

**ESKİŞEHİR-ALPU GEÇİCİ SULARINDA
BULUNAN *Triops cancriformis*'in
(BRANCHIOPODA: NOTOSTRACA) 18S rRNA
GENİ İLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

Sümevra Nur ŞANAL

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos, 2011

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1005F111**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sümevra Nur ŞANAL'ın "Eskişehir-Alpu Geçici Sularında Bulunan *Triops cancriformis*'in (Branchiopoda: Notostraca) 18S rRNA Geni ile Filogenetik Analizi" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 04.08.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. ALİ YAVUZ KILIÇ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. HAKAN ÇALIŞKAN
Üye	: Yrd. Doç. Dr. R. SULHİ ÖZKÜTÜK

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ESKİŞEHİR-ALPU GEÇİCİ SULARINDA BULUNAN *Triops cancriformis*'in (BRANCHIOPODA: NOTOSTRACA) 18S rRNA GENİ İLE FİLOGENETİK ANALİZİ

Sümevra Nur ŞANAL

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ
2011, 48 sayfa

Son yıllarda canlıların sınıflandırılmasında filogenetik çalışmalar öne çıkmıştır. Bu ilişkilerin ortaya konmasında belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler kabul edilerek evrimsel değişimler ölçülmeye çalışılmaktadır. Bu kronometreler arasında en yaygın olanı ribozomal RNA'lardır. Ökaryotlarda dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü üzerinde odaklanmıştır

Bu çalışmanın materyali *Triops cancriformis*'in literatürde 18S rRNA geniyle ilgili yapılmış fakat tamamlanmamış iki çalışması bulunmaktadır. Yapılan dizileme sonucunda bu çalışmada elde edilen genin 18S rRNA geni olduğu belirlenmiştir. Gen bankasında *T. cancriformis* 18S rRNA genine ait dizi bilgileri ile karşılaştırıldığında türün *T. cancriformis* türü olduğu; bir örneğe ait okunan 650 bazlık dizisinin % 81 oranında, diğer örneğe ait 480 bazlık dizinin ise % 78 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Buradaki farklılığın sebebi 18S rRNA genin uzunluğu 1800 bp olup bu çalışmada ise sadece belirli sayıdaki nükleotit diziliminin belirlenmesidir. Dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında 18S rRNA geninin yüksek oranda korunduğu görülmektedir. Elde edilen verilere göre oluşturulan filogenetik ağaçlar arasında da büyük benzerlik, dolayısıyla familya türleri arasındaki filogenetik akrabalık açıkça görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Triops cancriformis*, Biyoinformatik, 18S rRNA, Filogenetik Analiz

ABSTRACT**Master of Science Thesis****PHYLOGENETIC ANALYSIS WITH 18S GENE rRNA of *Triops cancriformis* (BRANCHIOPODA: NOTOSTRACA) IN TEMPORARY WATERS ESKİŞEHİR-ALPU****Sümeyra Nur ŞANAL****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Programme****Supervisor: Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ
2011, 48 pages**

The classification of living things came to the fore in recent years, phylogenetic studies. Specific genes and proteins in order to clarify this relationship by accepting the evolutionary changes in evolutionary chronometers tried to be measured. This is the most common of the ribosomal RNAs of chronometers. In eukaryotes, sequencing studies, functionally similar, but slightly more focused on the large 18S molecule.

Triops cancriformis material of this study in the literature were related to 18S ribosomal RNA gene, but the two studies are incomplete. The 18S rRNA gene sequencing of the gene was obtained as a result of this study was determined. Gene bank of *T. cancriformis* 18S rRNA gene sequence data and compared the species *T. cancriformis* that type, read a sample of the 650 series 81% of the alkalinity, the alkalinity in the other example of the 480 series were found to be similar to the 78%. The 18S rRNA gene, because the difference is the length of 1800 bp nucleotide sequence of this study is to determine only a certain number. 18S rRNA gene sequence analysis compared results are highly protected. According to the data generated from the strong similarity between the phylogenetic trees, phylogenetic kinship therefore be drawn between types of families.

Key words: *Triops cancriformis*, Bioinformatic, 18S rRNA, Phylogenetic Analysis

TEŞEKKÜR

Sekiz yıllık üniversite hayatım boyunca maddi manevi her zaman destek olan ve bu çalışma boyunca da bilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. A. Yavuz KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın projelendirmesinde yardımcı olan ve bilimsel katkılar sağlayan Arş. Gör. Cem ÖZİÇ'e teşekkür ederim.

Örneklerin yetiştirilmesindeki bilgilerinden dolayı Uzman Caner AYDINLI'ya teşekkür ederim.

Moleküler anlamdaki bilgilerini her zaman benimle paylaşan hocalarım Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU, Arş. Gör. Açelya KAPKAÇ ve Arş. Gör. Öge ARTAGAN'a ve yine bu alanda yardımlarını esirgemeyen Nurçin KÜÇÜKOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimi hazırlamamın her aşamasında yanımda olan ve hiç çekinmeden yardım eden arkadaşım Gizem ARIK'a çok teşekkür ederim.

