

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lepomis gibbosus TÜRÜNÜN EKOSİSTEM BAZINDA İSTİLA BAŞARISININ
DEĞERLENDİRİLMESİNDE GEN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Tuğçe AYGEN

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Tuğçe AYGEN tarafından hazırlanan “*Lepomis gibbosus* Türünün Ekosistem Bazında İstila Başarısının Değerlendirilmesinde Gen Ekspresyon Profillerinin Karşılaştırılması” adlı tez çalışması 29/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Emre KESKİN
Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR
Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Ali Serhan TARKAN
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Emre KESKİN
Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

29.06.2017



Tuğçe AYGEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lepomis gibbosus TÜRÜNÜN EKOSİSTEM BAZINDA İSTİLA BAŞARISININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE GEN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tuğçe AYGEN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre KESKİN

Bu çalışmada yabancı bir tatlısu balığı türü olan güneş balığı *L. gibbosus* Muğla'nın Sarıçay deresi havzasında istilaya başladığı yerlerden biri olduğu düşünülen Akgedik rezervuarından derenin denize doğru devam eden bölümlerde yayıldığı alanlara kadar toplanarak istilacı davranışa etki eden büyüme (GH, IGF-I), üreme (FSH, Activin), stres (HSP70, HSP90), beslenme (CART ve NPY) ve agresiflik (5-HT, GABA) ile ilişkili genlerine bakılarak gen ekspresyonu çalışması yapılmış ve türün istila başarısının altında yatan nedenler genetik temelde anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla söz konusu rezervuardan ve dereden belirlenen 3 istasyondan *L. gibbosus* örnekleri elektroşok cihazı ile yakalanmıştır. Yakalanan balıklardan kas ve beyin dokusu örnekleri alınmıştır. Alınan kas dokuları tür bazında teşhis için kullanılmış ve filogenetik analizi yapılmıştır. Beyin dokularından ise RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR ile uygulamaları ile genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Büyüme parametreleri bakımından istasyon bazında (D1, D2, D3) GH $p < 0.05$ 'e göre anlamlı farklılık gösterirken, IGF-I grupları arasında farklılık göstermemiştir ($p > 0.05$). IGF-I mRNA seviyesi en yüksek D2 grubunda tespit edilmiştir. Üremeye (FSH, Activin) ve agresif davranışa (5-HT, GABA) etki eden hormonlara ait genlerin her 3 istasyon bazında önemli farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Stresle ilişkili hormonlara ait genlerin (HSP70 ve HSP90) D3 grubu hariç diğer gruplarda $p > 0.05$ 'e göre önemli bir farklılık gösterdiği görülmemiştir.

Sonuç olarak, çoğu literatürde istilacı bir tür olduğu rapor edilen *L. gibbosus* farklı ekosistem bazında (Sarıçay deresi havzası) değerlendirildiğinde büyüme, üreme, beslenme ve agresif davranışa etki eden hormonlara ait genlerin ekspresyon seviyelerinin önemli derecede arttığı, D3 grubunda ise ortam koşullarından dolayı stres hormonlarına ait genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimin diğer istasyon gruplarına göre daha anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Haziran 2017, 60 sayfa

Anahtar Kelime: *L. gibbosus*, istilacı türler, gen ekspresyonu, mRNA, cDNA kütüphanesi

ABSTRACT

Master Thesis

COMPARISON of GENE EXPRESSION PROFILES IN ORDER TO EVALUATE THE ECOSYSTEM BASED INVASION SUCCESS of *Lepomis gibbosus*

Tuğçe AYGEN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheries and Aquaculture Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre KESKİN

In this study, *Lepomis gibbosus*, which is a non-native species is studied through evaluating the expression of growth, breeding, stress, feeding and aggression related genes by sampling from the predicted source of invasion, Muğla, Sarıçay basin, to the upper part of reservoir where they spread out. *Lepomis* samples were collected from three specific locations by electroshocker and muscles and brain tissues were sampled. Muscle tissues that had been taken were used for species level diagnosis. Also, phylogenetical analyses were performed. Expression levels of the genes in brain tissues were identified by RNA isolation, cDNA synthesis and Real time PCR.

Growth parameters indicated two significant results on the basis of station. With respect to stations D1, D2 and D3, GH $p < 0,05$ indicates a meaningful difference, while IGF-I did not indicate difference between groups. The level of IGF-I mRNA was maximum on D2 group. The genes in which there are hormones which affect breeding and aggressive behaviour indicated difference between three stations. Genes related with stress hormones did not indicate any difference according to $p > 0,05$ in all groups, but not in D3 group.

Finally, we conclude that the expression of the genes related with the hormones which affect growth, breeding, aggression and feeding increase significantly on two stations, while only stress related genes have decreased expression levels in the other station probably depending on different environmental conditions on the basis of ecosystem.

June 2017, 60 pages

Key Word: *L. gibbosus*, invasive species, gene expression, mRNA, cDNA library

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tezim süresince maddi ve manevi olarak yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Emre KESKİN'e, (Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı)

Fikirleriyle tez yazım aşamam da bana yeni bakış açıları kazandıran, hocam Prof. Dr. Ali Serhan TARKAN, (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı)

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek laboratuvar gerekse tez yazım kısmında bana yol arkadaşlığı yapan, Evrimsel Genetik Laboratuvarı ekip arkadaşlarıma,

Yanımda olmasa da her zaman sevgisini ve desteğini yanımdaymış gibi hissettiğim canım annem Tülay AYGEN'e

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan babam Mustafa, kardeşim Göksu AYGEN'e, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, "TÜBİTAK" tarafından "115Y660 nolu ÇAYDAG Projesi" tarafından desteklenmiştir.

Tuğçe AYGEN
Ankara, Haziran 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 L. gibbosus Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2 Habitat.....	5
2.2.1 Akgedik Baraj Gölü	5
2.2.2 Köprü	6
2.2.3 Kum Ocağı	7
2.3 Balıklarda DNA barkodlama	8
2.4 DNA Barkodlamada Kullanılan Moleküler Teknikler.....	8
2.4.1 Jel Elektrophorezi	8
2.4.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	9
2.4.3 DNA dizi analizi	10
2.5 Filogenetik Analiz	11
2.6 Gen İfadesi (Gen ekspresyonu).....	11
2.6.1 Transkripsiyon	11
2.6.2 Translasyon.....	12
2.7 Real-Time PCR.....	12
2.8 Kaynak Özeti	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal	18
3.1.1 Balıklardan doku örneklerinin alınması.....	18
3.1.2 Fix RNA protokoü.....	18
3.1.3 Kullanılan kimyasal maddeler	19
3.1.3.1 RNA ekstraksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler.....	19
3.1.3.1.1 Elektrophorezde kullanılan kimyasal maddeler	19

3.1.3.1.2 cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ..	19
3.1.3.1.3 Real time PCR’da kullanılan kimyasal maddeler.....	20
3.1.4 Yararlanılan alet ve ekipmanlar	20
3.2 Yöntem	21
3.2.1 DNA izolasyonu	21
3.2.2 DNA’nın spektrofotometrik analizi.....	23
3.2.3 DNA konsantrasyonunun ayarlanması.....	23
3.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	23
3.2.5 Tür tanımlama ve Filogenetik analiz.....	25
3.3 RNA izolasyonu	25
3.3.1 RNA’nın spektrofotometrik analizi.....	26
3.3.2 RNA örnekleri için jel hazırlanışı.....	26
3.3.3 RNA konsantrasyonunun ayarlanması.....	27
3.3.4 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	27
3.3.5 Genlere spesifik Primer Dizaynı.....	29
3.6 Real-Time PCR ile Gen ekspresyonu aşaması.....	31
3.6.1 Gen ekspresyonu hesaplamaları	31
3.6.2 Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1 DNA’nın Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirmesi.....	32
4.2 Filogenetik Analiz	34
4.3 RNA’nın Kalitatif ve Kantitatif Değerleri.....	37
4.4 Primer Optimizasyonu	39
4.5 Real-Time PCR mRNA Seviyelerinin Tespiti.....	41
4.5.1 Beyin dokularında büyümeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi	41
4.5.2 Beyin dokularında üremeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi	42
4.5.3 Beyin dokularında agresif davranışlara etki eden genlerin mRNA Seviyesi.....	42
4.5.4 Beyin dokularında beslenme etki eden genlerin mRNA Seviyesi	43
4.5.5 Beyin dokularında strese etki eden genlerin mRNA Seviyesi	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikro litre
5-HT	Serotonin veya 5-hydroxytryptamine receptörü
A260	260 dalga boyu
A280	280 dalga boyu
A2M	α-2-macroglobulin
Amplifikasyon	Ürünlerin çoğaltılması
Annealing	Bağlanma Sıcaklığı
Anod	+ kutup
Bp	Baz çifti
CART	Kokain ve amfetamin ile düzenlenen transkripti
CBOL	The Consortium for the Barcode of Life
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
COI	Sitokrom Oksidaz 1 gen bölgesi
Ct	Eşik döngüsü
D1	Akgedik Barajı
D2	Köprü
D3	Kum Ocağı
ddH ₂ O	Deiyonize Distile Su
Dimer	Monomer adı verilen iki alt ünitelerden oluşan kimyasal ya da biyolojik yapı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EtBr	Etidyum bromür
Elongation	Uzama sıcaklığı
FAM	6-carboxy fluorescein
g	Gram
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GHR	Büyüme Hormonu Reseptörü

HSP70	Isı Şoku Proteini 70
HSP90	Isı Şoku Proteini 90
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü
Katod	- kutup
Melting curve	Erime eğrisi
mg	Miligram
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NPY	Neuropeptide Y
P	Probability; Olasılık değeri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
rpm /g	1 Dakikadaki Rotor Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RT-PCR	Eş Zamanlı veya kinetik PCR
Sanger methodu	Dizi Analiz Yöntemi
SNP analizi	Tek nükleotit polimorfizmi
SOD	Süperoksit Dismutaz
SYBR Green	C ₃ H ₃ 7N ₄ S ⁺
TAE	Tris-asetat
T _m	Temperature of melting
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
β-actin	Beta actin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Bir canlının istila süreci ve alınması gereken önlemler	2
Şekil 2.1 Arazi esnasında örnekleme yapılırken çekilen <i>L. gibbosus</i> 'a ait bir fotoğraf	5
Şekil 2.2 Akgedik Barajı	6
Şekil 2.3 Köprü	7
Şekil 2.4 Kum Ocağı	7
Şekil 2.5 Real time PCR'ın 3 temel fazının gösterildiği grafik	14
Şekil 2.6 Florasan boyamalarla birlikte anlamlı reaksiyon profili	15
Şekil 3.1 Beyin dokusunun alındığı yer	18
Şekil 3.2 DNA ürünlerini çoğaltmak için kullanılan Termal Döngü Cihazı	24
Şekil 3.3 RNA jel döküm aşaması	27
Şekil 3.4 Gen ekspresyonu çalışmasında kullanılan Real time PCR cihazı	28
Şekil 3.5 Total RNA'nın mRNA'ya dönüştürülmesi	29
Şekil 4.1 Sekans PCR'ı jel görüntüsü	31
Şekil 4.2 Genetik uzaklık matrisi	34
Şekil 4.3 Filogenetik ağaç	35
Şekil 4.4 Network analizi	36
Şekil 4.5 RNA ürünlerinin jel görüntüsü	39
Şekil 4.6 Real time PCR cihazı ile genlere uygun bağlanma sıcaklıklarının tespiti	40
Şekil 4.7 Beyin dokularında büyümeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi	41
Şekil 4.8 Beyin dokularında üremeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi	42
Şekil 4.9 Beyin dokularında agresif davranışlara etki eden genlerin mRNA seviyesi	43
Şekil 4.10 Beyin dokularında beslenme etki eden genlerin mRNA Seviyesi	43
Şekil 4.11 Beyin dokularında stress etki eden genlerin mRNA Seviyesi	44
Şekil 5.1 IGF-I ve GH için cDNA seri dilüsyonları	46
Şekil 5.2 NPY ve CART gen bölgeleri için seri dilüsyonlar ve ekspresyon grafiği	47
Şekil 5.3 FSH ve Activin gen bölgeleri için seri dilüsyonlar ve ekspresyon grafiği	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 L. gibbosus (Linnaeus,1758) türünün sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2 L. gibbosus'a (Linnaeus,1758) ait biyolojik veriler fishbase'den uyarlanmıştır	5
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan primerler ve PCR protokolleri.....	24
Çizelge 3.2 cDNA sentez protokolü.....	28
Çizelge 3.3 L. gibbosus'a spesifik tasarlanan ilgili gen bölgelerine ait primer çiftleri ve uzunlukları	30
Çizelge 4.1 Akgedik Barajı L. gibbosus DNA izolasyonu nanodrop sonuçları.....	33
Çizelge 4.2 Taş Ocağı L. gibbosus DNA izolasyonu nanodrop sonuçları.....	33
Çizelge 4.3 Köprü L. gibbosus DNA izolasyonu nanodrop sonuçları.....	33
Çizelge 4.4 RNA izolasyonu nanodrop sonuçları.....	38
Çizelge 4.5 EvaGreen protokolü	40

1. GİRİŞ

İstilacı türler ve hayat stratejileri günümüzde önemli bir araştırma alanını kapsamaktadır. İstilacı tür tanımında bir kavram birliğine ulaşılamamasının sebebi birden fazla terimin kullanılması ile sonuçlanmıştır (Cadotte vd. 2006, Lockwood vd. 2007, Davis 2009). İstila biyolojisi üzerine çalışan araştırmacılar aynı terimi farklı şekillerde tanımlayıp, aynı süreç için karmaşa yaratacak eşanlamlı terimler kullanmışlardır. Aynı zamanda istila sürecini incelerken farklı terminoloji kullanma yolunu da izlemişlerdir (Lockwood vd. 2007, Polat vd. 2011). Bir coğrafik bölgede doğal olarak oluşmayan bir türü, alttürü, ırkı ya da varyeteyi ifade eden o bölgede daha önce bulunmayan, direk veya indirek olarak insanlar tarafından istemli ya da istemsiz olarak sözkonusu bölgeye getirilen türlere yabancı tür denilmektedir (Tarkan 2013). Son yıllarda ortaya çıkan küresel iklim değişiklikleri, ani sıcaklık artışları veya azalışları, sınırlar arası taşımacılığın artması, üniversite ya da enstitüler tarafından araştırma amaçlı ithal edilmeleri ve bu türlerin tesislerden kaçarak yerel türlerle melez oluşturarak verdiği zararlar söz konusu olmakla birlikte canlıların doğal koşullarından ayrılıp yeni yaşam ortamı aramalarına sebep olmaktadır. İklim ve sıcaklık değişimleri o bölgeye ait canlıların stres sebebiyle yok olmasına neden olurken istilacı türler ortamdaki yok olan canlıların yerine geçmektedirler. Yani istilacı türler doğal toplulukların yaşama alanını işgal ettikçe, bu yayılmanın üstesinden gelemeyen yerel türler yok olmaya başlamışlardır (Özdemir vd. 2007). Ulaşım, taşımacılık, insan kaynaklı sebeplerle doğal ekosisteme yerleşen farklı türler hem ekosisteme hem de insanlara zarar vermektedirler. İstilacı yerine birçok özdeş terim de kullanılmaktadır. Bunların en yaygın olanları ise egzotik, yabancı, taşınan, işgalci ve doğallaşandır. Bu terimler genel anlamda ortak bir paydaya sahip olup bir habitattaki yerli olmayan türlerin, aynı ortamda bulunan yerli olan türlerden ayrımını sağlamak için kullanılmaktadır (Reichard vd. 1997).

İSTİLA SÜRECİ

Canlının göç etmesi



Erken izleme programı



Bu sürede izlediği göç yolu



Taşınması ve Yayılması



Popülasyon Oluşturması



Ekolojiye, insan sağlığına ve ekonomiye etkisi

PLAN VE PROGRAM

İstilacılar için risk analizleri



Koruma önlemleri



Yok etme ve kontrol seçenekleri



Yayılma sürecinin durdurulması



Göç yolu önlemleri

Şekil 1.1 Bir canlının istila süreci ve alınması gereken önlemler (Lodge vd. 2006'ya göre uyarlanmıştır)

İstemli veya istem dışı olarak istilacı özellik taşıyan balık türlerinin yeni ortamlara girişi, sucul yaşam alanları üzerindeki zararı gözler önüne sermektedir ve bu türlerin dünya genelindeki başarısı, tüm sucul formlar için endişe vericidir (Copp vd. 2005). İstilacı tatlısu balığı türlerinden olan, doğal tür ve ekosistemlere zararlı etkileriyle bilinen güneş balığı *L. gibbosus* dünyada en yayılımcı türler arasındadır. Bu tür Avrupa'ya doğal dağılım alanı olan Kuzey Amerika'dan 19. yüzyılda süs balığı olarak getirilmiştir (Maes vd. 1898). Günümüzde Türkiye'yi de içine alan en az 28 Avrupa ve Asya ülkesinden bildirilmiştir ve yabancı tür olarak bulunduğu bölgelerde de ciddi bir popülasyon oluşturma başarısı göstermiştir (Copp vd. 2007). Güneş balığı günümüzde dünyada en yaygın olarak aşıl原因 10 sucul türden biridir ve bunların arasında da en fazla popülasyon oluşturma başarısı gösteren türlerden arasında gösterilir (Garcia-Berthou vd. 2007). Yani bu balık yabancı bir türün hayat süreci özelliklerinin, büyüme ve demografik değişimlerin ve sonuçta istilacı bir tür haline gelme süreçlerinin rahatlıkla görülüp izlenebilmesi için uygun bir model organizmadır. *L. gibbosus* çok çeşitli su kütlelerinde yaşayabilir ve neredeyse oksijensiz ve yüksek sıcaklık barındıran ortamlar gibi elverişsiz koşullarda da hayatta kalması ile bilinmektedir (Crivelli ve Mestre 1988, Fox ve Keast 1991, Farwell vd. 2007). Bu balık türü başarılı istilacı

türlerde genellikle gözlemlenen ebeveyn bakımı ve fizyolojik tolerans gibi bazı özel davranışları sergilemektedir. Bu anlamda Marchetti vd. (2004) tarafından belirlenmiş uygun istilacı tür kriterlerine tamamen uymaktadır. Oldukça geniş yayılım alanlarına sahip olan bu tür yapılan risk analizleri sonucu yüksek riskli türler arasında da gösterilmektedir (Tarkan vd. 2014).

