

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE'DEKİ *Daphnia* CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERİN
FİLOCOĞRAFYASI**

Ebru ÖZDEMİR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE’DEKİ *Daphnia* CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERİN FİLOCOĞRAFYASI

Ebru ÖZDEMİR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ

Bu çalışmada, Türkiye’de bulunan bazı *Daphnia* türlerinin morfolojik ve moleküler sistematiklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve filocoğrafyalarının araştırılması amaçlanmıştır. Morfolojik sistematikte ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniklerinden faydalanılmıştır. Moleküler sistematik için mitokondriyal DNA’nın Sitokrom C oksidaz alt ünite I (COI) geni kullanılarak dizi analizi çalışması yapılmıştır. Populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmalar, COI geninin 540 baz çifti (bç) kısmı kullanılmak üzere, filogenetik analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Karşılaştırma olanağı sunmak için GenBank veri tabanından COI genine ait 26 dizi çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma sonucunda, morfolojik ve moleküler sistematik birbiriyle uyumlu bulunmamıştır. Morfolojik teşhis ile 5 türün (*D. cucullata*, *D. curvirostris*, *D. galeata*, *D. magna* ve *D. pulex*) varlığı tespit edilmiştir. Morfolojik taksonomi ile *Daphnia pulex* olarak tanımlanan tür, moleküler taksonomi ile Kimura-2-Parametresine göre %16,1 dizi farklılığı ile iki monofiletik gruba ayrılmış ve bunların aynı tür kompleksine ait farklı türler olabileceği düşünülmüştür. GenBank örnekleri ile değerlendirildiğinde *D. pulex TR1* olarak adlandırılan monofiletik grubun *D. pulex* Leydig, 1980 ile %99 benzerlik gösterdiği, *D. pulex TR2* olarak adlandırılan monofiletik grubun ise en yakın akrabasının %5,4 dizi farklılığı ile *D. tenobrosa* olduğu tespit edilmiştir. Populasyonlar arası genetik farklılaşma 0,90669 F_{ST} değeri ile en fazla *Daphnia pulex TR2* monofiletik grubuna ait bulunmuştur. Populasyonlar arası genetik farklılığın yüksek olması ve gen akışının olmaması, coğrafik bariyerlerden ziyade bölgesel adaptasyonla açıklanmıştır. Bu çalışma ile *Daphnia pulex* kompleksi içerisindeki isimlendirme ve sınıflandırma probleminin altı çizilmiş, detaylı morfolojik çalışmaların bu problemi çözmeye yardımcı olacağı ve biyocoğrafik yorumların önünü açacağı düşünülmüştür.

Ekim 2013, 131 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Daphnia*, Türkiye, mtDNA, COI, filocoğrafya, SEM

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PHYLOGEOGRAPHY OF SOME SPECIES BELONGING TO THE GENUS *Daphnia* IN TURKEY

Ebru ÖZDEMİR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ

In this study, comparative examination of morphological and molecular systematics of some *Daphnia* species found in Turkey and research of phylogeography of these species was aimed. Techniques of light microscope and scanning electron microscope (SEM) were utilized for morphological systematic. For molecular systematic, sequence analysis study was performed with using cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene of mitochondrial DNA. Genetic differentiation among populations was evaluated by phlogenetic analysis with using 540 base pair (bp) fragment of the COI gene. 26 sequence belonging to COI gene from GeneBank database were included in the study to enable comparison.

The results of morphological and molecular systematic studies were not found coherent. With the help of morphological diagnosis, five species (*D. cucullata*, *D. curvirostris*, *D. galeata*, *D. magna* ve *D. pulex*) were determined. Species identified as *Daphnia pulex* with morphological systematic, was divided into two monophyletic groups according to Kimura-2 Parameters with molecular systematic. Differentiation between these monophyletic groups was determined as 16,1%. Therefore there may be different species of same complex. When compared to the samples of GeneBank the monophyletic group called *Daphnia pulex* TR1 showed resemblance at the rate of 99% with *Daphnia pulex* Leydig, 1980. On the other hand, *Daphnia tenobrosa* was identified as the most close relative of the monophyletic group called *Daphnia pulex* TR2 with 5,4% discrepancy. The highest genetic differentiation was the monophyletic group of the *Daphnia pulex* TR2 with rate of 0,90669 F_{ST} . This rate of differentiation and the absence of gene flow were explained with regional adaptation rather than geographic barriers. This study underlined the problem of nomenclature and classification in *Daphnia pulex* complex. Also we thought that detailed morphological studies will help to solve this problem and lead to biogeographic interpretations.

October 2013, 131 page

Key Words: *Daphnia*, Turkey, mtDNA, COI, phylogeography, SEM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, tavsiye ve yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren, doktora eğitimim süresince manevi desteğini her an ve eksiksiz hissettiğim değerli hocam tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet ALTINDAĞ'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD); bu çalışmanın her aşamasında bana bilgi ve önerileri ile yol gösteren Tez İzleme Komitesi üyeleri, Prof. Dr. Sibel ATASAGUN (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD) ve Prof. Dr. Sedat YERLİ (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji ABD) hocalarıma; konu ile ilgili bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. İrfan KANDEMİR'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD); çalışmalarımın kritik aşamalarında çok büyük emekleri bulunan ve moleküler teknikler konusunda kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü); Elektron Mikroskobu Laboratuvarı'nın imkanlarını kullanmamıza olanak sağlayan Prof. Dr. Selami CANDAN'a (Gazi Üniversitesi Biyoloji ABD); filogenetik analizler konusunda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli arkadaşlarım Dr. Gül Olgun KARACAN (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD) ve Dr. Utku PERKTAŞ'a (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji ABD); örneklem aşamasındaki yardımlarından dolayı değerli arkadaşlarım Doç. Dr. Murat KAYA (Aksaray Üniversitesi Biyoloji ABD) ve Özge BUYURGAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD); çalışmalarım sırasında manevi desteğini her an ve eksiksiz hissettiğim sevgili arkadaşım Dr. Esra KOÇ'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji ABD) teşekkür ederim.

Her konuda beni yüreklendiren ve bugünlere gelmemde önemli payı olan, eğitim hayatım boyunca gösterdiği fedakarlıkları asla göz ardı edemeyeceğim canım annem Tacriye YOLAÇAN'a, bu zorlu süreçte beni yarı yolda bırakmak zorunda kalan canım babam Yaşar YOLAÇAN'a, sevgili kardeşim Fırat YOLAÇAN'a ve sevgili dayım Bülent ÖZER'e; çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, ilgi ve anlayışını benden esirgemeyerek beni her konuda destekleyen sevgili eşim Alpay ÖZDEMİR'e ve içimin gülen yüzü güzel oğlum Rüzgar ÖZDEMİR'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğü tarafından 09B4240009 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Ebru ÖZDEMİR
Ankara, Ekim 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Cladocera.....	4
2.1.1 <i>Daphnia</i> 'nın sistematikteki yeri	5
2.1.2 <i>Daphnia</i> 'nın morfolojik yapısı.....	5
2.1.3 <i>Daphnia</i> 'nın habitat seçimi.....	7
2.1.4 <i>Daphnia</i> cinsinde hareket ve metabolizma.....	7
2.1.5 <i>Daphnia</i> cinsinde yaşam döngüsü ve üreme	9
2.1.6 <i>Daphnia</i> cinsinde morfolojik varyasyon.....	10
2.2 Taksonomi.....	12
2.2.1 <i>Daphnia</i> cinsinde morfolojik teşhis bakımından önem taşıyan karakterler...12	
2.3 Genetik Belirteçler (Markör) ve Kullanım Alanları.....	13
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	14
2.5 DNA Dizi Analizi.....	17
2.6 Mitokondriyal DNA (mtDNA).....	19
2.7 Filogenetik Analiz.....	21
2.7.1 Dizi düzeltme ve hizalama.....	23
2.7.2 Filogenetik ağaç.....	23
2.7.2.1 Karakter temelli yöntemler.....	24
2.7.2.2 Mesafe temelli yöntemler.....	25
2.7.3 Moleküler evrim ve filogenetik analiz programları.....	25
2.8 Konuya İlişkin Çalışmalar.....	27
3. MATERYAL ve METOT.....	32

3.1 Arazi Çalışması ve Örneklem Yerleri.....	32
3.2 Morfolojik Çalışmalar.....	34
3.2.1 Işık mikroskobu ile tür tayini.....	34
3.2.2 Elektron mikroskobu ile tür tayini.....	35
3.3 Moleküler Çalışmalar.....	35
3.3.1 DNA izolasyonu.....	35
3.3.2 DNA'nın spektrofotometrik analizi.....	37
3.3.3 Gen bölgesinin çoğaltılması (PCR).....	37
3.3.4 Çoğaltılan gen bölgesinin jel elektroforezi.....	39
3.3.5 PCR ürününün saflaştırılması (Pürifikasyon).....	41
3.3.6 DNA dizi analizi.....	41
3.4 Dizilerin Düzeltilmesi, Hizalanması ve Filogenetik Analizler.....	43
4. BULGULAR.....	52
4.1 Morfolojik Tür Tayini Sonuçları.....	52
4.1.1 <i>Daphnia cucullata</i> Sars, 1862 tür teşhisi.....	53
4.1.2 <i>Daphnia curvirostris</i> Elyamann, 1887 tür teşhisi.....	54
4.1.3 <i>Daphnia galeata</i> Sars, 1864 tür teşhisi.....	58
4.1.4 <i>Daphnia magna</i> Straus, 1820 tür teşhisi.....	63
4.1.5 <i>Daphnia pulex</i> Leydig, 1860 tür teşhisi.....	69
4.2 COI Gen Bölgesi Dizi Analizi sonuçları.....	78
4.2.1 Filogenetik ağaç ve network analizleri.....	79
4.2.2 Populasyon yapısı ve genetik çeşitlilik analizleri.....	93
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	103
KAYNAKLAR.....	116
ÖZGEÇMİŞ	130

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
+	Artı
-	Eksi
π	Nükleotid değişikliği
°C	Santigrat derece
μ l	Mikro litre
2n	Diploid kromozom sayısı
n	Haploid kromozom sayısı
A	Adenin
ABI	Application Binary Interface
AIC	Akaike Information Criterion (Akaike Bilgi Kısıtası)
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
Bç	Baz çifti
BIC	Bayesian Information Criterion (Bayesian Bilgi Kısıtası)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı)
C	Sitozin
COI	Cytochrome C oksidase subunit I (Sitokrom C oksidaz alt ünitesi)
D	Fumio Tajima'nın D istatistiği
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı)
EST	Expressed Sequence Tags (İfade Dizisi Etiketleri)
F _s	Yun-Xin Fu'nun F _s istatistiği
F _{ST}	Populasyonlar arası fiksasyon indeksi
G	Guanin
GPS	Global Positioning System (Küresel Konumlama Sistemi)
GTR+G+I	Gama ve sabit parametrelili General Time Reverseble model
HCl	Hidroklorik asit

Km	Kilometre
K2P	Kimura 2 Parametresi
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MgCl ₂	Magnezyum klorür
Mg	Mili gram
ml	Mili litre
mM	Mili molar
ML	Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık)
MP	Maximum Parsimony (Maksimum Tutumluluk)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
N	Birey sayısı
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
ND2	Nicotinamide adenine dinücleotide dehydrogenase complex subunit 2 (Nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz kompleksi alt ünite 2)
ND5	Nicotinamide adenine dinücleotide dehydrogenase complex subunit 5 (Nikotinamid adenin dinükleotit dehidrogenaz kompleksi alt ünite 5)
ng	Nano gram
NJ	Neighbour Joining (Komşu Birleştirme)
N _m	Gen Akışı
nm	Nano mol
pH	Asit baz derecesi
pmol	Pika mol
PCR	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RFLP	Restriction Fragment of Length Polymorphism (Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Çok Biçimli DNA)
Rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
STR	Short Tandem Repeat (Kısa Bitişik Tekrarlar)
T	Timin

TBE	Trisma base etilen diamin tetra asetik asit
TBR	Tree-bisection-reconnection (Ağaç-bölme-yeniden bağlanma)
tRNA	Transfer ribonükleik asit
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Ortalamalara Bağlı Ağırlıksız Çift Grup Metodu)
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Daphnia</i> 'nın genel vücut yapısı.....	6
Şekil 2.2 <i>Daphnia</i> 'nın yaşam döngüsü.....	10
Şekil 2.3 <i>Daphnia</i> türlerinde görülen morfolojik varyasyonlar.....	11
Şekil 2.4 Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları.....	15
Şekil 2.5 Polimeraz zincir reaksiyonlarında üssel çoğalma.....	16
Şekil 2.6 Dizi analizi sonucu oluşan piklerin görüntüsü (elektroferogram).....	18
Şekil 2.7 Mitokondriyal DNA'nın yapısı ve içerdiği gen bölgeleri	20
Şekil 2.8 Filogenetik analizlerde kullanılan programlar şeması.....	22
Şekil 3.1 Türkiye'den toplanan <i>Daphnia</i> türlerine ait örneklem lokaliteleri.....	33
Şekil 3.2 Çalışılan populasyonlara ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.....	40
Şekil 3.3 Moleküler çalışmalarda kullanılan analiz programları ve kullanım sırası.....	45
Şekil 4.1 Sakarya/Acarlar Gölü <i>Daphnia curvirostris</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	56
Şekil 4.2 Sinop/Aklıman mevkii <i>Daphnia curvirostris</i> populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı.....	57
Şekil 4.3 Afyon/Gebeceler Baraj Göleti <i>Daphnia galeata</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	60
Şekil 4.4 İzmir/Gölcük Gölü <i>Daphnia galeata</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	61
Şekil 4.5 Urfa/Atatürk Baraj Gölü <i>Daphnia galeata</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	62
Şekil 4.6 Manisa/Demirköprü Baraj Gölü <i>Daphnia magna</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	65
Şekil 4.7 Aksaray/Mamasın Baraj Gölü <i>Daphnia magna</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	66

Şekil 4.8 Ankara/Eymir Gölü <i>Daphnia magna</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	67
Şekil 4.9 Ankara/Mogan Gölü <i>Daphnia magna</i> populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı.....	68
Şekil 4.10 Edirne/İpsala mevki <i>Daphnia magna</i> populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı.....	69
Şekil 4.11 Kars/Yeşil Göl <i>Daphnia pulex</i> örneklerinde gözlenen siklomorfozis.....	70
Şekil 4.12 Ardahan/Kındırğa sazlığı <i>Daphnia pulex</i> populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı.....	72
Şekil 4.13 Kars/Yeşil Göl <i>Daphnia pulex</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı	73
Şekil 4.14 Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü <i>Daphnia pulex</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	74
Şekil 4.15 Bolu/Yeniçağa Gölü <i>Daphnia pulex</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı	75
Şekil 4.16 Rize/Verçenik Kuzey Dağ Gölü <i>Daphnia pulex</i> populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı.....	76
Şekil 4.17 Rize/Verçenik Güney Dağ Gölü <i>Daphnia pulex</i> populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı.....	77
Şekil 4.18 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan neighbour joining (NJ) ağacı.....	83
Şekil 4.19 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan maximum parsimony (MP) ağacı.....	84
Şekil 4.20 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan maximum likelihood (ML) ağacı.....	85
Şekil 4.21 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan Bayesian ağacı.....	86
Şekil 4.22 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank populasyonları için oluşturulan neighbour joining (NJ) ağacı.....	87
Şekil 4.23 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank populasyonları için oluşturulan maximum parsimony (MP) ağacı.....	88

Şekil 4.24 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank populasyonları için oluşturulan maximum likelihood (ML) ağacı.....	89
Şekil 4.25 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank populasyonları için oluşturulan Bayesian ağacı.....	90
Şekil 4.26 Türkiye örneklerinin COI gen bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan network analizi.....	91
Şekil 4.27 Türkiye ve GenBank örneklerinin COI gen bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan network analizi.....	92
Şekil 4.28 <i>Daphnia cucullata</i> populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	99
Şekil 4.29 <i>Daphnia curvirostris</i> populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	99
Şekil 4.30 <i>Daphnia galeata</i> populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	100
Şekil 4.31 <i>Daphnia magna</i> populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	100
Şekil 4.32 <i>Daphnia pulex</i> TR1 populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	101
Şekil 4.33 <i>Daphnia pulex</i> TR2 populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	101
Şekil 4.34 <i>Daphnia magna</i> için coğrafik mesafe ile genetik mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren Mantel test grafiği.....	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Örneklerin toplandığı lokaliteler ve koordinatları	32
Çizelge 3.2 COI gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan primer çifti.....	37
Çizelge 3.3 PCR’da kullanılan reaktifler ve konsantrasyonları.....	38
Çizelge 3.4 COI gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan I. PCR programı.....	38
Çizelge 3.5 COI gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan II. PCR programı.....	39
Çizelge 3.6 Sekans PCR protokolü.....	41
Çizelge 3.7 Analizlerde kullanılan tez çalışmasına ait örnekler, örnek kodları ve lokaliteleri.....	46
Çizelge 3.8 GenBank’den alınan örnekler, GenBank numaraları ve alındıkları lokaliteler.....	50
Çizelge 3.9 GenBank’den alınan dış grup örneklerinin, GenBank numaraları ve alındıkları lokaliteler.....	51
Çizelge 4.1 Lokalitelere göre teşhis edilen türler.....	52
Çizelge 4.2 <i>Daphnia</i> türlerine ait konsensus dizilerin baz uzunlukları.....	78
Çizelge 4.3 Haplotiplerin populasyonlara dağılımı	79
Çizelge 4.4 GenBank’den alınan örnekler ve haplotip numaraları.....	81
Çizelge 4.5 Monofiletik grupların COI gen bölgesine ait nükleotit kompozisyonları.....	93
Çizelge 4.6 COI gen bölgesinin tür komplekslerine göre korunmuşluk oranları.....	93
Çizelge 4.7 COI gen bölgesinin monofiletik gruplara göre korunmuşluk oranları.....	94
Çizelge 4.8 Nükleotitler arasındaki transisyon ve transversiyon değişim oranları.....	94
Çizelge 4.9 Monofiletik grupların haplotip çeşitliliği ve nükleotit değişiklikleri.....	95

Çizelge 4.10 K2P modeli kullanılarak COI gen bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan monofiletik grup populasyonları arasındaki mesafe değerleri.....	95
Çizelge 4.11 K2P modeli kullanılarak COI gen bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan monofiletik gruplar arasındaki genetik mesafe matrisi.....	96
Çizelge 4.12 Monofiletik gruplar için yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	96
Çizelge 4.13 Moleküler varyans analizi (AMOVA) ile belirlenmiş monofiletik gruplar içerisinde yer alan populasyonlara ait F_{ST} değerleri.....	97
Çizelge 4.14 Populasyonlar arası ikili F_{ST} değerlerine bağlı olarak hesaplanan gen akışı değerleri	97
Çizelge 4.15 Populasyonlara ait Tajima'nın D ve Fu'nun F_s değerleri.....	98

1. GİRİŞ

Cladocera, Copepoda ve Rotifera gibi zooplanktonik organizmalar, yavru balıkların doğrudan ve bunları tüketen diğer hayvanların da dolaylı olarak besin gereksinimlerini sağlayarak sucul ekosistemde besin zincirinin önemli halkalarından birini oluştururlar (Cirik ve Gökpınar 1993). Çoğu Copepoda türü uzun üreme aralığına sahipken Cladocera ve Rotifera partenogenetik üreme özellikleri sayesinde uygun ortam koşullarında hızlı bir şekilde populasyon artışı göstermektedirler (Kang vd. 2006). Bu nedenle Cladocera türleri (özellikle *Daphnia* ve *Moina* cinsleri) tatlı su balıklarının larva üretiminde başarıyla kullanılabilir (Hoff ve Snell 1989). Sucul ekosistemdeki besin zincirinin önemli bir halkasını oluşturmanın yanı sıra yetiştiricilikte canlı yem organizması olarak da önem taşıyan Cladocera doğal tatlı su ortamlarında biyokütle bakımından baskın bir taksondur.

Daphnia cinsi, Cladocera içerisinde yer alan en zengin cinslerden bir tanesidir (Benzie 2005). Dünya iç sularında 400'den fazla tür, Cladocera içerisinde bulunmaktadır (Segers ve Martens 2005) ve bunlardan 74 tanesi *Daphnia* cinsine aittir. Türkiye'de ise Cladocera içerisinde yer alan 93 tane tür bulunmaktadır ve bunlardan 14'ü *Daphnia* cinsine aittir (Ustaoglu 2004, Yalim ve Cıplak 2005).

Daphnia türleri döngüsel partenogenetik üremeleri ve ortam koşulları bozulduğu zaman dirençli dormant seksüel yumurtalar meydana getirip, bunlarla dağılım gösterebilmeleri ile karakterize edilirler (De Meester 1996). Dağılım kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle, *Daphnia* cinsi populasyon genetiği çalışmalarının merkezinde yer almıştır (Crease 1999, Penton vd. 2004, De Galas vd. 2005, Ishida vd. 2006, Markova vd. 2007, Mergeay vd. 2008). Bilim adamlarının bu cins üzerine yoğunlaşmalarının en önemli nedenlerinden birisi de, çok sayıda hibrit türün mevcut olması (Benzie 2005) ve tür ayrımının morfolojik olarak bazı gruplarda yapılamıyor olmasıdır.

Darwin'ın tatlı su kladoserlerinin kozmopolit dağılımı ve morfolojik benzerlikleri üzerine yapmış olduğu gözlemleri takiben, evrimsel tarih ve biyocoğrafik örnekleme üzerine odaklanılmıştır (Penton vd. 2004). Allozim ve mitokondriyal DNA çalışmaları,

taksonomik çalışmalara yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Tür ilişkilerini değerlendirmede, filogenetik analizler morfolojik çalışmalardan daha etkili (Adamowicz vd. 2009) olduğu için, son zamanlarda yapılan çalışmalar, morfolojik taksonomiden kaynaklanan problemlerin moleküler düzeyde yapılan çalışmalarla çözülmesi ve türlerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi yönündedir.

Yüksek genetik çözümlemeye ihtiyaç duyan araştırmalarda ya da çok az miktarda dokunun mevcut olduğu durumlarda, populasyon genetiği analizleri için polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı teknikler tercih edilmektedir (Schierwater vd. 1994). Bu teknikler, mitokondriyal DNA'nın çoğaltılmasını, ardından dizileme olayını ya da uzunluk polimorfizm analizini (RFLP) ve çekirdek DNA'sının çoğaltılmasını içermektedir (Arnheim vd. 1990, Avise 1994, Schwenk vd. 1998).

Mitokondriyal DNA'nın evrim hızı çekirdek DNA'sına oranla 10-20 kat daha fazladır. Bu nedenle türlerin akrabalık ilişkilerini belirlemek için yapılan filogenetik çalışmalarda mitokondriyal DNA dizileri daha sık kullanılmaktadır. Bu amaçla mitokondriyal DNA'nın türler arasında en çok korunduğu bilinen gen bölgelerinin dizisi çıkarılmaktadır. Mitokondrial genom 37 gen bölgesi içerir. Bunlardan 13'ü solunum zincirindeki yapısal proteinleri kodlarken, 2'si rRNA ve 22'si de tRNA genlerini kodlar. Dünyada Amerika, Avrupa, Avustralya ve Asya'da Cladocera türleri üzerine yapılmış çok sayıda moleküler çalışma bulunmaktadır (De Galas vd. 2005, Colbourne vd. 2006, De Waard vd. 2006, Ishida vd. 2006, Durbin vd. 2008, Jeffery vd. 2010, Duggan vd. 2012, Zuykova vd. 2013). Fakat zooplanktonik organizmalar üzerine Türkiye'de herhangi bir çalışma yapılmamıştır ve bu çalışma, alanda bir ilk olması bakımından önemlidir.

Asya ve Avrupa arasında köprü konumunda olan Türkiye'nin mevcut Cladocera türleri üzerine yapılacak çalışmaların, bu iki kıta arasında gen akışının açıklanmasında oldukça önemli bir kaynak niteliğinde olacağı düşünülmüştür.

Moleküler belirteçler kullanılarak zooplanktonik organizmalar üzerinde yapılan bazı çalışmalar ile kompleks gruplar içerisinde yer alan bazı türlerin yeni tür olduğu ortaya

konmuştur (Ishida vd. 2006, Penton vd. 2004, Juracka vd. 2010, Kotov ve Taylor 2010). Zooplanktonik organizmalarda gözlenen bu türleşmelerin sebebinin genetik bariyerler (örneğin sıra dağlar, barajlar ve uzaklık gibi) olduğu, diğer taraftan herhangi bir bariyer olmaksızın da planktonik organizmalarda türleşmenin mümkün olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Taylor vd. 1998, Gomez vd. 2000, Hebert vd. 2003).

Bu tez çalışmasında da, Türkiye'nin 7 farklı bölgesinde yapılan örneklemelerle 22 lokaliteden elde edilen *Daphnia* cinsine ait bazı türler morfolojik ve moleküler düzeyde incelenmiş, omurgasızlar için filogenetik ilişkileri iyi açıkladığı bilinen COI (Sitokrom C Oksidaz I) gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasını takiben DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan bu çalışma ile,

- Türkiye'de bulunan bazı *Daphnia* türlerinin morfolojik ve moleküler sistematiklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi;
- Eğer varsa gizli türleşmelerin ortaya çıkarılması;
- Çalışmada incelenecek örnekler Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanacağı için ülke genelinde varsa gen akışına bariyer teşkil eden etkenlerin ortaya çıkarılması;
- Gen akışına engel teşkil eden bir neden yokken bile moleküler düzeyde bir farklılaşma varsa bunun nedenlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Cladocera

Zooplanktonik organizmaların önemli bir kısmını oluşturan Cladocera, oldukça küçük, çoğunlukla mikroskobik hayvanların oluşturduğu bir taksondur (Demirsoy 2002). Büyüklükleri 0,5 mm ile 6 mm arasında değişir (Ebert 2005).

Cladocera, Copepoda ve Rotifera gibi zooplanktonik organizmalar, yavru balıkların doğrudan ve bunları tüketen diğer hayvanların da dolaylı olarak besin gereksinimlerini sağlayarak sucul ekosistemde besin zincirinin önemli halkalarından birini oluştururlar (Cirik ve Gökpınar 1993).

Cladocera içerisinde beslenme adaptasyonuna bağlı olarak iki hattın evrimleştiği görülür. Podonidae, Polyphemidae ve Leptodoridae familyalarının yer aldığı grupta, bacaklar yakalayıcı tipte olup predatör olarak beslenirler. Daphniidae, Chydoridae, Macrothricidae, Bosminidae ve Moinidae familyalarının olduğu grupta ise organizmalar, su içerisinde süzdükleri alglerle, detritusla ya da sucul bitkiler üzerinde bulunan alglerle beslenmeye uyum sağlamışlardır (Scourfield ve Harding 1966).

Cladocera'ya ait türlerin büyük bir çoğunluğu tatlı sularda yayılış gösterir. Sadece birkaç türü denizeldir. Tatlı sularda yaşayan türler genellikle planktonik olup göllerin limnetik bölgelerinde bulunurlar. Bunun yanı sıra gölcüklerde, küçük su birikintilerinde, akarsuların durgun zonlarında, tuzlu göllerde, acısu ortamlarında yayılış gösteren türler de vardır. Bazı türler ise su sistemlerinin bentik bölgelerinde yaşamaya uyum sağlamışlardır (Demirsoy 2002).

Cladocera zooplanktonik populasyonlarında kış ve yaz aylarında populasyon sayısında azalma gözlenirken, sıcaklığın ve fotosentez oranının arttığı ilkbahar aylarında ve su kütlesinin iyi karıştığı sonbahar aylarında populasyon sayısında artış gözlenir (Cirik ve Cirik 2005).

2.1.1 *Daphnia*'nın sistematikteki yeri

Phylum	: Arthropoda
Subphylum	: Crustacea
Classis	: Branchiopoda
Subclassis	: Phyllopoda
Ordo	: Diplostraca
Subordo	: Cladocera
Infraordo	: Anomopoda
Familia	: Daphniidae
Genus	: <i>Daphnia</i>

Dünya iç sularında 74 *Daphnia* türü bulunmaktadır (Benzie 2005). Bunlardan 14 tanesinin (*Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Daphnia ulomskyi*, *Daphnia carinata*, *Daphnia cucullata*, *Daphnia curvirostris*, *Daphnia galeata*, *Daphnia hyalina*, *Daphnia longispina*, *Daphnia obtusa*, *Daphnia parvula*, *Daphnia pulex* ve *Daphnia pulicaria*) Türkiye iç sularında bulunduğu kaydedilmiştir (Ustaoglu 2004, Yalim ve Çıplak 2005).

2.1.2 *Daphnia*'nın morfolojik yapısı

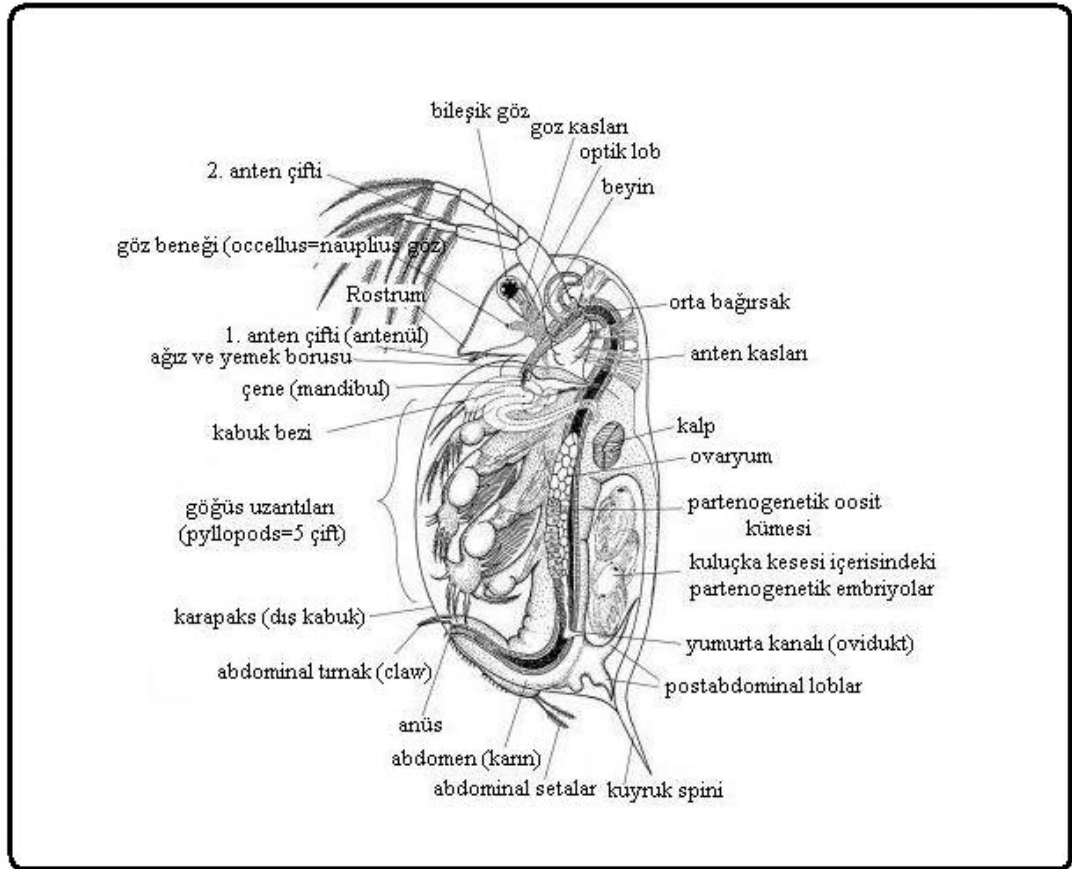
Daphnia (su pireleri) genellikle tatlı sularda yaşayan 0,2–3 mm boyunda olan, yüksek oranda protein ve temel yağ asitleri içeren bir tatlı su kabuklusudur. Besin değeri yaşa ve türe göre değişmekle birlikte kuru ağırlığının ortalama %50'sini protein oluşturur. Bu özellikleri nedeniyle balıklar için kaliteli ve besleyici bir yem teşkil ederler (Akyıldız 1992, Cirik ve Gökpınar 1993, Alpbaz, 1993).

Daphnia'da vücut, yüksek oranda kitin ve polisakkarit içeren karapaks adı verilen çift duvarlı bir kabuk ile örtülüdür (Ebert 2005). Karapaks, sırt tarafında midye kabuğu gibi birleşmiş, karın kısmında ise açıktır. İki karapaksın arasında bulunan ve vücut uzantılarını taşıyan kısım, abdomen (karın) ve thorax (göğüs) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Vücut yanlardan basık olup, arka kısmında genellikle mevsime göre uzayıp kısalabilen kuyruk şeklinde ve üzeri dişli bir diken (kuyruk spini) bulunmaktadır (Edmondson 1959, Erençin ve Köksal 1981, Alpbaz 1993).

Baş genellikle ventral tarafa ve kısmen geriye doğru uzayarak bir gaga (rostrum) şeklini almıştır. Baş kısmında antenül, bir çift anten, ağız, ışığa duyarlı büyük bileşik bir göz ve göz beneği (ocellus) bulunmaktadır. Gözün önündeki kısım vertex adını almakta ve üç kas yardımıyla her tarafa dönebilme yeteneğindedir (Demirsoy 1998).

Daphnia'lar suya karşı koyabilme ve suyu filtre edebilme özelliğine sahip yaprak şeklinde yassılaştırmış bacakları ile karakterize edilirler (Ebert 2005). Yassılaştırmış, uçları çatallı 5 çift bacağına sahiptirler.

Vücut postabdomen ile sonlanır. Postabdomen loblu bir yapıya sahiptir. Postabdomen bir çift tırnak (claw) taşır. Bu tırnaklar üç grup tarağa (comb) sahiptir. Postabdomendeki lobların sayısı ve yapısı, tırnaktaki tarakların büyüklüğü, gruplaşması ve taraktaki dişlerin sayısı taksonomik açıdan çok önemli ayırt edici karakterlerdir (Benzie 2005). *Daphnia*'nın genel vücut yapısı ve kısımları şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 *Daphnia*'nın genel vücut yapısı (Ebert 2005)

Dişi ve erkek bireyler genel olarak birbirlerine benzemek suretiyle, erkek bireyler daha küçük vücutlu olmaları, daha büyük antenüllere sahip olmaları, değişikliğe uğramış postabdomen yapıları ve daha köşeli bir vücut yapısına sahip olmaları ile dişilerden kolaylıkla ayırt edilebilirler (Benzie 2005, Ebert 2005).

2.1.3 *Daphnia*'nın habitat seçimi

Daphniidae familyasına ait olan türler çok geniş bir alana yayılmış olup, kuzey ve güney yarım kürede bulunan göller, nehirler, havuzlar ve geçici su birikintileri gibi ortamlarda yaşamaktadırlar. Sığ ve vejetasyonu zengin olan göllerde daha fazla tür bulunmaktadır. Bu canlılar genellikle littoral kesimde bulunurlar (Erençin ve Köksal 1981). Bu familyanın üyeleri organik maddelerin dekompozisasyona uğradığı sularda çok yüksek miktarda bulunabilmektedir. Özellikle büyüme koşullarının optimum olduğu periyotlarda geçici sularda sayıları oldukça fazla olabilmektedir (Cirik ve Gökpınar 1993). Genel olarak su birikintilerinde su sıcaklığının 15-22°C arasında olduğu ortamlarda iyi üremektedirler. *Daphnia*'lar günlük ve yıllık sıcaklık değişimlerine karşı oldukça toleranslıdır. En uygun gelişme sıcaklıkları ise 24-25°C olarak kaydedilmiştir (Alpbaz 1993, Cirik ve Gökpınar, 1993). *Daphnia* habitatlarının su kalitesi çok değişkenlik gösterebilmektedir. Çoğu tür için pH 6,5 ile 9,5 aralığındadır, ancak optimum pH 7,2-8,5 olarak kabul edilmektedir. Tuzluluğun genellikle %5'in altında olduğu habitatlarda iyi gelişim gösterirler. Ancak bu durum türlere göre değişmekle birlikte bazı türlerin tuzluluğa toleransı yüksek olup %20 tuzlulukta yaşayabilmektedirler (Ebert 2005).

2.1.4 *Daphnia* cinsinde hareket ve metabolizma

Daphnia'lar güçlü ikinci antenleriyle yüzmektedir. Hareketleri çoğunlukla düşey olarak inip çıkma şeklinde olmaktadır. Bazılarında düzenli bir yüzme mevcuttur. Pek azı anten kılımlarıyla su filmine asılmaktadır. Su içinde her türlü hareketi sağlayan bu antenler, *Daphnia* hızla aşağı doğru inerken yanlardan arkaya doğru uzanmaktadır. Yavaş yavaş yukarı çıktığında ise açılarak bir kavisle vücuda yaklaşmaktadır. *Daphnia* kendini yukarı çekmek için antenlerini bir kürek gibi kullanmaktadır. Genel olarak yüzme tipi

bu antenlerin büyüklüğüne, uzunluğuna, sahip olduğu uzantıların sayısına ve anten kaslarının büyüklüğüne bağlıdır (Edmondson 1959, Demirsoy 1998).

Daphnia suyu filtre ederek beslenme özelliğine sahiptir. Yaprak bacak şeklindeki bacaklar suda fırlatılmak suretiyle suda önden arkaya doğru bir akıntı oluşturulur ve suda asılı halde bulunan partiküller bu bacaklardaki özel uzantılar sayesinde tutularak bacaklar arasında yer alan ventral besin oluklarında süzülür. Burada besin ağız salgısı ile karşılaşır, öğütülmek üzere maksiller tarafından mandibullar arasına itilir (Wetzel 1975). Sindirim sistemi ağızla başlar. Ağızın gerisinde bir çift küçük ve küt mandibul bulunur. Basit yapıdaki sindirim sistemi kısa bir özofagus ile orta bağırsağa açılır. Uzun sindirim borusu vücut sekline uygun kıvrımlar yaparak kısa olan son bağırsağa ulaşır ve son segmentte anüsle dışarı açılır (Demirsoy 1998).

Daphnia, protozoa, bakteri, ölü materyal ve detritusu içine alan nanoplankton ile beslenme özelliğine sahiptir. Ancak temel besin kaynağı fitoplanktondur. *Scenedesmus* ve *Chlamydomonas* türü yeşil alglerin en önemli besin kaynakları olduğu yapılan laboratuvar çalışmaları ile kaydedilmiştir (Benzie 2005, Ebert 2005).

Normalde şeffaf bir görüntüye sahip olan *Daphnia*'da renk, bağırsağın dolu ve boş olmasına göre değişiklik göstermektedir. İyi beslenmiş bir *Daphnia* aç olan *Daphnia*'ya göre daha koyu renklidir. Bu renk besin çeşidine göre değişiklik gösterir. Örneğin hayvan yeşil alg ile beslenmişse sarı ya da yeşil, bakteri ile beslenmişse pembemsi bir renge sahip olur (Ebert 2005).

Cladocera üyelerinde karapaksın iç duvarı ve ayaklar gaz değişiminde rol oynayarak solunumu sağlarlar. Karapaksın ön ucunda bulunan yassı bir organ olan maksillar (kabuk bezi) boşaltım ve osmoregülasyonda görevlidir (Edmondson 1959).

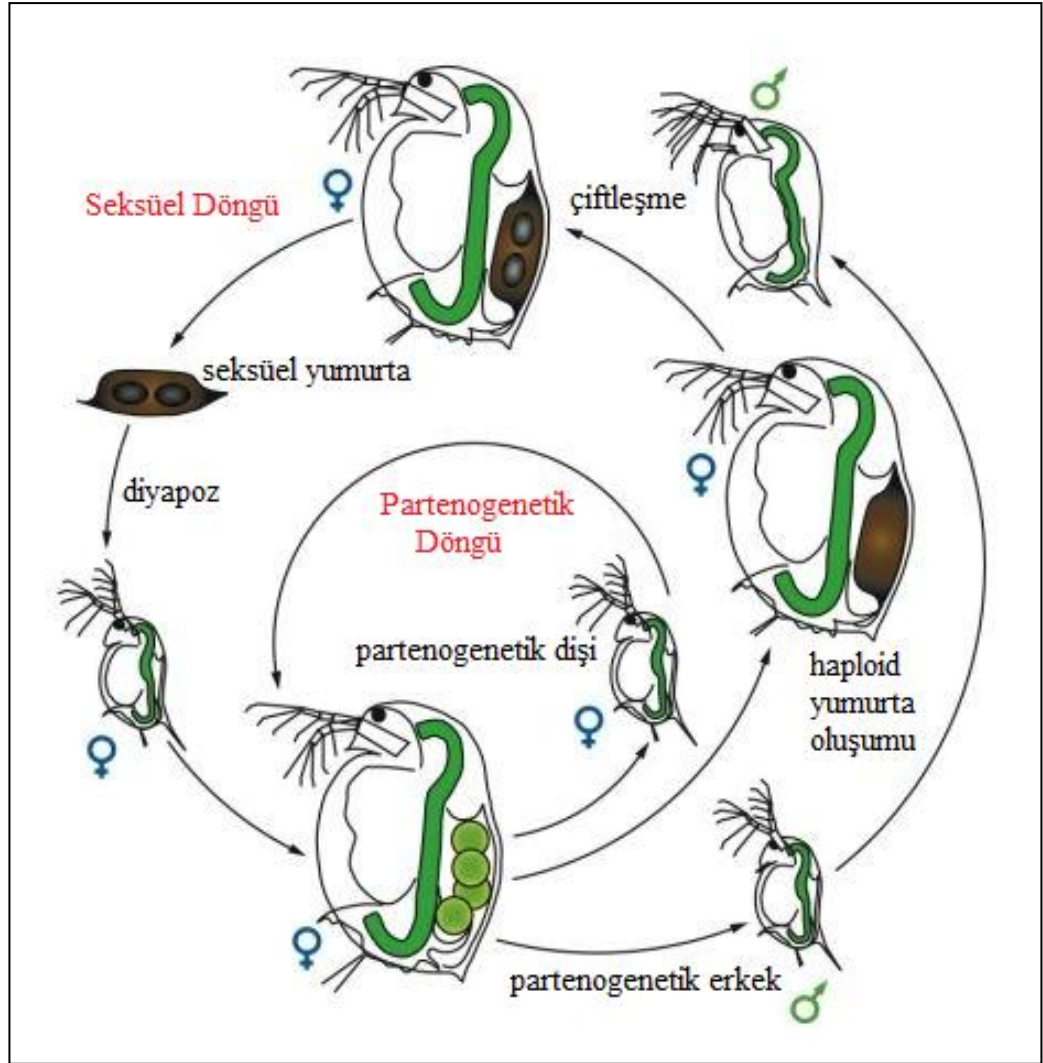
Başın hemen gerisinde, sırt kısmında bulunan kalp, bir çift ostiyuma sahip oval ya da uzunca bir kese şeklindedir. Genelde renksiz olan kan, çok iyi beslenmiş olanlarda kırmızıdır ve bundan dolayı bu canlılarda tüm vücut kırmızı görünmektedir (Edmondson 1959, Demirsoy 1998). 20°C Sıcaklıkta dakikada 200 kez atan kalp, daha düşük sıcaklıklarda yavaş atmaktadır (Ebert 2005).

Sinir sistemi, beyin ve karın gangliyon zincirinden oluşmaktadır (Ebert 2005).

2.1.5 *Daphnia* cinsinde yaşam döngüsü ve üreme

Daphnia'da üreme, seksüel ve aseksüel fazları içermektedir. Optimal koşullarda *Daphnia*, her 2,5–3 günde bir yumurta verip, bir dişi yaşamı boyunca 25 yeni yumurtlama dönemine girebilmektedir. *Daphnia*'nın üremesi genellikle partenogenetik yolla gerçekleşir. Dişi bireylerde orta bağırsağın iki yanında yer alan bir çift ovaryum bulunmaktadır. Yumurtalar vücudun dorsali ile karapaks arasındaki geniş boşlukta gelişir ve ovaryum içerisinde dörtlü gruplar oluşturur. Bunlardan sadece bir tanesi verimli olmakta ve diğerleri gelişme için besin ortamı oluşturmaktadır. Ufak ve ince kabuklu olan bu yumurtalara yaz yumurtası denir. Bu yumurtalar döllenmeden gelişim göstermektedirler (Alpbaz vd. 1992).