Beni en iyi şartlarda yetiştirip bu günlere getiren canım AİLEM'e ise sonsuz teşekkürler...

Sümeysra Nur ŞANAL

Ağustos, 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sınıflandırma Bilimi ve Önemi	1
1.2. Filogenetik Sistematiği	2
1.3. 18S rRNA Genleri	3
1.4. <i>Triops cancriformis</i>	4
1.4.1. <i>Triops cancriformis</i> ' in Biyolojisi	5
1.5. <i>Triops cancriformis</i> ile ilgili Yapılmış Çalışmalar.....	7
1.6. Çalışmanın Amacı	9
2. MATERYAL ve YÖNTEM	10
2.1. Materyal	10
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	11
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	11
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	11
2.2. Yöntemler.....	12
2.2.1. Genomik DNA (gDNA) İzolasyon Yöntemi	12
2.2.2. DNA'ların Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini	13
2.2.3. <i>T. cancriformis</i> 18S Genine Ait Spesifik Primerlerin Tasarlanması.....	13
2.2.4. PZR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	15

2.2.5. Agaroz Jel Analizi ve Jel Görüntüleme İşlemi.....	16
2.2.6. PZR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması	16
2.2.7. DNA Dizi Analizi.....	17
2.2.7.1. Dizi analizi için PZR.....	17
2.2.7.2. Manyetik boncukla saflaştırma.....	18
2.2.7.3. Biyoinformatik analiz	19
3. BULGULAR	21
3.1. DNA İzolasyonu	21
3.2. PZR Analizi.....	22
3.3. Dizi Analizi	22
3.4. Filogenetik Ağaç	26
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİ	33
5. KAYNAKLAR	36
Ek-1 Hizalama Sonuçları.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Akvaryum içinde yetiştirilen <i>Triops cancriformis</i> 'in dorsalden görünüşü	10
2.2. 18S rRNA genine uygun primerin tasarlanması için yapılan hizalama	14
3.1. <i>Triops cancriformis</i> 'ten elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel ile görüntülenmesi.....	21
3.2. <i>Triops cancriformis</i> 'in genomik DNA'sı kullanılarak kurulan PZR sonucunun jel görüntüsü.....	22
3.3. <i>Triops cancriformis</i> 3 18S rRNA genine ait pikler.....	23
3.4. <i>Triops cancriformis</i> 4 18S rRNA genine ait pikler.....	25
3.5. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 1 numaralı ağaç	27
3.6. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 2 numaralı ağaç	27
3.7. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 3 numaralı ağaç	27
3.8. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 4 numaralı ağaç	28
3.9. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 5 numaralı ağaç	28
3.10. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 6 numaralı ağaç	28
3.11. Bootstrap analizi	29
3.12. Maksimum olasılık sonucu oluşan filogenetik ağaç	30
3.13. Minimum evrim sonucu oluşan filogenetik ağaç.....	30
3.14. UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) sonucu oluşan filogenetik ağaç.....	31
3.15. Maksimum parsimoni sonucu oluşan filogenetik ağaç	31
3.16. NJ (neighbor joining) sonucu oluşan filogenetik ağaç.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. PZR’de kullanılan bileşenler ve miktarları.....	16
2.2. PZR döngüsü için değerler	16
2.3. PZR’de kullanılan bileşenler ve miktarları.....	18
2.4. Dizi analizi için PZR bileşenleri ve miktarları	18
2.5. Stop solüsyonu bileşenleri ve miktarları	18
3.1. <i>Triops cancriformis</i> 3’ün 18S rRNA geninin olası baz dizisi	23
3.2. NCBI’ a göre renk anahtarı	24
3.3. <i>Triops cancriformis</i> 3’ün NCBI veri tabanındaki türlere benzerliği.....	24
3.4. <i>Triops cancriformis</i> 4’ün 18S rRNA geninin olası baz dizisi	25
3.5. NCBI’ a göre renk anahtarı	25
3.6. <i>Triops cancriformis</i> 4’ün NCBI veri tabanındaki türlere benzerliği.....	26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

rRNA	: Ribozomal ribonükleikasit
ATP	: Adenozin trifosfat
S	: Svedberg'i simgeler ve bir partikülün santrifüj edildiğinde çökmesini esas alan bir kütle ölçüsüdür.
SSU	: Küçük alt birim
RDP	: Ribozomal Veri Tabanı Projesi
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
EMBL	: Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
ICZN	: Hayvan İsimlendirme Uluslararası Komisyonu
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
nm	: Nanometre
OD	: Optik dansite
bç	: Baz çifti
T _m	: Bağlanma sıcaklığı
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
kb	: Kilobayt