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte canlıdan alınan doku, kan vb. birçok örnekten o canlının genlerindeki değişim izlenebilmektedir. Gen ekspresyonu analizinin amacı, farklı örnekler arasındaki spesifik bir hedefin (genin) ekspresyon düzeyindeki farklılıkları nicelleştirmemizi sağlamaktır. Sonuç olarak veri çıktısı, ekspresyon seviyelerindeki değişim veya farklılık olarak ifade edilir. Örneğin, belirli bir süre boyunca tedavi edilenlere karşı tedavi edilmemiş örneklerde belirli bir genin ekspresyonundaki değişime bakılmak istenirse, bu varsayımsal çalışma için, bir kontrol geni seçilerek tüm örnekler için hem hedef hem de kontrol genlerinin seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilebilir. Sonuç ise "Gün 30'daki örnek A'nın, 0'ıncı günden 10 kat daha fazla ekspresyon seviyesine sahip" gibi bir formatta ifade edilebilir (<https://tools.thermofisher.com> 2008). Gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR (RT-PCR), kararlı durumdaki mRNA seviyelerinin nicelleştirilmesi ve temel araştırmalar için önemli bir araç olup, moleküler tıp ve biyoteknoloji alanında yapılan analizlerin gerçekleştirilmesine büyük kolaylık sağlamaktadır. Yüksek verimlilikte ve hassasiyete sahip bu teknoloji halen hızla gelişmektedir (Bustin 2002).

Sunulan tez çalışmasındaki özel hedef istilacı bir tatlı su balığı türü olarak bilinen *L. gibbosus*'un büyüme, üreme, beslenme, agresyon, stres ve diğer türlerle etkileşimlerinde meydana gelen değişimleri gen ifadeleri açısından türün istila süreci boyunca farklı popülasyonları arasında karşılaştırmak ve elde edilen sonuçları türün istila başarısı çerçevesinde irdelemektir. Daha genel anlamda, türün yeni istila ettiği habitatlardan ilk istila ettiği habitatlara uzanan bir ölçekte önemli biyolojik karakterler ve ekolojik etkileşimlerle ilgili gen ifadelerinin nasıl değiştiğini ve bu değişimlerin istila başarısı ile ilişkisinin bulunması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *L. gibbosus* Hakkında Genel Bilgiler

Centrarchidae familyasına ait olan *L. gibbosus* için hayat 1 mm çaplı su altında kayaya yapışmış yumurtaların açılması ile başlar. Yumurtadan çıkma süresi ortalama 19.0 ile 27.8 °C sıcaklıkta 47 saat içinde gerçekleşir (Balon 1959). Larval dönem 22 gün sürmektedir (Haode ve Zastrow 1993). Büyüme oranları bölgenin sıcaklığına göre geniş farklılıklar göstermektedir. Ortalama 40 cm boya ve yaklaşık olarak 600 g ağırlığa ulaşabilmektedirler. Besinlerini kabuklular, böcekler, küçük balıklar, bentik omurgasızlar ve balık yumurtaları oluşturur. Potamodrom bir tatlısı türü olan *L. gibbosus*'un soğuk sulara toleransı yüksektir (Çetinkaya 2006). Türkiye'ye Meriç Nehri vasıtasıyla güney-doğu Avrupa'dan girdiği düşünülen bu balık türü daha sonra istemli ve istemsiz aşılama ile bütün Anadolu'ya yayılmıştır (Ağdamar vd. 2015).

Çizelge 2.1 *L. gibbosus* (Linnaeus,1758) türünün sınıflandırılması

<i>Lepomis gibbosus</i> 'un sistematikteki yeri	
Alem	Animalia
Şube	Chordata
Sınıf	Actinopterygii
Takım	Perciformes
Familiya	Centrarchidae
Cins	<i>Lepomis</i>
Tür	<i>Lepomis gibbosus</i>

Çizelge 2.2 *L. gibbosus*'a (Linnaeus1758) ait biyolojik veriler (Fishbase www.fishbase.org, 2017)'den uyarlanmıştır

<i>L. gibbosus</i> 'un biyolojisi	
Yaşam alanı	Tatlı su
PH	7.0-7.5
dH	10-15
Yaşam siklusu	Potamodrom
Sıcaklık	4°C-22°C
Maksimum uzunluk	40 cm
Ortalama uzunluk	9.9 cm
Maximum ağırlık	630.00 g
Maximum rapor edilen yaş	12 yıl



Şekil 2.1 Arazi esnasında örnekleme yapılırken çekilen *L. gibbosus*'a ait bir fotoğraf

Centrarchidae familyası iteroparus'dur. Yani yıl boyunca birden fazla yumurtlama özelliği göstermektedirler. Doğal ortamlarında yumurtlama dönemleri Mayıs ve Ağustos ayları arasında gerçekleşir (Becker 1983). 11.5 ve 14 °C arasındaki sıcaklıklar erkek bireylerin gonad gelişimini tetikler. 14 ve 16.5 °C'lerde ise dişinin gonad gelişimi başlar (Burns 1976).

2.2 Habitat

L. gibbosus'un havzaya ilk aşılandığı Geyik Barajı'ndan daha aşağıdaki bölgelerine gidilerek belirlenen toplamda 3 istasyondan örnekleme yapılmıştır. Farklı ekosistem özelliklerine göre belirlenen Akgedik Barajı, Köprü ve Kum Ocağı istasyonlarında balık örnekleri toplanmıştır. Habitat seçimlerinde en önemli kriter her üç istasyonda da farklı koşulların var olmasıdır.

2.2.1 Akgedik Baraj Gölü

Sarıçay Deresi üzerine kurulan ikinci büyük insan yapımı suni göl olan Akgedik Baraj Gölü, bünyesinde *L. gibbosus*'u ve birkaç yaygın istilacı tatlısu balığı türünü içermektedir. Özellikle sazan (*Cyprinus carpio*) ile beraber istemsiz olarak ülke iç sularının önemli bir bölümüne de yayılmıştır (Tarkan vd. 2015). Benzer şekilde Sarıçay

Deresi üzerinde ilk kurulan Geyik baraj gölünde de sürekli olarak sazan aşılamlarının yapıldığı bilinmekte, *L. gibbosus* ve diğer istilacı tatlısu balığı türlerinin de Sarıçay havzasına bu şekilde girdiği düşünülmektedir. *L. gibbosus* istilasının başladığı ve merkez olarak nitelendirilebileceği yerler Geyik Baraj Gölü ve dere üzerinde bu baraj gölünden sonra inşa edilen diğer baraj gölü olan Akgedik Baraj Gölüdür.



Şekil 2.2 Akgedik Baraj Gölü

2.2.2 Köprü

Büyük bir yem fabrikasının hemen yanında bulunan ve yem fabrikası kaynaklı atık yemlerin derenin içine boşaltıldığı bilinen derenin bu bölümü, diğer istasyonlara göre besin içeriği bakımından daha zengin bir kaynaktır. Köprü istasyonunda balık türleri bazında yüksek bolluk olduğundan dolayı bu istasyonda ciddi bir besin rekabeti söz konusudur (Top vd. 2016).



Şekil 2.3 Köprü

2.2.3 Kum Ocağı

Yoğun olarak kum çekme faaliyetleri olup, sonradan oluşan derin gölet yapılarının bulunduğu örnekleme alanıdır.



Şekil 2.4 Kum Ocağı

2.3 Balıklarda DNA Barkodlama

Tür tanımlama için geliştirilen en güncel moleküler yöntem olan DNA barkodlama araştırmacılar için büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı noktalarda yapılacak tanımlamalarda büyük önem arz etmektedir (Keskin 2013). DNA barkodlama esasında kısa ve standardize edilmiş bir DNA bölgesinin hızlı, objektif ve ekonomik bir şekilde analiz edilmesini sağlamaktadır. Analizler sonucunda elde edilen veriler türün genetik olarak karakterize edilmesine dayanmaktadır. Barkodlamada kullanılacak gen bölgeleri belirli özellikleri taşıyacak nitelikte olmalıdır. Bunlar güvenilir ve rutin olarak sekanslanabilir olmasıdır. Aynı zamanda çalışma sonucunda elde edilecek veriler kolaylıkla karşılaştırılabilir ve türleri birbirinden ayırt edebilecek farklılığı gösterecek şekilde olmalıdır. Bu nedenle seçilen DNA barkod bölgesi, hayvanlarda % 90 ve üzeri başarı oranı ile çalışılan sitokrom c oksidaz alt ünite 1 (COI) geni, bir türün farklı popülasyonları arasındaki ilişkiyi bilgisayar tabanlı yazılımlar kullanılarak çizilen evrimsel ağaçlarla ortaya koymaktadır. 650-700 baz çifti uzunluğundaki bu standart bölge hızlı ve doğru bir şekilde tür tanımlamada büyük avantajlar sağlamaktadır. 1990'lı yıllarda ortaya atılan barkod terimi o zamanın bilim insanları tarafından ilgi görmese de 2003 yılında Hebert tarafından tekrar gündeme taşınmıştır.

2.4 DNA Barkodlamada Kullanılan Moleküler Teknikler

2.4.1 Jel Elektroforezi

Jel Elektroforezi, makromolekülleri hem büyüklük hem de elektrik yükü bakımından ayırt etmemizi sağlayan tekniktir. Kökeni Yunancadan gelen Elektroforez; elektro elektriğe ve forez ise taşımak bir yerden bir yere geçirmek anlamına gelmektedir. Temel esas jelin her iki ucunda bulunan elektrotlara uygulanan belli bir voltajın gücüdür. Yüklü moleküller herhangi bir elektrik akımına bırakıldıklarında, yüklerinin pozitif - negatif olma durumuna göre yer değiştirme eğilime girerler. Sahip oldukları fosfat gruplarından dolayı nükleik asitler, eksi yüklü olmakla birlikte pozitif (+) kutup'a (anod) doğru yer değiştirirler. Yürütölmek istenen örneğin çeşidine göre birçok jel

çeşidi bulunmaktadır. En çok tercih edilen ve en az toksik olan agaroz jeldir. Deniz yosunundan ekstrakte edilen agaroz moleküler kütlesi 12.000 Da olan bir polisakkarittir. Jel hazırlandıktan sonra, yüklenmesi istenen örnekler jelin içinde bulunan kuyucuklara yerleştirilir, hazırlanan elektroforez çözeltisinin içine koyulur ve bu çözelti elektrik akımının düzgün bir şekilde iletilmesini sağlar.

2.4.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA'nın yapısında bulunan dizisi bilinen iki parça arasındaki bölgeyi enzimatik tepkimelerle çoğaltmak amacıyla kullanılan tepkimelerin genel ismidir. 1985 yılında ilk kez bilim dünyasına sunulduğundan bu yana polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) klinik araştırmaların yanı sıra genetik laboratuvarlarında da sıklıkla kullanılmaktadır. 1993 yılında buluşundan dolayı K. Mullis Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır.

PCR temelde üç basamakda gerçekleşmektedir;

1. Denatürasyon: PCR'ın ilk aşaması olan denatürasyonda çift zincirli DNA molekülünün yapısı yüksek ısı uygulanması ile birbirinden ayrılır.
2. Bağlanma (Annealing): Sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanması olayıdır. Primerlerin bağlanması da bu aşamada gerçekleşmiş olur.
3. Uzama (Extension-Elongation): 72 °C'ye kadar arttırılan ısıнын DNA polimeraz enziminin DNA zincirini veya primerleri uzatması olayıdır.

PCR sonundaki ürünlerin boyu; primerlerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafenin tamamı kadardır. Matematiksel olarak amplifikasyon formülü;

$(2^n - 2n)X$ ile ifade edilir.

n=Elde edilen döngü sayısı

2n=Her iki döngü sonucunda oluşan ve boyları bilinmeyen ürünler.

X=DNA'nın kopya sayısı

2.4.3 DNA dizi analizi

Geçmişten günümüze DNA dizi analizi her alanda başvurulan önemli bir teknik olmakla birlikte bilim dünyası tarafından kabul görmüş birçok önemli gelişmenin kronolojik sıralaması şu şekildedir;

- Robert Holley tarafından 1965 yılında tRNA molekülünün analizi yapılmıştır.
- Allan Maxam- Walter Gilbert ve Frederick Sanger 1977 yılında birbirinden farklı DNA dizi analizi yöntemi bulmuşlardır.
- Akiyoshi Wada 1982 yılında dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiştir ve ilk adım olarak robotlar geliştirilmeye başlanmıştır.
- 1986 yılında California Teknoloji Enstitüsünden (Caltech) Leroy Hood ve Llyod Smith tarafından dört sene önce tohumları atılan ilk öneriye istinaden DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine bulunmuştur.
- 1990 yılında Edward Uberbacher tarafından istenilen geni bulmaya yarayan bir program olarak tasarlanan Grail kullanılmaya başlanmıştır.
- 21. kromozomun DNA Dizi Analizi 1990'lı yıllarda tamamlanmıştır.
- Aynı yıllarda *Haemophilus influenzae*' ya ait DNA dizisi Craig Venter, Claire Fraser ve Hamilton Smith tarafından yayınlanmıştır.
- Ekmek mayası olan *S. cerevisiae*'nin 1990'lı yıllarda uluslararası bir toplantı da DNA dizisi yayınlanmıştır.
- 1990'lı yıllarda Sanger Center ve Washington Üniversitesinde görevli bilim adamları tarafından *Caenorhabditis elegans*' in DNA dizisi ortaya çıkarılmıştır.
- 2000 yılında *Drosophila melanogaster*' in DNA dizisi açıklanmıştır.
- 2000'li yıllarda insan gen haritası taslağının tamamlandığı açıklanmıştır.
- DNA dizisi açıklanan ilk bitki olarak *Arabidopsis thaliana* 2000 yılında tarihe geçmiştir.

Günümüzde DNA Dizi Analizi için farklı iki yöntem kullanılmaktadır:

1- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam vd. 1977).

2- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi (Sanger vd. 1977).

Bu iki yöntemden, Fred Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen Sanger – Coulson'un yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Sanger vd. 1977). Günümüzün en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniği olmakla birlikte bu yöntemde yeni sentezlenecek iplik DNA ipliği için yeni bir kalıp olarak kullanılır.

2.5 Filogenetik Analiz

Çeşitli organizma grupları (türler veya topluluklar) arasındaki evrimsel ilişkinin araştırması ve bağlantının ortaya konulması filogeni olarak adlandırılır. Filogeninin büyük bir kısmını organizmaların evrimsel tarihi kapsar. Filogenetik analizler farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla başvurulmuş bir metottur. Filogenetik ağaçlar ise farklılığı görmemize olanak sağlamaktadır.

2.6 Gen İfadesi (Gen ekspresyonu)

DNA'da saklanan genetik bir bilginin seçilen bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) aracılığıyla kopyalanması *transkripsiyon*, protein molekülüne ait genetik bilgilerin okunması ya da işlevsel bir protein molekülü haline çevrilmesine *translasyon*; transkripsiyon ve translasyon olaylarının bütünü kapsayan genel olguya ise *gen ifadesi* ya da *gen ekspresyonu* denir. Basitçe, gen ifadesi ya da gen ekspresyonu genlerin protein yapılarına dönüşmesi sürecinde kullanılan bir terimdir. Proteinlerin ne zaman üretileceğini kontrol eden mekanizma olmasının yanı sıra, üretilen proteinlerin miktarını arttırıp azaltan bir hacim kontrolü olarak görev yapan terimdir. Protein yapım aşamasında iki önemli adım olmalıdır: Transkripsiyon ve Translasyon

2.6.1 Transkripsiyon

DNA'nın, "haberci (mesajcı) RNA" yani mRNA olarak adlandırılan bir RNA yapısı üretmesi için kopyalanma işlemidir. mRNA'yı oluşturma işlemi "RNA polimeraz" tarafından gerçekleştirilir. Yapısal olarak RNA, DNA'nın kimyasal olarak farklı bir

şeklidir; fark sadece bir tane baz iplikçığı varlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca Timin bazının yerini RNA’da Urasil bazı alır.

2.6.2 Translasyon

mRNA oluşturulan mesajı DNA’dan alıp, hücrenin protein üretim yerleri olan ribozomlara getirdikten sonra işlem gerçekleşir. mRNA tarafından ulaştırılan mesaj, “aktarıcı (tansferci) RNA” yani tRNA tarafından okunur. Bu işlem her tekrarlandığında mRNA’dan üçer harf yani bir kodon okunur. Her bir kodon, belirli bir amino asiti belirtir. Örneğin “GGU” kodonu, glisin adlı amino asitin şifresidir. Sadece 20 tane amino asit varken, 64 tane potansiyel kodon kombinasyonu olduğundan, aynı amino asit birden fazla kodon tarafından şifrelenebilir. Örneğin “GGU” ve “GGS” kodonlarının her ikisi de glisini kodlar. Her bir amino asit, özellikle kendi tRNA molekülüne bağlı olur. mRNA dizilimi okunduğunda, her bir tRNA molekülü kendi amino asitini ribozoma gönderir ve mRNA molekülünde karşılık gelen kodona geçici olarak bağlar. tRNA bağlanınca, amino asitini salar ve komşu amino asitler birbirlerine tutunarak, polipeptit adı verilen uzun bir zincir oluşturur. Bu süreç, hedeflenen protein oluşturulana dek sürer. Proteinler, bir hücrenin etkin işlevlerinin çoğunu gerçekleştirir.

