kemikleşmiştir. Derileri yumuşak ve mukus bezleri bakımından zengindir. Bütün amfibi türlerinde suda veya yumurta içinde olmak üzere bir larva evresi mevcuttur. Yumurtalar jelatin kılıflar ile örtülüdür. Larvalar genellikle sucul, ergin bireyler ise suda veya karada, nemli alanlarda yaşarlar. Amfibiler sistematik olarak 3 takımdan oluşmaktadır (Kuyruksuz kurbağalar, Semenderler, Ayaksız iki yaşamlılar). Bu 3 takım arasında kuyruksuz kurbağalar (Anura) diğer takımlara göre familya ve tür sayısı bakımından oldukça kalabalık olmaktadır (Kuru, 2012).

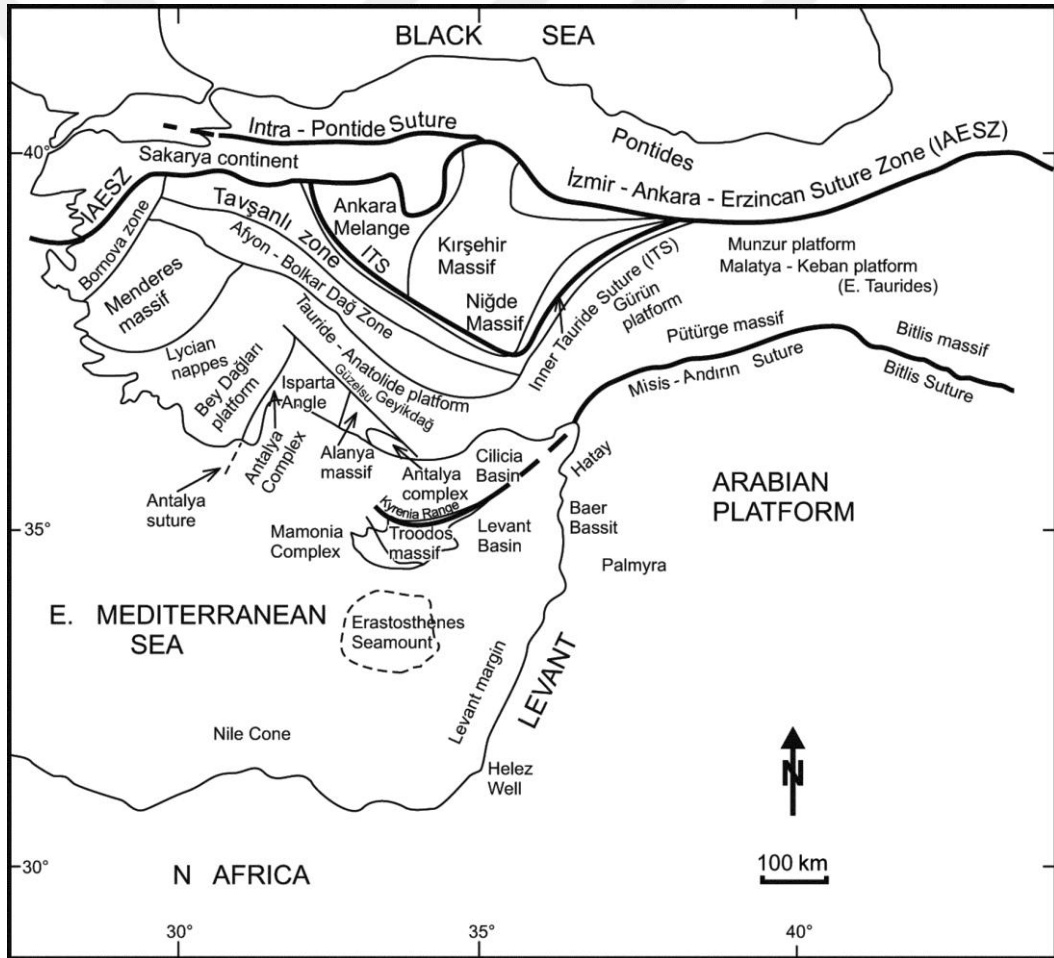
İlk tam amfibiler, Grönland adasının en geç Devoniyen döneminden kalma Ichthyostegidlerdir. Bunlar kuyruk yüzgeci, dermal kafatası kemiği, ve çizgisel yanalları, dişlerinin yapı ve dağılımı gibi hemen hemen her yönden Rhipidistianlarla aynı özelliklere sahiptir. Ana farklılık onların iri göğüs ve leğen kemiklerinin olması ve tamamen gelişmiş tetrapod özelliklerinin bulunmasıdır. Ekleme yakın üye kemiği doğrudan Rhipidistianlara benzer şekildedir. Fakat bunların belirgin parmakları vardır. Ichthyostegidler sucul hayvanlardı ve sonradan ortaya çıkan, beş ya da daha az parmakları olan dört üyeli omurgalılara hiç benzemeyen bir şekilde, parmak sayıları büyük ve değişkendi (Clack, 2002a). Daha karasal olan formlar, Ichthyostegidler ve sonraki beş parmaklı, üyeleri karada yürümeye daha iyi uyum sağlamış amfibilerle bağlantı oluşturdular. Bunlar, yakın zamanda, yaklaşık 13 milyon yıl önce depolanmış kayaların içinde tanımlanmıştır (Clack, 2002b). Ichthyostegidler, genellikle, çok önemli yüksek taksonlara (Amfibiye ve Tetrapoda) iyi örnek oluştururlar. Rhipidistianlarla Ichthyostegidler arasındaki geçiş formları mozayik evrimleşmeye ve bireysel özelliklerin dereceli değişimine işaret ederler (Futuyma, 2008).

### **1.5. Anadolu Biyocoğrafyası**

Türlerin yayılım süreci içerisinde, iklimsel ve jeolojik olaylar çok önemli rol oynamaktadır. Türlerin yayılım gösterdiği coğrafik alanların özelliklerinin (coğrafik bariyer, yayılış koridoru vb.) açığa çıkarılması türleşme öykülerinin anlaşılmasında fayda sağlamaktadır. Geçmişten günümüze bir çok türün anavatanı olan, jeolojik dönemlerdeki değişimlerden etkilenen bir çok canlıya barınak görevi gören Anadolu'nun coğrafyası ise çok fazla biyolojik öneme sahiptir.

Akdeniz jeosenklinal bölgede konuşlanan Anadolu, uzun eksenine paralel bir takım kuşaklar içermektedir. Bu kuşaklar doğu-batı doğrultusu sergiler ve bu kuşakları Pontid, Anatolid, Torid, İranid ve Kenar kıvrımları olmak üzere beş ana tektonik ve stratigrafik kuşak altında toplanmaktadır (Baykal, 1974) (Şekil 6). Anadolu yarımadası; Karadeniz, Ege ve Akdeniz ile çevrili, içinde Türkiye topraklarının da bulunduğu küçük Asya ve yanındaki doğu alanlarını içerir. Anadolu ayrıca, birçok mevcut ve geçmişe ait, dağ zincirleri (Anadolu diyagonalı (Davis, 1971), Toroslar ve Karadeniz dağları), İç Anadolu platosu, Marmara denizi ve İç Anadolu göl sistemi gibi gen akışı bariyerlerini

de içermektedir. Anadolu'daki dağ zincirlerinin dönüşümünün izi Alplerin değişiminden sonra Avrupa'nın kuzeye doğru hareketlendiği Tersiyer dönemine kadar sürülebilmektedir. Anadolu yarımadası'nın kuzey ve güneyi günümüzden 65 milyon yıl önce Tetis Denizi'nin altında bulunmaktaydı. Afrika plakasının kuzey yarımkürede yarattığı kıtasal çarpışma sonucu Anadolu bir kara parçası olarak yükselmeye başlamıştır (Demirsoy, 2008). Bununla birlikte, Anadolu'ya ait önceki oluşumlar Paleozoik zamanlara rastlamaktadır. Önemli taş kömürü yatakları bu zamanda oluşmuştur. Bu dönemde oluşan masif arazilere; Yıldız dağları, Menteşe yöresi, Kırşehir, Bitlis ve Kastamonu bölgelerinde rastlanmaktadır. Mezozoik zamanda ise yer kabuğu hareketleri bakımından önemli bir gelişmeye rastlanmamıştır.

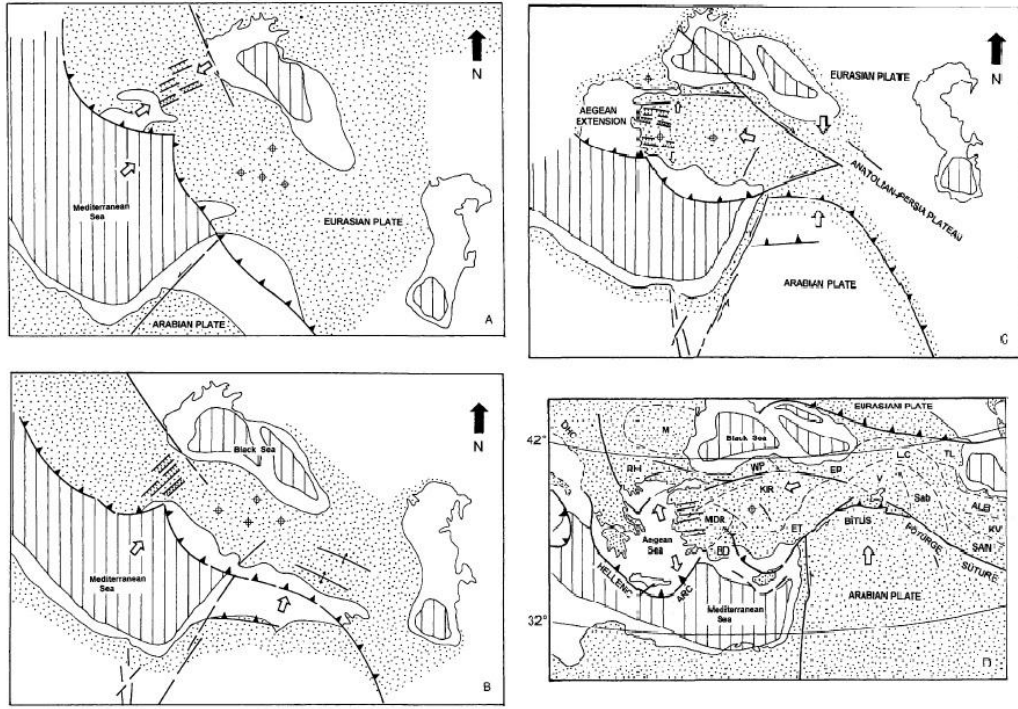


Şekil 6. Batı Akdeniz bölgesi tektonik (neotektonik bölgeler) harita taslağı (Robertson vd., 2012)

Ülkemizin dağlarının birçoğu Tersiyer döneminde oluşmuştur (Şekil 7). Orta-Geç Miyosen'de Bitlis kenet kuşağı boyunca Arabistan-Avrasya çarpışması başlamıştır. Birbirine doğru yaklaşan Avrasya ve Arabistan sıkıştırmasıyla, doğu Anadolu bu yaklaşmayı ilk dönemlerde kısılıp kalınlaşarak karşılayabilmiştir. Ancak bölge hızla yükseldikten sonra daha fazla kalınlaşma güçleştikçe, yana doğru itilip aradan uzaklaşma daha kolay hale gelmiştir. Bunun sonucunda, Türkiye'nin önemli bir kısmı özellikle doğuda, Torid-Anatolid platformunun kenarları boyunca batıya doğru yanal hareket etmiş, ve doğu Akdeniz tabanının üzerine doğru ilerlemiştir. Alp-Himalaya sistemine bağlı olarak Kuzey Anadolu ve Torosların oluşumu bu zamana rastlamaktadır (Şekil 7B). Miyosen dönemi boyunca çok aktif bir yapı sergileyen Anadolu'nun Geç Holosen'de İstanbul Boğazı'nın oluşumu ve Pleistosen buzul dönemi boyunca Anadolu ile doğu Ege adalarının tekrarlı bağlantıları dışında, Pliyosen sonrasında kara ve deniz yapılandırması ve topografyası açısından önemli bir değişiklik gerçekleşmemiştir (Şekil 7C) (van Andel ve Shackleton, 1982; Steininger ve Rögl, 1984; Meriç vd., 2000; Görür ve Tüysüz, 2001; Meulenkamp ve Sissingh, 2003).

Günümüz topografik yapılanmasını 4. jeolojik zaman olarak bilinen Kuvaterner döneminde büyük ölçüde tamamlamıştır (Şekil 7D). Kuvaterner'de meydana gelen dikey hareketler ile, Batı Anadolu çökmeye Doğu Anadolu ise yükselmeye başlamıştır. Ege bölgesi deniz düzeyinden birkaç yüz metre aşağıda Doğu Anadolu ise 1500 m. yükseğe çıkmıştır. Anadolu'nun en son oluşan kara parçası Egeid ise yine Kuvaterner döneme rastlamaktadır. Ayrıca, Kuvaterner'de Torosların yükselmesi devam etmektedir.



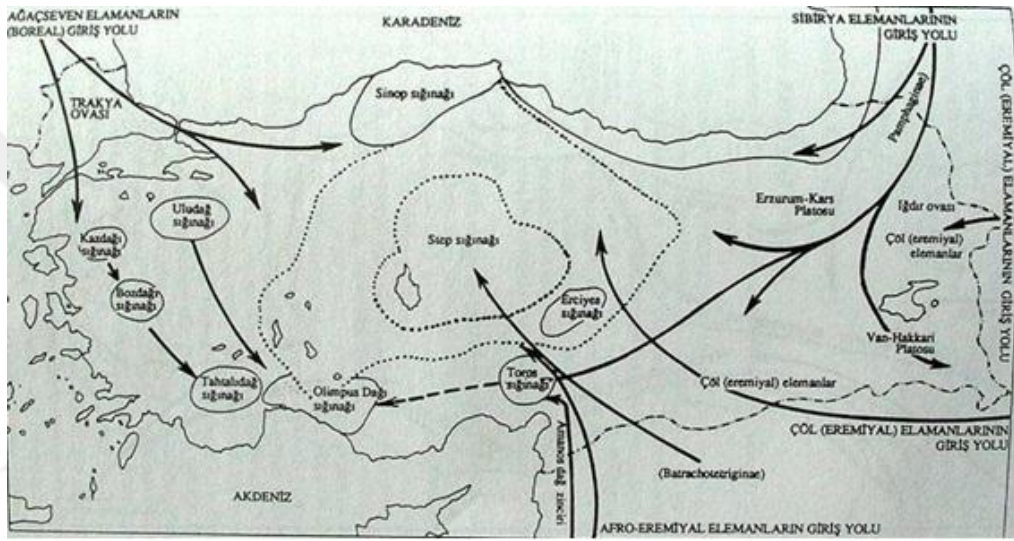


**Şekil 7. A.** Oligosen'deki Türkiye'nin paleocoğrafik haritası **B.** Miyosen'deki Türkiye'nin paleocoğrafik haritası **C.** Pliyosen'deki Türkiye'nin paleocoğrafik haritası **D.** Türkiye'nin şimdiki zamandaki tektonik haritası (Gürer ve Gürer, 1999)

Kuvaterner'de döngüsel olarak buzul çağlarının yaşandığı döneme Pleistosen adı verilir. Kuvaterner, klasik olarak önce buzul ve buzul arası evrelere ayrılır. Buzul evreler; buzul örtülerinin ve buzulların büyük çapta genişlediği zamanlardaki soğuk fazlar olarak (Günz, Mindel, Riss ve Würm), buzul arası evreler ise dört buzullaşma dönemini birbirinden ayıran sıcak ve kurak dönemlerdir. Buzul devirlerinin popülasyonlar üzerindeki olası etkilerinden biri yayılışlarında değişimlere neden olmalarıdır (Hewitt, 1996, Taberlet vd., 1998, Hampe ve Petit, 2005). Akdeniz Bölgesi Pleistosen boyunca iklimsel dalgalanmalara da maruz kalmıştır. Taberlet vd. (1998) tarafından yapılan 10 taksonun (memeli, amfibi, böcek ve bitki) moleküler analizine dayanan çalışma, her bir türün buzul ve buzul arası dönem döngülerine farklı tepki verdiğini göstermiştir. Yeniden kolonize olmuş alanların buzul sığınaklarına göre daha düşük genetik çeşitlilikle sahip olduğu düşünülse de (Widmer ve Lexer, 2001) bunun tam tersi fikirler de literatürde mevcuttur (Comps vd., 2001).

Anadolu söz konusu olduğunda buzul devirlerinin etkisi ile iki temel yayılış değişim tipi beklenmektedir. Yatay yayılış değişimleri Anadolu ile kuzey veya

güneyindeki alanlar arasında beklenir. Modeller baz alındığında iklimin soğumasına paralel olarak güneye doğru yayılışın genişlemesi ve kuzeyden bir daralması beklenirken ısınma dönemi için tersi bir olgu beklenir (Çıplak, 2004; Hampe ve Petit, 2005). Dikey değişimler ise kuzey güney arası değil, düşük ve yüksek rakımlarda yer alan habitatlar arasında beklenir. İklimsel döngülere bağlı olarak yaşanması beklenen bu değişimler nedeniyle populasyonların parçalanması, daralması veya genişlemesi, genetik çeşitlilik kazanmaları veya yok olmaları söz konusudur. Özellikle, bu dönemde Anadolu Kafkaslardan ve Balkanlardan gelen bir çok türe sığınak olmuştur (Şekil 8).



**Şekil 8.** Türlerin Anadoluya giriş yolları (Demirsoy, 2008)

Buzul dönemlerinde deniz seviyesi bugünküne oranla 100 metre kadar düştü. Bu düşüş sayesinde kıtaların görünmeyen kısımları ortaya çıktı, bu sayede kıtaların uçları bugünkü sınırlarını aşarak, pek çok ada parçasını yakınındaki kara kütlelerine bağladı. Buzul dönemlerinde küresel iklim genellikle daha kuruydu. Böylelikle nemli ormanlar sadece ufak alanlarla kısıtlı kalırken, çayır alanları büyüdü ve gelişti. Buzul dönemleri arası iklim yumuşadı ve genellikle bol yağışlı oldu. Bütün bu olaylar canlıların dağılımını geniş ölçüde etkiledi. Pek çok tür buzul dönemlerinde uygun koşulların bulunduğu sığınaklarda yalıtılmış olarak kaldı. Böyle yalıtılmış populasyonlar genotipik ve fenotipik olarak çeşitlenmeye ve türleşmeye sebep oldu. Vadilere giren türler, soğuk tundralar sebebi ile tamamen farklılaşamayacak kadar kısa fakat benzer olamayacak kadar da uzun bir süre yalıtılmışlardır. Aradaki ılıman iklim dönemlerinde tekrardan geniş vadileri işgal etmişler ve yeni bir gen merkezi oluşturmuşlardır. Çoğunlukla aralarında hibridizasyonun olması onların daha üst taksonomik kategorilerde

tanımlanabilecek kadar farklılaşmasını engellemiştir (Demirsoy, 2008).

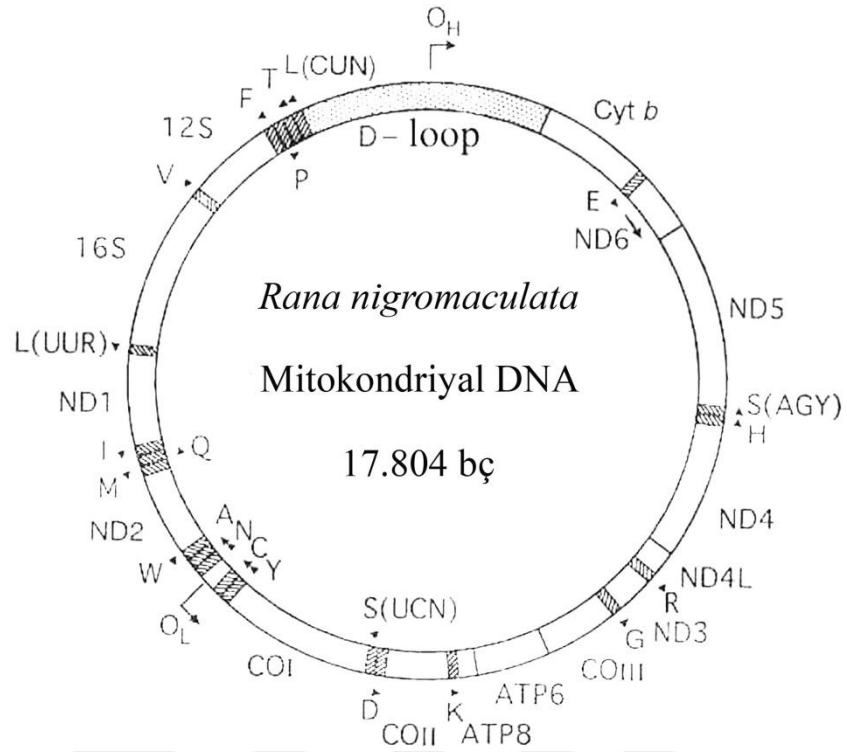
## **1.6. Kullanılan Moleküler Belirteçler**

### **1.6.1. Mitokondriyal DNA ve Yapısı**

Ökoryatların çoğunda mitokondriyal DNA (mtDNA) çift ipliklidir, yarı saklı replike olur ve ökoryatik DNA'nın tipik özelliğinin aksine proteinler ile ilişkili değildir. Birçok canlı şubesinde mtDNA'nın tüm sekansının varlığı; bu genom için uygun primerleri geliştirmeyi teşvik etmektedir (Kocher vd., 1989). Bu primerler türlerin mitokondriyal genomlarına ulaşmaya izin vermekte ve dizin analizini, yakın türler ve populasyonlar arasındaki homolog genlerin karşılaştırılmasını kolaylaştırmaktadır.

mtDNA'da protein kodlayan genler arasında korunmuşluk seviyeleri geniş aralık göstermektedir. Bazı araştırmacılar, amino asit evriminin daha az korunmuş gen bölgelerinde daha hızlı olduğunu ve filogenetik analizlerde bu çeşit bir verinin daha bilgi verici olabildiğini belirtmiştir. Diğer bir yaklaşım ise, primerler için genlerin korunmuş bölümlerini hedef almaktadır ve bu primerleri daha fazla farklı bölümleri desteklemek için kullanmaktadırlar. Örneğin; cyt b gen bölgesinin korunmuşluk seviyesi geniş bir aralıktadır ve mitokondriyal genomda bu genin fonksiyonu ile bağlantılı farklı domainlere sahiptir (Irwin vd., 1991; Martin ve Palumbi, 1993).

Hayvan mitokondriyal DNA'sının baz sırası genellikle hızlı ve belli durumlarda yüksek derecede korunmuştur. Mitokondriyal genlerin sırası şubeler arasında değişmektedir (Amfibilerde mtDNA dizilim sırası, Şekil 9).



**Şekil 9.** Mitokondriyal DNA dizilimi (17.804 bç) (Sumida vd., 2001)

### 1.6.2. Ranidae Familyasında Sıkça Kullanılan mtDNA Gen Bölgeleri

Bir çok karakteristik özelliklerinden dolayı, mtDNA belirteçler amfibilerde sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek evrim hızları, mtDNA belirteçleri amfibi türlerinin filogenetik ve popülasyon genetiği yapısının ortaya çıkarılmasında değerli kılmaktadır.

Amfibiler arasında en kalabalık ailelerden biri olan Ranidae ailesi 22 cins ve 387 tür ile temsil edilmektedir. Ranidae ailesi yakın zamanda taksonomik revizyona girmiş ve türlerle alakalı daha kesin tanımlamalar ortaya çıkmaya başlamıştır. Ranidae ailesi sınıflandırmasına ait yakın zaman çalışmaları, birçok cins içindeki monofiliyi sorgulayarak meydan okumaktadır (Marmayou vd., 2000; Bossuyt ve Milinkovitch, 2000; Emerson vd., 2000). Bu aileye ait literatürde birçok farklı mtDNA gen bölgesi kullanılarak yapılan filogenetik çalışmalar mevcuttur. Bu gen bölgelerinden karşımıza en çok 12S ve 16S gen bölgeleri ile ilgili çalışmalar çıkmaktadır (Plötner, 1998; van der Meijden vd., 2005; Matsui vd., 2006). Bununla birlikte 16S geni 12S genine göre daha yavaş evrimleşme hızına sahiptir. Yine de bazı filogenetik çalışmalarda yeterli sonuç verebilmektedir. Yüksek düzeyde korunmuş ve türler arası farklılıkların açığa

çıkarılmasında kesin sonuçlar veren Sitokrom Oksidaz alt ünite I (COI) gen bölgesine dair Ranidae ailesi ile yapılan çalışmalar son birkaç yılı kapsamaktadır (Huang vd., 2014; Zhou vd., 2015). Yapılan çalışmaların çıktıkları ile birlikte gün geçtikçe bu gen bölgesinin kullanımı da artmaktadır.

Ayrıca literatürde Ranidae ailesine ait türler üzerinde, cyt b (Austin vd., 2003), D-loop (Zhong vd., 2008) ve ND1, ND2 (Macey vd., 2001) ve ND3 (Plötner vd., 2001) gen bölgelerine dayalı filogenetik çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır.

### 1.6.2.1. Sitokrom Oksidaz alt ünite I (COI) Geni

Hayvan mitokondriyal genomunda en korunmuş ve protein kodlayan gen sitokrom oksidaz alt ünite I (COI) genidir ve bu özelliğinden dolayı filogenetik ilişkilerin çözümlenmesinde en güvenilir mitokondriyal gen bölgelerinden biridir. Bu gen bölgesi, elektron transfer zincirinin bir kısmı olan sitokrom oksidaz kompleksinin alt birimidir. Şubeler arasında oldukça korunmuş bir amino asit dizisi olması, sekansları birbirlerine dizilemeyi kolaylaştırmakta ve kullanışlı evrensel primerleri dizayn etmeyi olası kılmaktadır. Yüksek derecede korunmuş olduğu için; türler içerisinde amino asit yer değişimi nadir olmaktadır. Fakat amino asit baz dizisindeki düşük kısıtlamalar ile sessiz değişimler diğer mtDNA genlerinde olduğu kadar yaygındır (Palumbi ve Kessing, 1991). Filogenetik çalışmalarda derin evrimsel dallanmaların ortaya çıkarılmasında bu gen bölgesi amino asit baz dizisi kullanışlı olmaktadır (Palumbi ve Benzie, 1991) (Şekil 10).

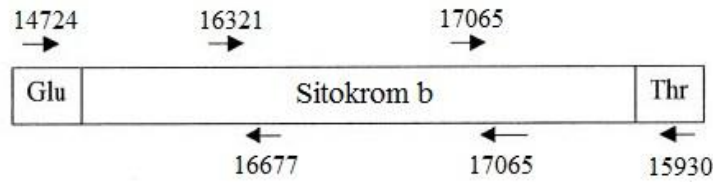


**Şekil 10.** Kurbağalarda mitokondriyal Sitokrom oksidaz alt ünite I geni primerleri baz dizisi pozisyonları (Hillis vd., 1998)

### 1.6.2.2. Sitokrom b (cyt b) Geni

Sitokrom b (cyt b) gen bölgesi filogenetik çalışmalar için en kullanışlı gen bölgesi

olarak değerlendirilmektedir, protein ürün yapısı ve fonksiyonu en iyi bilinen mitokondriyal gen bölgesidir (Esposti vd., 1993). cyt b geni, hem yavaş hem de hızlı evrimleşen kodon pozisyonlarına sahip olmakla birlikte en korunmuş ve en değişken bölgelere de sahiptir. Bununla birlikte, derin filogenetik ilişkilerin çözümlenmesinde (Meyer ve Wilson, 1990; Irwin vd., 1991; Normark vd., 1991; Cantatore vd., 1994; Lydeard ve Roe, 1997; Kumazawa ve Nishida, 2000) ve yakın zaman ayrılmalarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Rocha-Olivares vd., 1999; Lovejoy ve de Araújo, 2000). Mitokondriyal genomun tümüyle fonksiyonel olan tek protein ürünüdür. Diğer bütün şifrelenmiş proteinler gibi büyük enzim komplekslerinin alt birimi değildir. Genin birçok bölümü taksonlar arasında korunmuş olup, protein fonksiyonunda önemli olduğu düşünülmektedir (Şekil 11).



**Şekil 11.** Kurbağalarda mitokondriyal cyt b geni primerleri baz dizisi pozisyonları (Hillis vd., 1998)

### 1.6.3. Nükleer DNA ve Yapısı

Nükleer DNA (nDNA), ökaryotik organizmaların çekirdeğinde bulunan ve kompleks bir organik bileşik olan nükleik asittir. Nükleer DNA, mitokondriyal DNA'da olduğu gibi tek ebeveynden (anne) gelen bilgileri içermez. Nükleer DNA her iki ebeveynden (bir baba ve bir anne olmak üzere) gelen bilgi mirasına bağlıdır.

Moleküler sistematik çalışmalarında, son zamanlarda yüksek derecede korunmuş tekrarlı nükleer genlere önem verilmektedir. Nükleer genomun filogenetik karmaşıklığa sunduğu çözümler ile, bu genler üst seviye filogenetik ilişkilerden sonuç çıkarmada kullanışlı olmaktadır (Friendlander vd., 1992). Nükleer genlerin geniş kullanılabilirliklerine en iyi örnek rDNA tekrar ünitesidir. Bu gen, populasyonlar içinde ve arasında değişim gösteren baz dizisine sahiptir ve taksonları ayırmada kullanışlı, geniş farklılık gösteren, yüksek derecede korunmuş baz dizilerin kodlamaktadır (Mindell ve Honeycutt, 1990; Hillis ve Dixon, 1991).

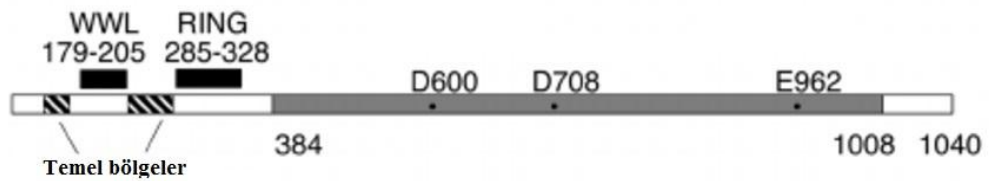
#### 1.6.4. Ranidae Familyasında Sıkça Kullanılan nDNA Gen Bölgeleri

Amfibi türleri üzerinde akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılması amaçlı filogenetik çalışmaların artması ile birlikte moleküler belirteçler önem kazanmıştır. Her ne kadar bir çok moleküler genetik çalışmasında genellikle mtDNA verilerinden faydalanılsa da derin akrabalık ilişkilerin belirlenmesinde bazen mtDNA gen bölgeleri yetersiz kalabilmektedir. Bu yüzden son zamanlarda moleküler çalışmalarda özellikle filogenetik sınıflandırmada nDNA gen bölgesi farklılıklarından yararlanılmaktadır.

Daha önce de belirttiğimiz gibi Ranidae ailesi amfibi türleri arasında en kalabalık ailedir. Ranidae ailesinde nDNA odaklı çok fazla çalışma bulunmaktadır (Roelants vd., 2004; Bossuyt vd., 2006; Frost vd., 2006). Nükleer genler arasından; Tirozinaz, Rodopsin, RAG1, RAG2 ve POMC gen bölgeleri Ranidae ailesinde filogenetik ve filocoğrafya çalışmalarında en çok tercih edilen gen bölgeleridir (Meijden vd., 2005; Che vd., 2007; van der Vences vd., 2013).