1. GİRİŞ

1.1. Sınıflandırma Bilimi ve Önemi

Yeryüzünde yaklaşık 31.000 protist, 1,5 milyon hayvan, 800.000 kadar bilinen bitki türü vardır. Bunun yanında henüz sınıflandırılmamış canlı türlerinin sayısının 3-10 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Bunların dışında çok sayıda yok olmuş türün bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca her bir türün sayısız formları (cinsiyet, yaş, mevsimsel formlar, özel formlar v.b) bulunmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında, eğer sınıflandırma yapılmamış olsaydı bu kadar çok değişiklikle uğraşmak mümkün olmayacaktı. Sistematik zooloji (zootaksonomi) çok zengin olan hayvanları bir düzen içinde sınıflandırmaya ve bunu başarabilmek için de yöntem ve kurallar geliştirmeye çalışmaktadır.

Sistematik'in en büyük uğraşlarından birisi her türün ve daha yüksek taksonların kendine has özelliklerinin ne olduğunu karşılaştırma yaparak tespit etmektir. Diğer bir uğraşısı, bazı taksonların ortak özelliklerinin ne olduğu ve bu ortak özelliklerin ya da farklılıkların ne gibi biyolojik etkenlerden kaynaklandığını tespit etmektir. Bir diğer uğraşısı ise taksonların içersindeki varyasyonlardır. Sistematik'in bu ilgi alanları biyoloji bilim kolları içinde ona eşsiz ve vazgeçilmez bir konum sağlamaktadır. Organik farklılıkları sınıflandırması sistematik'in diğer biyoloji bilim kolları içine kolayca girmesine fırsat vermektedir. Sistematik biyoloji olmadan biyolojinin diğer kolları kendi bulgularının anlamını kolayca açıklayamazlar.

Sistematik, biyolojinin diğer kollarına ve genel anlamda insanlığa büyük katkısı olan bir bilim koludur. Doğal sistemde uygun şekilde dağılmış birkaç türün iyi analizi, yeni enzimlerin, hormonların dağılışları ya da metabolik yolları hakkında bize çok önemli bilgiler verebilir. Birçok hayvan laboratuarda yetiştirilemez. Bazıları kültürlerde çoğaltılamaz. Bu nedenle sağlam bir sınıflandırma sistemi, genetik olarak iyi bilinen tiplerden çok çeşitli sonuçlar çıkartmamıza fırsat verir. Son yıllarda taksonomistlerle immünoloji, karşılaştırmalı biyokimya, karşılaştırmalı fizyoloji ve hayvan davranışları

üzerinde çalışan araştışıcılar arasında gittikçe artan bir iř birliği ortaya çıkmaktadır.

Zoolojik sınıflandırmada hayvanlar benzerlik ve akrabalık ilişkilerine dayanarak gruplar halinde sınıflandırılır. Fakat buradaki benzerlik ve akrabalık kavramları yüzyıllar boyunca büyük tartişmalara neden olmuştur. Bu tartişmalar sonucunda ortaya beş farklı sınıflandırma teorisi çıkmıştır. Bunlardan “Esasçılık (essentializm)”, bu teoriye göre bir taksona ait bütün bireylerin aynı tipi yansıttıkları ya da o tipe uydukları ifade edilmektedir. “İsimcilik (nominalizm)”, cins ve türlerin, genel kavramların ne aslında ne de zihinde hiçbir varlığının olmadığını ve bunların birer addan ibaret olduğunu savunan görüştür. “Amprizm (empirizm)”, canlıları dış görünüşleri ve yaşadıkları ortama bakarak sınıflandırmaktır. Bu tür sınıflandırma günümüzde geçerliliğini kaybetmiştir.

“Filogenetik sistematik (cladizm)”, Evrimsel sınıflandırma ise kladistik ve fenetik sınıflandırma ilkelerini kullanan görüştür. İlk kez Willi Henning tarafından tanımlanan filogenetik sistematik; filogeni ilişkisini kullanarak doğal taksonları saptamak ve yine filogeni ilişkisi ile bunları ilişkilendirerek doğal bir sınıflandırma oluşturmaktadır. Doğal taksonlar ise evrim sürecinde kendiliğinden oluşan taksonlardır yani; taksonomist farkına varıp onu isimlendirip sınıflandırsa da, farkına varmasa da o takson doğada vardır. En önemlisi doğal taksonlar türleşme süreçleri ile oluştuklarından ortak ata ilişkilerine sahiptirler [1].

1.2. Filogenetik Sistematik

Filogenetik sistematikte ilişkiler soy ağacını yani taksonları oluşurmada tek atadan gelme ölçüsünün kullanılması temeline dayanır. Filogenide milyonlarca nesil dikkate alındığında mutasyonlar, seleksiyonlar ve yeni birleşmeler nedeniyle sayısız gende değişmeler meydana gelir ve sonuçta yakın akrabalar arasında çok belirgin farklar oluşur. Bu durumun aksine uzun yıllar boyunca genotipinde herhangi bir değişiklik meydana gelmeyen ya da gelse bile fenotipinde bir değişiklik göstermeyen canlı gruplarının varlığından da söz edilebilir [1].