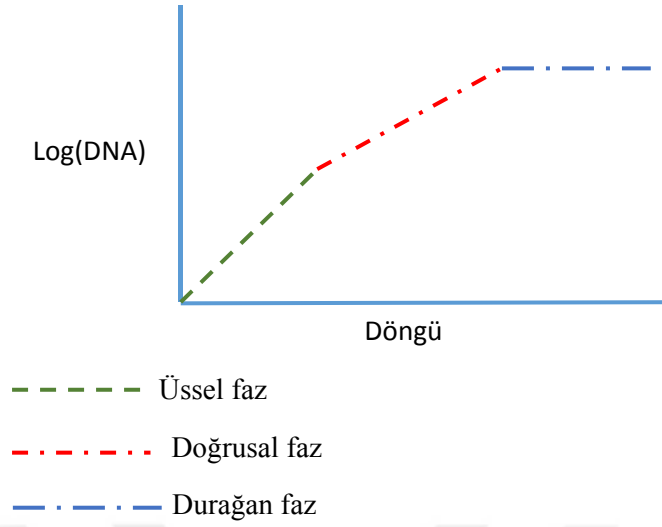
2.7 Real-Time PCR

Real-Time PCR DNA’nın çoğaltılması işlemiyle başlayarak oluşturulan ürünlerin tek bir tüpte tespitini konvensiyonel PCR’a göre daha zahmetsiz ve mümkün kılan bir metottur (Gibson vd. 1996). PCR’da gerçekleşen reaksiyonların çoğaltımını görünür hale getirirken aynı zamanda bunu gerçek zamanlı olarak izlememize olanak sağlamaktadır. Monitör yapısından dolayı reaksiyonda kullanılan floresan isaretleli prob ve boyaların sayesinde, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı bir şekilde arttığını gösteren bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılırken en sık kullanılanları “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-Time PCR” dır (Bustin vd. 2000). Amaç elde edilen DNA’nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürerek mRNA’nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilmektedir. Bunun yanı sıra farklı çalışmalarda da kullanılmakta olup; tek nokta mutasyonlarını belirleme ve patojen belirleme, DNA

hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti bunlar arasında en çok bilinenleridir (Kubista vd. 2006). SYBR Green, TaqMan Probe, Hibridizasyon Prob ve moleküler boncuk gibi farklı birkaç yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok tercih edilenler SYBR Green ve TaqMan Probe yöntemidir. SYBR Green spesifik olmayan DNA'nın çoğaltımında kullanılır. Floresan boya DNA'ya bağlandığı andan itibaren çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak Real-Time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artması beklenir. Farklı markalarca birçok çeşidi olmasına rağmen en fazla kullanılan boya çeşitidir. Reaksiyon için karışımında bulunması gerekenler cDNA molekülü, primerler ve SYBR Green boyasıdır. Dizaynı iyi yapılmış primerler ile bir takım optimizasyonlar sonucu çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Maliyeti ucuzdur ama dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerin çoğalmasında yanıltıcı aynı floresan açığa çıkacağından her zaman istenilen DNA'nın çoğaldığını işaret etmeyerek yanlış sonuç almak da mümkündür. Primerlerin birbiri ile istenmeyen bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan oluşumlar gözlemlenebilir. Erime eğrisi analizleri (melting curve) çoğaltılan DNA'nın istenilen bölge olup olmadığını anlayabilmek için ve deneylerin güvenilirliği açısından yapılması gerekmektedir. TaqMan Probe Yönteminde ise probun primer ve nükleik asitle bağlanma bölgeleri arasına TaqMan probolar bağlanır. Yeni zincir primerlerin bağlanmasının ardından baslar. Taq DNA polimeraz enzimi devreye girerek 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM (6-carboxy fluorescein)'ı probdan ayırır. FAM sinyal serbest hale geçer. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda orantılı olarak artmaya ve azalmaya devam eder.

Real-Time PCR'da 3 temel faz bulunmaktadır. Bunlar:

1. Üssel faz
2. Doğrusal faz
3. Durağan faz



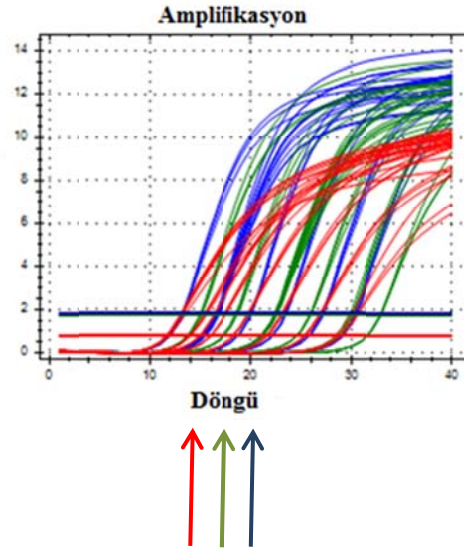
Şekil 2.5 Real-Time PCR'in 3 temel fazının gösterildiği grafik

PCR ürün miktarının her döngüde iki kat arttığı üssel fazdır. Reaksiyonun etkinliği % 100'dür. Floresan ışımının eşik değere ulaştığı fazdır. Eşik değer olarak bahsedilen değer Ct değeridir. Bu değer bize ürünlerdeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Ct (Threshold Cycle- eşik döngüsü) değerinin 35 ve üzerinde olması reaksiyonun gerçekleşmediği anlamına gelir.

Linear faz veya doğrusal faz, reaksiyonun bileşenlerinin tükenmeye başladığı fazdır. Reaksiyon yavaşlar ve oluşan PCR ürünleri parçalanmaya başlar.

Durağan veya End-point fazda ise, geleneksel PCR'a benzer jel bazlı tanının olduğu aşamadır. Reaksiyon sonlanmaktadır. Bu fazda yeni bir PCR ürünü oluşmaz.

Real-Time PCR'ın en büyük avantajı amplifikasyon esnasında ürün oluşumunun izlenebilmesi esasına dayanmaktadır. Çoğalma ile birlikte eş zamanlı olarak saptama gerçekleşir ve DNA'ya bağlanan boyalar ile ürün miktarındaki artış veya azalışa göre sinyallerin ölçülmesi ile değerlendirilir. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış Ct değeridir ve başlangıç miktarı ile orantılıdır.



Şekil 2.6 Florasan boyamalarla birlikte anlamlı reaksiyon profili

2.8 Kaynak Özeti

Literatür taraması sonucu 10 farklı gen bölgesi bakımından hedef tür olan *L. gibbosus* ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez bu bakımdan özgün bir değere sahiptir. Farklı balık türlerinde çalışılan aynı gen bölgeleri kaynak özeti olarak aktarılmıştır.

Kagawa vd. (2000) yılında yapmış oldukları çalışmada bir tankta sadece *Carassius auratus* (kontrol grubu) diğer bir tankta ise *Lepomis macrochirus* (deney grubu) ile aynı tankta konularak stres gen bölgesi olan HSP70'in beyin dokularındaki mRNA düzeylerini buna bağlı olarak kortizol düzeylerindeki artış/azalışı incelemişlerdir. HSP70 mRNA ve kortizol düzeyleri bakımından deney grubunda 6. ve 12. saatte belirgin artışlar görülmüştür. Stres başlangıcından hemen sonra balıklar tekrar ayrılmış ve 12. saatin sonunda kontrol grubu seviyesine geri dönmüştür. Deney grubu örneklerinin HSP70 mRNA seviyeleri 6 saat sonra tekrar kontrol edilmiş stres ve kortizol seviyesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Ayrı tanklara alınan balıklardan *Lepomis macrochirus*'un bulunduğu şeffaf tank ile yan yana konulan kontrol grubunda kortizol miktarında artış gözlemlenmiştir. Beyinde stres ile

güçlendirilmiş HSP70'in etkisinin görsel yolla bile kortizol ifadesinde önemli bir belirteç olduğu ortaya konmuştur.

Chen vd. (2001) yaptıkları çalışmada, IGF-I'in zebra balığındaki (*Danio rerio*) büyüme üzerine karakterizasyonunu incelemiştir. Yapılan çalışmada yetişkin zebra balığının beyin dokusundan cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. IGF-I genlerinden biri olan IGF-Ia'nın zebra balığında yaklaşık 15 kb'lık bir alanı kaplamış olduğu ve zebra balığının birden çok IGF-I genine sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Real-Time PCR kombinasyonunda IGF-I'in IGF-I Ea-2'yi anlamlı şekilde ifade ettiği belirtilmiştir.

Martyniuk vd, (2010) yılında yaptıkları çalışmada, hipotalamusta Dieldrin'in etki modunu daha iyi anlamak için *Micropterus salmoides* türünü kullanarak, ekspresyon düzeyini incelemiştir. Dieldrine maruz kalan balıkların aynı zamanda nörotoksik etkilere maruz kaldığı ve üreme süreçlerinin sekteye uğradığı ortaya çıkarken, üreme bozukluklarının muhtemelen birden fazla etkenin sonucu olarak ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Hipotalamusta dieldrinin etki modunu daha iyi anlamak için bu çalışmada erkek- dişi kullanılmış ve 10 mg dieldrin kg başına enjekte edilmiştir. 7 gün sonra deney için balıklar öldürülmüştür. Dopamin konsantrasyonunda önemli bir değişiklik gözlenmezken, dişi balıklarda agresif davranış gen düzeyinde GABA seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır.

Elabd vd. (2015) yaptıkları çalışmada, Centrarchidae familyasına ait olan *Lepomis macrochirus*'un farklı çevresel sıcaklıklara bağlı olarak HSP90 ve α -2-macroglobulin (A2M)'nin gen ekspresyon seviyesindeki değişimlerine bakmışlardır. 4 farklı grup içeren deneyde 6 hafta boyunca sırasıyla 10 °C, 20 °C, 30 °C ve 35 °C su sıcaklıkları kullanılmıştır. 0, 3 ve 6. haftalarda kontroller yapılmıştır. 0 ve 3. haftalarda SOD değerinde mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı görülürken ($p<0,05$) 6. haftada görülmemiştir. HSP90'nın yüksek sıcaklıklarda anlamlı olduğu kabul edilmiş, düşük sıcaklıklarda herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Benzer şekilde α -2-macroglobulin 20 ve 30 °C 'lik gruplarda anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak SOD, HSP90 ve A2M balık türlerinde iklim değişikliği ve çevresel sıcaklıkları izlemede iyi bir biyobelirteç olduğu belirtilmiştir.

Manuel vd. (2015), yılında yaptıkları çalışmada, çevresel olarak zenginleştirilmiş bir tankta yetiştirilen 6 ve 12 aylık zebra balıklarının nörojenik farklılaşma, kokain ve amfetamin ile düzenlenen transkript 4 (cart4) oranlarına bakmışlardır. Zenginleştirilmiş besin alan 6 aylık balıklarda hormonların etki ettiği bu gen bölgelerinin oranları düşükken, 12 aylık zebra balıklarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Zebra balıkları arasındaki bu yaş farkının kaçınma ve beslenme davranışlarında güçlü farklılıklar ortaya çıkardığı gözlemlenmiştir.

Wellband vd. (2017), yapmış oldukları çalışmada, fenotipik plastisitenin temelini ortaya çıkarmak amacıyla yeni habitatlara yerli olmayan türlerin başlangıçta nasıl yerleştiklerini anlamak için bir hipotez oluşturmuşlardır. Bunun için iki yerli olmayan balık türü *Proterorhinus semilunaris* ve *Neogobius melanostomus*'u kullanmışlardır. Yeni yaşam alanına uyum sağlayan balık türlerinin bu davranışlarının altında yatan genetik mekanizmaları incelemişlerdir. Gen transkripsiyonunun modülasyonunda fenotipik plastisitenin genel olarak zayıf karakterde seyrettiği ama aslında bu tepkilerin bileşeninde önemli bir mekanizma olduğunu vurgulamışlardır. Artan ve azalan su sıcaklığına maruz bırakılan *Proterorhinus semilunaris*'in ve *Neogobius melanostomus*'un sıcaklık toleransının transkripsiyonel temelini anlamak için RNA sekanslama tekniğini kullanmışlardır. Gen transkripsiyon seviyelerini karşılaştırmak için okuma sonucu ortaya çıkan verilerin doğrusal modelleri incelenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlarda *Proterorhinus semilunaris* ve *Neogobius melanostomus*'un işgalci tür potansiyelinin transkripsiyonel çerçevede hem çevresel hem de verdikleri tepkilerle anlamlı olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Balıklardan doku örneklerinin alınması

L. gibbosus ve beraberinde yaşayan diğer türlerin populasyonları Akgedik barajı (D1), Taş Ocağı (D2) ve Köprü (D3) olmak üzere toplamda 3 istasyondan 35 balık, SAMUS-725MP marka elektroşok cihazı ile yakalanmıştır. Yakalanan *Lepomis* örneklerinin beyin dokusu alınarak fix RNA ile dolu olan tüplere koyulmuştur ve analize kadar -20°C’de saklanmıştır. Aynı zamanda *L. gibbosus* ve beraberinde yaşayan diğer türlerin kas dokuları da alınarak tür seviyesinde teşhis için kullanılmak üzere saf etanol ile dolu olan tüplere koyulmuştur. Analizler başlayana kadar örnekler -20 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Beyin dokusunun alındığı yer

3.1.2 Fix RNA protoköü

Çalışma kapsamında *L. gibbosus* beyin dokuları için kullanılmış olan Fix RNA protokolü şu şekildedir:

- Taze dokudan 100 mg’a kadar kesit alınır ve kesilen dokunun tüp içerisine yerleştirilirken 0.5 cm’den ince olmasına dikkat edilir.

- Fix RNA solüsyonunun miktarının dokuya uygun olmasına dikkat edilir. Tamamıyla solüsyonun dokuyu kapladığından emin olunmalıdır. Fix RNA hacminin doku hacminin 10 katı olması veya hemen hemen 1 mg doku için 10µl fix RNA kullanılır.
- RNA izolasyonundan hemen önce tüp içerisinde kalan fix RNA solüsyonundan arındırılır.

3.1.3 Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.3.1 RNA ekstraksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler

RNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar:

- Kloroform
- İsoopropanol
- %75'lik etanol
- RNase-free su'dur.

3.1.3.1.1 Elektroforezde kullanılan kimyasal maddeler

Yükleme tamponu olarak TAE (Tris-asetat), agaroz, % 1'lik çamaşır suyu, EtBr (Etidyum bromür) kullanılmıştır.

3.1.3.1.2 cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

5X İscript reaksiyon karışımı, reverse transkriptaz, nukleaz free su ve RNA örneği kullanılmıştır.

3.1.3.1.3 Real time PCR’da kullanılan kimyasal maddeler

cDNA, Genlere spesifik tasarlanmış olan forward ve reverse primerler, Sybergreen, ddH₂O.

3.1.4 Yararlanılan alet ve ekipmanlar

Analizler sırasında;

- Termal Döngü Cihazı- Kyratec Supercycler Gradient Cycler
- Real-Time PCR Cihazı- BioRad CFX Connect Real-Time
- Nano spektrofotometre - Titertek Berthold Colibri Microvolume
- UV görüntüleme sistemi- Major Science UV Transilluminator
- RNA ve DNA örnekleri için ayrı ayrı yatay elektroforez sistemi- Major Science ME10-7-10
- Mikrodalga fırın- Kenwood MW455
- Otoklav- JSR JSAC-40
- Etüv- JSR CSOF-050
- Derin dondurucu (-30 °C)- Panasonic MDF-U5312
- Derin dondurucu (-80 °C)-Wisd
- Santrifüj, mikrosantrifüj- MPW, StarLab
- Saf su cihazı- Mini Pure
- Hassas terazi- BEL
- Vorteks- StarLab
- DNA ve RNA örneklerini yüklemek için ayrı ayrı kullanılan otomatik pipetler- Ergo One
- PCR tüpleri
- Plate
- Optik film
- Pens, bisturi ve cam malzemeler

kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 DNA izolasyonu

L. gibbosus ve yakalanan diğer türlerin kas dokularının DNA ekstraksiyonu Gene Matrix Tissue and Bacteria DNA Purification Kit kullanılarak protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Örnekler ekosistem bazında 3 grup halinde izole edilmiştir. Kas dokularının homojenize edilmesiyle ve protokolün gerçekleştirilmesiyle DNA izolasyonu tamamlanmıştır. Örnekler izole edildikten sonra PCR aşamasında kullanılabilecek kadar -20 °C’de saklanmıştır. Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir;

1. DNA Binding Spin Columnların filtre kısmı 40 µl Buffer T ile aktive edilir ve oda sıcaklığında bekletilir.
2. Maksimum 25 mg olan doku örnekleri küçük parçalara ayrılır.
3. Parçalanmış örnekler 1,5 ml’lik eppendorflara konulur ve 350 µl Lyse T Buffer eklenir.
4. 2 µl RNase A ve 20 µl Proteinase K eklenir.
5. Karışım vortexlenir ya da alt üst edilir.
6. Dokular şeffaflaşmaya kadar 56 °C’de 1-3 saat inkübe edilir (Gerekli durumlarda örnekler 1 gece inkübasyonda bırakılabilir).
7. Inkübasyon sırasında karışım her 15-30 dakikada bir vortexlenir ya da alt üst edilir.
8. Inkübasyondan sonra 350 µl Sol T Buffer eklenir.
9. Karışım vortexlenir ya da alt üst edilir.
10. Karışım 70 °C’de 10 dakika inkübe edilir.