##### 1.6.4.1. Rekombinasyon Aktivasyon Geni (RAG1)

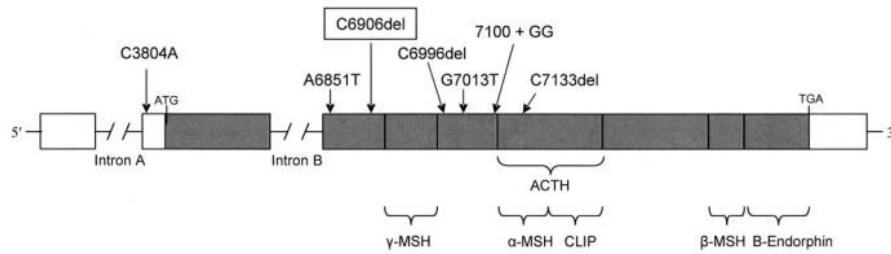
Tek kopya nükleer rekombinasyon aktivasyon geni (RAG1) bütün çeneli omurgalılarda bulunmaktadır ve rekombinaz ile alakalı bileşiklerden T-reseptörünün V(D)J rekombinasyonunun ve immunoglobulin genlerini kodlamaktadır (Schatz vd., 1989; Oettinger vd., 1990). RAG1 geni birçok omurgalının, derin filogenetik ilişkilerinin ortaya çıkarılması için kullanılmıştır (Baker vd., 2000; Barker vd., 2004; van der Meijden vd., 2004). Bununla birlikte, bu gen birçok omurgalı grubunda intronlar tarafından kesilmemiş, intronlar kodlayan baz dizisinin ortasında veya 5' ucunda yer almaktadır (Şekil 12).



**Şekil 12.** Nükleer RAG1 genin yapısı (Temel çekirdek bölge koyu gri ile belirtilmiş (384-1008) ve proteinin N-terminal sonlanması ilk önce RING motifi ile tanımlanmış bunu WW-like alanı takip etmiştir) (Maitra ve Sadofsky, 2009)

#### 1.6.4.2. Proopiomelanokortin (POMC) Geni

Proopiomenolokortin opioid/orphonin gen ailesi üyesi olan polipeptit hormon öncüsüdür. Bu gen sadece omurgalılarda bulunur ve bir dizi gen duplikasyon olayı sonucu olarak varsayımlanır. Proopiomenolokortin, birçok hormonu üretilen posttranslasyonel modifikasyonlar geçirir ve hormon olan korunmuş bölgeler içerir. Ayrıca değişken ara bölgeleri de mevcuttur. Hem korunmuş hem de değişken bölgelere sahip olması POMC’u kullanışlı bir filogenetik araç yapmaktadır (Becker, 2011) (Şekil 13).



**Şekil 13.** Nükleer POMC geninin yapısı ve şimdiye kadar tanımlanmış bütün homozigot ve heterozigot bileşikleri (Farooqi vd., 2006)

#### 1.6.5. Mikrosatellitler

Son yıllarda DNA üzerinde yapılan bazı araştırmalar ile DNA'daki bazların ve baz dizilişlerinin birbiri ardı sıra tekrar ettiği belirlenmiştir. Bunlardan; 100-6500 baz çifti (bç) tekrarlardan oluşturanlar klasik satellit DNA, 10-20 bç tekrarlı olanlar minisatellitler ve 2-6 bç tekrarlı olanlar mikrosatellitler olarak adlandırılırlar. Tekrarlayan diziler genellikle kodlanmayan (noncoding) bölgelerde bulunurlar. Bu diziler arasında en sık görülen tekrarlayan DNA dizileri “mikrosatellitler” olmaktadır. Mikrosatellitler; kromozomal sentromeri çevreledikleri için “satellit (uydu)” ismini almışlardır. Mikrosatellitler, basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats, SSR) ya da kısa ard arda tekrarlar (Short Tandem Repeats, STR) olarak da adlandırılmaktadır (Korkmaz Ağaoğlu ve Ertuğrul, 2010).

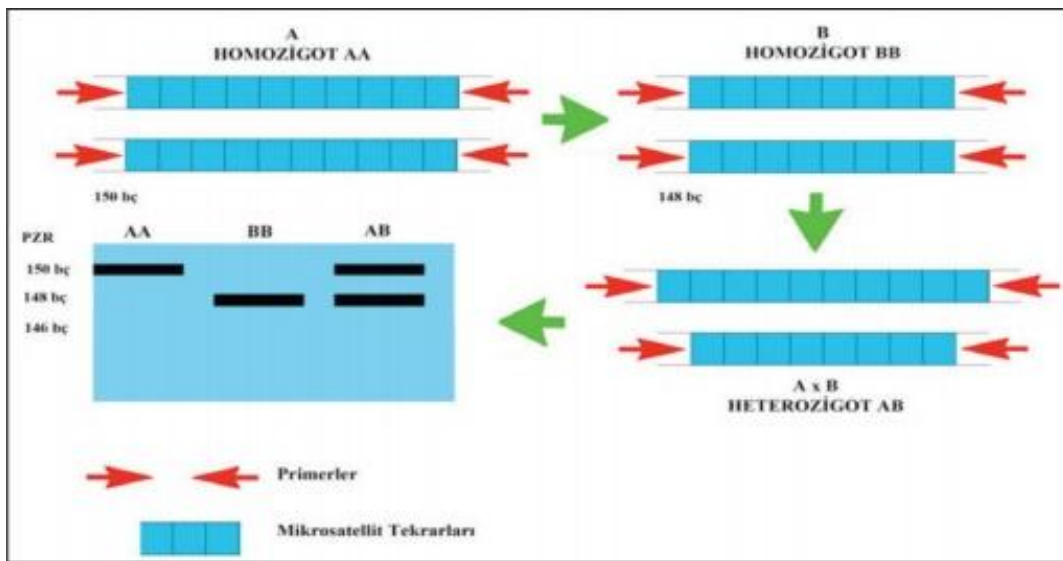
Mikrosatellitler ilk olarak 1980'li yıllarda keşfedilmiştir. Polimorfik bir lokusta tekrarların sayısı 5'ten 100'e kadar değişebilmektedir. Mikrosatellit polimeraz zincir



reaksiyonu (PZR) ürünleri her bir lokusa göre değişen ve genel olarak 75 ile 300 baz çifti uzunluğu arasındadır. Basit, ard arda tekrarlanan di-, tri- nükleotit dizilerinin genomda polimorfik oldukları ortaya konulmuştur. Bu dizilerin tekrarlanma sıklıkları yani frekansları yüksek oranda polimorfizm gösterirler ve bu diziler genom boyunca rastgele dağılmışlardır (Korkmaz Ağaoğlu ve Ertuğrul, 2010).

Mikrosatellit fragmentlerinin büyüklükleri, her bir mikrosatellit baz dizisi kendine özgü insersiyon ve delesyonlara sahip olduğu için veya birbiri ardına tekrarlı dizilerdeki kopya sayılarındaki değişimler yüzünden değişiklik göstermektedir. Mikrosatellit lokuslarındaki mutasyon oranı ve alel sayısı oldukça yüksek olabilmektedir (Jeffreys vd., 1988). Mikrosatellit lokusları; rastgele dağılım gösterirler ve replikasyon kaymalarına bağlıdır (Weber ve May, 1989; Schlötter ve Tautz, 1992).

Bir canlı; biri anneden diğeri babadan gelen kromozomlar bakımından her ikisinde de benzer sayıdaki mikrosatellit bölgelerine sahip ise yani; bu bölgeler bakımından homozigot ise (A ve B) (Şekil 14) PZR sonucunda çoğalan bu mikrosatellit bölgesi jel üzerinde tek bir bant olarak görülür. Eğer hem anneden hem de babadan gelen kromozomları içeriyorsa bu kromozomların uzunlukları farklı olacağı için; PZR ile elde edilen mikrosatellit bölgesine ait DNA bantlarının elektroforezi sonucunda iki farklı uzunlukta bant oluştururlar (heterozigot) (Şekil 14).



**Şekil 14.** Bir populasyondaki homozigot ve heterozigot bireylere ait mikrosatellit lokuslarının PZR görüntüsü (Korkmaz Ağaoğlu ve Ertuğrul, 2010)

Populasyon çalışmalarında, üreme sistemi ve populasyon yapısı analizlerinde mikrosatellit belirteçler güçlü bir araç olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Mikrosatellit belirteçlerin pozitif özellikleri;

1. Allozim lokusunda polimorfik olmayan türlerde bile yüksek değişkenliğe sahip olmaları,
2. Kesin alel büyüklüğü ile kodominant genotipi hesaplayabilme yetenekleri,
3. Soyu tükenmiş türlerde bile soyu devam eden türlerdeki gibi verimli çalışabilme olmaktadır.

Populasyonlar arası mikrosatellit varyasyonların analizi çalışmaları yakın zamanda başlamış çalışmalardır. Bu çalışmalar da, çatışma etkisi ve seçilime dair endişelere rağmen sonuçlar umut vericidir. Mikrosatellitler, nükleer ve kloroplast genomu boyunca yerleşim gösterirler. Bazı türlerde mitokondriyal genomda da bulunmuşlardır. Mikrosatellit lokusları, yakın ilişkili türler arasında oldukça korunmuş bölgelerdir. Bu özelliklerinden dolayı mikrosatellit primerleri bazen birden fazla tür hakkında bilgi elde etmek için kullanılabilir (Lippe vd., 2004; Provan vd., 2004).

Mikrosatellitler, diğer baz dizisi tiplerinden daha hızlı mutasyona uğramaktadır. Mikrosatellitlerdeki bu yüksek mutasyon oranı; DNA replikasyonu sırasında kayan zincirin yanlış eşleşmesine atfedilmektedir. Tek basamak mutasyon modelinde (SMM; Stepwise mutation model) verilen bu olay tek tekrar biriminin kazanımı veya kaybedilmesi ile sonuç verebilmektedir (Kimura ve Ohta, 1978). Genetik bilginin analizinde mutasyon modelleri oldukça önemlidir. Mikrosatellitlerin mutasyon oranı, tekrar motiflerinin sayısı ve büyüklüğü ve mikrosatellitlerin yapısının karmaşıklığı (örneğin; bir veya birden fazla tekrar içermesi gibi) tarafından etkilenmektedir (Estoup ve Cornuet, 1999).

Mikrosatellitler, değişken yapıları sayesinde yavaş evrimleşen gen bölgelerine benzemektedir. Bu özellikleri, onları bireylerin ve populasyonların genetik ayırımında kullanılabilmesini sağlamaktadır. Yüksek değişkenlik ve kodominant doğası ve yükselen kullanılabilirlikleri ile mikrosatellitler populasyon genetiğinin en popüler moleküler belirteçleri olmaktadır (Freeland, 2005).

## **1.7. Filogenetik Analizler**

### **1.7.1. Evrimsel Analiz için Model Seçimi**

Filogenetik yeniden yapılandırma, istatistiksel çıkarımın problemidir. İstatistiksel çıkarımlar, olasılıklar olmadığı zaman çizilemez. Bu yüzden, DNA veya protein baz dizisi kullanarak taksonlar arasında genetik ilişkiyi tahmin etmek için, nükleotit değişimi ya da amino asit yer değiştirmesinin hesaplanabilmesi için model kullanımı zorunlu hale gelmektedir. Evrimsel analiz için seçilen model, nükleotit ve amino asit değişimleri ile ilgili varsayım içermektedir. Bu modeller, filogenetik ağaç boyunca bir nükleik asit veya aminoasidin diğerine değişimi ile alakalı farklı olasılıkları tanımlar ve el altındaki verileri açıklamak için farklı filogenetik hipotezler arasından seçim yapılmasına izin verir (Lemey vd., 2010).

Filogenetik metodlar evrimsel işlemler ile alakalı tahmin sayısına dayanmaktadır. Aşık bir model yapmanın avantajı, modeldeki parametrelerin tahmin edilebilmesidir. Bilindiği üzere evrimin bir modelini veya bir başkasını kullanmak filogenetik analizlerin sonucunu değiştirebilmektedir (Sullivan ve Joyce, 2005). Varsayılan model yanlış ise; dal uzunluğu, transisyon/transversiyon oranı veya farklılık eksik değerlendirilebilir. Bölgeler arası güç oranı değişimi ise fazla değerlendirilebilir. Genel olarak, filogenetik metodlar varsayılan evrim modeli yanlış olduğu zaman daha az doğru veya tutarsız olabilir.

Modeller sadece filogenetik analizlerdeki sonuçlarından dolayı önemli değillerdir, alakalı oldukları moleküler seviyedeki evrimsel işlemlerdeki karakterizasyondan dolayı da önemlidirler. Tahminleri basite indirgemesine rağmen, doğru model veriyi uygun hale getirir, eldeki problem ile alakalı doğru tahmin yapan güçlü bir araç haline gelir (Lemey vd., 2010).

### **1.7.2. Bootstrapping (Seç-Bağla) Analizi**

Seç-bağla tekniği, örnekleme dağılımında bilinmeyen veya analitik olarak elde edilmesi zor durumların altında yatan istatistiksel hataların hesaplanmasında sıklıkla

kullanılan örnekleme tekniğidir (Efron ve Gong, 1983). Bu tekniği ilk uygulayan Felsenstein (1985), tek baz dizisi verilerinden çıkarılan filogeninin güven aralığını hesaplamak için kullanmıştır. İlk önce baz dizisi verileri seç-bağla analizine tabi tutuldu. Bunun anlamı orijinal dizi ile yer değiştiren sütunlardan rastgele seçilen dizilerden yeni bir dizi sağlanmıştır. Dizindeki her bir sütun orijinal ile aynı uzunluktaki yeni bir takım baz dizisi (seç-bağla tekrarı) yapılandırılana kadar birden fazla seçilebilir ya da hiç seçilmeyebilir. Bununla birlikte, yeniden örnekleme işleminde verilen seç-bağla tekrarının tamamında bazı karakterler dahil edilmemiş olabilir ve diğerleri 1, 2 veya daha fazla kere dahil edilebilir. İkinci olarak; veri kümesinin her bir tekrar üretiminde yapılandırılan ağaç ile bütün seç-bağla tekrarları arasında kalan her bir kladın oranı hesaplanır. Bu oran; alt kümenin monofilisini destekleyen istatistiksel güvenden alınır.

Filogenetik ağaçlarda; seç-bağla değerini gösteren iki yaklaşım kullanılır. Birincisi; majority rule consensus ağacındaki sonucu özetleyen seç bağla metodudur. İkinci yaklaşım ise; ağaç üzerindeki orijinal baz dizisinden elde edilen seç bağla değeridir. Bu durumda; bütün seç bağla ağaçları orijinal baz dizisine dayalı ağaç ile karşılaştırılır ve seç-bağla ağaçlarında bulunan kümelerin zaman sayısı kaydedilir.

Sonuç olarak; seç-bağla analizi grubun göreceli kararlılığını filogenetik ağaçlarla test eden basit ve etkin bir tekniktir. Seç-bağla tekniğinin en büyük avantajı; ağaç kurgulayan bütün metotlara temel olarak uygulanabilmesi, bununla birlikte seç-bağla metodunda uygulanan örnek sayısı bilgisayar için gereken zamanı artıracakları hatırlanması gerekmektedir. Bu tekniği kullanırken, genellikle 200 ila 2000 arasında yeniden örnekleme tavsiye edilir (Hedges, 1992; Zharkikh ve Li, 1992). Bununla birlikte; normal koşullar altında dallarda %70 veya %75'den fazla desteklenen gruplarda önemli güven verilmektedir, tam tersi %70'den az desteklenen dalların temkinli değerlendirilmesi gerekmektedir (Zharkikh ve Li, 1992; Van de Peer vd., 2000).

### **1.7.3. Filogenetik Ağaçların Oluşturulması**

Organizma grupları arasındaki ilişkilerin en uygun şekilde temsil eden filogenetik ağaçlar çeşitli yollarla oluşturulabilir. Filogenetik ağaçlar üzerindeki dallar evrimsel değişimi, zamanı veya her ikisini de temsil edecek şekilde ölçeklenmiş olabilir (orta

panel) veya ne evrimsel zamanı ne de miktarı ile ilgili direkt karşılığı bulunmayabilir (alt panel). Filogenetik ağaçlar köklü veya köksüz olabilir. Köklü ağaçlarda, “kök” (root) olarak adlandırılan belirli bir nod mevcuttur. Bu kök ağaçtaki en yaşlı noktadır ve analizdeki bütün taksonların ortak atasını temsil etmektedir. Köksüz ağaçlarda, taksonlar arasındaki dallanma ilişkisi birbirine bağlanma yolu ile belirtilmiştir fakat ortak atanın pozisyonu belirtilmemiştir. Örneğin; 5 tür içeren köksüz ağaç üzerinde, ağacın köklenebileceği 5 dal bulunur. Her bir dalın kökleşmesi evrimsel ilişki üzerinde farklı çıkarımlara sahiptir. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında yaygın kullanımlı 3 temel metod aşağıda bahsedilmektedir (Verma, 2015).

### **1.7.3.1. Maksimum Tutumluluk (Parsimoni)**

Tutumluluk tanımı filogeninin hesaplanmasında parametrik olmayan istatistiksel metodları işaret etmektedir. Bu metodlar altında istenilen filogenetik ağaç en az sayıda evrimsel değişimi gerektirmektedir. Maksimum tutumluluk analizinde kullanılan bilgiler taksonların dağılım alanlarındaki “karakter” çeşitleridir. “Karakter” hangi taksonun gözlemlendiği temeline dayanan bir özelliktir. Bu özellik fiziksel, morfolojik, genetik, moleküler, fizyolojik veya davranışsal vb. olabilir. Karakterdeki varyasyon kalıtsal olmalıdır. Her bir karakter sadece iki veya daha fazla duruma sahiptir ve gözlenen varyasyonun sınıflandırıldığı farklı karakter durumlarına ayrılabilir. Bu durumda, ayrı filogenetik karakterin matrisi genellikle tür dizilerinden veya tek türün üreme izolasyonu olan popülasyonlarından olan takson dizisi için bir veya daha fazla filogenetik ağaç çıkarımı yapma durumunu değerlendirir. Bununla birlikte, kodlanan karakterler filogenetik ağaçlardan sonuç çıkarmak için kesin bir metod değildir. Birbirine benzeyen taksonlar göze çarpmaktadır. Bazen karakterler belirgin karakterlere referans ile mümkün varyasyonları temsil etmektedir. Karakter kodlaması benzerlik üzerinden yapılmaktadır.

Taksonlara özgü karakterler sıralı veya sırasız olabilir. Çoklu durumdaki karakterler için sıralanmış karakterler, bir durumdan diğerine değişen eşit evrimsel olaylara sahip olabilmektedir. Sıralı karakterler bir evrimsel olaydan diğerine değişirken karakterlerin bir ara duruma sahip olmalarına gerek olmamaktadır. Sıralı karakterler evrim boyunca meydana gelen durumdaki sekans kısmına sahiptir. Ara durum geçmesi

gerekmektedir. Bununla birlikte işaretli karakterler sıklıkla karışık bir durum haline gelmektedir.

Bazen değerler belirli karakterleri düşünülerek atanmış olabilir veya bireyler arası gerçek evrimsel ilişkinin yansıması olabilir ve diğer karakterler ile karşılaştırmaya öncelik verebilir. Dahası, bazı filogenetik çalışmalarda bütün karakterleri eşit olarak değerlendirmektedir. Karakter durumundaki değişiklik bireysel olarak değerlendirilmektedir. Örneğin; nükleotit baz sekansı, A-T, T-A, G-C, C-G (Verma, 2015).

### **1.7.3.2. Maksimum Benzerlik**

Maksimum benzerlik metodunu kullanarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda topolojiyi tespit için veri setindeki DNA sekansında gözlenen en yüksek olasılığı veren dal uzunluğu esas alınmaktadır. Her bir adımdan sonra, her bir ağacın benzerliği incelenir. En yüksek benzerliği veren incelenen ağaç bir sonraki adımda seçilir.

Maksimum benzerlik metodu; nükleotit substitüsyon hesaplanması için uygun evrimsel modelin seçilimini gerektirir. Benzerlik hipotezi; hipotezde verilen verinin olasılığını tanımlar. Bu model altında yüksek sayıda parametrenin değerlendirilmesi ile, belirli durumlardaki olasılık farklılıkları, bazı değişkenlerin olasılıkları ve karakterler arasındaki farklılıkların hesaplanması sağlanmaktadır (Verma, 2015).

### **1.7.3.3. Bayesiyen Çıkarılma Yaklaşımı**

Filogenetik ağaç oluşturmada en yeni metod Bayesiyen metodu olmaktadır. Benzerlik fonksiyonunu kullanan bu metod, öncül olasılık testi sonuçlarına dayalı revize edilmiş hesaplamalar yapmaktadır. Bu yüzden, bayesiyen analizi aslında maksimum benzerlik metodunun farklı bir biçimidir. Bayesiyen metodunda, maksimum benzerlik metodunda olduğu gibi, gözlenen data seti içerisinde maksimum benzerliğe sahip tek ağacı aramak yerine; en iyi ağaç veri seti üretilir ve evrimsel modele özgü verilen ağaç veri setinde benzerliklerin tüm olasılık dağılımları oluşturulmaktadır. Bu yaklaşımda da, maksimum benzerlik metodunda olduğu gibi en uygun veri seti birçok ağaç görüntüsü

araştırılarak ve benzerlikler üzerinden en yüksek benzerliği takip ederek oluşturulmaktadır. Ayrıca bu metod ağaçlarını Markov-Zincir Monte Carlo (MCMC) yaklaşımının kontrolü altında oluşturmaktadır (Avisé, 2004).

#### **1.7.4. Genetik Mesafe**

Prensip olarak uzaklık metodları, ağaçlarını ikili genetik mesafeleri matrisine uydurmaya çalışır (Felsenstein, 1988). Her iki baz dizisinde, mesafe, farklı iki baz dizisindeki pozisyonun bir kısmına bağlı olan tek değer, p mesafesi olarak adlandırılır.

P mesafesi, gerçek genetik mesafenin yetersiz değerlendirilmesidir. Çünkü bazı nükleotit pozisyonları çoklu yer değişimleri olaylarına maruz kalmış olabilir. Aslında, mutasyonlar genlerde devamlı olarak onarıldığı için, geçen evrimsel zaman içinde aynı pozisyonda meydana gelen çoklu değişimlerin şansı artmaktadır. Bununla birlikte değişim sayısına ulaşan uzaklığa dayalı genetik mesafe metodlarında spesifik evrimsel modelin uygulanması ile meydana gelen evrimsel değişimlerin doğası hakkında belirli tahminler yapar. Baz dizisi setinde bütün ikili mesafeler hesaplandığı zaman ağaç topolojisi belirli metodlarla çıkarılabilmektedir. Genetik mesafenin doğru tahmini çok önemlidir ve birçok olayda ağaç topolojisini açığa çıkaran metod seçiminden daha önemlidir (Verma, 2015).

### **1.8. Populasyon Genetiği Analizleri**

#### **1.8.1. Hardy-Weinberg Dengesi**

Rastgele çiftleşme sonucu alel sıklıkları bir kuşaktan diğerine değişmez, ancak alel yüzdeleri farklı genotipler arasında değişmektedir. Bu durum “Hardy-Weinberg dengesi” olarak bilinmektedir. Buna göre; iki alel ile başlangıç genotip sıklıkları ne olursa olsun, rastgele çiftleşmenin görüldüğü bir kuşak sonunda genotip sıklıkları;  $p^2$ :  $2pq$ :  $q^2$  şeklinde olacaktır (p:A1 aleli genotip sıklığı, q:A2 aleli genotip sıklığı).

Bundan başka onları değiştiren etmenler söz konusu olmadığı sürece bu genotip sıklıkları ve alel sıklıkları gelecek kuşaklarda değişmeden sabit kalacaktır. Bu denge

neredeşye tüm eşeyli üreme gösteren canlılarda evrimin genetik kuramının temelini oluşturmaktadır. Hardy-Weinberg dengesinden çıkarabildiğimiz rastgele olmayan çiftleşme, şans olayı, gen akışı, mutasyon ve doğal seçilim gibi varyasyonlar, alel ve genotip sıklıklarını değiştirebilen ve bir toplumda evrime neden olan en önemli evrimsel etkenlerdir (Futuyma, 2008).

Hardy-Weinberg dengesindeki bir populasyonda, örneklenen bireylerdeki heterozigotluk frekansı beklenen heterozigotluk ( $H_B$ ) olarak adlandırılır. Fakat genetik varyasyonun temel kanıtı, incelenen populasyondaki bireylerin tüm karakterize lokuslarındaki heterozigotluk değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanır ve buna gözlenen heterozigotluk ( $H_G$ ) denir. Beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri arasındaki değişimler Hardy-Weinberg dengesinden sapmalara kanıt oluşturmaktadır (Freeland, 2005).

### **1.8.2. Mesafe İzolasyonu**

Birçok türde populasyonlar arası gen akışı miktarı aralarındaki coğrafik mesafe ile tersi orantılıdır. Çünkü bireyler genellikle yakın alanlara dağılmaktadırlar. Bu olay, mesafe izolasyonu (IBD: Isolation by Distance; Wright, 1943) olarak bilinir ve genellikle populasyon çifti arasındaki uygun log dönüşümlü coğrafik mesafe karşılığı olan gen akışını hesaplamak için log dönüşümlü regresyon değerlendirmesidir. Bu ilişkinin anlamlılığı, “Mantel testi” kullanılarak değerlendirilir ve bu test genetik ve coğrafik mesafe arasındaki korelasyon için kullanılmaktadır. Mantel testi, bu karşılaştırmayı yapmak için uygundur; çünkü populasyon ikili grup karşılaştırmalarını bağımsız olarak farzetmez. Mesafe izolasyonu (IBD) regresyonunun meyili ve kesişim noktası, ilişkinin gücünü test etmek için kullanılır (Freeland, 2005).

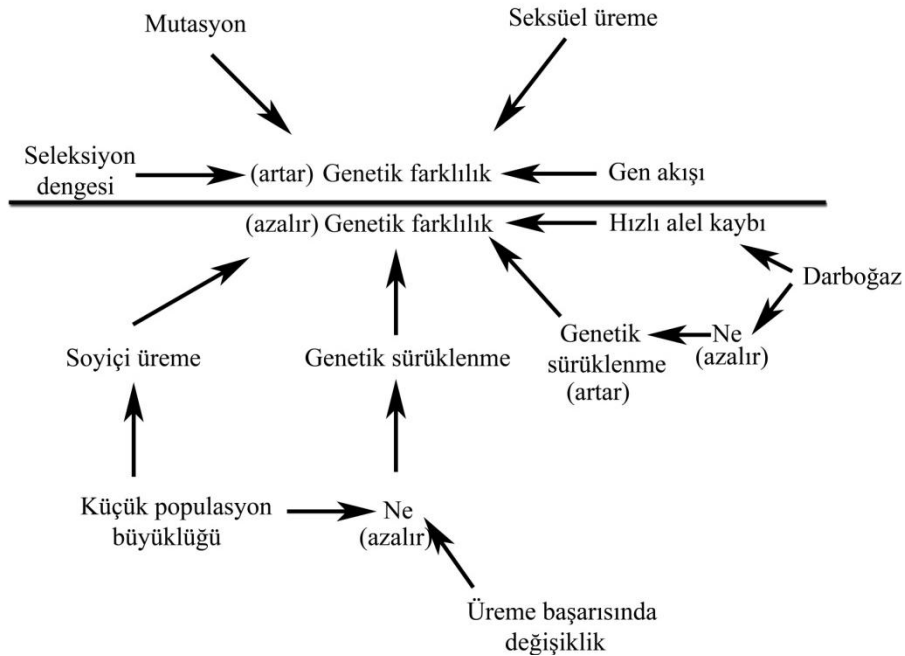
### **1.8.3. Etkili Populasyon Büyüklüğü ( $N_e$ )**

Populasyonun en temel ölçümü populasyonun büyüklüğüdür. Populasyon büyüklüğü ( $N_e$ ), bütün diğer populasyon genetiği safhalarında etkili olmaktadır. Büyük populasyonlar, küçük populasyonlardan daha çok hayatta kalma becerisine sahiptir. Bu yüzden IUCN’in Kırmızı Listesi anahtar değerşken olarak populasyon büyüklüğünü



kullanmaktadır ve 50 erişkin bireyden daha az sayıdaki popülasyonları kritik tehlike altındaki popülasyonlar olarak tanımlamaktadır. Popülasyon genetiği bakış açısından ise, etkili popülasyon büyüklüğü ( $N_e$ ) daha alakalı bir ölçüm birimidir.

Etkili popülasyon büyüklüğü takip edilen genetik sürüklenmede kaybedilen genetik farklılığın oranını yansıtmaktadır. İdeal bir popülasyonda  $N_e=N_c$  olmaktadır, fakat gerçekte bu nadir bir durumdur.  $N_e$  genellikle  $N_c$  den daha küçük olmaktadır. Bunun sebepleri, eşit olmayan cinsiyet oranı, üreme başarısındaki varyasyon ve popülasyon büyüklüğü dalgalanmalarıdır (Şekil 15) (Freeland, 2005).



**Şekil 15.** Bazı ana faktörler tarafından etkilenen popülasyon içinde genetik farklılık seviyelerinin gözden geçirilmesi (Freeland, 2005)

#### 1.8.4. Gen Akışı

Bir türün popülasyonları birbiriyle az ya da çok belli derecelerde gen alışverişi yapar. Bu işlem “gen akışı” olarak adlandırılır. Genler, göç eden bireyler tarafından veya gametler tarafından popülasyonlar arasında taşınabilir. Yeni popülasyona gelip burada üreme başarısı gösteremeyenler gen akışına katkı sağlamaz.

Eğer diğer faktörler gen akışına karşı çalışmıyorsa, gen akışı bir türün

populasyonlarını homojenleştirir. Yani, genetik sürüklenme ya da doğal seçilim yeterince etkili şekilde karşı koymuyorsa, gen akışı ilgili populasyonların hepsini aynı alel sıklıklarına getirir. Göçmenlerin aynı büyüklükteki ayrı toplumlara eşit dağılma olasılığı bulunuyorsa, populasyonlar arasındaki alel sıklıkları sonunda ortalama düzeye erişir. Bu olayın meydana geliş oranı, “gen akış düzeyi (m)” ile ilişkilidir, yani bu, her kuşakta populasyona diğer populasyonlardan göçlerle taşınmış çiftleşen bireylerdeki gen kopyalarının populasyondaki gen kopyalarının toplamına oranıdır (Futuyma, 2008).

Populasyona dair diğer bütün parametreler eşit olduğu zaman izole populasyonlar daha düşük etkili populasyon büyüklüğüne, daha yüksek genetik sürüklenme oranına sahiptir ve göç alan populasyonlar ile karşılaştırıldığında daha düşük genetik çeşitliliğe sahip olacaktır. En düşük seviyedeki göç bile, populasyona yeni genotip getireceğinden etkili populasyon büyüklüğü artacaktır. Bununla birlikte, lokal populasyonların genetik farklılığı artacaktır. Gen akışı özellikle tehlike altındaki populasyonlarda önem arz etmektedir. Gen akışının belirlenmesinde, iklim ve populasyonların dağılma kapasitesi de çok önemlidir (Freeland, 2005).