1.3. 18S rRNA Genleri

Belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler olup, evrimsel değişimi ölçerler. Diğer bir değişle işlevsel olarak benzer (homolog) makro moleküllerin nükleotid ve aminoasit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıkların sonucudur. Moleküler dizileme ve evrimsel uzaklıkların ölçülmesi amacıyla yapılacak dizileme çalışmalarında doğru moleküllerin seçilmesi şarttır. Kusursuz bir moleküler kronometreyi tanımlayan bazı kriterler vardır. Bunlardan ilki, moleküler kronometre, çalışmak için seçilen grup içerisinde evrensel olarak yaygın olmalıdır. Bu tüm organizmaların karşılaştırılmasına yardım eder. İkinci olarak, molekül her organizma için işlevsel olarak homolog olmalıdır zira işlevselliği farklı olan moleküllerin dizi benzerliği göstermesi beklenmez. Üçüncü olarak, analizler için dizileri sıralamak amacıyla molekülün korunmuş dizi bölgeleri içermesi çok önemlidir. Son olarak seçilen molekül dizisinin organizmadaki evrimsel değişimi bir bütün olarak yansıtmalıdır. Aslında ölçülecek filogenetik uzaklık artıka, dizilerdeki değişim oranının yavaşlaması gerekir ki, çok uzun bir zaman sürecinde meydana gelen değişimler bize evrimsel sinyalleri işaret eder. Pek çok gen ve proteinin moleküler kronometreler olduğu ileri sürülmektedir. Ancak bunlar arasından ribozomal RNA'ları kodlayan genler, translasyonel sistemdeki temel bileşenler, ATPaz proteinleri, ATP sentezleyen veya hidrolizini yapan enzim kompleksleri, genetik rekombinasyona yardımcı olan RecA enzimi ve belirli translasyonel proteinler canlılar hakkında en çok kabul edilebilir filogenetik bilgiyi edinmemizi sağlamışlardır. Çünkü Bu moleküllerin hepsi, ilkel hücrelerde bile gereklidir ve bu sebeple onların gen dizilerindeki varyasyonlar, evrimsel geçmişlerini daha derinlemesine incelememize olanak sağlar. Bu kronometreler arasında en yaygın olanı ribozomal RNA'lardır. Ribozomal RNA'lar, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküler olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda büyüklükleri 5S, 16S ve 23S ('S' Svedberg'i simgeler ve bir partikülün santrifüj edildiğinde çökmesini esas alan bir kütle ölçüsüdür) olan üç çeşit ribozomal RNA molekülü vardır. Ökaryotlarda ise dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü

üzerinde odaklanmıştır. 16S ve 18S rRNA'ları ribozomun küçük alt biriminin (30S veya 40S) bir parçası olduklarından, SSU (küçük alt birim) dizilemesi kısaltması, 16S veya 18S dizilemesi ile eş anlama gelmektedir. rRNA dizilerine ait çok geniş bir veri tabanı mevcuttur. Örneğin Ribozomal Veri Tabanı Projesi (RDP) şu an sayısı 100.000'i aşan bu tür dizilere ait büyük bir koleksiyonuna sahiptir. SSU rRNA'ların filogenetik bir araç olarak kullanıma, 1970'lerde Illinois Üniversitesi'nden Carl Woese öncülük etmiştir ve bu yöntem günümüzde tüm biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu başarısından dolayı 2003 yılında İsveç Kraliyet Bilim Akademisi tarafından, biyolojide bilimsel başarının en yüksek ölçütü olarak görülen Crafoord ödülüne layık görülmüştür. Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu şu an oldukça rutin hale gelmiştir. Yeni bulunan diziler, NCBI, EMBL, DDBJ gibi genetik veri tabanlarındaki mevcut diziler ile karşılaştırılabilir. Daha sonra ağaç oluşturan bir algoritma kullanılarak dizilerin tabiatında olan evrimsel bilgiyi en iyi şekilde ifade eden filogenetik bir ağaç çizilebilir [2].