11. 350 µl %96'lık absolute etanol eklenir.
12. Karışım vortexlenir ya da alt üst edilir.
13. Karışım 12.000 rpm 1 dakika santrifüjlenir.
14. Süpernatanttan 600 µl içerisinde DNA Binding Spin Column bulunan collection tüplere aktarılır.
15. 12.000 rpm 1 dakika santrifüjlenir (Eğer tüm süpernatant Columndan geçmemişse 14.000 rpmde tekrar santrifüjlenir).
16. Spin Column çıkarılır, fazla sıvı dökülür, geri yerleştirilir.
17. Tüm süpernatant bitene kadar 12-14 tekrarlanır (13. adım 2 dakika 12000 rpm) (Eğer tüm süpernatant Columndan geçmemişse 14.000 rpmde tekrar santrifüjlenir).
18. DNA binding spin-column üzerine 500 µl Wash TX1 buffer eklenir.
19. 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenir.
20. DNA binding spin column çıkarılır, fazla sıvı dökülür, geri yerleştirilir.
21. DNA binding spin-column üzerine 500 µl Wash TX2 buffer eklenir.
22. 2 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenir.
23. DNA binding spin-column yeni 2 ml'lik tüpe aktarılır.
24. Elution Buffer bağlı DNA'nın tüpe aktarılabilmesi için 70°C'ye ısıtılır.
25. 50 µl Elution Buffer tam ortaya eklenir.
26. 3 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
27. 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenir.
28. DNA binding spin-column çıkartılır, kapak kapatılır, +4 veya -20'de saklanır.

3.2.2 DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'nın miktar ve saflık analizleri nano spektrofotometrede (Colibri - Titertek Berthold Microvolume) ölçülmüştür. Nükleik asitler ışığı 260 nm dalga boyunda emerler. A260/280 oranı DNA'nın ne kadar saf olduğunu göstermektedir. Absorbans değeri nükleik asidin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 260 nm'de absorbans birimi DNA için 50 ng/ml'dir. A260/280 oranının yaklaşık olarak 1.8 olması DNA'nın saflığını göstermektedir. DNA'nın saflığını değerlendirirken 260 nm/280 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/ protein'in absorpsiyon değeri) ve 260 nm/230 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/Alkol'ün absorpsiyon değeri) değerleri göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca spektrofotometrik analizden sonra izolasyon ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.2.3 DNA konsantrasyonunun ayarlanması

Spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonları belirlenen örneklerin, ana stoklarının kontamine olmaması ve tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının standardize edilmesi amacı ile DNA konsantrasyonu 50 ng/μl olacak şekilde sulandırılarak -20 °C'de saklanmıştır

3.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR işleminde, DNA izolasyonu gerçekleştirilen tüm örnekler kullanılarak sitokrom oksidaz c alt ünite 1 (COI) gen bölgesi için spesifik olan FishF1-R1 ve FishF2-R2 (Ward vd. 2005) primer çiftleri ile PCR kurulmuştur. Bu basamakta elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jele 10μl olacak şekilde yüklenerek 150 voltta 25 dakika yürütülmüş ve uygun bant boyu veren örnekler, 25 μl sekans PCR'ı için reaksiyon hazırlanarak aynı işleme tabi tutulmuştur. Her iki PCR işlemi içinde FishF1-R1'in ve FishF2-R2'nin bağlanma sıcaklıkları bilindiği için herhangi bir optimizasyon yapılmamıştır.



Şekil 3.2 DNA ürünlerini çoğaltmak için kullanılan termal döngü cihazı

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan primerler ve PCR protokolleri

Hedef Gen/Bölge	COI			
Primer çiftleri	FishF1-R1		FishF2-R2	
Primer Dizileri	F: TCAACCAACCACACCGACATTGGCAC R: TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA		F: TCGACTAATCATAAAGATATCGGGAC R: ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	
Çoğaltılan Kısım	~ 650 Baz Çifti		~ 650 Baz Çifti	
PCR Protokolü	Termal Döngü Profili 95 °C 15 dakika 95 °C 15 saniye 54 °C 45 saniye x 39 72 °C 2 dakika 72 °C 10 dakika 8 °C ∞	Reaksiyon 2µl Master Mix 0,1 µl F primer 0,1 µl R primer 0,5 µl Kalıp DNA 7,3 µl PCR Water	Termal Döngü Profili 95 °C 15 dakika 95 °C 15 saniye 54 °C 45 saniye x 39 72 °C 2 dakika 72 °C 10 dakika 8 °C ∞	Reaksiyon 2µl Master Mix 0,1 µl F primer 0,1 µl R primer 0,5 µl Kalıp DNA 7,3 µl PCR Water

3.2.5 Tür tanımlama ve Filogenetik analiz

Tüm filogenetik analizler MEGA7 programında gerçekleştirilmiştir. COI gen bölgesi için CBOL (The Consortium for the Barcode of Life) tarafından önerilen primer çiftleri (FishF1-R1/FishF2-R2) kullanılarak tek bir parça halinde çoğaltılmış ve yaklaşık olarak 650 baz çifti uzunluğunda elde edilen ampliconlar saflaştırılarak DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Türle ilişkin nükleotid dizileri karşılaştırılarak, nükleotid kompozisyonu, nükleotid çifti frekansları ve kodon kullanımı istatistiksel olarak analiz edilen DNA dizileri GenBank'a farklı ülkelerden girişi yapılan çalışmalardan elde edilen referans dizilerde kullanılarak Kimura 2-parameter modeline uygun olarak genetik uzaklıkları hesaplanmıştır. Türler arası ilişkiyi hesaplamak için Neighbor Joining ağacından yararlanılmış ve farklı ülkelerden girişi yapılan diziler ile ülkemizden elde ettiğimiz türle ilişkin dizilerin arasındaki popülasyon farklılığını görebilmek için ise Median Joining Network analizi kullanılmıştır.

3.3 RNA izolasyonu

Bir hücredeki genin ifade seviyesini görmek için RNA üzerinden analiz yapılması gerekmektedir. RNA izolasyonu hücrelerin parçalanması (lisis), proteinlerin uzaklaştırılması (pürifikasyon) ve RNA'nın çöktürülmesi (presipitasyon) basamaklarına dayanmaktadır. Toplam RNA, *L. gibbosus*'un beyin dokusundan PureZOL RNA izolasyon protokolü kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Analizlerde yaklaşık olarak 100 mg beyin dokusu kullanılmıştır. Uygulanan protokol aşağıdaki gibidir:

1. Her 50-100 mg doku 1 ml PureZOL içerisine alınır.
2. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.
3. 12.000xg 10 dakika 4 °C'de santrifüjlenir.
4. 30-60 sn. boyunca homojenizasyon gerçekleştirilir.
5. Her 1ml PureZOL için 0.2ml kloroform kullanılır ve 15 sn. çalkalanır.
6. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.
7. 12.000xg 15dk. 4 °C'de santrifüjlenir.
8. Aqueous faz yeni RNase-free tüpe aktarılır.

9. Her 1ml PureZOL için 0.5ml isopropyl alkol kullanılır ve oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edilir.
10. 12.000xg 10 dakika 4 °C’de santrifüjlenir.
11. Süpernatant atılır.
12. RNA peleti 1ml PureZOL için % 75 etanol ile yıkanır.
13. Örnekler vortekslenir ve maximum 7.500xg’de 5 dk. 4° C’de santrifüjlenir.
14. Süpernatant atılır.
15. 5 dk. boyunca RNA peletinin kuruması beklenir.
16. Uygun miktar RNase-free su eklenir.
17. -20 °C’de 1 ay -80 °C’de 1 yıla kadar saklanabilir.

3.3.1 RNA’nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen RNA’nın miktar ve saflık analizleri nano spektrofotometrede (Colibri - Titertek Berthold Microvolume) gerçekleştirilmiştir. 260 nm’de absorbans birimi RNA için 40 ng/ml’dir. A260/280 oranının yaklaşık 1.8-2.0 olması RNA’nın saflığını göstermektedir. RNA’nın saflığını değerlendirirken 1.8’in altındaki değerler protein kontaminasyonunu; 2.0’ın üzerindeki değerlerinin DNA kontaminasyonunu göstereceği göz önüne alınmıştır. Ayrıca spektrofotometrik analizden sonra izolasyon ürünleri % 1’lik çamaşır sulu jelde RNA belirteci ile görüntülenmiştir.

3.3.2 RNA örnekleri için jel hazırlanışı

Aranda vd. (2012) yaptıkları çalışmada, jel hazırlamada formaldehit gibi toksik maddeler yerine çamaşır suyu kullanmışlardır. Çamaşır suyu ile hazırlanan jelin protokolü şekil 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.3 RNA jel döküm aşaması

Hazırlanan jele yüklenen RNA örnekleri 100 voltta 40 dakika RNA belirteç ile yürütülür.

3.3.3 RNA konsantrasyonunun ayarlanması

RNA nano spektrofotometre’de (Colibri - Titertek Berthold Microvolume) 260-280 nm’de RNA konsantrasyonları belirlenmiştir. Total RNA’lardan cDNA kütüphanesi oluşturmak için 1/RNA konsantrasyonu (µg) eşitliğinden faydalanarak RNA miktarları belirlenmiştir.

3.3.4 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Ters transkriptaz enzimi, RNA molekülünden belirli kimyasallar kullanılarak tek iplikli DNA üreten DNA polimeraz enzimidir. RNA tek iplikli yapısından enzimatik reaksiyonlarla cDNA şeklinde okunduktan sonra çift iplikli DNA oluşmasında da görev alır. Transkripsiyon DNA’dan RNA’nın sentezlenmesi olayıdır. Ters transkripsiyon bu sürecin tam tersidir. mRNA düzeyinde yapılacak analizlerde RNA molekülü kırılğan bir yapıya sahip olduğu için çalışmak zordur ve komplementar DNA (cDNA) gibi kararlı bir molekül ile çalışılır. İzole edilen mRNA’lardan cDNA eldesi için iScript™ cDNA Sentez Kiti’ndeki protokol kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 cDNA sentez protokolü

Bileşenler	Reaksiyon hacmi
5x İScript reaksiyon karışımı	4 µl
İScript reverse transkriptaz	1 µl
Nükleaz free su	X µl
cDNA	X µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon şartları; tutunma (annealing) 25 °C’de 5 dakika, uzama (extension) 42 °C’de 60 dakika ve revers transkriptaz enziminin aktive olması için 70 °C’de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyon işleminin bitiminde elde edilen komplementer DNA örnekleri bir sonraki analiz işlemine kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4 Gen ekspresyonu çalışmasında kullanılan Real time PCR cihazı



Şekil 3.5 Total RNA'nın mRNA'ya dönüştürülmesi

3.3.5 Genlere spesifik Primer Dizaynı

Çalışma için kullanılan 10 gen bölgesinden *L. gibbosus*'a ait herhangi bir mRNA ve cDNA dizisi bulunamadığından primerler tarafımızca tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). Gen ifadesi analizlerinde kullanılacak protokol daha önce balıklarda gerçekleştirilen (Zhang vd. 2004, Aegerter vd. 2005, Bonnet vd. 2007, Yao vd. 2007, Alam vd. 2008, Bouleau vd. 2014) ve farklı balık türlerine başarı ile uyarlanan gen ekspresyonu çalışmalardaki yöntemlerden değişiklikler yapılarak oluşturulmuştur. Büyümeye etki eden genler GHR ve IGF-I (Reinecke vd. 2005), üremeye etki eden genler FSH ve Activin (Tian vd., 2009), beslenme davranışından sorumlu genler CART ve NPY (Volkoff ve Peter 2006), agresif davranışlar ile ilgili genler 5-HT ve GABA (Norton ve Bally-Cuif 2010) ile stresle ilişkili genler olan HSP70 ve HSP90 (Iwata vd. 2007) olmak üzere toplamda 10 gen bölgesine bakılmıştır. Ayrıca ekspresyon değişimlerini karşılaştırmalı olarak hesaplamak amacıyla standart gen olarak Beta Aktin (β -actin) proteinini kodlayan gen seçilmiştir. Her bir gene spesifik primerler internet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/2008>) *Lepomis* türlerine ait seçilen genlerin (büyüme ve stres ile ilgili olanlarının) AY530822, AB296302, AB296301 erişim numaralı mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alınmış ve bu genler ile diğer tasarlanacak primerlerin amplifikasyonu için, internet ortamındaki başka bir primer dizayn programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/2012) kullanılarak genlerin maksimum 250 bp'lik kısmına spesifik primerler dizayn edilmiştir.

Oluşturulan primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.3 *L. gibbosus*'a spesifik tasarlanan ilgili gen bölgelerine ait primer çiftleri ve uzunlukları

Gen Bölgeleri	Tasarlanan Primerler			Ürün Uzunluğu
GHR	Forward	LepGHR-F2	TGTAGCTCCGCCTCTCTACT	152 bp
	Reverse	LepGHR-R2	TCATCACGCTGGGTTTCAGC	
IGF	Forward	LepIGF1-F1	TCGTCCCCACTCTTGTAAGC	116 bp
	Reverse	LepIGF1-R2	TGGCGATGGAGCTTGAACAT	
FSH	Forward	LepFSH-F2	AGAACACGTGTAACGGGGAC	195 bp
	Reverse	LepFSH-R2	AGCAAAAAGGCGACAGGTTC	
ACTIVIN	Forward	LepACTIVIN-F2	CGCGGCCTCGCGTAT	135 bp
	Reverse	LepACTIVIN-R2	GCCGAAGTCAGCTATGCAGG	
CART	Forward	LepCART-F2	GAAGTTGAGAGCGGACAGAC	126 bp
	Reverse	LepCART-R2	CACAGTGCGATGGTTCCTCT	
NPY	Forward	LepNPY-F2	GACTCTGGGGTTCCTGCTTT	172 bp
	Reverse	LepNPY-R2	AGGTAGTCGCCTACTCTGTC	
5-HT	Forward	Lep5-HT-F2	ACCCAGCGTTGATGGGAAAT	134 bp
	Reverse	Lep5-HT-R2	CCGGCAGCGAACATATCTCT	
GABA	Forward	LepGABA-F2	GCTCAGACCTGGTACGACAG	155 bp
	Reverse	LepGABA-R2	ATGCGATTGGGTGTGGTGAT	
HSP70	Forward	LepHSP70-F2	CAGGACTTGCTGCTTCTGGA	125 bp
	Reverse	LepHSP70-R2	GTGGTGAAGGTCTGGGTCTG	
HSP90	Forward	LepHSP90-F2	GCCGTGGAACAAAGATTGTG	112 bp
	Reverse	LepHSP90-R2	ATGGGGTAGCCGATGAACTG	
BETA ACTIN	Forward	LepB-ACTIN-F2	CACCATCGGCAATGAGAGGT	126 bp
	Reverse	LepB-ACTIN-R2	TCAGCGAGTTGTGCAGGATA	

3.6 Real-Time PCR ile Gen ekspresyonu aşaması

3.6.1 Gen ekspresyonu hesaplamaları

Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilirken her bir örneğin referans ve hedef Ct değerleri arasındaki farkı kıyaslayan hedef gen oranı metodu olarak adlandırılan metod kullanıldı (Pfaffl 2001). Kontrol ve deney gruplarının ekspresyon seviyelerinin hesaplanması aşağıda gösterildiği gibi hedef gen oranı metoduna göre yapılmıştır.

$$\text{Hedef Gen Oranı} = \frac{E_{\text{hedef gen}}^{\Delta CP \text{ hedef (kontrol-örnek)}}}{E_{\text{referans gen}}^{\Delta CP \text{ referans (kontrol-örnek)}}}$$

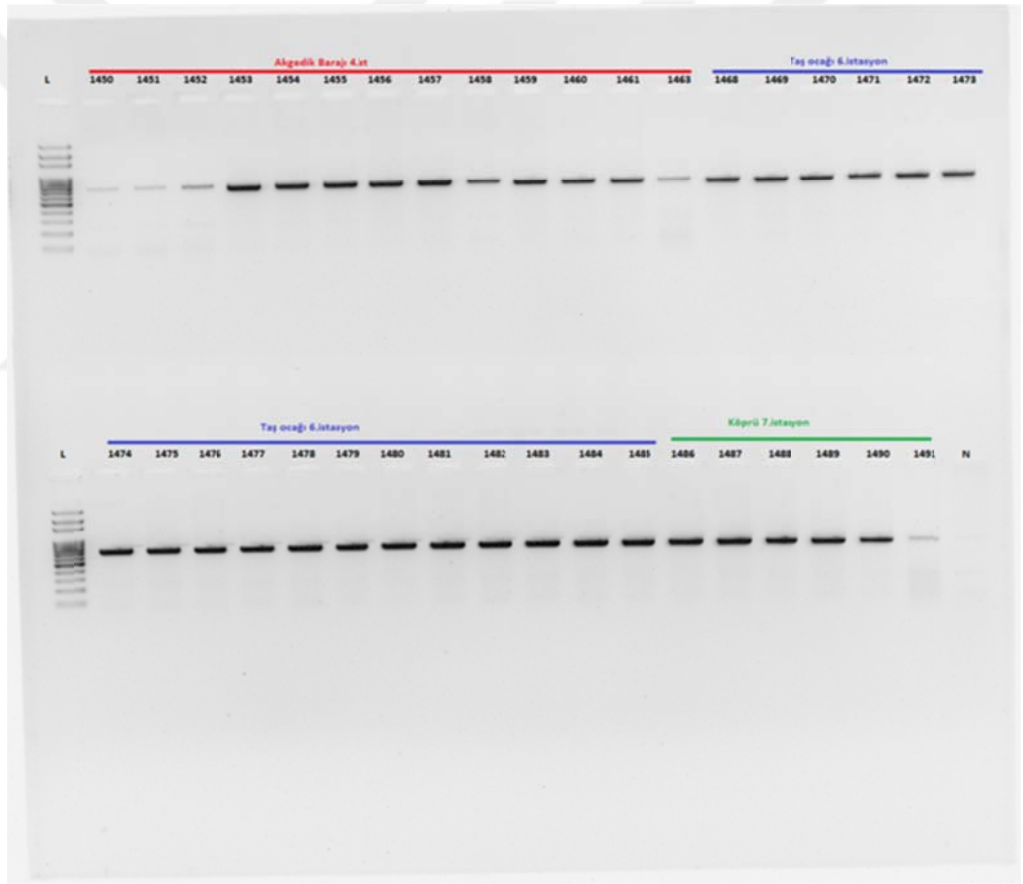
3.6.2 Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Tüm hedef genlerin mRNA seviyelerinin hesaplanmasında önce kontrol geni olan β -Aktin'e oranlama yapılmıştır. Veriler ortalama değer $\pm$ S.E.M. (Ortalamanın Standart Hatası) olacak şekilde ifadelendirilmiştir. İstatistiksel farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü ANOVA ile birlikte Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmış, anlamlı sonuçlar $P < 0.05$ eşiği ile belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerin tamamı SPSS 15.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 DNA'nın kalitatif ve kantitatif değerlendirmesi