#### **1.8.5. Darboğaz**

Populasyonların çeşitli dış faktörler (soy içi üreme depresyonu, genetik varyasyon azalması vd.) ile maruz bırakıldıkları nüfus büyüklüğü kısıtlamalarına “darboğaz” adı verilmektedir (Futuyma, 2008). Populasyonların geçirdikleri darboğazlar, populasyonların etkin büyüklüklerini azaltır ve bunun sonucu olarak genetik çeşitliliği azaltır. Bununla birlikte, darboğaz genetik çeşitlilik ile alakalı her ölçüyü azaltmaz. Darboğazdan sonra populasyona has ender alellerin kaybolmasından dolayı alel çeşitliliği artış gösterir. Bu genellikle beklenen heterozigotlukta düşüş ile alakalıdır. Çünkü alel sayısında azalma Hardy-Weinberg dengesi altında beklenen heterozigotluğu azaltır. Bununla birlikte, gözlenen heterozigotluk değeri azalmayabilir ve hatta Hardy-Weinberg dengesi altındaki gözlenen heterozigotluk değerinde geçici bir artış söz konusu olabilir. Bazı durumlarda gözlenen heterozigotluk başarısı geçmiş darboğazlarla alakalı iyi bir belirteç olmaktadır (Freeland, 2005).

### 1.8.6. F İstatistiği

Populasyonlar arası genetik farklılaşmanın belirlenmesinde en yaygın kullanılan method Wright (1951) tarafından geliştirilen F istatistiğine dayanmaktadır. F istatistiği, populasyonların içinde ve arasındaki genetik farklılaşmanın tanımlanmasında soy içi üreme kat sayısını kullanmaktadır. Bu kat sayı 3 farklı seviyede hesaplanmaktadır. İlk F istatistiği  $F_{IS}$ ; bireyler içindeki soy içi üreme derecesinin populasyonun geri kalanı ile ilişkisini hesaplar.  $F_{IS}$  değeri; aynı bireydeki iki alelin atasal benzerlik olasılığını hesaplar.  $F_{IS}$  formülü;

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

Bu formülde  $H_I$  incelenen populasyondaki gözlenen heterozigotluğu  $H_S$  ise Hardy-Weinberg dengesindeki populasyonda beklenen heterozigotluğu ifade etmektedir.

İkinci F istatistiği,  $F_{ST}$  (ayrıca fiksasyon indeksi olarak bilinmektedir) ise; populasyonlar arası genetik farklılaşmanın hesaplanmasını sağlar. Bu değer; populasyonun tüm diğer populasyonlar ile alakalı soy içi üreme derecesidir.  $F_{ST}$  populasyon içindeki ataya benzeyen tükenmiş rastgele iki aleli temsil etmektedir. formülü;

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Bu formülde  $H_S$  değeri  $F_{IS}$  formülündeki ile aynı anlamı taşıırken;  $H_T$  ise tüm populasyonlardaki beklenen heterozigotluğu ifade etmektedir.

Üçüncü ve sonuncu F istatistiği ise;  $F_{IT}$ 'dir. Bu değer, diğer ikisinden çok daha az kullanılmaktadır. Bu değer, bireyin tüm populasyonlar ile alakalı heterozigotluğunu hesaplayarak bireydeki tüm soy içi üreme katsayısını bulmaktadır. Formülü;

$$F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$$

Yukarda bahsettiğimiz üç farklı F istatistiği değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren

formül aşağıda verilmiştir (Freeland, 2005);

$$F_{IT} = F_{IS} + F_{ST} - (F_{IS})(F_{ST})$$



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait 4 tür (*Rana macrocnemis*, *Rana camerani*, *Rana holtzi* ve *Rana tavasensis*) kullanılmıştır. Bu grup en kalabalık kuyruksuz kurbağa ailelerinden biri olan Ranidae ailesine aittir. Mevcut çalışmada kullanılan Anadolu dağ kurbağa grubuna ait türlerin sistematik bilgileri aşağıda verilmiştir:

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Altşube: Vertebrata

Sınıf: Amphibia

Takım: Anura

Aile: Ranidae

Cins: *Rana*

Tür: *Rana macrocnemis* (Şekil 16)

Tür: *Rana camerani* (Şekil 17)

Tür: *Rana holtzi* (Şekil 18)

Tür: *Rana tavasensis* (Şekil 19)



Şekil 16. Adana İnderesi lokalitesinden örneklenen *R. macrocnemis* türüne ait birey



Şekil 17. Van Bahçesaray lokalitesinden örneklenen *R. camerani* türüne ait birey



**Şekil 18.** Mersin Yanpınar lokalitesinden örneklenen *R. holtzi* türüne ait bireyler



**Şekil 19.** Denizli Çakıroluk lokalitesinden örneklenen *R. tavasensis* türüne ait birey

Literatüre dayalı veriler dikkate alınarak toplam 28 farklı lokaliteden Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri 2013.102.03.10 No'lu proje kapsamında örnekleme yapılmıştır. Üç lokalite için ise; Adnan Menderes Üniversitesi, Zooloji müzesi materyallerinden örnekler kullanılmıştır (Tablo 1, Şekil 20). Lokalitelere göre tür tanımlaması için geçmiş literatür bilgisi temel alındı. Her lokaliteden en fazla 6 adet birey arazide doğal ortamlarında elle veya atrapla sakince yakalanıp deri yoluyla

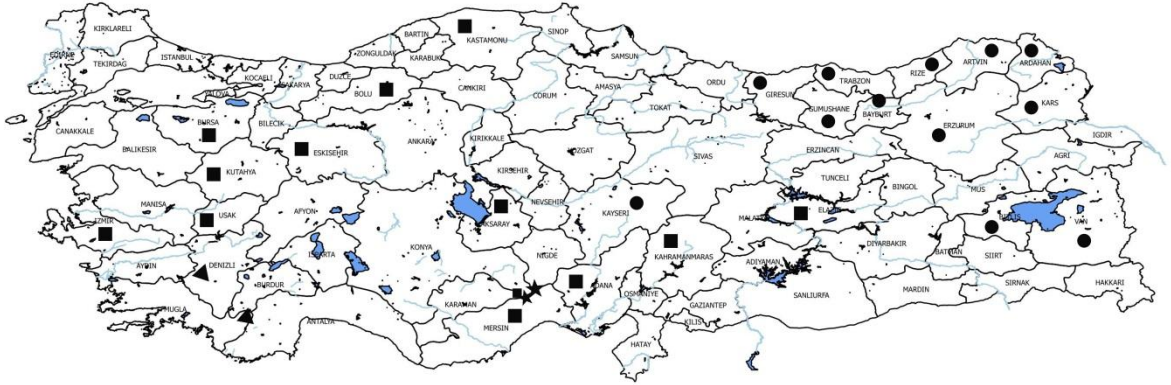
enjekte edilen 250 mg/L MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate) ile bayıldıktan sonra steril cerrahi makasla parmak uçlarından küçük bir kısım alınmıştır. Hayvanlar kendine geldikten sonra doğal ortamlarına geri bırakılmıştır (Arazi çalışmaları için, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü ve RTEÜ, Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan gerekli izinler alınmıştır (Etik kurul onay numarası: 2014/36)).





**Tablo 1.** Anadolu dağ kurbağaları örneklerine ait lokalite bilgileri

Örnekleme bölgesi	Tarih	Rakım (m)	Koordinatlar
Seviçova (Konya)	02.08.2014	2351	37.30/34.31
atak (Mersin)	03.08.2014	1586	36.94/34.24
Ekecik (Aksaray)	04.08.2014	1593	38.65/34.07
Erciyes (Kayseri)	05.08.2014	2428	38.53/35.55
Eğrigöl (Mersin)	02.08.2014	2713	37.32/34.42
Yanpınar (Mersin)	02.08.2014	2839	37.31/34.43
Ovit (Rize)	05.05.2013	2695	40.62/40.78
Kümbet yaylası (Giresun)	31.08.2014	1573	40.55/38.45
Sarıkamış (Kars)	16.06.2014	1916	40.40/42.72
Ağzıaçık (Erzurum)	17.06.2014	2248	40.28/40.99
Bahçesaray (Van)	13.07.2014	2008	38.11/43.13
Hizan (Bitlis)	07.06.2015	1560	38.25/42.43
akırgl (Gümüşhane)	17.05.2014	2152	40.63/38.68
Murgul (Artvin)	15.06.2014	544	41.15/41.33
Karagöl (Artvin)	20.08.2014	1550	41.22/41.58
Yalnızçam (Ardahan)	19.06.2014	1822	41.06/42.51
Ilgaz (Kastamonu)	26.07.2014	2230	41.02/33.76
Samat yaylası (Bolu)	07.09.2014	1384	40.60/31.24
Uludağ (Bursa)	06.08.2013	2543	40.07/28.89
Atlıdere (Muğla)	16.09.2014	1402	36.86/29.70
Sündiken dağı (Eskişehir)	26.06.2014	1056	39.94/30.97
Banaz (Uşak)	28.06.2014	1189	38.85/29.68
Murat dağı (Kütahya)	27.06.2014	1138	39.10/29.47
İnderesi (Adana)	06.08.2014	1529	37.91/35.61
Maden (Elazığ)	09.08.2014	1508	38.53/39.65
Serssem (Kahramanmaraş)	07.08.2014	1850	37.56/36.57
Uzungöl (Trabzon)	05.09.2014	1896	40.56/40.41
Balıklıgöl (Trabzon-Bayburt)	05.09.2014	2543	40.53/40.39
Tavas (Denizli)	-	-	AD Mze Materyali
Ulukışla (Niğde)	-	-	AD Mze Materyali
Ödemiş (İzmir)	-	-	AD Mze Materyali



Şekil 20. Örnekleme yapıldığı lokaliteler ( ■ *R. macrocnemis*, ● *R. camerani*, ★ *R. holtzi*, ▲ *R. tavasensis*).

## 2.2. Metod

### 2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu parmak uçlarından alınan örneklerden, Wizard Genomic DNA saflaştırma kiti (Promega, Madison, USA) yardımı ile üreticinin sağlamış olduğu protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı etidyum bromür ile boyanmış % 0,8'lik agaroz jelde yürütülerek ve Nanodrop spektrofotometrede (Thermo Scientific) görüntülenerek kontrol edilmiştir. Elde edilen DNA, PZR yapılıncaya kadar -20 C° de saklanmıştır.

### 2.2.2. mtDNA ve nDNA Genlerinin PZR Yardımı ile Çoğaltılması

Bu çalışmada; Anadolu dağ kurbağalarına ait türler arasındaki filogenetik ilişkiyi saptamak ve populasyonların genetik yapılarını ortaya çıkarabilmek için; mitokondriyal (cyt b ve COI) ve nükleer (POMC ve RAG1) gen bölgeleri kullanılmıştır. Mitokondriyal (cyt b ve COI) ve nükleer (POMC ve RAG1) gen bölgelerinin çoğaltılmasında doku örneklerinden elde edilmiş total DNA kullanılmıştır. 50 µl'lik PZR şartında; DNA (3 µl), 5 µl PZR Tamponu (10 mM), ileri ve geri yönlü primerler (0,5-1 µl), Taq DNA Polimeraz enzimi (50 ünite/ml) (0,2 µl), dNTPmix (5 µl) (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP), 3 mM MgCl<sub>2</sub> ve ddH<sub>2</sub>O bulunacak şekilde

reaksiyon hazırlanmıştır. COI geni hariç primer dizileri literatür doğrultusunda belirlenmiştir (Tablo 2). COI geni primeri çeşitli *Rana* türlerinin gen dizileri temel alınarak dizayn edilmiştir (türlerin Gen Bankası erişim numaraları: NC\_028521, NC\_023528, KF898355). PZR reaksiyonu sonrası 5 µl PZR ürünü + 1 µl 6X yükleme boyası etidyum bromür yoğunluğu 0,01 mg (1mg/100 µl) olacak şekilde hazırlanan %1'lik agaroz jel üzerinde 1xTAE tampon sisteminde 1 saat yürütülmüştür. Etidyum bromür ile boyanan DNA parçaları UV illüminatörle görüntülenerek jel görüntüleri jel dökümantasyon sistemi kullanılarak kayıt edilmiştir.

**Tablo 2.** mtDNA ve nDNA primerlerinin baz dizileri ve PZR koşulları

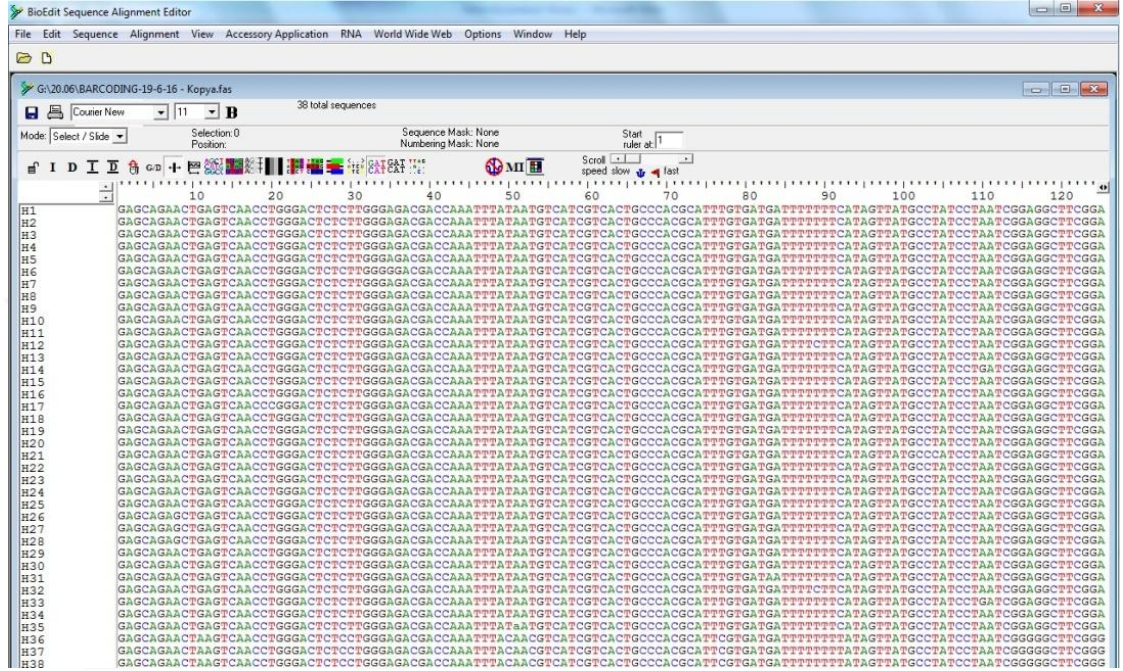
Gen	Baz Dizilimi	Referans	PZR koşulları	Baz uzunlukları
cyt b	F:TTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTAGGC R:AGGGAACGAAGTTTGGAGGTGTGG	Vences vd., 2013	95C° 3dk 95C° 30 sn 55C° 45 sn 72C° 1 dk 72C° 7 dk X40	481 bç
COI	F:CATAAAGAYATTGGAACCC R:GTRAAAYATRTGRTGGGCTC	Bu çalışma	95C° 3dk 95C° 30 sn 52C° 45 sn 72C° 1 dk 72C° 7 dk X40	743 bç
POMC	F:ATATGTCATGASCCAYTTYCGCTGGAA R:GGCRTTYTTGAAWAGAGTCATTAGWGG	Veietes vd., 2007	95C° 3dk 95C° 30 sn 52C° 45 sn 72C° 1 dk 72C° 7 dk X40	401 bç
RAG1	F:ATAACTGGTCGTCAGATCTTTCAGCC R:CTTGACTGACGAGCATTTCAT	Vences vd., 2013	95C° 3dk 95C° 30 sn 56C° 45 sn 72C° 1 dk 72C° 7 dk X40	717 bç

### 2.2.3. DNA Dizin Analizi

Agaroz jelde yürütülerek kontrol edilen mtDNA ve nDNA örneklerine ait PZR ürünleri, özel/ticari laboratuarda (Macrogen Inc., Güney Kore) ABI 3730XL gibi otomatik dizin analiz sistemleri kullanılarak analizi yaptırıldı.

Macrogen firması tarafından “.abi” dosya formatında gönderilen baz dizileri ilk

önce çoklu hizalama programı (Bioedit) (Hall, 1999) yardımı ile hizalanmıştır (Şekil 21). Hizalanan dizilerin uzunluk farklılıkları giderildikten sonra her bir örneğin dizi uzunluğu cyt b gen bölgesi için 481 bç, COI gen bölgesi için 743 bç, RAG1 gen bölgesi için 717 bç, POMC gen bölgesi için 401 bç olarak hazırlanmıştır.



Şekil 21. Bioedit programı ile hizalanmış sekans dizileri

## 2.2.4. mtDNA ve nDNA Verilerinin Analizi

Mitokondriyal ve nükleer gen bölgeleri için analizlerde kullanılan birey sayısı Tablo 3’de verilmiştir. Elde edilen mitokondriyal ve nükleer genomların % A-T analizi, korunmuş bölgelerin analizi, değişken bölgelerin analizi, parsimonik bilgi içeren bölgelerin (Pi) analizi MEGA 6 (Tamura vd., 2013) programı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Baz dizilerinin gerekli formatlara dönüştürülmesi için Clustal X (Thompson, 1994) ve Clustal W (Thompson vd., 1997) programları kullanılmıştır. DNASP v5 (Librado ve Rozas, 2009) programı kullanılarak haplotipler belirlenmiş ve populasyonları temsil eden haplotipler arası ilişki ve mutasyon miktarı eldesi Network programı (Bandelt vd., 1999) (Fluxus Engineering) kullanılarak oluşturuldu.

**Tablo 3.** mtDNA (cyt b ve COI) ve nDNA (POMC ve RAG1) gen bölgeleri analizlerinde kullanılan birey sayısı (n=birey sayısı)

<b>Lokaliteler</b>	<b>cyt b (n)</b>	<b>COI (n)</b>	<b>POMC (n)</b>	<b>RAG (n)</b>
Sarıkamış (Kars)	4	3	4	2
Ödemiş (İzmir)	4	3	5	2
Uzungöl (Trabzon)	5	3	2	3
Balıklığöl (Bayburt Trabzon sınırı)	4	3	3	2
Çakırgöl (Gümüşhane)	3	2	4	2
Ağzıaçık geçidi (Erzurum)	4	3	2	2
Murgul (Artvin)	6	3	4	3
Yalnızçam (Ardahan)	5	3	2	2
Yanpınar (Mersin)	5	4	4	2
Seviçova (Konya)	5	4	2	2
Eğrigöl (Mersin)	5	3	5	2
Samas yaylası (Bolu)	5	3	5	3
Tepeköy (Mersin)	5	3	1	2
Serssem Yaylası (Kahramanmaraş)	3	3	3	2
Bahçesaray (Van)	5	4	3	2
Kümbet (Giresun)	5	3	2	2
Sündiken (Eskişehir)	3	3	3	2
Ekecik (Aksaray)	5	3	5	1
Erciyes (Kayseri)	5	3	2	2
Murat Dağı (Kütahya)	4	3	4	2
Maden (Elazığ)	5	3	5	2
İnderesi (Adana)	6	3	1	2
Hizan (Bitlis)	3	3	2	2
Uludağ (Bursa)	5	3	5	2
Ovit (Rize)	4	3	2	3
Ilgaz (Kastamonu)	1	1	1	1
Karagöl (Artvin)	2	2	1	1
Ulukışla (Niğde)	3	3	5	3
Banaz (Uşak)	4	4	5	2
Tavas (Denizli)	3	2	2	2
Atlidere (Antalya)	5	3	4	2
<b>Toplam</b>	<b>127</b>	<b>93</b>	<b>98</b>	<b>64</b>

Filogenetik ilişkileri inceleyen ağaçların oluşturulmasında ve genetik yapının ortaya çıkarılmasında daha çok varyasyon göstermesi ve bilgi içermesinden dolayı sadece mtDNA gen bölgelerinden elde edilen verilerinden faydalanılmıştır. Filogenetik

ağaçlar, Maksimum tutumluluk (MP), Bayesiyen çıkarımı (BI) ve Maksimum benzerlik (MB) metodlarına göre oluşturuldu. En uygun modeli sağlayarak gerçekleştirilen Bayesiyen analizinde filogenetik ağaçlar MrBayes 3.1.2. (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) programı kullanılarak oluşturuldu. MrBayes 3.1.2. (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) programı yardımı ile Markov-Zincir Monte Carlo (MCMC) analizi 10000000 kuşak yürütüldü (sample freq=100, lset nst=2 rates=gamma, burnin=25000). Maksimum benzerlik ağaçları uygun nükleotit baz değişim modeli ile PhyML 3.0 (Guindon, 2010) programı yardımı ile oluşturuldu. Maksimum tutumluluk analizinde buluşsal arama PAUP 4.0 (Swofford, 2003) programı vasıtası ile gerçekleştirildi. Analiz 1000 tekrarlı olarak yürütüldü. En uygun baz değişim modeli ise, Akaike bilgi kriteri kullanılarak JModelTest version 0.1 (Posada, 2008) programı ile elde edildi. Ağaç dosyalarını görüntülemek için ise FigTree v 1.4.2 (Rambaut, 2014) programı kullanıldı. Ayrıca, etkin popülasyon büyüklüğü analizi yürütülürken (ESS) Tracer v1.5 (Rambaut ve Drummond, 2007) programı ile kontrol edildi. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken dış grup olarak *R. dalmatina* (KJ789718 ve KJ789705 cyt b, JN871602 ve KP697920 COI) ve *R. temporaria* (KC800109 ve KC799522 cyt b, KC977250 ve KJ128669 COI) türleri kullandı. Türlerle ait sekans dizileri NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri tabanından elde edildi.

Haplotalar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değeri MEGA 6 programı (Tamura vd., 2013) kullanılarak hesaplandı. Gruplar arası ve grup içi genetik farklılığı hesaplamak için moleküler varyans analizi (AMOVA) Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier ve Lischer, 2011) programı kullanılarak 5000 tekrarlı gerçekleştirildi. Her bir popülasyona ait birey sayısı bu analizi yürütmek için düşük olduğundan, popülasyonlarımızı haplotip ağındaki dağılımlarına ve coğrafik ilişkilerine göre 7 anlamlı gruba ayırdık. Bu gruplar aşağıdaki gibidir:

Grup 1: Bolu (Samat), Bursa (Uludağ) ve Kastamonu (İlgaz),

Grup 2: İzmir (Ödemiş), Uşak (Banaz), Eskişehir (Sündiken), Kütahya (Murat Dağları),

Grup 3: Trabzon (Uzungöl), Rize (Ovit), Artvin (Karagöl ve Murgul), Giresun (Kümbet), Ardahan (Yalnızçam), Bayburt ve Trabzon sınırı (Balıklıgöl), Gümüşhane (Çakırgöl)

Grup 4: Muğla (Atlidere), Denizli (Tavas),

Grup 5: Mersin (Yanpınar), Konya (Seviçova), Mersin (Eğrigöl), Niğde (Ulukışla), Mersin (Çatak),

Grup 6: Van (Bahçesaray), Elazığ (Maden), Erzurum (Ağzıaçık), Kars (Sarıkamış), Bitlis (Hizan)

Grup 7: Adana (İnderesi), Aksaray (Ekecik), Kayseri (Erciyes), Kahramanmaraş (Sersem).

### **2.2.5. Mikrosatellit Fragmentlerin Eldesi**

Miktarı ve kalitesi kontrol edilmiş olan genomik DNA'ların mikrosatellit bölgelerinin çoğaltımı daha önce araştırmacılar tarafından geliştirilmiş lokus spesifik primerler (Tablo 4) kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle yapıldı. Mikrosatellit primerlerinin ileri yönlüleri, ürün boyu ve tutunma sıcaklığına bağlı olarak belirlenen floresan boya ile işaretli olarak kullanıldı. Bir reaksiyonda 3 mikrosatellit lokusu çoğaltıldı. Primerlerin tekrar sayıları, baz dizileri, hangi boyayla işaretleneceği, bağlanma sıcaklığı, alel sayısı Tablo 4 ve 5'de verilmiştir. PZR reaksiyonu; 3,0 µL Master Mix, 0,4 µL (10 µM) floresans işaretli ileri ve geri yönlü primerler ve 1 µL DNA (10-20 ng/µL) içerecek şekilde hazırlandı. PZR için kullanılacak olan protokol; 95 C°de 2 dakika ön inkübasyon, 35 döngü olacak şekilde 94 C°de 30 saniye, 48-60 C°de (primerlerin erime sıcaklıklarına göre) 40 saniye, 72 C°de 40 saniye ve son olarak 72 C°de 10 dakika inkübe edilerek reaksiyon tamamlandı. PZR ürünleri % 2,5'lük agaroz jelde kontrol edildi (Şekil 22).

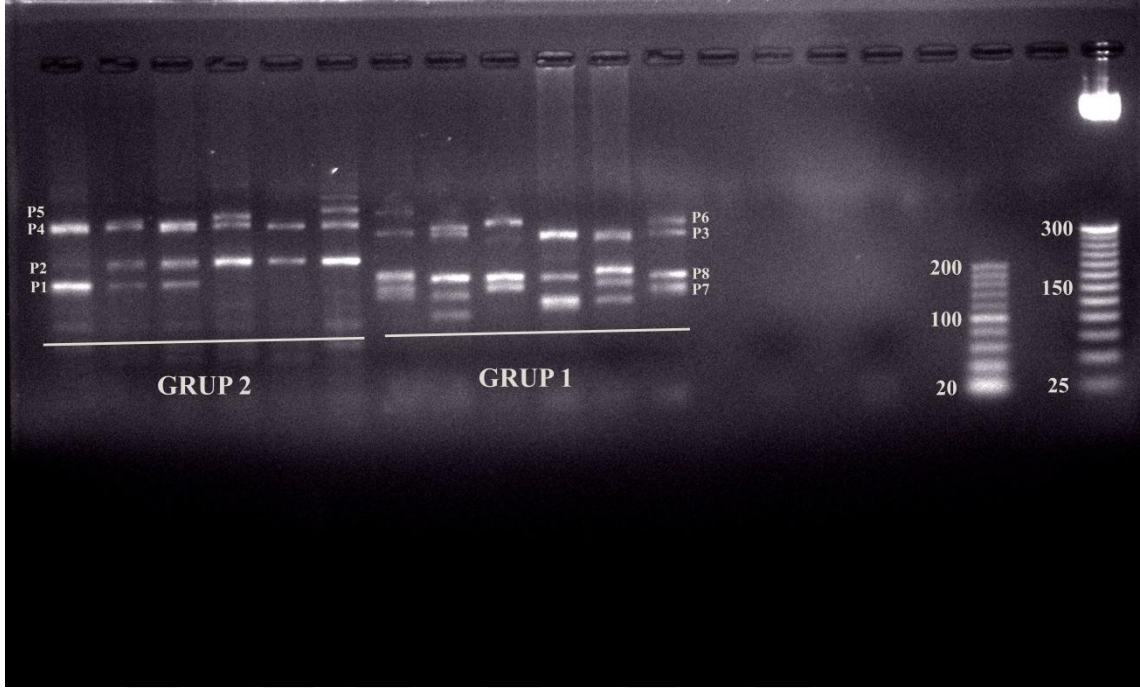
**Tablo 4.** Çalışmada kullanılan mikrosatellit primerler ve özellikleri

Lokus	Allel Boyu	Floresans Boya	Tekrar motifi
BFG095 (P1)	236-284	FAM	(GT) <sub>14</sub>
BFG134 (P2)	248-275	VIC	(TG) <sub>18</sub>
BFG143 (P3)	223-302	FAM	(AC) <sub>19</sub>
Radal G-11 (P4)	351-367	NED	(GATA) <sub>11</sub>
Radal C8 (P5)	351-367	-	(GATA) <sub>11</sub>
Radal E-8 (P6)	366-414	VIC	(TATC) <sub>6</sub> G(TATC) <sub>8</sub>
Radal F-5 (P7)	157-173	NED	(TAGA) <sub>9</sub> (TAGG) <sub>2</sub> TAGA(TAGG) <sub>2</sub> (TAGA) <sub>6</sub>
Radal-H1 (P8)	172-192	-	(CTAT) <sub>16</sub>
Radal B5 (P9)	380-404	-	(TATC) <sub>11</sub>
Radal F3 (P10)	213-257	-	(TATC) <sub>6</sub> (TGTC) <sub>3</sub> GTTC(TATC) <sub>16</sub>
Radal G12 (P11)	235-263	-	(TAGA) <sub>10</sub> TAAA(TAGA) <sub>5</sub>

**Tablo 5.** Mikrosatellit primerlerinin baz dizilimi

Lokus	Nükleotit sırası	Tm (C°)	Referans
BFG095	F: GTATATGTGCAGAAGGCGGTC R: ATCATTCCAAAACGGGTTC	55	Matsuba ve Merila, 2009
BFG134	F: GTCCCATCTAGTGCTATCAAAGGT R: ACTACAACAAGCCGAAACACG	55	Matsuba ve Merila, 2009
BFG143	F: CCATCTCTACATAATCCCAGGC R: ACTAGAAGCCCTCCCTGTTTGT	55	Matsuba ve Merila, 2009
Radal G-11	F: GAAATAAACTTCCTGGTGGTTGG R: TCCAGTGCCTAATCCTCTCCTC	56	Hauswaldt vd., 2008
Radal E-8	F: AGCTAGATGGGTTTCAAATGC R: TGAGAGATCAGACAACTAACTA AAGATAGG	54	Hauswaldt vd., 2008
Radal F-5	F: GTAAAGCTCTCATGAAACCTAAAAG R: TGCATATGCTGACTGTATTTATTG	52	Hauswaldt vd., 2008
Radal B5	F: CAGTAGTTCTGTCACACGGGAAC R: ACCCTTGAGCATAATGGAATAGC	56	Hauswaldt vd., 2008
Radal C8	F: GAAATAAACTTCCTGGTGGTTGG R: TCCAGTGCCTAATCCTCTCCTC	56	Hauswaldt vd., 2008
Radal F3	F: TTATATTCGGGTCCGCTTATACTC R: AAAATGTATCCGCACCAAATAAC	54	Hauswaldt vd., 2008
Radal G12	F: TTTGGAATTCTATGTCCAACAGG R: CAGAGACATTTTTGCTGGTTTG	55	Hauswaldt vd., 2008
Radal-H1	F: CCGGAACAAAATATTTCAAGTGTG R: GGTGGCACTAGAAAGAAATAAAG	55	Hauswaldt vd., 2008





**Şekil 22.** PZR ile çoğaltılmış mikrosatellit lokuslarının agaroz jeldeki görünümü

#### 2.2.6. Mikrosatellit Verilerinin Analizi

Bu çalışmada 31 farklı populasyona ait toplam 132 örneğin 6 mikrosatellit lokusuna ait genotipleri değerlendirilmiştir. Mikrosatellit analizlerinde sonuçların istatistiksel olarak güvenilirliğini artırmak için, mtDNA gen bölgelerinin AMOVA analizi için oluşturulan gruplar kullanıldı.

Mikrosatellit alellerinin okunması Macrogen Inc. (Korea) şirketinde yaptırıldı. Her bir lokusa ait veri ABI 3730 otomatik cihazları ile analiz edildi. Herbir birey ve lokus için alel büyüklükleri ve frekansları Genemarker (Soft Genetics LLC) programı yardımı ile belirlendi (Şekil 23 ve 24). Elde edilen veri seti CONVERT (Glaubitz, 2004) programı vasıtasıyla kullanılacak olan analiz programlarının girdi dosyası formatına dönüştürüldü.

Bireylerde kalıp DNA çeşitli nedenlerle hasar görürse veya primerlerin bağlanma bölgesinde mutasyon oluşursa nul alel (sessiz alel) meydana gelmektedir. Nul alelin varlığının belirlenmesinde hata yapılması populasyon içi genetik farklılaşmanın yanlış hesaplanmasına sebep olabilir (Paetkau ve Strabeck, 1995). Mikrosatellit lokuslarında nul alel varlığı Micro-Checker (van Oosterhout vd., 2004) ve FreeNA (Chapuis ve

Estoup, 2007) programı ile test edildi.