Aseksüel olan klon ($2n$) döllenme olmaksızın, hem erkek (n) hem diploid dişi ($2n$) hem de erkek tarafından döllenmeye ihtiyaç duyan haploid yumurta taşıyan dişi birey (n) üretebilme özelliğine sahiptir. Ortam koşulları normal olduğu zaman partenogenez yoluyla diploid ana dişiden diploid yavru dişiler oluşurken, popülasyon artışının bir sonucu olarak besin miktarında azalma ve rekabette artış gözlenmesi veya su sıcaklığındaki değişim durumunda dişi bireyden, erkek bireyler ve haploid yumurta taşıyan dişi bireyler oluşmaktadır (Şekil 2.2). Oluşan erkek bireyler (n) ile dişi bireyler (n) seksüel üreme ile kış yumurtalarını oluştururlar. Çiftleşme sonucunda oluşan epifiyum içerisindeki bu yumurtalar (resting eggs=seksüel yumurtalar) kötü ortam koşullarına karşı direnç sağlar. Ortam koşulları normale döndüğünde epifiyum ana canlıdan koparak ayrılır ve içerisindeki yumurtalar ($2n$) serbest kalır. Epifiyum yüksek oranda melanize olmuş bir yapıya sahip olup, genellikle 2 yumurta taşımaktadır. Bu yumurtalardan partenogenetik yolla üreyen diploid dişiler meydana gelir (Lavens ve Sorgeloos, 1996, Benzie 2005, Ebert 2005). Büyük göllerde genellikle sabit bir popülasyon yapısı varken, yani sadece partenogenezle çoğalma gözlenirken, havuz ve geçici su kütlelerinde seksüel üreme ile seksüel yumurta oluşumu daha fazla gözlenir (Ebert 2005).

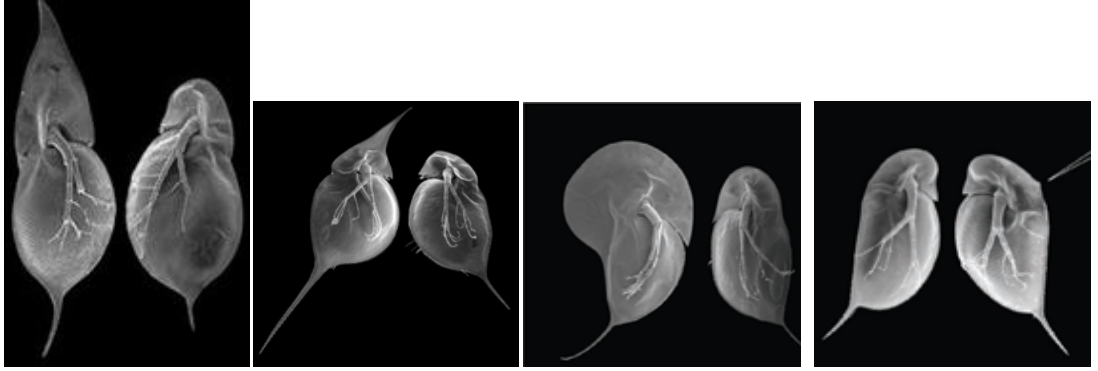


Şekil 2.2 *Daphnia*'nın yaşam döngüsü (Ebert 2005)

2.1.6 *Daphnia* cinsinde morfolojik varyasyon

Daphnia'da vücut büyüklüğü ve diğer morfolojik karakterler çevresel faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Morfolojideki bu değişiklikler "siklomorfozis" olarak adlandırılmaktadır. Siklomorfozise neden olan faktörler, fotoperiyot, sıcaklık, türbülans, besin miktarı-kalitesi ve predasyon olarak belirtilmiştir. Bir ya da daha fazla karakterdeki bu mevsimsel değişiklikler, *Daphnia ambigua*, *Daphnia cucullata*, *Daphnia cristata*, *Daphnia galeata*, *Daphnia hyalina*, *Daphnia pulex*, *Daphnia retrocurva*, *Daphnia carinata*, *Daphnia cephalata* ve *Daphnia lumholtzi* olmak üzere birçok türde tanımlanmıştır.

Türe bağılı olarak siklomorfozis şekli değişiklik göstermektedir (Şekil 2.3) (Agrawal vd. 1999, Agrawal 2001, Ebert 2011). Örneğin, *Daphnia middendorffiana*'da Kopepod, *Daphnia lumholtzi*'de balık predasyonuna karşı uzun kuyruk spini oluşumu gözlenmiştir. *Chaborus* larvalarının olduğu durumlarda *Daphnia galeata* ve *Daphnia retrocurva*'da başta miğfer şeklinde bir yapı oluşurken *Daphnia pulex* 'de boyun dişi (neck teeth) adı verilen başın dorsal alt kısmında çentik oluşumu kaydedilmiştir (Benzie 2005).



Şekil 2.3 *Daphnia* türlerinde görülen morfolojik varyasyonlar (Agrawal vd. 1999, Agrawal 2001, Ebert 2011)

Genellikle transparan bir görüntüye sahip olan *Daphnia*, yüksek derecede UV (ultraviyole) radyasyonuna maruz kaldığında melanin pigmentinin vücuttaki oranı artar ve canlı daha koyu kahverengi bir renge sahip olur. Bu pigment sayesinde canlı, güneşin zararlı ışınlarından korunur (Ebert 2005).

2.2 Taksonomi

Taksonomi, canlıların benzerlik, akrabalık ya da köken ilişkisiyle sınıflandırılması olarak tanımlanır. Bugüne kadar kullanılan morfolojik karakterlere dayalı taksonominin yanı sıra, moleküler genetiğin gelişmesiyle canlıların genetik yapılarından yola çıkılarak yapılan taksonomi çalışmalarıyla da evrimsel sürece dair çok önemli bilgiler elde edilmektedir (Qi vd. 2007).

Morfolojik taksonomi çalışmalarının iki önemli aşaması bulunur. Bunlardan birincisi teşhistir. Teşhis yapılırken örnekler daha önceden taksonomide yerleri belirlenmiş bireylerle karşılaştırılarak taksonomik açıdan anlam taşıyan karakterleri açısından değerlendirilir. İkinci aşama ise sınıflandırmadır. Sınıflandırmada taksonomik gruplar çeşitli özellikleri bakımından birbirleriyle karşılaştırılarak düzenlenir.

Canlıların taksonomik yerlerinin kesin olarak belirlenebilmesi için kimi zaman değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmamaktadır. Ayrıca canlıların yaşadıkları farklı habitatlar da morfolojik varyasyona neden olacağından, aynı türlere ait bireyler morfolojik ve anatomik olarak birbirinden farklılıklar gösterebilirler. Taksonomik çalışmalarda bizi genetik yapıdan faydalanmaya iten en önemli neden genotipin fenotipten daha üstün, kararlı bir yapıya sahip olmasıdır. Bir karakteri birden fazla lokusun belirlemesi, bir genin birden fazla karakteri etkilemesi ve genotip-çevre etkileşimi gibi ilişkiler, morfoloji yoluyla elde edilen bilgilerin tek başına yeterli olmasını engellemektedir (Klug ve Cummings 2000). Bu sebeple günümüzde taksonomi ve filogeni çalışmalarında DNA'yı, özellikle de mitokondriyal DNA'yı hedef alan moleküler teknikler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.1 *Daphnia* cinsinde morfolojik teşhis bakımından önem taşıyan karakterler

Daphnia türlerinde morfolojik teşhis bakımından önem taşıyan karakterler Benzie (2005)'e göre aşağıdaki gibi tanımlanmıştır:

- Vücut büyüklüğü
- Kuyruk spininin karapaksa oranı
- Karapaksin yandan görünüşü, dorsal ve ventral kenarın şekli
- Baş yapısı ve karapaksa oranı
- Rostrum şekli
- Antenülün yapısı ve rostruma oranı
- Göz büyüklüğü ve yeri
- Göz beneğinin var olup olmaması, büyüklüğü
- Dorsal ve ventral hat boyunca dizilen setaların şekli ve oranı
- Postabdomenin yapısı ve lob sayısı

- Postabdomendeki anal diş sayısı ve bunların sıralanışı
- Postabdominal tırnak ve taşıdığı tarakların birbiri ile oranı, tarakların üzerindeki dişlerin sayısı ve dizilimi
- Epifiyumun şekli, rengi ve konumu

2.3 Genetik Belirteçler (Markör) ve Kullanım Alanları

Canlılar arası genetik farklılıklar, farklı genler taşımalarından kaynaklanmaktadır. Aile içi, tür içi ve populasyonlar arası genetik varyasyon genetik belirteçlerle değerlendirilmektedir. Genetik belirteç, bağlantılı bir lokustaki alelleri tanımlamak için kullanılan saptanabilir gen ya da DNA parçasıdır. Genetik belirteçler genel olarak, morfolojik belirteçler, protein belirteçler ve DNA belirteçleri olmak üzere üç gruba ayrılır (Avis 1994).

Çok sayıdaki morfolojik belirteç insan, hayvan ve bitki genetik çalışmalarında kullanılmaktadır. Genler ve kromozomlar hakkındaki bilgi eksikliğinden dolayı ilk çalışmalar, göz rengi, kanat yapısı, boynuzluluk, deri rengi gibi basit Mendel kalıtımı gösteren özellikler üzerinde yapılmıştır. Morfolojik belirteçlerin gözlenmesi kolay olmasına rağmen alel sayılarının nispeten az olmasından dolayı kullanımı kısıtlı kalmaktadır (Liu 1998).

Protein belirteçleri olarak, allozimler ve izozimler kullanılır. Allozim ve izozimlerin sistematik ve populasyon genetiğinde kullanımları 1960'ların ortasında başlamıştır (Hubby ve Lewontin 1966, Lewontin ve Hubby 1966). Protein belirteçlerin bazı dezavantajlarından dolayı DNA temelli belirteç sistemleri geliştirilmiştir. DNA belirteçleri ile protein belirteçlerden daha fazla polimorfizm elde edildiği saptanmıştır (Behura 2006). DNA bölgesinin intronlarında yer alan mutasyonların DNA seviyesinde protein seviyesinden daha fazla değişiklik göstermesi, ayrıca DNA örneklerinin proteinlere göre daha stabil olması nedeniyle DNA belirteçleri, türler arasındaki genetik farklılığın ölçümünde daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Loxdale ve Lushai 1998, Heckel 2003, Avis 2004). DNA belirteçleri, hibridizasyona dayalı belirteçler, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı belirteçler ve EST'ler (İfade

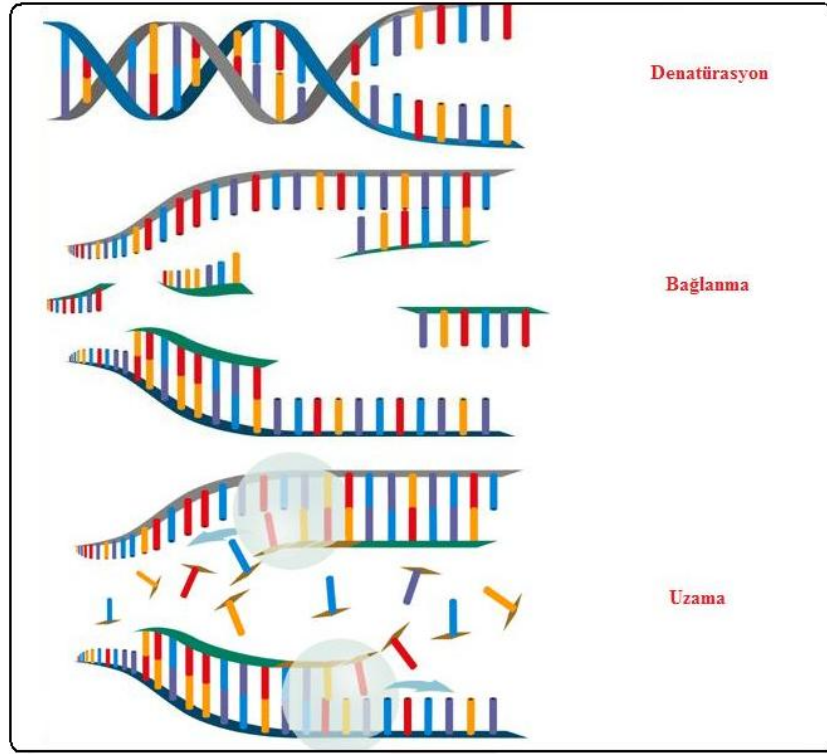
Dizisi Etiketleri) olarak gruplandırılır (Awise 1994). Polimeraz zincir reaksiyonunun keşfinden sonra genetik çalışmalarda PCR temelli belirteçler daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır.

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Rekombinant DNA teknolojisi 1970'lerin başında geliştirilmiş ve takip eden yıllarda genetikçilerin ve moleküler biyologların araştırmalarında bir devrim yaratarak, biyoteknoloji endüstrisinde patlamaya neden olmuştur (Jackson vd. 1972, Lobban ve Kaiser 1973, Cohen vd. 1973). Ardından 1984 yılında bilim adamları in-vivo koşullar yerine in-vitro koşullarda çoğaltmaya bağlı olarak bir DNA amplifikasyonu prosedürü geliştirmişlerdir. PCR olarak bildirilen bu metodla basit enzimatik bir reaksiyonla, kompleks bir DNA kalıbından, çok miktarda spesifik DNA fragmenti oluşturulabilmiştir (Arnheim ve Erlich 1992). PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuş, moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim ve adli vakalar gibi pek çok disiplinde uygulama olanağı bulmuştur (Klug vd. 2009).

PCR, bir seri in-vitro reaksiyon boyunca özgül bir DNA dizisinin birçok kopyasını yapar. PCR için ön koşul, klonlanacak DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekliliğidir. Dizi bilgisi, iki oligonükleotit primerin sentezi için kullanılır. Tek zincirli duruma getirilmiş DNA örneğine primerler ilave edilir. Primerler klonlanacak dizideki eşlenik nükleotitlere bağlanır. Bu bağlanmadan sonra ortama, ısıya dayanıklı DNA polimeraz ilave edilir ve DNA'nın ikinci zinciri sentezlenir. Bu adımların tekrarıyla DNA'nın birçok kopyası oluşturulur (Klug vd. 2009).

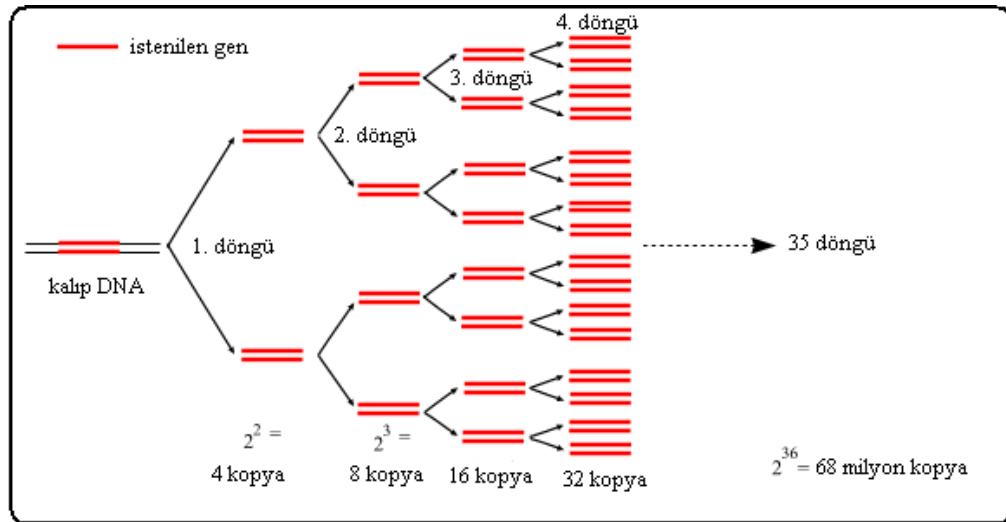
Pratikte PCR'da üç adım vardır (Şekil 2.4). Çoğaltılan DNA'nın miktarı teorik olarak sadece bu adımların tekrarlanma sayıları ile sınırlanır.



Şekil 2.4 Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları
(<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2> 2013)

1. Klonlanacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA; genomik DNA, mumya kalıntıları, fosiller, kurumuş kan, semen gibi adli örnekler, tek bir saç teli ya da tıbbi kayıtlara ait kurumuş örnekler gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. İki oligonükleotit primer, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz ve 4 adet dNTP (Deoksiribonükleotid trifosfat)'den oluşan reaksiyon karışımı içinde bulunan DNA, 90–95°C'de yaklaşık 5 dakika süreyle ısıtılarak denatüre edilir.
2. Sıcaklık 50°C ile 70°C arasında bir değere düşürülür ve bu birleşme (annealing) sıcaklığında primerler tek zincirli DNA'ya bağlanır. Primerler yapay oligonükleotitlerdir (15-30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak hedef DNA'nın uçlarındaki dizilere eşleniktir. Primerler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3. DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir formu (Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir. DNA sentezi 70°C ile 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Taq polimeraz, nükleotitleri 5''den 3''ne doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını yapar. PCR, DNA zincirlerinin sayısının her döngüde iki katına çıktığı ve eski zincirlerle beraber yeni zincirlerin de bir sonraki döngüde kalıp görevi gördüğü bir zincir reaksiyonudur (Şekil 2.5) (Vierstraete 1999). Yaklaşık 5 dakika süren bir döngü birçok kez tekrar edilir ve 3 saatten daha az bir zamanda 25-30 döngü sonunda DNA miktarı milyon kattan daha fazla artar (Klug vd. 2009).



Şekil 2.5 Polimeraz zincir reaksiyonunda üssel çoğalma (Vierstraete 1999)

2.5 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ve gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların sayısı, yeri ve çeşidi ile ilgili bilgiler verir. Dizi analizi ayrıca, prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin aminoasit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılır (Klug ve Cummings 2000). DNA belirteçleri, dizi analizi ve sistematik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bu amaçla önce çalışılacak olan türler belirlenir, daha sonra bu türlerin ayrımında kullanılacak olan hedef gen seçilir. Bu genlere özgü primerler sentezlenerek, önce örneklerin DNA izolasyonu ve

ardından PCR ile amplifikasyonu (çoğaltılması) sağlanır. Amplifiye edilen gen bölgesinin, DNA dizi analizi ile nükleotit dizisi belirlenir.

DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemleri 1940'larda bulunmasına karşın DNA'daki nükleotit dizilerinin doğrudan kimyasal analizi 1960'larda geliştirilip kullanılmaya başlanmış, 1970'lerde daha etkin ve doğrudan nükleotit dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır (Klug ve Cummings 2000).

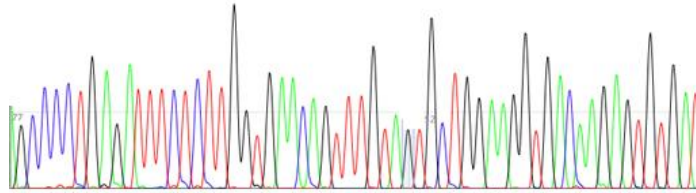
Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde, Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam ve Gilbert 1977) ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi (Sanger ve Coulson 1977) olmak üzere iki temel teknik kullanılmaktadır.

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır. Jel hattındaki her bir bant belirli bir baza karşılık gelmektedir ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir (Klug ve Cummings 2000).

DNA dizi analizinde en çok kullanılan yöntem, tek zincirli DNA kalıbının tamamlayıcı zincirinin DNA polimeraz enzimi ile 5'den 3'ne doğru sentezlenmesi işlemine dayanır. DNA dizi analizi reaksiyonlarında normal nükleotitlerin yanı sıra, dideoksinükleotit adı verilen özgül baz analogları kullanılır. DNA parçasındaki nükleotit dizisinin tayini için, her biri ayrı tüplerde olmak üzere dört reaksiyon seti hazırlanır. Her tüpte, tek zincirli bir DNA kalıbı (dizisi belirlenecek olan DNA parçası), uygun bir primer, DNA polimeraz, dört nükleotit ve oransal olarak daha az miktarda dört tip dideoksinükleotitlerden sadece biri bulunur. DNA sentezi olurken, DNA polimeraz, arada sırada, uzayan DNA zincirinin yapısına nükleotitlerin yanı sıra dideoksinükleotitleri de sokar. Bu nükleotit analogu 3' hidroksil grubu içermediği için bir sonraki nükleotit ile 3' bağı oluşturamaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır. Her

bir tüpte uzunlukları birbirinden birer nükleotit farklı olan, değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Her bir reaksiyon tüpündeki örnekler jel elektroforezine yan yana yüklenerek, tüplerdeki DNA parçaları birbirinden ayrılır. Parçaların jel üzerinde görünüşleri sağlandığında merdivene benzer bantlar serisi ortaya çıkar. Dizi aşağıdan yukarı doğru okunarak, baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5' den 3' ne doğru nükleotit dizisi belirlenmiş olur (Klug ve Cummings 2000).

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik DNA dizi analizinde de Sanger'ın enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Tek farkı, radyoaktif izotop yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkte piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Klug ve Cummings 2000). Guanin bazı siyah renkli, Timin bazı kırmızı renkli, Adenin bazı yeşil renkli ve Sitozin bazı mavi renkli pik verir (Şekil 2.6).



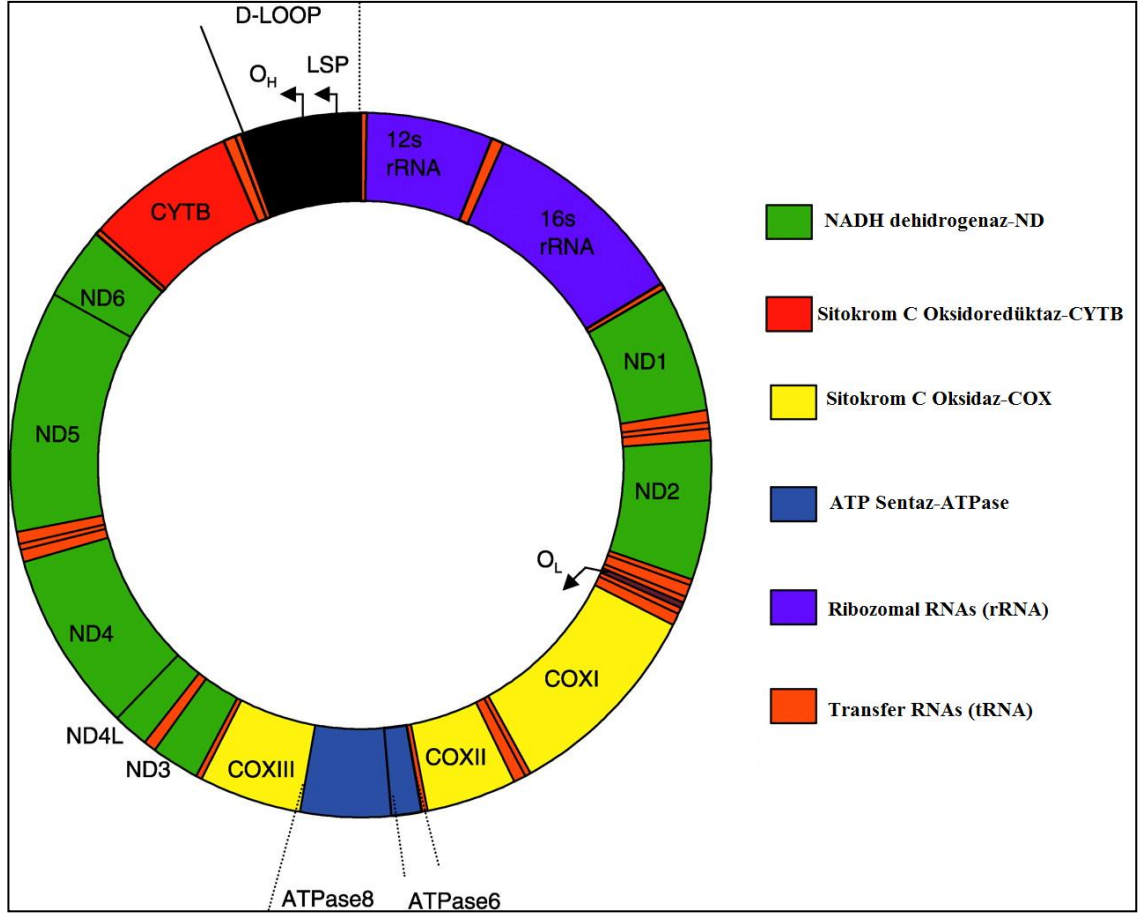
Şekil 2.6 Dizi analizi sonucu oluşan piklerin görüntüsü (Elektroferogram)

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook ve Maniatis 1989).

2.6 Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Diploid organizmalarda nükleer genomdaki her lokusda bir alel anneden diğeri ise babadan kalıtılmaktadır. Bu durum “biparental kalıtım” olarak adlandırılır. Mitokondri ve plastidler, “uniparental kalıtım”ı olan iki önemli istisnai organeldir. Bunların her ikisi de hücre çekirdeğinin dışında bulunurlar. Bu organeller tipik olarak süper-halkasal çift zincirli DNA içerirler ve bu genomlar, nükleer genomdan daha küçüktürler (Freeland 2005).

Hayvan mitokondriyal DNA’sı 13 protein kodlayan gen, 22 tRNA ve 2 rRNA geni ile birlikte replikasyon ve transkripsiyonun başlangıcında görevli olan bir kontrol bölgesi içermektedir (Şekil 2.7) (John vd. 2004). Farklı hayvan türlerinde mitokondriyal genlerde bazı yeni düzenlenmeler olsa da, genel yapı, büyüklük ve genlerin dizilişi nispeten korunmuştur. Birçok hayvanda mtDNA, maternal (anneden) kalıtılırken, bazı çalışmalar maternal kalıtımda istisnai durumlar olabileceğini göstermiştir. Farelerde (Gyllensten vd. 1991), kuşlarda (Kvist vd. 2003) ve insanlarda (Schwartz ve Vissing 2002), mtDNA’nın yavruya babadan geçtiği paternal sızıntılar olduğu ortaya konulmuştur. Midye türlerinin çoğunda hem maternal hem de paternal kalıtım gözlenmiş olup, bu çalışmalara göre mtDNA’nın, dişi bireye tamamen anneden, ancak erkek bireye hem anneden hem de babadan geçtiği, dolayısıyla erkek bireylerin klasik bir “heteroplazmi” (tek bir bireyde mtDNA’nın birden fazla çeşidinin bulunması) örneği sergilemiş oldukları görülmektedir (Freeland 2005).



Şekil 2.7 Mitokondriyal DNA'nın yapısı ve içerdiği gen bölgeleri (John vd. 2004)

Organel genomlarındaki moleküler belirteçler, özellikle de hayvan mtDNA'sı bazı sebeplerden dolayı ekolojik çalışmalarda ve hayvan populasyon genetiği çalışmalarında yaygın bir şekilde tercih edilmektedir.

Bunlardan birincisi, mtDNA'nın nükleer DNA'ya göre daha küçük olmasıdır. Organel genomları her ne kadar küçük olsalar da hücre içindeki sayıları fazladır. Her insan hücresi normalde 1000-10000 mitokondri içerir. Dolayısıyla mtDNA çok fazladır ve elde edilmesi çok kolaydır. mtDNA'nın amplifikasyonu uygun olmayan koşullarda saklanmış örneklerde bile mümkün olabilmektedir (Freeland 2005).

İkincisi, gen dizilimleri korunmuş olmasına rağmen mtDNA'da mutasyon oranı yüksektir ve hızlı evrimsel gelişme gösterir. mtDNA'daki yüksek mutasyon oranının, metabolik solunum ürünlerinin birikimi ve nükleer DNA'ya oranla tamir

mekanizmasının çok iyi olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wilson vd. 1985). mtDNA'da transisyon mutasyonlar fazladır (Brown vd. 1982). Mitokondriyal genlerin daha hızlı evrimi, özellikle sinonim bölgelerde nükleer genlerden daha fazla nükleotit değişimi gösterdikleri anlamına gelmektedir (Goto ve Kimura 2001, Overton ve Rhoads 2004). Yüksek mutasyon oranına bağlı olarak nispeten yüksek seviyede çeşitlilik gösteren mtDNA, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik soyların ortaya konulmasını sağlamaktadır (Avice 2000, Freeland 2005).

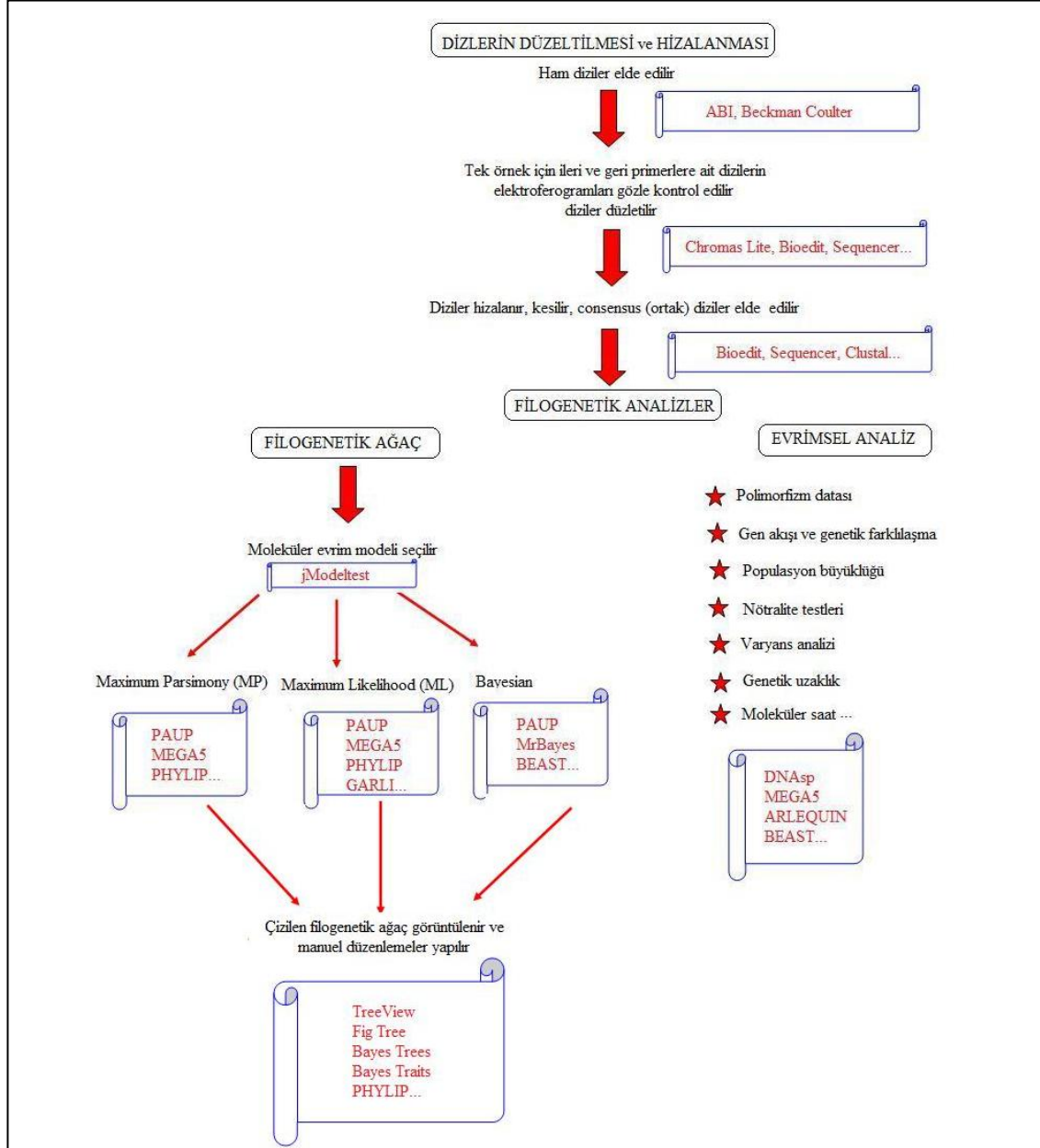
Üçüncüsü mtDNA'da maternal kalıttan dolayı rekombinasyonun olmamasıdır. Böylece nükleer genlere göre mitokondriyal soyların tanımlanması daha kolay olmuştur. mtDNA'nın etkili klonal kalıtımı, bireysel soyların zaman içindeki takibini kolaylaştırır ve filocoğrafya çalışmalarında mtDNA dizilerinin daha fazla kullanılmasını elverişli kılar (Freeland 2005).

2.7 Filogenetik Analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla filogenetik analizlerden yararlanılmaktadır. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde meydana gelen değişikliklerin hızını ve karakterini belirlemeye ve böylece genler ile organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymada en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizler yoluyla filogenetik ağaçlara dönüştürülmesidir (Saitou ve Imanishi 1989).

Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler istenirse referans dizi denilen daha önce saptanmış ve üzerinde uzlaşılarak doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Son yıllarda moleküler filogeni alanında kaydedilen gelişmeler neticesinde çeşitli türlerden elde edilen diziler, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) gibi özel veritabanı sistemlerinde toplanarak kullanıcıların hizmetine

sunulmuştur (Mount 2001). Filogenetik analizlerde kullanılan programlar şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8 Filogenetik analizlerde kullanılan programlar şeması

2.7.1 Dizi düzeltme ve hizalama

Dizi analizi sonrası elde edilen aynı bireye ait ileri (forward) ve geri (reverse) primerlere ait ham dizilerin kromatogramlarının görüntülenmesi, hizalanması ve analiz edilmesi, oluşturulacak ortak (konsensus) dizilerinin güvenilirliği için ilk ve en önemli adımdır. Bu amaçla kullanılan bazı programlar; Chromas Lite, Bioedit, Sequencer ve Clustal W olarak sıralanabilir.

Chromas Lite, ABI (Application Binary Interface) ve Beckman dizi analizi cihazlarının ham veri dosyası olan SCF uzantılı kromatogram dosyalarının görselleştirilmesi için kullanılabilecek ücretsiz bir yazılımdır. Çoklu dizi hizalama özelliği yoktur.

Bioedit, protein ve nükleik asit dizilerini düzenlemek, hizalamak, manipüle ve analiz etmek için temel fonksiyonlar içeren bir programdır. Bir bireyin aynı lokusuna ait forward ve reverse primerlerle elde edilen dizi analizi verilerinin hizalanması ve her iki okumaya ait kromatogramların tek tek gözden geçirilerek o bireye ait konsensus dizinin oluşturulmasına olanak sağlar (Hall 1999).

Çoklu dizi hizalamada en çok kullanılan yöntem aşamalı hizalama yöntemidir. Bu yöntemi kullanan araçların en yaygını CLUSTALW programıdır (Thompson vd. 1994). Önce eldeki dizilerin ikili benzerlikleri kullanılarak tahmini bir filogenetik ağaç oluşturulur, daha sonra bu bilgidan yararlanılarak aşamalı olarak diziler hizalanır.

2.7.2 Filogenetik ağaç

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur. Dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman ve Herron 1999). Ağaçtaki öncülü olmayan düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder, ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir. Köksüz ağaçlarda ise ortak ata gösterilmeden

sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır. Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Ağaçtaki dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını belirler (Mount 2001).

Filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan yöntemler, karakter temelli yöntemler ve mesafe temelli yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.7.2.1 Karakter temelli yöntemler

Karakter temelli yöntemler, her bir taksondaki canlıya ait moleküler dizilerde biriken mutasyonların sayılması esasına dayanır. Maximum parsimony (maksimum tutumluluk), maximum likelihood (maksimum benzerlik) ve MrBayes, karakter temelli yöntemlerdir.

Maximum parsimony (MP), bir gözlemin en basit (en az karmaşık) olarak açıklanması şeklinde tanımlanabilir. Parsimoni yöntemleri, her bir türün en az evrimsel değişikliklerine dayanan ağaçları karşılaştırır ve en basit muhtemel ağacı seçer (Klug ve Cummings 2000). Parsimoniye göre en iyi ağaç, tüm karakterler için en az karakter durum değişimini ifade eden ağaçtır. Kelime anlamı tutumluluk olan parsimoni, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca varılırken, karmaşık yerine basit açıklamaların seçilmesi olarak açıklanabilir (Freeman ve Herron 1999).

Maximum likelihood (ML), Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında maximum parsimony'ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir (Felsenstein 1987). Gözlenen veriyi oluşturmada en yüksek olasılığa sahip en iyi ağacı seçmede olasılık modellerini kullanan zor ve karmaşık bir yöntemdir. Bu yöntemin kuramsal olarak nasıl işlediğini kavramak için yeterli istatistiki bilgi ile donanmış olmak gerekir. Bu yöntemde her olası ağaç topolojisi araştırılır ve dizi hizalamasında yalnızca bilgi verici bölgeler değil her pozisyon hesaba katılır. Nükleotit veya aminoasit değişimlerine olasılık değerleri verilerek elde edilen belirli bir değişim modeli ile bu yöntem, ata dizilerin ara boğum noktalarına ve sonrasında günümüzde yaşayan canlılara ait olan

dizilere evrimleşme olasılığını hesaplar. Çok iyi temellendirilmiş istatistiğe dayandığından matematiksel olarak daha zahmetli bir yöntemdir. Bu zorluktan dolayı taksonların sayısı belirli bir seviyeyi aştığında bu yöntemin kullanılması imkansız hale gelir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için bazı farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bayes yöntemi bunlardan bir tanesidir.

Bayes metodu, filogenetiğin en popüler metodudur. Temelde maximum likelihood metoduna benzer, ancak önceki (prior) olasılık kullanımı ile bu yöntemden ayrılır. Var olan gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir şey hakkında sonuç çıkarma temeline dayanır. Bu yöntemde ağaç seçiminde, “önceki olasılık”, analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılıktır. Bu yöntem ML yönteminden daha hızlıdır ve daha geniş çapta veri kümelerini kullanabilir.

2.7.2.2 Mesafe temelli yöntemler

Genetik uzaklık yöntemi, filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Aralarında az sayıda nükleotit değişikliği olan bu dizi çiftleri komşu (neighbours) olarak adlandırılır. Uzaklık metodları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı verir (Mount 2001). Tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır (Freeman ve Herron 1999). Bu yöntemler diğerlerinden daha kolay ve hızlı olup, çok sayıda dizi için kullanılabilir. Bunlar içinde en çok kullanılanlar, unweighted pair group method with arithmetic mean (Ortalamalara bağlı ağırlıksız çift grup metodu/UPGMA) metodu ve neighbour joining (komşu birleştirme/NJ) metodudur.

2.7.3 Moleküler evrim ve filogenetik analiz programları

Moleküler evrim ve filogenetik analizler için kullanılan çok sayıda program bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, DnaSP Arlequin, ModelTest, MEGA, PAUP, PHYLIP, MrBayes, Network programlarıdır.

DnaSP populasyon ii ve dışı dizi farklılaşması, bağlantı eşitsizliği, yeniden yapılanma (rekombinasyon), gen akışı ve gen dönüşümü parametrelerinin hesaplanmasına ve nötrlük testlerinin yapılmasına olanak sağlayan bir programdır (Rozas 2009).

Arlequin, bir populasyon genetiği veri analiz yazılımı olup, populasyon genetiği çalışan bir araştırmacının, elindeki verilere farklı temel filogenetik metotları ve istatistik testleri uygulayarak, verileri hakkında genetik ve demografik bilgiye ulaşmasını sağlamayı amaçlamaktadır. Arlequin programı ile, DNA nükleotit dizileri, mikrosatellit verileri, RFLP sonuçları ve alel frekansları gibi farklı tipdeki genetik veriler analiz edilebilir. Populasyon ii ve populasyonlar arası dizi farklılaşması, bağlantı eşitsizliği, nötrlük testlerinin gerçekleştirilmesi, varyasyonun hiyerarşik olarak analizi, Mantel test gibi birçok testi yapmaya elverişli bir programdır (Excoffier vd. 2005).

ModelTest, en iyi nükleotit değişim modelini belirlemeye yardımcı olan bir programdır. Beş farklı model seçim stratejisi kullanarak en iyi nükleotit değişim modelini belirlemektedir (Posada 2008). ModelTest tarafından belirlenen model MEGA, PAUP, PHYLIP ve MrBayes gibi filogenetik ağaç oluşturan programlarda kullanılabilir.

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), moleküler evrimsel genetik analizlerini gerçekleştirmek için kullanılan ilk versiyonu 1900'l yılların başlarında geliştirilmiş olup, son versiyonu (MEGAV) daha gelişmiş seçenekler sunan bir programdır. Karşılaştırmalı dizi analizi için çeşitli istatistiksel ve matematiksel metotlar içerir ve kullanıcı için kolay bir ara yüze sahiptir. Filogenetik ağaç oluşturmak için gerekli olan en iyi nükleotit değişim modelini seçmeyi sağlayan bir analiz seçeneğinin olması araştırmacılara ayrıca bir kolaylık sağlamaktadır. Bu nedenle AIDS/HIV araştırmalarından virolojiye, bakteriolojiden bitki biyolojisine, koruma biyolojisinden sitematiğe, gelişimsel evrimden populasyon genetiğine birçok disiplinden araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Tamura vd. 2011).

PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony), parsimony ve maximum likelihood metotları dahil pek çok metot kullanarak populasyon verilerini detaylı araştırmaya yardımcı ücretli bir programdır. Belirli ağaçlar üzerinde veya ağaç oluşturulması

sırasında, maksimum olasılık modeli parametrelerinin otomatik olarak önceden tahmin edilmesine yardımcı olur. En genel geri dönüşebilir model ve onun alt modellerini de içeren geniş bir DNA değişim modeli yelpazesi içerir (Swofford 1998).

PHYLIP (The Phylogeny Inference Package), filogenetik haritaların (evrimsel soyağaçlarının) çıkarılması için internet üzerinden üyelik işlemi ile ulaşılabilen bir programlar paketidir. Paket, parsimony, uzaklık matrisi, çöz-bağla işlevi (bootstrapping) ve konsensus ağaçları kapsayan olasılık metotlarını içerir.

MrBayes (Bayesian Inference of Phylogeny), filogeninin Bayes metodu ile tahmini için kullanılan bir programdır. Amaç tek bir doğru filogeniyi bulmayı değil, bütün muhtemel filogenilerin sonraki olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. Oldukça fazla sayıda muhtemel ağacın analizi için Monte Carlo algoritmasına dayanan metotlar kullanılır (Huelsenbeck vd. 2001).

Network (Phylogenetic Network Software), filogenetik ağaçlar evrimsel model için uygun olmadığında, kompleks evrimsel biçimlerin görsel hale getirilmesinde, verilerin derinlemesine incelenmesinde, network metotları kullanılabilir. Network programı ile, DNA dizisi, STR (kısa bitişik tekrarlar), RFLP (sınırlı parça uzunluk polimorfizmi) ve amino asit verileri kullanılarak filogenetik network analizi (median-joining network) yapılabilir (Bendelt vd. 1999).

Moleküler evrim ve filogenetik analizler için yukarıda bahsedilen programlardan başka analiz programları ve yardımcı analiz programları da bulunmaktadır. Filogenetik ağaç programları ile elde edilen filogenetik ağaçları görselleştirmek ve manipule etmek için kullanılan TreeView ve FigTree bunlardan bazılarıdır.