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları, A260/A280 nm'de ölçülen absorbansların oranıyla belirlenen saflık dereceleri nanodrop cihazı ile belirlenmiştir. Saf haldeki bir DNA'nın A260/A280 absorbans oranı 1,8 civarındadır. Elde ettiğimiz DNA örneklerimizin saflık dereceleri yani A260/A280 oranının 1,8 olması DNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 4.1 Sekans PCR'ı jel görüntüsü

Çizelge 4.1 Akgedik Barajı *L. gibbosus* DNA izolasyonu nanodrop sonuçları

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konsantra	2,012287	4,774339	11,91377	194,3437	200,8461	180,1341	278,1058	153,2662	1,763153	289,3883	208,3771	309,8368
Tip	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50
A260/A280	1,211243	2,611552	3,67486	1,893406	1,911056	1,894506	1,906334	1,884756	0,101178	1,899363	1,871883	1,907007
A260/A230	0,237852	0,102822	0,093873	1,951636	1,906303	1,931788	2,131368	1,74309	0,077427	1,978444	1,344185	1,971621

Çizelge 4.2 Taş Ocağı istasyonu *L. gibbosus* DNA izolasyonu nanodrop sonuçları

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Konsantrasyon	159,397483	88,14421	131,7136	53,75866	122,6086	102,3239	79,09884	185,412	149,8385	83,41832	107,5746	84,42503	132,9117	151,7226	179,8354	137,5855	88,27975	152,8947
Tip	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50
A260/A280	1,913591	1,852444	1,842637	1,810918	1,874926	1,841082	1,729699	1,759163	1,797843	1,765071	1,781984	1,775389	1,787746	1,778305	1,787437	1,644918	1,839184	1,692858
A260/A230	1,974456	1,570808	1,278818	1,384211	1,273202	1,380636	1,14812	0,959117	1,330615	1,278016	1,127258	1,256918	1,310649	1,348681	1,326572	0,84116	1,366255	1,006573

Çizelge 4.3 Köprü istasyonu *L. gibbosus* DNA izolasyonu nanodrop sonuçları

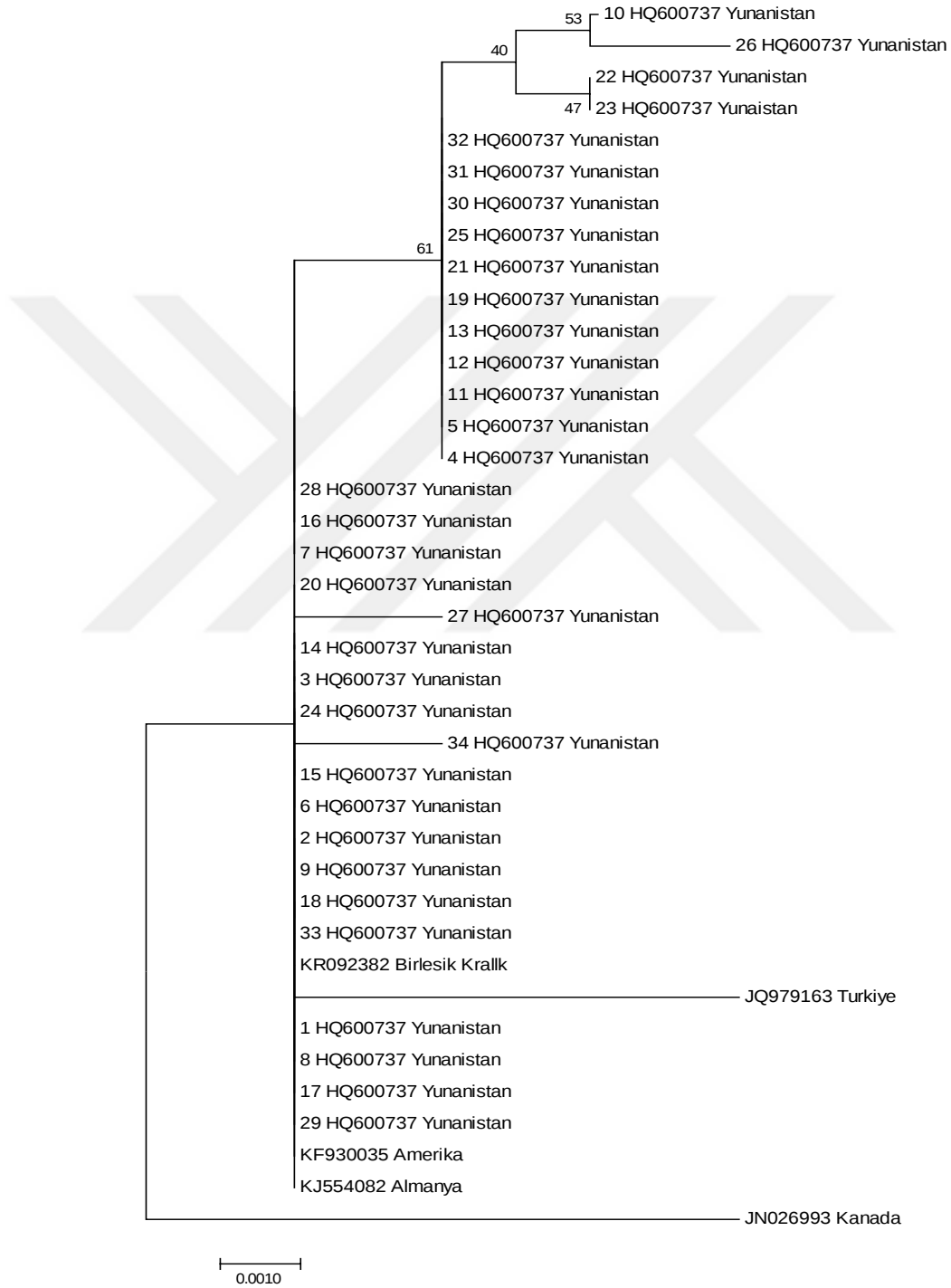
Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Konsantrasyon	271,8483	166,8461	94,92534	149,916	133,9646	303,4936	304,8854	41,22581	388,0679	91,51613	210,9056	427,7598	362,4644	*1624,434009
Tip	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50	DNA-50
A260/A280	1,912608	1,898905	1,852187	1,879229	1,959036	1,750187	1,900404	1,750172	2,061299	1,77461	1,984659	2,007629	1,923796	2,060112
A260/A230	2,197716	2,2665	1,986373	2,078873	2,749817	1,147181	2,246683	2,089413	2,222997	1,552317	2,081488	2,2187	2,426253	2,209802

34

Şekil 4.2 Genetik uzaklık matrisi

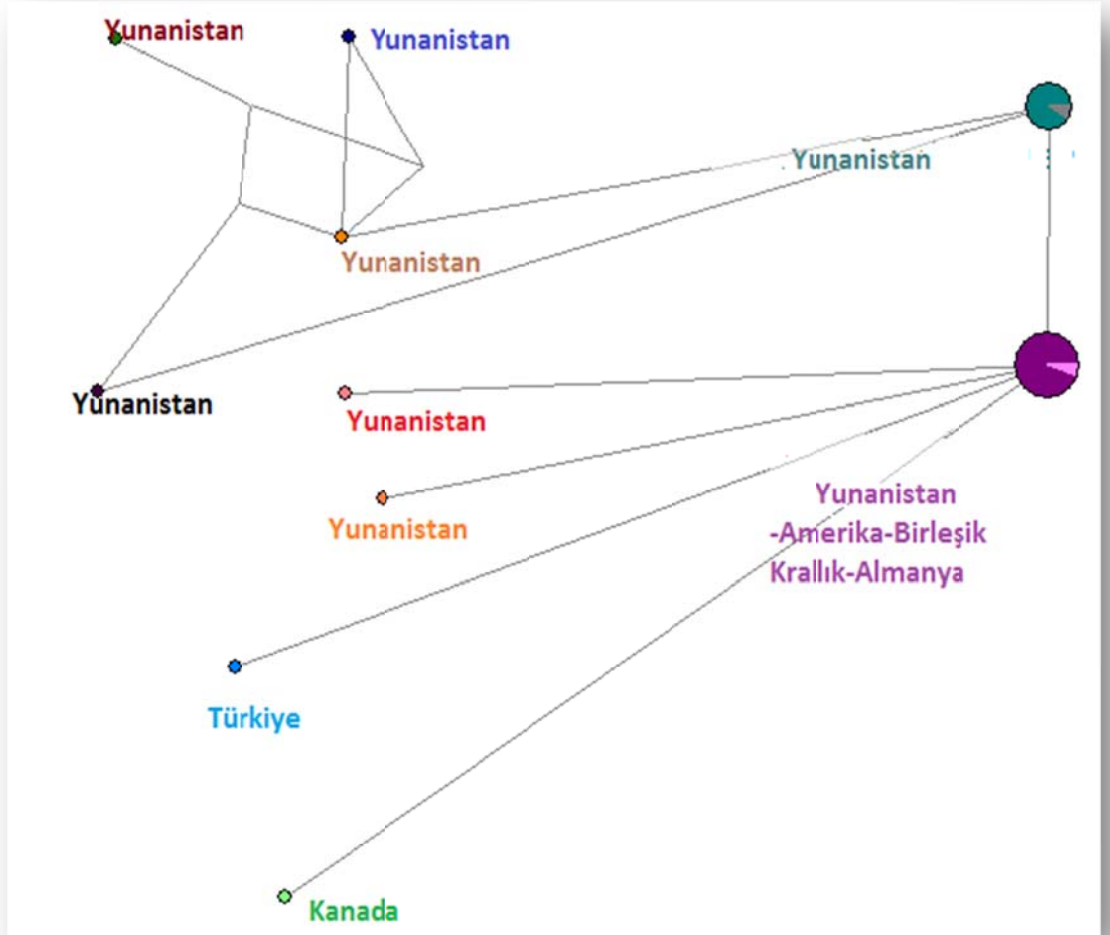
[illegible]

Türler arası en düşük ve en yüksek genetik uzaklıklar tabloda belirtilmiş ve bold işaretlenmiştir. Yunanistan ve Türkiye haplotipleri arasındaki genetik uzaklık en az iken Kanada haplotipleri arasındaki genetik uzaklık en fazladır.



Şekil 4.3 Filogenetik ağaç

NJ ağacı iki ana dala ayrılmıştır. Birinci ana dalda *L. gibbosus* Kanada ikinci ana dalda ise Yunanistan haplotipleri görülmektedir. Yunanistan haplotiplerinin de kendi aralarında kümelendiği görülmektedir. Türkiye *L. gibbosus* örneğinin Yunanistan, Almanya ve Amerika ile aynı haplotipte yer alıp Kanada'dan belirgin bir biçimde ayrıldığı görülmektedir. Filogenetik ağaçta yandaki sayılar bootstrap değerlerinin istatistiksel analizidir. 50 ve üzeri olanlar anlamlı kabul edilirken, 80 ve üzeri doğruluğunu, 90 ve üzeri bu analizin geçerli olduğu anlamına gelmektedir. Bootstrap 1000 tekrardan oluşmaktadır. Bunun nedeni DNA dizisinin rastgele seçtiği farklı yerlerden başlıyor olmasından kaynaklanır. Birbirleri arasında genetik uzaklık ne kadar az olursa bootstrap değeri de o kadar azalır.



Şekil 4.4 Median Joining Network analizi sonucu

Network analizinde amaç türlerin birbirleriyle nasıl bir ilişki içinde olduğunu göstermektir. Ağaçta bulunan nodlar aynı grupta bulunan örnekleri göstermektedir. *L. gibbosus* Yunanistan, Amerika, Birleşik Krallık ve Almanya haplotipleri aynı nodda bulunurken, Kanada ve Türkiye haplotipleri farklı nodda bulunmaktadır. Yunanistan ve Türkiye haplotipleri Kanada'ya göre daha fazla yakınlık göstermektedir.

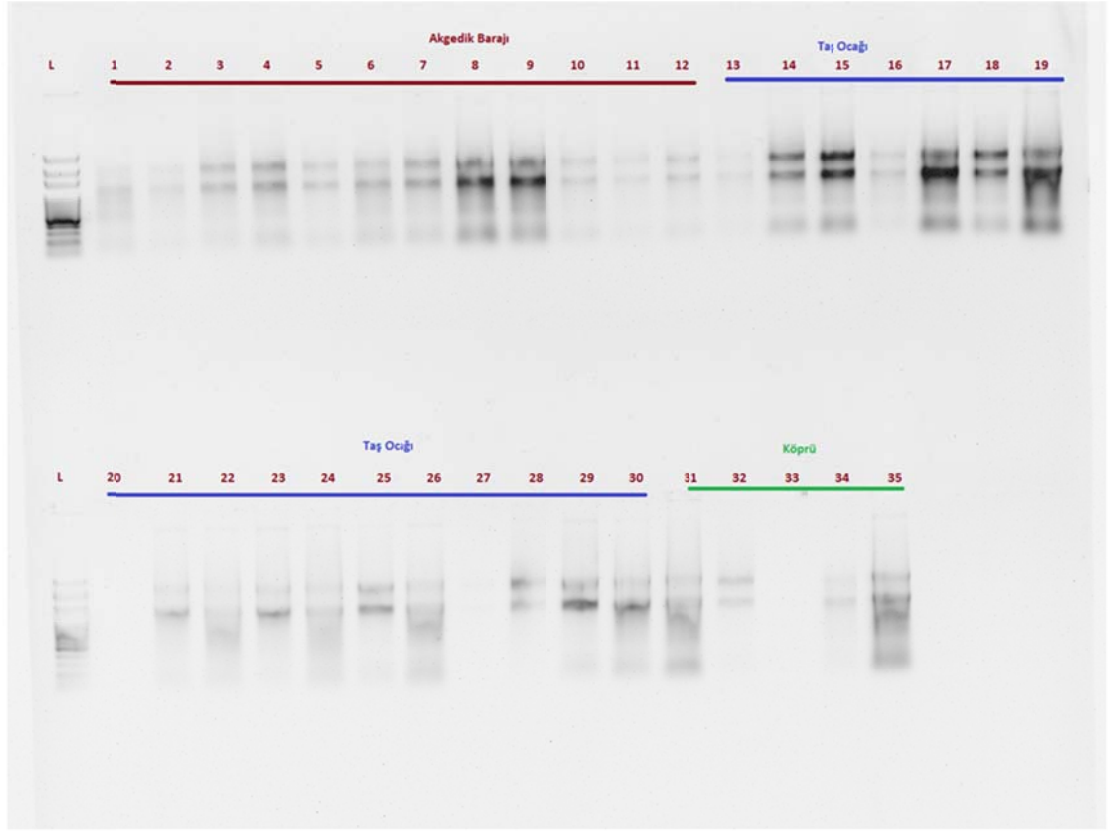
4.3 RNA'nın kalitatif ve kantitatif değerleri

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları, A260/A280 nm'de ölçülen absorbansların oranıyla belirlenen saflık dereceleri nanodrop cihazı ile belirlenmiştir. Saf haldeki bir RNA'nın A260/A280 absorbans oranı 2,0 civarındadır. Elde ettiğimiz RNA örneklerimizin saflık dereceleri yani A260/A280 oranının 2,0 olması RNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir. Bulduğumuz konsantrasyonlar cDNA'ların elde edilebilmesi için gerekli olan konsantrasyon miktarlarının üzerinde olup cDNA sentezinde başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Kompleks yapıları organizmalarda elektroforez sonucunda 18S rRNA ve 28S rRNA olmak üzere iki bant elde edilmektedir. Bantta görülen total RNA'dır. Elektroforez sonuçlarında elde edilen bantlar yoğun ve belirgindir. RNA kırıkları ve kontaminasyon görülmemektedir.