Hardy Weinberg dengesi, gözlenen ve beklenen heterozigotluk oranı Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier ve Lischer, 2011) programıyla hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  değerleri ve HW global testi Genepop (Rousset, 2008), ENA doğrulaması (Dempster vd., 1977) yapılmış  $F_{ST}$  değerlerinin hesaplanmasında ise FreeNA (Chapuis ve Estoup, 2007) programı kullanıldı. Soyüçü üreme katsayısı ( $F_{IS}$ ) değeri ise FSTAT (Goudet, 2001) programıyla hesaplandı. Etkili popülasyon büyüklüğünün ( $N_e$ ) tespiti amacıyla LDNe (Waples ve Do, 2008) programı kullanıldı.

Popülasyonlara has alellerin (private) varlığı veya yokluğu popülasyonlar arası göç oranı hakkında bilgi vermektedir. Alel sayısı, popülasyonlara has alellerin varlığı ve frekansları, popülasyonlar arasındaki genetik uzaklık ve  $N_m$  değerleri GenAlEx (Peakall ve Smouse, 2012) programı kullanılarak hesaplandı. Her bir kuşakta alt popülasyonlara giren birey sayısı ( $N_m$ ) elde edildi.

Mikrosatellit lokuslarında heterozigotluk başarısı ve alel frekansı dağılım analizi, popülasyonlarda darboğaz etkisinin belirlenmesi amacıyla Bottleneck (Piry vd., 1999) programı kullanıldı. Hardy-Weinberg (HW) dengesinden sapmalar her bir lokus-popülasyon kombinasyonu için 1000 tekrarlı 10000 adımlı Markov zinciri kullanılarak tespit edildi. Gözlenen alel sayısından ve beklenen heterozigotlukların dağılımından yola çıkılarak her bir lokus ve her bir popülasyon için dağılımları Basamak Tarzı Mutasyon modeli (Kimura ve Ohta, 1978) ve İki Safhalı Mutasyon Modeli (Di Rienzo vd., 1994; Slatkin, 1995) ile tespit edildi.

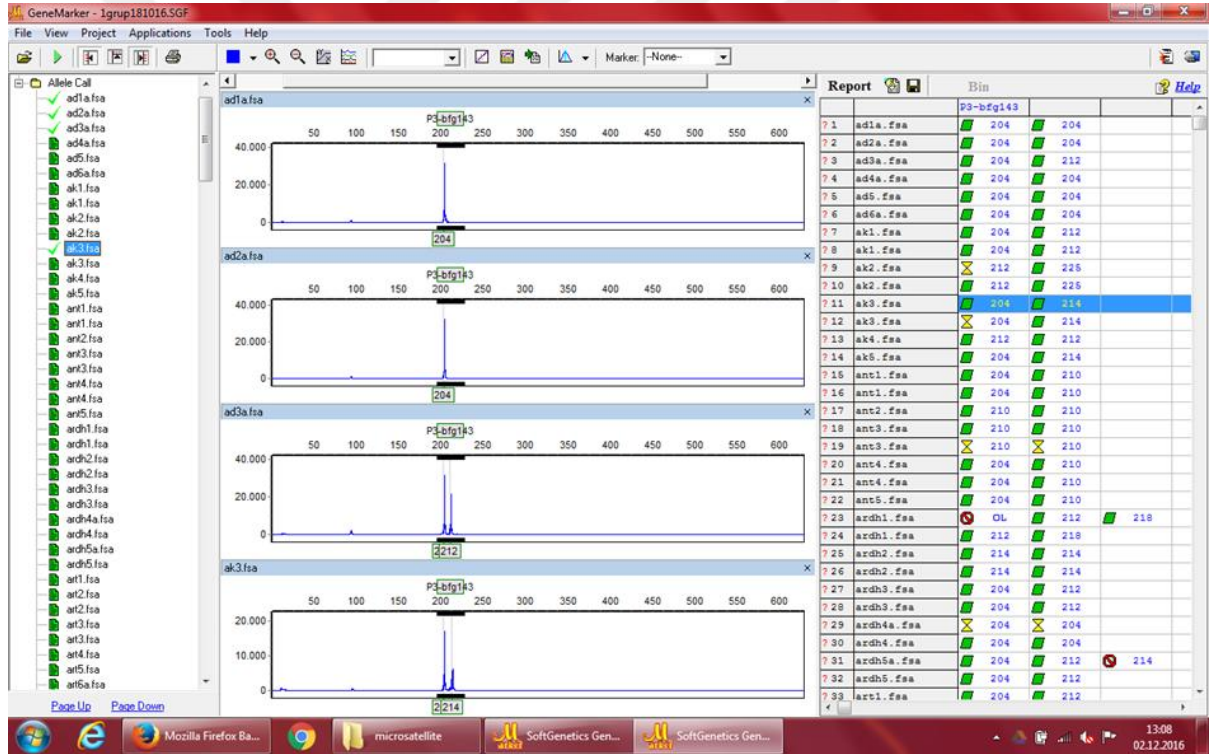
Popülasyonların genetik yapısı ilk olarak Cockerham (1973) tarafından tanımlanan ve daha sonra Weir ve Cockerham (1984) tarafından geliştirilen varyans analizi ile araştırılmıştır. Bu bağlamda, moleküler varyans analizi (AMOVA) analizi Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier ve Lischer, 2011) programı kullanılarak yapılmıştır.

Temel koordinatlar analizi (PCoA) popülasyonları kimliklerine bir kenara bırakarak, bireyler arası kümelenmeyi gösteren ve niteliksel olarak araştıran bir methodur. Anadolu dağ kurbağaları arasındaki mikrosatellit genetik varyasyonu

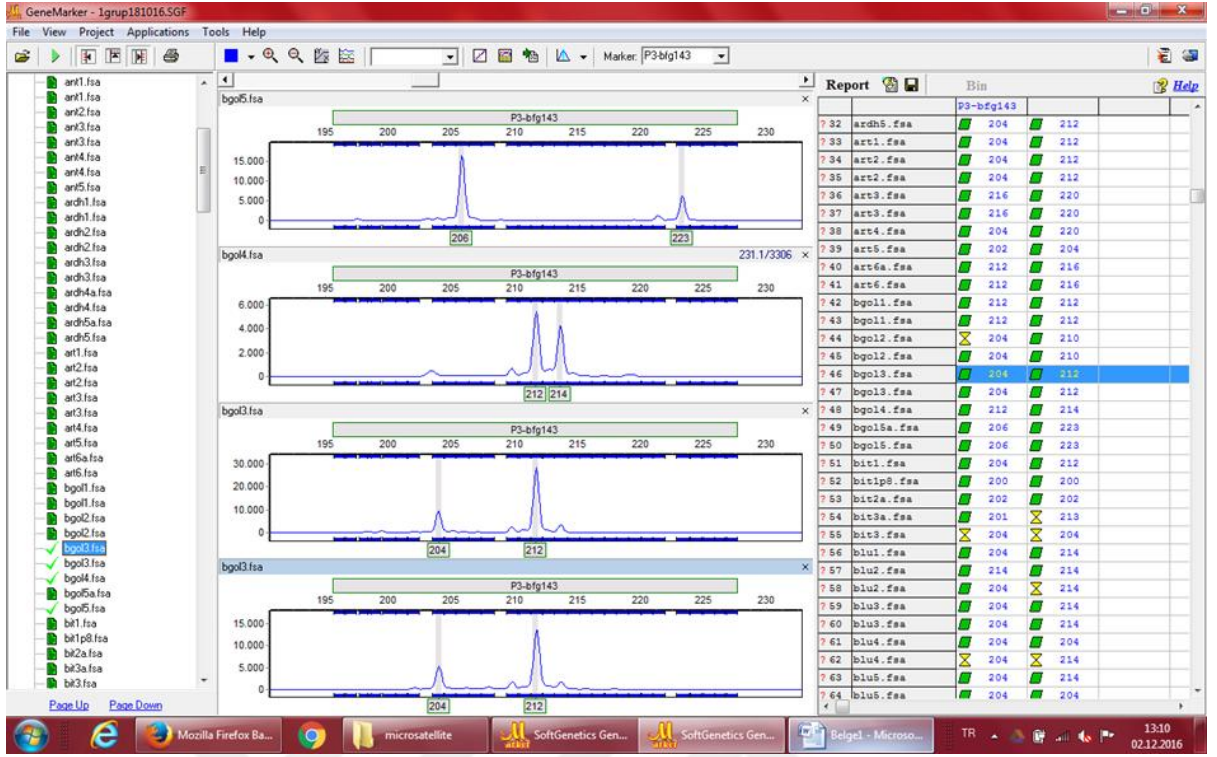
özetlemek için temel koordinatlar analizi GenAlex programı (Peakall ve Smouse, 2012) kullanılarak yapıldı. Ayrıca aynı programla, gruplar arası genetik ve coğrafik mesafenin ilişkisini inceleyen mekansal otokorelasyon testi ve Mantel testi de (Mantel, 1967) uygulandı.

Mikrosatellit verilere göre popülasyonların yapısı Bayesiyen gruplandırma algoritmasını uygulayan Structure (Pritchard vd., 2000) programı ile değerlendirilmiştir.

Popülasyonlar arasındaki uzaklığa dayalı ilişkileri gösteren, Neighbor Joining ağacı 1000000 bootstrap yapılarak online olarak erişim sağlanabilen POPTREW (Takezaki vd., 2014) programıyla elde edildi.



Şekil 23. GeneMarker programında mikrosatellit lokuslarının görüntülenmesi



Şekil 24. GeneMarker programında mikrosatellit lokuslarının görüntülenmesi

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Filogenetik Analizler**

##### **3.1.1. cyt b Gen Bölgesi Dizin Analizi**

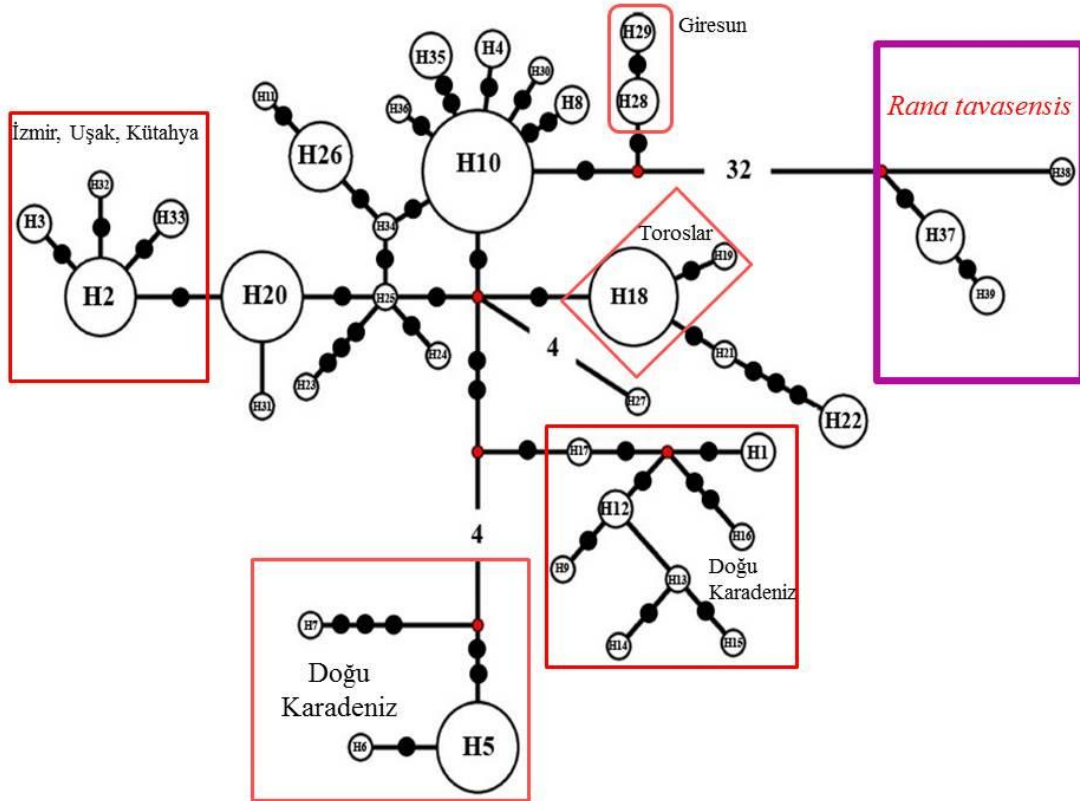
Toplam 31 Anadolu dağ kurbağası popülasyona ait örneklerin mitokondriyal DNA cyt b gen bölgesinin 481 bç'lık kısmı analiz edilmiştir. Analize dahil edilen toplam 127 örnekte, 39 haplotip ve 59 adet tutumluluk bilgi verici, 73 değişken bölge ve 408 adet korunmuş bölge olduğu saptandı. Analiz edilen örneklere ait cyt b haplotip dağılımı Tablo 6'da verilmiştir. Sitokrom b gen bölgesi için haplotip çeşitliliği, Hd: 0,933; nükleotit çeşitliliği ise, Pi: 0,01757 olarak tespit edildi. Bu gen bölgesi için nükleotit kompozisyon oranları T (U); 28,3, C; 35,4, A; 24,1, G; 12,2 olarak tespit edildi.

**Tablo 6.** cyt b gen bölgesi haplotip dağılımı

Lokaliteler	Haplotip
Sarıkamış (Kars)	H1, H4
Ödemiş (İzmir)	H2, H3
Uzungöl (Trabzon)	H5, H6, H7
Balıklığöl (Bayburt Trabzon sınırı)	H5
Çakırgöl (Gümüşhane)	H5, H8
Ağzıaçık geçidi (Erzurum)	H9
Murgul (Artvin)	H5, H12, H13
Yalnızçam (Ardahan)	H5, H14, H15, H16, H17
Yanpınar (Mersin)	H18
Seviçova (Konya)	H18, H19
Eğrigöl (Mersin)	H18
Samas yaylası (Bolu)	H20
Tepeköy (Mersin)	H21, H22
Sersem Yaylası (Kahramanmaraş)	H23, H24, H25
Bahçesaray (Van)	H26, H27
Kümbet (Giresun)	H28, H29
Sündiken (Eskişehir)	H20
Ekecik (Aksaray)	H10, H30
Erciyes (Kayseri)	H10, H31
Murat Dağı (Kütahya)	H2, H32, H33
Maden (Elazığ)	H10, H34
İnderesi (Adana)	H10
Hizan (Bitlis)	H26
Uludağ (Bursa)	H2, H20
Ovit (Rize)	H35
Ilgaz (Kastamonu)	H20
Karagöl (Artvin)	H1, H36
Ulukışla (Niğde)	H10, H11
Banaz (Uşak)	H2
Tavas (Denizli)	H37, H38
Atlidere (Antalya)	H37, H39

Network analizi sonuçlarına göre; *R. tavasensis* türünü temsil eden H37, H38 ve H39 haplotipleri ile diğer *Rana* türlerini temsil eden haplotipler arasında en az 32 baz değişimi gözlemlendi (Şekil 25). Network ağında, Van ve Bitlis örneklerine ait haplotipler (H26) ile Ulukışla (H11) örneklerine ait haplotipin birbirine çok yakın gruplandı. Bununla birlikte, batı Anadolu (Murat Dağı, Banaz, Uludağ, Ödemiş) bölgesine ait

örneklerin haplotipleri (H2, H3, H32 ve H33) de bir grup oluşturdu. Doğu Karadeniz ve Kafkasya coğrafyasında bazı bölgelerin (Uzungöl, Balıklıgöl, Murgul, Yalnızçam, Sarıkamış, Çakırgöl) haplotiplerinin kendi aralarında gruplar oluşturduğu gözlenirken, bazı bölgelerin ise (Ovit, Karagöl, Kümbet) diğer coğrafik bölgelerde yaygın haplotipler ile yakın ilişki kurduğu gözlemlendi.



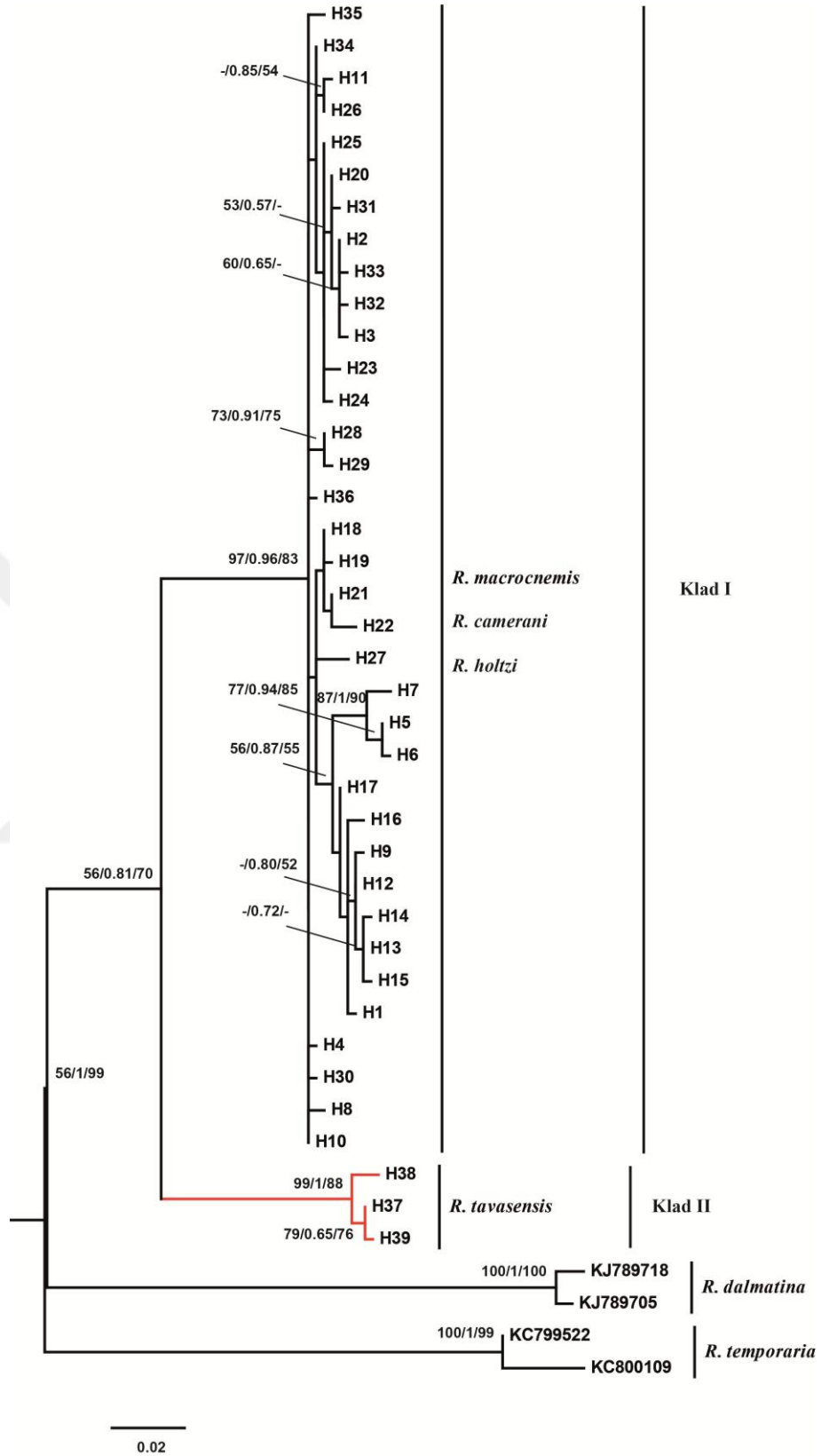
Şekil 25. cyt b gen bölgesi haplotip ağı

Filogenetik ağaçların oluşturulması için gerekli olan baz değişim modeli jModelTest programı ile tespit edildi. Model seçim analizi bağlamında Akaike Bilgi Kriterleri kapsamında en uygun baz değişim modeli cyt b gen bölgesi için HKY+G (-lnL = 1196,9602) olarak tespit edildi. Bu modele göre baz frekansları, adenin (A) = 0,2384, sitozin (C) = 0,3458, guanin (G) = 0,1286, timin (T) = 0,2873 olarak hesaplandı.

Filogenetik ağaçlar Maksimum Tutumluluk, Bayesiyan çıkarımı ve Maksimum Benzerlik metodlarına dayanılarak inşa edildi. Sitokrom b gen bölgesi verilerine dayalı MP/BI/MB ağacına göre *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi* türlerine ait örnekler tek bir ana dalda yer alırken; *R. tavasensis* türüne ait örnekler ayrı bir dalda yer aldı. Bu

sonuç yüksek seç-bağla ve posterior olasılık değerleri ile de desteklenmektedir. Tutumluluk analizinde elde edilen ağaç, *R. tavasensis* türünü temsil eden Haplotip 37, 38 ve 39'un % 90'ın üzerindeki seç-bağla değeri ile ayrıldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca Doğu Karadeniz grubuna ait bazı lokaliteleri temsil eden örnekler ayrı bir alt dalda gruplandı. Fakat bu dallanma düşük seç-bağla ve posterior olasılık değerleri ile desteklendi (50/0,87/55). Haplotip ağı sonuçlarına paralel olarak Bahçesaray (Van) ve Hizan (Bitlis) örneklerini temsil eden H26 haplotipi ve Ulukışla örneklerini temsil eden H11 haplotipi ayrı bir alt dalda beraber gruplandı (-/0,85/54). Doğu Karadeniz grubu Kümbet (Giresun) lokalitesine ait örneklerin haplotipleri (H28 ve H29) ayrı bir dalda gruplandı (73/0,91/75). Elde edilen ağaca göre, *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi* bakımından Anadolu dağ kurbağaları yakın bir ilişki görüntüsü ortaya koymuşlardır (Şekil 26).





Şekil 26. Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin cyt b genine dayalı filogenetik ağacı (MP/BI/MB)

Sitokrom b gen bölgesi analizlerinden elde edilen genetik varyasyonun dağılımını belirlemek amacı ile populasyon sayısı az olan bireylerde coğrafik uzaklıklarına bakılarak yapılan gruplandırmalar üzerinden AMOVA analizi yapıldı. Sonuç olarak, gruplar arasında grupları oluşturan populasyonlar arasında ve populasyon içinde olmak üzere 3 farklı düzeyde varyasyon elde edildi. Buna göre; gruplar arası varyasyon yüzdesi % 36,19, grup içi populasyonlar arası varyasyon yüzdesi % 37,33 ve populasyon içi varyasyon yüzdesi % 26,48 olarak tespit edildi. AMOVA analizi *R. tavasensis* hariç diğer Anadolu dağ kurbağaları üzerinden gerçekleştirildiği için (Tablo 7) diğer Anadolu dağ kurbağalarını temsil eden türlere ait gruplar arasında bir farklılık bulunamadı.

**Tablo 7.** cyt b gen bölgesine göre gruplar arası AMOVA varyasyon değerleri

	Varyasyon	Varyasyon yüzdesi	Fiksasyon indeksi
Gruplar arasında	1,01719	36,19	0,36193 F <sub>CT</sub>
Grup içi populasyonlar arasında	1,04913	37,33	0,58504 F <sub>SC</sub>
Populasyonlar içinde	0,74414	26,48	0,73523 F <sub>ST</sub>

İkili karşılaştırma değerleri analizi, AMOVA testi için oluşturulan gruplara ek olarak *R. tavasensis* türünü temsil eden populasyonlarda eklenerek MEGA 6 programı kullanılarak hesaplandı. Buna göre, türleri temsil eden gruplar arasında elde edilen genetik uzaklığın derecesinin ifadesi olan F<sub>ST</sub> değeri Tablo 8’de verildi. Hesaplamalar sonucunda, *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4’e ait F<sub>ST</sub> değeri % 7,8-8,6 arasında değişmektedir. Diğer türleri temsil eden gruplar arasında ise, bu değer en fazla % 1,4 olarak tespit edildi. Genetik mesafe dikkate alındığında da *R. tavasensis* türünün diğer Anadolu dağ kurbağalarından ayrıldığı cyt b gen bölgesinde açıkça ortada olmaktadır (Tablo 8).

**Tablo 8.** cyt b gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
Grup 1							
Grup 2	0,001						
Grup 3	0,010	0,011					
Grup 4	0,083	0,081	0,086				
Grup 5	0,004	0,005	0,014	0,083			
Grup 6	0,004	0,005	0,012	0,079	0,007		
Grup 7	0,003	0,004	0,011	0,078	0,006	0,003	
<i>R. dalmatina</i>	0,139	0,135	0,141	0,143	0,139	0,138	0,137

### 3.1.2. COI Gen Bölgesi Dizin Analizi

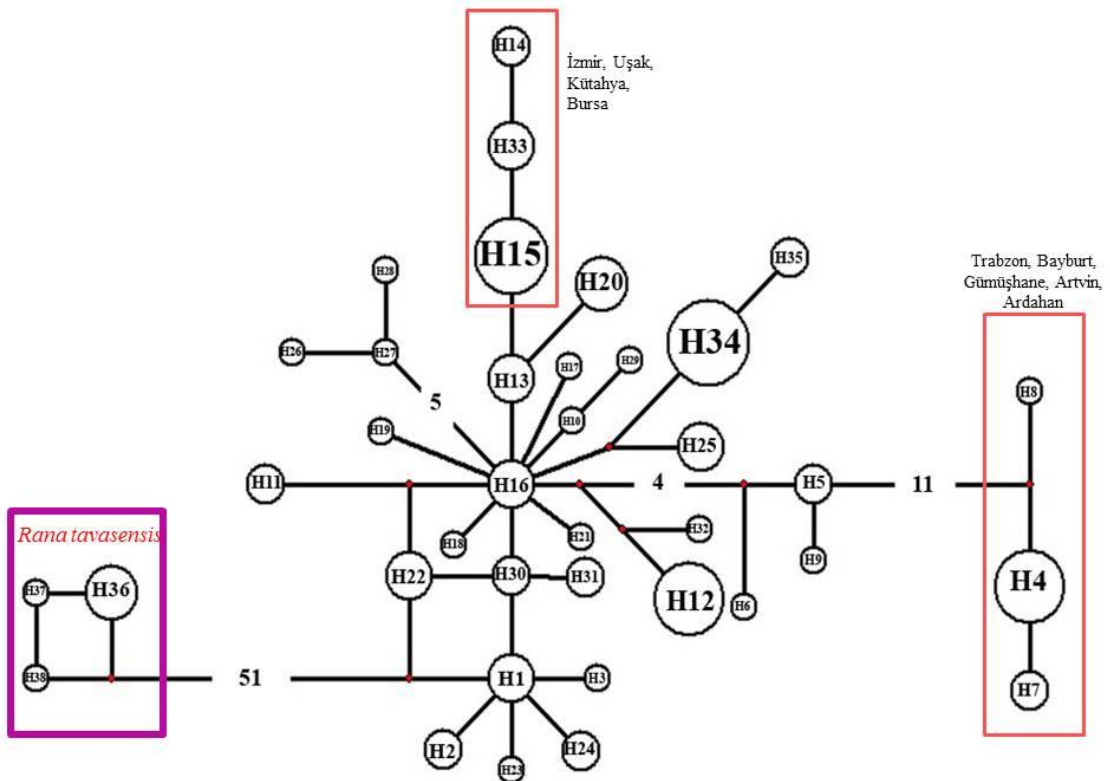
Toplam 31 Anadolu dağ kurbağaları popülasyona ait örneklerin mtDNA COI bölgesi için 743 bç analiz edildi. Analize dahil edilen toplam 93 örnekte, 38 haplotip ve 83 parsimonik bilgi verici bölge olduğu saptandı. 743 bç uzunluğundaki bölgenin analizi sonucunda 649 korunmuş bölge ve 94 değişken bölge tespit edildi. Analiz edilen örneklere ait COI haplotip dağılımı Tablo 9’da verildi. COI gen bölgesi için haplotip çeşitliliği, Hd: 0.964; nükleotit çeşitliliği ise, Pi: 0,01784 olarak tespit edildi. Bu gen bölgesi için nükleotit kompozisyon oranları T (U); 28,6, C; 29,5, A; 23,1, G; 18,8 olarak tespit edildi.

**Tablo 9.** COI gen bölgesi haplotip dağılımı

Lokaliteler	Haplotip
Sarıkamış (Kars)	H5, H11
Ödemiş (İzmir)	H33
Uzungöl (Trabzon)	H4, H8
Balıklığöl (Bayburt Trabzon sınırı)	H4, H7
Çakırgöl (Gümüşhane)	H4, H21
Ağzıaçık geçidi (Erzurum)	H17, H18, H19
Murgul (Artvin)	H4, H6
Yalnızçam (Ardahan)	H4, H5
Yanpınar (Mersin)	H34
Seviçova (Konya)	H34, H35
Eğrigöl (Mersin)	H34
Samas yaylası (Bolu)	H13
Tepeköy (Mersin)	H25
Sersem Yaylası (Kahramanmaraş)	H26, H27, H28
Bahçesaray (Van)	H12
Kümbet (Giresun)	H22
Sündiken (Eskişehir)	H20
Ekecik (Aksaray)	H2, H3
Erciyes (Kayseri)	H23, H24
Murat Dağı (Kütahya)	H15,
Maden (Elazığ)	H16
İnderesi (Adana)	H1
Hizan (Bitlis)	H12
Uludağ (Bursa)	H14, H15
Ovit (Rize)	H29, H30
Ilgaz (Kastamonu)	H20
Karagöl (Artvin)	H9, H10
Ulukışla (Niğde)	H31, H32
Banaz (Uşak)	H15
Tavas (Denizli)	H37, H38
Atlidere (Antalya)	H36

Network analizi sonuçlarına göre; cyt b gen bölgesine benzer olarak COI gen bölgesinde de *R. tavasensis* türünü temsil eden H36, H37 ve H38 haplotiplerinin diğer Anadolu dağ kurbağalarına ait haplotiplerden farklı olarak gruplandığı gözlemlendi. Toplam 743 bç üzerinde yapılan analiz sonucunda *R. tavasensis* türlerini temsil eden haplotipler ve diğer türleri temsil eden haplotipler arasında en az 52 baz değişimi gözlemlendi. COI

gen bölgesine ait haplotip ağı genel hatları ile cyt b gen bölgesine ait haplotip ağı ile uyumludur. Network analizi, Bahçesaray ve Hizan örneklerine ait haplotipler (H12) ile Ulukışla (H32) örneklerine ait haplotipin birbirine çok yakın gruplandığını göstermiştir. Bununla birlikte, Batı Anadolu (Murat Dağı, Banaz, Uludağ, Ödemiş) bölgesine ait örneklerin haplotipleri (H13, H14, ve H33) COI network ağında bir grup oluşturdu. Doğu Karadeniz ve Kafkasya coğrafyasında bazı bölgelerin, bu gen bölgesine ait haplotip ağında da gruplaşma gösterdiği tespit edildi (Şekil 27).