2.8 Konuya İlişkin Çalışmalar

Schwenk vd. (1998), Kladosera'ya ait 9 familyadan örnekleme yaparak, basit bir DNA ekstraksiyonu ve mitokondriyal DNA'nın 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltmak yoluyla sucul ekolojideki yaklaşımların altını çizmişlerdir. Daphniidae familyasına ait

türlerin, türler arası hibritlerin kimliğini tespit etmek için RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), RFLP ve morfolojik analizler birleştirilmiştir. Çalışma, türler arası hibridizasyonun ve bazı taksonlarda (*Daphnia cucullata* ve *Daphnia galeata*) geri çaprazlamanın yaygın olduğunu, ayrıca türler ve hibritlerin sık sık simpatri gösterdiğini açığa çıkarmıştır.

Crease (1999), *Daphnia pulex* ile gerçekleştirdiği çalışmada *Daphnia pulex*'in tüm mitokondriyal DNA dizilimini çıkarmıştır. Bu çalışmada iki Crustacea olan *Artemia* ve *Daphnia* nükleotit kompozisyonu, kodon kullanımı ve aminoasit kompozisyonu bakımından çok benzer bulunmasına rağmen, *Daphnia*'nın mitokondriyal proteinlerinin Dipter insectler (*Drosophila* ve *Anopheles*) ile çok daha benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

Hebert vd. (2003), *Daphnia ambigua* türüne ait varyasyonların coğrafik dağılımını belirlemek üzere iki mitokondriyal gendeki (COI ve 12S rRNA) değişime bakmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda Kuzey Amerika'daki *Daphnia ambigua*'nın %4 dizi farklılığı ile 4 filogruba ayrıldığını tespit etmişlerdir. Avrupa popülasyonunun Amerika'nın doğusundaki popülasyon ile yakın akraba olduğunu, buna karşın Kuzey Amerika ve Güney Amerika popülasyonlarının yaklaşık 2 milyon yıl önce birbirlerinden ayrıldığı sonucuna varmışlar ve allopatrik türleşmenin farklılaşmada önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir.

Penton vd. (2004), Kuzey Amerika'da geniş dağılıma sahip olan *Daphnia obtusa*'nın filoğrafyasını araştırmışlardır. Mitokondriyal DNA'nın COI gen bölgesindeki dizi değişimlerini kullanarak iki kriptik türün varlığını belirlemişlerdir. Kriptik türlerden birinin Amerika'da geniş bir dağılıma, diğerinin ise doğuda sınırlı bir dağılıma sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada belirlenen filogrupların, daha önce allozim analizi ile belirlenen akrabaları ile uyumlu olmadığı ifade edilmiştir.

De Galas ve De Meester (2005), Avrupa'nın büyük bir kısmını kapsayan 75 popülasyondan yapmış oldukları örnekleme ile *Daphnia magna*'nın filoğrafyasını incelemişlerdir. Mitokondriyal DNA'nın COI gen bölgesinin dizi analizini yapmışlar ve

39 haplotipden oluşan 4 büyük filogrup tespit etmişlerdir. Bu çalışmada gen akışının sınırlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Ishida vd. (2006), *Daphnia curvirostris*'in *Daphnia* cinsi içerisindeki pozisyonunu belirlemek üzere geniş coğrafik alanda (Avrupa, Japonya ve Kuzey Amerika) yapılan bir örnekleme ile morfolojik ve moleküler açıdan oldukça detaylı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında ND2 gen bölgesinin dizisini çıkarmışlardır. Japonya *Daphnia curvirostris*'ini hem morfolojik bakımdan hem de moleküler bakımından Avrupa ve Kuzey Amerika'daki *Daphnia curvirostris*'den çok farklı (%35) bulmuşlar ve bu yeni ırkı *Daphnia tanakai sp. nov.* olarak isimlendirmişlerdir.

Markova vd. (2007), yaptıkları çalışmada *Daphnia pulicaria*'nın mitokondriyal ND5 gen bölgesinin dizi analizini çıkararak, elde edilen verileri maximum likelihood, maximum parsimony ve neighbor joining analizleri ile değerlendirip, filogenetik ilişkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Kuzey Amerika ve Avrupa'dan seçtikleri 50 lokaliteden örnekleme yapmışlardır. Örnekleme alanlarını yüksek dağ gölleri, buzul göller ve aşağı ova göllerinden seçmişler ve pigmentasyonun genetik farklılık üzerinde etkili olup olmadığını araştırmışlardır. Bunun için Avrupa'nın yüksek dağ göllerinde bulunan simpatrik turuncu ve şeffaf örnekleri alarak, seçilen 5 mikrosatellit lokusundan uzunluk polimorfizm analizi yapılmışlardır. *Daphnia pulex* kompleksinin: *pulicaria*, *tenobrosa*, *pulex* türlerini kapsadığını ifade etmişlerdir. Uzunluk polimorfizmi sonucunda 6 farklı genotip (4 Avrupa ırkı, 2 Amerika ırkı) belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile pigmentasyonun sadece UV stresine karşı koruyucu bir mekanizma olduğu ve genetik farklılaşmanın derecesini ölçmede etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Forro vd. (2008), "Tatlısu Kladoserlerinin Küresel Çeşitliliği" başlıklı makalelerinde Cladocera'nın tür çeşitliliğinin, akrabalık ilişkilerinin ve evrimsel süreçlerinin, şu anki dağılımlarının ve endemizm alanlarının altını çizmişlerdir. Ayrıca taşınmalarında insan etkisinin önemli olduğunu, diğer kladoserlerde hibritleşmenin nadir olarak görüldüğünü buna karşın türler arası hibridizasyonun *Daphnia* tür komplekslerinde önemli bir role sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Mergeay vd. (2008), Bolivya'nın yüksek enlemleri 12 gölünden aldıkları *Daphnia pulex* kompleksine ait poliploid bireylerin, 4 mikrosatellit (Dp183, Dp464, Dp496, Dp502) ve 3 mitokondriyal gen bölgesini (12S rRNA, COI ve ND5) kullanmak suretiyle genetik çeşitliliklerini araştırmışlardır. Anne ve babadan aktarılan kalıtım ile sadece anneden aktarılan kalıtımı karşılaştırmışlardır. Mitokondriyal genlerin dizi analizleri sonucunda, 12S rRNA ve COI dizi verileri 6 haplotipin, ND5 ise 4 haplotipin varlığını ortaya koyarken, COI daha bilgilendirici bir gen bölgesi olarak ifade edilmiştir. Nükleer ve mitokondriyal sonuçlar karşılaştırıldığı zaman, nükleer genotipleri birbirleri ile çok yakın akraba olanların çok farklı mitokondriyal ırklara ait olabildiklerinin ya da bunun tam tersinin mümkün olabildiği sonucuna varmışlardır. Güney Amerikadaki poliploid *Daphnia*'ların farklı endemikler (seksüel üreyen parental ırklar) arasındaki hibridizasyonla oluştuğunu, ayrıca tropikal alp dağlarının iklim değişikliklerinin kötü olduğu dönemlerde önemli sığınak alanları olduğunu ifade etmişlerdir.

Durbin vd. (2008), Mitokondriyal DNA'nın COI gen bölgesini kullanarak deniz kladoserlerinden 6 türün populasyon genetiğini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, deniz kladoserlerinin birkaç türünde aynı ya da çok benzer olan haplotiplerin okyanus aşırı bir dağılıma sahip olduklarını ve bunun hem doğal taşınma hem de insan yoluyla taşınmanın bir sonucu olabileceğini ortaya koymuştur.

Adamowicz vd. (2009), farklılaşmanın derecesini belirlemek üzere, pasif dağılım gösteren tatlı su zooplanktonlarından *Daphnia* cinsinin kıtalararası allopatrik türleşmesine ilişkin filogenetik bir ön çalışma yapmışlardır. 7 kıtadan 92 *Daphnia* türü almışlar, allopatrik dağılım olayının coğrafik uyumu, sıklığı ve derecesini kullanarak, mtDNA esaslı filogenetik bir hipotez kurmuşlardır. Bu çalışma ile allopatrik türleşmenin %42 oranında olduğunu ve bunların çoğunun kıtalararası dağılıma sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yakın akraba türlerin genellikle arktik bölge civarında ve Kuzey-Güney kıtalar arasında yoğunlaştığını gözlemlemişler ve bu durum, dağılımın son zamanlarda kuşların göçü ile gerçekleştiği ya da kıtasal parçalanma senaryosu ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, allopatrik türleşmenin oldukça yüksek olduğunu ve *Daphnia* cinsinin pasif dağılıma sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Kotov ve Taylor (2010), Etiyopya, Güney Amerika ve Japonya'dan *Daphnia obtusa* benzeri örnekleri alarak COI ve 12S rRNA gen bölgelerindeki farklılaşmaları araştırmışlar ve ayrıca detaylı morfolojik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. DNA dizileri kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizler ve detaylı morfolojik çalışmalar sonucunda Afrika için yeni bir endemik türün varlığını bulmuşlar ve bu türü *Daphnia izpodvala sp. nov.* olarak isimlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları tanımlanan bu endemik türün en yakın akrabasının Kuzey Amerika'daki *Daphnia pileata* olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, yakın akrabası bilinmeyen iki tane Japon ırkı *Daphnia JPN sp. 1* ve *Daphnia JPN sp. 2* olarak tanımlanmıştır.

Jeffery vd. (2011), Kanada'nın Churchill ve Manitoba bölgelerinde farklı su sistemlerinde (havuz, lagün ırmak, göl) yaptıkları örneklemelerle 41 farklı mikrokabuklu (Branchiopoda) türünü alarak DNA barkodlaması yapmışlardır. Bunun için hayvanlarda standart barkod geni olarak kabul gören COI gen bölgesini kullanmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışma ile Churchill ve Manitoba bölgesindeki tür çeşitliliğinin daha önce kaydedilmiş olandan çok daha fazla olduğunu ve çok sayıda kriptik (gizli) türün bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Duggan vd. (2012), Kuzey Amerika'da Yeni Zelanda'daki göllerden *Daphnia pulex* örnekleri alarak COI gen bölgesini kullanmak suretiyle DNA barkodlaması yapmışlardır. Filogeniyi maximum likelihood yaklaşımı ile kurmuşlar ve Yeni Zelanda göllerinden almış oldukları bu *Daphnia pulex*'lerin Kuzey Amerika ve Afrika *Daphnia pulex*'leri ile monofiletik bir grup oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda Kuzey Amerika'daki *Daphnia pulex*'i Avrupa *Daphnia pulex*'inden ve Avrupa ve Amerika *Daphnia pulicaria*'sından farklı bulmuşlardır. GenBankası'ndaki mevcut dizilerle yapmış oldukları karşılaştırma sonrasında kendi örneklerine ait dizilerin *Daphnia pulicaria*'dan %3-11, Avrupa *Daphnia pulex*'inden %11 oranında farklı olduğunu kaydetmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Arazi Çalışması ve Örneklem Yerleri

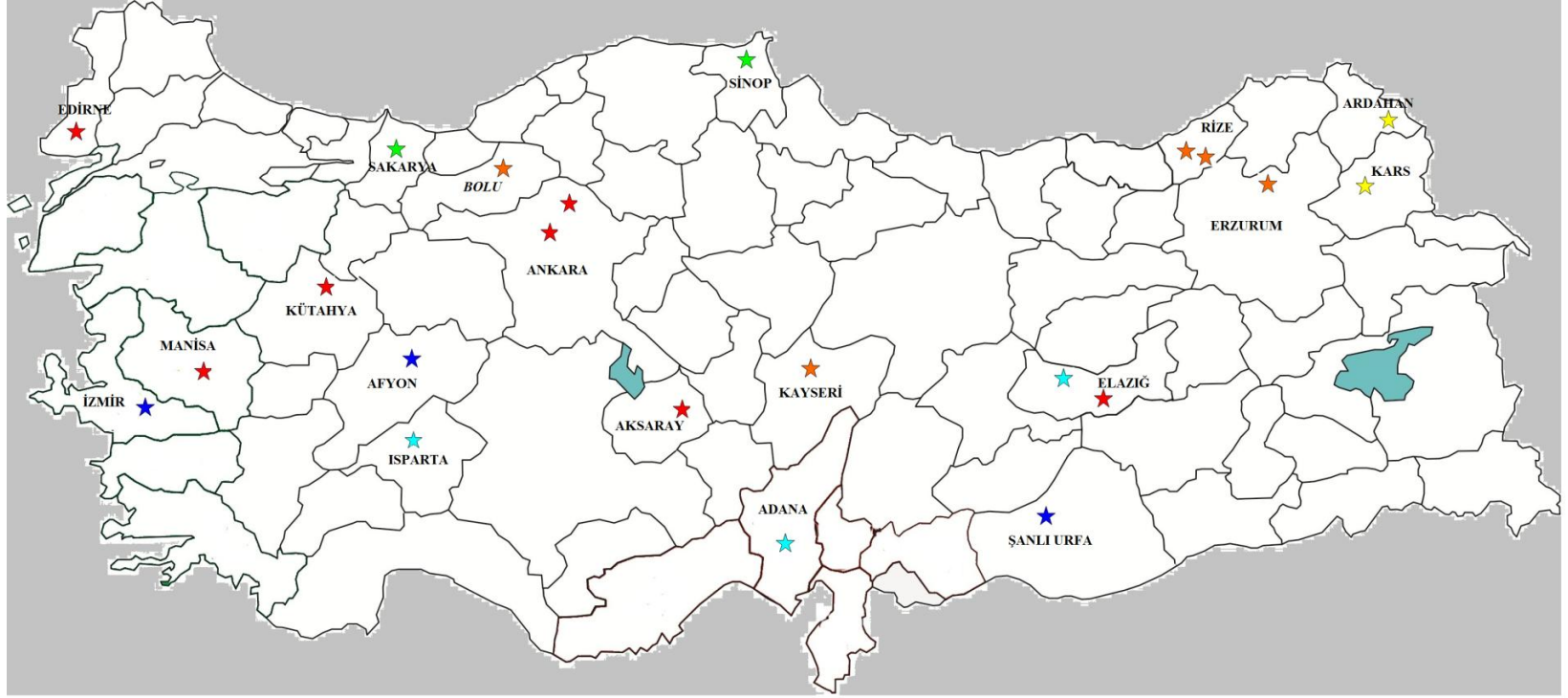
Bu araştırmada kullanılan örnekler için Türkiye'nin 7 farklı bölgesinde arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Yapılan arazi çalışmaları ile toplam 22 lokaliteden *Daphnia* örneği temin edilmiştir. Örneklerin toplandığı lokaliteler şekil 3.1'de verilmiştir.

Örneklerin toplanmasında 55 µm'lik göz açıklığına sahip Hydrobios marka plankton kepçesi kullanılmıştır. Plankton kepçesi ile alınan su örneği süzölmüş, süzöntü içerisindeki *Daphnia* örnekleri tek tek seçilerek %95'lik etil alkol içerisinde tespit edilmiştir.

Örneklerin temin edildiği lokalitelerin koordinatları GPS (Global Positioning System; Küresel Konumlama Sistemi) cihazı ile ölçülerek kaydedilmiştir. Örnekleme yapıldığı lokaliteler ve koordinatları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Örneklerin toplandığı lokaliteler ve koordinatları

Lokalite Kodu	Örneklem Lokalitesi	Bölge	Enlem	Boylam
AN1	ANKARA/Eymir Gölü	İç Anadolu	39. 823116°	32. 832198°
AN2	ANKARA/Mogan Gölü	İç Anadolu	39.752289°	32. 792143°
KY	KAYSERİ/Sarımsaklı Baraj Gölü	İç Anadolu	38. 529056°	35. 523458°
AK	AKSARAY/Mamasın Baraj Gölü	İç Anadolu	38. 399182°	34. 165258°
EL1	ELAZIĞ/Keban Baraj Gölü	Doğu Anadolu	38. 831084°	39. 090709°
EL2	ELAZIĞ/Hazar Gölü Yakını	Doğu Anadolu	38. 443918°	39. 314969
AR	ARDAHAN/Kındırğa Sazlığı	Doğu Anadolu	41. 075468°	43. 136085°
KA	KARS/Yeşil Göl	Doğu Anadolu	40. 299817°	42. 338128°
ER	ERZURUM/Tortum Gölü	Doğu Anadolu	40. 636172°	41. 634498°
UR	URFA/Atatürk Baraj Gölü	G.Doğu Anadolu	37. 403566°	38. 689991°
KÜ	KÜTAHYA/Sulak alan	Ege	39. 681729°	30. 005020°
MA	MANİSA/Demirköprü Baraj Gölü	Ege	38. 691994°	28. 405868°
İZ	İZMİR/Gölcük Gölü	Ege	38. 318305°	28. 024113°
AF	AFYON/Gebeceler Baraj Göleti	Ege	38.790853°	30. 793224°
AD	ADANA/Seyhan Baraj Gölü	Akdeniz	37. 041187°	35. 317448°
IS	ISPARTA/Eğridir Gölü	Akdeniz	37. 921640°	30. 809289°
Rİ1	RİZE/Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	Karadeniz	40. 710390°	40. 914120°
Rİ2	RİZE/Verçenik Dağ Gölü(Güney)	Karadeniz	40. 691216°	40. 900148°
BO	BOLU/Yeniçağa Gölü	Karadeniz	40. 778459°	32. 035921°
Sİ	SİNOP/Aklıman mevkii	Karadeniz	42. 055883°	35. 035638°
ED	EDİRNE/İpsala mevkii	Marmara	40. 851636°	26. 359605°
SA	SAKARYA/Acarlar Gölü	Marmara	40. 779557°	32. 036244°



★ *Daphnia magna* ★ *Daphnia cucullata* ★ *Daphnia galeata* ★ *Daphnia curvirostris*

★ *Daphnia pulex TR1* ★ *Daphnia pulex TR2*

Şekil 3.1 Türkiye’den toplanan *Daphnia* türlerine ait örneklem lokaliteleri (Herbir tür ayrı renkle işaretlenmiş ve renklerin hangi türlere ait olduğu harita içerisinde tanımlanmıştır)

3.2 Morfolojik Çalışmalar

Bu araştırmanın morfolojik tür tayini ile ilgili olan kısmı Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Algoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Işık mikroskobu ile tür tayini

%95'lik etil alkol içerisinde tespit edilerek laboratuara getirilen örneklerin, inverted ve Leica DMLS marka mikroskop altında tür teşhisleri, Benzie (2005)'e göre yapılmıştır. Aşağıda belirtilmiş olan karakterler göz önünde bulundurularak tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir:

- Vücut büyüklüğü
- Kuyruk spininin karapaksa oranı
- Karapaksın yandan görünüşü, dorsal ve ventral kenarın şekli
- Baş yapısı ve karapaksa oranı
- Rostrum şekli
- Antenülün yapısı ve rostruma oranı
- Göz büyüklüğü ve yeri
- Göz beneği (ocellus) var olup olmaması, büyüklüğü
- Dorsal ve ventral hat boyunca dizilen setaların şekli ve oranı
- Postabdomenin yapısı ve lob sayısı
- Postabdomendeki anal diş sayısı ve bunların sıralanışı
- Postabdominal tırnak (claw) ve taşıdığı tarak (comb) ların birbiri ile oranı, tarakların üzerindeki dişlerin sayısı ve dizilimi
- Epifiyumun şekli, rengi ve konumu

Tür teşhisi yapılan her bir birey, içerisinde %95'lik etil alkol bulunan 0,5 ml'lik tüplere alınmış, etiketlenmiş moleküler çalışmaları yapılmıncaya kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2 Elektron mikroskobu ile tür tayini

Bu araştırmanın elektron mikroskobu çalışmalarını kapsayan kısmı Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde yer alan Elektron Mikroskop Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tür teşhisi tamamlanan örneklerden her bir lokaliteyi temsilen birkaç örnek seçilerek postabdomenlerindeki anal dişler ve tırnak yapısı Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu-SEM) ile incelenmiştir. Örneklerin SEM'e hazırlanması için önce ışık mikroskobu altında canlının postabdomeni disseksiyon ile çıkartılmıştır. Disekte edilen postabdomen cam pasteur pipetle dikkatlice alınarak, alüminyum stab üzerine yapıştırılmış olan çift taraflı bant üzerine yerleştirilmiştir. Ardından stab üzerindeki örnekler altın ile kaplanmıştır. Altın kaplama POLARON SC 502 SPUTTER COATER cihazı ile yapılmıştır. Hazır olan preparatların JEOL JSM-6060LV taramalı elektron mikroskobunda görüntüleri alınmıştır.

3.3 Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmaların bir kısmı (DNA izolasyonu) Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Sistemik Laboratuvarı'nda, bir kısmı (PCR, saflaştırma, sekans PCR'ı, etanolle çöktürme ve dizileme) ise çalışmalara bizzat dahil olmak üzere Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Genom Bilim Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu bireyin tamamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı DNA izolasyon protokolleri denenmiş ve optimizasyon sonucu elde edilen ve tüm örneklerin DNA izolasyonunda kullanılan protokolün basamakları aşağıda verilmiştir.

- Tek bir *Daphnia* örneği 200 µl hidroliz buffer içerisinde tek kullanımlık plastik havaneli kullanılarak ezildi. Ezme işlemi mümkün olduğunca homojen bir sıvı elde edilinceye kadar sürdürüldü.
- Homojenat üzerine 36 µl Proteinaz-K (25mg/ml) eklendi, hafifçe karıştırıldı.

- Örnekler 56°C’de su banyosunda bir gece inkübe edildi.
- İnkübasyondan alınan örneklerin üzerine 236 µl fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) eklendi. Süt kıvamında beyaz renk alıncaya kadar hafifçe karıştırıldı.
- 13000 rpm de +4°C’de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüjden sonra üst faz dikkatlice alınarak temiz ependorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine 236 µl izopropanol, 1:10 oranında sodyum asetat (pH: 5,2) eklendi, tüpler birkaç kez alt üst edildi.
- Örnekler -20°C’de 1 saat bekletildi.
- 13000 rpm’de +4°C’de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 500 µl %70’lik etil alkol eklendi.
- 13000 rpm’de +4°C’de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı, ependorf tüplerdeki pelletler alkolün tamamen uzaklaşması için laminar kabinde en az 1 saat kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan DNA’ların üzerine 25 µl ddH₂O eklenerek DNA’ların çözünmesi sağlandı.
- DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonda kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

DNA izolasyonuna kullanılan çözeltiler:

- EDTA (0,5 M, pH:8,0)
- Tris-HCL (1M, pH:8,5)
- Tween-20
- Hidroliz Buffer (Toplam hacim 100ml olacak şekilde Tris-HCL (1 M), EDTA (0,5 M), Tween-20 içermektedir.)
- Proteinaz-K (25 mg/ml)
- Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1)
- Sodyum Asetat (3M pH:5.2)
- İzopropanol (1:10)
- Etil Alkol (%70)

3.3.2 DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'ların miktar ve saflık analizleri Nano Drop (Agilent 2100 Bioanalyser NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. DNA'nın saflığı 260/280 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/ proteinin absorpsiyon değeri) ve 260 nm/ 230 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/ fenolün absorpsiyon değeri) değerleri göz önüne alınarak hesaplanmıştır (<http://www.nanodrop.com> 2010). Tek birey kullanılarak elde edilen DNA'nın miktarı 23,72 ng/μl ile 383,73 ng/μl arasında, 260/280 absorbans değeri 1,83 ile 1,97 arasında 260/230 absorbans değeri ise 1,85 ile 2,11 arasında bulunmuştur.

3.3.3 Gen bölgesinin çoğaltılması (PCR)

Spektrofotometrik sonuçlar dikkate alınarak örnek sayısının elverdiği ölçüde her bir lokaliteden ortalama 10 tane örnek alınmasına dikkat edilmiş ve 408 izolasyondan 223 tanesi seçilerek COI gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır.

COI gen bölgesi'nin PCR ile çoğaltılmasında, LCO1490 ve HCO2198 (Folmer vd. 1994) primer çifti kullanılmıştır (Çizelge 3.2). PCR'da kullanılacak olan liyofilize primerler, üretici firmanın önerdiği oranda distile su ile sulandırılarak 100 pmol/μl'lik stok primer elde edilmiştir. Daha sonra stok primer 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak PCR reaksiyonunda kullanılacak 10 pmol/μl'lik stok primerler oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2 COI gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan primer çifti

Primer	Primer Dizileri
LCO1490 (Forward=ileri primer)	5'-gggtcaacaaatcataaagatattgg-3'
HCO2198 (Reverse=geri primer)	5'-taaacttcagggtgacaaaaaatca-3'

PCR 50 μl hacimde gerçekleştirilmiştir. 50 μl reaksiyon karışımı; 5x Go Taq Flexi Buffer (pH 8,5) dan 10 μl, 10 mM dNTP karışımından 1 μl, 10 pmol/ μl forward primerden 1 μl, 10 pmol/ μl reverse primerden 1 μl, 25mM MgCl₂'den 3 μl, Taq poimerazdan 0,5 μl, Kalıp DNA'dan 2 μl (100-200 ng) alınmak üzere son hacim ddH₂O

ile 50 µl ye tamamlanarak hazırlanmıştır. PCR reaktifleri Promega marka kullanılmıştır (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.3 PCR da kullanılan reaktifler ve konsantrasyonları

Reaktifler	Miktar	Son Konsantrasyon
5x Go Taq Flexi Buffer (pH 8,5)	10 µl	1X
dNTP (10 mM)	1 µl	0,2 mM
Forward primer (10 pmol/ µl)	1 µl	0,2 pmol/ µl
Reverse primer (10 pmol/ µl)	1 µl	0,2 pmol/ µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl	1,5 mM
Taq Polimeraz	0,5 µl	2,5 Ü
DNA	2 µl	100-200 ng
ddH ₂ O	31,5 µl	

Farklı PCR termal koşulları denenmiş ve PCR ürün kalitesi örneklerle bağlı olarak farklılık gösterdiği için iki farklı PCR programı kullanılmıştır. Kullanılan PCR termal koşulları çizelge 3.4 ve çizelge 3.5’de verilmiştir. Örneklerin PCR ile çoğaltılmasında MJ Research DNA Engine Tetrad2 Gradient Thermocycler kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 COI gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan I. PCR programı

95’de	3 dakika	Ön Denatürasyon
95°C’de	1 dakika 30 saniye	} 35 Döngü
52°C’de	1 dakika 30 saniye	
72°C’de	1 dakika 30 saniye	
72°C’de	6 dakika	Son Uzama

Çizelge 3.5 COI gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan II. PCR programı

95°C'de	3 dakika	Ön Denatürasyon
94°C'de	30 saniye	} 5 Döngü
45°C'de	40 saniye	
72°C'de	1 dakika	
94°C'de	30 saniye	} 35 Döngü
52°C'de	40 saniye	
72°C'de	1 dakika	
72°C'de	10 dakika	Son Uzama

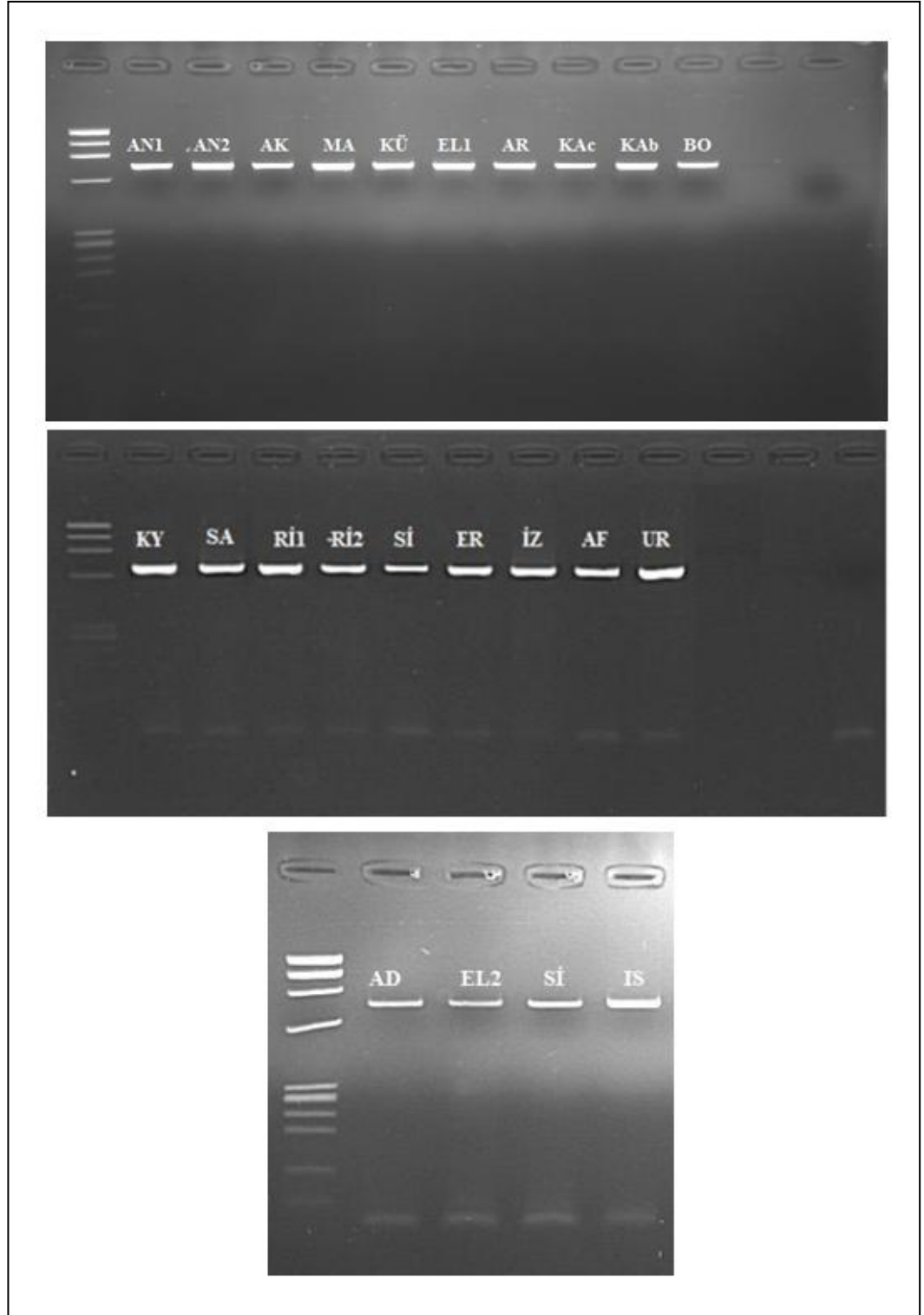
3.3.4 Çoğaltılan gen bölgesinin jel elektroforezi

Çoğaltılan gen bölgesine ait PCR ürününü görüntüleyebilmek için jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

Jel elektroforezi için gerekli olan çözeltiler ve kimyasal maddeler:

- 5X Trisma Base EDTA (TBE)
- 1X Trisma Base EDTA (TBE)
- Ethidium Bromide (10 mg/ml)
- Agaroz (Sigma)
- QX DNA Marker 9 Hae III (Fermantas)
- 6X Loading Dye (Promega)

%2'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Scie-Plas HU10W) yerleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri 5 µl yükleme tamponuyla (6X Loading Dye, Promega) karıştırılarak %2'lik agaroz jele yüklenmiştir. Jel'deki ilk kuyuya QX DNA Marker 9 Hae III (Fermantas) yüklenmiştir. Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra jel 1X TBE (Trisma Base, Borik Asit, EDTA) tamponunda 120 Voltta 30-35 dk yürütülmüş ve ardından ultraviyole görüntüleme sisteminde (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) görüntülenmiştir. Çalışılan popülasyonlara ait jel elektroforez görüntüsü şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Çalışılan populasyonlara ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü

3.3.5 PCR ürününün saflaştırılması (Pürüfikasyon)

PCR ürününün saflaştırılmasında QIAquick PCR Purification Kit kullanılmıştır (<http://www.qiagen.com> 2012) Saflaştırılan PCR ürünlerinden 4'er µl alınarak 4 µl 6X Loading Dye (Promega) ile karıştırılmış ve %2'lik agaroz jelde, 120 voltta 30 dakika yürütülerek UV görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.3.6 DNA dizi analizi

PCR ürününün saflaştırılması işleminden sonra iyi sonuç veren 201 örneğin sırasıyla sekans PCR'ı, etanol presipitasyonu (etanolle çöktürme) ve son olarak da dizi analizleri yapılmıştır. Pürifiye edilmiş gen bölgelerine ait nükleotit dizileri, "Sanger Dideoksinükleotit Zincir Sonlanması" prensibi ile (Sanger vd. 1977), ddNTP'lerin varlığında sekans PCR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Dideoksinükleotit zincir sonlanma reaksiyonunu gerçekleştirmek için GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter 608120) kullanılmıştır. Sekans PCR protokolü çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 Sekans PCR protokolü

SEKANS PCR PROTOKOLÜ	
Reaksiyon Karışımı	PCR Programı
Premix (4µl)	96°C'de 3 dakika
Primer (forward veya reverse) 1.6pmol (1µl)	96°C'de 20 saniye
DNA (Pürüfikasyon ürünü)	50°C'de 20 saniye
dH ₂ O	60°C'de 4 saniye
	30 Döngü

Zincir sonlanma reaksiyonu sonrasında reaksiyona katılmayan primer, ddNTP gibi reaksiyon artıklarının uzaklaştırılması amacıyla etanol presipitasyonu, Griffith University Ethanol/EDTA/Sodium Acetate Precipitasyon Protokol

(<http://www.griffith.edu.tr> 2012)’den modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Protokol basamakları aşağıdaki gibidir.

- Örnek başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat olacak şekilde stop solüsyon karışımı hazırlandı.
- Stop solüsyon karışımından PCR ürünlerinin olduğu her bir ependorf tüpe 2 µl dağıtıldı, santrifüjde spin edildi.
- Örnekler PCR örneklerinin olduğu ependorf tüplerden alınıp 0,5 µl’lik yeni ependorf tüplere aktarıldı. Ardından 35 µl etil alkol (%100 ve 20°C) eklendi. Tüpler ters yüz edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 10 dakika santrifüj (+4°C 14.000 rpm) yapıldı.
- Peletin bulunduğu kısma değmeden supernatant pipetle çekilerek uzaklaştırıldı, ardından 130 µl etil alkol (%70 -20°C) eklenerek tüpler ters yüz edildi.
- 10 dakika santrifüj (+4°C 14.000 rpm) yapıldı.
- Tüpler fazla sarsılmadan ters çevrilerek supernatant uzaklaştırıldı, ardından 130 µl etil alkol (%70 -20°C) eklenerek tüpler ters yüz edildi.
- 10 dakika santrifüj (+4°C 14.000 rpm) yapıldı.
- Tüpler fazla sarsılmadan ters çevrilerek supernatant uzaklaştırıldı, boş tüpler spin edildi.
- Tüpler vakumlu ısıtmalı santrifüj cihazında 10 dk vakumlandı. Böylece presipitasyon (çöktürme) sonrası pelletler elde edilmiş oldu.

Presipitasyon sonrası elde edilen pelletler formamid içeren bir solüsyonda çözünerek, otomatik DNA dizileme cihazı (Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System) platelerine yüklendi, son olarak buharlaşmayı engellemek amacı ile tüm örneklerin üzerlerine 1 damla mineral yağ (Beckman Coulter S505019) damlatıldı ve dizi analizleri yapıldı.

3.4 Dizilerin Düzeltilmesi, Hizalanması ve Filogenetik Analizler

Dizi analizi sonucu elde edilen kromatogram dosyaları Chromas Lite 2.01 (www.techne.lysium.com.au 2012) programı ile incelenmiştir. Bunun için tek bireye ait ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerin kromatogram dosyaları tek tek açılmış, gözle piklerin doğruluğu kontrol edilmiş ve gerekli düzeltmeler yapıldıktan sonra her iki primere ait dizi fasta formatına dönüştürülmüştür. Ardından bu iki fasta dosyası tek bireye ait forward ve reverse diziyi bulunduran fasta dosyası şeklinde kaydedilmiştir. Hizalama ve budalama işlemleri BioEdit 7.1.3 (Hall 1999) programı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için önce her bir birey kendi içinde hizalanmış ve budanmış ardından, tüm diziler bir araya getirilerek ortak baz uzunluğunda olacak şekilde budanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir.

Konsensus dizilerin teşhis edilen türe ait doğru dizi olup olmadığını araştırmak üzere NCBI veri tabanındaki COI gen bölgesine ait kayıtlı dizilerle BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapılmıştır.

DnaSP 5.10.01 (Rozas vd. 2010) programı ile diziler arasındaki nükleotit farklılıklarına göre özgün haplotipler tespit edilip, bu haplotiplere göre gen ağaçları (filogenetik ağaçlar) oluşturulmuştur.

Populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyan gen ağaçları MEGA 5 (Tamura vd. 2011) programı ile neighbour joining (NJ), maximum parsimony (MP) ve maximum likelihood (ML) metodları kullanılarak oluşturulmuştur.

-
tir. MP gen ağacı, heuristic search algoritması olan ağacı ikiye bölüp yeniden bağlama (TBR) yoluyla oluşturulmuştur. ML analizleri için en uygun mutasyon modelini belirlemede MEGA5 programının önerdiği BIC (Bayesian Information Criterion) kriteri göz önünde bulundurularak uygun mutasyon modeli belirlen tir. Ağaçların güvenilirliğini ortaya koymak için her metotta 1000 tekrarlı bootstrap analizi uygulanmıştır (Felsenstein 1985).

Filogenetik ilişkiyi değerlendirmek üzere NJ, MP ve ML metodlarına ilaveten farklı bir yaklaşım olan Bayesian yaklaşımı (Yang ve Rannala 1997, Huelsenbeck vd. 2001) ile Bayesian ağacı oluşturulmuştur. Bayesian ağacı oluşturmak için en uygun mutasyon modeli JModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) programıyla belirlenmiştir. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) temelli Bayesian filogenetik analizi MrBayes (Huelsenbeck vd. 2001) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan gen ağaçları FigTree 1.3.1 (Rambaut 2009) programı ile görselleştirilmiş ve manipüle edilmiştir.

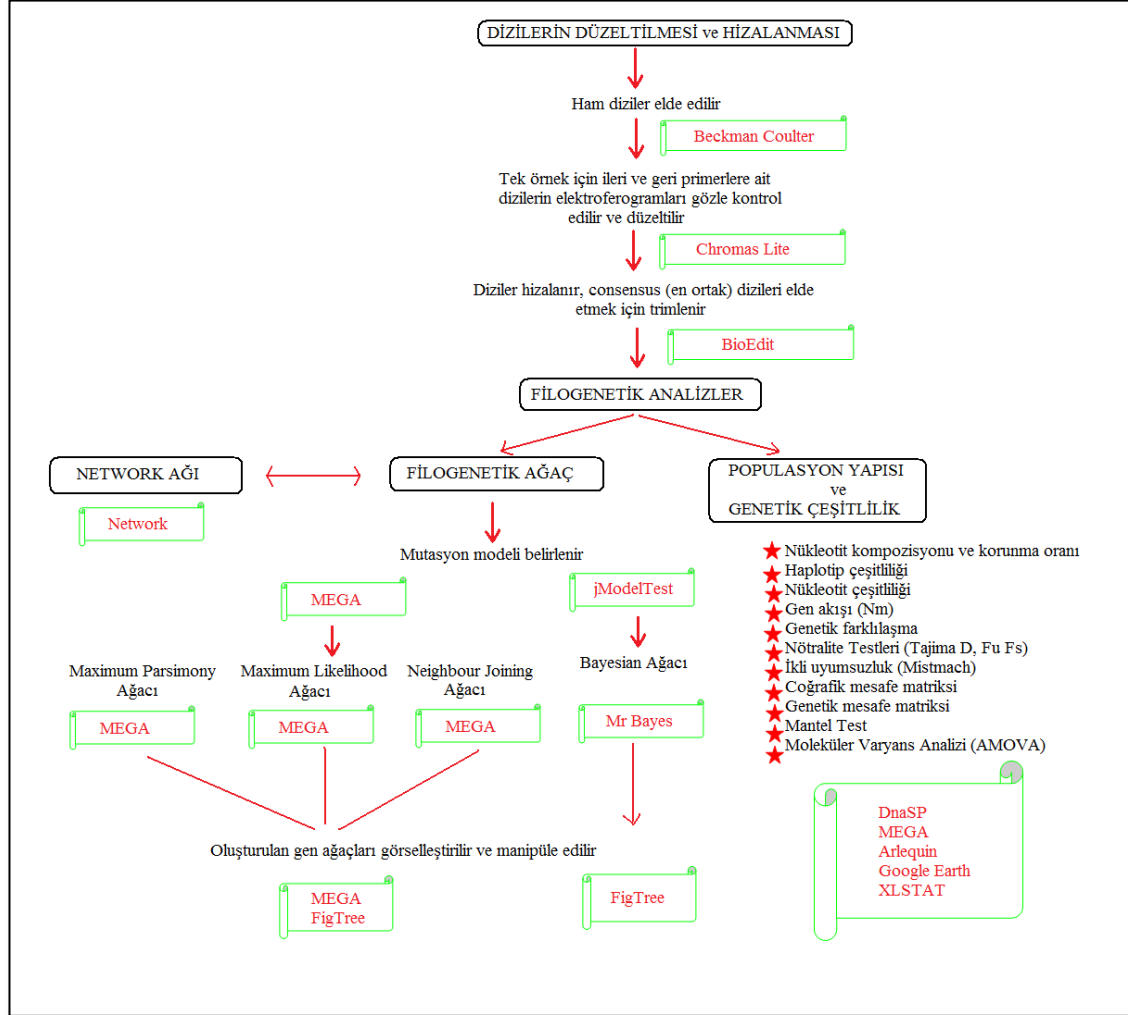
Ayrıca çalışılan gen bölgelerine ait haplotipler arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek için Network (Bendelt vd. 1999) programı kullanılarak network ağları oluşturulmuştur.

Genetik varyasyonun hiyerarşik yapılanmasını ortaya koymak üzere Arlequin 3.5 (Excoffier vd. 2010) paket programı kullanılarak, Moleküler varyans analizi (AMOVA) yapılmıştır. AMOVA analizleri örneklem sayısı dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Moleküler varyans analizlerinin ortaya koyduğu toplam genetik varyasyon; populasyonlar arası ve populasyon içi seviyelerde hesaplanmıştır. Bu parametrelerin anlamlılığı 1000 permütasyonlu mesafe matrisiyle ortaya konmuştur.

Haplotip (hç), nükleotit çeşitliliği (π) ve gen akışı (Nm) değerleri, DnaSP 5.10.01 (Rozas vd. 2010) programı ile belirlenmiştir. Bireyler arasındaki ikili uyumsuzluk dağılımı (mismatch distribution) analizleri, populasyon büyümesi-düşüşü modeli (growth-decline model) altında DnaSP 5.10.01 programı ile gerçekleştirilmiştir. Yine DnaSP 5.10.01 programı ile nötralite testleri yapılmış, populasyonların nötraliteden uzaklaşıp uzaklaşmadığını ortaya koymak için Tajima'nın D (Tajima 1989) ve Fu'nun Fs (Fu 1997) değerleri kullanılmıştır.