Çizelge 4.4 RNA izolasyonu nanodrop sonuçları

Numara	Konsantasyon	Tip	A260/280	A260/230
1	118,537557	RNA-40	1,910912	1,88791
2	68,012258	RNA-40	1,931464	0,871638
3	157,138258	RNA-40	1,908192	1,627884
4	152,102623	RNA-40	1,922243	1,811674
5	84,042008	RNA-40	1,8476	2,043526
6	168,903732	RNA-40	1,888629	2,268587
7	140,027965	RNA-40	1,919009	1,76584
8	*946,312538	RNA-40	1,961511	2,290587
9	323,790044	RNA-40	1,951248	2,280231
10	100,660541	RNA-40	1,839083	1,894342
11	41,147704	RNA-40	1,714096	2,107717
12	73,453196	RNA-40	1,786861	2,103487
13	40,555169	RNA-40	1,703528	2,138899
14	119,075391	RNA-40	1,890288	2,038063
15	143,414725	RNA-40	1,899367	1,935357
16	74,412042	RNA-40	1,850687	1,518864
17	162,199849	RNA-40	1,930694	1,919426
18	110,720922	RNA-40	1,895343	1,950496
19	108,997943	RNA-40	2,002681	0,839701
20	161,627711	RNA-40	1,932231	1,917515
21	200,392895	RNA-40	1,924688	2,235297
22	*763,308020	RNA-40	2,002705	2,348192
23	502,003314	RNA-40	1,980052	2,259806
24	*942,800180	RNA-40	2,020292	2,32738
25	119,650787	RNA-40	1,902269	2,367002
26	302,015841	RNA-40	1,982481	2,329365
27	16,38536	RNA-40	1,902662	0,388598
28	103,046741	RNA-40	2,041884	1,540413
29	132,556165	RNA-40	1,84175	2,478021
30	85,798585	RNA-40	1,946066	0,768516
31	*1213,227487	RNA-40	2,063607	2,261987
32	107,059163	RNA-40	2,102262	1,169862
33	3,905862	RNA-40	1,9516	0,121901
34	103,557711	RNA-40	1,892687	1,766353
35	*1163,972412	RNA-40	2,024864	2,305473



Şekil 4.5 RNA ürünlerinin jel görüntüsü

4.4 Primer Optimizasyonu

Tasarlanan primerlerin annealing (bağlanma) sıcaklıklarını tespit etmek amacıyla Biorad CFX96 Real time PCR cihazının gradient özelliğinden faydalanılarak her bir genin ayrı ayrı T_m sıcaklığından $\pm 5^{\circ}\text{C}$ derece aralığında gradient PCR kurulmuştur. Tasarlanan bütün primerlerin annealing sıcaklıkları tespit edilerek gen ekspresyonu çalışmalarına başlanmıştır. Dizayn edilen primerlerin, çalışıp çalışmadıkları ve spesifiklikleri RT-PCR (BioRad- CFX Connect Real-Time) yapıp kontrol edildikten sonra kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan karışım; forward primer, revers primer ve 5x HOT FIREpol EvaGreen RT-PCR Master Mix (Solis BioDyne) karışımı kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5 EvaGreen protokolü

Bileşenler	Reaksiyon hacmi
5x HOT FIREpol EvaGreen Master Mix	4 µl
Forward Primer	0.2-0.4 µl
Reverse Primer	0.2-0.4 µl
cDNA	X µl
Nükleaz free su	20 µl 'ye kadar
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon Profili

95°C'de 12 dakika

95°C'de 15 saniye

60°C'de 20 saniye

72°C'de 20 saniye

40 döngü

		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
A	60.0	Unk1	Unk1	Unk1	Std1	NTC1	A	58.0	Unk1	Unk1	Unk1	Std1	NTC1
B	59.4	Unk2	Unk2	Unk2	Std2	NTC2	B	57.5	Unk1	Unk1	Unk1	Std2	NTC1
C	58.3	Unk3	Unk3	Unk3	Std3	NTC3	C	56.5	Unk2	Unk2	Unk2	Std3	NTC2
D	56.3	Unk4	Unk4	Unk4	Std4	NTC4	D	54.7	Unk2	Unk2	Unk2	Std4	NTC2
E	53.9	Unk5	Unk5	Unk5	Std5	NTC5	E	52.5	Unk3	Unk3	Unk3	Std5	NTC3
F	52.0	Unk6	Unk6	Unk6	Std6	NTC6	F	50.8	Unk3	Unk3	Unk3	Std6	NTC3
G	50.7	Unk7	Unk7	Unk7	Std7	NTC7	G	49.6	Unk4	Unk4	Unk4	Std7	NTC4
H	50.0	Unk8	Unk8	Unk8	Std8	NTC8	H	49.0	Unk4	Unk4	Unk4	Std8	NTC4

		1	2	3	4	5
A	57.0	Unk1	Unk1	Unk1	Std1	NTC1
B	56.6	Unk1	Unk1	Unk1	Std2	NTC1
C	55.8	Unk2	Unk2	Unk2	Std3	NTC2
D	54.5	Unk2	Unk2	Unk2	Std4	NTC2
E	52.8	Unk3	Unk3	Unk3	Std5	NTC3
F	51.4	Unk3	Unk3	Unk3	Std6	NTC3
G	50.5	Unk4	Unk4	Unk4	Std7	NTC4
H	50.0	Unk4	Unk4	Unk4	Std8	NTC4

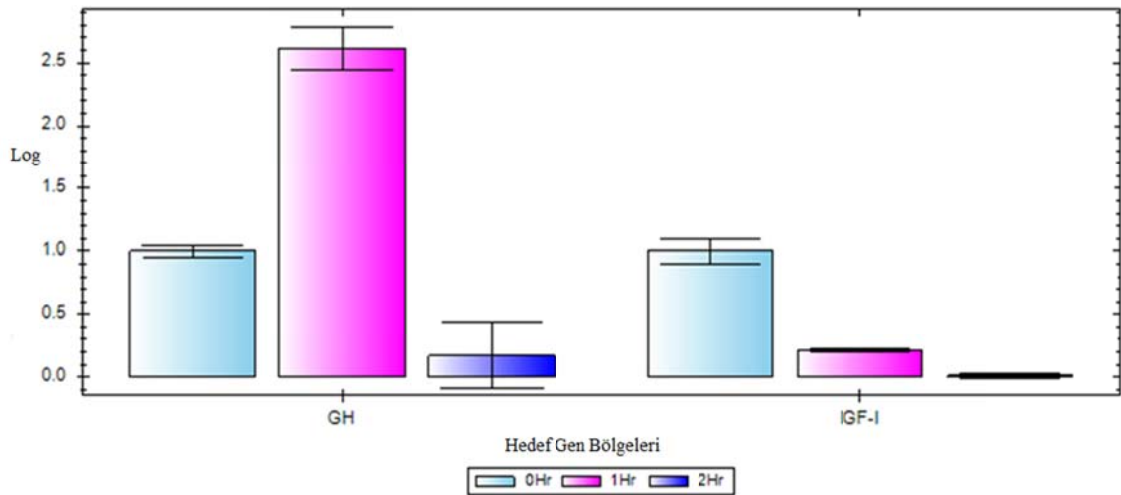
Şekil 4.6 Real time PCR cihazı ile genlere uygun bağlanma sıcaklıklarının tespiti

4.5 Real-Time PCR mRNA Seviyelerinin Tespiti

4.5.1 Beyin dokularında büyümeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi

Araştırmada farklı ekosistem bazındaki gruplarda bulunan *L. gibbosus*'un beyin dokularının GH ve IGF-I mRNA seviyelerine ait farklılıklar şekil.5.1'de sunulmuştur. Kontrol grubu olarak kullanılan Beta actin grubu mRNA seviyelerinin belirlenmesinde standart olarak kullanılmış olup bu gruba ait gen ekspresyon miktarı 1 olarak kabul edilmektedir.

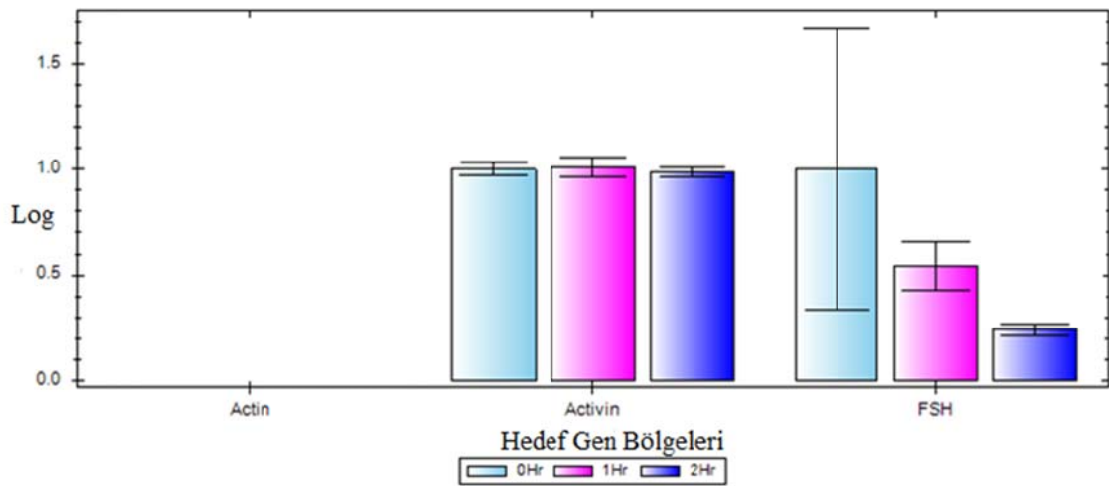
Beyin dokusunda en yüksek GH gen ekspresyonu D2 grubu balıklarda $2,22 \pm 0,32$ ile belirlenirken en düşük ekspresyon miktarı $1,20 \pm 0,15$ ile D3 grubunda tespit edilmiştir. D1, D2, D3 grupları arasında GH ve IGF-I mRNA seviyesi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark bulunmakla birlikte ($p < 0,05$) IGF-I gruplar arasında anlamlı farklılık ($p > 0,005$) görülmemiştir. IGF-I mRNA seviyesi en yüksek D2 grubunda tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Beta actin genine göre standardize edilmiş GH ve IGF-I 'den büyüme parametreleri bakımından özellikle GH hormonuna ait gen ekspresyon derecesinin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7 Beyin dokularında büyümeye etki eden genlerin mRNA seviyesi

4.5.2 Beyin dokularında üremeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi

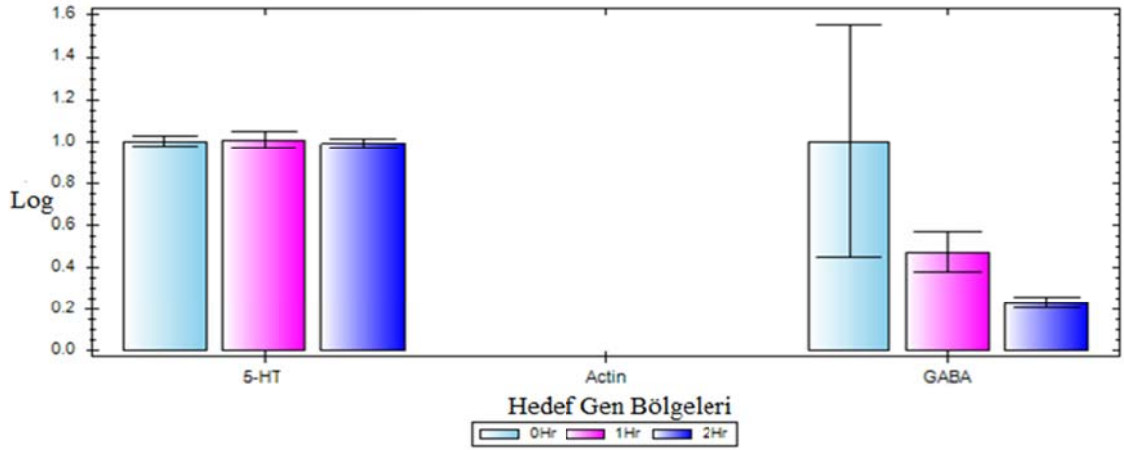
L. gibbosus'un beyin dokularının FSH ve Activin mRNA seviyelerine ait farklılıklar şekil 5.2'de sunulmuştur. Beyin dokusunda en yüksek Activin gen ekspresyonu D2 grubu balıklarda $2,50 \pm 0,56$ ile belirlenirken en düşük ekspresyon miktarı $1,02 \pm 0,16$ ile D3 grubunda tespit edilmiştir. D1, D2, D3 grupları arasında FSH mRNA seviyesi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark bulunmakla birlikte ($p < 0,05$) Activin mRNA seviyesi gruplar içinde anlamlı farklılık ($p > 0,005$) görülmemiştir. FSH mRNA seviyesi en yüksek D1 grubunda tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Beta actin genine göre standardize edilmiş FSH ve Activin'nin üreme parametreleri bakımından özellikle FSH hormonuna ait gen ekspresyon derecesinin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8 Beyin dokularında üremeye etki eden genlerin mRNA Seviyesi

4.5.3 Beyin dokularında agresif davranışlara etki eden genlerin mRNA Seviyesi

L. gibbosus'un beyin dokularının 5-HT ve GABA mRNA seviyelerine ait farklılıklar şekil 5.3'te sunulmuştur. 5-HT grup içi karşılaştırmada herhangi bir farklılık gözlemlenmezken; D1, D2, D3 grupları arasında 5-HT mRNA seviyesi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark bulunmakla birlikte ($p < 0,05$), GABA grupları arasında da anlamlı farklılık görülmüştür. Sonuç olarak, Beta actin genine göre standardize edilmiş 5-HT ve GABA agresif davranışa etki eden parametreleri bakımından özellikle GABA hormonuna ait genlerin grup içi ekspresyon derecesinin arttığı gözlemlenmiştir.

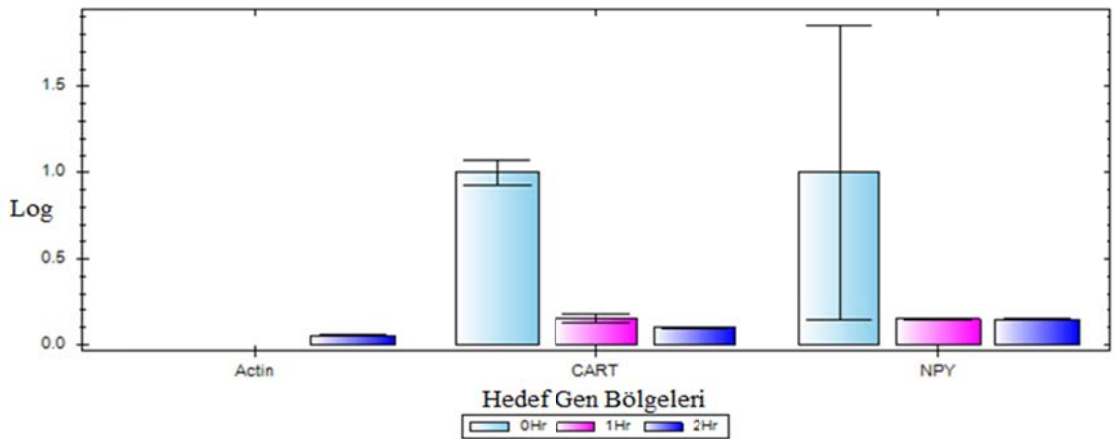


Şekil 4.9 Beyin dokularında agresif davranışlara etki eden genlerin mRNA Seviyesi

4.5.4 Beyin dokularında beslenme etki eden genlerin mRNA Seviyesi

L. gibbosus'un beyin dokularının CART ve NPY mRNA seviyelerine ait farklılıklar şekil 5.4'te sunulmuştur.

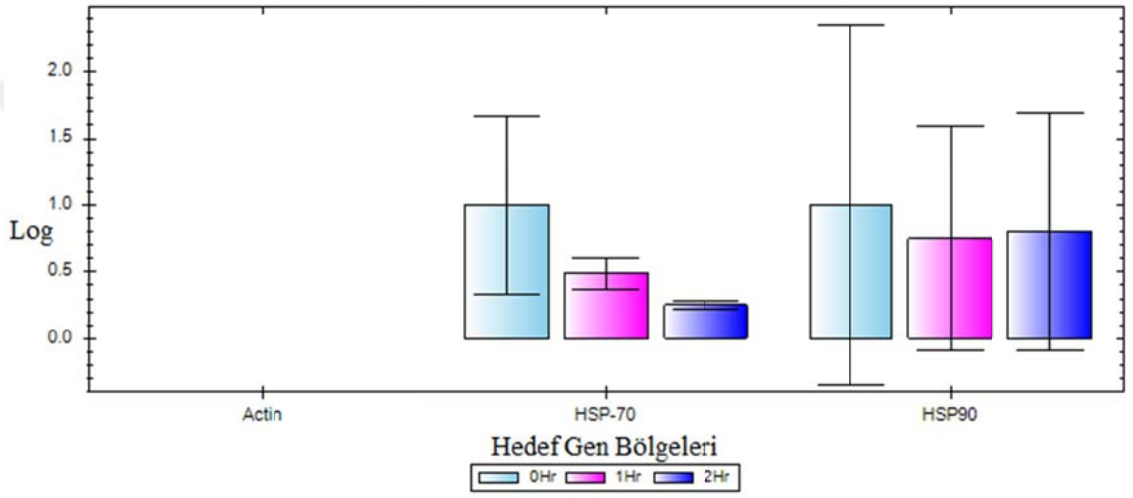
Beyin dokusunda en yüksek CART gen ekspresyonu D1 grubu balıklarda $2,70 \pm 0,42$ ile belirlenirken en düşük ekspresyon miktarı $1,80 \pm 0,15$ ile D3 grubunda tespit edilmiştir. D1, D2, D3 grupları arasında CART ve NPY arasında mRNA seviyesi bakımından istatistiki olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). Sonuç olarak, Beta actin genine göre standardize edilmiş CART ve NPY'den beslenme parametreleri bakımından özellikle NPY hormonuna ait gen ekspresyon derecesinin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10 Beyin dokularında beslenme etki eden genlerin mRNA Seviyesi

4.5.5 Beyin dokularında strese etki eden genlerin mRNA Seviyesi

L. gibbosus'un beyin dokularının HSP70 ve HSP90 mRNA seviyelerine ait farklılıklar şekil 5.5 'te sunulmuştur. HSP70 gruplar arasında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) görülmüştür. HSP90 mRNA seviyeleri anlamlı farklılık görülmemiştir. Sonuç olarak, Beta actin genine göre standardize edilmiş HSP70 ve HSP90'den stres parametreleri bakımından özellikle HSP70 hormonuna ait gen ekspresyon derecesinin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11 Beyin dokularında stress etki eden genlerin mRNA Seviyesi

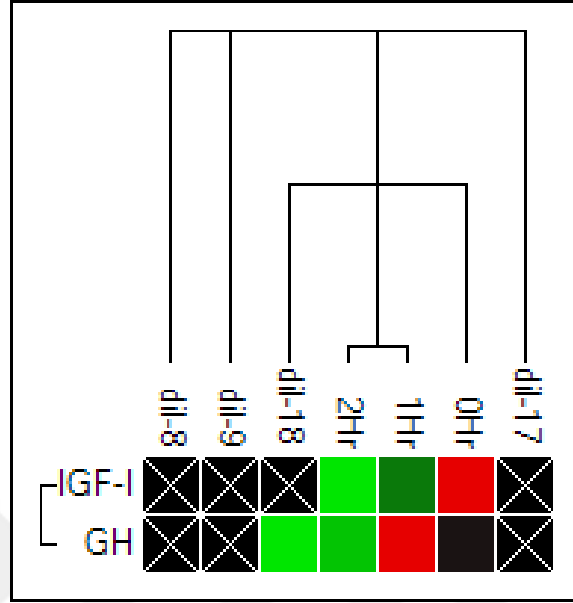
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye'ye Trakya Bölgesi'nden girdiği düşünülen ve 1980'li yıllardan sonra özellikle son yıllarda artan çalışmaların da katkısı ile (Ağdamar vd., 2015, Top vd., 2016) Türkiye içsularında istila alanını genişlettiği ortaya konan tatlısu balığı türü, *L. gibbosus*'un istila başarısını ve sürecini anlamak için gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, türün istila başarısında önemli olduğu düşünülen büyüme, üreme, beslenme, agresif davranış ve stres gibi davranışların gen ifadelerindeki değişimler türün yaygın olarak bulunduğu Sarıçay deresi havzasında farklı çevresel baskılar altında bulunan üç lokasyondan toplanan örnekler ile incelenmiştir. İstilacı bir türün istila sürecindeki başarısını göstermek için ilgili davranışlardan sorumlu gen bölgeleri seçilmiş ve RT-PCR ile genlerin endojen gen bölgesine göre normalizasyonu yapılmıştır.