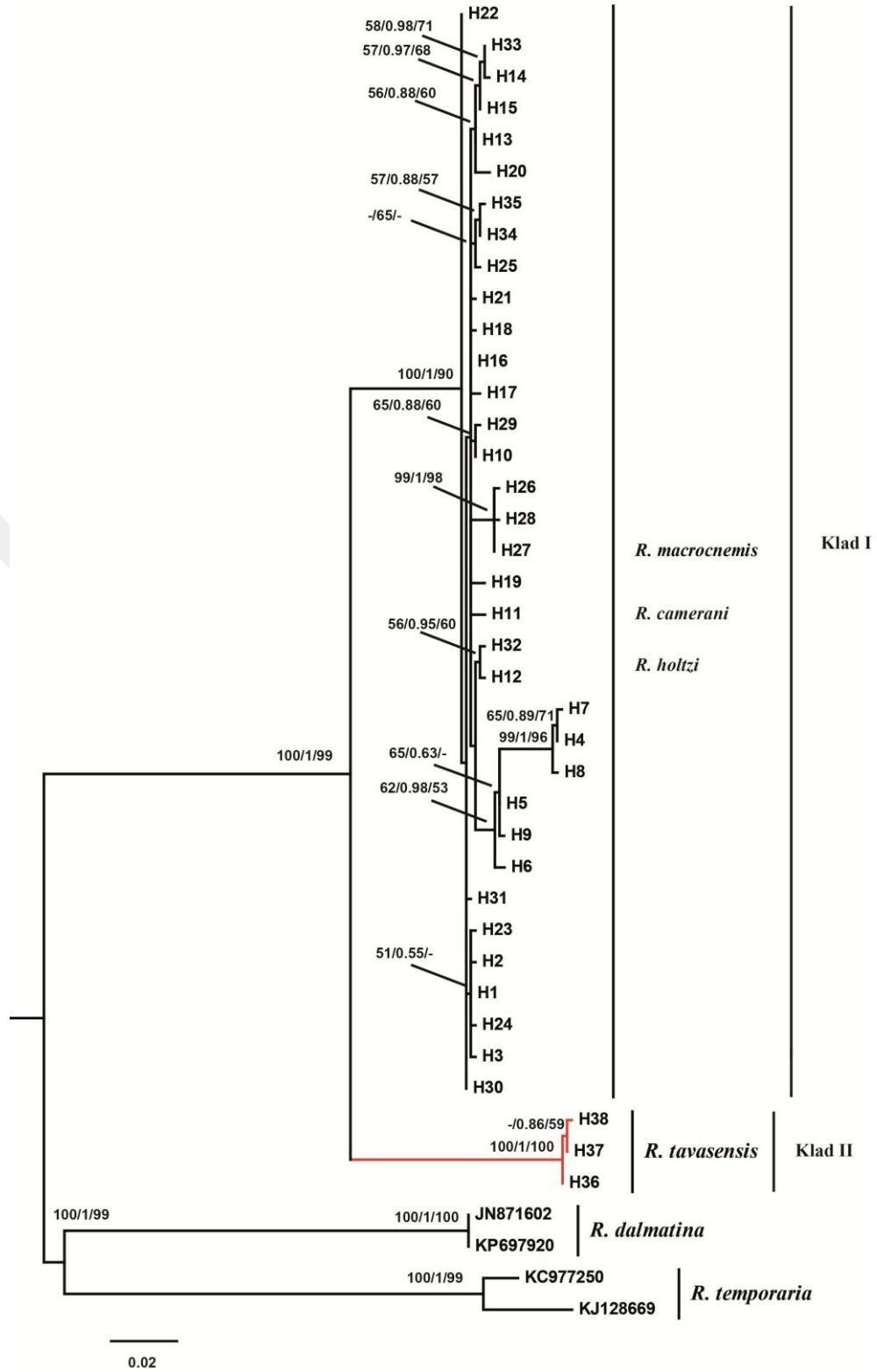


Şekil 27. COI gen bölgesi haplotip ağı

Filogenetik ağaçların yapımı için uygun nükleotit baz değişim modelinin tespiti için jModelTest kullanıldı. Bu bağlamda Akaike Bilgi Kriterleri (AIC) kapsamında en uygun baz değişim modeli COI gen bölgesi için GTR+I+G (-lnL = 2433.8269) olarak tespit edildi. Bu modele göre baz frekansları, adenin (A) = 0,2285, sitozin (C) = 0,3019, guanin (G) = 0,1870, timin (T) = 0,2826 olarak hesaplandı.

Maksimum Benzerlik, Maksimum Tutumluluk ve Bayesiyan çıkarımı metodlarına dayanılarak inşa edilen COI gen bölgesi filogenetik ağaçları cyt b gen bölgesi filogenetik ağaçları ile benzerdir. Buna göre *R. tavasensis* türü diğer Anadolu dağ kurbağaları türlerinden yüksek seç-bağla ve posterior olasılık değerleri ile ayrıldı (100/1.0/100). Ayrıca yine cyt b gen bölgesi sonuçlarına benzer olarak Bahçesaray ve Hizan örneklerini temsil eden H12 haplotipi ve Ulukışla örneklerini temsil eden H32 haplotipi ayrı bir alt dalda beraber gruplandı (56/0,95/60). Genel olarak bakıldığında, *R. macrocnemis*, *R. camerani* ve *R. holtzi* türlerinin birbirlerine yakın gruplar oluşturduğu görüldü (Şekil 28).





**Şekil 28.** Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin COI genine dayalı filogenetik ağacı (MP/BI/MB)

Mitokondriyal cyt b gen bölgesi analizlerinde olduğu gibi COI gen bölgesi için yapılan AMOVA analizi sonucunda da, gruplar arasında, grupları oluşturan

populasyonlar arasında ve populasyon içinde olmak üzere 3 farklı düzeyde varyasyon elde edildi (Tablo 10). Buna göre; gruplar arası varyasyon yüzdesi % 35,08, grup içi populasyonlar arası varyasyon yüzdesi % 42,09 ve populasyon içi varyasyon yüzdesi % 22,83 olarak tespit edildi. Bu gen bölgesi için yapılan AMOVA analizinde de *R. tavasensis* türü dahil edilmediğinden (Tablo 12) *R. tavasensis* türü hariç diğer Anadolu dağ kurbağalarını temsil eden türlere ait gruplar arasında bir farklılık bulunamadı.

**Tablo 10.** COI gen bölgesine göre gruplar arası AMOVA varyasyon değerleri

	Varyasyon	Varyasyon yüzdesi	Fiksasyon indeksi
Gruplar arasında	1,38235	35,08	0,35084 F <sub>CT</sub>
Grup içi populasyonlar arasında	1,65834	42,09	0,64836 F <sub>SC</sub>
Populasyonlar içinde	0,89943	22,83	0,77173 F <sub>ST</sub>

İkili karşılaştırma değerleri analizi, AMOVA testi için oluşturulan gruplara ek olarak *R. tavasensis* türünü temsil eden populasyonlarda eklenerek MEGA 6 programı kullanılarak hesaplandı. Buna göre, türleri temsil eden gruplar arasında elde edilen genetik uzaklık derecesi F<sub>ST</sub> değeri Tablo 11’de verildi. Hesaplamalar sonucunda, *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4’e ait F<sub>ST</sub> değeri %7,7-8,3 arasında değişmektedir. Diğer türleri temsil eden gruplar arasında ise, bu değer en fazla %1,6 olarak tespit edildi (Tablo 11). Genetik mesafe dikkate alındığında da *R. tavasensis* türünün diğer Anadolu dağ kurbağalarından genetik olarak ayrıldığı; cyt b gen bölgesinde olduğu gibi COI gen bölgesinde de açıkça gözlendi.



**Tablo 11.** COI gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
Grup 1							
Grup 2	0,002						
Grup 3	0,016	0,015					
Grup 4	0,083	0,083	0,083				
Grup 5	0,006	0,006	0,016	0,077			
Grup 6	0,007	0,007	0,014	0,083	0,007		
Grup 7	0,007	0,007	0,016	0,081	0,007	0,008	
<i>R. dalmatina</i>	0,157	0,158	0,153	0,147	0,155	0,154	0,154

### 3.1.3. Nükleer DNA Gen Bölgelerinin Dizin Analizi

#### 3.1.3.1. RAG1 Gen Bölgesi Dizin Analizi

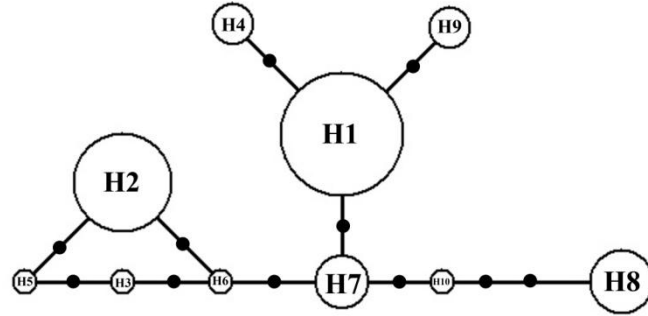
Toplam 31 Anadolu dağ kurbağaları popülasyonlarına ait örneklerin nDNA RAG1 gen bölgesi için analize dahil edilen toplam 64 örnekte, 10 haplotip ve 8 parsimonik bilgi verici, 8 değişken bölge ve 709 adet korunmuş bölge olduğu saptandı. Haplotip dağılımı Tablo 12’de verildi. RAG1 gen bölgesi için haplotip çeşitliliği; Hd: 0,761 nükleotit çeşitliliği ise; Pi: 0,00302 olarak tespit edildi. Bu gen bölgesi için nükleotit kompozisyon oranları T (U); 32,5, C; 21,4, A; 24,6, G; 21,5 olarak tespit edildi.

**Tablo 12.** RAG1 gen bölgesi haplotip dağılımı

Lokaliteler	Haplotip
Sarıkamış (Kars)	H1
Ödemiş (İzmir)	H2
Uzungöl (Trabzon)	H9
Balıkligöl (Bayburt Trabzon sınırı)	H1
Çakırgöl (Gümüşhane)	H7, H10
Ağzıaçık geçidi (Erzurum)	H7
Murgul (Artvin)	H1
Yalnızçam (Ardahan)	H1
Yanpınar (Mersin)	H1
Seviçova (Konya)	H4
Eğrigöl (Mersin)	H1
Samas yaylası (Bolu)	H2, H3
Tepeköy (Mersin)	H7
Sersem Yaylası (Kahramanmaraş)	H8
Bahçesaray (Van)	H1
Kümbet (Giresun)	H1
Sündiken (Eskişehir)	H2
Ekecik (Aksaray)	H1
Erciyes (Kayseri)	H1, H7
Murat Dağı (Kütahya)	H2
Maden (Elazığ)	H1, H4
İnderesi (Adana)	H1
Hizan (Bitlis)	H1
Uludağ (Bursa)	H2
Ovit (Rize)	H8
Ilgaz (Kastamonu)	H1
Karagöl (Artvin)	H1
Ulukışla (Niğde)	H2, H8
Banaz (Uşak)	H2
Tavas (Denizli)	H2
Atlidere (Antalya)	H2

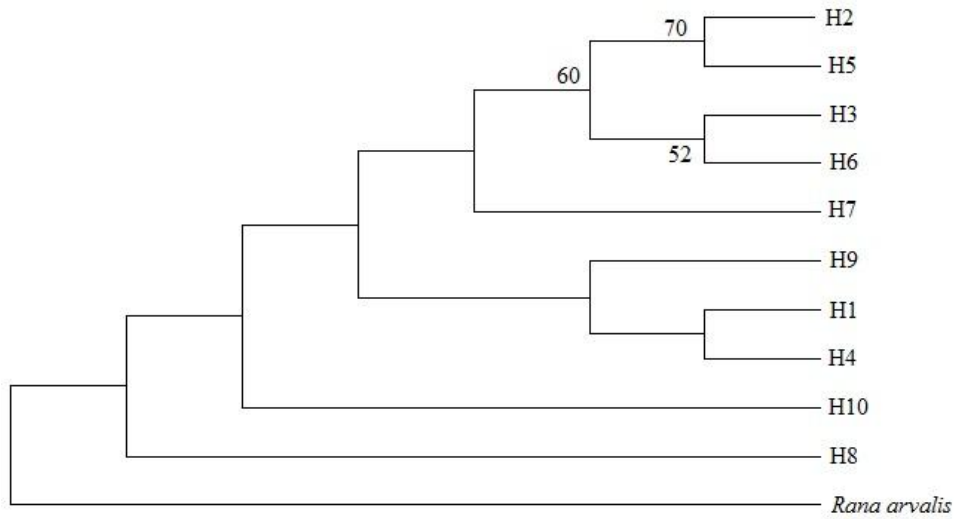
Network analizi sonuçlarına göre; Anadolu dağ kurbağalarına ait incelenen türler arasında herhangi bir fark bulunamadı. Türlerin genel olarak iki ana haplotipde (H1 ve H2) toplandığı gözlemlendi. H1 haplotipinde; İnderesi, Ekecik, Yalnızçam, Murgul, Karagöl, Uzungöl, Hizan, Seviçova, Ulukışla, Yanpınar ve Eğrigöl, Erciyes, Kümbet, Maden, Ilgaz, Sarıkamış, Ağzıaçık ve Bahçesaray örnekleri mevcuttur. H2 haplotipinde

ise; Samat, Uludağ, Sündiken Dağı, Murat Dağı, Ödemiş, Banaz, Atlıdere ve Tavas örneklerinin yanısıra bir Ulukışla örneği tespit edildi. Dolayısıyla bu gen bölgesi için; haplotipler arasında ne tür, ne de coğrafi bakımından bir gruplandırma söz konusu değildir (Şekil 29).



Şekil 29. RAG1 gen bölgesi haplotip ağı

Maksimum benzerlik (MB) metoduna dayanılarak inşa edilen RAG1 gen bölgesi filogenetik ağacı mtDNA gen bölgeleri filogenetik ağaç topolojilerinden farklı olarak anlamlı hiçbir genetik ayırım barındırmamaktadır (Şekil 30).



Şekil 30. Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin RAG1 genine dayalı filogenetik ağacı (MB)

RAG1 gen bölgesi için ikili mesafe hesaplaması mitokondriyal gen bölgesi AMOVA analizleri için oluşturulan gruplar üzerinden yürütüldü. Buna göre, türleri temsil eden gruplar arasında elde edilen genetik uzaklık derecesi  $F_{ST}$  değeri Tablo 13'de verildi. Hesaplamalar sonucunda, hiçbir türler arasında (*R. tavasensis* dahil) anlamlı bir

genetik uzaklık tespit edilemedi. Bu gen bölgesi bakımından türler arası genetik mesafe değeri % 0,5 ile % 0,0 arasında değişmektedir. Network analizi sonuçlarına benzer olarak ikili mesafe analizi sonucunda da bu gen bölgesinin Anadolu dağ kurbağaları tür grubunu ayırmada yeterli olmadığı kanatine varıldı.

**Tablo 13.** RAG1 gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
Grup 1						
Grup 2	0,001					
Grup 3	0,004	0,005				
Grup 4	0,001	0,000	0,005			
Grup 5	0,004	0,005	0,003	0,004		
Grup 6	0,004	0,004	0,002	0,004	0,002	
Grup 7	0,004	0,005	0,002	0,005	0,002	0,002

### 3.1.3.2. POMC Gen Bölgesi Dizin Analizi

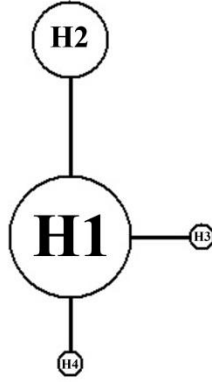
Toplam 31 popülasyona ait örneklerin nDNA POMC gen bölgesi (401 bç) analiz edildi (Tablo 14). Analize dahil edilen toplam 98 örnekte, 4 haplotip ve 1 parsimonik bilgi verici bölge olduğu saptandı. 401 bç uzunluğundaki bölgenin analizi sonucunda 397 korunmuş bölge tespit edildi. Analiz edilen örneklere ait POMC haplotip dağılımı Tablo 14’de verildi. POMC gen bölgesi için haplotip çeşitliliği, Hd: 0,205; nükleotit çeşitliliği ise, Pi: 0,00057 olarak tespit edildi. Bu gen bölgesi için nükleotit kompozisyon oranları T (U); 19,2, C; 22,4, A; 32,2, G; 26,2 olarak tespit edildi.

**Tablo 14.** POMC gen bölgesi haplotip dağılımı

Lokaliteler	Haplotip
Sarıkamış (Kars)	H1,
Ödemiş (İzmir)	H1,H2
Uzungöl (Trabzon)	H1
Balıkliöl (Bayburt Trabzon sınırı)	H1
Çakırgöl (Gümüşhane)	H1
Ağzıaçık geçidi (Erzurum)	H1
Murgul (Artvin)	H1
Yalnızçam (Ardahan)	H1
Yanpınar (Mersin)	H1
Seviçova (Konya)	H1
Eğrigöl (Mersin)	H1
Samas yaylası (Bolu)	H1,H3
Tepeköy (Mersin)	H1
Serssem Yaylası (Kahramanmaraş)	H1
Bahçesaray (Van)	H1
Kümbet (Giresun)	H1
Sündiken (Eskişehir)	H1
Ekecik (Aksaray)	H1
Erciyes (Kayseri)	H1
Murat Dağı (Kütahya)	H1
Maden (Elazığ)	H1
İnderesi (Adana)	H1
Hizan (Bitlis)	H1
Uludağ (Bursa)	H1
Ovit (Rize)	H1
Ilgaz (Kastamonu)	H1
Karagöl (Artvin)	H4
Ulukışla (Niğde)	H1
Banaz (Uşak)	H1
Tavas (Denizli)	H2
Atlidere (Antalya)	H1, H2

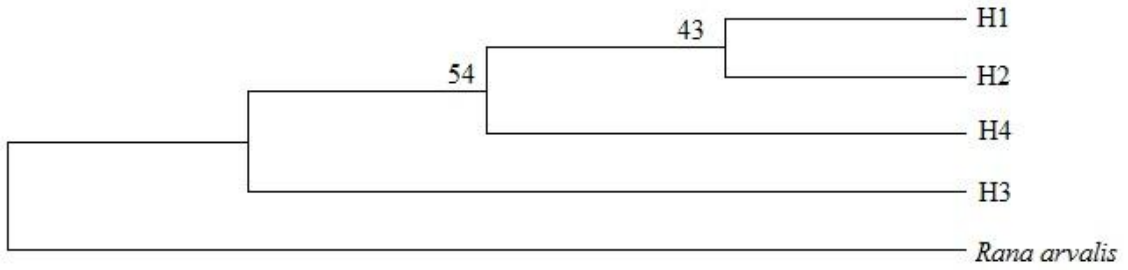
Network analizi sonuçlarına göre; Anadolu dağ kurbağalarına ait türler arasında herhangi bir fark bulunamadı. Türlerin genel olarak tek bir ana haplotipde (H1) toplandığı gözlemlendi. Kalan diğer haplotiplerin çoğunlukla birer popülasyon ile temsil edildiği gözlemlendi. Sadece H2 haplotipinde Atlidere, Denizli, Ödemiş ve Murat Dağı örnekleri beraber gruplandı. Fakat bu lokalitelere ait örneklerin genel haplotip olan

H1’inde içinde olduğunu görüldü. H3’de Samat H4’de ise Karagöl örnekleri 1’er birey ile mevcuttur. Bu sonuçlara göre, popülasyonların genetik olarak anlamlı bir gruplanma sergilemediği ve çalışılan bu gen bölgesine göre bu tür grubunun ayırt edilemediği sonucuna varıldı (Şekil 31).



Şekil 31. POMC gen bölgesi haplotip ağı

Maksimum benzerlik (MB) metoduna dayanılarak inşa edilen POMC gen bölgesi filogenetik ağacı anlamlı bir genetik ayırım sağlamadı (Şekil 32).



Şekil 32. Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait türlerin POMC genine dayalı filogenetik ağacı (MB)

POMC gen bölgesi için ikili mesafe hesaplaması mitokondriyal gen bölgesi AMOVA analizleri için oluşturulan gruplar üzerinden yürütüldü. Buna göre, türleri temsil eden gruplar arasında elde edilen genetik uzaklık derecesi  $F_{ST}$  değerleri Tablo 15’de verildi. Hesaplamalar sonucunda, türler arasında (*R. tavasensis*’de dahil olmak üzere) anlamlı bir genetik uzaklık tespit edilemedi. Bu gen bölgesi bakımından türler arası genetik mesafe değeri % 0,0 ile % 0,3 arasında değişmektedir. Network analizi

sonuçlarına benzer olarak ikili mesafe analizi sonucu göstermektedir ki, bu gen bölgesi sonuçlarına göre Anadolu dağ kurbağaları tür grubunda genetik olarak bir farklılaşma tespit edilmedi.

**Tablo 15.** POMC gen bölgesine göre gruplar arası ikili genetik mesafe ( $F_{st}$ ) değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
Grup 1						
Grup 2	0,001					
Grup 3	0,001	0,001				
Grup 4	0,003	0,002	0,002			
Grup 5	0,000	0,001	0,000	0,002		
Grup 6	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	
Grup 7	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000

### 3.2. Mikrosatellit DNA Verilerinin Analizi

Toplam 138 örnek için 11 adet mikrosatellit lokusu çalışıldı. P9-P11 lokuslarının PZR ile çoğaltılması ardından yeterli miktarda ve değerlendirilebilir ürün elde edilemediğinden çalışma 8 lokus ile sürdürüldü. P8 lokusundan elde edilen PZR sonucunda fragment boyları belirlenemediği için, P5 lokusunda ise tüm örneklerden aynı fragment boyu elde edildiği için bu iki lokus da çalışmadan çıkarıldı. Bunun sonucunda veri analizleri geriye kalan 6 mikrosatellit lokus ile gerçekleştirildi.

Nul alel frekansı iki ayrı programla hesaplandı. Mikrochecker ile yapılan nul alel frekansı hesaplanması sonucunda nul alel olduğu tahmin edilen populasyon ve lokuslardaki Van Oosterhout metotuna göre (Van Oosterhout vd., 2006) alel frekansları Tablo 16'da parantez içinde verildi. Ayrıca FreeNA programı kullanılarak EM algoritmasına göre (Dempster vd., 1977) nul alel frekansı belirlendi (Tablo 16'da NA satırında). İki programla da hesaplanan değerler birbirine yakın sonuçlar verdi. Populasyonlara göre alel sayılarının 1-16 arasında değiştiği belirlendi. Lokuslara göre alelik zenginlik ortalamaları en düşük P2 lokusunda (2,523); en yüksek ise P7 lokusunda (8,882) hesaplandı. Çok sayıda lokus ve populasyonun Hardy-Weinberg dengesinden sapmalar gösterdiği belirlendi. Heterozigot fazlalığına dayanarak hesaplanan HW Global Test sonucunda P1 lokusu hariç tüm lokusların ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinden sapmalar gösterdiği belirlendi (Tablo

16). Her bir gruba ait ortalama gözlenen heterozigotluk değerleri en düşük (0,447) Grup 2’de gözlenirken en yüksek (0,711) Grup 3’de gözlendi. Genetik çeşitliliğin göstergesi olan heterozigotluk değeri ve alel sayısının Grup 3’de yüksek olması lokaliteler arası coğrafik mesafenin yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir (Tablo 16).





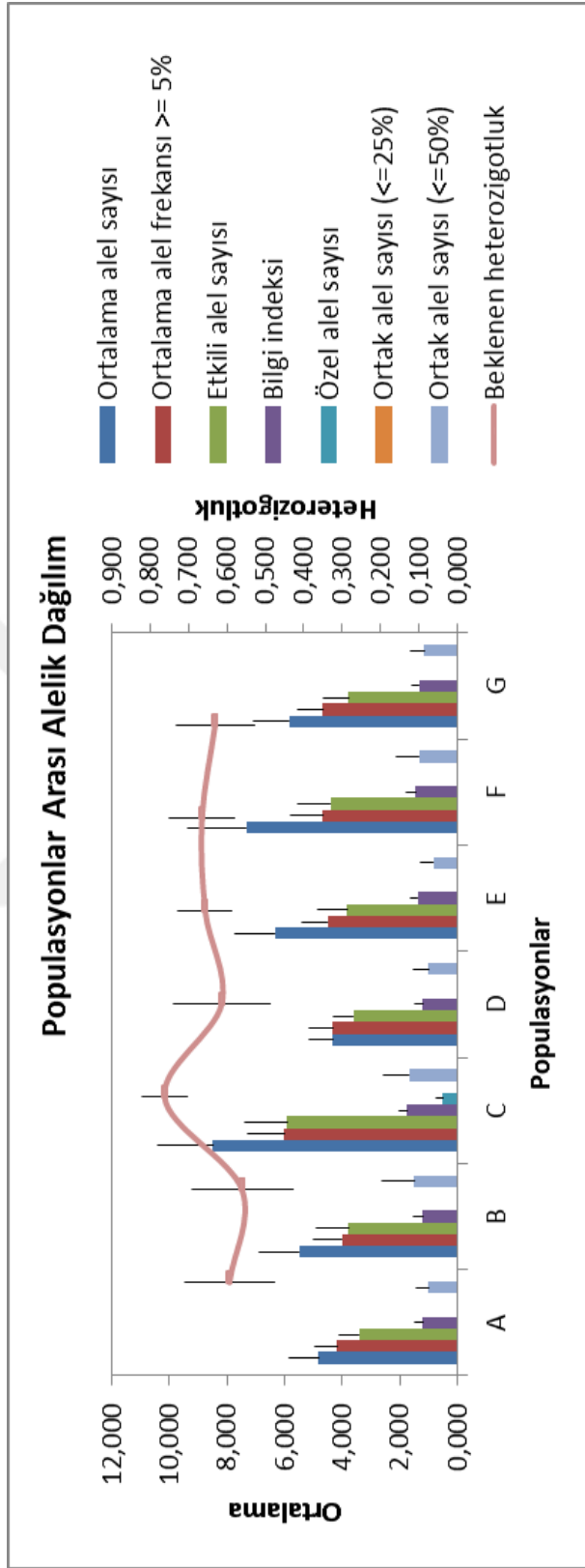
**Tablo 16.** Gruplara göre mikrosatellit lokuslarının birey sayısı (N), alellik zenginlik (AZ), alel sayısı (AS), gözlenen ( $H_G$ ) ve beklenen ( $H_B$ ) heterozigotluk, soyiçi üreme ( $F_{IS}$ ), Hardy-Weinberg dengesine dayalı alel sıklığı anlamlılığı (p) ve nul alel (NA) değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	Toplam	
<b>P1</b>	N	11	17	31	9	24	21	18	131
	AZ	3,935	2,471	3,441	3,889	2,978	2,879	1,918	3,405
	AS	4,000	3,000	4,000	4,000	3,000	3	2	5
	$H_G$	0,727	0,588	0,71	0,667	0,583	0,476	0,222	0,568
	$H_B$	0,740	0,54	0,563	0,712	0,584	0,431	0,203	0,539
	$F_{IS}$	0,018	-0,092	-0,266	0,068	0,002	-0,108	-0,097	
	p (H w)	0,785	1	0,048	0,603	0,145	1	1	
	NA	0	0	0	0,025	0,022	0	0	
<b>P2</b>	N	11	17	31	9	24	26	18	136
	AZ	1,727	1,471	2,982	1	1,997	2	2	2,523
	AS	2	2	3	1	2	2	2	3
	$H_G$	0,091	0,059	0,452	0	0,333	0,269	0,389	0,228
	$H_B$	0,091	0,059	0,646	0	0,383	0,473	0,513	0,309
	$F_{IS}$	0	0	0,304	0	0,132	0,435	0,247	
	p (H w)	1	1	0,019	0	0,596	0,037	0,371	
	NA	0	0	0,116	0,001	0,036	0,137	0,073	
<b>P4</b>	N	10	16	31	8	25	26	17	133
	AZ	5,761	6,695	7,722	6	6,204	7,063	7,198	8,291
	AS	6	9	11	6	9	11	9	12
	$H_G$	0,8	0,438	0,742	0,875	0,6	0,615	0,647	0,674
	$H_B$	0,832	0,841	0,878	0,808	0,778	0,851	0,879	0,838
	$F_{IS}$	0,04	0,488	0,158	-0,089	0,232	0,281	0,27	
	p (H w)	0,991	0	0,343	0,951	0,001	0,01	0,042	
	NA	0	0,204 (0,230)	0,057 (0,072)	0	0,060 (0,123)	0,114 (0,133)	0,112 (0,119)	
<b>P3</b>	N	11	16	29	9	25	26	19	135
	AZ	2,933	2,774	5,261	3	4,787	2,833	4,867	5,365
	AS	3	3	7	3	6	4	6	8
	$H_G$	0,364	0,125	0,679	0,778	0,32	0,385	0,368	0,431
	$H_B$	0,45	0,333	0,755	0,66	0,663	0,56	0,661	0,583
	$F_{IS}$	0,2	0,632	0,103	-0,191	0,522	0,318	0,45	
	p (H w)	0,084	0,029 0,185	0,154	0,182	0	0,011	0	
	NA	0,096	(0,224)	0,052	0	(0,252)	0,125	(0,204)	

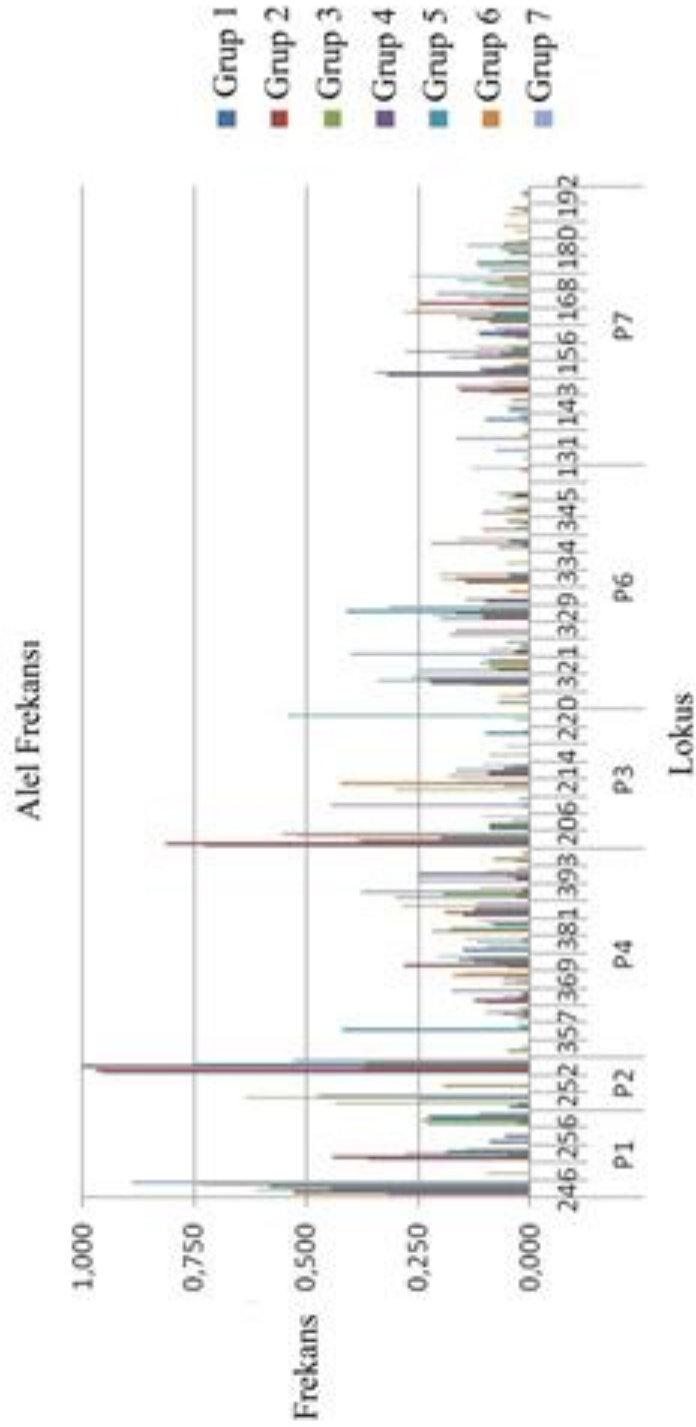
**Tablo 16 (devam).** Gruplara göre mikrosatellit lokuslarının birey sayısı (N), alellik zenginlik (AZ), alel sayısı (AS), gözlenen ( $H_G$ ) ve beklenen ( $H_B$ ) heterozigotluk, soyiçi üreme ( $F_{IS}$ ), Hardy-Weinberg dengesine dayalı alel sıklığı anlamlılığı ( $p$ ) ve nul alel (NA) değerleri

<b>P6</b>	N	10	14	28	9	22	22	19	124
	AZ	4,768	8,536	7,968	5,889	4,837	7,394	6,282	8,001
	AS	5	10	11	6	7	10	8	14
	$H_G$	0,8	0,786	0,75	0,667	0,591	0,636	0,474	0,672
	$H_B$	0,763	0,913	0,884	0,863	0,715	0,87	0,815	0,832
	$F_{IS}$	-0,051	0,144	0,154	0,238	0,176	0,273	0,426	
	$p$ ( $H_w$ )	0,182	0,061	0,003	0,493	0,103	0	0	
	NA	0	0,046	0,055	0,079	0,028	0,130 (0,118)	0,166 (0,205)	
	<b>P7</b>	N	11	16	30	9	25	25	19
AZ		7,92	5,314	9,786	5,987	8,233	9,147	6,139	8,882
AS		9	6	15	6	11	14	8	16
$H_G$		0,818	0,688	0,933	1	0,76	0,72	0,632	0,793
$H_B$		0,866	0,794	0,929	0,863	0,902	0,891	0,822	0,867
$F_{IS}$		0,058	0,138	-0,004	-0,171	0,16	0,196	0,237	
$p$ ( $H_w$ )		0,272	0,144	0,075	0,449	0,007	0,155	0,044	
NA		0	0,044	0,006	0	0,070 (0,069)	0,095 (0,082)	0,093 (0,103)	
<b>TÜMÜ</b>		AS	4,833	5,5	8,5	4,333	6,333	7,333	5,833
	$H_G$	0,6	0,447	0,711	0,664	0,531	0,517	0,455	
	$H_B$	0,624	0,58	0,776	0,651	0,671	0,679	0,649	
	$F_{IS}$	0,04	0,235	0,085	-0,022	0,211	0,243	0,304	

6 mikrosatellit lokusunun populasyonlar arasında alellerinin dağılım grafiği Şekil 33'de verildi. Populasyona özgü (private) aleller sadece Grup 3 kümesinde gözlemlendi. Diğerlerinde ise populasyona özgü aleller tespit edilmedi. Alel frekansları Şekil 34'de gösterildi.