Populasyonlar arası genetik mesafenin coğrafik mesafe ile olan ilişkisini belirleyebilmek için Mantel testi yapılmıştır. Bu testte genetik mesafe matrisi için DnaSP 5.10.01 programı ile hesaplanan F_{ST} değerleri, coğrafi mesafe matrisi için ise Google Earth yardımıyla kuşbakışı ölçülen km cinsinden değerler kullanılmıştır. Mantel test analizleri XLSTAT programı (<http://www.xlstat.com/en/about-us.html> 2013) ile

gerçekleştirilmiştir. Moleküler çalışmaların sonuçlarını değerlendirmek üzere kullanılan analiz programları ve kullanım sırası şekil 3.3’de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 3.3 Moleküler çalışmalarda kullanılan analiz programları ve kullanım sırası

Dizilerin düzeltilmesi, hizalanması aşamalarından sonra analize uygun olduğu belirlenen 142 örnek seçilmiş ve bütün analizler bu örnekler üzerinden yapılmıştır. Analizlerde dış grup olarak, *Daphnia* cinsi ile yakın akraba olduğu bilinen 3 tane *Simocephalus* (*Simocephalus expinosus*, *Simocephalus serrulatus*, *Simocephalus vetulus*) türü kullanılmıştır. Dış gruplara ait dizler GenBank’tan alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 2012). Ayrıca taksonomik açıdan karşılaştırma olanağı sunması için teşhisi yapılan türlere ait GenBank veri tabanında bulunan güvenilir olduğu düşünülen 26 tane COI dizisi de filogenetik ağaç ve network analizlerine dahil

edilmiştir. Analizlerde kullanılan bu çalışmaya ait örnekler ve GenBank'dan alınan örnekler ve yine GenBank'dan alınan dış grup örneklerine ait bilgiler, çizelge 3.7-3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.7 Analizlerde kullanılan tez çalışmasına ait örnekler, örnek kodları ve lokaliteleri

Örnek No	Lokale	Tür ismi
1 AD15	Adana/Seyhan Baraj Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
2 AD16	Adana/Seyhan Baraj Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
3 EL2.1	Elazığ/Keban Baraj Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
4 EL2.2	Elazığ/Keban Baraj Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
5 EL2.3	Elazığ/Keban Baraj Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
6 IS1	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
7 IS2	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
8 IS6	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
9 IS7	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
10 IS8	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
11 IS9	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
12 IS12	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
13 IS15	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
14 IS16	Isparta/Eğridir Gölü	<i>Daphnia cucullata</i>
15 SA1	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
16 SA2	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
17 SA3	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
18 SA4	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
19 SA6	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
20 SA7	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
21 SA9	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
22 SA11	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
23 SA13	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
24 SA14	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>
25 SA16	Sakarya/Acarlar Gölü	<i>Daphnia curvirostris</i>

Çizelge 3.7 Analizlerde kullanılan tez çalışmasına ait örnekler, örnek kodları ve lokaliteleri (devam)

26	Sİ1	Sinop/Aklıman Mevkii	<i>Daphnia curvirostris</i>
27	Sİ4	Sinop/Aklıman Mevkii	<i>Daphnia curvirostris</i>
28	AF3	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
29	AF4	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
30	AF5	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
31	AF6	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
32	AF7	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
33	AF8	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
34	AF15	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
35	AF18	Afyon/Gebeceler Baraj Göleti	<i>Daphnia galeata</i>
36	İZ2	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
37	İZ3	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
38	İZ5	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
39	İZ6	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
40	İZ8	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
41	İZ10	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
42	İZ14	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
43	İZ17	İzmir/Gölcük Gölü	<i>Daphnia galeata</i>
44	UR2	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
45	UR3	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
46	UR4	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
47	UR7	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
48	UR8	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
49	UR18	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
50	UR19	Urfa/Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>Daphnia galeata</i>
51	AK3	Aksaray/Mamasın Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
52	AK4	Aksaray/Mamasın Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
53	AK7	Aksaray/Mamasın Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
54	AK8	Aksaray/Mamasın Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
55	AK10	Aksaray/Mamasın Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
56	AN1.1	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
57	AN1.2	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
58	AN1.3	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
59	AN1.5	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
60	AN1.7	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>

Çizelge 3.7 Analizlerde kullanılan tez çalışmasına ait örnekler, örnek kodları ve lokaliteleri (devam)

61	AN1.21	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
62	AN1.22	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
63	AN1.23	Ankara/Eymir Gölü	<i>Daphnia magna</i>
64	AN2.2	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
65	AN2.3	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
66	AN2.4	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
67	AN2.5	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
68	AN2.6	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
69	AN2.7	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
70	AN2.10	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
71	AN2.13	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
72	AN2.15	Ankara/Mogan Gölü	<i>Daphnia magna</i>
73	EL1.1	Elazığ/Hazar Gölü Mevkii	<i>Daphnia magna</i>
74	ED2	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
75	ED3	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
76	ED4	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
77	ED5	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
78	ED7	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
79	ED8	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
80	ED9	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
81	ED10	Edirne/İpsala Balık Çiftliği	<i>Daphnia magna</i>
82	KÜ4	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
83	KÜ9	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
84	KÜ10	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
85	KÜ11	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
86	KÜ16	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
87	KÜ18	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
88	KÜ27	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
89	KÜ28	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
90	KÜ34	Kütahya/Sulak Alan	<i>Daphnia magna</i>
91	MA2	Manisa/Demirköprü Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
92	MA5	Manisa/Demirköprü Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
93	MA6	Manisa/Demirköprü Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
94	MA7	Manisa/Demirköprü Baraj Gölü	<i>Daphnia magna</i>
95	AR1	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>

Çizelge 3.7 Analizlerde kullanılan tez çalışmasına ait örnekler, örnek kodları ve lokaliteleri (devam)

96	AR3	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
97	AR4	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
98	AR5	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
99	AR8	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
100	AR9	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
101	AR12	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
102	AR14	Ardahan/Kındırğa Sazlığı	<i>Daphnia pulex</i>
103	KAb2	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
104	KAb3	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
105	KAb4	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
106	KAb6	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
107	KAb9	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
108	KAb10	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
109	KAb12	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
110	KAc1	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
111	KAc3	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
112	KAc6	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
113	KAc7	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
114	KAc9	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
115	KAc10	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
116	KAc12	Kars/Yeşil Göl	<i>Daphnia pulex</i>
117	BO1	Bolu/Yeniçağa Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
118	BO2	Bolu/Yeniçağa Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
119	BO3	Bolu/Yeniçağa Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
120	BO6	Bolu/Yeniçağa Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
121	ER1	Erzurum/Tortum Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
122	ER4	Erzurum/Tortum Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
123	ER5	Erzurum/Tortum Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
124	KY2	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
125	KY3	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
126	KY10	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
127	KY11	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
128	KY12	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
129	KY13	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
130	KY15	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>

Çizelge 3.7 Analizlerde kullanılan tez çalışmasına ait örnekler, örnek kodları ve lokaliteleri (devam)

131	KY16	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
132	KY17	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
133	KY19	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
134	KY20	Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>Daphnia pulex</i>
135	Rİ1.6	Rize/Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	<i>Daphnia pulex</i>
136	Rİ1.8	Rize/Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	<i>Daphnia pulex</i>
137	Rİ1.11	Rize/Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	<i>Daphnia pulex</i>
138	Rİ1.12	Rize/Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	<i>Daphnia pulex</i>
139	Rİ1.14	Rize/Verçenik Dağ Gölü (Kuzey)	<i>Daphnia pulex</i>
140	Rİ1.16	Rize/Verçenik Dağ Gölü (Kuzey)	<i>Daphnia pulex</i>
141	Rİ2.1	Rize/Verçenik Dağ Gölü (Güney)	<i>Daphnia pulex</i>
142	Rİ2.2	Rize/Verçenik Dağ Gölü (Güney)	<i>Daphnia pulex</i>

Çizelge 3.8 GenBank'dan alınan örnekler, GenBank numaraları ve alındıkları lokaliteler

GenBank No	Lokalite	Tür İsmi
EF375869	Hollanda	<i>Daphnia cucullata</i>
EF375870	Çek Cumhuriyeti	<i>Daphnia cucullata</i>
EF375872	Almanya	<i>Daphnia curvirostris</i>
FJ427487	Kanada	<i>Daphnia curvirostris</i>
EF375868	İsveç	<i>Daphnia galeata</i>
EF375867	Hollanda	<i>Daphnia galeata</i>
AY803046	Çek Cumhuriyeti	<i>Daphnia magna</i>
AY803069	İspanya	<i>Daphnia magna</i>
JF750769	Rusya	<i>Daphnia magna</i>
EU702138	Meksika	<i>Daphnia magna</i>
AF217106	Kuzey Amerika	<i>Daphnia magna</i>
DQ166849	İsrail	<i>Daphnia magna</i>
AY380449	Kuzey Amerika	<i>Daphnia pulex</i>
AY745244	Kenya	<i>Daphnia pulex</i>
EU152321	Çek Cumhuriyeti	<i>Daphnia pulex</i>
EU152320	Belçika	<i>Daphnia pulex</i>
GQ475277	Kanada	<i>Daphnia pulex</i>

Çizelge 3.8 GenBank’den alınan örnekler, GenBank numaraları ve alındıkları lokaliteler (devam)

HM622593	Yeni Zelanda	<i>Daphnia pulex</i>
DQ340843	Amerika Birleşik Devletleri	<i>Daphnia pulex</i>
AF117817	Kanada	<i>Daphnia pulex</i>
AF489525	Arjantin	<i>Daphnia pulicaria</i>
JN233925	Kanada	<i>Daphnia pulicaria</i>
FJ427506	Kanada	<i>Daphnia tenebrosa</i>
JN233926	Kanada	<i>Daphnia tenebrosa</i>
HM131366	Amerika Birleşik Devletleri	<i>Daphnia melanica</i>
FJ427495	Amerika Birleşik Devletleri	<i>Daphnia melanica</i>

Çizelge 3.9 GenBank’den alınan dış grup örneklerinin GenBank numaraları ve alındıkları lokaliteler

GenBank No	Lokalite	Tür İsmi
EU702296	Meksika	<i>Simocephalus expinosus</i>
AB549198	Tayvan	<i>Simocephalus serrulatus</i>
AB549192	Tayvan	<i>Simocephalus vetulus</i>

4. BULGULAR

4.1 Morfolojik Tür Tayini Sonuçları

Bu araştırmada, toplam 22 lokaliteden örnek toplanmış, ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile yapılan tür tayini sonucunda 5 türün varlığı tespit edilmiştir. Türlerin lokalitelere dağılımı çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Lokalitelere göre teşhis edilen türler

Lokalite Kodu	Örnekleme Lokalitesi	Bölge	Tür İsmi
AD	ADANA/Seyhan Baraj Gölü	Akdeniz	<i>Daphnia cucullata</i>
IS	ISPARTA/Eğridir Gölü	Akdeniz	<i>Daphnia cucullata</i>
EL2	ELAZIĞ/Keban Baraj Gölü	Doğu Anadolu	<i>Daphnia cucullata</i>
Sİ	SİNOP/Aklıman mevkii	Karadeniz	<i>Daphnia curvirostris</i>
SA	SAKARYA/Acarlar Gölü	Marmara	<i>Daphnia curvirostris</i>
İZ	İZMİR/Gölcük Gölü	Ege	<i>Daphnia galeata</i>
AF	AFYON/Gebeceler Baraj Göleti	Ege	<i>Daphnia galeata</i>
UR	URFA/Atatürk Baraj Gölü	G.Doğu Anadolu	<i>Daphnia galeata</i>
AN1	ANKARA/Eymir Gölü	İç Anadolu	<i>Daphnia magna</i>
AN2	ANKARA/Mogan Gölü	İç Anadolu	<i>Daphnia magna</i>
AK	AKSARAY/Mamasın Baraj Gölü	İç Anadolu	<i>Daphnia magna</i>
EL1	ELAZIĞ/Hazar Gölü Yakını	Doğu Anadolu	<i>Daphnia magna</i>
KÜ	KÜTAHYA/Sulak alan	Ege	<i>Daphnia magna</i>
MA	MANİSA/Demirköprü Baraj Gölü	Ege	<i>Daphnia magna</i>
ED	EDİRNE/İpsala mevkii	Marmara	<i>Daphnia magna</i>
AR	ARDAHAN/Kındırğa Sazlığı	Doğu Anadolu	<i>Daphnia pulex</i>
KA	KARS/Yeşil Göl	Doğu Anadolu	<i>Daphnia pulex</i>
BO	BOLU/Yeniçağa Gölü	Karadeniz	<i>Daphnia pulex</i>
KY	KAYSERİ/Sarımsaklı Baraj Gölü	İç Anadolu	<i>Daphnia pulex</i>
ER	ERZURUM/Tortum Gölü	Doğu Anadolu	<i>Daphnia pulex</i>
Rİ1	RİZE/Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	Karadeniz	<i>Daphnia pulex</i>
Rİ2	RİZE/Verçenik Dağ Gölü(Güney)	Karadeniz	<i>Daphnia pulex</i>
22 Lokalite			5 Tür

Işık mikroskobu yardımı yapılan tür tayinlerinin ardından, tür teşhisinde oldukça önemli karakterlerden ikisi olan postabdomendeki anal diş sayısı ve postabdominal tırnaktaki tarakların yapısı ve büyüklüğü, taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

4.1.1 *Daphnia cucullata* Sars, 1862 tür teşhisi

Adana/Seyhan Baraj Gölü (AD), Isparta/Eğirdir Gölü (IS) ve Elazığ/Keban Baraj Gölü (EL2) populasyonları *Daphnia cucullata* olarak teşhis edilmiştir. Tür teşhisi sırasında belirlenen karakterler aşağıda verilmiştir.

- Karapaks uzun ve oval yapıdadır.
- Karapaksın ventral (ön) kenarı yarısına kadar, dorsal (arka) kenarı ise kuyruk dikeninin kaidesine kadar dikenlidir.
- Kuyruk oldukça uzundur (hemen hemen karapaksın yarısı kadar)
- Baş miğfer şeklinde kukuletalıdır.
- Göz küçük yapıdadır ve başın ön tarafına yakın yer almaktadır.
- Göz beneği bulunmamaktadır.
- Rostrum kısa ve yuvarlaktır.
- Antenül küçük, başın ventral kenarını aşmamaktadır. Antenülün ucundaki tentaküller içerden başlamakta, ancak rostrumu aşmamaktadır.
- Postabdomen küçüktür ve dorsal kenarı oldukça düzdür.
- 4 tane postabdominal lob bulunmaktadır ve bunlardan 1. lob diğerlerine kıyasla oldukça büyüktür ve loblar dalgali yapıdadır.
- Postabdominal tırnak 3 tane tarak bulundurur. Bunlar dikenlerin (spin) büyüklük sırasına göre; Tarak1=Tarak2=Tarak3 şeklindedir.
- Postabdomendeki anal diş sayısı *Daphnia cucullata* için 6-8 olarak belirlenmiştir. Anal diş sayısı AD populasyonu için 8, IS populasyonu için 6-8, EL2 populasyonu için 8 olarak sayılmıştır.
- AD populasyonunun IS ve EL2 populasyonlarından nispeten daha büyük vücutlu olduğu gözlenmiştir.

- Epifiyum D şeklindedir, yumurta odaları koyu kahverengi ya da siyahımsı renktedir. Epifiyumun anterior (ön-üst) kısmında kısa dikensiz bir çıkıntı, posterior (arka-alt) kısmında ise kısmen uzun olan dikenli bir çıkıntı mevcuttur.

Daphnia cucullata populasyonlarına ait örnek sayısı az olduğu için, tür teşhisi çalışmalarında ve DNA izolasyonu aşamalarında kullanılmıştır. Bu nedenle bu türün SEM çalışması yapılamamıştır.

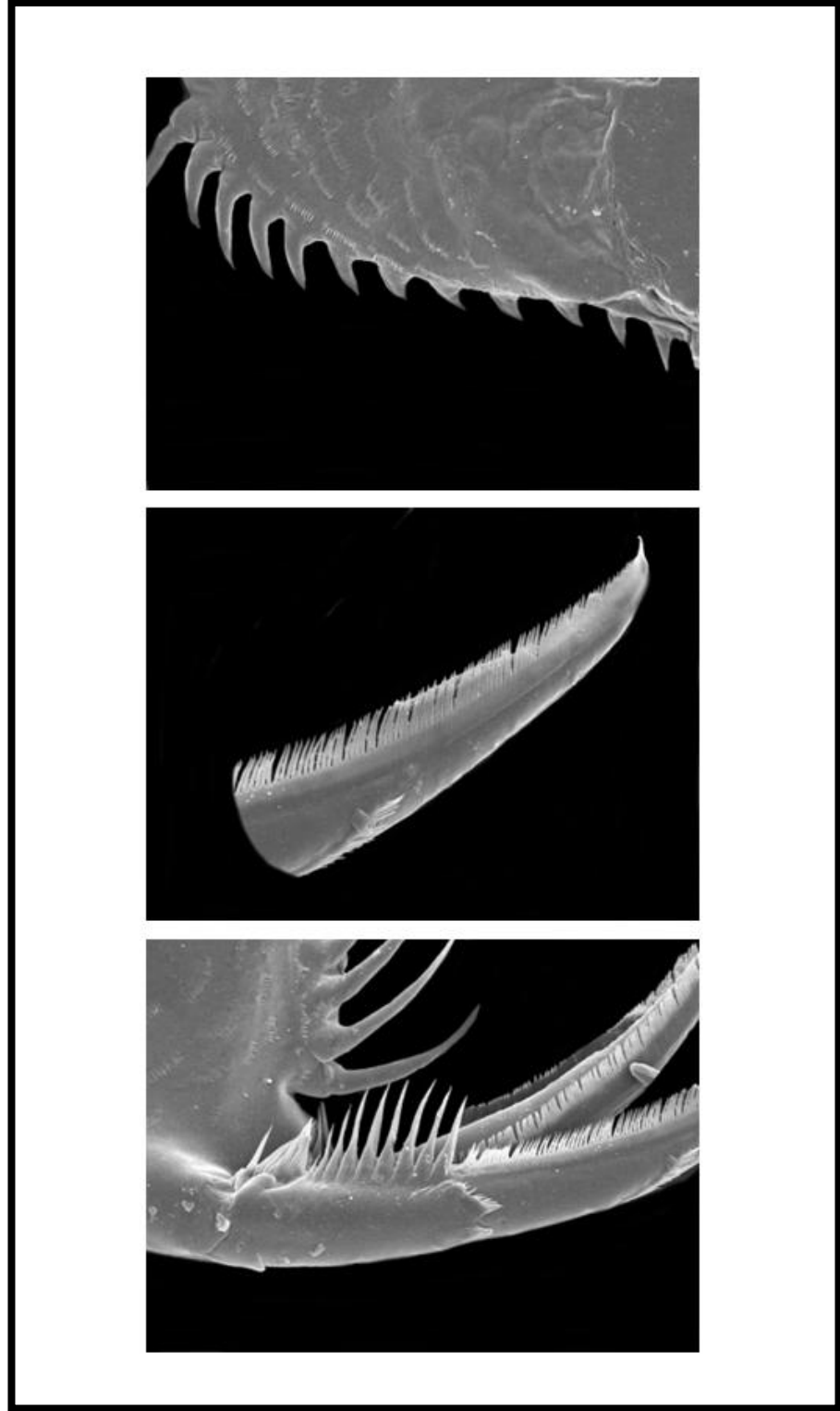
4.1.2 *Daphnia curvirostris* Elyamann, 1887 tür teşhisi

Sakarya/Acarlar Gölü (SA) ve Sinop/Aklıman mevki (Sİ) populasyonları *Daphnia curvirostris* olarak teşhis edilmiştir. SA ve Sİ populasyonlarına ait SEM görüntüleri şekil 4.1 ve şekil 4.2’de verilmiştir. Tür teşhisi sırasında belirlenen karakterler aşağıda verilmiştir.

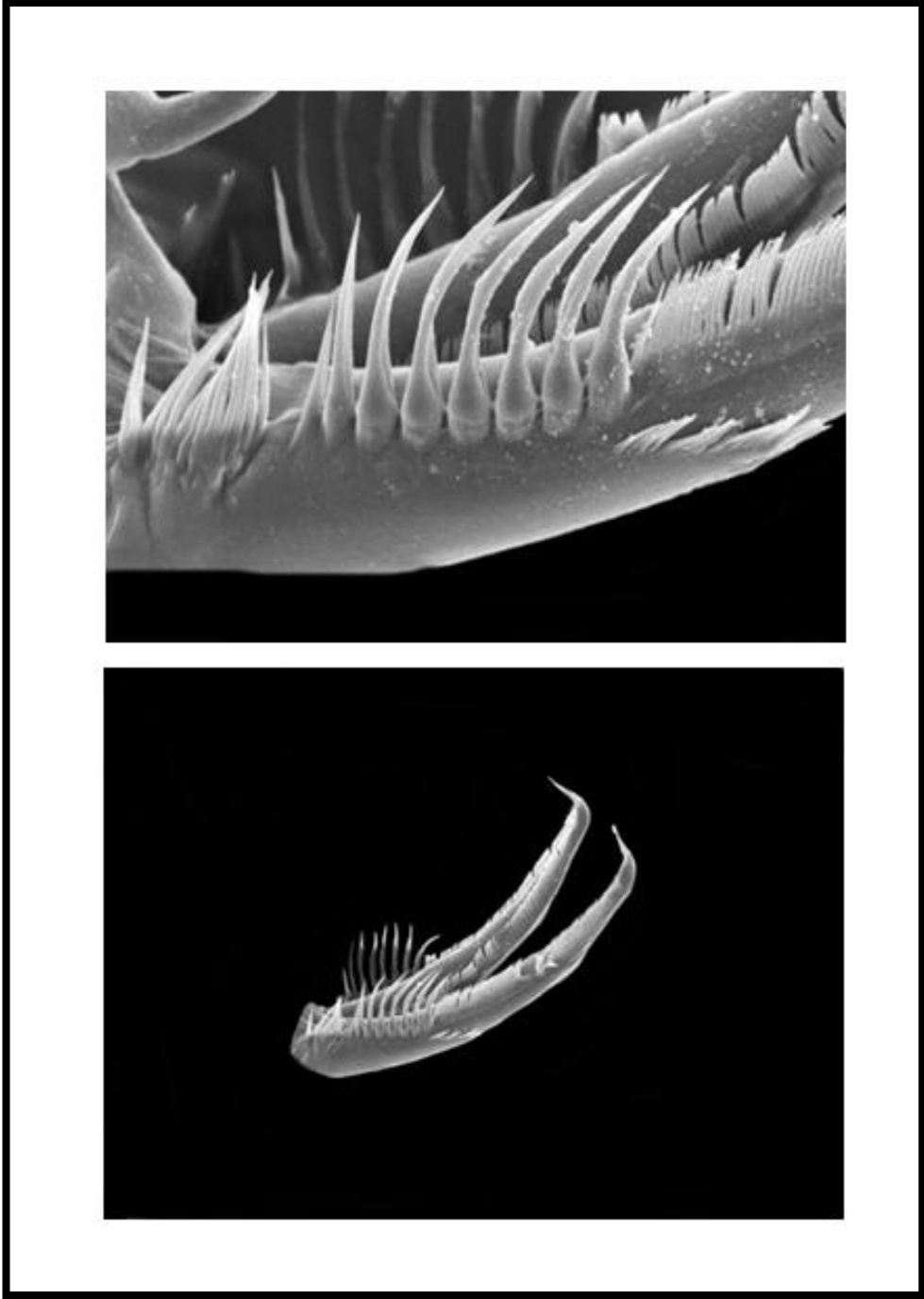
- Karapaksın yandan görünüşü ovaldir.
- Baş genel olarak yuvarlaktır, karapaksa oranla küçük değildir ve ön kenarı iç bükeydir.
- Kuyruk dkeni kısadır.
- Rostrum kısadır.
- Antenül küçüktür ve rostrumu aşmaz. Antenülden çıkan tentaküller de rostrumu aşmamaktadır.
- Göz büyüktür ve ön tarafa yakındır.
- Göz beneği vardır ve büyüktür.
- Vücudun ventral kısmının 1/3 kadarında ve vücudun dorsal kısmının kuyruk dikenine yakın olan kısmında küçük dikenler bulunur.
- Postabdomen konik yapıdadır, dorsal kısmı dış bükeydir.
- 4 tane postabdominal lob bulunur. Bu loblar üzerinde ince tüyler bulunur.
- Postabdomendeki anal diş sayısı *Daphnia curvirostris* için 9-14 olarak belirlenmiştir. Anal dişler güçlüdür ve uç tırnağa yakın olan kısımda daha büyük

olan dişler giderek küçülür. Anal diş sayısı SA populasyonu için 12, Sİ populasyonu için 11-12 olarak kaydedilmiştir.

- Postabdominal tırnak 3 tane tarak bulundurur. Bunlar, dikenlerin büyüklük sırasına göre; $Tarak2 \gg Tarak1 \geq Tarak3$ 'dür.
- Tarak2 deki diken sayısı *Daphnia curvirostris* için 7-15 olarak verilmiştir. SA populasyonu için Tarak2'deki diken sayısı 9-14, Sİ populasyonu için 7-8 olarak kaydedilmiştir.
- Epifiyum D şeklinde ve kahverengidir, 2 tane yumurta odası bulunur, yumurta odaları epifiyumun dorsal kenarına dik pozisyonudadır. Epifiyumun dorsal kenarı düzdür, diken bulundurmaz. Epifiyumun posterior kısmında ise kısa dikenli bir çıkıntı mevcuttur.



Şekil 4.1 Sakarya/Acarlar Gölü *Daphnia curvirostris* populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.2 Sinop/Aklıman mevkii *Daphnia curvirostris* populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı (SEM)

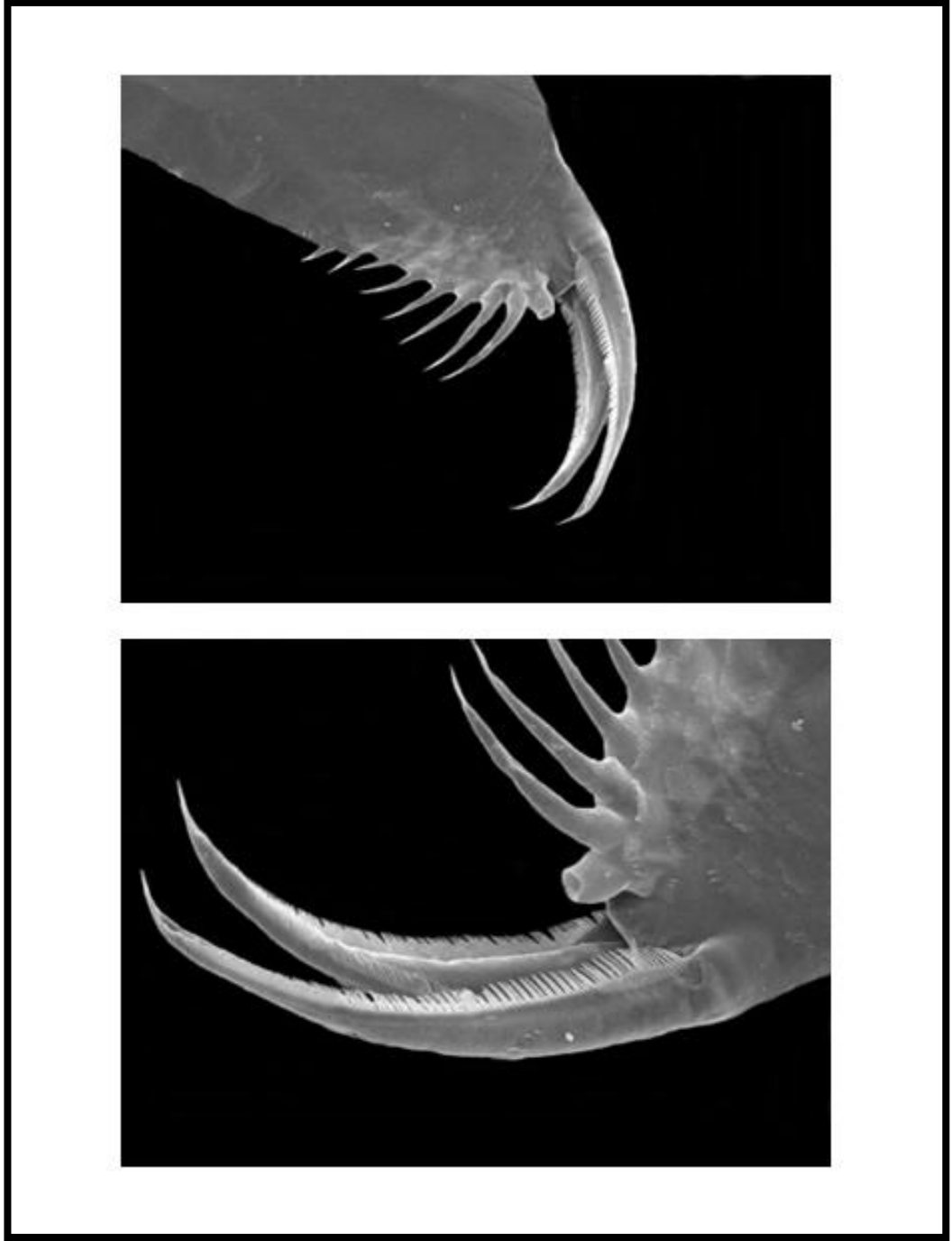
4.1.3 *Daphnia galeata* Sars, 1864 tür teşhisi

Afyon/Gebeceler Baraj Göleti (AF), İzmir/Gölcük Gölü (İZ) ve Urfa/Atatürk Baraj Gölü (UR) populasyonları *Daphnia galeata* olarak teşhis edilmiştir. Tür teşhisi sırasında belirlenen karakterler aşağıda verilmiştir. AF, İZ ve UR populasyonlarına ait SEM görüntüleri şekil 4.3-4.5’de verilmiştir.

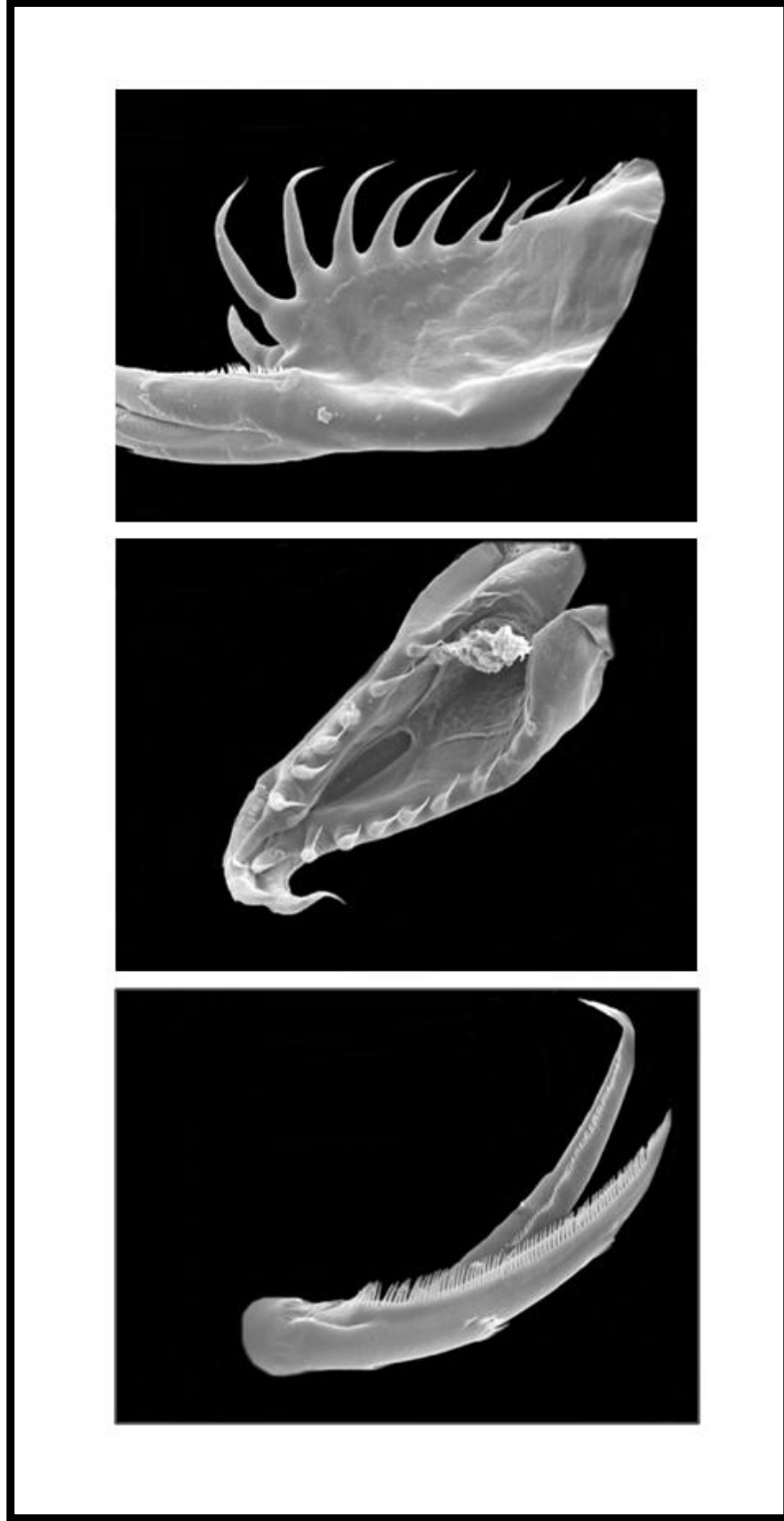
- Karapaksın yandan görünüşü ovaldir.
- Kuyruk spini kuvvetli, kısmen uzundur.
- Miğfer şeklinde bir baş yapısı görülmektedir. Bu miğfer şeklinde olan yapı yumuşak hatlara sahip olmayıp tepe kısmı sivridir. Baş vücuda oranla küçük değildir. Baş dorsal kısmındaki çukur yardımıyla vücuttan ayırt edilir.
- Rostrum kısa ve küttür, ucu çentikli bir yapıya sahiptir.
- Antenül kısa olup başın kenar kısmını aşmaz. Antenülden çıkan uzantılar rostruma ulaşır ve rostrumu aşar.
- Göz orta derecede büyüktür ve başın ön kısmına yakındır.
- Göz beneği vardır ve küçüktür.
- Karapaks üzerindeki dikenler ventralde karapaksın yarısını kaplarken dorsal kısımda sadece kuyruk dikeninin kaidesine yakın olan bölgede bulunur.
- Postabdomen konik yapıda olup dorsal kenarı düzdür. Postabdomende oldukça belirgin olan 3 lob ve tam gelişmemiş lobsu bir yapı bulunur. Bu loblardan ilkinde hiç seta (kıl, tüy) bulunmazken ikinci ve üçüncü lobların uç kısımlarında seta bulunur.
- Postabdomendeki anal diş sayısı *Daphnia galeata* için 9-12 olarak tanımlanmıştır. Uç tırnağa yakın olan kısımda daha büyük olan dişler giderek küçülür. Anal diş sayısı

İZ populasyonu için 8-9-10, AF populasyonu için 9-10, UR populasyonu için 10-11-12 olarak kaydedilmiştir..

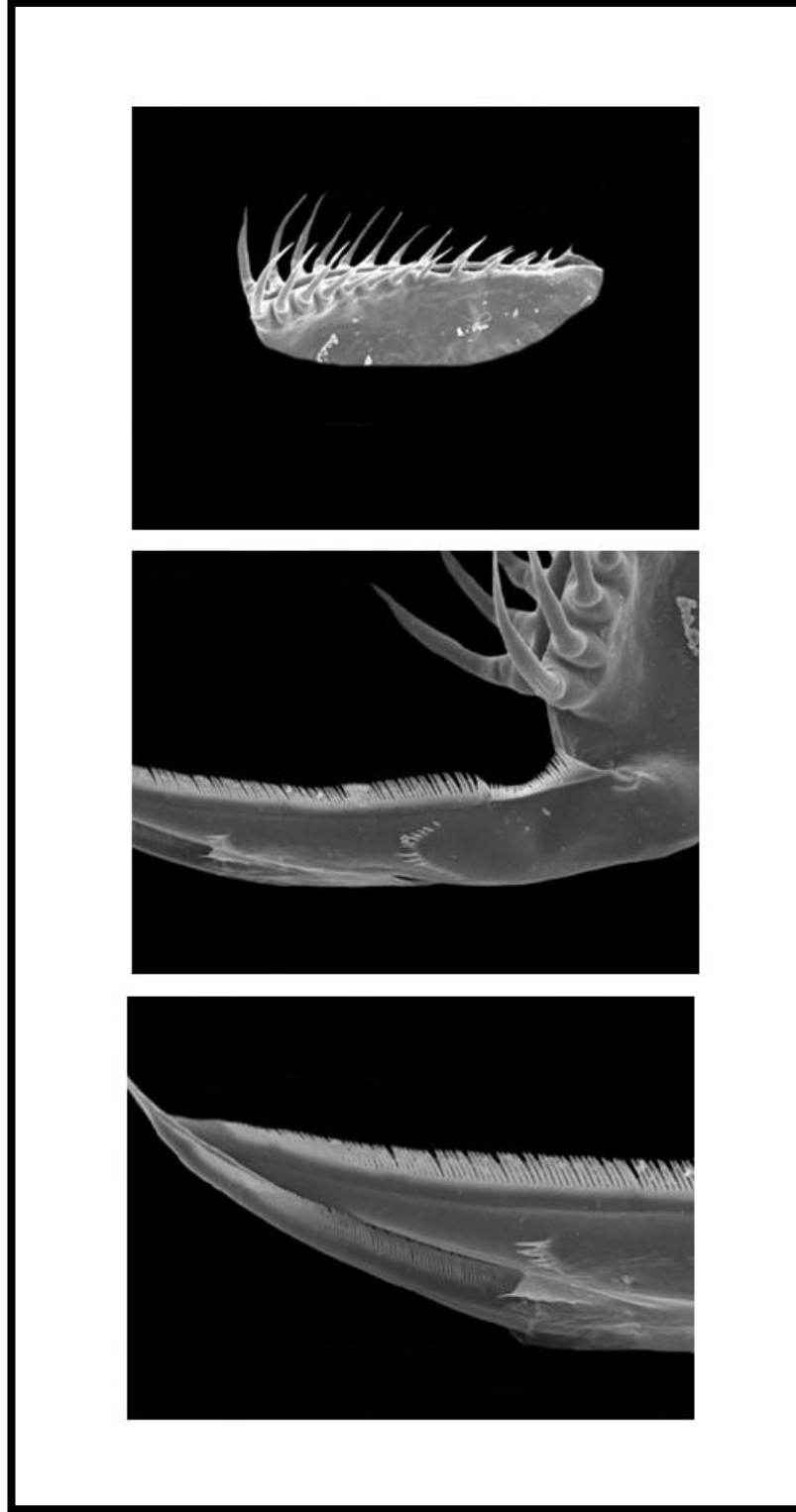
- Postabdominal tırnak 3 tane tarak bulundurur. Bunlar dikenlerin büyüklük sırasına göre; Tarak1=Tarak2=Tarak3 şeklindedir.
- Epifiyum D şeklinde ve kahverengidir, yumurta odaları epifiyumun dorsal kenarına dik pozisyonudadır. Epifiyumun dorsal kenarı düz ve dikensizdir. Epifiyumun anterior kısmında dikenisiz kısa, posterior kısmında oldukça uzun dikenli bir çıkıntı bulunur.



Şekil 4.3 Afyon/Gebeceler Baraj Göleti *Daphnia galeata* populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.4 İzmir/Gölcük Gölü *Daphnia galeta* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



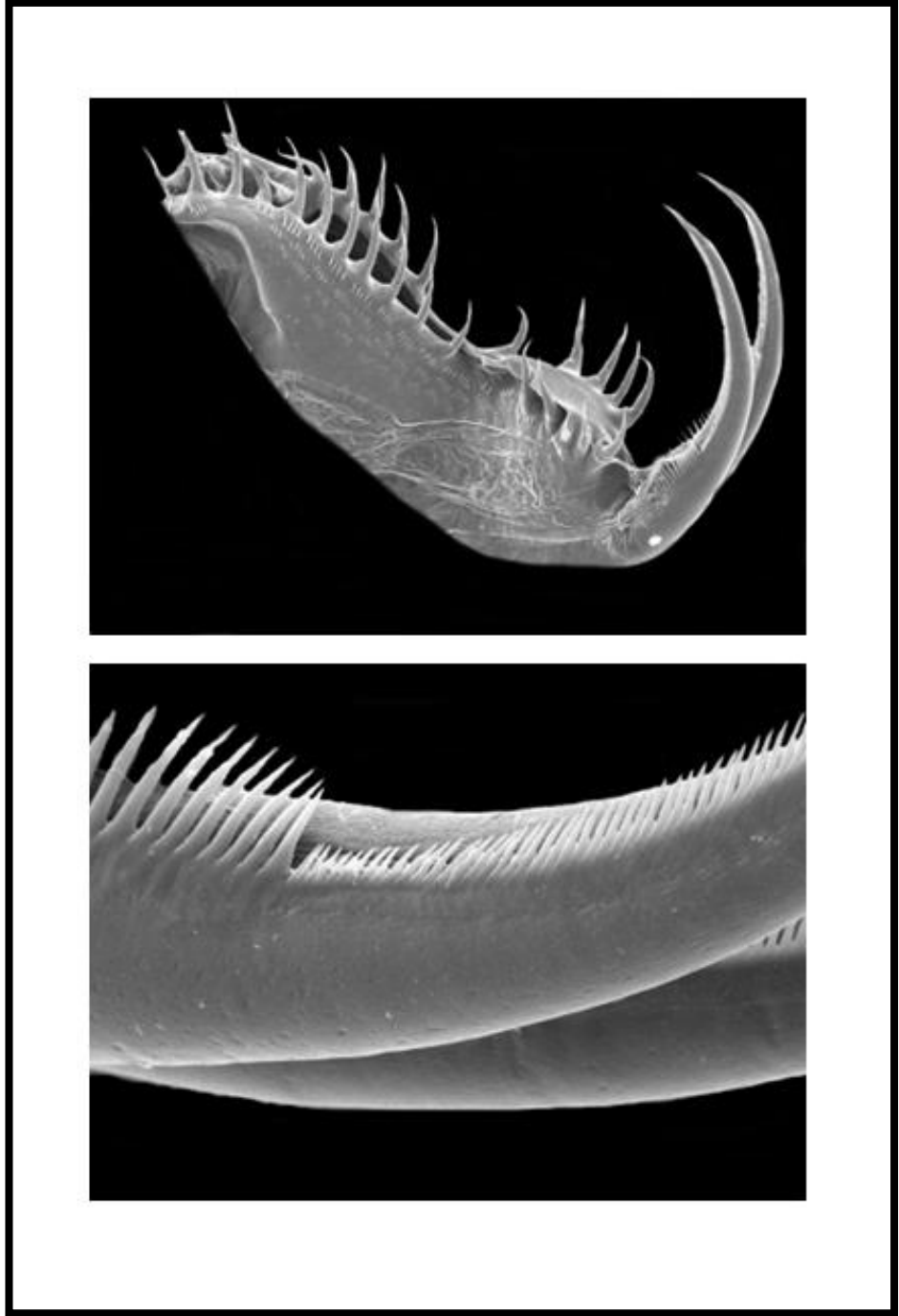
Şekil 4.5 Urfa/Atatürk Baraj Gölü *Daphnia galeta* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)

4.1.4 *Daphnia magna* Straus, 1820 tür teşhisi

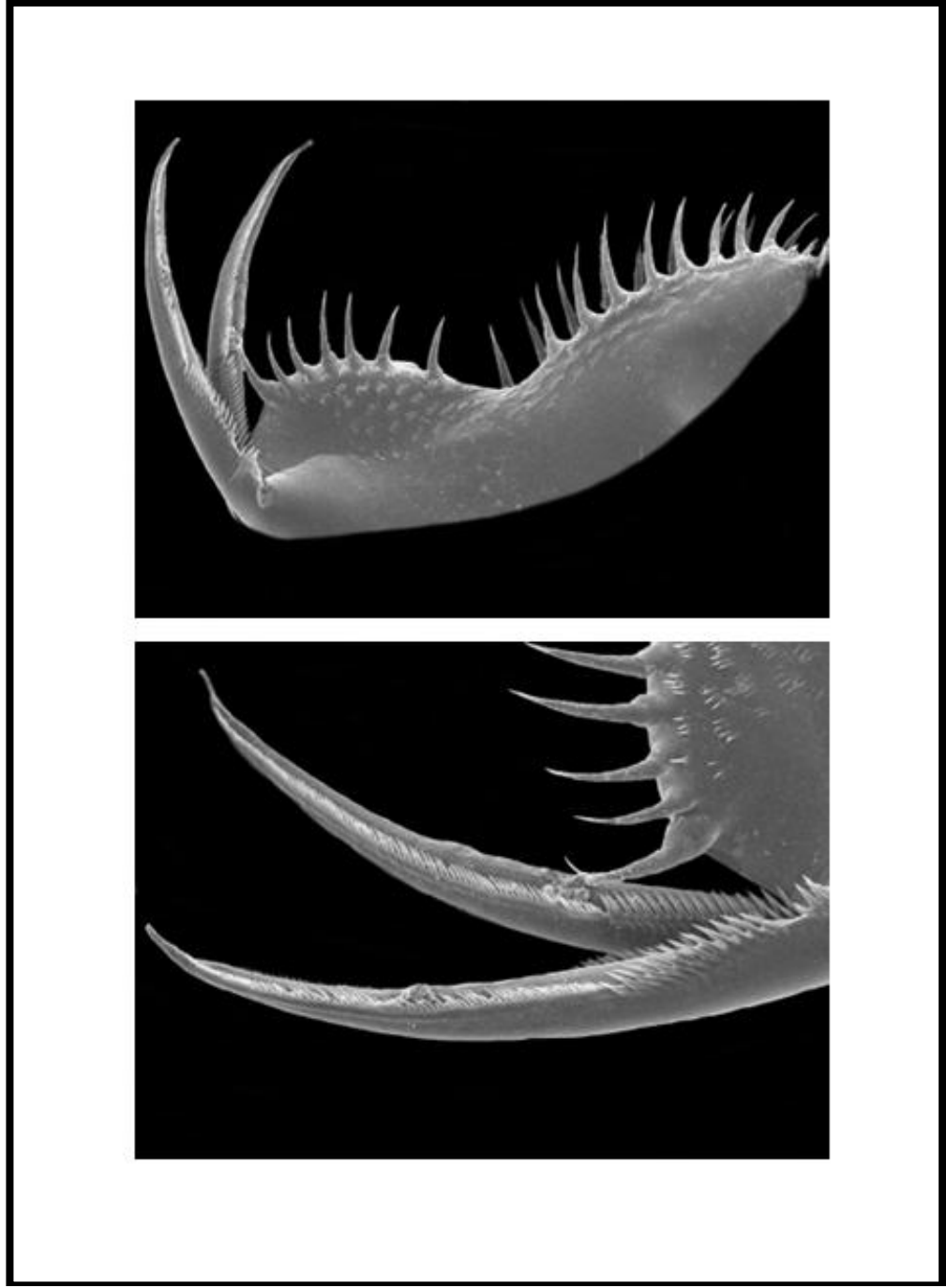
Ankara/Eymir Gölü (AN1), Ankara/Mogan Gölü (AN2), Aksaray/Mamasın Baraj Gölü (AK), Elazığ/Hazar Gölü mevki (EL1), Kütahya/Sulak Alan (KÜ), Manisa/Demirköprü Baraj Gölü (MA) ve Edirne/İpsala mevki (ED) populasyonları *Daphnia magna* olarak teşhis edilmiştir. Tür teşhisi sırasında belirlenen karakterler aşağıda verilmiştir. MA, AK, AN1, AN2 ve ED populasyonlarına ait SEM görüntüleri şekil 4.6-4.10'da verilmiştir.