1.4. *Triops cancriformis* (Bosc, 1801)

Triops cinsi, Arthropoda şubesinin, Crustacea altşubesi, Branchiopoda sınıfı, Phyllopoda takımı, Notostraca alttakımı Triopsidae familyası içinde yer alır (NCBI, Taxonomy Browser). *Triops* cinsine ait 7 tür bulunmaktadır. Bu çalışmada materyal olarak kullanılan *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) yaşayan fosil olarak anılmaktadır. 300 milyon yıldır fazla bir değişiklik göstermeden bugünlere gelebilmiş bir canlıdır. Halen yaşayan canlılar arasında kökeni en eski olanlardandır. Bosc tarafından (1801) *Apus cancriformis* adı altında tanımlanan *Triops cancriformis* ilk kez resmi olarak Longhurst tarafından (1955) bu adıyla tanımlanmıştır. *Triops* cins adı, bavaria faunası üzerindeki çalışmasında ilk kez Schrank (1803) tarafından kullanılmıştır. Schrank, Schäffer'in 1750'li yıllarda topladığı örnekler Regensburg (Almanya) yakınındaki aynı lokaliteden topladığı örnekleri 'dreyauge' olarak tanımlamıştır. (İngilizcesi: üç gözlü, latincesi: *Triops*). Almanya tatlısu faunasını tanımlama anahtarı olarak *Triops*'ın kullanılması

Schrank tarafından teklif edilmiştir. Keilhack (1909) bütün mevcut Notostraklar için familya adı olarak Triopsidae'yi kullanmıştır. Ayrıca Keilhack doğru isim olarak *Triops cancriformis* ve *Lepidurus apus* u kullanmıştır. The International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) 1958 yılında *Apus* ve *Triops* isimlerinin kökenini ve kullanımı kurallara uygun olarak düzenlemiştir. ICZN cins ismi olarak *Apus*'u reddetmiş ve *Triops*'u Schrank (1803) kabul etmiştir (ICZN isim no. 1246). *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) adını tanımlamışlardır (ICZN isim no. 1476). Son olarakta ICZN *Triopsidae* Keilhack (1909) adını tanımlamış ve resmi olarak familya adı da belirlenmiştir [4].

1.4.1. *Triops cancriformis*' in Biyolojisi

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan *Triops cancriformis* (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca: Triopsidae) yaşayan fosil olarak anılmaktadır. 300 milyon yıldır fazla bir değişiklik göstermeden bugünlere gelebilmiş bir canlıdır. Halen yaşayan canlılar arasında kökeni en eski olanlardandır.

Morfolojik olarak vücut bir baş ve çoğunlukla geniş dorsal bir karapaksla kaplı bir gövdeden oluşur. Baş geniş ve basık, karapaks hafif kubbelidir. Başın ağız bölgesinde dudakla çevrili; antenül, anten, maxil ve mandibul içeren üyeler bulunur ve besin yakalamada kullanılır. Karapaksın anterior dorsal kısmında tek bir optik düzenleme vardır. Vücudun karapaks dışında kalan arka kısmı uzun iki furka ile sonlanır. Furkalarla birlikte bütün vücut uzunluğu dişi hayvanda 7,5 cm kadardır. Gövde toraks uzantıları taşır ancak abdomende bu yapılar bulunmaz. Göğsün 13. segmente kadar olan kısmında her segment bir çift üye içerir. Bundan sonra 28. segmente kadar her segmentte 2-5 çift üye bulunur. Birinci göğüs üyelerine ait enditler çok eklemlili, ince ve çok uzundur. Eşeyssel delikler 11. göğüs segmentindedir. 11. üye dişilerde ovisaklar şeklini almıştır. Ovisaklarda yumurtalar eşit sayıda tutulur. Yumurtaların hepsi ovisaklardan serbest bırakılmasına rağmen yumurtaların vücuttan çıkması rastgeledir, kümeler halinde değildir. *Triops cancriformis*' in üreme yetenekleri yüksektir, bireyler 1000' den fazla yumurta üretirler. Abdomenin proksimal kısmında ince saç benzeri 65 çift üye bulunur ve bunlar ritmik şekilde vuruşlarla harekete ve besin alımına yardım

eder. Abdomenin distal kısmı çıkık ve göze çarpan bir telson ve sonradan ikiye dallanan kuyruk furkasıyla biter.

T. cancriformis'in habitatu geçici sular, yağmur suları ile oluşan su birlikleri, havuzlar, gölcük gibi bir dönem sulu bir dönemde kurak fazın görüldüğü yerlerdir. *T. cancriformis*'in Avrasya ve Afrika'daki piriç tarlalarında ve ayrıca Avrupa'da da dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Triopslar ventral yüzeylerinden beslenirler. Dip sedimentlerini kazarlar, detritus ve çeşitli küçük organizmaları ararlar. Beslenmeleri habitatlarına bağlıdır. İsteğe bağlı detritus tüketicisi, leş yiyen ya da predatörlerdir. Triopslar alg, bakteri, protozoa, rotifera, böcek, yer solucanı, kurbağa yumurtası yerler. Triopslar popülasyon yoğunluklarının geniş değişimleriyle karakterizedir. Yeterli besini bulduklarında, yoğunlukları oldukça yükselir ve besin aramak için yeterli seviyede aktif olurlar. Besin eksikliği gelişimde ve yumurtlamada olumsuz etki yaparken, kannibalistik davranış sonucunda mortalitenin yükselmesine sebep olur [5, 6].