Şekil 33. Populasyonlar arası alelik dağılım grafiği



**Şekil 34.** Populasyonlara ve lokuslara göre alel frekansları

Populasyonlara ait  $R_{ST}$  değerleri incelendiğinde Grup 3-Grup 7, Grup 1-Grup 2, Grup 3-Grup 6, Grup 1-Grup 6 arasında anlamlı bir farklılaşma gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Ancak  $F_{ST}$  değerlerine göre düzeltilmiş p değerleri (Bonferroni Correction) ile populasyonlar arasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p > 0,05$ ) (Tablo 17). Nul alel

doğrulaması yapılmış ikili karşılaştırma sonuçları da bunu destekledi (Tablo 18). Bununla birlikte, genellikle Grup 6 populasyonlarının diğer populasyonlardan farklılaştığı gözlemlendi.

**Tablo 17.**  $F_{ST}$  (alt diyagonal) ve  $R_{ST}$  (üst diyagonal) değerleri

	Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	Grup5	Grup6	Grup7
Grup1		0,0309	0,1354	0,0632	0,2021	0,2039	0,1361
Grup2	0,0430		0,1749	0,1451	0,2265	0,2353	0,1386
Grup3	0,1070	0,1250		0,1630	0,1283	0,0227	0,0288
Grup4	0,0630	0,0820	0,1050		0,2072	0,2418	0,1908
Grup5	0,1450	0,1570	0,0900	0,1230		0,2020	0,1299
Grup6	0,1570	0,1490	0,0170	0,1390	0,1320		0,0353
Grup7	0,1420	0,1270	0,0320	0,1380	0,0910	0,0290	

**Tablo 18.** Bonferroni doğrulaması yapılmamış  $F_{ST}$  (alt diyagonal), ENA doğrulaması yapılmış  $F_{ST}$  (üst diyagonal) değerleri

	Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	Grup5	Grup6	Grup7
Grup1		0,044	0,107	0,057	0,132	0,160	0,149
Grup2	0,043		0,117	0,072	0,133	0,147	0,129
Grup3	0,107	0,124		0,106	0,077	0,013	0,027
Grup4	0,063	0,082	0,105		0,116	0,144	0,142
Grup5	0,145	0,157	0,090	0,123		0,114	0,078
Grup6	0,157	0,149	0,017	0,139	0,132		0,027
Grup7	0,142	0,127	0,032	0,138	0,091	0,029	

Aynı zamanda gen akışı ( $N_m$ ) değerleri de  $F_{ST}$  değerlerine benzer sonuçları gösterdi (Tablo 19). Genetik uzaklığa bağlı olarak hesaplanan gen akışı değeri en düşük Grup 4-Grup 6 arasında ( $N_m= 4,136$ ), en yüksek ise Grup 3-Grup 6 arasında ( $N_m= 11,865$ ) gözlemlendi. Gen akışının en düşük olduğu ( $F_{ST}$ : 0,1570;  $R_{ST}$ :0,2039;  $N_m$ : 4,906 ) Grup 1 ve Grup 6 ile arasında diğer gruplara oranla nispeten farklılık mevcuttur.

**Tablo 19.** Anadolu dağ kurbağaları populasyonları arasındaki gen akışını gösteren Nm değerleri

	1	2	3	4	5	6
1						
2	6,839					
3	2,503	2,271				
4	4,334	3,719	2,370			
5	2,257	2,125	3,999	2,420		
6	1,693	1,798	11,865	1,731	2,708	
7	1,944	2,070	7,477	1,795	3,643	7,885

Genetik farklılaşmanın nerden kaynaklandığını göstermek için yapılan AMOVA analizi sonucunda genetik farklılaşmanın yüksek oranda (71,51) bireyiçi varyasyondan kaynaklandığı belirlendi (Tablo 20). mtDNA verilerine paralel olarak mikrosatellit AMOVA analizi sonucunda da gruplar arası farklılık tespit edilmedi.

**Tablo 20.** Mikrosatellit lokuslarına göre gruplar ve populasyonlar arasında varyans analizi değerleri (AMOVA)

	Varyasyon	Varyasyon Yüzdesi	Fiksasyon İndeksi
Gruplar arasında	0,12483	8,56	0,08556
Grup içi populasyonlar arasında	0,21557	14,77	0,16156
Populasyon içi bireyler arasında	0,07522	5,16	0,06724
Bireyler içinde	1,04348	71,51	0,28485

LDNe programıyla bağlantı eşitsizliğine dayanarak hesaplanan etkili populasyon büyüklüğü değerleri ( $N_e$ ) gruplar arasında 6,1-187,2 olarak değişmektedir. Bu sonuçlara göre; bazı populasyonlarımız için etkili populasyon büyüklüğüne erişemediğiz tespit edildi ( $p<0,05$ ) (Tablo 21).

**Tablo 21.** Anadolu dağ kurbağa gruplarının etkili populasyon büyüklüklerinin ( $N_e$ ) karşılaştırılması

Gruplar	$N_e$
Grup 1	62,5
Grup 2	6,1
Grup 3	84,3
Grup 4	6,4
Grup 5	16
Grup 6	187,2
Grup 7	7,5

Gruplara ait lokuslarda darboğaz varlığı TPM ve SMM modelleri kullanılarak test edildi. TPM modeli; diğer modellere göre daha gerçekçi sonuçlar verdi. TPM modelin kullanılmasıyla ortaya çıkan sonuçlar ışığında; “\*” işaretli gruplar hariç, belirtilen hiçbir grubun herhangi bir lokusunda önemli derecede bir heterozigot başarısına rastlanmadı ( $p>0,05$ , Tablo 22, 23)

**Tablo 22.** Anadolu dağ kurbağaları darboğaz varlığı anlam sıklığı değerleri ( $p<0,05$ )

Lokus	Grup1	Grup2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
P1	0,1186	0,2378	0,3684	0,3088	0,3664	0,3888	0,0190*
P2	0,4164	0,3842	0,0706	0,0380*	0,0842	0,1516	0,1112
P4	0,3334	0,2820	0,5014	0,4270	0,4434	0,2616	0,3312
P3	0,0312*	0,4114	0,1286	0,2948	0,3162	0,1144	0,1870
P6	0,1058	0,4486	0,3884	0,4334	0,0768	0,2134	0,4396
P7	0,2058	0,3706	0,3620	0,3542	0,2432	0,1312	0,2708

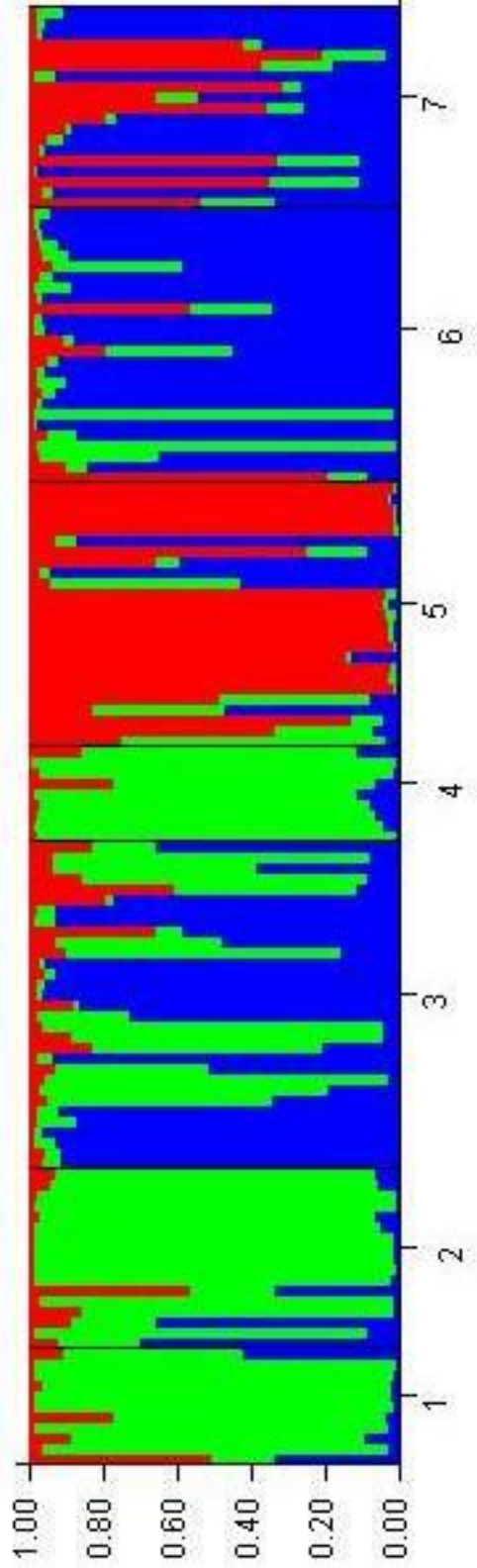
**Tablo 23.** Anadolu dağ kurbağa gruplarına ait heterozigotluk başarısı ( $H_e$ ) ve başarısızlık ( $H_d$ ) değerleri

	TPM
Populasyon	$H_e/H_d$
Grup 1	4/2
Grup 2	6/0
Grup 3	4/2
Grup 4	5/1
Grup 5	3/3
Grup 6	3/3

Structure programında yapılan Bayesiyen kümeleme analizi ile genetik olarak birbirinden farklı grup belirlenmedi. Örnekler arasında çok düşük seviyede olan genetik uzaklık, Structure programının sonucuyla uyumludur. Populasyonların coğrafik ve genetik yapılanmalarını ortaya koymak için oluşturduğumuz 7 grubumuza ait 6 adet

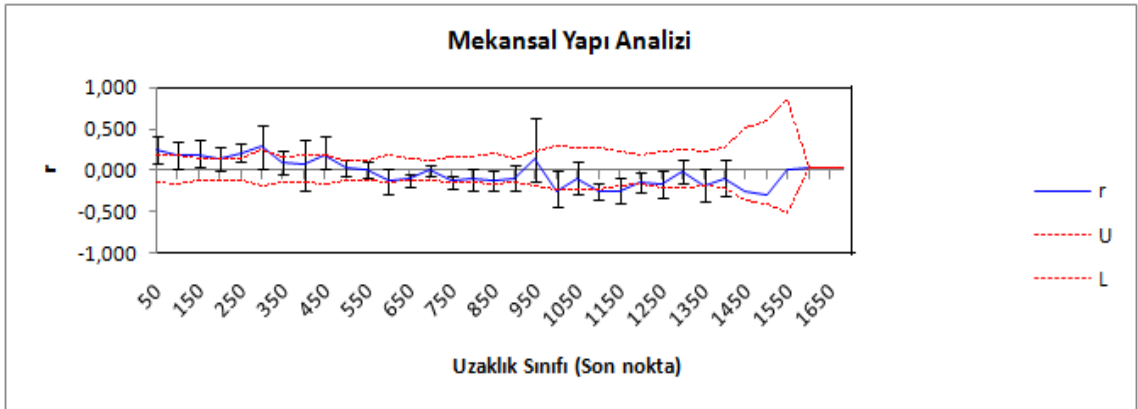
mikrosatellit lokusu ile Structure analizi sonucunda olası 3 grup ortaya çıktı (1.Grup, Yeşil, 2.Grup Mavi, 3. Grup Kırmızı) (Şekil 35). Populasyon yapısını ortaya koymak için oluşturulan bu grafikte, populasyonlara ait bireylerin belirlenen 3 grup içinde nasıl bir dağılım gösterdiği Şekil 35’de gösterildi. Dikey eksen benzerlik durumunu (bireylerin genotiplerinin hangi gruba girdiği), yatay eksendeki her bir çizgi bir bireyi temsil etmektedir. Siyah dikey çizgiler populasyonların sınırlarını göstermektedir. Grup 5 (Tepeköy, Eğrigöl, Yanpınar ve Seviçova) nispeten diğer örneklerden farklı gözüküyor olsa da tüm populasyonlar arasında gen akışının var olduğu gözlemlendi. Toros örneklerine (Grup 5) ait genetik yapının farklılaşma sebebi bölgenin coğrafik konumu ve izolasyon bariyerleri mevcudiyetinden ötürü meydana geldiği tahmin edilmektedir. 7. gruba ait örnekler arasında ise gen akışı oranı yüksek gözükte (Şekil 35).





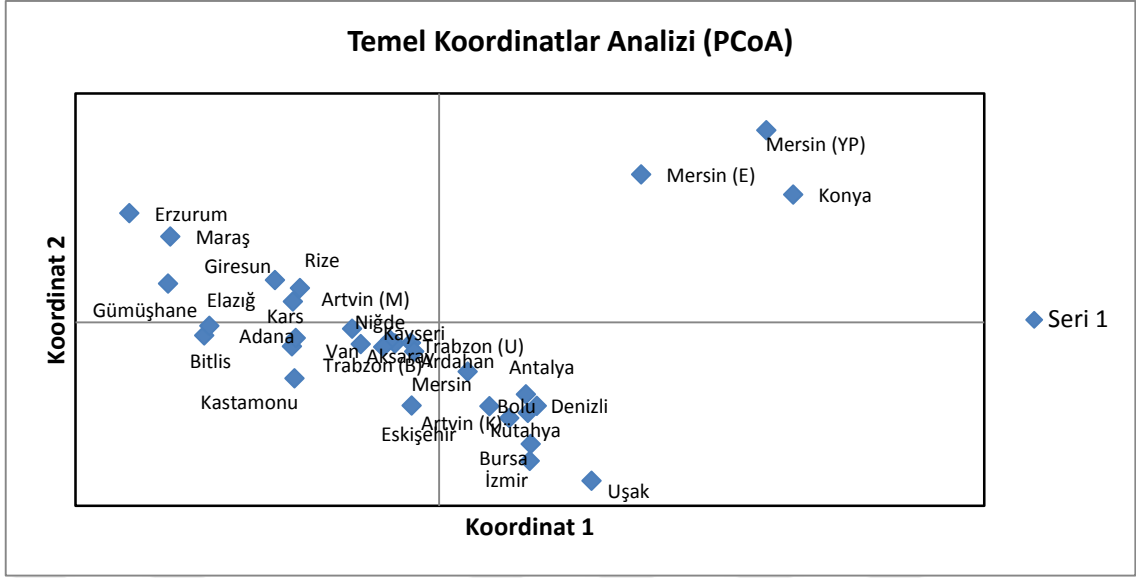
**Şekil 35.** Anadolu dağ kurbağaları gruplarının popülasyon genetik yapılarını gösteren Structure bar grafiği

Mekansal otokorelasyon analizi, farklı coğrafik mesafe sınıfları kullanılarak gerçekleştirildi. 50 km lik uzaklık sınıfı ile analiz gerçekleştirilmiş olup en uzak iki populasyon 1550 km civarında hesaplanmıştır. Kuş uçuşu olarak coğrafik mesafe ve genetik mesafe dikkate alınarak yapılan mekansal oto korelasyon hesaplaması sonucunda; genetik mesafe ile coğrafik mesafe arasında bir bağlantı olmadığı ortaya çıktı (Şekil 36). Dolayısıyla 1550 km içerisinde örneklenen bireylerin genotipleri arasında otokorelasyon belirlenmemiştir.

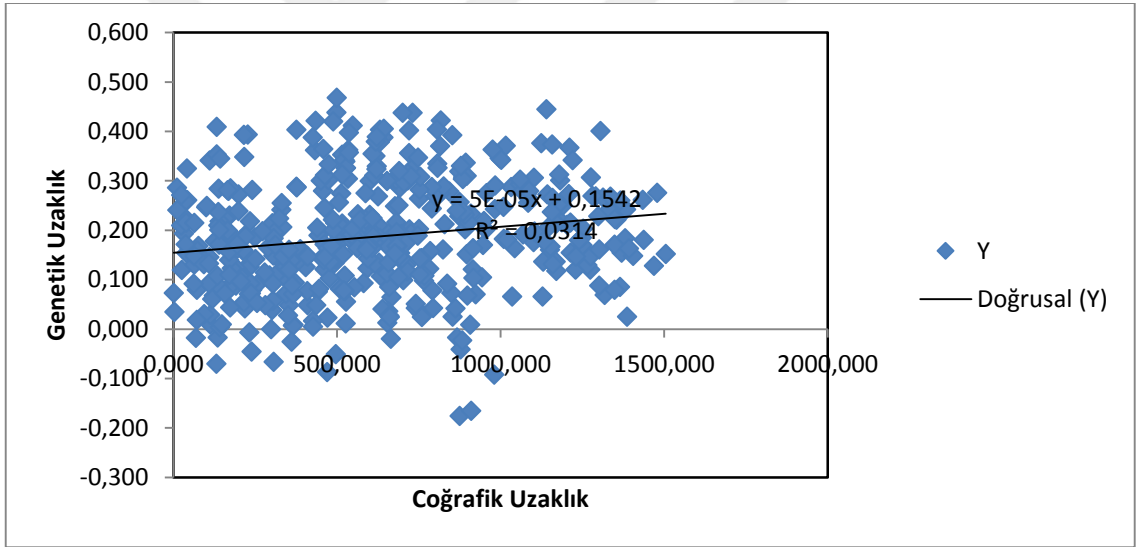


Şekil 36. Coğrafik mesafe mekânsal yapı analizi

Temel koordinatlar analizi (PCoA) sonucuna göre 5. grup örnekleri (Mersin; Eğrigöl, Mersin; Yanpınar ve Konya; Seviçova) farklı bir yerde konumlanırken, diğer populasyonlar coğrafik konumlarına göre grafikte yerleşmişlerdir (Şekil 37). Mantel test sonucuna göre genetik mesafe ile coğrafik mesafe az da olsa doğru orantılı olmasına rağmen anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $r^2= 0,031$ ) (Şekil 38).

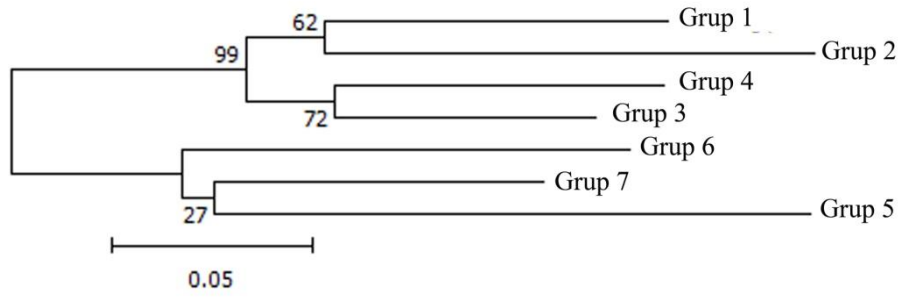


**Şekil 37.** Anadolu dağ kurbağalarında temel koordinat analizine göre mikrosatellit varyasyonu (E: Eğrigöl, YP: Yanpınar, K: Karagöl, M: Murgul, B: Balıklıgöl)



**Şekil 38.** Genetik uzaklık ve coğrafik uzaklığın arasındaki ilişkinin grafiği

Populasyonlar arası genetik uzaklığı ifade etmek için Poptreew2 ile çizilen UPGMA ağacı sonucunda 2 ana grubun ortaya çıktığı gözlemlendi. İlk ana dalı, 1. grup (Samat, Uludağ, Ilgaz), 2. grup (Ödemiş, Banaz, Sündiken Dağı, Murat Dağı), 3. Grup (Uzungöl, Ovit, Murgul, Karagöl, Kümbet, Yalnızçam, Balıklıgöl), 4. grup (Atlidere, Çakıroluk) örnekleri oluştururken; 2. ana dalda ise; 5. grup (Eğrigöl, Yanpınar, Tepeköy, Seviçova), 6. Grup (Bahçesaray, Maden, Ağzıaçık, Sarıkamış, Hizan), 7. grup (İnderesi, Erciyes, Ekecik, Sersem) örnekleri yer aldı (Şekil 39).



**Şekil 39.** Mikrosatellit lokuslarından oluşturulan UPGMA dendogramı

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Anadolu dağ kurbağalarına ait bugüne kadar yapılan taksonomik çalışmaların birçoğu vücut ölçümleri, osteolojik, serolojik, renk-desen ve deri özellikleri farklılıklarına dayanmaktadır. Dünya’da kahverengi kurbağalar olarak da nitelendirilen gruba dahil olan Anadolu dağ kurbağaları yukarıda bahsedilen karakterler bakımından birbirine benzer özellikler gösteren bir gruptur. Ayrıca grubu inceleyen diğer araştırmacılar, morfolojik karakterler ile bu grubun taksonomik olarak ayrılmasının imkansız olduğundan bahsetmiştir (Veith vd., 2003). Bu sebep ile mevcut çalışmada Anadolu dağ kurbağaları grubunun populasyon yapısını belirlemek ve sistematikteki yerini tayin etmek amacı ile; mtDNA, nDNA ve mikrosatellit belirteçler ile çalışıldı. Bu gruba ait üyelerin, korunmuş bölgeler içeren ve ayırım gücü yüksek COI gen bölgesi ve grubun populasyon genetik yapısını ortaya çıkarmak için mikrosatellit belirteçler ilk defa bu çalışmada kullanıldı.

Tarkhishvili vd. (2001) Kafkasya ve Türkiye’den 22 farklı populasyondan topladığı toplam 149 örneği allozim, morfolojik ve genetik farklılıklarına göre inceledi. Bu çalışmada *R. macrocnemis* ve *R. camerani* türleri arasında cyt b gen bölgesine göre 1-3 baz değişim farklılığı tespit edildi. Aynı çalışmada; Türkiye’den sadece Van, Kars, Rize, Giresun, Artvin, Toros, Kayseri, Bolkar Dağı ve Uludağ’dan örnekleme yapıldı. Sonuç olarak Kafkasya’nın güneybatısındaki *macrocnemis* örnekleri ile Gürcistan’ın güneyinde, Ermenistan’ın batısında ve Türkiye’nin kuzey doğusunda bulunan *camerani* örnekleri, genetik ve morfolojik olarak farklılık gösterdi. Geri kalan dağılım alanlarında ise hibrit zonlar gözlemlendi. Ayrıca araştırmacılar, *macrocnemis* ve *camerani* arasında sınırlandırılmış bir coğrafik aralığın da bulunmadığını bildirdi. Fakat araştırmacılar Türkiye’deki *macrocnemis* ve *camerani* taksonlarının ayırımlarından bahsetmediler. Mevcut çalışmamızda ise mtDNA verilerine göre Türkiye’nin kuzeyine ait bazı örnekler filogenetik ağaçlarda diğerlerinden ayrı bir dal oluştursalar da, bu iki türe dair tam bir coğrafik izolasyona rastlanmadı. Ayrıca, *macrocnemis* ve *camerani* türlerine ait ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri bakımından da bu iki türün ayırt edici genetik farklılığa sahip olmadığı tespit edildi.

Baran vd. (2007) Toroslarda Eğrigöl (Çamlıyayla-Mersin) ve Seviçova (Ereğli-

Konya) ve Maden Köy'ünden (Elazığ) *R. macrocnemis* ve *R. holtzi* türlerine dair yeni lokalite kayıtları verdi. Türlerin morfolojik karşılaştırmalarına göre kategorize eden araştırmacılar ve mevcut çalışmamızın mtDNA verileri arasında farklılık tespit edildi. Buna göre, Seviçova (Ereğli-Konya) popülasyonunda *macrocnemis* olarak tanımlanan bireyler çalışmamıza göre *holtzi* olarak tanımlanan Eğrigöl (Çamlıyayla-Mersin) popülasyonu ile aynı haplotipi paylaştığı görüldü.

Veith vd. (2003) Elburz Dağları, Kafkasya ve Anadolu'dan 40 farklı lokaliteden elde ettikleri Anadolu dağ kurbağalarına ait örnekleri mitokondriyal 16S rRNA gen bölgelerine (540 bp) göre karşılaştırdı. Buna göre bu gruba dair monofiliyi gösteren bir kanıtı rastlamadı. Ayrıca, *R. tavasensis*'in buzul çağlardaki dağılımlarına bakarak güneye göç eden ve burda sığınaklara yerleşen bireylerin endemik seviyede türleştiğini belirtildi. *R. tavasensis* ilk olarak Baran ve Atatür (1986) tarafından *macrocnemis*'in alt türü olarak tanıldı. Bu tez çalışmasında da; mitokondriyal *cyt b* ve *COI* gen bölgeleri bakımından karşılaştırılan *R. tavasensis*, yüksek bootstrap ve posterior olasılık değerleri ile, haplotip ağında ise yüksek baz değişimi ile ayrıldı. Diğer tür grupları ise haplotip ağında birbiri ile ilişkili konumlarda çıktı. Veith vd. (2003)'nin çalışmasında bulunan haplotip ağında da, mevcut çalışmamıza benzer olarak, diğer türler birbirine yakın veya birbiri ile ilişkili haplotip gruplarında çıktı. Fakat, Veith vd. (2003)'nin bu çalışmasında batı Anadolu'dan örnekler yer verilmemiştir. Anadolu'nun en batısı olarak sadece *R. tavasensis* örneklerinin alındığı Denizli lokalitesi görüldü. Mevcut çalışmamızda ise, İzmir, Uşak ve Kütahya (*R. macrocnemis*) lokalitelerinden alınan örneklerin, diğer örneklerle aralarında yakın ilişki gözükse de hiçbiri diğer lokaliteleri içeren haplotiplerle beraber gruplanmadı. Buna göre Batı Anadolu'nun kendi arasında bir gruplaşmaya doğru gittiği düşünülmektedir.

Picariello vd. (2016) Anadolu dağ kurbağaları grubuna dair S1 satellit DNA çeşitliliğini incelemiş ve bu gruba ait 4 türde de farklılık olmadığı bildirildi. Hatta, S1 tekrar sekansının bütün türlerde aynı uzunluğa sahip olduğunu belirtildi. KpnI, EcoRV, NdeI, NheI, veya StuI ile kesilmiş genomik DNA southern blot analizinde aynı özellikte satellit DNA bantları verdi. Sonuç olarak araştırmacılar, mitokondriyal ve nükleer DNA ile ayrılan bu türlerin S1a satellit DNA ile ayrılmadığını ve bahsedilen dört türün tek bir tür olarak değerlendirilmesi gerektiğinden bahsedildi. *R. macrocnemis* türü için;

Uludağ, Afyon, Nemrut Gölü (Tatvan), Eskişehir ve Bolu'dan; *R. camerani* türü için; Erzurum, Amasya, Asbuğa Köyü (Ağrı), Erciyes, Gevaş, Tatvan'dan; *R. holtzi* için; Karagöl'den (Ereğli) ve *R. tavasensis* için Tavas-Denizli'den örnekleme yapıldı. Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait literatürde bulunan en güncel çalışma olan Picariello vd. (2016)'nin çalışmasında, örnekleme alanı bakımından eksikler mevcuttur. Bahsi geçen bu çalışmadan farklı olarak mevcut çalışmamızda *R. macrocnemis* türüne ait yeni tanıtılan lokalitelerden (Maden-Elazığ, Seviçova-Konya) örnekleme yapıldı. Ayrıca *R. holtzi* türü için de sadece türün tip lokalitesinden değil daha iyi karşılaştırma yapabilmek adına Toroslardan farklı iki lokaliteden (Yanpınar, Eğrigöl-Mersin) daha örnekleme yapıldı. Bununla birlikte, *R. tavasensis* türü içinde Tavas dışından örnekleme yapıldı (Atlidere-Muğla). Picariello vd. (2016)'den farklı olarak mevcut çalışmamızda mtDNA verilerinin sonuçlarına göre; *R. tavasensis* türü yüksek bootstrap ve ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerleri ile diğer türlerden ayrıldı. Çalışılan iki mtDNA gen bölgemiz de bu sonucu desteklemektedir. Ayrıca, yine mevcut çalışmada da gözlemlendiği gibi çalışılan nükleer gen bölgelerine göre, bu tür grubunda taksonomik ve populasyon genetiği bakımından bir ayırım elde edilmedi. Picariello vd. (2016) Anadolu dağ kurbağalarının tek tür ile temsil edildiği fikrinin aksine bu çalışmanın mtDNA verilerine göre Anadolu dağ kurbağalarını temsil eden iki tür bulunmaktadır: *R. macrocnemis* ve *R. tavasensis*.

Anadolu dağ kurbağaları grubuna ait oluşturulan tür grupları arasında mtDNA gen bölgelerine göre ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerlerine bakıldığında; *R. tavasensis* ve diğer Anadolu dağ kurbağaları arasında genetik uzaklık *cyt b* gen bölgesine göre 0,078-0,086, COI gen bölgesine göre ise 0,077-0,083 değerleri arasında değişmektedir. Diğer kahverengi kurbağa grupları ile karşılaştırıldığında bu değer *R. tavasensis* türünün diğer türlerden ne kadar fazla farklılaştığını ortaya koymaktadır. Song vd. (2006) Asya'da bulunan kahverengi kurbağalar arasında 16S rRNA'ya göre ikili genetik mesafe ( $F_{ST}$ ) değerlerini; *Rana dybowski* ve *Rana amurensis coreana* arasında 0,0835; *Rana chensinensis* ve *Rana amurensis amurensis* arasında ise 0,0896 olarak tespit edildi. Ayrıca; Asya'da bulunan diğer türler arasında benzer  $F_{ST}$  değerleri olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre *R. tavasensis*  $F_{ST}$  değerlerinin diğer Anadolu dağ kurbağalarından yukarıda bahsedilen değerlere benzer derecelerde farklılaştığı için ayrı bir tür olarak değerlendirildi.