- Büyük vücutlu, karapaks geniş oval yapıdadır. Yandan sıkıştırılmamıştır.
- Kuyruk spini kısadır.
- Baş hafifçe yuvarlaktır, eni boyundan daha fazladır, karapaksa oranla küçük değildir.
- Rostrum kısa ve sivridir.
- Antenül büyüktür, rostrumu aşmaz, antenülden çıkan uzantılar rostrumu aşar.
- Göz, çukur olan başın ön kenarına yakındır. Göz etrafındaki kapsül yukarı doğru tümsek şeklindedir.
- Göz beneği (ocellus) belirgindir.
- Karapaksın ön bölgesi merkezde uzun setaların gruplandığı küçük setalarla kaplıdır. Karapaksın arka bölgesi tamamen spinlidir.
- Postabdomen konik yapıdadır, dorsal kenarı oldukça dalgalıdır. Postabdomendeki dalgalanma uç tırnağa doğru azalır ya da tamamen ortadan kalkar. 4 tane postabdominal lob bulunur. Bunlardan ilki uzun ve az setalıdır, ikinci üçüncü ve dördüncü loblar uç kısımlarında dikkat çekici oranda setaya sahiptir.

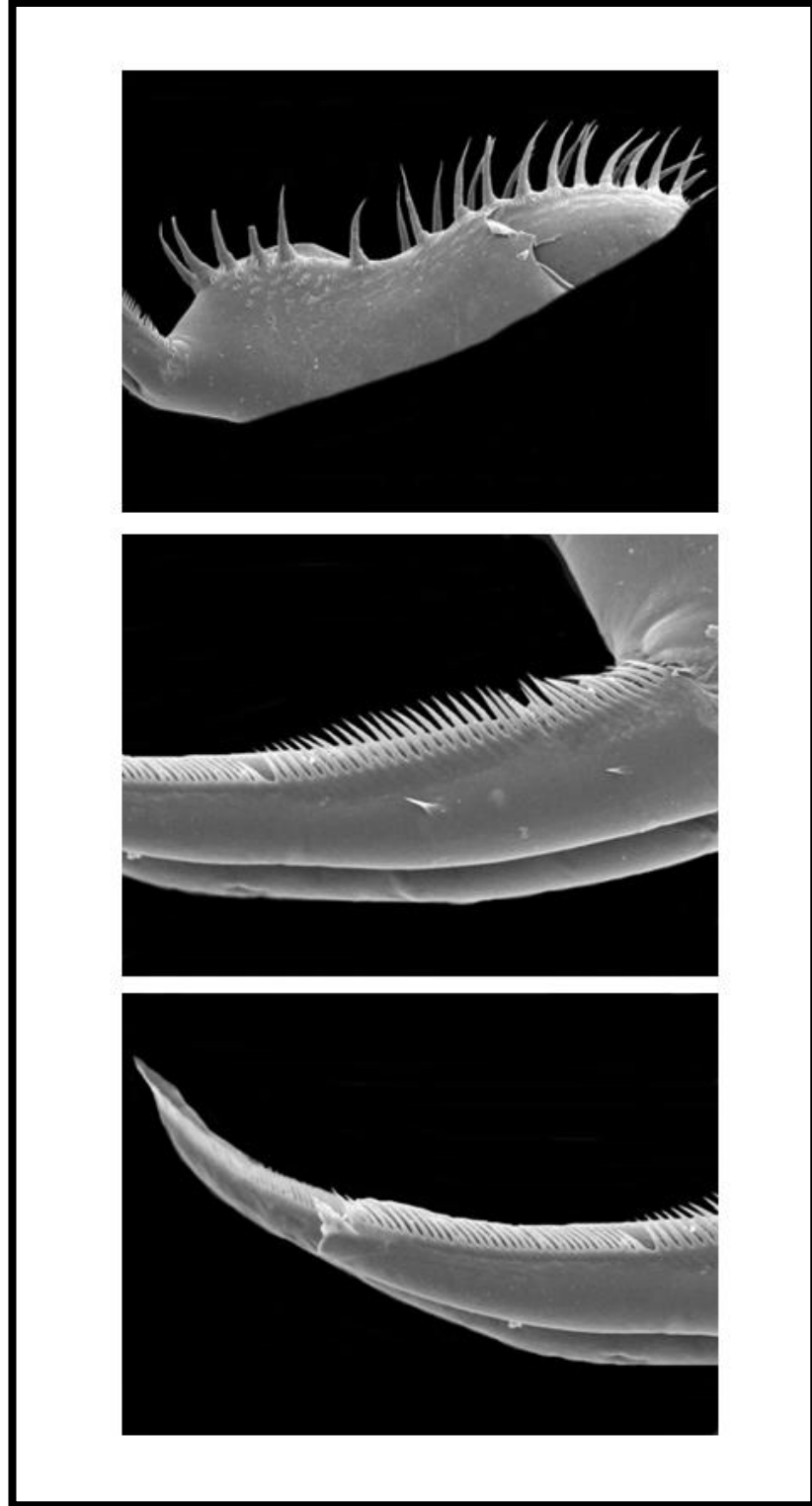
- Anal dişler zayıf ve uzun olup hemen hemen eşittir. Anal dişler distal ve proksimal olmak üzere iki grup halinde görülür. Tüm populasyonlarda distal grup 6-7 dişten proksimal grup 9-12 dişten oluşmuştur.
- Postabdominal tırnak 3 tane tarak bulundurur. Bunlar setaların büyüklüğüne göre; Tarak1= Tarak 2> Tarak 3 şeklindedir.
- Epifiyum D şeklindedir, yumurta odaları siyahımsı renkte olup arka kısmı beyaza dönüktür. Epifiyumun anterior kısmında uzun dikenli bir çıkıntı, posterior kısmında ise kısa dikensiz bir çıkıntı mevcuttur.



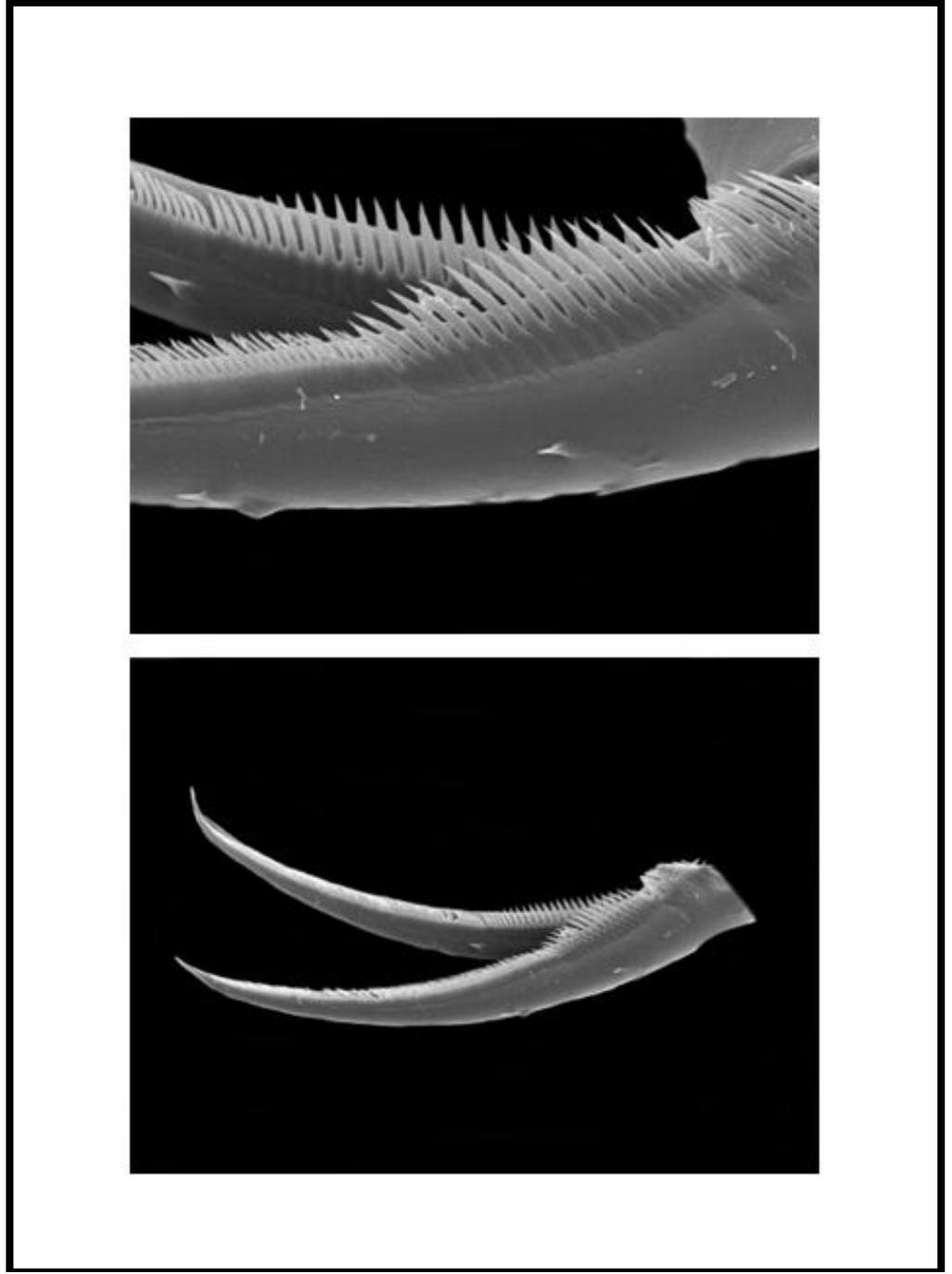
Şekil 4.6 Manisa/Demirköprü Baraj Gölü *Daphnia magna* populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



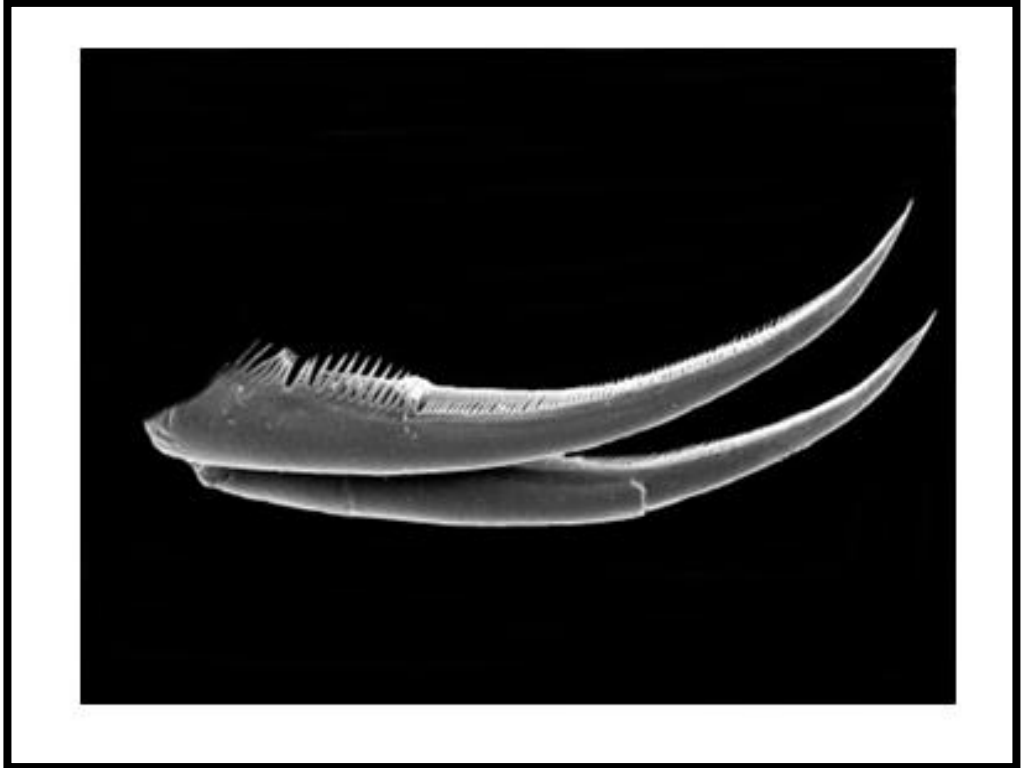
Şekil 4.7 Aksaray/Mamasın Baraj Gölü *Daphnia magna* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.8 Ankara/Eymir Gölü *Daphnia magna* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.9 Ankara/Mogan Gölü *Daphnia magna* populasyonuna ait tırnak ve taramak yapısı (SEM)



Şekil 4.10 Edirne/İpsala mevkii *Daphnia magna* populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı (SEM)

4.1.5 *Daphnia pulex* Leydig, 1860 tür teşhisi

Ardahan/Kındırğa Sazlığı (AR), Kars/Yeşil Göl (KAb ve KAc), Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü (KY), Bolu/Yeniçağa Gölü (BO), Rize/ Verçenik Kuzey Dağ Gölü (Rİ1), Rize/ Verçenik Güney Dağ Gölü (Rİ2), Erzurum/Tortum Gölü (ER) populasyonları *Daphnia pulex* olarak teşhis edilmiştir.

Kars/Yeşil Göl'den alınan *Daphnia pulex* örneklerinden bazılarında siklomorfozis gözlenmiştir. Bu siklomorfozis “boyun dişi (neck teeth)” olarak adlandırılan başın dorsal kısmında çentikli bir yapının var olması şeklindedir (Şekil 4.11). Siklomorfozis gösteren örnekler KAb, göstermeyen örnekler de KAc olarak etiketlenmiştir.

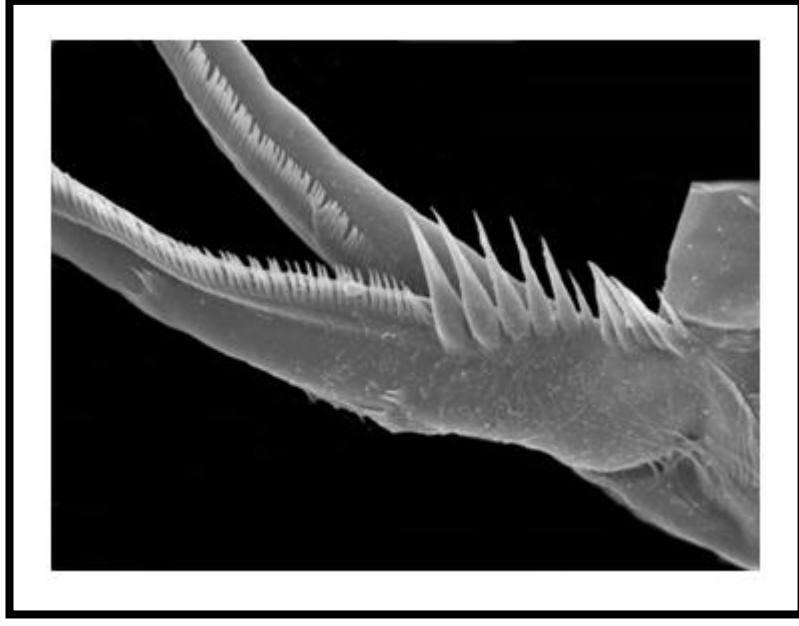


Şekil 4.11 Kars/Yeşil Göl *Daphnia pulex* örneklerinde gözlenen siklomorfozis

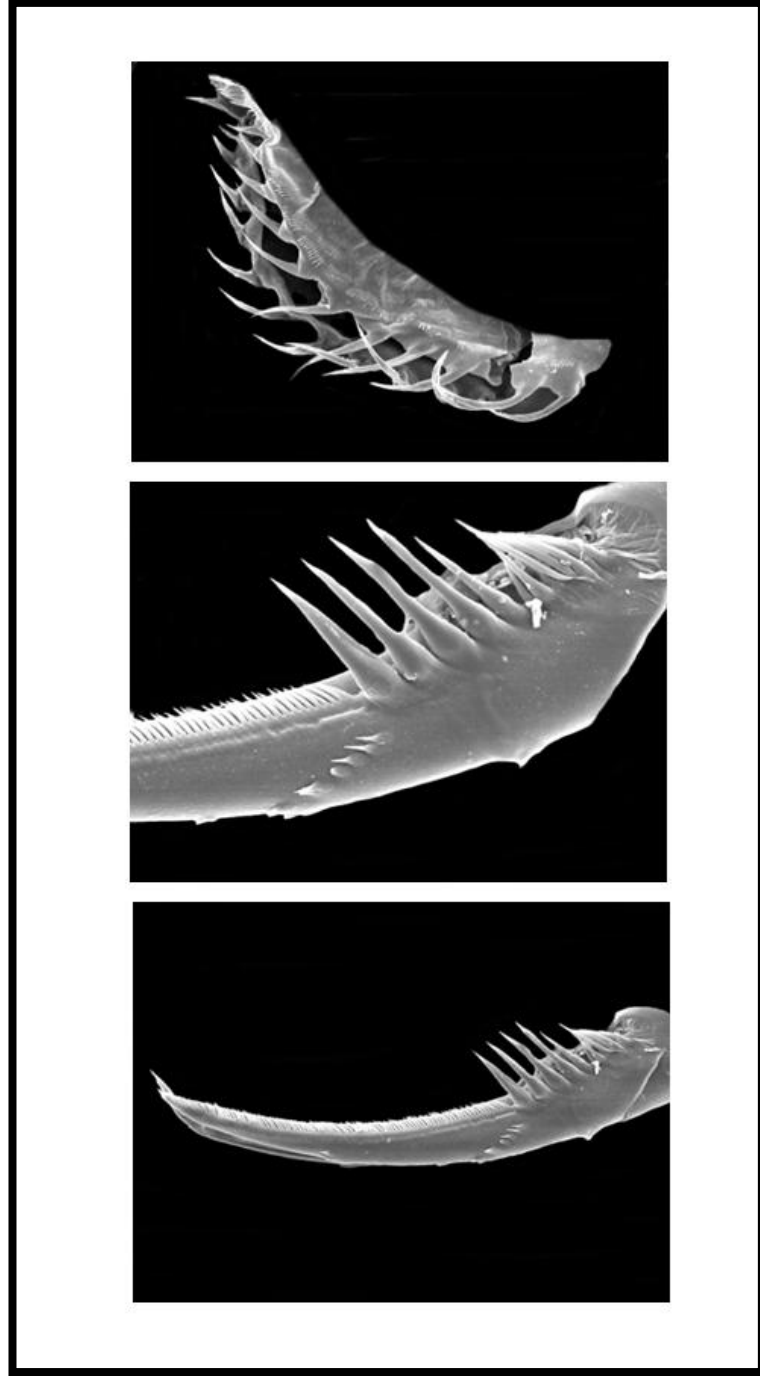
Tür teşhisi sırasında belirlenen karakterler aşağıda verilmiştir. AR, KA, KY, BO, Rİ1 ve Rİ2 populasyonlarına ait SEM görüntüleri şekil 4.12-4.17’de verilmiştir. ER populasyonuna ait az sayıda örnek bulunduğu için var olanlar ışık mikroskobu çalışmalarında ve moleküler çalışmalarda kullanılmış ve bu nedenle SEM görüntüleri alınamamıştır.

- Yandan bakıldığında karapaks oval ya da yuvarlaktır.
- Kuyruk spini kısadır.
- Baş geniş ve yuvarlak yapıdadır. Karapaksa oranla küçük değildir. Başın ön kısmı konkav yani dış bükeydir.
- Rostrum sivri uçludur. Rostrumun yüzeyinde poligonal ağısı bir yapılanma vardır.
- Antenül büyüktür, antenülden çıkan uzantılar rostrumu aşmaz.
- Göz büyüktür ve alna yakındır.

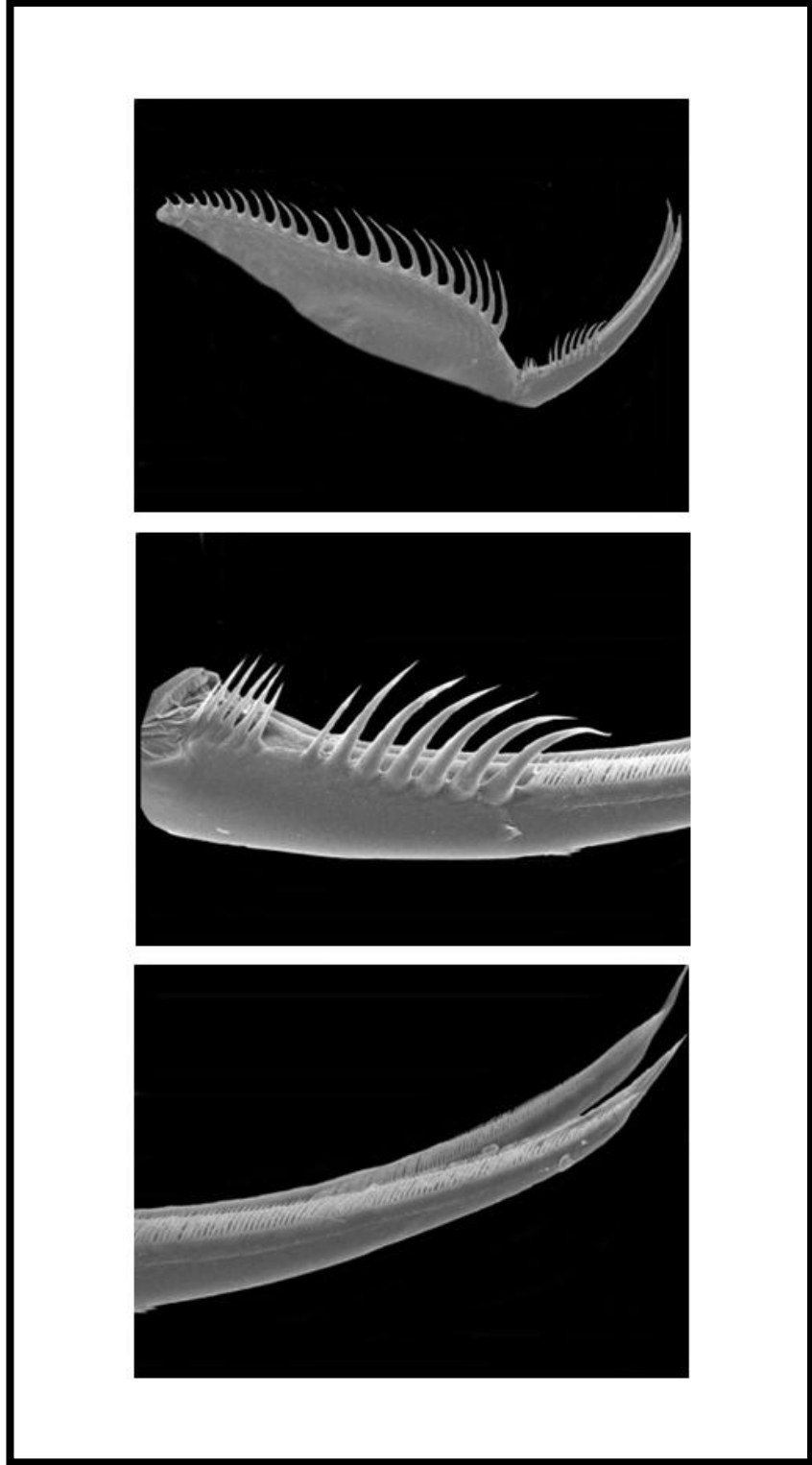
- Göz beneği mevcuttur.
- Karapaksın ventral kenarında yarısına kadar dorsal kenarında ise 1/3'üne kadar birbirine yakın dizilmiş setalar bulunur.
- Postabdomen dar konik yapıdadır, dorsal kenarı düzdür.
- Postabdomende 4 tane lob bulunur. Bunlardan ilki en büyüktür ve hemen hemen hiç seta bulunmaz. 2. 3. ve 4 loblar loblar hem büyüklük hem de seta yoğunluğu bakımından giderek küçülür.
- Posatabdomendeki anal dişler güçlüdür ve anal dişler uç tırnaktan itibaren giderek küçülür. Anal dişlerin sayısı *Daphnia pulex* türü için 10-22 genellikle 12-17 arasında tanımlanmıştır. Anal dişlerin sayısı AR populasyonu için 12-14, KA populasyonu için 12-14, ER populasyonu için 19-21, BO populasyonu için 12-15, Rİ1 populasyonu için 13-14, Rİ2 populasyonu için 17-18, KY populasyonu için 13-22 olarak sayılmıştır.
- Postabdominal tırnak 3 tane tarak bulundurur. Bunlar spinlerin büyüklük sırasına göre Tarak2>>Tarak1>>Tarak3 şeklindedir. Tarak2'deki diş sayısı 5-7 olarak tanımlanmıştır. Tarak2'deki diş sayısı AR populasyonu için 5, KA populasyonu için 5, ER populasyonu için 5, BO populasyonu için 6, Rİ1 populasyonu için 5, Rİ2 populasyonu için 5, KY populasyonu için 7 olarak sayılmıştır.
- Epifiyum D şeklindedir, kahverengi ya da siyahtır. Yumurta odaları epifiyumun dorsal kenarına dik pozisyonudadır. Epifiyumun dorsal kenarı boyunca küçük dikenler bulunur. Epifiyumun posterior dikenli küçük bir çıkıntısı bulunur. Anterior kısmında uzantı yoktur.



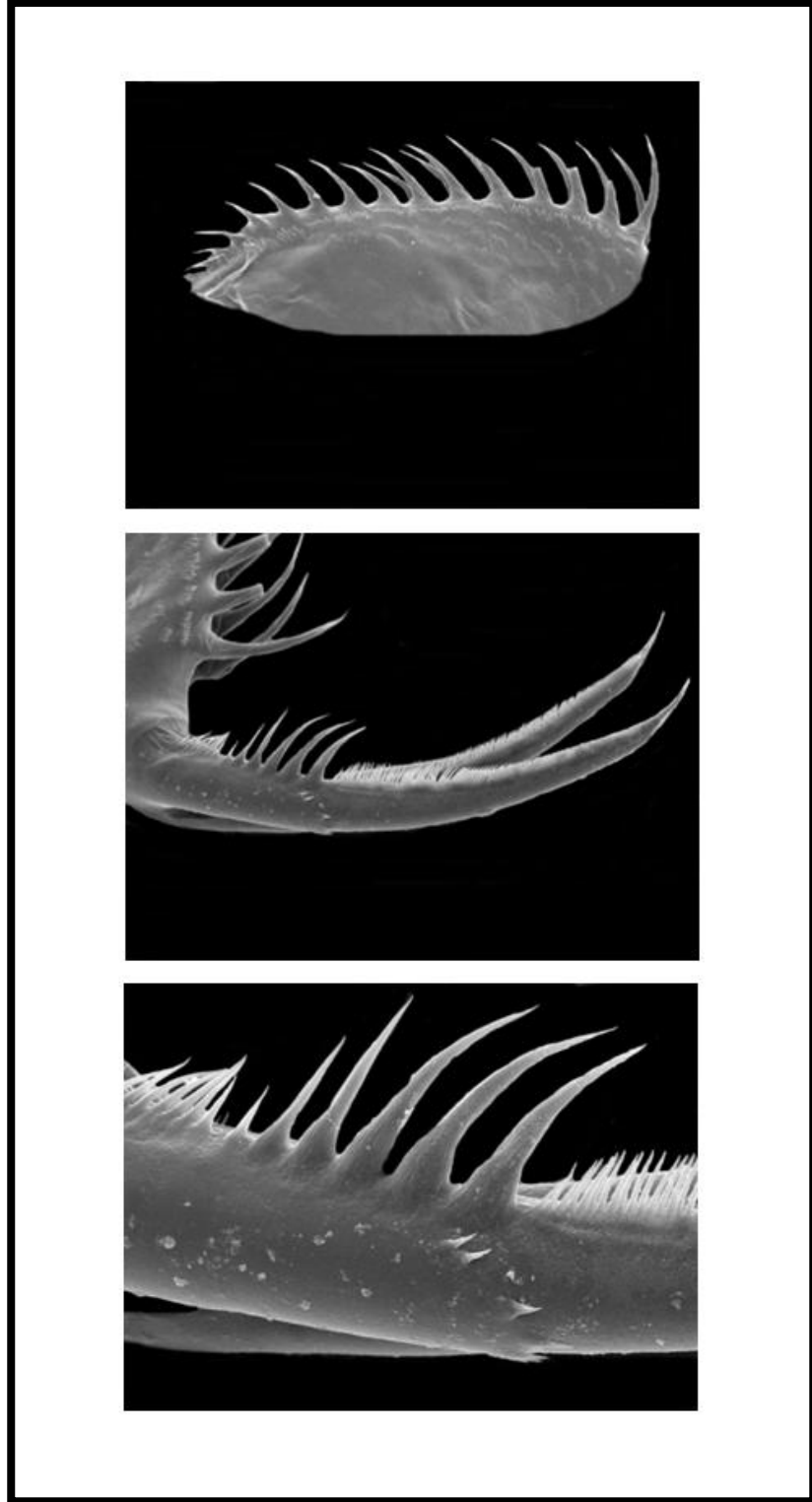
Şekil 4.12 Ardahan/Kındırğa Sazlığı *Daphnia pulex* populasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı (SEM)



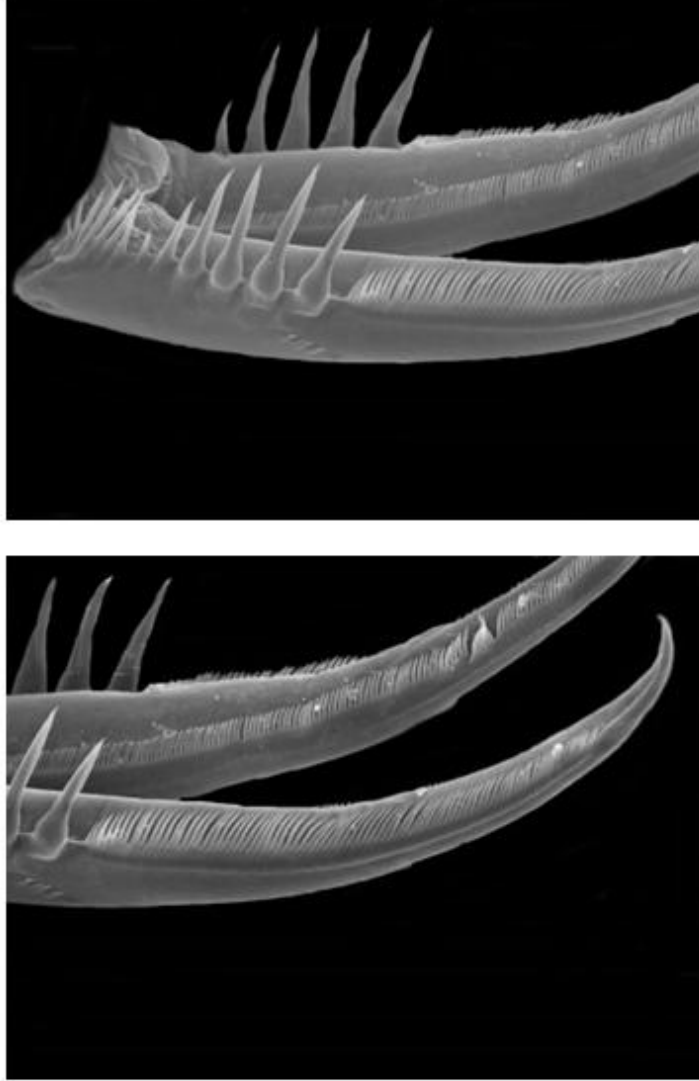
Şekil 4.13 Kars/Yeşil Göl *Daphnia pulex* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



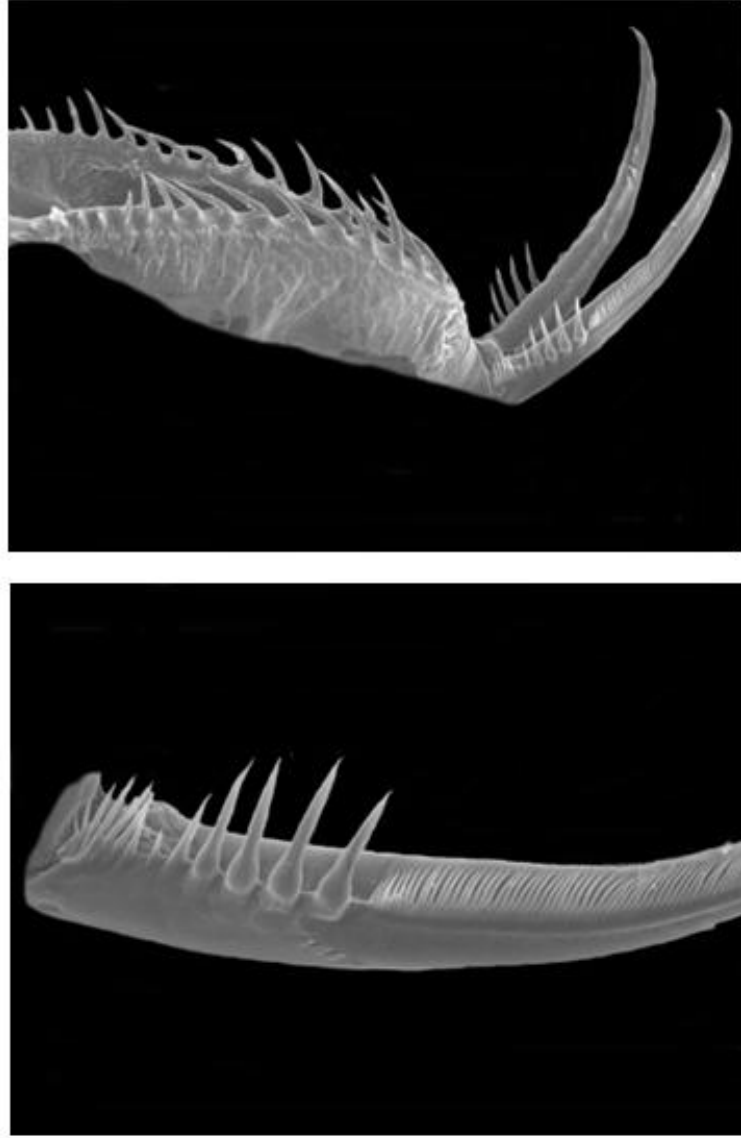
Şekil 4.14 Kayseri/Sarımsaklı Baraj Gölü *Daphnia pulex* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.15 Bolu/Yeniçağa Gölü *Daphnia pulex* populasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.16 Rize/Verçenik Kuzey Dağ Gölü *Daphnia pulex* popülasyonuna ait tırnak ve tarak yapısı (SEM)



Şekil 4.17 Rize/Verçenik Güney Dağ Gölü *Daphnia pulex* popülasyonuna ait anal diş, tırnak ve tarak yapısı (SEM)

4.2 COI Gen Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları

Toplam 408 bireyin DNA izolasyonu yapılmıştır. 408 izolasyondan seçilen 223 tanesinin PCR'ı yapılmış ve bu PCR'lardan 201 tanesi başarılı olmuştur. Bu 201 PCR'dan da 142 tanesinin başarılı bir şekilde dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizleri çift yönlü (forward-reverse) okunduğu için toplam 284 tane dizi elde edilmiştir. Filogenetik analizlerde başarılı bir şekilde dizi analizi yapılan bu 142 örnek kullanılmıştır (Çizelge 3.7). Analizlerde dış grup olarak, *Daphnia* cinsi ile yakın akraba olduğu bilinen 3 tane *Simocephalus* (*Simocephalus expinosus*, *Simocephalus serrulatus*, *Simocephalus vetulus*) türü kullanılmıştır. Dış gruplara ait diziler GenBank'dan alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 2012). Ayrıca taksonomik açıdan karşılaştırma olanağı sunması için teşhisi yapılan türlere ait GenBank veri tabanında bulunan güvenilir olduğu düşünülen 26 COI dizisi de filogenetik ağaç ve network analizlerine dahil edilmiştir (Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9).

Yapılan hizalama ve budama işlemleri sonrasında türlere göre farklı baz uzunluklarında konsensus diziler elde edilmiştir. Türler için elde edilen konsensus dizilere ait baz uzunlukları çizelge 4.2'de verilmiştir. Analizlerde eşit baz uzunluğunda diziler kullanılmak zorunda olduğu için, tüm dizler 540 baz çifti (bç) uzunluğunda budanmış ve bütün analizler 540 bç üzerinden yapılmıştır. Filogenetik analizler iki şekilde gerçekleştirilmiştir. Önce filogenetik ağaç ve network analizleri, daha sonra populasyon yapısı ve genetik çeşitlilik analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.2 *Daphnia* türlerine ait konsensus dizilerin baz uzunlukları

Tür İsmi	Baz Sayısı	Dizi Sayısı	34 Haplotip
<i>Daphnia cucullata</i>	567	14	
<i>Daphnia curvirostris</i>	570	13	
<i>Daphnia galeata</i>	571	23	
<i>Daphnia magna</i>	571	44	
<i>Daphnia pulex</i>	555	48	

4.2.1 Filogenetik ağaç ve network analizleri

142 sekans örneğindeki polimorfizm farklılıklarına bakılarak populasyonlar içerisindeki özgün haplotipler DnaSP 5.10.01 (Rozas vd. 2010) analiz programı ile tespit edilmiştir. Toplam 34 tane haplotipin varlığı belirlenmiştir. Haplotiplerin populasyonlara göre dağılımı çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Haplotiplerin populasyonlara dağılımı (Haplotiplerin populasyon içindeki sıklıkları parantez içerisinde verilmiştir)

Örnek Kodu	Örnekleme Lokalitesi	Tür İsmi	Birey Sayısı	Haplotipler
AD	Adana / Seyhan Baraj Gölü	<i>D. cucullata</i>	2	Hap1(1), Hap2(1)
IS	Isparta / Eğridir Gölü	<i>D. cucullata</i>	9	Hap1(7), Hap3(2)
EL2	Elazığ / Keban Baraj Gölü	<i>D. cucullata</i>	3	Hap2(3)
SA	Sakarya / Acarlar Gölü	<i>D. curvirostris</i>	11	Hap4(5), Hap5(4), Hap6(2)
Sİ	Sinop / Aklıman mevkii	<i>D. curvirostris</i>	2	Hap7(2)
AF	Afyon / Gebeceler Baraj Göleti	<i>D. galeata</i>	8	Hap8(8)
UR	Urfa / Atatürk Baraj Gölü Balık Çiftliği	<i>D. galeata</i>	7	Hap8(3), Hap10(4)
İZ	İzmir / Gölçük Gölü	<i>D. galeata</i>	8	Hap9(8)
AK	Aksaray / Mamasın Baraj Gölü	<i>D. magna</i>	5	Hap11(4), Hap12(1)
AN1	Ankara / Eymir Gölü	<i>D. magna</i>	8	Hap13(3), Hap14(2), Hap15(2), Hap16(1)

Çizelge 4.3 Haplotiplerin populasyonlara dağılımı (Haplotiplerin populasyon içindeki sıklıkları parantez içerisinde verilmiştir) (devam)

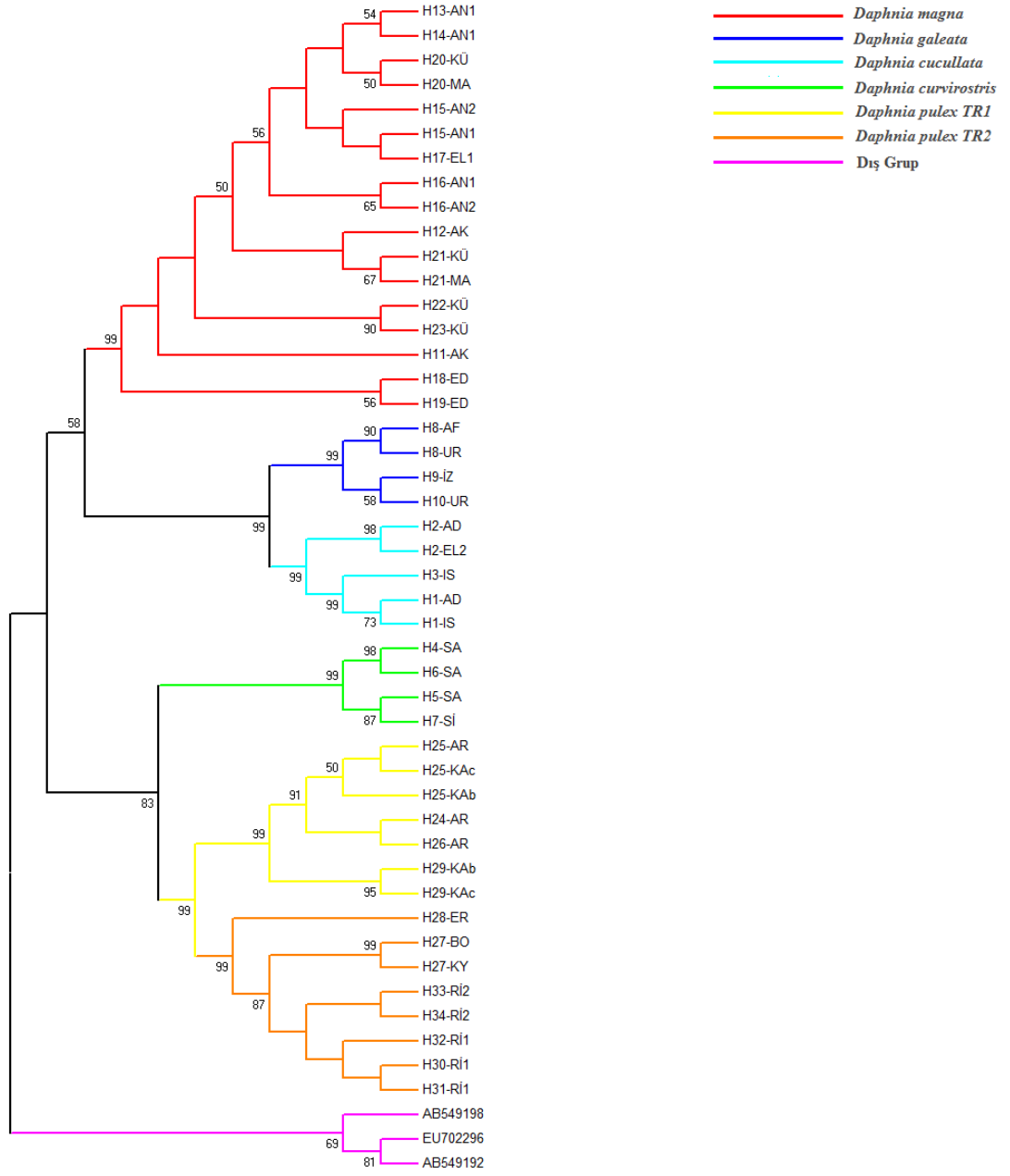
AN2	Ankara / Mogan Gölü	<i>D. magna</i>	9	Hap15(8), Hap16(1)
ED	Edirne / İpsala Balık Çiftliği kanaletler	<i>D. magna</i>	8	Hap18(3), Hap19(5)
EL1	Elazığ / Hazar Gölü mevkii	<i>D. magna</i>	1	Hap17(1)
KÜ	Kütahya / Sulak alan	<i>D. magna</i>	9	Hap20(3), Hap21(3), Hap22(2), Hap23(1)
MA	Manisa / Demirköprü Baraj Gölü	<i>D. magna</i>	4	Hap20(1), Hap21(3)
AR	Ardahan / Kındırğa Sazlığı	<i>D. pulex</i>	8	Hap24(4), Hap25(3), Hap26(1)
KAb	Kars / Yeşil Göl	<i>D. pulex</i>	7	Hap25(3), Hap29(4)
KAc	Kars / Yeşil Göl	<i>D. pulex</i>	7	Hap25(2), Hap29(5)
BO	Bolu / Yeniçağa Gölü	<i>D. pulex</i>	4	Hap27(4)
KY	Kayseri / Sarımsaklı Baraj Gölü	<i>D. pulex</i>	11	Hap27(11)
ER	Erzurum / Tortum Gölü	<i>D. pulex</i>	3	Hap28(3)
Ri1	Rize / Verçenik Dağ Gölü(Kuzey)	<i>D. pulex</i>	6	Hap30(4), Hap31(1), Hap32(1)
Rİ2	Rize / Verçenik Dağ Gölü(Güney)	<i>D. pulex</i>	2	Hap33(1), Hap34(1)

GenBank veri tabanından alınan *Daphnia* türlerine COI dizileri ile yine GenBank'dan alınan dış grup örneklerinin COI dizilerine ait haplotipler çizelge 4.4'de verilmiştir.