Triops'un yaşam döngüsü oldukça kısadır. Başlıca ana habitatları geçici sulardır. Bu suların sıcaklık değişimleri de yaşam döngülerini etkilemektedir. Yaşam döngüleri sırasında iki tip yumurta bırakırlar. Bunlardan birincisi ortamda erkeklerin bulunmadığı zamanlarda oluşturulan ve partenogenetik olarak gelişen yumurtalardır (yaz yumurtaları). Bunlar ince çeperli, şeffaf ve çok hızlı gelişebilen yumurtalardır. İkinci tip yumurtalar ise yaşama şartları kötüleştiğinde ve erkeklerin ortamda bulunduğu zamanlarda oluşturulan ve döllenmeye ihtiyaç duyan yumurtalardır (kış yumurtaları). Bunların etrafı kitin bir tabaka ile çevrilerek ephippium olarak ortama bırakılırlar. Bu yumurtalar kahverengi ve kalın çeperli, soğuk, sıcaklık ve kuraklık gibi ekstrem durumlara dayanıklı yumurtalardır. Bu kalın çeper yumurtayı fiziksel darbelere ve güneş ışınlarına karşı korur. Ephippiumlar suların kurumaya başladığı yaz aylarında özel bir önem taşımaktadırlar. Çünkü bunlar sıcak günlerde sular tamamen kuruduktan sonrada canlılıklarını sürdürmektedirler. Daha sonra yağışlı mevsimlerde tekrar yavru birey meydana getirmektedirler. Kış yumurtaları, yaz boyunca sıcaklıkla, kış boyunca da soğuk ve donla karşılaşmaktadır. Yapılan araştırmalar bu durumların yumurtaların gelişebilmeleri için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu yumurtalar canlılıklarını kuru dönemde 15 yıl kadar koruyabilmektedir. Yaz ve

sonbahar mevsimlerinde oldukça fazla *Triops* yumurtası (kuru dönem) bulunmaktadır. Kış ve sonbahar boyunca, daha fazla yağmur suyu yağdığından su birikintileri ve geçici su birlikleri oluşmaya başlar. Bu suların meydana gelmesiyle birlikte kuru dönem yumurtaları yumurtadan çıkmaya başlar. Yumurtalar yumurtadan çıktıktan sonra omurgasız hayvanlarla beslenmeye başlar. Metanauplius tam olarak ilk larval dönemdir ve bu dönemde Triopsların rengi turuncudur. Triopsların ilk dönem boyunca 6 tane bacağı ve 1 tane gözü vardır. Sonraki büyüme dönemlerinde de gelişmeler devam eder. Bu dönemlere instar da denir. Her bir instar sonunda, dışkabuklar dökülür. *Triops*'un büyümesiyle uzantıları ve segmentleri artmaya başlar. Renginde de değişimler olur ve turuncu olan renk grimsi-kahverengiye dönüşür. Triopslar 8 günde olgunluğa erişirler ve bu zamanda yumurta üretmeye hazırlardır. Su birikintilerinin kurumasıyla birçok olgun *Triops* ölmeye başlar [5].

1.5. *Triops cancriformis* ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Literatürde *Triops cancriformis* ve diğer *Triops* türleri ile yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır [3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Yapılan bu çalışmaların büyük çoğunluğu morfolojisine ve biyolojik mücadelede kullanılması temeline dayanır. Yani moleküler düzeyde yapılan çalışmalar oldukça azdır [17, 18, 19, 20].

Özkütük (1997) Alpu (Eskişehir) çevresinde oluşan geçici sular omurgasız faunası üzerine ön çalışmalar yapmış ve *Triops cancriformis* kaydı vermiştir [3].

2003 yılında Møller ve arkadaşları elektron mikroskobu yardımıyla *Triops cancriformis*'in erken larval gelişim üzerine bir çalışma yapmışlar ve erken larval dönemin beş ayrı bölümden meydana geldiğini bulmuşlardır [4].

Golzari ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada Batı Azerbaycan'daki geçici su birliklerinde yaşayan *Triops cancriformis*'in bazı biyolojik özellikleri belirlenmiştir [6].

Hughes'in (1997) yaptığı çalışmada Britanya'daki *Triops cancriformis*'in üremeleri kontrol altına alınmıştır [7].

Zierold ve arkadaşları (2009) *Triops cancriformis*'in cinsiyet oranı, üreme modu ve genetik çeşitliliği üzerine bir araştırma yapmışlardır [8].

Su ve Mulla (2005) *Triops newberryi*'nin üreme ve gelişimi üzerine mikrobiyal sinek larvasitlerinin ve larvasidal yağının etkisi ve toksisitesini araştırmışlardır [9].