Populasyonlar arasındaki coğrafik bariyerlerin tespiti ve populasyonların genetik yapıları üzerindeki etkileri yadsınamaz. Bilgin (2011); “Toros yolu” olarak adlandırılan Toroslar ve Batı Ege arasındaki Anadolu diyagonalinin, Anadolu dağ kurbağaları türleri üzerinde sadece dağılımında etkili olduğunu ve bir populasyon farklılaşmasına sebep olmadığını belirtmiştir. Ayrıca Anadolu Diyagonalini bazı omurgalı türlerini ayırmada etkili olsada (Nilson vd., 1990; Gül vd., 2012; Kaplı vd., 2013) Demirsoy (2008) da belirttiği gibi Anadolu'nun güçlü bariyerleri genellikle omurgasız türlerinde daha etkin rol oynamaktadır.

Anadolu dağ kurbağalarına ait populasyonların genetik yapısının ortaya çıkarılması için 6 farklı mikrosatellit lokusu çalışılmıştır. Buna göre, her bir lokustaki alel sayısı 4-9 arasında değişmektedir ve ortalama gözlenen heterozigotluk 0,69 ile 0,81 arasındadır. Birçok lokusun Hardy-Weinberg beklentilerinden sapma gösterdiği tespit edildi. Vences vd. (2013) *Rana dalmatina* populasyonlarında 8 lokus üzerinde yaptığı çalışmada gözlenen heterozigotluğu 0,61 (0,38-0,84) olarak bulundu. Alel sayısı ise 15-34 arasında değişmektedir. Sarasola-Puente vd. (2012), 12 mikrosatellit lokusu üzerinde yaptıkları çalışmada, gözlenen heterozigotluk değerlerine bakıldığı zaman populasyonlarda gözlenen yakın zamanda geçirilen bir darboğazın belirtilerine rastlamıştır. Fakat buna rağmen heterozigotluk ve alel sayılarına bakıldığı zaman diğer anuralara kıyasla makul seviyede genetik çeşitliliğe rastlandı (Wilkinson vd., 2007; Blouin vd., 2010; Roth ve Jehle, 2016). Mevcut çalışmamız için de aynı durum söz konusu olmaktadır. Bazı populasyonlarımızda darboğaz varlığı söz konusu olsa da diğer anura türlerine yakın genetik çeşitlilik tespit edildi.

Tüm lokuslar için populasyonların ortalama alel sayısı 4,83-8,5 arasında değişmektedir. Genetik çeşitliliğin ifadesi olan bir başka değer olan beklenen heterozigotluğun; 0,58-0,78 arasında değiştiği tespit edildi. Mikrosatellit lokusu başına düşen alel sayısı ve beklenen heterozigotluk değeri ile ölçülen genetik çeşitlilik diğer dağ *Rana* türleri ile benzer olmaktadır. Monsen ve Blouin (2004), farklı lokalitelerden elde ettikleri *R. cascade* populasyonlarında populasyon başına düşen alel sayısını 1-11 arasında, beklenen heterozigotluğun 0,45-0,73 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Zhan vd. (2009) Tsinling ve Daba Dağlarındaki *R. chensinensis* populasyonlarında beklenen heterozigotluk değerlerinin 0,504-0,855 arasında tespit edildi. Zhao vd. (2009)



Güney Çin’de farklı *R. kukunoris* populasyonlarının yapısını incelemiştir. Buna göre; beklenen heterozigotluğunun 0,412-0,754 değerleri arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Populasyona özgü (private) aleller sadece Grup 3 kümesinde gözlenmiştir. Diğerlerinde ise populasyona özgü aleller mevcut değildir. Populasyonlar arası gözlenen yüksek gen akışına rağmen sadece Grup 3’de populasyona özgü alelin (private alel) gözlenmesi, populasyon içi yeni bir mutasyona veya mevcut alelin henüz yayılmaya fırsat bulamadığına işaretler. Ayrıca, Slatkin (1985) ile Barton ve Slatkin (1986) populasyona özgü alellerin gen akışı indikatörü olarak katkı sağlayabildikleri bir populasyon genetiği modeli göstermişlerdir. Buna göre, populasyona özgü aleller, her jenerasyonda populasyonlar arasında değiştirilen ortalama göç eden birey sayısı ile alakalı olmaktadır. Bu modele göre, mevcut gruplarımızdan, sadece Grup 3’de populasyona özgü alelin bulunması; populasyona ait yeni göç eden bir bireyin getirdiği mutasyon veyahut sınırlı sayıda göç eden bireyin diğer bölgeler ile paylaşıldığını düşündürmektedir. Bu durum, bize Anadolu dağ kurbağaları arasında hala hazırda tamamlanmış bir ayrılmanın vuku bulmadığına dair kanıt olabilmektedir.

Populasyonlara ait  $R_{ST}$  değerleri incelendiğinde Grup 3-Grup 7, Grup 1-Grup 2, Grup 3-Grup 6 ve Grup1-Grup 6 arasında anlamlı bir farklılaşma gözlenirken ( $p < 0,05$ ),  $F_{ST}$  değerlerine göre düzeltilmiş  $p$  değerleri (Bonferroni Correction) ile populasyonlar arasında anlamlı bir fark elde edilemedi ( $p > 0,05$ ). Mikrosatellitlerin populasyon genetiği çalışmalarında yaygınlaşması ile birlikte, populasyon yapılarını ayırmak için geleneksel populasyon genetiği istatistiğinin kullanılması ile ilgili bir tartışma da meydana gelmiştir (Wright, 1965 tarafından geliştirilen  $F$  istatistiği). Akabinde bazı araştırmacılar yeni bir genetik yapı parametresi olan ve populasyonlar arası genetik mesafeyi hesaplayan  $R_{ST}$  değerini önermişlerdir (Goldstein vd., 1995; Slatkin, 1995; Paetkau vd., 1997). Fakat,  $R_{ST}$  değerinin  $F_{ST}$  değerinden daha etkili olduğu kanıtlanmamıştır (Neigel, 1997; 2002). Bununla birlikte; Gaggiotti vd. (1999) populasyon büyüklüğü “ $\leq 10$ ” olan ve kullanılan mikrosatellit primer sayısı 20’den az olan populasyonlarda,  $F_{ST}$  değeri ile populasyonlar arası değişen gen akışının tahmini daha korunmuştur. Bu sebepten dolayı, mevcut analizlerde daha fazla güvenilir sonuç verdiği için  $F_{ST}$  değeri dikkate alınarak populasyonlar arası genetik farklılık yorumlandı.  $F_{ST}$  değerine göre yukarıda da bahsettiğimiz gibi mevcut populasyonlarımız arasında

herhangi bir genetik farklılık tespit edilemedi ve bununla birlikte populasyonlar arası yüksek gen akışı gözlemlendi. Coğrafik olarak izole populasyonlar arasındaki düşük  $F_{ST}$  değeri daha önce başka *Rana* türlerinde de rastlandı. Martínez-Solano vd. (2005) İspanya’da yaşayan dağ kurbağası *R. iberica*’ya ait farklı populasyonlar üzerinden mikrosatellit belirteçler ile populasyonların genetik yapılarını karşılaştırmıştır. Buna göre, coğrafik olarak birbirinden uzak olan populasyonlar arasında düşük  $F_{ST}$  değeri elde etmişlerdir. Araştırmacıların bu sonucu düşük alel sayısı üzerinden gerçekleşen genetik homojeniteye bağlamışlardır. Her ne kadar mevcut çalışmamız alel sayısı bakımından Martínez-Solano vd. (2005) çalışmasına benzer değerlere sahip olsa da, elde edilen değerlerin kullanılan lokuslarla alakası olabilir. Daha fazla sayıda ve polimorfik lokuslar ile farklı  $F_{ST}$  değerleri eldesi olasıdır.

Gruplar arasında  $F_{ST}$  değerine ve bu değere göre hesaplanan gen akışı oranına ( $N_m$ ) bakıldığı zaman mevcut gruplar arasında yüksek seviyede gen akışından ve az seviyede genetik farklılaşmadan söz edilmektedir. Aynı türün farklı populasyonlarında ve coğrafik olarak yakın populasyonlarının gen akışının yüksek çıkması beklenen bir olaydır. *R. macrocnemis* türünün farklı populasyonları arasında coğrafik olarak birbirine yakın olanlarda  $N_m$  değeri yüksek seviyede tespit edilmiştir (Grup 1-Grup 2 için  $N_m=6,839$  ve Grup 3-Grup 6 için  $N_m=11,865$ ). Ayrıca yine gen akışı değerlerine bakıldığı zaman Bursa, Kastamonu ve Bolu lokalitelerinden oluşan Grup 1’in batı bölgesi için; Doğu Karadeniz kıyılarındaki lokalitelerden oluşan Grup 3’in ise Doğu Anadolu için gen akışında kaynak populasyon görevi gördüğü anlaşılmaktadır. Bununla birlikte mevcut çalışma da dahil olmak üzere birçok çalışmada farklı tür olduğu belirlenmiş *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4 ile yakın coğrafik alanlardaki *R. macrocnemis* türlerini temsil eden Grup 2 ve Grup 1 arasında gen akışı gösteren yüksek genetik farklılaşma ( $F_{ST}$ ) değeri ise nispeten düşük çıktı.

Ortalama  $F_{IS}$  değeri ( $F_{IS}>0.2$ ) olan ve Hardy-Weinberg dengesinden sapan izole populasyonların genetik stres altında oldukları söylenebilir. Ayrıca populasyon için soy içi üreme kat sayısına bakıldığında  $F_{IS}<0$  çıkan tek grubumuz *R. tavasensis* örneklerini temsil eden Grup 4 olmaktadır. Tüm bu veriler ışığında *R. tavasensis* için hibridizasyon olayının meydana geldiğini söylebiliriz. Seehausen (2004)’e göre türler arasındaki hibridizasyon; alelleri çaprazlar ve populasyonun genetik çeşitliliğini artırarak türlerin

hızlı bir şekilde dağılmasına katkı sağlayarak onları geliştirir. *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4'de akraba olmayan ile üremenin artması heterozigotluğun fazlalığına sebep olmaktadır. Ayrıca stres altındaki birçok türün soy içi üreme baskısından kaçmak için akraba olmayan türler ile üreme yolu gittiği bilinmektedir. Bununla birlikte Wiens vd. (2006); hibridizasyondaki artışın yakın zaman türleşme olayları içerisinde uygun üreme izolasyonu geliştirmeyi başaramamış türlerin gerçekleştirdiğine dair kanıtlar bulmuşlardır. Her iki olasılıkta, *R. tavasensis* popülasyonundaki  $F_{IS} < 0$  durumunu açıklamada mümkün olasılıklar olmaktadır. Endemik ve popülasyon seviyesinde azalma yaşayan bu türün, genetik çeşitliliğini artırmak istemesi mantıklı gözükmektedir.

Popülasyon büyüklüğü değeri düşük olan küçük popülasyonlar büyük olanlara nazaran lokal azalmalara karşı daha yatkın olmaktadır (Blaustein vd., 1994; Hanski, 1998; Montgomery vd., 2000). En küçük etkili popülasyon büyüklüğüne sahip Grup 4 ve Grup 7'de belirgin darboğaz varlığına rastlanmıştır. Ayrıca, *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4'deki darboğaz etkisi, IUCN'in Kırmızı Listesine göre, popülasyon sayısı azalmakta olan *R. tavasensis*'in durumunu doğrulamaktadır. Söz edilen bu gruplarda darboğazların sebepleri; soy içi üreme depresyonu, yakın zamanda geçirilen habitat fragmentasyonu, nul alel varlığı, kurucu etkisi veya tüm bu faktörlerin kombinasyonu olabilir. Özellikle Grup 7'de ortama  $F_{IS}$  değeri 0.2'den yüksek çıkmıştır. Bu sonuç soy içi üremenin bir belirtisi olabilmektedir. Ayrıca tüm gruplarda, bazılarında az seviye de olsa nul alel varlığı tespit edilmiştir. Darboğaz gözlenen bir başka grup olan Grup 1'de ise nul alel varlığı sadece tek bir lokusta tespit edilmiştir.  $F_{IS}$  değeri düşük olarak bulunmuştur. Etkin popülasyon büyüklüğü ise nispeten diğer popülasyonlara göre daha büyük olmaktadır. Bu gruptaki darboğazın bu yüzden yeni başlamış olabileceği düşünülmektedir.

Temel koordinatlar analizi (PCoA) sonucuna göre Grup 5 örnekleri (Eğrigöl, Yanpınar-Mersin, Seviçova-Konya) farklı bir yerde konumlanırken diğer popülasyonlar coğrafik konumlarına göre grafikte yerleşmişlerdir. Mantel test sonucuna göre genetik mesafe ile coğrafik mesafe az da olsa doğru orantılı olmasına rağmen anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $r^2 = 0,031$ ). Genetik mesafe ve coğrafik uzaklığın ilişkili olması çok da gerekli olmamaktadır. Bu duruma literatürde *R. dalmatina* örneklerinde de rastlanmıştır

(Lesbarrères vd., 2006). Coğrafik mesafeye rağmen genetik farklılaşmanın gerçekleşmesi gen akışını azaltacak bir bariyerin olmadığına veya mevcut coğrafik bariyerlerin popülasyon farklılaşmasının oluşamayacağı kadar çok yakın zamanlarda oluştuğunu göstermektedir (Dupanloup de Ceuninck vd., 2000).

Popülasyon genetik yapısını ortaya koyan Structure programı ile elde edilen bar grafiğine bakıldığında; Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 örneklerinin genetik yapısının birbirine benzediği görülmektedir. Grup 5'in ise genetik yapısı diğer gruplardan farklı gözükse de bütün popülasyonlar arasında gen akışı olduğu söylenebilir. Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 arasındaki genetik yapı benzerliğinin coğrafik konumlarının yakınlığından ileri geldiği düşünülmektedir. Bununla birlikte popülasyonların şuanki genetik yapılarının belirlenmesinde, jeolojik geçmişleri de önemli rol oynamaktadır. Pleistosen'deki buzul dönemlerindeki ısınma ve soğuma değişimleri Anadolu dağ kurbağalarının genetik yapısının oluşmasında belirleyici olmuştur. Isınma zamanlarında yükseklerle çekilen canlılar, soğuma zamanlarında en yakın vadilerde buluşarak ortak gen havuzunu oluşturdukları düşünülmektedir. Buna bağlı olarak, coğrafik bariyerlerin ortaya çıkışından günümüze dek geçen süre Anadolu dağ kurbağası popülasyonlarının farklılaşması için yeterli değildi diğer bir deyişle nispeten genç popülasyonlardır.

Anadolu dağ kurbağalarının, mitokondriyal DNA ve nükleer DNA verileri (RAG1, POMC ve mikrosatellit bölgeleri) popülasyonların demografik tarihini açıklarken birbirleriyle uyumlu bilgiler vermemektedir. Mikroevrimin kısmen dahil olduğu popülasyonlar arası farklılığı açıklarken böyle sonuçların çıkması çok da olağandışı değildir (Toews ve Brelsford, 2012). Canestrelli vd. (2014) Avrupa'dan örneklediği 40 farklı *Rana dalmatina* popülasyonu üzerinde yaptığı incelemede, benzer sonuçları tespit etmiş ve mitokondriyal DNA ve mikrosatellit verileri arasında bir uyuma rastlamamıştır. Bir başka açıklama olarak, bu türün sadece babadan kalıtılan nDNA varyasyonunu azaltacak şekilde azalma geçirdiğini göstermektedir (Li, 1997; Toline ve Baker, 1995; Bensch vd., 2006). mtDNA gibi bazı organel genlerinde mutasyon oranı nükleer genlere oranla 5-10 kat daha fazladır (Brown vd., 1979). Böyle yüksek bir mutasyon oranına sahip olması, doğal popülasyonlarda yüksek genetik çeşitliliğe neden olabilmektedir. (Melnick ve Hoelzer, 1992).

Elde edilen bilgiler ışığında çalışmanın sonuçları;

- 1- cyt b gen bölgesi verilerine dayalı Maksimum Benzerlik/Maksimum Tutumluluk/Bayesian yaklaşımlı filogenetik ağaçlar; *R. tavasensis* türünü temsil eden Haplotip 37, 38 ve 39'un diğer türlere ait haplotiplerden %90'ın üstünde seç-bağla ve posterior olasılık değerleri ile ayrıldığını gösterdi.
- 2- cyt b gen bölgesi Network analizi sonuçlarına göre; *R. tavasensis* türünü temsil eden H37, H38 ve H39 haplotiplerinin diğer *Rana* türleri temsil eden haplotipler arasında toplam 481 bç üzerinden, en az 32 baz pozisyonunda mutasyon gözlemlendi.
- 3- cyt b gen bölgesi AMOVA analizine göre; gruplar arası varyasyon yüzdesi % 36,19; grup içi popülasyonlar arası varyasyon yüzdesi % 37,33 ve popülasyon içi varyasyon yüzdesi % 26,48 olarak tespit edilmiştir. *R. tavasensis* türü dahil edilmeden yapılan varyans analizi sonucunda diğer Anadolu dağ kurbağa grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi.
- 4- cyt b gen bölgesine göre Anadolu dağ kurbağa türlerini temsil eden gruplar  $F_{ST}$  değeri bakımından karşılaştırılmıştır. *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4'e ait  $F_{ST}$  değeri %7.8-8.6 arasında değişirken diğer türleri temsil eden gruplar arasında ise, bu değer en fazla %1 olarak tespit edildi.
- 5- COI gen bölgesi Network analizi sonuçlarına göre yapılan analiz sonucunda *R. tavasensis* türlerini temsil eden haplotipler (H36, H37 ve H38) ve diğer türleri temsil eden haplotipler arasında en az 52 baz pozisyonunda mutasyon gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar cyt b gen bölgesi ile benzerlik gösterdi.
- 6- COI gen bölgesi verilerine dayalı Maksimum Benzerlik/Maksimum Tutumluluk/Bayesian yaklaşımlı filogenetik ağaçlara göre *R. tavasensis* türü incelenen diğer kurbağalardan yüksek seç-bağla ve posterior olasılık değerleri ile ayrıldı (100/1/100).

- 7- COI gen bölgesi AMOVA analizine göre; gruplar arası varyasyon yüzdesi % 35,08, grup içi popülasyonlar arası varyasyon yüzdesi % 42,09 ve popülasyon içi varyasyon yüzdesi % 22,83 olarak tespit edilmiştir. Fakat Cyt b gen bölgesi analizlerine benzer olarak, *R. tavasensis* türü dahil edilmeden yapılan varyans analizi sonucunda diğer Anadolu dağ kurbağa grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi.
- 8- COI gen bölgesine göre Anadolu dağ kurbağa türlerini temsil eden gruplar  $F_{ST}$  değeri bakımından karşılaştırılmıştır. *R. tavasensis* türünü temsil eden Grup 4'ün  $F_{ST}$  değeri %7.7-8.3 arasında değişmektedir. Diğer türleri temsil eden gruplar arasında ise, bu değer en fazla %1 olarak tespit edildi.
- 9- mtDNA'ya ait gen bölgelerine dayalı analizlerin sonuçları *R. tavasensis* türünün diğer türlerden genetik olarak ayrıldığını açıkça gösterdi. *R. holtzi*, *R. camerani* ve *R. macrocnemis* arasında ise genetik farklılık tespit edilemedi.
- 10- nDNA gen bölgeleri (POMC ve RAG1) bakımından Anadolu dağ kurbağaları türlerini arasında filogenetik bir ayırım tespit edilmedi.
- 11- Popülasyonlara dair genetik çeşitliliği tespit edebilmek için 6 polimorfik mikrosatellit lokusu üzerinden popülasyon genetiği analizleri gerçekleştirildi. Alel sayılarının popülasyonlara göre 1-16 arasında değiştiği belirlendi. Bu sonuç diğer dağcıl *Rana* cinsine ait türlerden elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdi.
- 12- Lokuslara göre alellik zenginlik ortalamaları en düşük P2 lokusunda 2,523; en yüksek ise P7 lokusunda 8,882 olarak hesaplandı. Çok sayıda lokus ve popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinden sapmalar gösterdiği belirlendi. P1 lokusu hariç tüm lokusların ve popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinden sapmalar gösterdiği belirlendi.
- 13- Popülasyona özgü (private) aleller sadece grup 3 kümesinde gözlenmiştir. Diğerlerinde ise popülasyona özgü aleller bulunmamaktadır.

- 14- Her bir gruba ait ortalama gözlenen heterozigotluk değerleri en düşük (0,447) Grup 2’de gözlenirken en yüksek (0,711) Grup 3’de gözlendi.
- 15- Genetik çeşitliliğin ifadesi olan alel sayısı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri ve alellik zenginlik Anadolu dağ kurbağaları için Grup 1, Grup 3, ve Grup 6’da diğer gruplara nispeten daha yüksek elde edildi.
- 16- Populasyonlara ait  $R_{ST}$  değerleri incelendiğinde Grup 3-Grup 7, Grup 1-Grup 2, Grup 3-Grup 6, Grup1-Grup 6 arasında anlamlı bir farklılaşma gözlendi ( $p<0,05$ ). Ancak  $F_{ST}$  değerlerine göre düzeltilmiş p değerleri (Bonferroni Correction) ile populasyonlar arasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0,05$ ).
- 17- Genetik uzaklığa bağlı olarak hesaplanan gen akışı değeri en düşük Grup 4-Grup 6 arasında ( $N_m$ : 4,136), en yüksek ise Grup 3-Grup 6 arasında ( $N_m$ : 43,995) gözlenmiştir. Gen akışının en düşük olduğu ( $F_{ST}$ : 0,1570;  $R_{ST}$ :0,2039;  $N_m$ : 4,906 ) Grup 1 ve Grup 6 ile arasında diğer gruplara oranla nispeten farklılık mevcuttur. Coğrafik olarak yakın gruplar arasında daha yüksek gen akışını gözlendi.
- 18- Genetik farklılaşmanın nerden kaynaklandığını göstermek için yapılan AMOVA analizi sonucunda genetik farklılaşmanın mtDNA veri analizine benzer olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi, farklılık yüksek oranda (% 71.51) bireyiçi varyasyondan kaynaklandığı belirlendi.
- 19- Structure programının sonuçlarına göre populasyonların genetik olarak anlamlı bir farklılaşmaya göre gruplanmadığı gözlendi. Örnekler arasında çok düşük seviyede olan genetik uzaklık değeri ( $F_{ST}$ ) Structure programının sonucuyla uyumludur.
- 20- Mekansal otokorelasyon hesaplaması sonucunda genetik mesafe ile coğrafik mesafe arasında bir bağlantı olmadığı ortaya çıktı. 50 km lik uzaklık sınıfı ile analiz gerçekleştirilmiş olup en uzak iki populasyon 1550 km civarındadır.

- 21- Mantel test sonucuna göre genetik mesafe ile coğrafik mesafe az da olsa doğru orantılı olmasına rağmen anlamlı bir ilişki yoktur ( $r^2= 0,031$ ).
- 22- Coğrafik yakınlıklarına göre gruplandığımız popülasyonlarımız arasında coğrafik ve genetik farklılıklar arasında anlamlı ilişki elde edilmemesi sonuçlarımızın tutarlılığını gösterdi.
- 23- Gruplara ait lokuslarda darboğaz varlığı TPM ve SMM modelleri kullanılarak test edilmiştir. Buna göre Grup 1, 4 ve 7'ye ait bazı lokuslarda darboğaz varlığına rastlandı. Genetik çeşitlilik değerleri nispeten daha düşük olan bu gruplarda darboğaz varlığının anlamlılığı sonuçlarımız ile ilişkilidir.
- 24- Popülasyonlar arası genetik uzaklığı ifade etmek için Poptreew2 ile çizilen UPGMA ağacı sonucunda 2 ana grubun ortaya çıktığı gözlenmiştir. Fakat hiçbir grup birbirinden anlamlı olarak ayrılmamıştır.
- 25- LDNe programıyla bağlantı eşitsizliğine dayanarak hesaplanan etkili popülasyon büyüklüğü değerleri ( $N_e$ ) gruplar arasında 6,1-187,2 olarak değişmektedir. Etkili popülasyon büyüklüğü en yüksek çıkan gruplarımız; Grup 1, Grup 3 ve Grup 6'dır.
- 26- Nul alel frekansı iki ayrı programla hesaplandı. İki programla da hesaplanan değerler birbirine yakın sonuçlar vermektedir. Buna göre; her gruba ait en az bir lokusta nul alel varlığına rastlandı. Her lokusta nul alel varlığı gruplarımızın Hardy-Weinberg dengesinden sapmasının nedenlerinden biri olabilir.
- 27- Mikrosatellit verilerimize göre incelenen gruplar arasında herhangi bir genetik farklılaşma tespit edilmedi.



## 5. ÖNERİLER

Canlıların tür seviyesinde ayrılmasında filogenetik çalışmalar yıllar geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle aynı ekolojik koşullarda yaşayan birçok canlı benzer fenotipik özelliğe sahiptir. Bu sebep ile, tür seviyesinde ayrılmaları sadece dış görünüş ile çok zor hale gelmektedir. Ayrıca benzer habitat alanlarında yaşayan birçok tür, yaşam koşullarına benzer tepkiler geliştirmektedir. Tüm bu sebeplerden ötürü, canlıların atasal geçmişlerine göre gruplanması veya ayrılması daha güvenli sonuçlar verir. Anadolu dağ kurbağaları tür grubu soğuk kuşak seven ve yüksek rakımlarda yaşayan bir tür grubu olduğu için diğer Anadolu'da yaşayan amfibileri içerisinde ayrı bir yere sahiptir. Bu tür grubuna ait filogenetik karmaşa çok uzun süreden beri devam etmektedir. Literatürde türe ait yapılan taksonomik çıkarımların çoğu morfolojik olmaktadır. Bundan dolayı mevcut çalışma daha önce bu grup üzerinde hiç çalışılmamış yüksek polimorfik ve korunmuş gen bölgesi olan COI'a dayalı bilgiler içermesi bakımından literatürdeki diğer genetik çalışmalardan ayrılmaktadır.

Ülkemizde populasyon genetiği çalışmaları, geçmiş yıllara nazaran daha fazla ilgi çeken çalışmalar olmaktadır. Canlıların populasyon yapılarına dair en doğru bilgi populasyon genetiği çalışmaları ile sunulmaktadır. Anadolu coğrafyası birçok açıdan diğer benzersiz özellikleri sahiptir. Bu coğrafya üzerinde yaşayan her canlıya ait populasyon genetik yapılarının tespiti özellikle önemli olmaktadır. Çalışılan tür grubuna dair, literatürde bulunan populasyon çalışmaları markala-yakala metoduna dayalı populasyon dinamiği çalışmaları olmaktadır. Bu çalışma ile birlikte içerisinde endemik türlerde bulunduran bu grubun ilk defa mikrosatellit belirteçler yardımı ile populasyon yapıları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bununla birlikte, ülkemizde daha fazla canlıya ait populasyon genetiği çalışmaları yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın çıktıları göstermektedir ki; bu gruba ait endemik bir tür olan *R. tivasensis*'in populasyon yapısı daha ayrıntılı olarak daha fazla sayıda ve polimorfik belirteçler ile çalışılmalı ve tehlike altında olan bu tür için koruma stratejilerinin geliştirilmesi planlanmalıdır. Ayrıca daha fazla sayıda mikrosatellit lokusunun geçerliliği bu tür grubu üzerinde denenebilir.

## KAYNAKLAR

- Afşar, M., 2006.** Sultandağları'nın Herpetofaunası. Doktora Tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, Türkiye, 143 s.
- Afşar, M., Afsar, B. and Arıkan, H., 2014.** *Rana macrocnemis* BOULENGER, 1885, from the Emir Mountains in western inner Anatolia (Turkey) (Anura: Ranidae). *Herpetozoa*, 26, 115-123.
- Afşar, M., Afsar, B. and Arıkan, H., 2015.** Classification of the mountain frogs of the Berçelan plateau (Hakkari) east anatolia (Turkey) (Anura: Ranidae). *Herpetozoa*, 28, (1/2), 15-27.
- Akın, Ç., Bilgin, C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Uzzell, T., Bilgin, M., Hotz, H. and Guex, G.D., 2010.** Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the late Cenozoic. *Journal of Biogeography*, 37, 2111-2124.
- Arıkan, H., Olgun, K., Tok, C.V. and Çevik, İ.E., 2001.** Morphological and serological investigations on the mountain frogs of the mid-aurus range between east longitudes 33° and 36°. *Turkish Journal of Zoology*, 25, 11-17.
- Austin, J.D., Lougheed, S.C., Moler, P.E. and Boag, P.T., 2003.** Phylogenetics, zoogeography, and the role of dispersal and vicariance in the evolution of the *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) species group. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 601-624.
- Avise, J.C., 2004.** Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates, 2. Baskı, ISBN: 0-87893-041-8, 541 s.
- Baker, R.J., Porter, C.A., Patton, J.C. and Bussche, V.D., 2000.** Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. *Occasional Papers - The Museum, Texas Tech University*, 20, 1-16.
- Bandelt, H-J., Forster, P. and Rohl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Baran, İ., 1969.** Anadolu dağ kurbağaları üzerinde sistematik araştırma. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmi Raporlar Serisi*, 80, 1-78.
- Baran, İ. and Atatür, M.K., 1986.** A taxonomical survey of the mountain frogs of Anatolia. *Amphibia-Reptilia*, 7, 115-133.
- Baran, İ., Yılmaz, İ., Kete, R., Kumlutaş, Y. ve Durmuş, H., 1992.** Batı ve Orta Karadeniz bölgesinin herpetofaunası. *Doğa Türk Zooloji Dergisi*, 16, 275-288.

- Baran, İ., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Olgun, K., Avci, A. and İret, F., 2007.** On new populations of *Rana holtzi* and *Rana macrocnemis* (Ranidae: Anura). Turkish Journal of Zoology, 31, 241-247.
- Barker, F.K., Cibois, A., Schikler, P., Feinstein, J. and Cracraft, J., 2004.** Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. Proceedings of the National Academy of Science, 101, 11040-11045.
- Barton, N.H. and Slatkin, M., 1986.** A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. Heredity, 56, 409-415.
- Başkale, E., Çevik, İ.E., Kaya, U., Kumlutaş, Y. and Olgun, K., 2012.** New data On The Distribution of The Taurus Frog *Rana holtzi* Werner, 1898, in The Bolkar Mountains of Turkey. Herpetozoa, 24, (3/4), 113-120.
- Başoğlu, M. and Helmich, W., 1959.** Auf Herpetologischer Forschungsfahrt in Ost-Anatolien. Die Aquarienzeitschrift, 12, 118-121, 149-152.
- Başoğlu, M. and Helmich, W., 1970.** Amphibien und reptilien aus dem östlichen Anatolien. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmî Raporlar Serisi, 93, 1-37.
- Baykal, A.F., 1974.** Historik Jeoloji. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, yayın no: 127, 2. Baskı, 436 s.
- Becker, R.E., Valverde, R.A. and Crother, B.I., 2011.** Proopiomelanocortin (POMC) and testing the phylogenetic position of turtles (Testudines). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 49, 148-159.
- Beckmann, J.S. and Weber, J.L., 1992.** Survey of human and rat microsatellites. Genomics, 12, 627-631.
- Bensch, S., Irwin, D.E., Irwin, J.H., Kvist, L. and Åkesson, S., 2006.** Conflicting patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in Phylloscopus warblers. Molecular Ecology, 15, 161-171.
- Bilgin, R., 2011.** Back to the suture: the distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. International Journal of Molecular Sciences, 12, 4080-4103.
- Bird, G.G., 1936.** The distribution of reptiles and amphibians in Asiatic Turkey, with notes on a collection from the Vilayets of Adana, Gaziantep and Malatya. The Annals and magazine of natural history, 18, (10), 257-281.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B. and Sousa, W.P., 1994.** Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. Conservation Biology, 8, 60-71.
- Blouin, M.S., Phillipsen, I.C. and Monsen, K.J., 2010.** Population structure and conservation genetics of the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. Conservation Genetics, 11, 2179-2194.