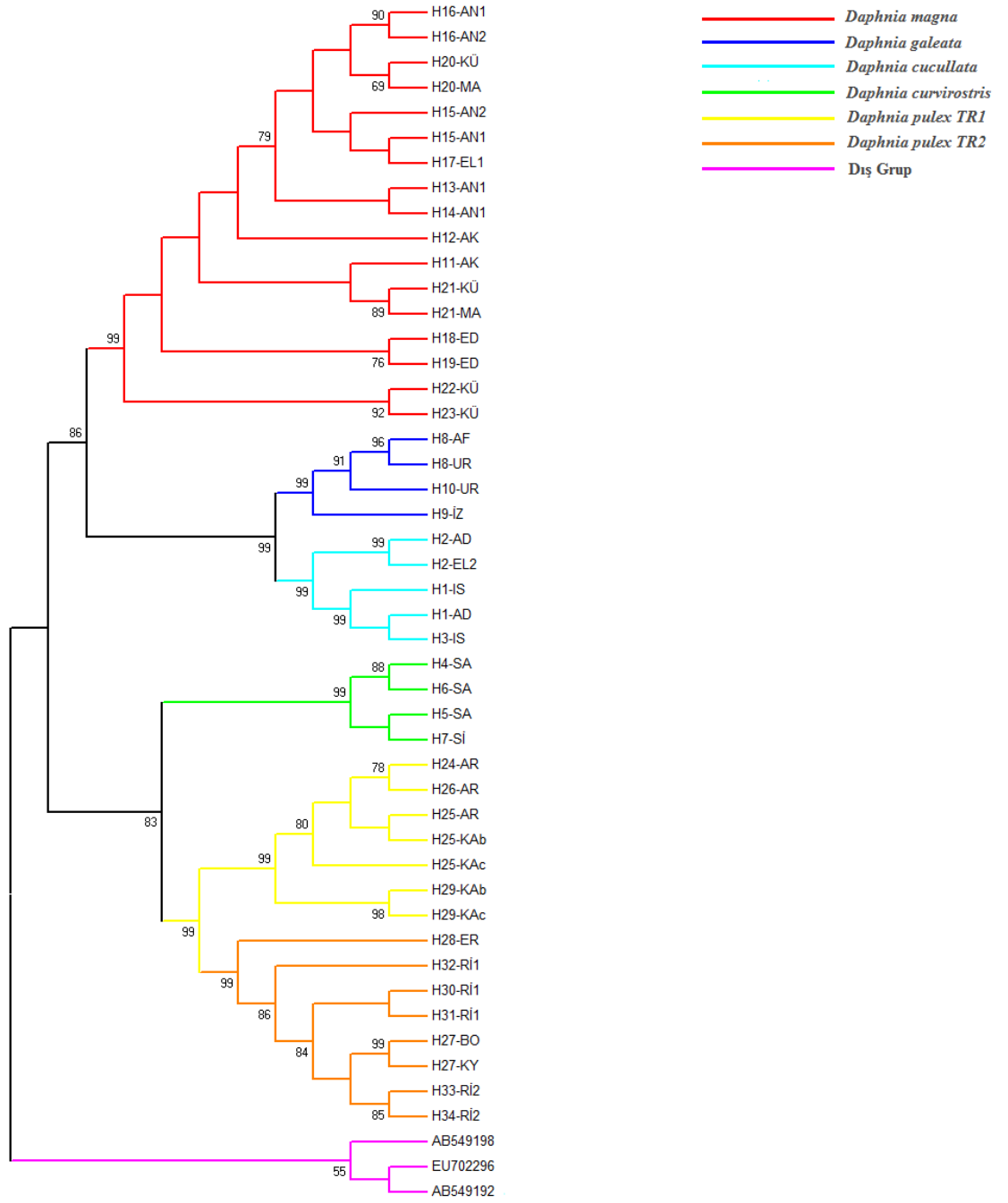
Çizelge 4.4 GenBank'dan alınan örnekler ve haplotip numaraları

GenBank No	Lokale	Tür İsmi	Haplotip No
EF375869	Hollanda	<i>Daphnia cucullata</i>	H35
EF375870	Çek Cumhuriyeti	<i>Daphnia cucullata</i>	H36
EF375872	Almanya	<i>Daphnia curvirostris</i>	H37
FJ427487	Kanada	<i>Daphnia curvirostris</i>	H38
EF375868	İsveç	<i>Daphnia galeata</i>	H39
EF375867	Hollanda	<i>Daphnia galeata</i>	H40
AY803046	Çek Cumhuriyeti	<i>Daphnia magna</i>	H41
AY803069	İspanya	<i>Daphnia magna</i>	H42
JF750769	Rusya	<i>Daphnia magna</i>	H43
EU702138	Meksika	<i>Daphnia magna</i>	H44
AF217106	Kuzey Amerika	<i>Daphnia magna</i>	H44
DQ166849	İsrail	<i>Daphnia magna</i>	H23
AY380449	Kuzey Amerika	<i>Daphnia pulex</i>	H46
AY745244	Kenya	<i>Daphnia pulex</i>	H47
EU152321	Çek Cumhuriyeti	<i>Daphnia pulex</i>	H48
EU152320	Belçika	<i>Daphnia pulex</i>	H49
GQ475277	Kanada	<i>Daphnia pulex</i>	H48
HM622593	Yeni Zelanda	<i>Daphnia pulex</i>	H50
DQ340843	Amerika Birleşik Devletleri	<i>Daphnia pulex</i>	H51
AF117817	Kanada	<i>Daphnia pulex</i>	H52
AF489525	Arjantin	<i>Daphnia pulicaria</i>	H53
JN233925	Kanada	<i>Daphnia pulicaria</i>	H54
FJ427506	Kanada	<i>Daphnia tenebrosa</i>	H55
JN233926	Kanada	<i>Daphnia tenebrosa</i>	H56
HM131366	Amerika Birleşik Devletleri	<i>Daphnia melanica</i>	H57
FJ427495	Amerika Birleşik Devletleri	<i>Daphnia melanica</i>	H58
EU702296	Meksika	<i>Simocephalus expinosus</i>	Dış grup
AB549198	Tayvan	<i>Simocephalus serrulatus</i>	Dış grup
AB549192	Tayvan	<i>Simocephalus vetulus</i>	Dış grup

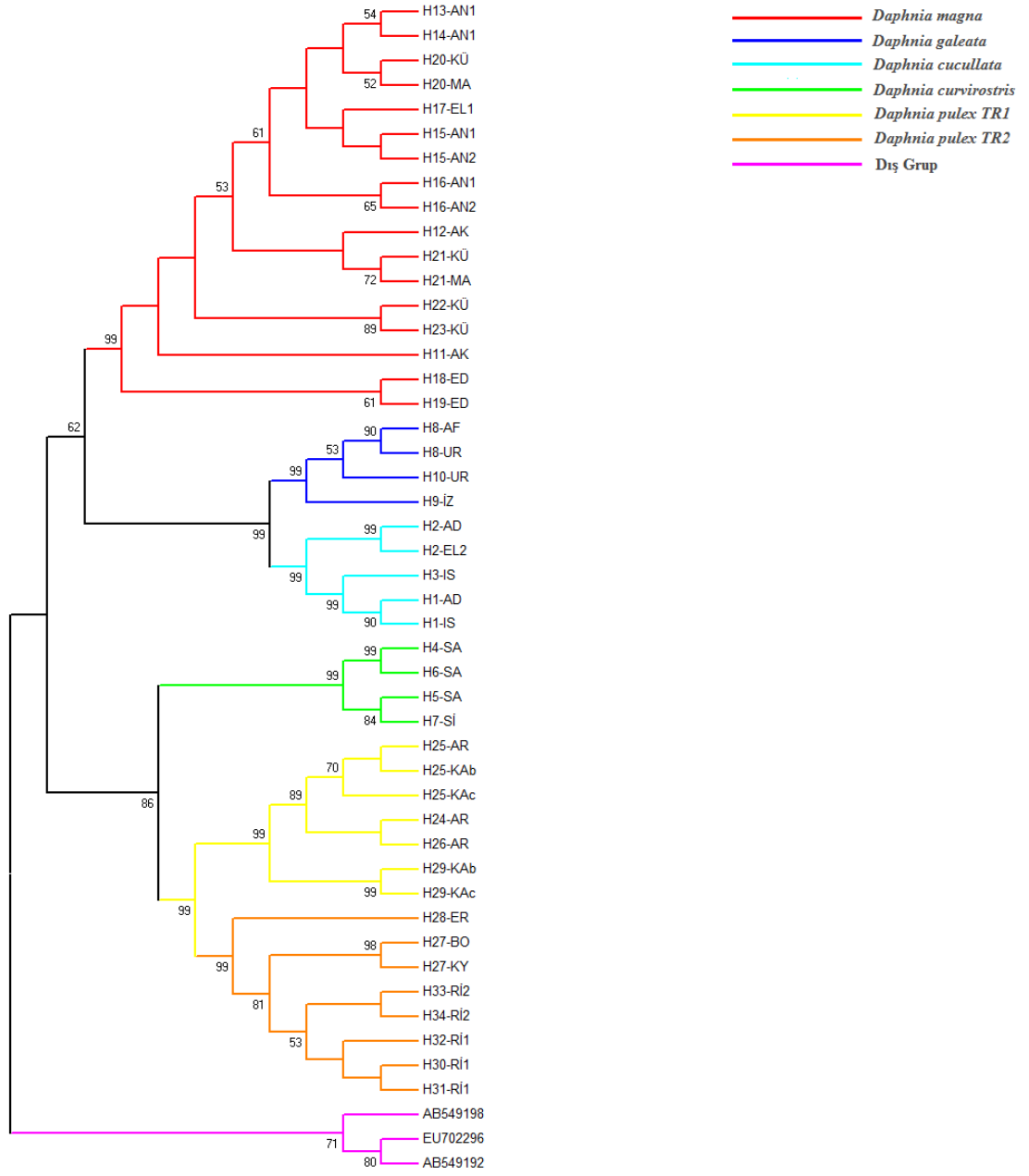
COI gen bölgesi dizilerinden elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koyabilmek için neighbour joining, maximum parsimony, maximum likelihood ve Bayesian yaklaşımları kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçlar iki ayrı şekilde oluşturulmuştur; önce sadece bu çalışmaya ait 142 örnek kullanılarak, daha sonra mevcut 142 örneğe GenBank'dan alınan diziler eklenmek suretiyle oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçlar oluşturulmadan önce MEGA 5(Tamura vd. 2011) ve JModeltest 0.1.1 (Posada 2008) programları kullanılarak en uygun evrimsel model seçilmiştir. Sadece bu çalışmaya ait 142 örnekle filogenetik ağaç oluşturmak için en uygun evrimsel model GTR+G+I (General Time Reverseble Model) olarak belirlenmiştir. Sadece bu çalışmaya ait örneklerle oluşturulmuş NJ, MP, ML ve Bayesian ağaçları şekil 4.18-4.21'de verilmiştir.



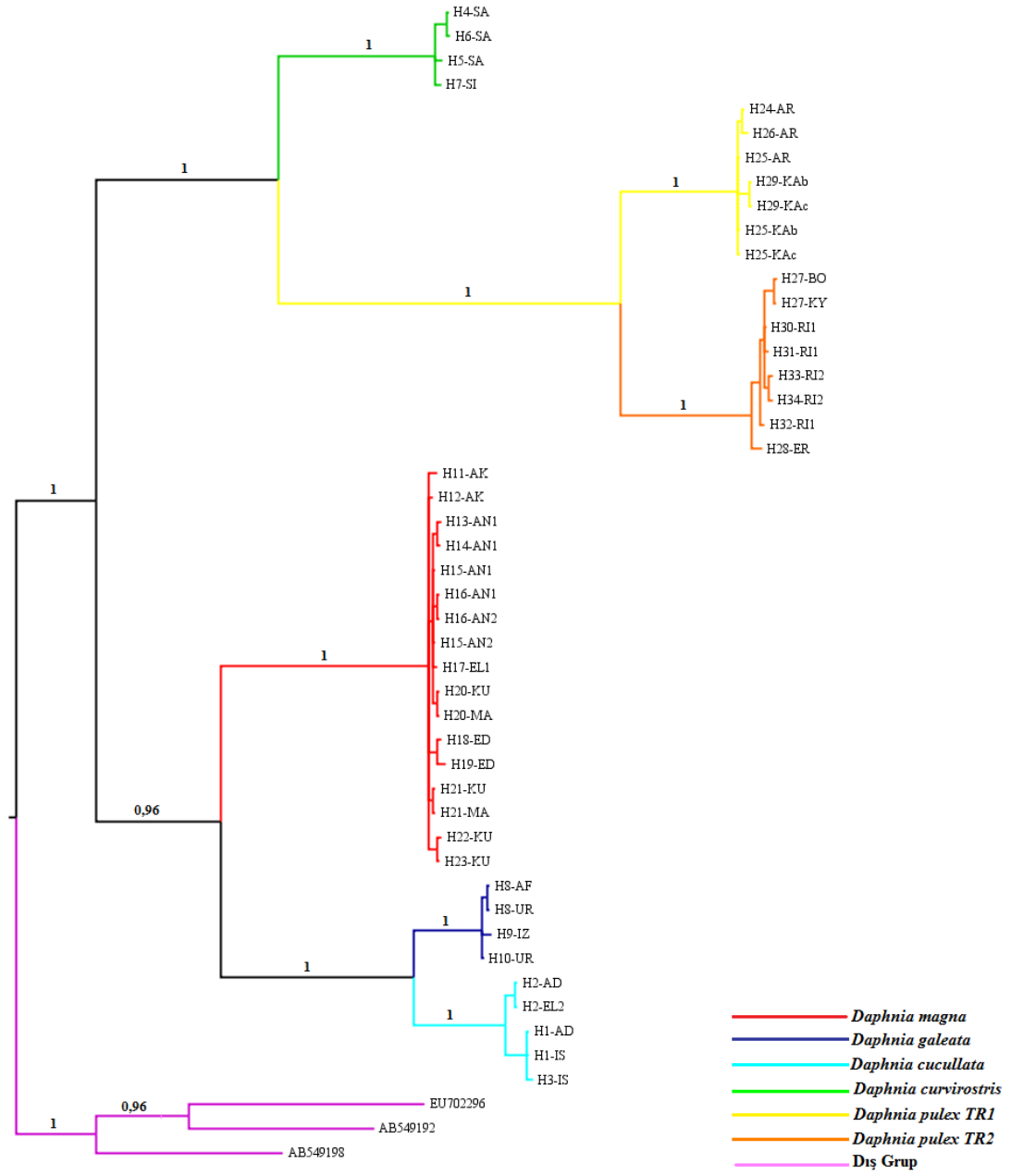
Şekil 4.18 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan neighbour joining (NJ) ağacı (%50'nin üzerindeki bootstrap değerleri dallara yerleştirilmiştir)



Şekil 4.19 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan maximum parsimony (MP) ağacı (%50'nin üzerindeki bootstrap değerleri dallara yerleştirilmiştir)

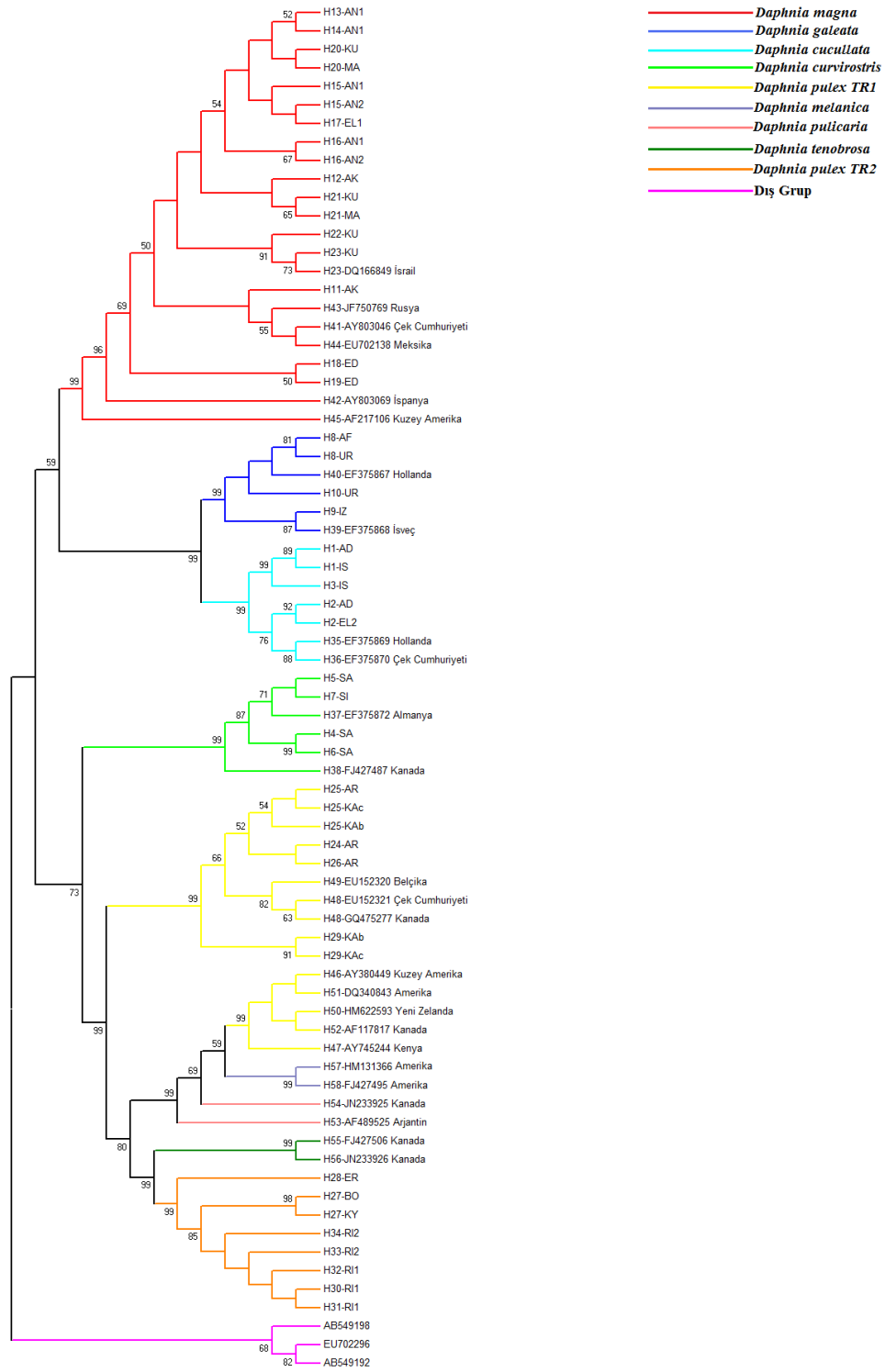


Şekil 4.20 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan maximum likelihood (ML) ağacı (%50'nin üzerindeki bootstrap değerleri dallara yerleştirilmiştir)

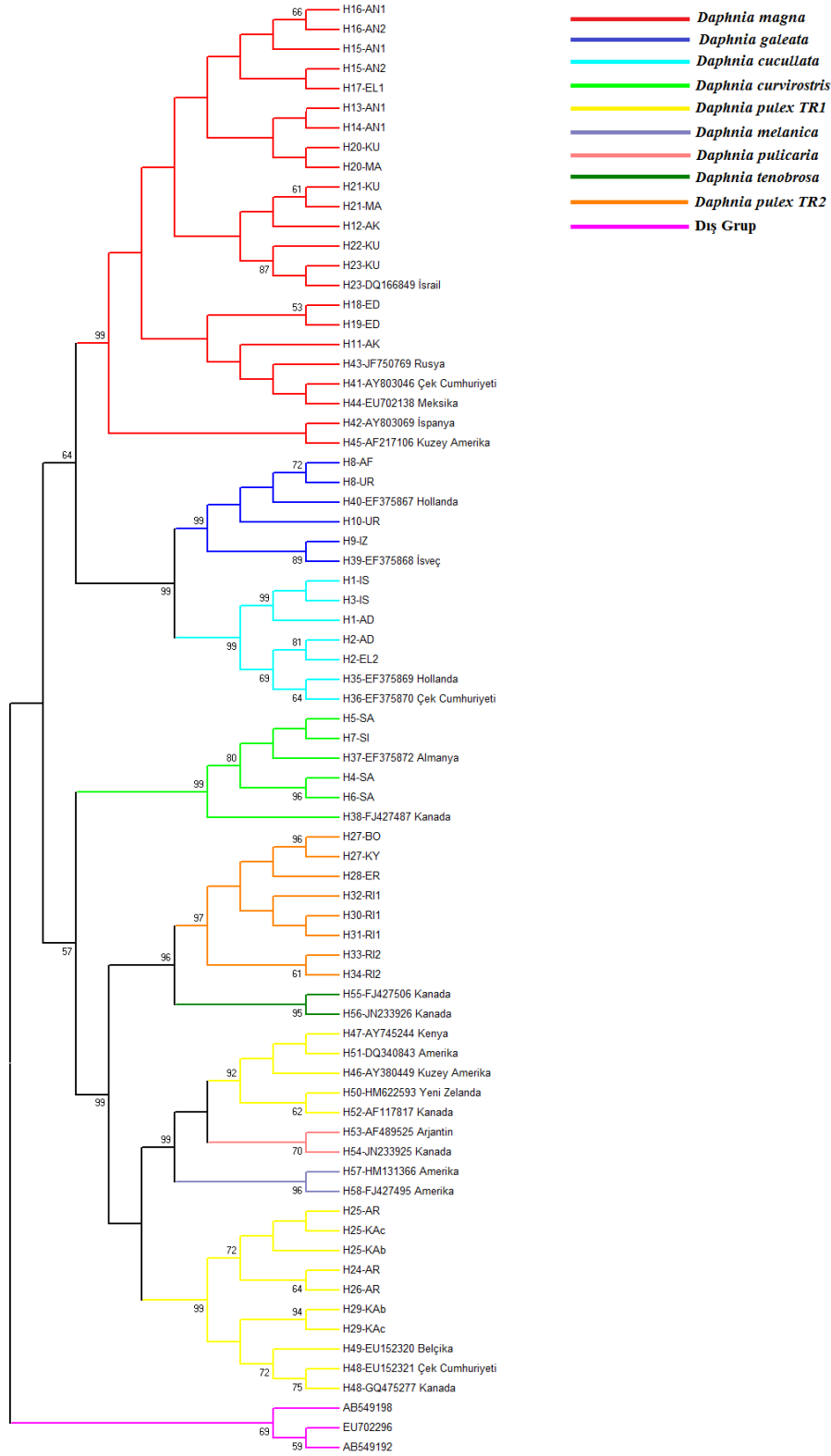


Şekil 4.21 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye populasyonları için oluşturulan Bayesian ağacı

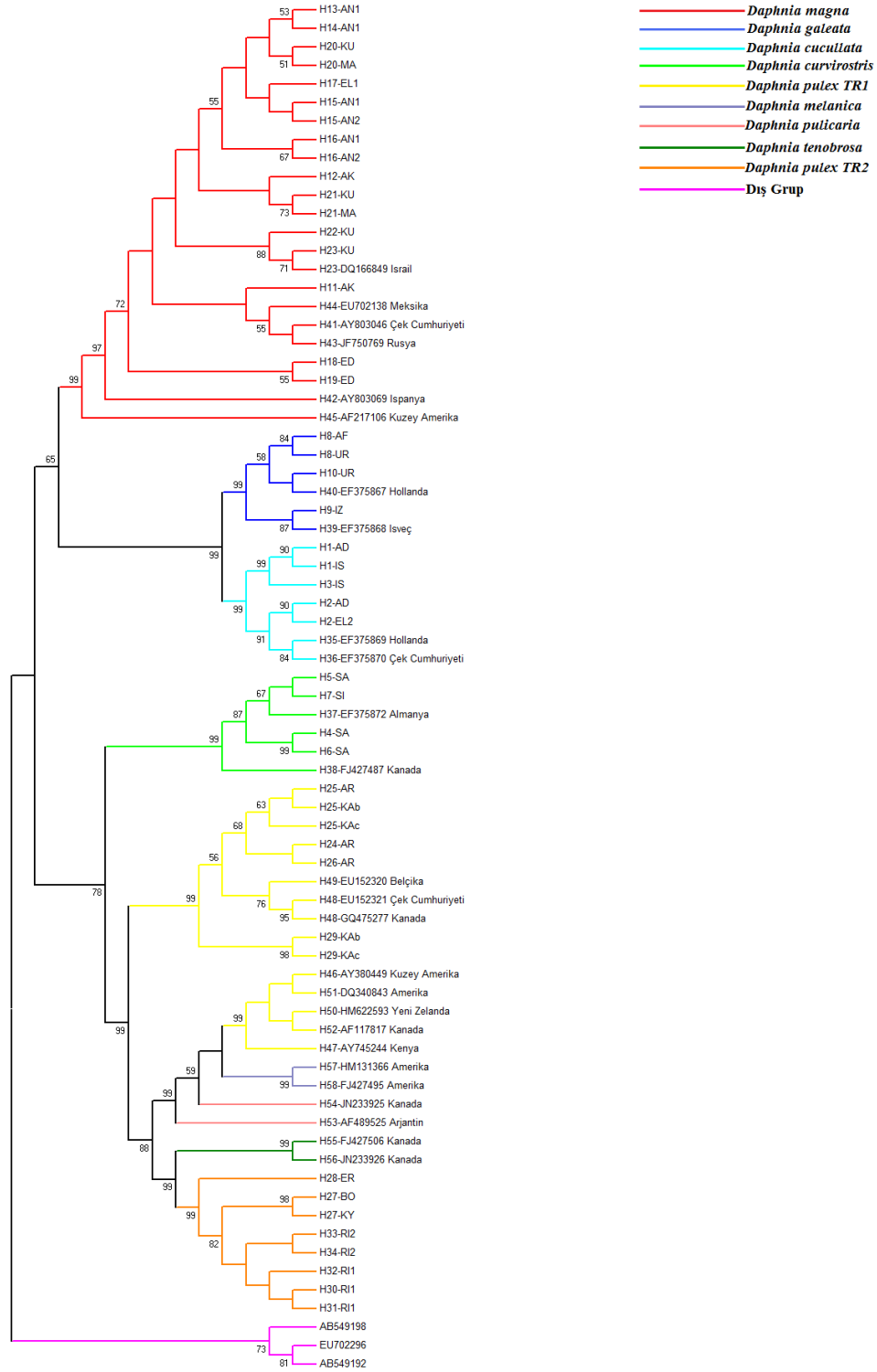
GenBank'dan alınan verilerin eklenmesiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar için en uygun evrimsel model de MEGA 5(Tamura vd 2011) ve JModeltest 0.1.1 (Posada 2008) programları kullanılarak GTR+G+I olarak belirlenmiştir. GenBank'dan alınan dizilerin eklenmesiyle oluşturulmuş NJ, MP, ML ve Bayesian ağaçları şekil 4.22-4.25'de verilmiştir.



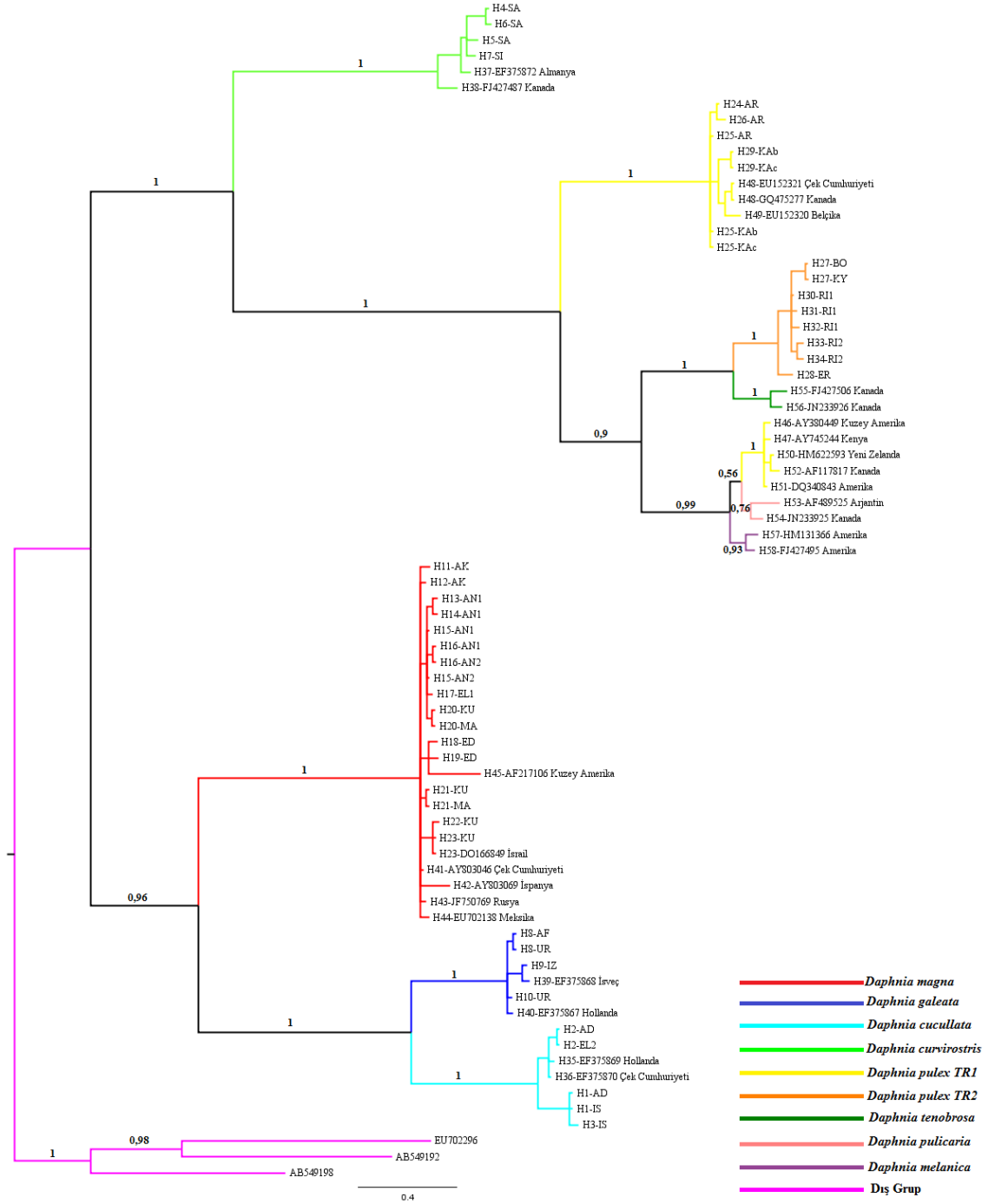
Şekil 4.22 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank popülasyonları için oluşturulan neighbour joining (NJ) ağacı (%50'nin üzerindeki bootstrap değerleri dallara yerleştirilmiştir. GenBank'dan alınan örneklerin lokaliteleri GenBank numaralarının yanında belirtilmiştir)



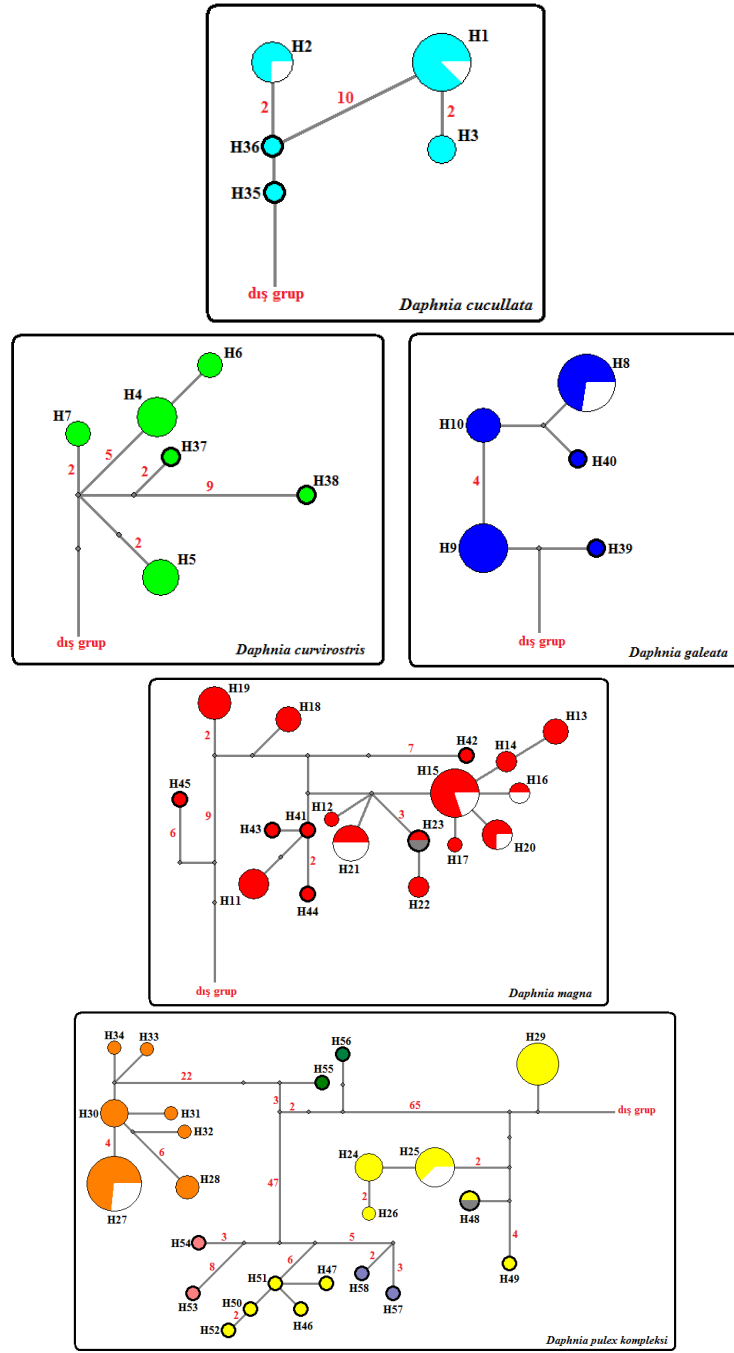
Şekil 4.23 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank populasyonları için oluşturulan maximum parsimony (MP) ağacı (%50'nin üzerindeki bootstrap değerleri dallara yerleştirilmiştir. GenBank'dan alınan örneklerin lokaliteleri GenBank numaralarının yanında belirtilmiştir)



Şekil 4.24 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank popülasyonları için oluşturulan maximum likelihood (ML) ağacı (%50'nin üzerindeki bootstrap değerleri dallara yerleştirilmiştir. GenBank'dan alınan örneklerin lokaliteleri GenBank numaralarının yanında belirtilmiştir)



Şekil 4.25 COI gen bölgesi dizilerine göre Türkiye ve GenBank populasyonları için oluşturulan Bayesian ağacı



● *Daphnia magna* ● *Daphnia galeata* ● *Daphnia cucullata* ● *Daphnia curvirostris* ● *Daphnia pulex TR1*
 ● *Daphnia pulex TR2* ● *Daphnia tenobrosa* ● *Daphnia pulicaria* ● *Daphnia melanica*

Şekil 4.27 Türkiye ve GenBank örneklerinin COI gen bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan network analizi (1'den fazla nükleotidde değişiklik gösterenler dalların üzerine yerleştirilmiştir. GenBank örneklerinin etrafı koyu halka ile işaretlenmiştir)

Haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı filogenetik analizler sonucu ortaya çıkan monofiletik grupları ve bunlar arasındaki ilişkileri desteklemiştir. Nükleotit farklılıkları göz önünde bulundurulduğunda, birbirine en yakın monofiletik grupların *Daphnia galeata* ile *Daphnia cucullata* olduğu, birbirine en uzak monofiletik grupların ise *Daphnia magna* ile *Daphnia pulex* olduğu gözlenmiştir. Filogenetik ağaç analizlerinde olduğu gibi network ağı da *Daphnia pulex* kompleksinin iki farklı monofiletik gruba ayrıldığını göstermiştir.