Beyin dokularında en yüksek GH mRNA seviyesi besin bakımından en zengin olduğu düşünülen D2 grubunda gözlemlenmiştir. Büyüme hormonu GH hipofizden salgılanan bir hormon olmakla birlikte bu hormona ait genin ekspresyonunun dokulara göre değiştiği büyüme mekanizmasının gereğidir (Picha vd. 2008). Büyüme hormonları arasında ekosistem bazında anlamlı farklılıkların görülmesi seçilen istasyonlar arasındaki farklılığın sebebi olarak düşünülmektedir. Köprü barajında diğer ekosistem alanlarına göre büyüme hormonuna ait genlerin ekspresyon seviyelerinde önemli artışlar görülmüştür. Köprü barajı çevresinde bulunan yem fabrikasından bırakılan ham yem maddelerinin bu sonuçları etkileyen en önemli faktör olduğu düşünülmektedir.

Büyüme hormonu ve IGF metabolik sistemine göre GH hormonlarının hipotalamustan salgılanması ile karaciğerde IGF-I'in sentezi başlamaktadır. IGF-I'in salgılanma yolağı karaciğerde sentezlenen miktarına bağlı olarak böbrek ve diğer dokularda IGF-II sentezini başlamakta olup doku gelişimi gerçekleşmektedir (Duan 1997, Sheridan ve Hagemester 2009, Reinecke 2010). IGF'ler büyüme hormonunun stimülasyonu ile karaciğerden salgılanır. GH tarafından uyarılır, GH reseptörlerinin aktive olması IGF-I sentezini ve salınımını artırır. Ancak, *L. gibbosus* örneklerine ait elimizde sadece beyin

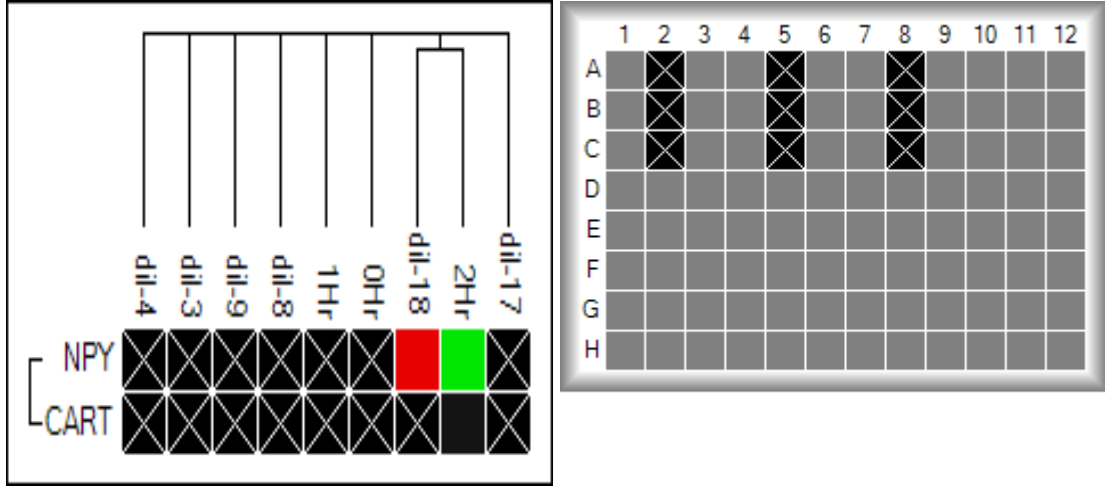
dokusu olduğundan D2 grubunda büyüme hormonu ile kıyasla herhangi anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.1 IGF-I ve GH için cDNA seri dilüsyonları

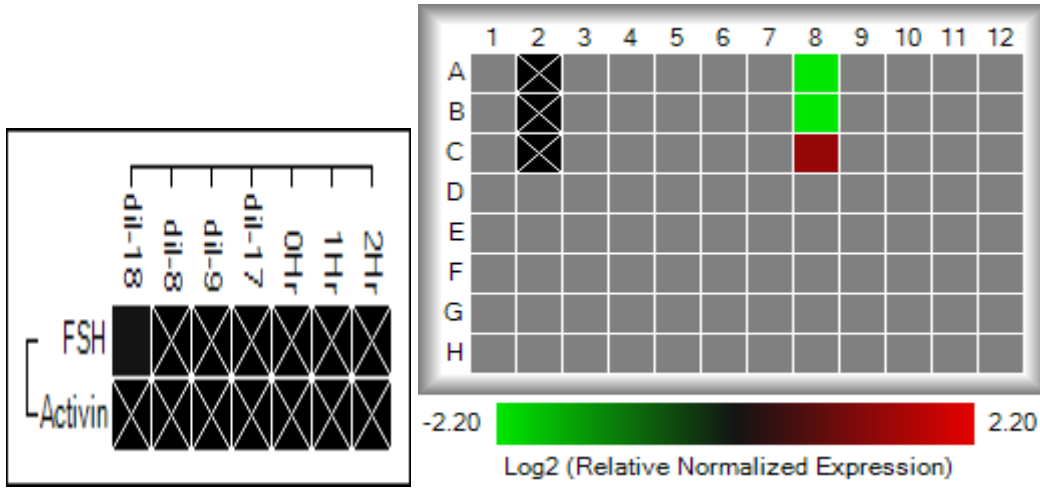
IGF-I ve GH seri seyreltmeleri sonucu 1. 2 ve dil18’de mRNA seviyesine ait olan genin ekspresyon düzeyinin diğerlerine oranla daha yüksek olduğu, 0. ve GH 1. seyreltme gruplarında ise ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Diğer kısımlarda belirgin bir ekspresyon değişimi yoktur.

Beslenme ile ilgili gen bölgeleri olan CART ve NPY (Volkoff ve Peter, 2006) bölgelerine bakıldığı zaman anlamlı olarak D2 grubunda fark görülmüştür. Besin içeriği bakımından zengin olan bu bölge istila sürecinde balıkların büyümeye başlayıp gelişme gösterdikleri ekosistem olarak yorumlanabilir. Sadece 2. seyreltmelerde ekspresyon gözlemlenirken, dil-18 de anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Diğer kısımlarda belirgin bir ekspresyon değişimi yoktur.



Şekil 5.2 NPY ve CART gen bölgeleri için seri dilüsyonlar ve ekspresyon grafiği

Üreme ile ilgili gen bölgeleri olan FSH ve Activin (Tian vd. 2009), bölgelerine bakıldığı zaman anlamlı olarak FSH gen bölgesinde farklılık gözlemlenmiştir. D1, D2 ve D3 gruplarındaki balıkların ortalama büyüklükleri farklı olmasından dolayı FSH oranında anlamlı farklılıklar görülürken, Activin gen bölgesinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.3 FSH ve Activin gen bölgeleri için seri dilüsyonlar ve ekspresyon grafiği

Agresif davranışa etki eden gen bölgeleri 5-HT ve GABA (Norton ve Bally-Cuif, 2010) arasından 5-HT gen bölgesinde anlamlı farklılık gözlemlenmezken, merkezi sinir sisteminde stresle ilgili önemli mesajların normal olarak çalışmasına yardımcı olan

GABA da önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bu da bize her 3 ekosistemin stres etkenlerinin canlıyı farklı şekilde etkilediğini göstermektedir.

Stresle ilişkili gen bölgeleri HSP70 ve HSP90 (Iwata vd. 2007) gen bölgeleri arasında anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. Ekosistemler arasında tuzluluk farkı, besin farkı bulunmasından dolayı böyle bir farkın ortaya çıkması beklenen bir durumdur.

Beslenme, üreme ve agresyon ile ilgili gen bölgeleri incelendiğinde, hepsinde tutarlı bir şablon karşımıza çıkmış ve D1 grubunun bulunduğu Akdegik istasyonundaki *L. gibbosus* bireylerinde en yüksek gen ifadelerinin bulunduğu, D2 grubunun bulunduğu yem fabrikasının hemen yanında bulunan dere istasyondaki bireylerin gen ifadelerinin bunu takip ettiği ve en düşük değerlerin kum ocaklarının oluşturduğu suni göletlerde olduğu görülmüştür. Beslenme, üreme ve agresiflik davranışları yabancı bir türün yeni girdiği bir ortamda tutunabilmesi, hayatta kalan popülasyonlar oluşturabilmesi ve istilacı bir tür haline gelebilmesi için oldukça önemli ve kritik davranışlardır ve baskın olarak görülmeleri beklenir. Elde edilen bu sonuçlar yabancı bir türün dominant bir tür haline gelerek bulunduğu ekosistemi istila etmesine yönelik tutarlı çıktılar vermiştir. Söz konusu davranışların en fazla görülmesinin beklendiği istasyon D1 grubu *L. gibbosus* bireylerinin olduğu Akdegik baraj gölüdür. Habitat alanı özelliklerinde bahsedildiği üzere bu baraj gölü, Sarıçay Deresi üzerine kurulan ikinci büyük insan yapımı suni göldür. Sunulan tez çalışmasının konusunu oluşturan balık türü *L. gibbosus*'u da içine alan birkaç yaygın istilacı tatlısu balığı türü, Türkiye içsularında bazı kamu kuruluşlarının genel bir alışkanlığı olarak baraj göllerine stoklanan sazan, *Cyprinus carpio* ile beraber istemsiz olarak ülke içsularının önemli bir bölümüne yayılmıştır (Tarkan vd. 2015). Benzer şekilde Sarıçay Deresi üzerinde ilk kurulan Geyik baraj gölünü de sürekli olarak sazan aşılamaalarının yapıldığı bilinmekte, *L. gibbosus* ve diğer istilacı tatlısu balığı türlerinin de Sarıçay havzasına bu şekilde girdiği düşünülmektedir. Dolayısıyla *L. gibbosus* istilasının başladığı ve merkez olarak nitelendirilebileceği yerler Geyik baraj gölü ve dere üzerinde bu baraj gölünden sonra inşa edilen diğer baraj gölü Akgedik baraj gölüdür. Geyik barajında olduğu gibi D1 grubu örneklerin bulunduğu Akgedik baraj gölü bu türün en bol olduğu, uygun habitatları dere habitatlarına nazaran çok daha uygun ve rahat bulabildiği bir bölgedir.

İstila biyolojisinde, herhangi bir istila olayının başlangıç noktası istilayı gerçekleştirecek türün yeni girdiği ilk bölgede çevresel ve ekolojik faktörlerin uygunluğuna bağlı olarak iyi bir şekilde hayatta kalmasını, zaman içinde bolluğunu hızlı bir şekilde arttırmasını ve baskın tür haline gelmesi öngörülür. Bu merkez olarak nitelendirilebilecek bölgeden yayılmaya başlayan öncü bireyler istilanın gelişimini sağlarlar ancak bu bireylerin oluşturduğu popülasyonlar merkez popülasyonun içinde bulunduğu optimum şartlardan daha zor çevresel şartlara dayanmak zorunda kaldıkları için farklı seçim baskılarına maruz kalacaklar ve hem biyolojik hem de bu biyolojik özelliklerin temelini oluşturan genetik yapılarında ciddi farklılıklar ortaya çıkmasına neden olacaktır. Bu özellikler yukarıda da bahsi geçen başta agresyon (saldırganlık), cesurluk (boldness), gelişmiş üreme, büyüme ve beslenme faaliyetleri gibi faktörlerdeki değişimler olarak karşımıza çıkabilir. Bu özellik ve davranışların istilanın başladığı merkez popülasyonlarda en yüksek seviyelerde, şartların optimumdan uzaklaştığı ve çevresel faktörlerin zorlayıcı hale geldiği kenar olarak tabi edebileceğimiz istilanın gelişimini sağlayan öncü (pioneering) popülasyonlarda daha düşük olması beklenir (Bohn 2004).

Bu sebeplerden dolayı merkez popülasyon olduğu düşünülen Akgedik barajı popülasyonunun diğer dere ve rezervuar (kum ocağı) popülasyonlarına göre daha agresif, yüksek üreme, beslenme ve büyüme kapasitelerine ve daha düşük bir strese sahip olmaları beklenir. Elde edilen sonuçlar bu hipotezleri çoğunlukla doğrular nitelikte karşımıza çıkmıştır. Özellikle agresyon, beslenme ve üreme davranışları D1 grubu bireylerin bulunduğu Akgedik baraj gölündeki popülasyonda diğer istasyonlara göre yüksek olarak bulunmuştur. D2 grubunun bulunduğu dere istasyonunda tür bolluk olarak bazı diğer yerel ve endemik türlere göre daha azdır ve bu istasyonda çok ciddi bir habitat ve besin rekabeti söz konusudur (Top vd. 2016). Ayrıca bu istasyonu da içine alan kısıtlı bir bölgede türün biyo-ekolojik özellikleri ve genetik çeşitliliğinin incelendiği bir çalışmada (Ağdamar vd. 2015) türün istilacılık koşullarını tam olarak sağlayamadığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde diğer istasyon D3 grubu örneklerin bulunduğu kum ocağı istasyonu ise bölgede yoğun bir şekilde gerçekleştirilen kum çekme faaliyetleri yüzünden oluşmuş birçok oldukça derin göletlerinden birinden elde edilmiştir. Bu bölgede de *L. gibbosus* ve diğer türler için uygun habitatlar göletin çok

derin ve vejetasyon/zemin miktarının ve uygunluğunun oldukça kısıtlı olmasından dolayı son derece azdır. Bu sebeplerden ötürü istilanın ‘kenar’ olarak tabir edebileceğimiz bölgelerinde yer alan bu örnekleme istasyonlarında türün daha agresif ya da yüksek bir üreme ve beslenme davranışı sergilemesi beklenen bir durum değildir.

Elde edilen sonuçlarda beklenenin aksine karşımıza çıkan durumlar büyüme ve stres genlerinde görülmüştür. Balıklarda endokrin sisteminin düzenlenmesinde büyüme hormonu (GH) önemli bir rol oynamaktadır. Büyüme metabolizmasının düzenlenmesinde iç faktörlerin etkisi kadar çeşitli dış faktörlerin de etkisi büyüktür. Besin madde kompozisyonu balıkların büyümeleri için en önemli dış etken olup, balığın ihtiyaçlarını içerip içermemesine göre olumlu ya da olumsuz etki etmektedir (Company et al. 2001; Sirkecioğlu 2011; Reindl and Sheridan 2012). Büyüme hormonu olan GH, hipofizden salgılanan bir hormon olmakla birlikte bu hormona ait genin ekspresyonunun dokulara göre değişmesi büyüme mekanizmasının gereğidir (Picha vd. 2008). Beyin dokularında en yüksek GH mRNA seviyesi besin bakımından en zengin olduğu düşünülen D2 grubu balıkların bulunduğu örnekleme istasyonunda gözlemlenmiştir. Bu istasyon suyun akıntılı olduğu dere bölümünde olmasına rağmen durgun su karakterindeki (baraj ve rezervuar) diğer iki istasyona nazaran hemen yanı başında bulunan bir yem fabrikasının ham maddelerinin bırakılması nedeniyle balıklar için çok daha fazla bir besin içeriği sunmaktadır. Bu durum daha önce *L. gibbosus*’un büyümesi ve beslenmesi üzerine yapılan çalışmalarda (Top 2011, Karakuş 2014) net bir şekilde görülmüştür. Dolayısıyla örneklenen istasyonlar arasındaki *L. gibbosus* bireylerinin büyüme genleri arasında anlamlı farklılıkların görülmesine seçilen istasyonlar arasındaki besin içeriği farklılıkların sebep olabileceği düşünülmektedir.

Stres ile ilgili gen bölgelerinde yukarıda bahsedilen gerekçelere dayanarak beklentilerin dışında sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun farklı sebepleri olabileceği gibi akla en yakın açıklama bireyleri yakalama esnasında elektroşok cihazı kullanımı ve yakalayıp örnek alana kadar süreçte bireylerin ani ve yoğun bir şekilde strese girmeleri olabilir. Bütün çalışılan istasyonlarda yüksek bir stres içeriğinin tespit edilmesi avcılık faaliyetlerimizin her çalışılan bölgede aynı olması da dikkate alındığında mantıklı bir çıktı olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak agresyon ve stres davranışlarının paralel

olarak işlev görebileceği ihtimali de gözden çıkarılmamalıdır. Örneklemenin yapıldığı ay olan şubat ayı iklimsel koşulların özellikle baraj göllerinde suyun yoğun miktarda artıp azaldığı ve çevresel şartların zorlayıcı bir hale geldiği bir zamandır. Dolayısıyla elde edilen stres değerlerinin diğer istasyonlarda olduğu gibi merkez popülasyonda da yüksek çıkması bu sebepten de kaynaklanmış olabilir. Mevsimsel olarak daha fazla çevresel değişimin gözlenebileceği daha çok lokasyondan yapılacak örneklemeler bu konuda daha doyurucu sonuçlar sağlayacaktır.