Hamasaki ve Ohbayashi (2000) Suyun pH'sının *Triops longicaudatus* larvalarının hayatta kalma oranlarına etkisine bakmışlar ve asidik topraklarda larvalarının hayatta kalamadığını ama asidikliğin azalmasıyla hayatta kalma oranlarının yükseldiğini hatta bazı bireylerin yumurtlama dönemine girdiklerini, larvaların hayatta kalması için uygun ve uygun olmayan pH aralığını 5.7 ve 5.9 olarak belirlemişlerdir [10].

Boix ve arkadaşları (2002) Espolla geçici sularındaki *Triops cancriformis*'in populasyon dinamiği belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda diğer Notostraca populasyonlarına göre çalışılan populasyonun karakteristiği maksimum yoğunluğun düşük değerlere sahip olması ve kışa göre ilkbahar ve yaz aylarına yoğunluğun yüksek olmasıdır [11].

Machado ve arkadaşları (1999) *T. cancriformis*' in bir alt türü olan *Triops cancriformis mauritanicus*'u Portekiz geçici sularında bulduğunun kaydını vermişlerdir [12].

Takahashi (1977) yaşamın öncüsü olan hayvanlardan *Triops spp.*'nin yumurtadan çıkma, büyüme, olgunlaşma ve kısa yaşam döngülerini araştıran bir çalışma yapmıştır [13].

Scanabissi ve arkadaşları (2005) Avusturya populasyonlarındaki *Triops cancriformis*'in erkek oluşumu ve erkek gonadlarının ultra yapısını incelemişler ve morfolojik verileri erkeklerin işlevlerini tam olarak desteklemiştir [14].

Guadagnoli ve arkadaşları (2005) *Triops longicaudatus*'un çevresel O₂ azlığında hemoglobin alt üniteleri kompozisyonlarına etkilerini araştırmışlar anlamlı azalma olduğu tersinir değildir [15].

Riley ve arkadaşı (1998) *Triops longicaudatus*'un yumurta sarısı sentezini invitro koşullarda ³H-lösin molekülü ile ölçmüş ve bu molekölün doğrudan etkisi olduğunu belirlemişlerdir [16].

Mantovani ve arkadaşları (2008) yaşayan fosil *T. cancriformis*'in mitokondriyal ve nükleer DNA değişkenliği üzerine bir çalışma yapmışlar ve bunun sonucunda her iki DNA çeşidinden farklı durumların ortaya konulduğunu görmüşlerdir [17].

Richter ve arkadaşları (2006) Branchiopodların morfolojik bilgi ve moleküler lokulusları yardımı ile filogenetik analizlerini yapmışlardır [18].

Mantovani ve arkadaşları (2003) yaşayan fosil *Triops* ve *Lepidurus*'un moleküler taksonomisi ve filogenesi üzerine araştırma yapmışlar ve *Lepidurus*'un monofiletik *Triops*'un ise polifiletik takson olduklarını bulmuşlardır [19].

Umetsu ve arkadaşları (2002) *Triops cancriformis*'in müze örnekleri üzerinde bir çalışma yapmışlar ve mitokondriyal DNA dizisinin tamamını analiz etmişlerdir [20].

1.6. Çalışmanın Amacı

Triops cancriformis'in Avrupa ve Amerika'da bulunan popülasyonları üzerinde filogenetik çalışmalar bulunmasına karşılık, Türkiye'de bu konuda bir çalışma bulunmamaktadır. Geçici sulak alanlarda yayılış göstermesi nedeniyle yayılışı ülke içinde sınırlı olan bu türün Eskişehir çevresinde Alpu ilçesi geçici sulak alanlarında ilkbahar aylarında ortaya çıktığı bilinmektedir. Ribozomal RNA'ların oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içermeleri nedeniyle en yaygın evrimsel kronometreler olmaları, *Triops cancriformis*'in özellikle Japonya'da biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaktadır [21]. Bu yüzden *T. cancriformis*' in biyolojik mücadele ajanı olarak yararlanılması ve zararlı mücadelesi konularında kullanılması nedeniyle Türün filogenetik analizinin yapılması ile gen bankasına ve literatüre katkı sağlanmasının yanında, yayılış alanı çok uzak olan popülasyonlarla karşılaştırma fırsatı da verecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Triops cancriformis*'e ait yumurtaların bulunduğu toprak örneği Eskişehir-Alpu bölgesinde bulunan geçici sulak alanlardan alınmıştır. Bu amaçla anılan alana 16.10.2010 ve 28.04.2011 tarihlerinde olmak üzere iki kez toprak örnekleri almak üzere gidilmiştir. Laboratuvarında hazırlanan 4 adet akvaryum içine getirilen topraklar serilerek üzerine iki gün süresince dinlendirilmiş musluk suyu eklenmiş, havalandırma sistemi kurularak yumurtaların açılması için gerekli ortam sağlanmıştır. 5-6 gün sonra ortaya çıkan *Triops cancriformis* ergin örnekleri mikroskopik olarak incelenmiş ve morfolojik özellikleri belirlenerek kesin tanıları yapılmıştır [3]. Akvaryum içinde yetiştirilen *Triops cancriformis*'in dorsal görünüşü şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Akvaryum içinde yetiştirilen *Triops cancriformis*' in dorsalden görünüşü.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