4.2.2 Populasyon yapısı ve genetik çeşitlilik analizleri

Daphnia cucullata, *Daphnia curvirostris*, *Daphnia galeata*, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* TR1 ve *Daphnia pulex* TR2 monofiletik gruplarına ait dizilerin nükleotit kompozisyonları belirlenmiştir. Bütün monofiletik gruplarda Timin bazının frekansı %32,1-%32,9 ile yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.5). Araştırmada çalışılan türlerin COI dizilerindeki korunmuş bölgelerin nükleotit sayısı ve yüzde olarak değerleri monofiletik gruplar için, tür kompleksleri için ve *Daphnia* cinsi için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.6, Çizelge 4.7). Her bir monofiletik grup için transisyon/transversiyon oranı ayrı ayrı hesaplanmış olup, nükleotitlerin yer değişim oranları çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Monofiletik grupların COI gen bölgesine ait nükleotit kompozisyonları

Monofiletik Grup	T	C	A	G
<i>Daphnia cucullata</i>	32,1	23,6	22,9	21,4
<i>Daphnia curvirostris</i>	34,8	20,4	23,1	21,6
<i>Daphnia galeata</i>	32,7	23,4	22,7	21,2
<i>Daphnia magna</i>	37,3	18,7	22,2	21,8
<i>Daphnia pulex</i> TR1	32,9	22,4	22,7	22,1
<i>Daphnia pulex</i> TR2	32,5	21,4	21,6	24,5

Çizelge 4.6 COI gen bölgesinin tür komplekslerine göre korunmuşluk oranları

Tür Kompleksleri	Korunmuş Baz Sayısı	Bilgilendirici Baz Sayısı	Değişken Baz Sayısı	Tek Baz Değişimi Sayısı	Korunma Oranı (%)
<i>D. longispina</i> kompleksi	471	65	69	4	87,2
<i>D. pulex</i> kompleksi	454	81	86	5	84

Çizelge 4.7 COI gen bölgesinin monofiletik gruplara göre korunmuşluk oranları

Monofiletik Grup	Korunmuş B.S	Bilgilendirici B.S	Değişken B.S	Tek Baz D.S	Korunma Oranı(%)
<i>Daphnia cucullata</i>	529	14	14	-	97,6
<i>Daphnia curvirostris</i>	529	11	11	-	97,6
<i>Daphnia galeata</i>	534	6	6	-	98,8
<i>Daphnia magna</i>	523	15	17	2	96,8
<i>Daphnia pulex</i> TR1	532	6	8	2	98,5
<i>Daphnia pulex</i> TR2	525	11	15	4	97,2
<i>Daphnia</i> genus	341	197	199	2	63,1

B.S: Baz Sayısı, D.S: Değişim Sayısı

Çizelge 4.8 Nükleotitler arasındaki transisyon ve transversiyon değişim oranları (koyu yazılan oranlar transisyon değişimlerini gösterirken açık yazılanlar transversiyon oranlarını göstermektedir)

Monofiletik Grup		A	T	C	G
<i>Daphnia cucullata</i>	A	-	0,2245	0,1648	26,0145
	T	0,1597	-	18,9684	0,1495
	C	0,1597	25,8370	-	0,1495
	G	27,7831	0,2245	0,1648	-
<i>Daphnia curvirostris</i>	A	-	4,6473	1,3574	25,6686
	T	3,0874	-	9,3373	3,1089
	C	1,5403	15,9490	-	1,4379
	G	27,4960	5,0127	1,3574	-
<i>Daphnia galeata</i>	A	-	0,2793	0,1997	33,7091
	T	0,1934	-	11,9268	0,1812
	C	0,1934	16,6852	-	0,1812
	G	35,9717	0,2793	0,1997	-
<i>Daphnia magna</i>	A	-	9,8296	2,5306	10,0308
	T	5,8483	-	15,0879	2,9011
	C	3,0031	30,0944	-	2,9456
	G	10,2266	4,9712	2,5306	-
<i>Daphnia pulex</i> TR1	A	-	3,0420	6,7929	13,5954
	T	2,1010	-	19,5503	0,4744
	C	6,8978	28,7439	-	2,0425
	G	13,9843	0,7066	2,0690	-
<i>Daphnia pulex</i> TR2	A	-	0,0000	3,3191	33,5918
	T	0,0000	-	9,0469	2,1918
	C	3,3478	13,7434	-	1,1972
	G	29,6065	2,9094	1,0461	-

Monofiletik gruplar için haplotip sayısı, haplotip çeşitliliği ve nükleotit değişiklikleri DnaSP 5.10.01 (Rozas vd. 2010) analiz programı ile hesaplanmış ve çizelge 4.9’da verilmiştir. Haplotip sayısının *Daphnia magna*’da yüksek olduğu (13) gözlenmiştir. Haplotip çeşitliliğinin 0,904 değeri ile en yüksek *Daphnia magna*’ya, 0,615 değeri ile en düşük *Daphnia cucullata*’ya ait olduğu görülmüştür. Nükleotit değişikliğine bakıldığında en yüksek değerin 0,01074 ile *Daphnia cucullata*’ya, en düşük değerin ise 0,00545 ile *Daphnia galeata*’ya ait olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.9 Monofiletik grupların haplotip çeşitliliği ve nükleotit değişiklikleri

Monofiletik Grup	N	H	Hç	Pi (π)
<i>D. cucullata</i>	14	3	0,615	0,01074
<i>D. curvirostris</i>	13	4	0,769	0,00912
<i>D. galeata</i>	23	3	0,648	0,00545
<i>D. magna</i>	44	13	0,904	0,00728
<i>D. pulex</i> TR1	22	4	0,697	0,00571
<i>D. pulex</i> TR2	26	7	0,649	0,00695

N: birey sayısı, H: haplotip sayısı, Hç: haplotip çeşitliliği, Pi (π): nükleotit değişikliği

Genetik mesafe değerleri Kimura-2-Parametresi’ne (K2P) göre hesaplanmıştır. Genetik mesafe, her bir monofiletik grubun kendi popülasyonları arasında ve monofiletik gruplar arasında ayrı ayrı hesaplanmış ve sırasıyla çizelge 4.10 ve çizelge 4.11’de verilmiştir. Buna göre grup içi popülasyonlar arasındaki mesafe değeri düşük (%0,6 – %1,5) bulunmuştur. Gruplar arası mesafe değerlerine bakıldığında ise, *Daphnia galeata* ile *Daphnia cucullata*’nın birbirine en yakın (%12), *Daphnia magna* ile *Daphnia pulex* TR2’nin birbirine en uzak (%30) monofiletik gruplar olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.10 K2P modeli kullanılarak COI gen bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan monofiletik grup popülasyonları arasındaki mesafe değerleri

Monofiletik Grup	Genetik Mesafe
<i>Daphnia cucullata</i>	0,0152
<i>Daphnia curvirostris</i>	0,0119
<i>Daphnia galeata</i>	0,0062
<i>Daphnia magna</i>	0,0073
<i>Daphnia pulex</i> TR1	0,0064
<i>Daphnia pulex</i> TR2	0,0092

Çizelge 4.11 K2P modeli kullanılarak COI gen bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan monofiletik gruplar arasındaki genetik mesafe matrisi

	<i>Daphnia cucullata</i>	<i>Daphnia curvirostris</i>	<i>Daphnia galeata</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia pulex</i> TR1	<i>Daphnia pulex</i> TR2
<i>D. cucullata</i>						
<i>D. curvirostris</i>	0,249					
<i>D. galeata</i>	0,123*	0,248				
<i>D. magna</i>	0,239	0,244	0,216			
<i>D. pulex</i> TR1	0,292	0,253	0,284	0,297		
<i>D. pulex</i> TR2	0,275	0,238	0,281	0,305**	0,161	

* en düşük değer, ** en yüksek değer

Daphnia cinsi içerisinde görülen genetik varyasyonun hiyerarşik yapılanmasını ortaya koymak üzere Arlequin 3.5 (Excoffier vd. 2010) paket programı kullanılarak, moleküler varyans analizi yapılmıştır. Bu çalışmada, AMOVA analizleri örneklem sayısı dikkate alınarak gerçekleştirilmiş olup *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* TR1 ve *Daphnia pulex* TR2 monofiletik grupları için ayrı ayrı yapılmış ve populasyon içi ve populasyonlar arası varyasyon oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.12). AMOVA analizleri için tanımlanan monofiletik gruplar ve monofiletik grup içinde yer alan populasyonlara ait F_{ST} değerleri çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Monofiletik gruplar için yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Monofiletik Grup	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyasyon Yüzdesi	Bağılılık İndeksi (F_{ST})
<i>Daphnia magna</i>	Populasyonlar arası	5	50,911	1,31957	60,39	0,60393
	Populasyon içi	37	32,019	0,86539	39,61	
<i>Daphnia pulex</i> TR1	Populasyonlar arası	1	12,667	1,14738	53,81	0,53813
	Populasyon içi	20	19,696	0,98482	46,19	
<i>Daphnia pulex</i> TR2	Populasyonlar arası	2	17,500	1,34950	90,67	0,90669
	Populasyon içi	18	2,500	0,13889	9,33	

Çizelge 4.13 Moleküler varyans analizi (AMOVA) ile belirlenmiş monofiletik gruplar içerisinde yer alan populasyonlara ait F_{ST} değerleri

Monofiletik Grup	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia pulex TR1</i>	<i>Daphnia pulex TR2</i>
	F_{ST}	F_{ST}	F_{ST}
Populasyon	AK 0,61182	AR 0,56052	BO 0,92131
	AN1 0,61648	KA 0,52532	KY 0,92131
	AN2 0,65259		RI 0,87013
	ED 0,58940		
	KÜ 0,54656		
	MA 0,61765		

Moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre en yüksek varyasyonun ($F_{ST}=0,90669$) *Daphnia pulex TR2* populasyonları arasında olduğu belirlenmiştir. Tüm monofiletik gruplarda populasyonlar arası varyasyon populasyon içi varyasyondan daha yüksek bulunmuştur. Populasyon içi varyasyon oranlarına bakıldığında *Daphnia pulex TR2* populasyonlarının *Daphnia pulex TR1* ve *Daphnia magna* populasyonlarından daha yüksek varyasyona sahip olduğu gözlenmiştir. Önemliliğin tahmini için 1000 permutasyon uygulanmıştır. Tüm sonuçlar istatistiki açıdan önemli ($P<0.001$) bulunmuştur.

Farklı şekillerde hesaplanabilen gen akışı, bu çalışmada genetik farklılığın seviyesinin göstergesi olan populasyonlar arası ikili F_{ST} değerlerine bağlı olarak (Hudson vd. 1992) hesaplanmıştır (Çizelge 4.14). Genetik farklılaşmanın istatistiki açıdan önemi için ki kare testi uygulanmış ve tüm sonuçlar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Bu çalışmada Nm değeri bütün monofiletik gruplar için 1'den küçük bulunmuştur.

Çizelge 4.14 Populasyonlar arası ikili F_{ST} değerlerine bağlı olarak hesaplanan gen akışı değerleri

	F_{ST}	Nm	P
<i>Daphnia cucullata</i>	0,48661	0,53	*
<i>Daphnia curvirostris</i>	0,65915	0,26	**
<i>Daphnia galeata</i>	0,90476	0,05	***
<i>Daphnia magna</i>	0,60638	0,32	***
<i>Daphnia pulex TR1</i>	0,57104	0,38	**
<i>Daphnia pulex TR2</i>	0,89595	0,06	***

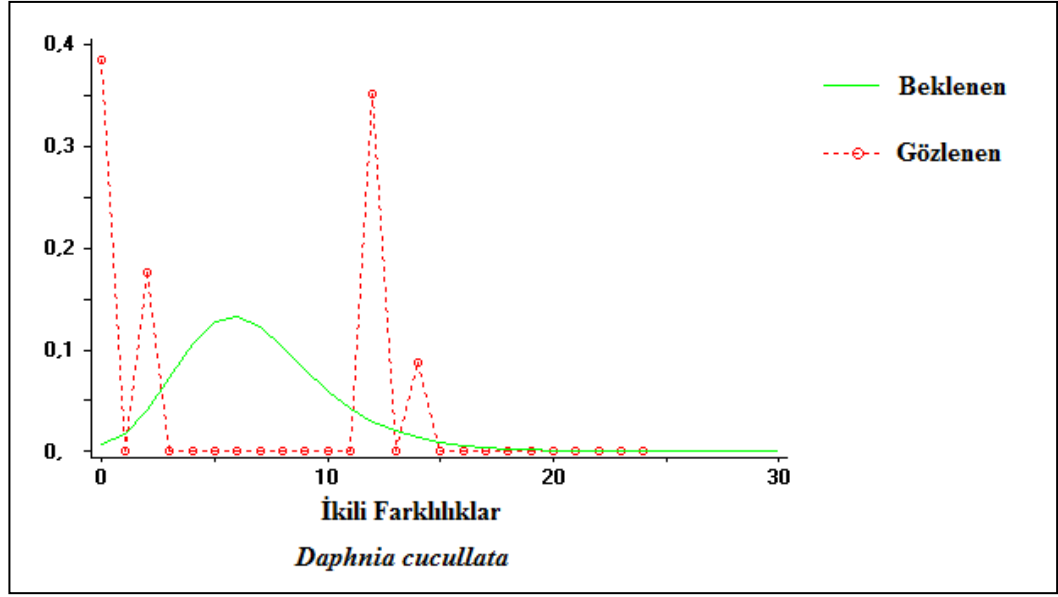
F_{ST} : genetik farklılaşma; Nm: gen akışı; P: genetik farklılaşmanın önemi
 $0.01 < p < 0.05$ *; $0.001 < p < 0.01$ **; $P < 0.001$ ***

Populasyonların seçilime uğrayıp uğramadığını belirlemek için nötralite testleri kullanılmıştır. Bu testler aynı zamanda zamanda populasyon büyümesi ve darboğazı ile ilgili bilgiler de vermektedir. Bu amaç doğrultusunda, COI gen bölgesine ait diziler arasındaki farklılaşmada nötral süreçlerin etkili olup olmadığını yani nükleotit polimorfizminin seçim tarafından etkilenip etkilenmediğini belirleyebilmek için, DnaSP 5.10.01 (Rozas vd. 2010) analiz programı kullanılarak Tajima'nın D (Tajima 1989) ve Fu'nun Fs (Fu 1997) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.15). Bu çalışmada nötralite testleri sonucunda negatif çıkan D ve Fs değerleri istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

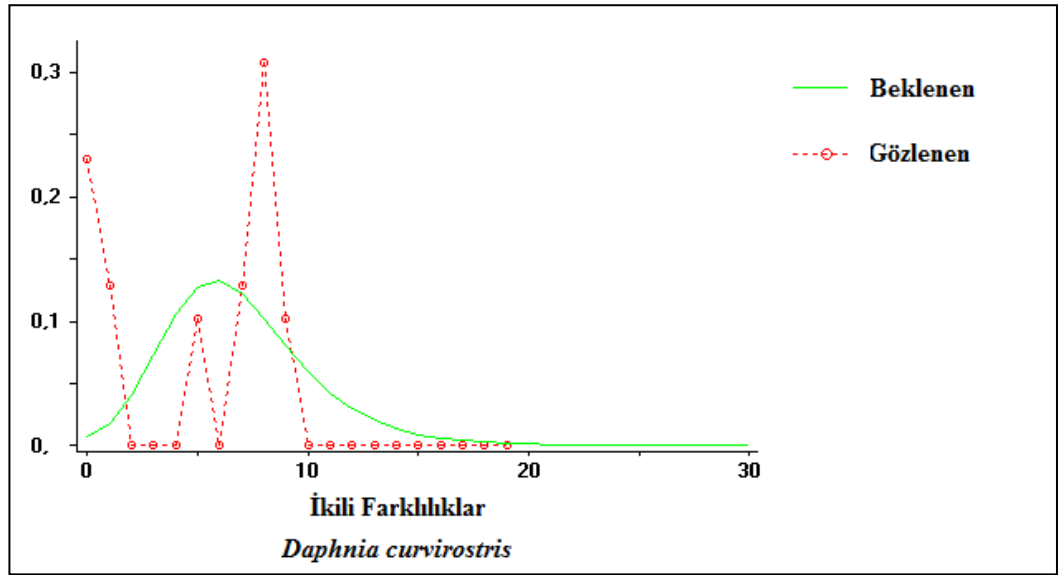
Çizelge 4.15 Populasyonlara ait Tajima'nın D ve Fu'nun Fs değerleri

	D	Fs
<i>Daphnia cucullata</i>	1,28779	7,020
<i>Daphnia curvirostris</i>	1,57181	3,884
<i>Daphnia galeata</i>	2,47552	5,144
<i>Daphnia magna</i>	-0,32489	-1,476
<i>Daphnia pulex</i>	3,45158	26,640
<i>Daphnia pulex</i> TR1	1,32786	3,527
<i>Daphnia pulex</i> TR2	-0,15632	1,342

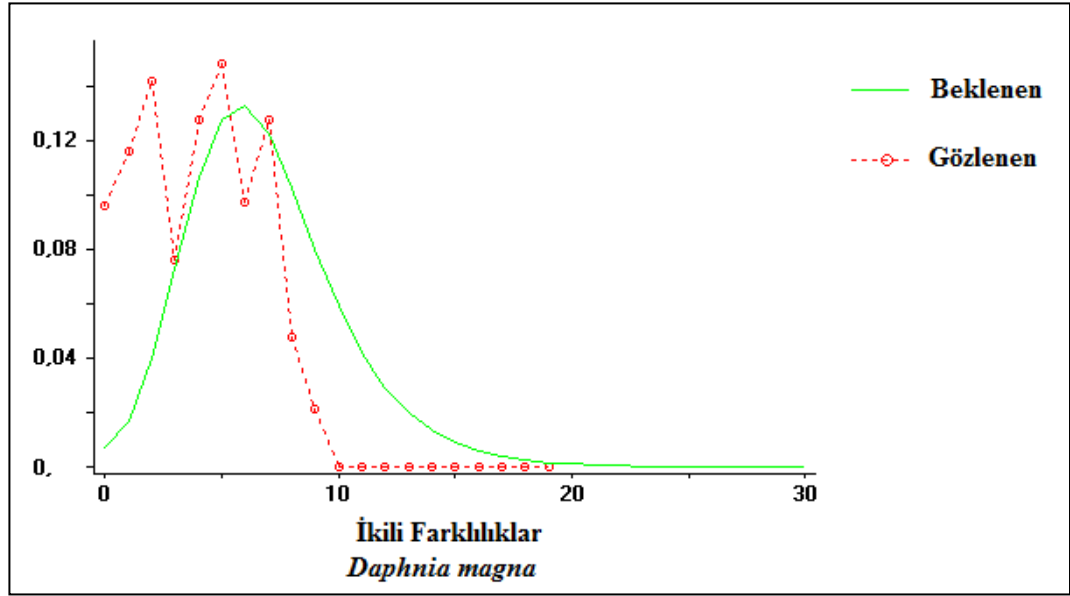
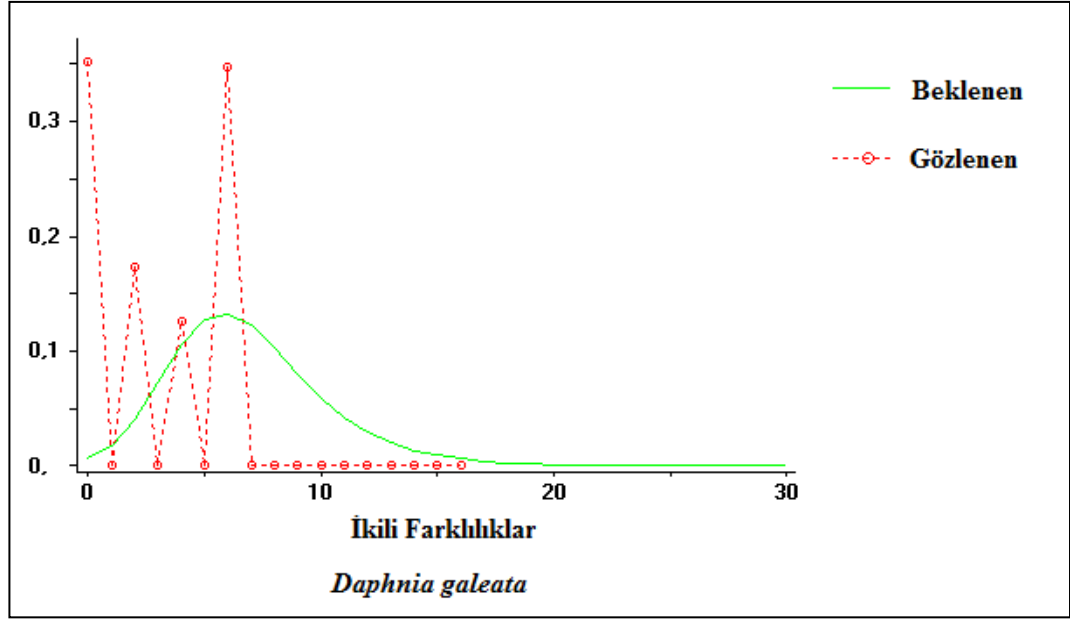
ikili uyumsuzluk dağılımı (mismatch distribution) analizleri ile incelenen populasyonlardaki tarihsel demografi ortaya konmuştur (Harpending 1994). Uyumsuzluk dağılımı analizi, populasyon büyümesi-düşüşü modeli (growth-decline model) altında DnaSP 5.10.01 (Rozas vd. 2010) programıyla gerçekleştirilmiştir. Tüm monofiletik gruplar için çok tepecikli (multimodal) dağılım yapısında grafikler elde edilmiş ve şekil 4.28-4.33'de verilmiştir.

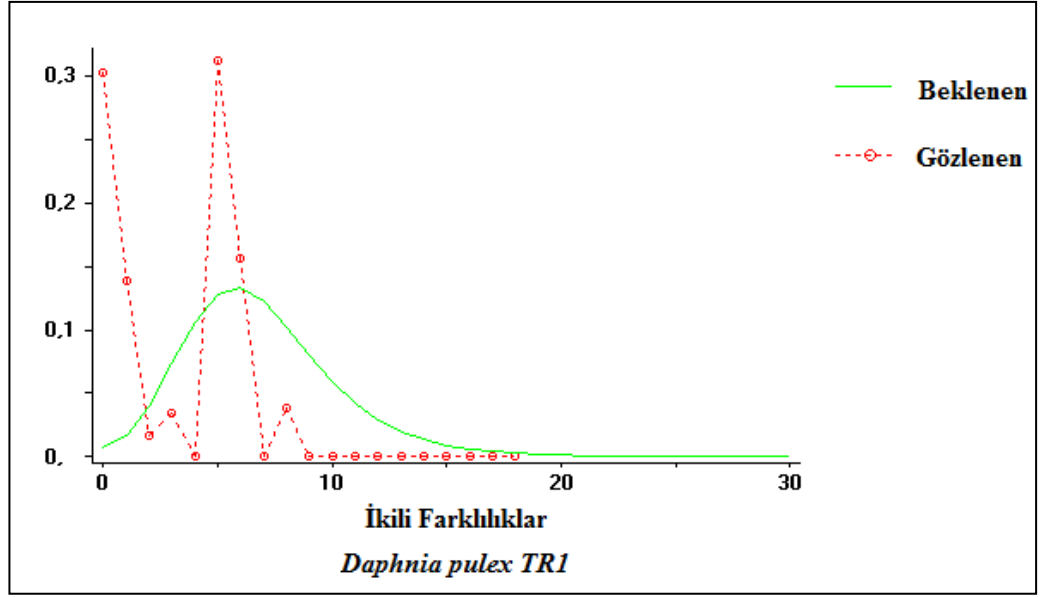


Şekil 4.28 *Daphnia cucullata* populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri

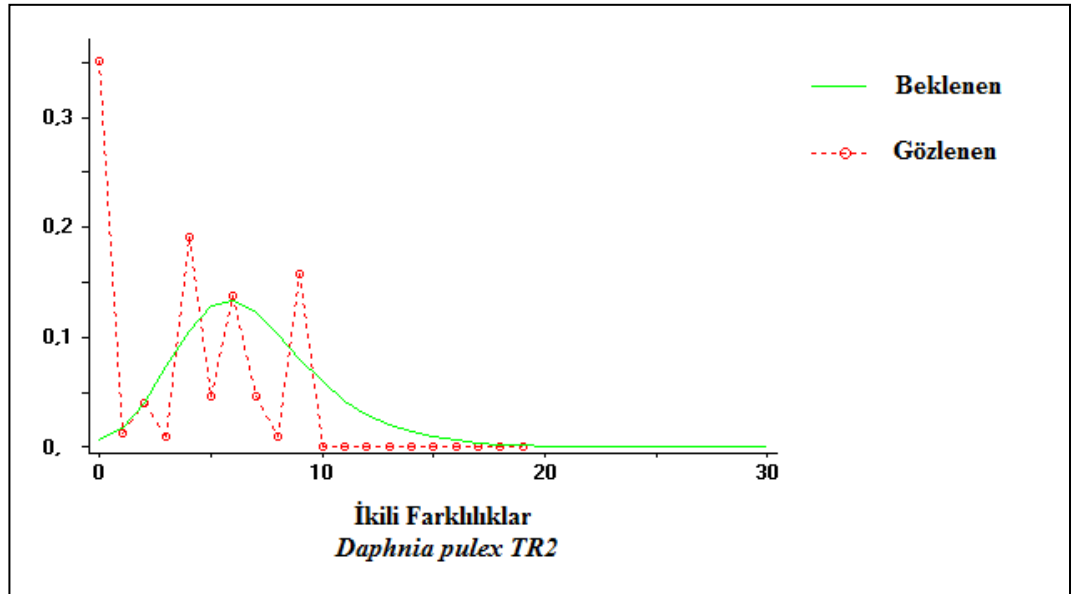


Şekil 4.29 *Daphnia curvirostris* populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri





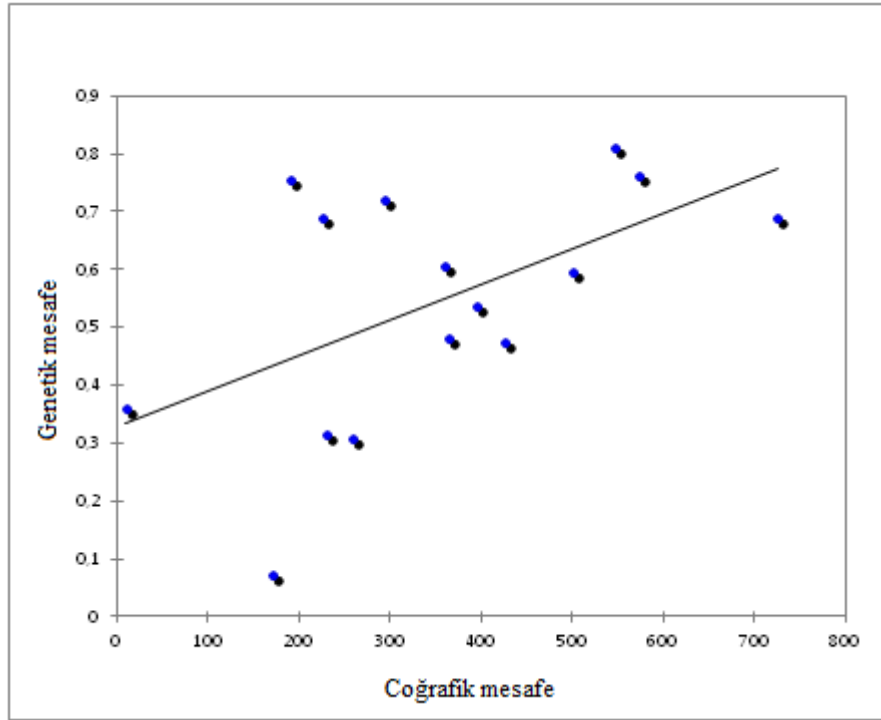
Şekil 4.32 *Daphnia pulex* TR1 populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri



Şekil 4.33 *Daphnia pulex* TR2 populasyonlarına ait uyumsuzluk dağılımı grafikleri

Uyumsuzluk dağılım grafiklerine bakıldığında tüm monofiletik gruplar için çok modelli (multimodal) dağılım yapısı olduğu görülmektedir. Çok modelli dağılım yapısı sabit popülasyon büyüklüğü ile ilişkilendirilmektedir. Bu durumda popülasyonların dengede olduğu söylenebilir.

Popülasyonlar arası genetik mesafenin coğrafi mesafe ile olan ilişkisini belirleyebilmek için Mantel testi yapılmıştır. Bunun için lokaliteler arası mesafe km cinsinden kuşbakışı ölçülmüş ve coğrafik mesafe matrisi oluşturulmuştur. Ayrıca popülasyonlar arası ikili F_{ST} değerleri kullanılarak genetik mesafe matrisi oluşturulmuştur. Bu matrisler kullanılarak XLSTAT (<http://www.xlstat.com/en/about-us.html> 2013) programı ile Mantel testi yapılmıştır. Bu test örnek sayısının uygun olduğu üç monofiletik grup (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex* TR1 ve *Daphnia pulex* TR2) için yapılabilmektedir. Coğrafik mesafe ile genetik mesafe arasında *Daphnia magna* için ilişki bulunmuş, *Daphnia pulex* kompleksi için ilişki bulunamamıştır. *Daphnia magna* için coğrafik ve genetik mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren Mantel test grafiği şekil 4.34 ve verilmiştir.



Şekil 4.34 *Daphnia magna* için coğrafik mesafe ile genetik mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren Mantel test grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Daphnia cinsi tatlı su zooplanktonunun bilinen en yaygın grubudur. Bu grubun üyeleri biyolojinin birçok alanında deney organizması olarak tercih edilmektedir. Genetik, evrim ve populasyon biyolojisi gibi çalışma alanlarında da model organizma olarak *Daphnia* türleri kullanılmaktadır. Farklı habitatlarda ve farklı iklim koşullarında yaşayabilmeleri, döngüsel partenogenetik üreme özelliğine sahip olmaları ve tüm kıtalarda yaygın olarak bulunmaları nedeniyle model organizma olarak tercih edilen bu grubun taksonomisi hala tartışmalıdır. Bu canlılarda vücut şekli ve diğer morfolojik özellikler, çevresel faktörlere bağlı olarak yüksek derecede değişkenlik gösterebilmektedir. Adaptasyon yeteneklerinin yüksek olması ve çevresel koşullara bağlı olarak gözlenen morfolojik değişiklikler bu grubun klasik taksonomisini zorlaştırmaktadır. Taksonomiye zorlaştıran bir başka özellikleri ise bazı türlerin hibrit oluşturma özelliğine sahip olmalarıdır. Bu nedenle özellikle son 20 yıldır geniş coğrafik bir skalada bu canlıların moleküler genetik analizlerine ilişkin çalışmalara eğilimin arttığı bilinmektedir (Benzie 2005).

Amerika, Avrupa, Avustralya ve Asya’da *Daphnia* cinsi için yapılmış çok sayıda moleküler çalışma bulunmaktadır (Crease 1999, Hebert vd. 2003, Penton vd. 2004, De Galas ve De Meester 2005, Ishida 2006, Markova vd. 2007, Mergeay vd. 2008, Adamowicz vd. 2009, Kotov ve Taylor 2010, Duggan vd. 2012). Son zamanlarda Türkiye omurgalı hayvanlarından, balıklar, memeliler, kuşlar ve sürüngenler için, omurgasız hayvanlarından ise böcekler için moleküler düzeyde çalışmalar yapılmaktadır (Gündüz vd. 2000, Palmer vd. 2000, Şen vd. 2001, Hrbek vd. 2002, Hrbek vd. 2004, Susnik vd. 2004, Poulakakis vd. 2005, Bardakçı vd. 2006, Kandemir vd. 2006, Carreras vd. 2007, Meadows vd. 2007, Bektaş ve Beldüz, 2008, Kaya ve Yıldız 2008, Özdil ve İlhan 2012, Çiftci vd. 2013, Perktas ve Quintero 2013). Fakat, Türkiye’de zooplanktonik organizmalar üzerine yapılmış herhangi bir moleküler çalışmaya rastlanmamıştır.

Türkiye, Palearktik Bölge’de yer alan, Trakya bölgesi ile Avrupa’ya, Anadolu Yarımadası’yla da Asya’ya bağlantısı bulunan bir kara parçasıdır. Kıtalar arasında yer

almasından dolayı birçok hayvan taksonunun bölgenin batısından doğusuna, kuzeyinden güneyine yayılımına izin veren bir geçiş bölgesi özelliği taşımaktadır (Kosswig 1955, Demirsoy 2002). Ayrıca sıradağlar (Anadolu Diyagonalı, Toroslar ve Kuzey Anadolu Dağları), Orta Anadolu Platosu, Marmara Denizi ve Orta Anadolu Göl Sistemi gibi geçmişten günümüze gen akışını engelleyen birçok bariyeri de içermektedir (Bilgin 2011). Birçok canlı grubunun evrimsel olarak farklılaşması, bu bariyerlerin etkisi ile gerçekleşmiş olup özellikle buzul ve buzul arası dönemlerde bu bariyerler, geçişleri büyük ölçüde engellediği için populasyon farklılaşmalarına ya da yayılışların sınırlandırılmasına neden olmuştur (Demirsoy 2002).

Asya ve Avrupa arasında köprü konumunda olan ülkemizin mevcut *Daphnia* türleri üzerine yapılacak çalışmaların, bu iki kıta arasında gen akışının açıklanmasında oldukça önemli bir kaynak niteliğinde olacağı düşünülmüştür. Ayrıca taksonomiden kaynaklanan problemlerin ortaya konması ve dünya genelinde mevcut olan *Daphnia* türlerinin DNA dizi verilerine Türkiye örneklerinin de eklenmesi düşüncesi ile örnekleme yapılmış ve mevcut *Daphnia* türleri hem morfolojik taksonomi hem de moleküler taksonomileri bakımından değerlendirilmiştir. Yapılan morfolojik taksonomi ile 5 türün (*Daphnia cucullata*, *Daphnia curvirostris*, *Daphnia galeata*, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*) varlığı belirlenmiştir.

NCBI veri tabanındaki nükleotit dizileri incelendiğinde *Daphnia* cinsi için mevcut olan 14323 nükleotit dizisinin 1114 tanesinin COI gen bölgesine ait olduğu görülmektedir. Diğer gen bölgeleri ile kıyaslandığında mtDNA'nın en fazla çalışılan gen bölgesinin, *Daphnia* türleri için COI gen bölgesi olduğu, bunu 734 nükleotit dizisi ile 16S rRNA ve 681 nükleotit dizisi ile 12S rRNA gen bölgelerinin izlediği görülmektedir.

COI geninin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğü, metazoan türler için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesinin yanı sıra farklı taksonomik seviyelerde kullanılabilir bir filogenetik sinyale sahip olmasıdır. COI geninde bulunan kodonların üçüncü pozisyonundaki nükleotidleri yüksek oranda değişim göstermektedir ve bu nedenle mitokondriyal rRNA genlerine oranla üç kat daha yüksek moleküler evrim hızına sahip olarak değerlendirilmektedir (Knowlton ve Weigt 1998). Bir diğer

önemli nokta ise, COI geninde gerçekleşen evrimin, yakın türlerin ayırımına imkan tanıyan ve coğrafik yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek bir hızda gerçekleşmesidir (Bucklin vd. 2011). Bu evrim hızı, COI dizilerinin sadece birbirine yakın türlerin ayırımında değil, aynı zamanda bir türün farklı populasyonlarının ayırımında da başarılı bir moleküler belirteç olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Cox ve Hebert 2001). COI gen bölgesinin tür seviyesinde tanımlamalarda etkin bir şekilde kullanılabilirliği günümüzde birçok omurgalı ve omurgasız hayvan grubu için kabul edilmiştir (Waugh 2007).

Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında *Daphnia* cinsine ait bazı türlerin populasyonları arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek için mtDNA'nın COI bölgesi tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, polimorfizm farklılıklarına bakılarak toplam 34 tane haplotipin var olduğu belirlenmiş ve haplotip sayısının en yüksek (13) olduğu türün *Daphnia magna* olduğu görülmüştür. Haplotip çeşitliliğinin 0,904 değeri ile en yüksek *Daphnia magna*'ya, 0,615 değeri ile en düşük *Daphnia cucullata*'ya ait olduğu, nükleotit değişikliğine bakıldığında ise en yüksek değerin 0,01074 ile *Daphnia cucullata*'ya, en düşük değerin ise 0,00545 ile *Daphnia galeata*'ya ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9). De Galas ve De Meester (2005), Avrupa'da 75 lokaliteden yaptıkları örnekleme ile *Daphnia magna*'nın COI gen bölgesini kullanarak 39 haplotipin var olduğunu belirlemişlerdir. Orsini vd. (2013), Belçika'da 19 lokalitede yaptıkları örnekleme sonucunda yine COI gen bölgesini kullanarak *Daphnia magna* için 9 haplotipin var olduğunu kaydetmişler ve bu 9 haplotipten 5 tanesinin De Galas ve De Meester (2005) tarafından önceden kaydedilen haplotipler olduğunu ifade etmişlerdir. Mergeay vd. (2008) Bolivya'nın 12 gölünden aldıkları *Daphnia pulex* kompleksine ait bireyleri üç gen bölgesi bakımından incelemişler ve COI gen bölgesinin dizi analizi sonuçlarına göre 6 haplotipin varlığını tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında, 7 lokaliteden alınan 44 tane *Daphnia magna* örneği için 13 haplotipin, 7 lokaliteden *Daphnia pulex* kompleksine ait 48 birey için 11 haplotipin belirlenmesinden yola çıkarak, Türkiye'nin haplotip çeşitliliği bakımından zengin olduğunu söyleyebiliriz.

Haplotipler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koyabilmek üzere, neighbour joining, maximum parsimony, maximum likelihood ve Bayesian yaklaşımları ile oluşturulan tüm filogenetik ağaçlarda, dış grup olarak seçilen *Simocephalus* cinsine ait türler ağacın en altında yer almış olup, *Daphnia* cinsinden bariz bir şekilde ayrılmıştır. Bütün filogenetik ağaçlar topoloji bakımından benzer bulunmuştur. Filogenetik ağaçlar, morfolojik taksonomiden farklı olarak 6 tane monofiletik grubun varlığını ortaya koymuştur. Morfolojik taksonomiye göre *Daphnia pulex* olarak tanımlanan türün, moleküler taksonomiye göre, NJ, MP ve ML ağaçları ile bootstrap değeri %99 olan, Bayesian ağacı ile son olasılık değeri 1 olan yüksek güvenilirlikle iki farklı monofiletik gruba ayrıldığı belirlenmiştir. AR ve KA örnekleri aynı monofiletik grup içerisinde BO, KY, ER, Rİ1 ve Rİ2 örnekleri aynı monofiletik grup içerisinde kümelenmiştir.

Bütün filogenetik ağaçlardaki bootstrap değerleri incelendiğinde monofiletik grupların bir arada bulunma ihtimallerinin %99 seviyesinde oldukça yüksek değerlere sahip olduğu, monofiletik grupların birbirlerinden ayrıldıkları dallara bakıldığında bootstrap değerlerinin %83 'ün üzerinde olduğu görülmüştür. Sadece bir dalda değer %83'ün altında bulunmuştur. Düşük olan bu bootstrap değeri NJ ağacında %58, ML ağacında %62, MP ağacında %86 değerindedir. Hillis ve Bull (1993) yaptıkları çalışma ile %70'in üzerindeki bootstrap değerlerinin oluşturduğu gruplandırmanın %95'in üzerinde bir doğruluğa sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine aynı çalışmada %50'nin üzerindeki bootstrap değerlerinin doğru kabul edilebileceği ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra yapılan çoğu çalışmada %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri güvenilir kabul edilmiş ve %50'nin altında olan dallar çöktürülmüştür. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada elde edilen filogenetik ağaç sonuçlarının güvenilirlik seviyesinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

Populasyonlar arasındaki bağlantıyı ortaya koymak için, haplotip verilerine dayanarak oluşturulan median-joining ağacı ile elde edilen haplotip ağı, filogenetik ağaç analizleri sonucu ortaya çıkan monofiletik grupları ve bunlar arasındaki ilişkileri desteklemiştir. Haplotip ağı nükleotit farklılıkları göz önünde bulundurularak incelendiğinde, birbirine en yakın olan monofiletik grupların *Daphnia galeata* ile *Daphnia cucullata* olduğu, birbirine en uzak monofiletik grupların ise *Daphnia magna* ile *Daphnia pulex* olduğu

gözenmiştir. Bu durum, *Daphnia galeata* ve *Daphnia cucullata*'nın aynı tür kompleksi içerisinde bulunması ile, *Daphnia magna* ve *Daphnia pulex*'in ise farklı tür komplekslerinde yer almaları ile açıklanabilir. Adamowicz vd. (2009)'nin tatlısu zooplankton genusunun kıtalararası allopatrik türleşmesine ilişkin yapmış oldukları filogenetik bir çalışmada, farklı türler olduğu düşünülen 92 tür incelenmiş ve tür kompleksleri belirlenmiştir. Adamowicz vd. (2009)'nin belirlemiş oldukları tür kompleksleri incelendiğinde de *Daphnia galeata* ve *Daphnia cucullata*'nın aynı tür kompleksinde, *Daphnia magna* ve *Daphnia pulex*'in ise farklı tür komplekslerinde yer aldıkları görülmektedir.

Kimura-2-Parametresi altında hesaplanan genetik mesafe değerlerine göre, grup içi popülasyonlar arasındaki mesafe değeri düşük (%0,6 – %1,5) bulunmuştur (Çizelge 4.10). Gruplar arası mesafe değerlerine bakıldığında, *Daphnia galeata* ile *Daphnia cucullata*'nın birbirine en yakın (%12), *Daphnia magna* ile *Daphnia pulex* TR2'nin birbirine en uzak (%30) monofiletik gruplar olduğu görülmüştür (Çizelge 4.11). Morfolojik olarak *Daphnia pulex*, moleküler olarak *Daphnia pulex* TR1 ve *Daphnia pulex* TR2 olarak tanımlanan monofiletik gruplar arasındaki mesafe değeri hesaplandığında *Daphnia pulex* TR1 ve *Daphnia pulex* TR2 arasında %16,1 oranında farklılığın olduğu görülmüştür. Adamowicz vd. (2009)'nin bildirdiği bir çalışmada, tür kompleksleri içerisindeki farklılık oranı %14'den küçük, tür kompleksleri arasındaki farklılık oranı ise %14'den büyük olarak kaydedilmiştir. Ancak yine bu çalışmada hesaplanan %16,8 ve %23,3 oranları, ait olduğu türler hibrit türler olduğu için kabul edilmiştir. Aynı şekilde Benzie (2005)'de mtDNA'daki farklılık oranı eğer %14'ün üzerinde ise hibridizasyonun söz konusu olduğu ifade edilmiştir. Mergeay vd. (2008), Bolivya'da 12 lokaliteden topladıkları *Daphnia pulex* kompleksine ait bireylerle yapmış oldukları çalışma ile COI gen bölgesine ait 6 haplotipin olduğunu, bu haplotiplerden bir tanesinin (BoIC) kompleksin diğer üyelerinden yüksek oranda farklı olduğunu belirtmişler ve bu farklılığın oranını ise 12S ve COI gen bölgeleri için sırasıyla %4,3 ve %7,3 olarak vermişlerdir. Farklılık derecesini yüksek bulmalarına rağmen, bu 6 haplotipi de aynı tür ismi ile GenBank veritabanında tanımlamışlardır. Juracka vd. (2010)'nin Çek Cumhuriyeti'nden örnekledikleri *Daphnia curvirostris* komplekse ait bireylerin 12S, COI ve ND2 genlerindeki DNA dizi farklılıkları, bazı bireyler için

dikkate değer oranda yüksek bulunmuştur.. Kimura 2 parametresine göre 12S, COI ve ND2 genleri içi dizi farklılıklarını sırasıyla, %13, %23 ve %41 olarak belirledikleri bu bireyleri *Daphnia hrbacki* sp. nov. olarak isimlendirmişler ve bu türün en yakın akrabasının *Daphnia curvirostris* olduğunu ifade etmişlerdir. Ishida vd. (2006), ND2 gen bölgesini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, Japonya *Daphnia curvirostris*'ini hem morfolojik bakımdan hem de moleküler bakımından Avrupa ve Kuzey Amerika'daki *Daphnia curvirostris*'den çok farklı (%35) bulmuşlar ve bu yeni ırkı *Daphnia tanakai* sp. nov. olarak isimlendirmişlerdir. Kotov ve Taylor (2010), Afrika *Daphnia obtusa* kompleksinde mtDNA farklılıklarını COI ve 12S gen bölgelerine dayalı olarak araştırmışlar ve yaptıkları çalışmayı morfolojiyle desteklemişlerdir. Etiyopya'dan aldıkları örneklerin *Daphnia obtusa* kompleksinin diğer üyelerinden bazı morfolojik karakterler bakımından ve genetik olarak oldukça farklı olduğunu, en yakın akrabasının bu kompleks içerisinde yer alan *Daphnia pileata* olduğunu belirlemişler ve bu yeni türü *Daphnia izpodvala* sp. nov olarak adlandırmışlardır. Farklılığın oranını K80 parametresine göre COI gen bölgesi için %17,9 olarak kaydetmişlerdir. Bu tez çalışmasına ait *Daphnia pulex* kompleksinde genetik mesafe değerinin bu derece yüksek olması, *Daphnia pulex* TR1 ve *Daphnia pulex* TR2 monofiletik gruplarının, aynı tür kompleksi içerisinde yer alan farklı türler olabileceği veya hibrit bir tür olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir.

Bu tez çalışmasında, COI dizilerindeki korunmuşluk oranı, çalışılan bütün türler için oldukça yüksek (%96,8-%98,8) bulunmuştur (Çizelge 4.7). Cins düzeyinde korunmuşluk oranı %63,1 olarak belirlenmiştir. Korunmuşluk oranının bu derece yüksek olması, bu çalışmada kullanılan COI gen bölgesini *Daphnia* için doğru bir moleküler belirteç yapmaktadır. Colbourne vd. (2006) Avrupa *Daphnia carinata* kompleksi için 12S ve 16S gen bölgelerine ait sonuçların çok benzer olduğunu, COI gen bölgesinin ise daha bilgilendirici olduğunu ortaya koymuşlardır. Mergeay vd. (2008)'nin *Daphnia pulex* kompleksinde 3 farklı gen bölgesi (12S rRNA, COI ve ND5) kullanarak gerçekleştirdikleri genetik çeşitlilik araştırmasının sonuçları da COI gen bölgesinin diğerlerine göre daha bilgilendirici bir gen bölgesi olduğunu belirlemişlerdir. Aynı şekilde Hebert vd. (2003), Kuzey Amerika'daki *Daphnia ambigua* örneklerinin

COI ve 12S rRNA gen bölgelerindeki dizi farklılıklarını araştırmışlar ve COI bölgesinin daha yüksek varyasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bu tez çalışmasına ait monofiletik grupların nükleotit kompozisyonuna bakıldığında A+T oranının G+C oranından yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). A+T/G+C oranı türe göre değişir ki insan ve hayvan DNA'larında A ve T bazlarının, bakteri ve virüs DNA'larında ise G ve C bazlarının çok olduğu bilinmektedir . Özellikle böceklerdeki A+T eğilimi çok yüksek seviyede fazladır (Simon vd. 1994).

Her bir monofiletik grup için transisyon/transversiyon oranı ayrı ayrı hesaplandığında, çalışılan bütün monofiletik gruplar için transisyon oranı transversiyon oranından yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.8). Herhangi bir genomdaki hemen hemen bütün DNA dizileri incelendiğinde, transisyonların (T↔C, A↔G) transversiyonlardan (T↔A, T↔G, C↔A, C↔G) daha yüksek oranda meydana geldiği Brown vd. (1982), Gojobori vd. (1982), Curtis ve Clegg (1984), Wakeley (1994, 1996) gibi araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir. Transisyon/transversiyon oranı DNA dizi evrimi için genel bir özellik olarak kabul edilmesine rağmen, hayvan mitokondriyal DNA'sında, çekirdek ya da kloroplast DNA'sından daha etkili olduğu Wakeley (1996) tarafından kaydedilmiştir. Transisyon/transversiyon oranının hesaplanması sadece DNA dizi evriminin anlaşılması için değil aynı zamanda dizi mesafesinin güvenilir bir şekilde hesaplanması ve filogeninin oluşumu için önemlidir (Yang ve Yoder 1999). Bu tez çalışmasındaki sonuçlar, *Daphnia* populasyonları arasındaki farklılaşmaların ortaya konulmasında transisyonların etkili olduğunu göstermektedir.