Sonuç olarak elde edilen bulgular, çalışılan yabancı tür *L. gibbosus*'un istila süreci boyunca belirli ve önem ihtiva eden gen ifadelerindeki değişimleri beklenen bir şekilde karşımıza çıkarmıştır. Elde edilen bu sonuçların daha geniş bir ölçekte, özellikle farklı çevresel baskılar altındaki daha fazla öncü popülasyon kullanılarak çalışılması başlangıç hipotezimizin doğrulanması anlamında elzem olacaktır. Bunun türün moleküler seviyede çalışılan davranışlarıyla ilgili yapılacak biyolojik ve ekolojik çalışmalar ile pekiştirilmesi de sadece bu tür özelinde değil herhangi yabancı bir türün istila oluşumu ve gelişimini anlamak için son derece yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, A.A. 2001. "Phenotypic plasticity in the interaction of evolution of species", Science, 294, 321-326.
- Ağdamar, S., Tarkan, A. S., Keskin, E., Top, N., Doğaç, E. and Baysal, Ö. 2015. "The role of environmental factors and genetic diversity on colonization success of a non-native fish, *L. gibbosus* from western part of Turkey", Biochemical Systematics and Ecology, 58, 195-203.
- Ağdamar, S., Tarkan, A. S., Keskin, E., Top, N., Doğaç, E. and Baysal, Ö. 2015. "The role of environmental factors and genetic diversity on colonization success of a non-native fish, *L. gibbosus* from western part of Turkey", Biochemical Systematics and Ecology, 58, 195-203.
- Andersen, M.C., Adams, H., Hope, B. and Powell, M. 2004. "Risk assessment for invasive species", Risk Analysis, 24, 787–793.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N. and Clarke, K.R. 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK.
- Anonymous. 2007. Francesca Gherardi Springer Science & Business Media, 734 p.
- Anonymous. 2008. Applied Biosystems. Web Sitesi: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042380.pdf, Erişim Tarihi: 15.06.2017.
- Aranda, P.S., LaJoie, D.M. and Jorcyk, C. L. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis, 33(2), 366-369.
- Balon, E.K. 1959. Die Entwicklung desakklimatisiertwn *L. gibbosus* (Linné 1948) während der embryonalen Periode inden Donauseitenwässern. Z. Fischerei 8(1-3):1-27.
- Becker-George, C. 1983. Fishes of Wisconsin. The University of Wisconsin Press. 828-833.
- Bohn, T., Sandlund, O.T., Amundsen, P.A. and Primicerio, R. 2004. "Rapidly changing life history during invasion", Oikos, 106, 138-150.
- Bohn, T., Sandlund, O.T., Amundsen, P.A. and Primicerio, R. 2004. "Rapidly changing life history during invasion", Oikos, 106, 138-150.
- Brinsmead, J. and Fox, M.G. 2002. "Morphological variation between lake–and stream–dwelling rock bass and pumpkinseed populations", Journal of Fish Biology, 61, 1619–1638.
- Burnham, K.P. and Anderson, D.R. 2003. Model selection and multimodel inference. A practical information-theoretic approach. Springer, New York, NY, USA.

- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*;25:169-93.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29, 23-39.
- Bustin, S.A. 2005. Real-time reverse transcription PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*.
- Cadotte, M.W., Murray, B.R. and Lovett-Doust, J. 2006. Evolutionary and ecological influences of plant invader success in the flora of Ontario. *Ecoscience*, 13: 388-395.
- Cano, L., Escarre, J., Fleck, I., Blanco-Moreno, J.M. and Sans, F.X. 2008. "Increased fitness and plasticity of an invasive species in its introduced range: a study using *Senecia pterophorus*", *Journal of Ecology*, 96, 468–476.
- Carroll, S. B. 2000. "Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity", *Cell*, 101, 577-580.
- Casadei, R., Pelleri, M.C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P. and Frabetti, F. 2011. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis. *Gene Expression Patterns*, 11, 271-276. DOI:10.1016/j.gep.2011.01.003
- Casal, C.M.V. 2006. "Global documentation of fish introductions: the growing crisis and recommendations for action", *Biological Invasions*, 8, 3–11.
- Chen, M.H.C., Lin, G.H., Gong, H.Y., Weng, C. F., Chang, C. Y. and Wu, J. L. 2001. The characterization of prepro-Insulin-like growth factor-1 Ea-2 expression and Insulin-like growth factor-1 genes (devoid 81 bp) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 268(1), 67-75.
- Chun, Y.J. 2011. "Phenotypic plasticity of introduced versus native purple loosestrife: univariate and multivariate reaction norm approaches", *Biological Invasions*, 13, 819–829.
- Colautti, R.I. and MacIsaac, H.J. 2004. "A neutral terminology to define 'invasive' species", *Diversity and Distributions*, 10, 135–141.
- Copp, G.H. and Fox, M.G. 2007. "Growth and life history traits of introduced pumpkinseed (*L. gibbosus*) in Europe, and the relevance to invasiveness potential" In: *Freshwater Bioinvaders: Profiles, Distribution, and Threats*. Editor: Gherardi, F.. Springer, Berlin. pp. 289-306.
- Copp, G.H., Fox, M.G. and Kováč, V. 2002. "Growth, morphology and life history traits of a coolwater European population of pumpkinseed *L. gibbosus*", *Archiv für Hydrobiologie*, 155, 585–614.

- Crivelli, A.J. and Mestre, D. 1988. "Life-history traits of pumpkinseed, *L. gibbosus*, introduced into the camargue, a Mediterranean wetland". *Archive für Hydrobiologia*, 111, 449–466.
- Cucherousset, J., Copp, G. H., Fox, M. G, Sterud, E, Van Kleef H. H., Verreycken, H. and Záhorská, E. 2009. "Latitudinal trends in the life-history traits of introduced pumpkinseed *L. gibbosus* populations of northern Europe", *Biological Invasions*, 11, 2171–2218.
- Çetinkaya, O. 2006. Türkiye sularına aşıl原因 veya stoklanan egzotik ve yerli balık türleri, bunların yetiştiricilik, balıkçılık, doğal populasyonlar ve sucul ekosistemler üzerindeki etkileri: Veri tabanı için bir ön çalışma. I. Balıklandırma ve Rezervuar Yönetimi Sempozyumu, 7-9 Şubat Antalya
- Davis, M.A. 2009. *Invasion Biology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Elabd, H., Kumar, V., Eissa, N., Shen, Z.G., Yao, H., Shaheen, A. and Wang, H.P. 2015. Stress, immune and growth responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) to different environmental temperatures as referred by related gene expression *Global Journal of Fisheries and Aquaculture* Vol. 3 (6), pp. 247-256
- Elvira, B. 2001. "Identification of non-native freshwater fishes established in europe and assessment of their potential threats to the biological diversity", *Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats*, Strasbourg.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. "Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis", *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Facon, B., Genton, B.J., Shykoff, J. Jarne, P. Estoup, A. and David, P. 2006. "A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions", *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 130–135.
- Fierst, J.L. 2011. "A history of phenotypic plasticity accelerates adaptation to a new environment", *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 1992–2001.
- Fischer–Rousseau, L., Pokwah Chu, K. and Cloutier, R. 2010. "Developmental plasticity in fish exposed to a water velocity gradient: a complex response", *Journal of Experimental Zoology B*, 314B, 67–85.
- Fox, M.G. 1994. "Growth, density, and interspecific influences on pumpkinseed sunfish life histories", *Ecology*, 75, 1157–1171.
- Fox, M.G. and Keast, A. 1991. "Effect of overwinter mortality on reproductive life history characteristics of pumpkinseed populations", *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science*, 48, 1792–1799.

- Fox, M.G., Vila-Gispert, A. and Copp, G. H. 2007. "Life-history traits of introduced Iberian pumpkinseed (*L. gibbosus*) relative to native populations; can differences explain colonization success?", *Journal of Fish Biology*, 71, 56–69.
- García-Berthou E, Boix, D. and Clavero, M. 2007. Non-indigenous animal species naturalized in Iberian inland waters. In: Gherardi F (ed), *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 123–140, doi:10.1007/978-1-4020-6029-8_6.
- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P. and Reznick, D.N. 2007. "Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments", *Functional Ecology*, 21, 394–407.
- Gibson, U.Eb, Heid, C.A. and Williams, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* ;6: pp.995-1001.
- Gillespie, G.J. and Fox, M.G. 2003. "Morphological and life-history differentiation between littoral and pelagic forms of pumpkinseed", *Journal Fish Biology*, 62, 1099–1115.
- Houde, E.D. and Zastrow, C.E 1993. Ecosystem- and taxon-specific dynamic and energetic properties of fish larvae assemblages. *Bulletin of Marine Science*.53(2):290-335.
- Iwata, E., Yamanobe, S., Momokawa-Sasaki, Mikami, K. and Sasaki, H. 2007. "Cloning and expression of HSP70 and 90 mRNA from bluegill *Lepomis macrochirus*", *Journal of Biological Sciences*, 7, 791-795.
- Kagawa, N. and Mugiya, Y. 2000. Exposure of goldfish (*Carassius auratus*) to bluegills (*Lepomis macrochirus*) enhances expression of stress protein 70 mRNA in the brains and increases plasma cortisol levels. *Zoological science*, 17(8), 1061-1066.
- Karakuş, 2014. Yabancı bir tatlısu türü *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846)'nın yerel balık türleriyle olan beslenme etkileşimleri. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla.
- Keskin, E. and Atar, H.H. 2013. DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Turkish Journal of Scientific Reviews*. 6(2): 01-08 (ULAKBİM).
- Kolbe, J.J., Glor, R.E., Schettino, L.R., Lara, A.C., Larson, A. and Losos, J.B. 2004. "Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard", *Nature*, 431, 177–181.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson. M., Forootan, A., Jonák, J. and Lind K. 2006. The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med*;27:95-125.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25:402-408.
- Lockwood, J.L., Hoopes, M.F. and Marchetti, M.P. 2007. *Invasion Ecology*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Lodge, D.M., Williams, S.L., MacIsaac, H., Hayes, K., Leung, B., Reichard, S., Mack, R.N., Moyle, P.B., Smith, M., Andow, D.A., Carlton, J.T. and McMichael, A. 2006. Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management. *Ecol. Appl.* 16, 2035–2054.
- Löffert, D., Karger, S., Twieling, G., Ulber, V. and Kang, J. 1999. Optimization of multiplex PCR. Qiagen GmbH, Issue No:2, Germany.
- Manuel, R., Gorissen, M., Stokkermans, M., Zethof, J., Ebbesson, L.O., Vis, H.V.D. and Bos, R.V.D. 2015. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Zebrafish*, 12(2), 152-165.
- Marchetti, M.P., Moyle, P.B. and Levine, R. 2004. Alien fishes in California watersheds: characteristics of successful and failed invaders. *Ecological Applications*, 14(2), 587-596.
- Martyniuk, C.J., Feswick, A., Spade, D. J., Kroll, K. J., Barber, D. S. and Denslow, N. D. 2010. Effects of acute dieldrin exposure on neurotransmitters and global gene transcription in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) hypothalamus. *Neurotoxicology*, 31(4), 356-366.
- Maxam, A. and Gilbert, W. 1977. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4.
- NCBI BLAST Home.Web Sites: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Norton, W. and Bally-Cuif, L. 2010. “Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics”, *BMC Neuroscience*, 11, 90.
- Özdemir, G. and Ceylan, B. 2007. Biyolojik İstila ve Karadeniz’deki İstilacı Türler. SÜMAE YUNUS Araştırma Bülteni, 7:3 Eylül 2007.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):2003-2007.
- Pfenning, D.W., Wund, M.A., Snell–Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D. and Moczek, A.P. 2010. “Phenotypic plasticity’s impacts on diversification and speciation”, *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 459–467.
- Picha, M.E., Turano, M.J., Tipsmark, C.K. and Borski, R.J. 2008. Regulation of endocrine and paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory

- growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Journal of Endocrinology*, 199(1), 81-94.
- Polat, N., Zengin, M. ve Gümüş, A. 2011. İstilacı balık türleri ve hayat stratejileri. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 1(4): 63-86.
- Reichard, S.H. and Hamilton, C.W. 1997. Predicting invasions of woody plants introduced into North America. *Conservation Biology*, 11,193-203 .
- Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhov, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D. M. and Gutiérrez, J. 2005. “Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go”, *General and Comparative Endocrinology*, 142, 20–24.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. 1977, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- Schaefer, J. and Ryan, A. 2006. “Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*”, *Journal of Fish Biology*, 69, 722–734.
- Slynko, E.E., Novitsky, R.A., Bangs, M.R., Douglas, M.R., Douglas, M.E., Khrystenko, D. S. and Slynko, Y.V. 2014. “Phylogeography and phenotypic diversity of the pumpkinseed sunfish *L. gibbosus* (Linnaeus, 1758) of the Northern Black Sea Coast”, *Russian Journal of Genetics*, 50, 1285-1293.
- Swofford, D. 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. “MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0”, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tarkan, A.S. 2013. Yabancı Tatlısu Balıklarının Dünyada ve Türkiye’de Giriş Yolları, Etkileri ve Bunlardan Korunma Yöntemleri. *Meriç ALBAY*, 28, 63-104.
- Tarkan, A.S., Ekmekçi, F.G., Vilizzi, L. and Copp, G.H. 2014. “Risk screening of non-native freshwater fishes at the frontier between Asia and Europe: first application in Turkey of the Fish Invasiveness Screening Kit (FISK)”, *Journal of Applied Ichthyology*, 30, 392-398.
- Tarkan, A.S., Marr, S.M. and Ekmekçi, F.G. 2015. “Non-native and translocated freshwater fish species in Turkey”, *FISHMED*, 2015.003: 1-28.
- Tarkan, A.S., Marr, S.M. and Ekmekçi, F.G. 2015. “Non-native and translocated freshwater fish species in Turkey”, *FISHMED*, 2015.003: 1-28.
- Thompson, J.D, Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. “CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.

- Top, N. 2011. Egzotik güneş balığı (*L. gibbosus*)'nın Sarıçay Deresi'nde biyo-ekolojik özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla.
- Top, N., Tarkan, A.S., Vilizzi, L. and Karakuş, U. 2016. Microhabitat interactions of non-native pumpkinseed *L. gibbosus* in a Mediterranean-type stream suggest no evidence for impact on endemic fishes. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 417, 36.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. and Hebert, P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 360(1462), 1847-1857.
- Wellband, K.W. and Heath, D.D. 2017. Plasticity in gene transcription explains the differential performance of two invasive fish species. Evolutionary Applications.
- Yao, B., Zhou, L., Wang, Y., Xia, W. and Gui, J.F. 2007. "Differential expression and dynamic changes of SOX3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish", Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 307, 207-219.
- Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, L., Zhu, T., Tian, J., Li, X. and Lin, H. 2004. "Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression", The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 92, 39-50.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğçe AYGEN

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Tarihi : 15.1990

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Mimar Sinan Lisesi (2009)

Lisans : Mustafa Kemal Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi
Mühendisliği (2013)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı
(Eylül 2015-Haziran 2017)

A. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

Ünal, E.M, Kaynar, S, **Aygen, T**, Keskin, E. 2016 Molecular diet analysis of *Mycteroperca rubra*. International Grouper Workshop. 07-08 October. Bodrum, Turkey.

Ünal E.M, Kaynar S, **Aygen T**, Keskin E. 2016. DNA Barcode Comparison Of Some Aquatic Plants For Detection Of Highest Species Level Resolution. 3rd Ecology and Evolutionary Biology Symposium. 30 Ağustos-1Eylül, Ankara (Poster).

Kaynar S, Ünal E.M, **Aygen T**, Keskin E. 2016. mtActinopterygii: Analyzing evolution of mitogenomes belonging to the most dominant class of vertebrates. 3rd Ecology and Evolutionary Biology Symposium. 30 Ağustos-1Eylül, Ankara (Poster).

Aygen T, Ünal E.M, Kaynar S, Genç E, Keskin E.2016. Using Biological Filters as a Source For Enviromental DNA in Recirculating Aquaculture Systems. International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences. 3-5 October, Antalya (Poster).

Kaynar S, Ünal E.M, **Aygen T**, Genç E, Keskin E. 2016. Species Detection Using Environmental DNA from Stool Samples. International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences. 3-5 October, Antalya (Poster).

Aygen T, Genç E, Genç MA, Keskin E. 2016. *Patella caerulea* Türünün Moleküler Bir Yöntem Olan DNA Barkodlama ile Tanımlanması. Türkiye Deniz Bilimleri Konferansı. 31 Mayıs-3 Haziran, Ankara (Poster).

B.Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

Aygen T, Genç E, Genç MA, Keskin E. 2016. *Patella caerulea* Türünün Moleküler Bir Yöntem Olan DNA Barkodlama ile Tanımlanması. Türkiye Deniz Bilimleri Konferansı. 31 Mayıs-3 Haziran, Ankara (Poster).

KATILDIĞI PROJELER

Türkiye İçin Mevcut ve Potansiyel Yabancı Tatlısu Balıklarına Yönelik Ulusal İzleme ve Erken Uyarı Sisteminin Oluşturulması: Hedef Türlerin Geleneksel ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tespiti, Risk Analizlerinin Yapılması ve Web Tabanlı Veri Tabanı Oluşturulması

Görevi: Araştırmacı Bursiyer
Destekleyen: COST 115Y181 (2016-2018)

Ödüller/Burslar

TÜBİTAK Bursiyeri: 115Y181 numaralı COST projesi kapsamında lisansüstü bursiyer (2016-2018)