- Bodenheimer, F.S., 1944.** Introduction into the knowledge of the amphibia and reptilia of Turkey. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası, 9, 1-93.
- Boettger, O., 1892.** Wissenschaftliche Ergebnisse der Reise Dr. Jean Valentins im Sommer 1890. I. Kriechtiere der Kaukasusländer, gesammelt durch die Radde-Valentin'sche Expedition nach dem Karabagh und durch die Herren Dr. J. Valentin und P. Reibisch. Ber. Senckenberg Naturforschende Gesellschaft, 1892, 131-150.
- Bossuyt, F. and Milinkovitch, M.C., 2000.** Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 6585-6590.
- Bossuyt, F., Brown, R.M., Hillis, D.M., Cannatella, D.C. and Milinkovitch, M.C., 2006.** Phylogeny and biogeography of a cosmopolitan frog radiation: late Cretaceous diversification resulted in continent-scale endemism in the family Ranidae. Systematic Biology, 55, 579-594.
- Boulenger, G.A., 1885.** Description of a new species of frog from Asia Minor. Proceedings of the Zoological Society of London, 1885, 22-23.
- Boulenger, G.A., 1886.** Note sur les grenouilles rousses d'Asie. Bulletin de la Société zoologique de France, 11, 595-600.
- Boulenger, G.A., 1898.** The Tailless Batrachians of Europe. Wentworth Press, Part II. London, ISBN: 1371633991, 256 s.
- Brown, W.M., George, Jr M. and Wilson, A.C., 1979.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76, 1967-1971.
- Clack, J.A., 2002a.** Gaining Ground: The Origin and Evolution of Tetrapods. Indiana University Press, 2 edition, ISBN: 025335675X, 369 s.
- Clack, J.A., 2002b.** An early tetrapod from "Romer's Gap". Nature, 418, 72-76.
- Canestrelli, D., Bisconti, R., Sacco, F. and Nascetti, G., 2014.** What triggers the rising of an intraspecific biodiversity hotspot? Hints from the agile frog. Scientific Reports, 4, 5042.
- Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta, M.N. and Saccone, C., 1994.** Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. Journal of Molecular Evolution, 39, 589-597.
- Chapuis, M. and Estoup, A., 2007.** Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution, 24, (3), 621-31.

- Che, J., Pang, J., Zhao, H., Wu, G.F., Zhao, E.M. and Zhang Y.P., 2007.** Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) inferred from mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 1-13
- Cockerham, C.C., 1973.** Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74, 679-700.
- Comps, B., Gömöry, D., Letouzey, J., Thiébaud, B. and Petit, R.J., 2001.** Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics*, 157, 389-397.
- Çapar, D. and Başkale E., 2016.** Population size of endemic *Rana tavasensis* in its terra typica, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 40, 729-733.
- Çevik, İ.E., Arıkan, H., Kaya, U. and Atatür, M.K., 2006.** Comparative morphological and serological studies of three Anatolian Mountain Frogs, *Rana macrocnemis*, *R. camerani* and *R. holtzi* (Anura, Ranidae). *Amphibia-Reptilia*, 27, 63-71.
- Çiplak, B., 2004.** Biogeography of Anatolia: the marker group Orthoptera. *Memorie della Società Entomologica Italia*, 82, 357- 372.
- Davis, P.H., 1971.** Distribution patterns in Anatolia with particular reference to endemism. *Botanical Society of Edinburgh*, 335 s., Davis, P.H., Harper, P.C., Hedge, I.C., (Ed) 15-27.
- Delwig, W., 1928.** Über die Selbständigkeit von *Rana camerani* Blgr. *Zoologischer Anzeiger*, 79, 37-44.
- Demirsoy, A., 2008.** Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası Hayvan Coğrafyası. *Meteksan Yayınları*, 7. Baskı, ISBN: 978-975-7746-33-1, 1007 s.
- Dempster, A.P., Laird, N.M. and Rubin, D.B., 1977.** Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, 39, 1-38.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. and Fraimer, N.B., 1994.** Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 91, 3166-3170.
- Dupanloup de Ceuninck, I., Schneider, S., Langaney, A. and Excoffier, L., 2000.** Inferring the impact of linguistic boundaries on population differentiation: application to the Afro-Asiatic-Indo-European case. *European Journal of Human Genetics*, 8, 750-756.
- Efron, B. and Gong, G., 1983.** A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *The American Statistician*, 37, 36-48.

- Eiselt, J., 1965.** Einige Amphibien und Reptilien aus der nordöstlichen Türkei, gesammelt von Herrn H. Steiner. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, Bd. 67, 387-399.
- Emerson, S.B., Inger, R.F. and Iskandar, D., 2000.** Molecular Systematics and Biogeography of the Fanged Frogs of Southeast Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 131-142.
- Esposti, D.M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. and Meyer, A., 1993.** Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta*, 1143, 243-271.
- Estoup, A. and Cornuet, J.M., 1999.** Microsatellite evolution: inferences from population data. Oxford University Press, ISBN: 9780198504078, 368 s., Goldstein, D.B. and Schlötterer, C. (Ed.), 49-65.
- Excoffier, L. and Lischer, H., 2011.** ARLEQUIN ver. 3.5.1.3. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Swiss Institute of Bioinformatics, Bern, 174s.
- Farooqi, I.S., Drop, S., Clements, A., Keogh, J.M., Biernacka, J., Lowenbein, S., Challis, B.G. and O’Rahilly, S., 2006.** Heterozygosity for a POMC-nul mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes*, 55, 2549-2553.
- Felsenstein, J., 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Felsenstein, J., 1988.** Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of Genetics*, 22, 521-565.
- Franzen, M., Bussmann, M., Kordges, T. and Thiesmeier, B., 2008.** Die Amphibien Und Reptilien Der Südwest-Türkei. Bielefeld (Laurenti Verlag), ISBN: 978-3933066381, 328 s.
- Freeland, J.R., 2005.** Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd, ISBN: 978-0-470-09062-6, 400 s.
- Friendlander, T.P., Regier, J.C. and Mitter, C., 1992.** Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates. *Systematic Biology*, 41, 483-490.
- Frost, D.R., 1985.** Amphibian species of the world: a taxonomic and geographic reference. Allen Press, ISBN: 0942924118, 732 s.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sa, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. and Wheeler, W.C., 2006.** The amphibian tree of life. *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle*, 297, 8-370.

- Futuyma, D.J., 2008.** Evolutoin. Palme Yayıncılık, 611 s., Kence A. ve Bozcuk N. (Ç. Ed.).
- Gaggiotti, O.E., Lange, O., Rassmann, K. and Gliddon, C., 1999.** A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8, 1513-1520.
- Glaubitz, J.C., 2004.** CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4, 309-310.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Feldman, M.W., Cavalli, S. and Forza, L.L., 1995.** An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139, 463-471.
- Goudet, J., 2001.** FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. Available from [www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html).
- Görür, N. and Tüysüz, O., 2001.** Cretaceous to Miocene palaeogeographic evolution of Turkey: implications for hydrocarbon potential. *Journal of Petroleum Geology*, 24, 119-146.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O., 2010.** New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, (3), 307-21.
- Gül, S., Kutrup, B. and Özdemir, N., 2012.** Patterns of distribution of tree frogs in Turkey based on molecular data. *Amphibia-Reptilia*, 33, 95-10.
- Gürer, Ö.F. and Gürer, A., 1999.** Development of evaporites and the counterclockwise rotation of Anatolia, Turkey. *International Geology Review* 41, 607-622.
- Gvoždík, V., Moravec, J., Klütsch, C. and Kotlík, P., 2010.** Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with descriptions of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 1146-1166.
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41, 91-98.
- Hampe, A. and Petit, R.J., 2005.** Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8, 461-67.
- Hanski, I., 1998.** Metapopulation dynamics. *Nature*, 396, 41-49.

- Hauswaldt, J.S., Fuessel, J., Guenther, J. and Steinfartz, S., 2008.** Eight new tetranucleotide microsatellite loci for the agile frog (*Rana dalmatina*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1457-1459.
- Hedges, S.B., 1992.** The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap value in phylogenetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 366-369.
- Hewitt, G.M., 1996.** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 247-276.
- Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K., 1998.** *Molecular Systematics*. Second Edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, 655 s.
- Hillis, D.M. and Dixon M.T., 1991.** Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66, 411-453.
- Huang, Z.H., Yang, C.Z. and Ke, D.H., 2014.** DNA barcoding and molecular phylogeny in Ranidae. *Mitochondrial DNA*, 29, 1-5.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C., 1991.** Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128-144.
- Ishchenko, V.G., 1978.** *Dynamic Polymorphism of The Brown Frogs of Ussr Fauna*. Nauka Publ., 147 p.
- Ishchenko, V.G., 1987.** The Level of Morphological Similarity Between The Populations Of The Caucasian Brown Frog, *Rana macrocnemis* Blgr. *Proceedings of The Zoological Institute*, 158, 100-104.
- Jeffreys, A.J., Royle, N.J., Wilson, V., and Wong, Z., 1988.** Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandemrepetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 332, 278-281.
- Jehle, R. and Arntzen, J.W., 2002.** Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Journal of Herpetology*, 12, 1-9.
- Johnson, N.K. and Cicero, C., 2004.** New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evolution*, 58, (5), 1122-1130.
- Kapli, P., Botoni, D., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Avcı, A., Rastegar-Pouyani, N., Fathinia, B., Lymberakis, P., Ahmadzadeh, F. and Poulakakis, N., 2013.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the Anatolian lizard *Apathya* (Squamata, Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 992-1001.



- Kaska, Y. and Avcı, A., 2009.** *Rana tavasensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T61875A12558013. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T61875A12558013.en>. Downloaded on 09 May 2017.
- Kaya Mutanoğlu, Z., 2012.** Üç Anadolu Dağ Kurbağası Türü Arasında İskelet Kası Protein Bantlarının Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 51s.
- Kevork, O.K., 1972.** *Rana camerani* Boulenger from Iraq. Bulletin Iraq Natural History Museum, 5, (3), 9-15.
- Kimura, M. and Ohta, T., 1978.** Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite population. Proceedings of the National Academy of Sciences, 75, 2868-2872.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca F.X. and Wilson A.C., 1989.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86, 6196-6200.
- Korkmaz Ağaoğlu, Ö. and Ertuğrul, O., 2010.** Mikrosatellitlerin Önemi Ve Kullanım Alanları. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 81, (1), 39-43.
- Kumazawa, Y. and Nishida, M., 2000.** Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. Molecular Biology and Evolution, 17, (2), 1869-1878.
- Kumlutaş, Y. and Tok, V., 1998.** The Herpetofauna of the Ordu-Giresun Region. Turkish Journal of Zoology, 22, 199-201.
- Kumlutaş, Y., Özdemir, A., Ilgaz, Ç. and Tosunoğlu, M., 2004.** The Amphibian and Reptile Species of Bozdağ (Ödemiş). Turkish Journal of Zoology, 28, 317-319.
- Kuru, M., 2012.** Omurgalı Hayvanlar. Palme yayıncılık, 841 s.
- Kutrup, B., 2001.** On the Amphibia and Reptilia Species of Murgul (Artvin). Pakistan Journal of Biological Sciences, 4, (9), 1160-1164.
- Kuzmin, S., Tarkhnishvili, D., Ishchenko, V., Ananjeva, N., Orlov, N., Tuniyev, B., Sparreboom, M., Ugurtas, I., Rastegar-Pouyani, N., Papenfuss, T., Anderson, S., Eken, G., Kiliç, T., Gem, E. and Kaya, U., 2009.** *Rana macrocnemis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T58651A11820145. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T58651A11820145.en>. Downloaded on 09 May 2017
- Lantz, L.A. and Cyrén, O., 1913.** Über Die Identität Von *Rana macrocnemis* und *Rana camerani*. Zoologischer Anzeiger, 43, 214-220.

- Lee, T. and Foighil, D.O., 2004.** Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Molecular Ecology*, 13, 3527-3542.
- Lemey, P., Salemi, M. and Vandamme, A.M., 2010.** *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press, 723 s.
- Lesbarrères, D., Primmer, C.R., Lodè, T., and Merilä, J., 2006.** The effects of 20 years of highway presence on the genetic structure of *Rana dalmatina* populations. *Ecoscience*, 13, 531-538.
- Li, W.H., 1997.** *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, ISBN: 978-0878934638, 432 s.
- Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Lippe, C., Dumont, P. and Bernatchez, L., 2004.** Isolation and identification of 21 microsatellite loci in the copper redbreast (*Moxostoma hubbsi*; Catostomidae) and their variability in other catostomids. *Molecular Ecology Notes*, 4, 638-641.
- Lovejoy, N.R. and de Araújo, M.L.G., 2000.** Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, 9, (3), 259-268.
- Luquet, E., Léna, J.-P., Miaud, C. and Plénet, S., 2015.** Phenotypic divergence of the common toad (*Bufo bufo*) along an altitudinal gradient: evidence for local adaptation. *Heredity*, 114, 69-79.
- Lydeard, C., Roe and K.J., 1997.** The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. Academic Press, ISBN: 978-0-12-417540-2, 334 s., Kocher, T.D and Stepien, C.A. (Ed.), 285-303.
- Macey, J. R., Strasburg, J. L., Brisson, J. A., Vredenburg, V. T., Jennings, M. and Larson, A., 2001.** Molecular Phylogenetics of Western North American Frogs of the *Rana boylei* Species Group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19, 1, 131-143.
- Maitra, R. and Sadofsky, M.J., 2009.** A WW-like module in the RAG1 N-terminal domain contributes to previously unidentified protein-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 37, 3301-9.
- Mantel, N., 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.

- Marmayou, J., Dubois, A., Ohler, A., Pasquet, E. and Tillier, A.C., 2000.** Phylogenetic relationships in the Ranidae. Independent origin of direct development in the genera *Philautus* and *Taylorana*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 323, 287-297.
- Martin, A.P. and Palumbi, S.R., 1993.** Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 873-891.
- Martinez-Solano, I., Rey, I. and Garcia-Paris, M., 2005.** The impact of historical and recent factors on genetic variability in a mountain frog: the case of *Rana iberica* (Anura: Ranidae). *Animal Conservation*, 8, 431-441.
- Matsuba, C. and Merilä, A., 2009.** Isolation and characterization of 145 polymorphic microsatellite loci for the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology Resources*, 9, 555-562.
- Matsui, M., Shimada, T., Liu, W.Z., Maryati, M., Khonsue, W. and Orlov, N., 2006.** Phylogenetic relationships of Oriental torrent frogs in the genus *Amolops* and its allies (Amphibia, Anura, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 659-666.
- Melnick, D.J. and Hoelzer, G.A., 1992.** Differences in male and female macaque dispersal lead to contrasting distributions of nuclear and mitochondrial DNA variation. *International Journal of Primatology*, 13, 379-393.
- Meriç, E., Kerey, E., Avşar, N., Tunoğlu, C., Taner, G., Kapan-Yesilyurt, S., Ünsal, I. and Rosso, A., 2000.** New findings on the Late Quaternary (Holocene) Marmara Sea-Black Sea connection via the Bosphorus sea way. *Geological Bulletin of Turkey*, 43, 73-118.
- Mertens, R., 1952.** Amphibien und Reptilien aus der Türkei. Review of the Faculty of Science, University of Istanbul, Series B, 17, 41-75.
- Meulenkamp, J.E. and Sissingh, W., 2003.** Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African-Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeogeography*, 196, 209-228.
- Meyer, A. and Wilson, C., 1990.** Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *Journal of Molecular Evolution*, 31, 359-364.
- Mills, L.S. and Allendorf, F.W., 1996.** The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, 6, 1509-1518.
- Mindell, P.P. and Honeycutt, R.L., 1990.** Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic applications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 21, 541-566.

- Montgomery, M.E., Woodworth, L.M., Nurthen, R.K., Gilligan, D.M., Briscoe, D.A. and Frankham, R., 2000.** Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conservation Genetics*, 1, 33-43.
- Monsen, K. and Blouin, M., 2004.** Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics*, 5, 827-835.
- Neigel, J.E., 1997.** A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 28, 105-128.
- Neigel, J.E., 2002.** Is  $F_{ST}$  obsolete ? *Conservation Genetics*, 3, 167-173.
- Nilson, G., Andren, C. and Flardh, B., 1990.** *Vipera albizona*, a new mountain viper from central Turkey, with comments on isolating effects of the Anatolian "Diagonal". *Amphibia-Reptilia*, 11, 285-294.
- Normark, B.B., McCune, A.R. and Harrison, R.G., 1991.** Phylogenetic relationships of neopterygian fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 8, 819-834.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorke, C. and Baltimore, D., 1990.** Rag-1 and Rag-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 248, 1517-1522.
- Olgun, K., Arıkan, H., Tok, C.V. and Çevik İ. E., 2003.** 33° 00-36° 00' Doğu Boylamlar arası orta Torosların amfibileri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4, (2), 181-188.
- Olgun, K., Bozdoğan, M., Öz, M., Kaska, Y., Kumlutaş Y., Kaya, U., Avcı, A., Üzüm, N., Yeniyurt, C. and Akarsu, F., 2009.** *Rana holtzi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T136089A4230728. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T136089A4230728.en>. Downloaded on 09 May 2017.
- Özeti, N., 1970.** Anadolu Dağ Kurbağaları ve Bunlara Yakın Bazı Türlerin Karşılaştırmalı Osteolojisi. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İlmi Raporlar Serisi*, 104.
- Özdemir, A. and Baran, İ., 2002.** Research on the Herpetofauna of Murat Mountain (Kütahya-Uflak). *Turkish Journal of Zoology*, 26, 189-195.
- Paetkau, D. and Strobeck, C., 1995.** The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*, 4, (4), 519-520.
- Paetkau, D., Waits, L. P., Clarkson, P. L., Craighead, L. and Strobeck, C., 1997.** An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*, 147, 1943-1957.

- Palumbi, S.R. and Kessing, B., 1991.** Population biology of the TransArctic exchange: MtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins. *Evolution*, 45, 1790-1805.
- Palumbi, S.R. and Benzie, J.A.H., 1991.** Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1, 27-34.
- Peakall, R. and Smouse, P.E., 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Picariello, O., Feliciello, I., Scillitani, G., Cataudo, A., Maresca, I. and Chinali, G., 1999.** Morphological and Molecular Evidences Supporting the Taxonomic Identity of *Rana macrocnemis*, *R. camerani* and *R. holtzi* (Anura: Ranidae). *Hydrobiologia*, 38, 167-182.
- Picariello, O., Feliciello, I. and Chinali, G., 2016.** S1 satellite DNA repetitive units display identical structure and overall variability in all Anatolian brown frog taxa. *Genetica*, 144, 47-57.
- Piry, S., Luikart, G. and Cornuet, J. M., 1999.** BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502-503.
- Plötner, J., 1998.** Genetic diversity in mitochondrial 12s rDNA of western Palearctic water frogs (Anura, Ranidae) and implications for their systematics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 36, 191-201.
- Plötner, J., Ohst, T., Böhme, W. and Schreiber, R., 2001.** Divergence in mitochondrial DNA of Near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of Cypriote and Anatolian populations (Anura, Ranidae). *Amphibia-Reptilia*, 22, 397-412.
- Posada, D., 2008.** jModelTest: Phylogenetic Model Averaging, *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-6.
- Pough, F.H., Janis, C. M. and Heiser, J.B., 2013.** *Vertebrate Life*. Pearson Publishing, 9. Baskı, 729 s.
- Pritchard, J.K., Stephens, P. and Donnelly, P., 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Provan, J., Biss, P. M., McMeel, D. and Mathews, S., 2004.** Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 262-264.
- Rambaut, A., 2014.** FigTree. Tree figure drawing tool. Version 1.4.2. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

- Rambaut, A. and Drummond, A.J., 2007.** Tracer v1. 4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Robertson, A.H.F., Parlak, O. and Ustaömer, T., 2012.** Overview of the Palaeozoic-Neogene evolution of the Neotethys in the Eastern Mediterranean region (southern Turkey, Cyprus, Syria). *Petroleum Geoscience*, 18, 381-404.
- Rocha-Olivares, A., Rosenblatt, R.H. and Vetter, R.D., 1999.** Cryptic species of rockfishes (Sebastes: Scorpaenidae) in the southern hemisphere inferred from mitochondrial lineages. *Journal of Heredity*, 90, 404-411.
- Roelants, K., Jiang, J. and Bossuyt, F., 2004.** Endemic ranid (Amphibia: Anura) genera in southern mountain ranges of the Indian subcontinent represent ancient frog lineages: evidence from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 730-740.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics*, 19, (12), 1572-1574.
- Rousset, F., 2008.** “genepop’007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux”, *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Roth, S. and Jehle, R., 2016.** High genetic diversity of common toad (*Bufo bufo*) populations under strong natural fragmentation on a Northern archipelago. *Ecology and Evolution*, 6, 1626-1636.
- Sarasola-Puente, V., Madeira, M., Gosá, A., Lizana, M. and Gómez-Moliner, B., 2012.** Population structure and genetic diversity of *Rana dalmatina* in the Iberian Peninsula. *Conservation Genetics*, 13, 197-209.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Baltimore, D., 1989.** The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59, 1035.
- Schmidtler, J.F., Eiselt, J. and Sigg, H., 1990.** Die Subalpine Herpetofauna Des Bolkar-Gebirges (Mitt Lerer Taurus, Südtürkei). *Herpetofauna*, Weinstadt, 12, (64), 11-20.
- Schlotter, C. and Tautz, D., 1992.** Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 211-215.
- Seehausen, O., 2004.** Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 198-207.
- Slatkin, M., 1985.** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 16, 393-430.
- Slatkin, M., 1995.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.

- Song, J.Y., Matsui, M., Chung, K.H., Oh, H.S. and Zhao, W.G., 2006.** Distinct specific status of the Korean brown frog, *Rana amurensiscoreana* (Amphibia: Ranidae). *Zoological Science*, 23, 219-224.
- Steininger, F.F. and Rögl, F., 1984.** Paleogeography and palinspastic reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and Paratethys. *Geological Society Special Publication No 17*. Blackwell, Dixon, J.E., Robertson, A.H. (Ed), 659-668.
- Sullivan, J. and Joyce, P., 2005.** Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 36, 445-466.
- Sumida, M., Kanamori, Y., Kaneda, H., Kato, Y., Nishioka, M., Hasegawa, M. and Yonekawa, H., 2001.** Complete nucleotide sequence and gene rearrangement of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes & Genetic Systems*, 76, 311-325.
- Swofford, D. L., 2003.** PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates.
- Şahin, F., 2008.** Bozdağ (Ödemiş) ve Akdağ (Tavas)'daki *Rana macrocnemis* (Anura: Amphibia) Türünün Taksonomik İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 50s.
- Taberlet, P, Fumagalli, L, Wust-Saucy, A.G. and Cossons, J.F., 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7, 453-464.
- Takezaki, N., Nei, M. and Tamura, K., 2014.** POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 1625-1637.
- Tarkhishvili, D.N., Arntzen, J.W. and Thorpe, R.S., 1999.** Morphological Variation in Brown Frogs From The Caucasus and The Taxonomy of The *Rana macrocnemis* Group. *Herpetologica*, 55, 406-416.
- Tarkhishvili, D.N. and Gokhelasvili, R.K., 1999.** The Amphibians of The Caucasus. *Sofia-Moscow (Pensoft)*, 4, 158-175.
- Tarkhishvili, D.N., Hille, A. and Böhme, W., 2001.** Humid Forest Refugia, Speciation and Secondary Introgression Between Evolutionary Lineages: Differentiation in a Near Eastern Brown Frog, *Rana macrocnemis*. *Biological Journal of The Linnean Society*, 74, 141-156.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, (12), 2725-2729.
- Terent'ev, P.V. and Chernov, S.A., 1949.** Key to Amphibians and Reptiles. Jerusalem (Israel Program for Scientific Translations, Translated From Russian), 315p.

- Teynie, A., 1991.** Observations Herpétologiques Turquie 2ème Partie. Bulletin de la Société Herpétologique de France, 58, 21-30.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997.** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25, 4876-4882.
- Toews, D.P.L. and Brelsford, A., 2012.** The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. Molecular Ecology, 21, 3907-3930.
- Toline, C.A. and Baker, A.J., 1995.** Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the northern redbelly dace (*Phoxinus eos*). Molecular Ecology, 4, (6), 745-753.
- Uğurtaş, I., 1989.** Bursa-Uludağ Bölgesinin Herpetofaunası. Doğa Türk Zooloji Dergisi, 13, 241-248.
- URL-1, 2017.** [http://www.amphibiaweb.org/cgi/amphib\\_query?wheregenus=Rana&where-species=tavasensis](http://www.amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?wheregenus=Rana&where-species=tavasensis) (9 Mayıs 2017).
- URL-2, 2017.** [http://www.amphibiaweb.org/cgi/amphib\\_query?where-enus=Rana&where-species=macrocnemis](http://www.amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?where-enus=Rana&where-species=macrocnemis) (9 Mayıs 2017).
- van Andel, T.H. and Shackleton, J.C., 1982.** Late Paleolithic and Neolithic coastlines of Greece and the Aegean. Journal of Field Archaeology, 9, 445-454.
- van de Peer, Y., Baldauf, S. L., Doolittle, W. F. and Meyer, A., 2000.** An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on ratecalibrated evolutionary distances. Journal of Molecular Evolution, 51, 565-576.
- van der Meijden, A., Vences, M. and Meyer, A., 2004.** Novel phylogenetic relationships of the enigmatic brevicipitine and scaphiophrynine toads as revealed by sequences from the nuclear Rag-1 gene. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science, 271, S378-S381.
- van der Meijden, A., Vences, M., Hoegg, S. and Meyer, A., 2005.** A previously unrecognized radiation of ranid frogs in southern Africa revealed by nuclear and mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 37, 674-685.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. and Shipley, P., 2004.** Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 4, 535-538.



- Van Oosterhout, C., Weetman, D. and Hutchinson, W.F., 2006.** Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes*, 5, 255–256.
- Vences, M., Hauswaldt, J.S., Steinfartz, S., Rupp, O., Goesmann, A., Künzel, S., Orozco-terWengel, P., Vieites, D.R., Nieto-Roman, S., Haas, S., Laugsch, C., Gehara, M., Bruchmann, S., Pabijan, M., Ludewig, A.K., Rudert, D., Angelini, C., Borkin, L.J., Crochet, P.A., Crottini, A., Dubois, A., Ficetola, G.F., Galán, P., Geniez, P., Hachtel, M., Jovanovic, O., Litvinchuk, S.N., Lymberakis, P., Ohler, A. and Smirnov, N.A., 2013.** Radically different phylogeographies and patterns of genetic variation in two European brown frogs, genus *Rana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, (3), 657-670.
- Veith, M., Schmidler, F., Kosuch, J., Baran, Ī. and Seitz, A., 2003.** Paleoclimatic Changes Explain Anatolian Mountain Frog Evolution: A Test For Alternating Vicariance and Dispersal Event. *Molecular Ecology*, 12, 185-189.
- Verma, A., 2015.** Principles of Animal Taxonomy. Alpha Science International Ltd. Oxford, ISBN: 978-1842659441, 404 s.
- Vieites, D.R., Min, M.S. and Wake, D.B., 2007.** Rapid diversification and dispersal during periods of global warming by plethodontid salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19903-19907.
- Waples, R.S. and Do, C., 2008.** LdNe: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, 8, 753-756.
- Weber, J.L. and May, P.E., 1989.** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Werner, F., 1898.** Über einige neue Reptilien und einen neuen Frosch aus dem cilicischen Taurus. *Zoologischer Anzeiger*, 21, 217-223.
- Werner, F., 1902.** Die Reptilien und Amphibienfauna von Kleinasien. *Sitzungsberichte der Mathematischen und Naturwissenschaftlichen Klasse der Kaiserlichen Academie der Wissenschaften in Wien* 101, 1057–1121.
- Werner, F., 1904.** Ueber Reptilien und Batrachier aus West-Asien (Anatolien und Persien). *Zoologische Jahrbuecher*, 19, 329-345.
- Werner, F., 1914.** Zur Herpetologie Der Türkei. *Zoologischer Anzeiger*, 43, (11), 497-499.

- Widmer, A. and Lexer, C., 2001.** Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 267-269.
- Wiens, J.J., Engstrom, T.N., Chippindale and P.T., 2006.** Rapid diversification, incomplete isolation, and the 'speciation clock' in North American salamanders (genus *Plethodon*): testing the hybrid swarm hypothesis of rapid radiation. *Evolution*, 60, 2585-2603.
- Wilcox, T.P., Hugg, L., Zeh, J.A. and Zeh, D.W., 1997.** Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 208-216.
- Wilkinson, J.W., Beebee, T.J.C. and Griffiths, R.A., 2007.** Conservation genetics of an island toad: *Bufo bufo* in Jersey. *Herpetological Journal*, 17, 192-198.
- Wright, S., 1943.** Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114-138.
- Wright, S., 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics Journal*, 15, 323-354.
- Wright, S., 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395-420.
- Yıldız, M.Z., 2010.** Bolkar dağlarında (Niğde-Ulukışla) yaşayan *Rana holtzi* Werner, 1898 (Anura:Ranidae)'in populasyon dinamiği. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, 183 s.
- Yılmaz, İ., 1989.** Anadolu Amfibilerinin Yayılışı Üzerine bir Çalışma (Amphibia: Urodela, Anura). *Doğa Bilimleri Dergisi, Tübitak*, 13, 130-140.
- Zhan, A., Li, C. and Fu, J., 2009.** Big mountains but small barriers: population genetic structure of the Chinese wood frog (*Rana chensinensis*) in the Tsinling and Daba Mountain region of northern China. *BMC Genetics*, 10, 17.
- Zharkikh, A. and Li, W.H., 1992.** Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. Four taxa with a molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 1119-1147.
- Zhao, S., Dai, Q. and Fu, J., 2009.** Do rivers function as a genetic barriers for the plateau wood frog at high elevations? *Journal of Zoology*, 279, 270-276.
- Zhou, Y., Yang, B-T., Li, P-P., Min, M-S, Fong, J.J., Dong, B-J., Zhou, Z-Y. and Lu, Y-Y., 2015.** Molecular and Morphological Evidence for *Rana kunyuensis* as a Junior Synonym of *Rana coreana* (Anura: Ranidae). *Journal of Herpetology*, 49, (2), 302-307.
- Zhong, J., Liu, Z-Q. and Wang, Y-Q., 2008.** Phylogeography of the Rice Frog, *Fejervarya multistriata* (Anura: Ranidae), from China Based on mtDNA D-loop Sequences. *Zoological Science*, 25, 811-820.

## ÖZGEÇMİŞ

11.07.1986 tarihinde İstanbul Bakırköy’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bahçelievler Mevlana İlköğretim Okulunda tamamladıktan sonra Lise öğrenimini Fatih Vatan Anadolu Lisesinde tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Giresun Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve Ekim 2009’da Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2009 yılında Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne yatay geçiş yaptı. 2010-2011 Güz yarıyılı Erasmus programı kapsamında Torino Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. 2011 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı ve aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı. Halen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesinde Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir. İngilizce bilmektedir. Evli, bir çocuk annesidir.