Hiyerarşik gruplar arasındaki farklılaşmayı değerlendirmek üzere yapılan moleküler varyans analizi sonuçlarına göre, üç monofiletik grup (*D.magna*, *D. pulex TR1* ve *D. pulex TR2*) için de F_{ST} değeri %50'nin üzerinde bulunmuştur. En yüksek varyasyonun ($F_{ST}=0,90669$) *Daphnia pulex TR2* populasyonları arasında olduğu belirlenmiştir. Tüm monofiletik gruplarda populasyonlar arası varyasyon populasyon içi varyasyondan daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.12). F_{ST} , populasyonlar arası genetik farklılaşmayı gösteren en kapsamlı ölçütlerden biridir. Daima 0 ile 1 arasında değişen pozitif değerler alır. Freeland (2005)'e göre F_{ST} değerinin 0 olması populasyonlar arasında genetik

farklılaşma olmadığının; F_{ST} değerinin 0 ile 0,05 arasında olması genetik farklılaşmanın ihmal edilebilir düzeyde olduğunun; F_{ST} değerinin 0,25'den büyük olması ise genetik farklılaşma derecesinin yüksek olduğunun göstergesidir. Populasyonlar arası ikili F_{ST} değerlerine bağlı olarak hesaplanan N_m değeri bütün monofiletik gruplar için 1'den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.14). N_m için kritik değer 1'dir. Eğer N_m değeri 1'den küçükse populasyonlar arası farklılaşma gözlenmektedir, yani gen akışı yoktur (Wright 1951). Orsini vd. (2013), *Daphnia magna* ile yapmış oldukları çalışmada F_{ST} değerini yüksek bulmuşlar ve yüksek F_{ST} değerini düşük gen akışı ve yüksek genetik farklılaşma ile ilişkilendirmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen moleküler varyans analizi sonuçları Orsini vd. (2013) ile uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmada, populasyonların seçilime uğrayıp uğramadığını belirlemek için yapılan nötralite testleri sonucunda, *Daphnia magna* için hem Tajima'nın D hem de F_u 'nun F_s değerleri, *Daphnia pulex* TR2 için ise sadece Tajima'nın D değeri negatif bulunmuştur (Çizelge 4.15). Ancak bu negatiflik istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. D ve F_s değerlerinin negatif olması durumunda, populasyon genişlemesinden ya da seçici süpürmeden, pozitif olması durumunda ise, populasyon azalmasından ya da dengeli seçimden bahsedildiği bilinmektedir. Özellikle F_u 'nun F_s değeri populasyon büyümesine karşı oldukça hassas olup, populasyon büyümesi altında bu test istatistiği yüksek negatif değerler vermektedir (Fu 1997).

Uyumsuzluk dağılımı, populasyonların geçmişteki büyüklükleri hakkında bilgi veren ve oldukça sık kullanılan grafiksel bir yöntemdir. Düzgün çan eğrisine sahip uyumsuzluk dağılımları, hızlı populasyon büyümesine, çok tepecikli dağılım sabit populasyon büyüklüğüne işaret etmektedir (Slatkin ve Hudson 1991, Rogers ve Harpending 1992). Sabit büyüklüğe sahip populasyonlarda genişleyen populasyonlara göre bireyler arasında daha fazla mutasyon paylaşılmaktadır. Bu tez çalışmada elde edilen uyumsuzluk dağılım grafiklerine bakıldığında tüm monofiletik gruplar için çok tepecikli dağılım yapısı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada yapılan nötralite ve uyumsuzluk dağılım testleri birbirleri ile uyumlu bulunmuş, populasyonların genişleme etkisinde olmadığı, dengede ve darboğaz etkisinde olabileceği düşünülmüştür. Orsini vd. (2013), Avrupa'daki *Daphnia magna* populasyonu için düzgün çan eğrisine sahip tek tepecikli bir uyumsuzluk dağılım grafiği elde etmişler ve populasyonun dengede olmadığını

kaydetmişlerdir. Bu tez çalışmasında populasyon büyümesine ilişkin elde edilen sonuçlar, Orsini vd. (2013)'nin elde ettiği sonuçlardan farklı bulunmuştur.

Populasyonlar arası genetik mesafenin coğrafi mesafe ile olan ilişkisini belirleyebilmek için yapılan Mantel test ile *Daphnia magna* için $p=0,035$ ($p<0.05$) anlamlılık derecesinde %54 oranında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu, coğrafik olarak yakın olan populasyonların COI dizilerinin birbirlerine daha benzer olduğunu, mesafe arttıkça benzerliğin azaldığını göstermektedir. Oysaki, moleküler belirteçler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda küçük populasyonlarda büyük populasyonlardan daha büyük F_{ST} değerleri kaydedilmiştir (Hebert 1987, Wolf 1988, Jacobs 1990, De Meester 1996, Vanoverbeke ve De Meester 1997). Hatta bitişik havuz populasyonlarında bile F_{ST} değeri 0,2'den yüksek bulunmuştur (Korpelainen 1984, Wolf 1988, Innes 1991, Palsson 2000). Benzer şekilde Vanoverbeke ve De Meester (1997), Haag vd. (2006), Orsini vd. (2013) gibi araştırmacılar da *Daphnia magna* ile yapmış oldukları çalışmalarda yakın populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın uzak populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmadan daha fazla olduğunu kaydetmişlerdir. Bu tez çalışmasında sadece *Daphnia magna* ve *Daphnia pulex* kompleksine ait bireyler için Mantel test yapılabilmektedir. Örnek sayısı artırılarak yapılacak analizler ile coğrafik mesafe ile genetik mesafe arasındaki ilişki üzerine daha sağlıklı yorumlar yapılabileceği düşünülmektedir.

Morfolojik ve moleküler taksonomi arasındaki farklılığı aydınlatabilmek ve karşılaştırma olanağı sunmak için, bu çalışmaya ait COI dizileri ile GenBank'a ait COI dizileri birlikte değerlendirildiğinde, bütün filogenetik ağaçlar (NJ, MP, ML, BI) benzer topolojide, birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Filogenetik ağaçlar incelendiğinde, *Daphnia magna*, *Daphnia curvirostris*, *Daphnia galeata* ve *Daphnia cucullata* monofiletik gruplarının GenBank'dan alınan örneklerle aynı grup içerisinde kümelendiği, bunlar için herhangi bir taksonomik karışıklığın söz konusu olmadığı, bunun aksine *Daphnia pulex* kompleksi için ciddi bir karışıklığın olduğu gözlenmiştir.

Daphnia pulex örnekleri için yapılan BLAST analizi ile *Daphnia pulex* TR1 monofiletik grubunun GenBank veri tabanındaki *Daphnia pulex* sensu Leydig, 1860 ile %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Daphnia pulex* TR2 monofiletik grubu ise

BLAST analizi yapıldığında, *Daphnia cf. pulicaria*, *Daphnia tenobrosa* ve *Daphnia pulex* ile sırasıyla %98, %95 ve %90 oranlarında benzerlik göstermiştir. Karşılaştırma olanağı sunmak için GenBank'dan alınan *Daphnia pulex* kompleksine ait olduğu bilinen *Daphnia pulex*, *Daphnia melanica*, *Daphnia pulicaria* ve *Daphnia tenobrosa* türleri filogenetik ağaç ve network analizlerine katılmıştır. Elde edilen filogenetik ağaçlar incelendiğinde, *Daphnia pulex* olarak adlandırılan türlerin 3 farklı grup şeklinde kümelendiği gözlenmiştir. AR ve KA örneklerini içeren ve bu çalışmada *Daphnia pulex* TR1 olarak tanımlanan monofiletik grup, Belçika (EU152320), Çek Cumhuriyeti (EU1523212008) ve Kanada (GQ475277)'dan *Daphnia pulex* olarak tanımlanmış türlerle %99 bootstrap değeri ile aynı grup içerisinde yer almıştır. Kuzey Amerika (AY380449), Amerika (DQ340843), Yeni Zelanda (HM622593), Kanada (AF117817) ve Kenya (AY745244)'dan *Daphnia pulex* olarak tanımlanan türler, Amerika (HM131366 ve FJ427495)'dan *Daphnia melanica* olarak, Kanada (JN233925) ve Arjantin (AF489525)'den *Daphnia pulicaria* olarak tanımlanmış türlerle %99 bootstrap değeri ile aynı grup içerisinde kümelenmiştir. Bu çalışmada *Daphnia pulex* TR2 olarak tanımlanmış olan monofiletik grup ise, Kanada (FJ427506 ve JN233926)'dan *Daphnia tenobrosa* olarak tanımlanmış tür ile %99 bootstrap değeri ile aynı grup içerisinde kümelenmiş ve bu monofiletik grup Amerika *Daphnia pulex*, *Daphnia melanica* ve *Daphnia pulicaria*'nın birlikte kümelendiği monofiletik gruptan %80 bootstrap değeri ile ayrılmıştır.

Daha önce yapılmış morfolojik, ekolojik ve genetik veriler incelendiğinde, *Daphnia pulex* tür kompleksinin 7 farklı türü kapsadığı görülmektedir (Hebert 1995, Colbourne vd. 1998, Markova vd. 2007). Mitokondriyal genlere dayalı çalışmalar, *Daphnia pulex* kompleksi içerisinde 3 büyük grubun (*Daphnia pulex*, *Daphnia pulicaria* ve *Daphnia tenobrosa*) var olduğunu ve bunların da 10 farklı ırkı içerdiğini ortaya koymuştur. *Daphnia pulicaria*'nın 7 farklı ırktan (3 Kuzey Amerika *D. pulicaria*, Panarktik *D. pulex*, *D. melanica*, hibrit takson *D. middendorffiana* ve *D. arenata*), *Daphnia tenobrosa*'nın ise 2 farklı ırktan (Avrupa *D. pulicaria*, *D. tenobrosa*) ve *Daphnia pulex*'in 1 ırktan (Avrupa *D. pulex*) oluştuğu bilinmektedir (Colbourne ve Hebert 1996, Colbourne vd. 1998, Adamowicz vd. 2002, Markova vd. 2007, Omilian vd. 2008, Omilian ve Lynch 2009).

Amerika’da yaygın olarak bulunan *Daphnia pulex* (sensu Hebert 1995) olarak refere edilen kriptik bir tür, Avrupa’da *Daphnia pulex* Leydig 1860 olarak tanımlanan tür ile morfolojik olarak benzerlik gösteren, fakat genetik olarak farklı bir tür olmasına rağmen bu iki ırk aynı isimle anılmaktadır. Aynı durum *Daphnia pulicaria* için de geçerlidir. *Daphnia pulicaria* (sensu Alonso 1996) olarak refere edilen Avrupa *Daphnia pulicaria*’sı, yaygın olarak Kuzey Amerika’da nadiren de Avrupa’nın kutup ve alpin bölgelerinde bulunan, *Daphnia pulicaria* Forbes 1893 olarak refere edilen tür ile genetik bakımdan farklılık göstermesine rağmen bu iki farklı ırk aynı isimle anılmaktadır (Mergeay vd. 2008). *Daphnia pulex* grubu içerisinde yer alan bir diğer kompleks de *Daphnia obtusa* kompleksidir. *Daphnia pulex* kompleksine ait sınıflandırma ve isimlendirme problemine benzer bir durum da *Daphnia obtusa* kompleksinde görülmektedir. *Daphnia obtusa* sinonim ismi ile anılan 3 farklı Asya ve Afrika ırkının olduğu Kotov ve Taylor (2010) tarafından yapılan çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, *Daphnia pulex* kompleksi için sınıflandırma ve adlandırma bakımından ciddi bir karışıklığın sözkonusu olduğu görülmektedir. Mergeay vd. (2008), Kotov ve Taylor (2010), Vergilino vd. (2011) gibi bir çok araştırmacı tarafından vurgulanan *Daphnia pulex* kompleksi içerisindeki sınıflandırmalarına ve adlandırma problemi bu tez çalışmasıyla da desteklenmiştir.

Bu tez çalışması ile COI gen bölgesinin *Daphnia* için iyi bir filogenetik belirteç olduğu sonucuna varılmıştır. Türkiye’de *Daphnia pulex* kompleksine ait iki farklı monofiletik grubun varlığı %16,1 dizi farklılığı ile ortaya konmuştur. *Daphnia pulex* TR2 olarak tanımlanan monofiletik grubun en yakın akrabasının %5,4 dizi farklılığı ile *Daphnia tenobrosa* olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu sonuçların farklı gen bölgeleri kullanarak gerçekleştirilecek çalışmalarla daha da güçlendirilebileceği düşünülmektedir. Yeni türleşmiş grupların, karmaşık filogenilere sahip olmaları sıklıkla rastlanan bir durumdur (Sanderson ve Shafer 2002, Felsenstein 2004, Knowles ve Chan 2008). Dolayısıyla tek bir gen bölgesine dayanarak yapılan filogenetik analizlerden kesin sistematik sonuçlara varılması tavsiye edilmemektedir (Peters vd. 2005). Farklı gen bölgelerinin evrimsel süreçlere farklı cevaplar verebileceği göz önüne alınmalı ve dolayısıyla farklı gen bölgelerinin aynı taksonlar için farklı filogenetik sonuçlar verebileceği göz ardı edilmemelidir (Felsenstein 2006). Bunun yanı sıra daha fazla takson ve karakter

kullanımının filogenetik analizlerin doğruluğunu arttırdığı Wiens (2006)'in yaptığı çalışmada vurgulanmıştır.

Bu tez çalışması ile farklı gen bölgeleri kullanmanın yanı sıra Türkiye'den daha fazla örnekleme yapılarak özellikle *Daphnia pulex* kompleksinin filogenetik ilişkileri üzerine odaklanılması gerektiğinin altı çizilmiştir.

Çoğu tatlı su zooplankton türü, dirençli kist aşamaları (ressting eggs, diapausing eggs) nedeniyle yüksek dağılım kapasitesine sahip olmaları ile karakterize edilirler (Bilton vd. 2001, Figuerola ve Green 2002, Figuerola vd. 2003). Bu organizmalarda dağılım kapasitesinin yüksek olması, gen akışı olduğu ve genetik sürüklenmenin bir sonucu olarak popülasyonlar arasında genetik farklılaşmanın düşük olduğu fikrini desteklemektedir. Oysaki Hebert (1987), Carvalho (1994), De Meester (1996), De Galas (2005), Allen vd. (2010) gibi birçok araştırmacının moleküler belirteçler kullanarak gerçekleştirdiği çalışmalar bundan tamamen farklı bir sonuç ortaya koymuştur. Bu çalışmaların sonuçları küçük coğrafik alanlarda bile yüksek derecede farklılık gözlemlenebileceğini ortaya koymuştur. Tatlı su zooplankton türleri, genellikle yüksek dağılım kapasiteleri ile karakterize edilmelerine rağmen, bu tez çalışmasının sonuçları, Türkiye'deki *Daphnia* popülasyonları arasındaki genetik farklılaşmanın yüksek, gen akışının düşük olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları; De Meester vd. (2002), De Galas ve De Meester (2005), Allen (2010) ve Orsini (2013) tarafından yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Bu konuda yapılmış çalışmalar incelendiğinde gen akışını engelleyen faktörler konusunda araştırmacıların iki gruba ayrıldığı görülmektedir. Bir kısmı, dağ sıraları gibi fiziksel özelliklerin birer bariyer gibi davrandıkları, gen akışına engel oldukları ve bölgesel farklılıkların oluşmasında ve devamında etkili oldukları (Taylor vd. 1998, Cox ve Hebert 2001, Hebert vd. 2003) fikrini savunmaktadır. Diğer bir kısmı ise fiziksel bariyerlerin, bölgesel farklılıkların oluşmasından ve gen akışının engellenmesinden her zaman sorumlu olmadığı (Gomez vd. 2000), bölgesel adaptasyonların popülasyonlar arasındaki gen akışını önemli ölçüde azalttığı ve bu yüzden kolonileşen örneklerin korunduğu (Boileau vd. 1992, De Meester vd. 2002) fikrini savunmaktadır. Bu tez

çalışmasının sonuçları *Daphnia* cinsine ait populasyonlar arasında gen akışı olmadığını göstermiştir. Türkiye coğrafik yapısı göz önünde bulundurulduğunda, gen akışına engel teşkil eden faktörün, fiziksel bariyerlerden ziyade canlının adaptasyon yeteneği olduğu düşünülmektedir.

Moleküler taksonomi ve morfolojik taksonomi çoğu zaman farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Yapılan populasyon genetiği çalışmalarında detaylı morfolojik incelemelere yer verilmemesi, kriptik türlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Gün geçtikçe büyüyen NCBI GenBank veri tabanı araştırmacılara kullanışlı ve detaylı bir kütüphane sunmaktadır. Fakat dikkatli bir şekilde incelendiğinde GenBank veri tabanında taksonomik tanımlamanın yanlış yapıldığı, DNA dizisinin uygun bir şekilde kontrol edilmediği (dizinin yanlış hizalanması, stop kodonların oluşması, okuma çerçevesindeki insersiyon ve delesyonlar) ve mikrobiyal kontaminasyonlara maruz kalmış birçok hatalı dizinin olduğu Bucklin vd. (20011)'nin yaptığı çalışmada ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra NCBI veri tabanındaki diziler incelendiğinde, *Daphnia* türleri için cf. ya da sp. olarak adlandırılmış çok sayıda türün var olduğu görülmektedir. Sistematik ve sınıflandırmadaki bu problemler, genetik verilerin karşılaştırılmalı analizini ve verilerin biyocoğrafik olarak yorumlanmasını sınırlamaktadır. Bu nedenle özellikle *Daphnia pulex* (sensu Hebert 1995) olarak adlandırılan türün Avrupa'daki *Daphnia pulex* Leydig 1860 olarak adlandırılan türden ayrılması ve tüm *Daphnia pulex* kompleksi için acilen revizyona gidilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Populasyon genetiği çalışmalarında detaylı morfolojik verilere yer verilerek sistematikteki problemlerin giderilmesinin, biyocoğrafya çalışmalarının önünü açacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adamowicz, S.J., Gregory, T.R., Marinone, M.C. and Hebert, P.D.N. 2002. New insights into the distribution of polyploid *Daphnia*: the Holarctic revisited and Argentina explored. *Molecular Ecology*, 11; 1209–1217.
- Adamowicz, S.J., Petrusek, A., Colbourne, J.K., Hebert, P.D.N. and Witt, J.D.S. 2009. The scale of divergence: A phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50; 423-436.
- Agrawal, A.A., Laforsch, C., and Tollrian, R. 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401(2); 60-63. <http://www.nature.com/nature/journal/v401/n6748/pdf/401060a0.pdf> Erişim Tarihi: 15/06/2013
- Agrawal, A. 2001. Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science*, 294; 321-326. <http://www.sciencemag.org/content/294/5541/321.full.pdf> Erişim Tarihi: 15/06/2013
- Akyıldız, A.R. 1992. Balık Yemleri ve Teknolojisi Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Yayınları, 366s, Ankara.
- Allen, M.R., Thum, R.A., and Caceres, C.E. 2010. Does local adaptation to resources explain genetic differentiation among *Daphnia* populations? *Molecular Ecology*, 19; 3076–3087.
- Alpbaz, A.G., Ciriş, S., Özden, O., Temelli, B., Korkut, A.Y., Saka, Ş., Fırat, K., Güner, Y., Diler, İ., Hindioğlu, A., Gökçe, H., Fırat, A. ve Tekin, M. 1992. Su Piresi Yetiştiriciliği. E.Ü. Su Ürünleri Yüksekokulu. Yayınları, İzmir.
- Alpbaz, A. 1993. Akvaryum Teknikleri Ve Balıkları. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakóltesi Yayınları, İzmir.
- Anonymous. 2010. The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> Erişim Tarihi:12/02/2010
- Anonymous. 2012a. QIAquick® PCR Purification Kit. Quick-StartProtocol. <http://www.qiagen.com> Erişim Tarihi: 12/01/2012
- Anonymous. 2012b. Griffith University Ethanol/EDTA/ Sodium Acetate Precipitation Protocol. <http://www.griffith.edu.au/science/dna-sequencingfacility/pdf/ethanoledtasodiumacetateprotocol.pdf> Erişim Tarihi: 12/01/2012

- Anonymous. 2012c. Technelysium software for DNA sequencing (ChromasLite)
www.technelysium.com.au Erişim Tarihi: 10/05/2012
- Anonymous. 2012d. The National Center for Biotechnology Information (NCBI)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Erişim Tarihi: 10/06/2012.
- Anonymous. 2013a. Polymerase chain reaction stages.
<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2> Erişim Tarihi: 16/04/2013.
- Anonymous. 2013b. Specializes in Statistical & Data Analysis Software for Excel (XLSTAT) <http://www.xlstat.com/en/about-us.html> Erişim Tarihi: 10/06/2013.
- Arnheim, N., White, T. and Rainey, W.E. 1990. Application of PCR: organismal and population biology. *BioScience*, 40; 174–182.
- Arnheim, N. and Erlich, H. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annual Review of Biochemistry*, 61; 131 – 56.
- Awise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Hapman & Hall, 511pp, New York.
- Awise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates, 684p, Sunderland, Massachusetts.
- Awise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, 447pp, Cambridge.
- Bardakçı, F., Değerli, N., Özdemir, O. and Başıbüyük, H.H. 2006. Phylogeography of the Turkish brown trout *Salmo trutta* L.: mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. *Journal of Fish Biology*, 68; 36-55.
- Behura, K.S. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, 15; 3087-3113.
- Bektaş, Y. and Beldüz, O. 2008. Molecular phylogeny of Turkish *Trachurus* species (Perciformes: Carangidae) inferred from mitochondrial DNA analyses. *Journal of Fish Biology*, 73; 1228–1248.
- Bendelt H., Froster P. and Rohl A. 1999. Median joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16; 37–48.
- Benzie, J.A.H. 2005. *Cladocera: The genus Daphnia (including Daphniopsis) (Anomopoda: Daphniidae)*. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. Backhuys Publishers, Leiden, 376 p, The Netherlands.

- Bilgin, R. 2011. Back to the Suture: The distribution of genetic diversity in and around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12; 4080-4103.
- Bilton, D.T., Freeland, J.R. and Okamura, B. 2001. Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32; 159–181.
- Bucklin, A., Steinke, D. and Blanco-Bercial, L. 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Reviews of Marine Science*, 3; 471-508.
- Boileau, M.G., Hebert, P.D.N. and Schwartz, S. 1992. Non-equilibrium gene frequency divergence: persistent founder effects in natural populations. *Journal of Evolutionary Ecology*, 5; 25–39.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18; 225-239.
- Carreras, C., Pascual, M., Cardona, L., Aguilar, A., Margaritoulis, D., Rees, A., Türkozan, O., Levy, Y., Gasith, A., Aureggi, M. and Khalil, M. 2007. The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conserv Genet.*, 8; 761–775.
- Carvalho, G.R. 1994. Genetics of aquatic clonal organisms. In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (ed. Beaumont A), pp. 291–323. Chapman & Hall, London.
- Cirik, S. ve Gökpınar, S. 1993. Plankton Bilgisi ve Kültürü. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 274s, İzmir.
- Cirk, Ş. ve Cirik, S. 2005. Limnoloji Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 166s, İzmir.
- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. and Helling, R. 1973. "Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70 (11); 3240-3244.
- Colbourne, J.K. and Hebert, P.D.N. 1996. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B-Biological Sciences*, 351; 349–360.
- Colbourne, J.K., Crease, T.J., Weider L.J., Hebert, P.D.N., Dufresne, F. And Hobaek, A. 1998. Phylogenetics and evolution of acircumartic species complex (Cladocera : *Daphnia pulex*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 65; 347–365.

- Colbourne, J.K., Wison, C.C. and Hebert, P.D.N. 2006. The systematics of Austalian *Daphnia* and *Daphniopsis* (Crustaceae: Cladocera): a shared phylogenetic history transformed by habitat-specific rates of evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89; 469-488.
- Cox, A.J., and Hebert, P.D.N. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10; 371-386.
- Crease, T.J. 1999. The complete sequence of the mtochondrial genom of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustaceae). *Gene*, 233: 89-99.
- Curtis, S.E. and Clegg, M.T. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1; 291-301.
- Çiftci, Y., Eroğlu, O. And Firidin, Ş. 2013. Mitochondrial Cytochrome b Sequence Variation in Three Sturgeon Species (*A. stellatus* Pallas, 1771, *A. gueldenstaedtii* Brandt, 1833, *H. huso* Linnaeus, 1758) from the Black Sea Coasts of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13; 291-303.
- De Galas, K. and De Meester, L. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe. *Molecular Ecology*, 14; 753-764.
- De Meester, L. 1996. Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: patterns and processes. *Ecoscience*, 3; 385-399.
- De Meester, L., Gomez, A., Okamura, B. And Schwenk, K. 2002. The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23; 121-135.
- Demirsoy, A. 1998. Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar = invertebrata böcekler dışında Cilt-II / Kısım-I, 818-830, Ankara.
- Demirsoy, A. 2002. Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası “Hayvan Coğrafyası”. Meteksan, 1007s, Ankara.
- De Waard, J.R., Sacherova, V., Cristescu, M.E.A., Remigio, E.A., Crease, J.C. and Hebert, P.D.N. 2006. Probing the relationships of the banchiopod crustaceans. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 39; 41-502.
- Duggan, I.C., Robinson, K.V., Burns, C.W., Banks, J.C. and Hogg, I.D. 2012. Identifying invertebrate invasions using morphological and molecular analyses: North American *Daphnia pulex*’ in New Zealand fresh waters. *Aquatic Invasions*, 7(4); 585-590.
- Durbin, A., Hebert, P.D.N. and Cristescu, M.E.A. 2008. Comparative phylogeography of marine cladocerans. *Marine Biology*, 155: 1-10.

- Ebert, D. 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD), National Center for Biotechnology Information (US); ISBN-10: 1-932811-06-0.
- Ebert, D. 2011. A Genome for the Environment. *Science*, 331 (4): 539-540. <https://www.sciencemag.org/content/331/6017/539.short> Erişim Tarihi: 15/06/2013
- Edmondson, W. T. 1959. *Freshwater Biology*. 2nd Edition John Wiley and Sons Inc. Press, 1248pp, New York.
- Erençin, Z. ve Köksal, G. 1981. İç Sular Temel Bilimleri. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayınları. 159s, Ankara.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1; 47-50.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10; 564-567.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39; 783-791.
- Felsenstein, J. 1987. Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*, 26; 123-133.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Felsenstein, J. 2006. Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? *Molecular Biology and Evolution*, 23; 691-700.
- Folmer O., Black M., Hoeh W. and Lutz R. And Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3; 294-299.
- Figuerola, J. and Green, A.J. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology*, 47; 483-494.
- Figuerola, J., Green, A.J. and Santamaria, L. 2003. Passive internal transport of aquatic organisms by waterfowl in Doñana, south-west Spain. *Global Ecology and Biogeography*, 12; 427-436.

- Forro, L., Korovchinsky, N.M., Kotov, A.A. and Petrusek, A. 2008. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 177–184.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, 402pp, England.
- Freeman S. and Herron, J.C. 1999. *Evrimsel Analiz*. Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytug. S. ve Gündüz. İ. (eds.), 708s, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147; 915-25.
- Gündüz, İ., Tez, C., Malıkov, V., Vazırı, A., Polyakov, A.V. and Searle, J.B. 2000. Mitochondrial DNA and chromosomal studies of wild mice (*Mus*) from Turkey and Iran. *Heredity*, 84; 458-467.
- Gomez, A., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H. 2000. Phylogeography and regional endemism of passively dispersing zooplankter. Mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceeding of the Royal Society of London series B, Biological Sciences*, 267; 2189-2197.
- Gojobori, T., Li, W.H. and Graur, D. 1982. Patterns of nucleotide substitution in pseudogenes and functional genes. *Journal of Molecular Evolution*, 18; 360–369.
- Goto, S. G. and Kimura, M. T. 2001. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18; 404–22.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A. and Wilson, A.C. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352; 255-257.
- Haag, C.R., Riek, M., Hottinger, J.W., Pajunen, V.I. and Ebert, D. 2006. Founder events as determinants of within-island and amongisland genetic structure of *Daphnia* metapopulations. *Heredity*, 96; 150–158.
- 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; 95-98. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66; 591–600.
- Hebert, P.D.N. 1987. Genetics of *Daphnia*. In: Peters, R.H., De Bernardi, R. (Eds.), *Daphnia*, Istituto Italiano di Idrobiologia, Pallanza. pp. 439–460.

- Hebert, P.D.N. 1995. The *Daphnia* of North America: an illustrated fauna (on CD-ROM). CyberNatural Software, Guelph, Ontario, Canada.
- Hebert, P.D.N., Witt, J.D.S. and Adomowics, S.J. 2003. Phylogeographic patterning in *Daphnia ambigua*: regional divergence and intercontinental cohesion. *Limnology and Oceanography*, 48; 261-268.
- Heckel, D.G. 2003. Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology*, 48; 235–260.
- Hillis, D.M. and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 42; 182-192.
- Hoff, F.H. and Snell, T.W. 1989. Plankton culture manual. Florida Aqua Farms Inc., 125pp.
- Hrbek, T., Küçük, F., Frickey, T., Stölting, K.N., Wildekam, R.H. and Meyer, A. 2002. Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25; 125–137.
- Hrbek, T., Stölkig, K.N., Bardakci F., Küçük, F., Wildekamp, R.H. and Meyer, A. 2004. Plate tectonics and biogeographical patterns of the *Pseudophoxinus* (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32; 297–308.
- Hubby, J.L. and Lewontin, R.C. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54; 577–594.
- Hudson, R.R., Slatkin, M. and Maddison, W.P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132; 583-589.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R. And Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294; 2310–2314. (<http://mrbayes.sourceforge.net/>)
- Innes, D.J. 1991. Geographic patterns of genetic differentiation among sexual populations of *Daphnia pulex*. *Canadian Journal of Zoology*, 69; 995–1003.
- Ishida, S., Kotov, A.A. and Taylor, D.J. 2006 A new divergent lineage of *Daphnia* (Cladocera: Anomopoda) and its morphological and genetic differentiation from *Daphnia curvirostris* Eylmann, 1887. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146; 385-405.

- Jackson, D., Symons, R. and Berg, P. 1972. "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69 (10); 2904–2909.
- Jacobs, J. 1990. Microevolution in predominantly clonal populations of pelagic *Daphnia* (Crustacea: Phyllopoda): selection, exchange, and sex. *Journal of Evolutionary Biology*, 3; 257–282.
- Jeffery, N.W., Elias-Gutierrez, M. and Adamowicz, S.J. 2011. Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PLOS ONE*, 6(5); e18364.
- John, J.C.S., Lloyd, E.I.R., Bowles, E.J., Thomas, E.C. and Shourbagy, S.E. 2004. The consequences of nuclear transfer for mammalian foetal development and offspring survival. A mitochondrial DNA perspective. *Reproduction*, 127; 631–641. <http://www.reproduction-online.org/content/127/6/631.full.pdf+html>
Erişim Tarihi: 15/06/2013
- Juracka, P.J., Korinek, V. and Petrusek, A. 2010. A new Central European species of the *Daphnia curvirostris* complex, *Daphnia hrbaceki* sp. nov. (Cladocera, Anomopoda, Daphniidae). *Zootaxa*, 2718; 1-22.
- Kandemir, I., Kence, M., Sheppard W.S. and Kence, A. 2006. Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 45 (1); 33-38.
- Kang, C.K., Park, H.Y., Kim, M.C. and Lee, W.J. 2006. Use of marine yeasts as an available diet for mass cultures of *Moina macrocopa*, *Aquaculture Research*, 37; 1227-1237.
- Kaya M. and Yıldız, M.A. 2008. Genetic Diversity Among Turkish Native Chickens, Denizli and Gerze, Estimated by Microsatellite Markers. *Biochemical Genetics*, 46; 480–491.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16; 111-120.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. 2009. *Genetik Kavramlar*. (8. Baskıdan çeviri, C. Öner, S. Sümer, R. Öner, A. Öğüş, L. Açık). Palme Yayıncılık, 677s, Ankara.
- Klug, W.S. and Cummings, R.M. 2000. *Genetik*. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, 816s Ankara.

- Knowles, L.L. and Chan, Y.H. 2008. Resolving Species Phylogenies of Recent Evolutionary Radiations¹, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95, 224-231.
- Knowlton, N. and Weigt, L.A. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 265; 2257-2263.
- Korpelainen, H. 1984. Genic differentiation of *Daphnia magna* populations. *Hereditas*, 101; 209–216.
- Kosswig, C. 1955. Zoogeography of the Near East. *Systematical Zoology*, 4; 49-73.
- Kotov, A.A. and Taylor, D.J. 2010. A new African lineage of the *Daphnia obtusa* group (Cladocera: Daphniidae) disrupts continental vicariance patterns. *Journal of Plankton Research*, 32(6); 937-949.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A.A. and Orell, M. 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Molecular Biology and Evolution*, 20; 243-247.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, 295pp, Rome.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54; 595–609.
- Liu, B. H. 1998. Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press incorporated, 611pp, Boca Raton New York.
- Lobban, P. and Kaiser, A. 1973. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *Journal of Molecular Biology*, 78 (3); 453–471.
- Loxdale, H.D. and Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88; 577–600.
- Markova, S., Dufrense, F., Rees, D.J., Cerny, M. and Kotlik, P. 2007. Cryptic intercontinental colonization in water fleas *Daphnia pulicaria* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44; 42-52.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. 1977. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (2); 560-564.

- Meadows, J.R.S., Cemal, I., Karaca, O., Gootwine, E. and Kijas, J.W. 2007. Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. *Genetics Society of America. Genetics*, 175; 1371–1379.
- Mergeay, J., Aguilera, X., Declerck, S., Petrusek, A., Husye, T. and De Meester, L. 2008. The genetic legacy of polyploid Bolivian *Daphnia*: the tropical Andes as a source for the North and South American *D. pulicaria complex*. *Molecular Ecology*, 17; 1789-1800.
- Mount, D. 2001. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 7 Phylogenetic prediction, 271-324p, New York.
- Omilian, A.R., Scofield, D.G. and Lynch, M. 2008. Intron presence/absence polymorphisms in *Daphnia*. *Molecular Biology Evolution*, 25(10); 2129–2139.
- Omilian, A.R. and Lynch, M. 2009. Patterns of intraspecific DNA variation in the *Daphnia* nuclear genome. *Genetics*, 182; 325–336.
- Orsini, L., Mergeay, J., Vanoverbeke, J. and De Meester, L. 2013. The role of selection in driving landscape genomic structure of the waterflea *Daphnia magna*. *Molecular Ecology*, 22; 583–601.
- Overton, L. C. and Rhoads, D. D. 2004. Molecular phylogenetic relationships based on mitochondrial and nuclear gene sequences for the Todies (Todus, Todidae) of the Caribbean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32; 524–38.
- Özdil, F. and İlhan, F. 2012. Diversity of *Apis mellifera* Subspecies from Turkey Revealed by Sequence Analysis of Mitochondrial 16s rDNA Region. *Biochemical Genetics*, 50 (9-10); 748-760.
- Palmer, M.R., Smith D.R. and Kaftanoğlu O. 2000. Turkish Honeybees: Genetic Variation and Evidence for a Fourth Lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *Turkish Journal of Heredity*, 91 (1); 42-66.
- Palsson, S. 2000. Microsatellite variation in *Daphnia pulex* from both sides of the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 9; 1075–1088.
- Penton, E.H., Hebert, P.D.N. and Crease, T.J. 2004. Mitochondrial DNA variation in North American populations of *Daphnia obtusa*: continentalism or cryptic endemism? *Molecular ecology*, 13; 97-107.
- Perktaş, U. and Quintero, E. 2013. A wide geographical survey of mitochondrial DNA variation in the great spotted woodpecker complex, *Dendrocopos major* (Aves: Picidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 108; 173–188.

- Peters, J., Mc Cracken, K., Zhuravlev, Y., Lu, Y., Wilson, R., Johnson, K. and Omland, K. 2005. Phylogenetics of wigeons and allies (Anatidae: Anas): the importance of sampling multiple loci and multiple individuals, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35; 209-224.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging, *Molecular Biology and Evolution*, 25; 1253-1256.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A. and Mylonas, M. 2005. Phylogenetic relationships and evolutionary history of snake-eyed skink *Ablepharus kitaibelii* (Sauria: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34; 245–256.
- Qi, D., Guo, S., Tang, J., Zhao, X. and Liu, J. 2007. Mitochondrial DNA phylogeny of two morphologically enigmatic fishes in the subfamily Schizothoracinae (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Journal of Fish Biology*, 70 (Supplement A); 60–74.
- Rambaut A. 2009. Fig Tree <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Erişim Tarihi: 10/05/2013.
- Rogers, A.R. and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9; 552–569.
- Rozas J., 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis*, Methods in Molecular Biology 537, Humana Press, 350pp, USA.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R., 2010. An integrated software package for DNA Sequence Polymorphism. <http://www.ub.edu/dnasp/>
- Saitou N. and Imanishi, T. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution*, 6; 514-525.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York.
- Sanderson, M. and Shaffer, H. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33; 49-72.
- Sanger, F.N.S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74; 5463-5467.

- Schierwater, B., Streit B., Wagner G.P. and De Salle, R. (eds). 1994. Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Schwartz, M. and Vissing, J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. New England Journal of Medicine, 347; 576-580.
- Schwenk, K., Sand, A., Boersma, M., Brehm, M., Mader, E., Offerhaus, D. and Spaak, P. 1998. Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera. Aquatic Ecology, 32; 37–51.
- Scourfield, D.J. and Harding, J.P. 1966. A key to British species Freshwater Cladocera with notes on their ecology. Freshwater Biology Assoc. Sci. Publ., 5; 1-55.
- Segers, H. and Martens, K. 2005. The diversity of aquatic ecosystems: Aquatic biodeversity II. Published by Springer, Netherlands, pp. 390.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America, 87; 651–701.
- Slatkin, M. and Hudson, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics, 129; 555–562.
- Susnik, S., Schöffmann, J. and Snoj, A. 2004. Phylogenetic position of *Salmo* (Platysalmo) *platycephalus* Behnke 1968 from south-central Turkey, evidenced by genetic data. Journal of Fish Biology, 64; 947–960.
- Swofford D.L. 1998. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Şen, A., Hu, C.H., Urbach, E., Wang-Buhler, J.L., Yang, Y.H., Arinc, E. and Buhler, D.R. 2001. Cloning, Sequencing, and Characterization of CYP1A1 cDNA from Leaping Mullet (*Liza Saliens*) Liver and Implications for the Potential Functions of its Conserved Amino Acids. J. Biochem Molecular Toxicology, 15 (5); 243-255.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics, 123; 597-601.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28; 2731-2739.

- Taylor, D.J., Finston, T.L. and Hebert, P.D.N. 1998. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: Pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia leavis* complex. *Evolution*, 52; 1648-1670.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. "CLUSTALW: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acid Research*, 22; 4673-4680.
- Ustaoglu, M.R. 2004. A check-list for zooplankton of Turkish inland waters. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21; 191-199.
- Vanoverbeke, J. and De Meester, L. 1997. Among-population genetic differentiation in the cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and conal diversity. *Hydrobiologia*, 360; 135–142.
- Vergilino, R., Markova, S., Ventura, M., Manca, M. and Dufrense, F. 2011. Reticulate evolution of the *Daphnia pulex* complex as revealed by nuclear markers. *Molecular Ecology*, 20; 1191-1207.
- Vierstraete, A. 1999. Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> Erişim Tarihi: 15/06/2013
- Wakeley, J. 1994. Substitution rate variation among sites and the estimation of transition bias. *Molecular Biology and Evolution*, 11; 436–442.
- Wakeley, J. 1996. The excess of transitions among nucleotide substitutions: New methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in Ecology and Evolution*, 11; 158–163.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays*. 29; 188-197.
- Wetzel, R.G. 1975. *Limnology*. W. B. Saunders Company, 419-439 p, Philadelphia
- Wiens, J.J. 2006. Missing data and the design of phylogenetic analyses. *Journal of Biomedical Informatics*, 39; 34–42.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllenstein, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D. and Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26; 375-400.
- Wolf, H.G. 1988. Differences in the genetic structure of pond-dwelling and lake-dwelling *Daphnia*. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 23; 2056–2059.

- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15; 323-354.
- Yalim, F. B. and Çıplak, B. 2005. Digging more deeply into the verrucosa-group of the genus *Alona* (Anomopoda, Chydoridae): *Alona mediterranea* new species from the Mediterranean part of Anatolia (Turkey). *Crustaceana*, 78; 565-578.
- Yang, Z. and Rannala, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14; 717-724.
- Yang, Z. and Yoder, A.D. 1999. Estimation of the Transition/Transversion Rate Bias and Species Sampling. *Journal of Molecular Evolution*, 48; 274-283.
- Zuykova, E.I., Bochkarev, N.A. and Katokhin, A.V. 2013. Molecular genetic identification and phylogeny of *Daphnia* species (Crustacea, Cladocera) from water bodies of the Lake Chany basin. *Russian Journal of Genetics*, 49 (2); 206-213.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ebru ÖZDEMİR
Doğum Yeri: : Kars
Doğum Tarihi : 02/04/1981
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Alpaslan Lisesi (1996)
Lisans : Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2002)
Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD (2005)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004 Mart-2006 Ağustos)
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2006 Ağustos- halen)

Bilimsel Çalışmaları

Yayınları

Yolaçan (Özdemir), E. ve Baysal, A. 2005. Kars Çayı'ndaki *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1772)'nın büyüme ve üreme özelliklerinin incelenmesi. Türk Sucul Yaşam Dergisi. 3 (4); 51-57.

Altındağ, A., Buyuırgan O., Kaya, M., **Özdemir E.**, and Dirican S. 2009. A Survey on SomePhysico-Chemical Parameters and Zooplankton Structure in Karaman Stream, Antalya, Turkey. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8 (9); 1710-1716.

Özdemir, E. and Altındağ, A. 2009. The impact of global warming on aquatic life. Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi. 1 (1); 7-15.

Fikirdeşici, Ş., Altındağ, A. and **Özdemir, E.** 2012. “Investigation of Acute Toxicity of Cadmium Arsenic Mixtures to *Daphnia magna* Approach with Toxic Unit” Turkish Journal of Zoology, 36 (4); 543-550.

Poster ve Bildirileri

Yolaçan (Özdemir), E. ve Baysal, A., 2005. Kars Çayı’ndaki *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1772)’nın büyüme ve üreme özelliklerinin incelenmesi. Ulusal Su Günleri 28-30 Eylül 2005, Trabzon.

Altındağ, A., Buyurgan, Ö., Kaya, M. ve **Özdemir, E.** 2008. Karaman Çayı (Antalya)’nın zooplankton faunası. III. Ulusal Limnoloji Sempozyumu, İzmir.

Özdemir, E., Fikirdeşici, Ş. ve Altındağ, A., 2010. Bakır, Arsenik, Kurşun ve Kadmiyumun *Daphnia magna* Üzerine Akut Toksik Etkilerinin İncelenmesi, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Fikirdeşici, Ş., Altındağ, A. and **Özdemir, E.,** 2010. Kadmiyum-Arsenik Karışımlarının *Daphnia magna* Üzerindeki Toksik Etkilerinin Additional İndeks Yaklaşımı ile Değerlendirilmesi, Ekoloji 2010 Sempozyumu, Aksaray Üniversitesi, Aksaray.

Projeleri

Türkiye’deki *Daphnia* cinsine ait bazı türlerin filocoğrafyası. Destekleyen: BAP (2009-2012).