1. Etidyum bromür: 10 mg/ml stok solüsyonu hazırlandı (SİGMA Katalog no: E 8751).
2. Tris: MERCK Katalog no: 1.08387
3. Tris HCL: SİGMA Katalog no:05432
4. EDTA: FLUKA Katalog no: 03620
5. İzopropanol: Riedel de haen Katalog no: 24137
6. Etanol (Riedel de haen Katalog no:071029):
7. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol: SİGMA
8. 10X TAE: 108 gr trizma base (Sigma katalog no: 114K5415) ve asetik asit (Fluka) 600 ml H₂O da iyice çözülür. Daha sonra üzerine 40 ml 0.5M EDTA (FLUKA Katalog no: 03620) eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Etüv Genhart, Thermo Shaker THO 220
2. Santrifüj Thermo IC, Beckman Coulter Microfuge 22R ve Beckman Coulter Avanti J30I,
3. PZR Cihazı Biorad, iCycler thermal
4. Agaroz Jel Elektroforez Aparatı Thermo EC25090
5. UV Jel Görüntüleme Kabini Uvitec M02 4611
6. pH Metre Orion
7. Vorteks IKA MS2
8. Su banyosu Memmert D-91126
9. Nanodrop Metek ND-100
10. Spektrofotometre UV-2101 PC Shimadzu
11. Terazı Ohaus pro AV812

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

GE Healthcare İllustra GFX PCR DNA and gel band purification kit
 GE Healthcare İllustra tissue and cell genomic prepminispin kit

2.2. Yöntemler

2.2.1. Genomik DNA (gDNA) İzolasyon Yöntemi:

Genomik DNA izolasyonu, GE Healthcare İllustra tissue and cell genomic prepminispin kit protokolüne uygun olarak aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır;

1- Örneğin homojenize edilmesi

- Steril bisturi ile örnek küçük küçük parçalara ayrılmıştır. Bu parçaların miktarının 5-50 mg arasında olması gerekmektedir.
- Mikrosantrifüj içine konulan parçalanmış örneğin üzerine 1 ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) konulmuştur.
- Örnekler 1-2 dakika 16.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Örneğe zarar vermeden süpernatant kısmı tüpten uzaklaştırılmıştır.
- Örnek üzerine 50 µl PBS eklenmiş ve tamamen homojenizasyon sağlanmıştır.

2- Lizis

- Tüp içinde bulunan örneğe 50 µl lizis buffer type1'den eklenmiştir.
- Proteinaz K dan 10 µl eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir.
- Örnekler 56 °C' ye ısıtılan su banyosunda 1 saat bekletilmiştir.
- Su banyosundan alınan örnekler 2.000 g'de 10 saniye santrifüj edilmiştir.

3- RNA giderme

- RNA solüsyonundan (20 mg/ml) 5 µl eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.

4- Saflaştırma

- 500 µl lizis buffer type 4'den tüplere eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir.
- 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Kitin içinde bulunan collection tüplerin içine kolonlar yerleştirilmiş ve örnekler bu tüplere aktarılmıştır.
- 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edilmiş ve collection tüplerde biriken süpernatant dökülmüştür.

5- Yıkama

- 500 µl lizis buffer 4'den eklenmiştir.
- 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür.
- 500 µl wash buffer type 6'dan eklenmiştir.
- 3 dakika 11.000 g'de santrifüj edilmiş ve collection tüp atılmıştır.

6- Elüsyon

- Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Önceden 70 °C'ye ısıtılan elüsyon buffer type 5'den 200µl eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edilmiş ve saflaştırılmış genomik DNA tüpün dipinde toplanmıştır.
- % 0.8'lik agaroz jel ile analiz edilmiştir.

2.2.2. DNA'ların Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini

DNA örneklerinin spektrofotometre'de 260 ve 280 nm (nanometre) dalga boylarında ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerde DNA peletleri hangi tampon ile çözülmüş ise o tampon kör olarak kullanılmıştır. Spektrofotometrede okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak DNA miktarı saptanmıştır.

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD}_{260} \times \text{Dilüsyon katsayısı} \times 50 \text{ µl/ml}$$

2.2.3. *T. cancriformis* 18S Genine Ait Spesifik Primerlerin Tasarlanması

18S rRNA geni kullanılarak filogenetik analiz yapabilmek için bu gene ait spesifik primerler tasarlanmıştır. Primerler 18S genine ait dizi bilgisinden yola çıkılarak hazırlanmıştır. Bazı türlerin 18S rRNA genlerine ait dizi bilgileri NCBI veritabanından çekilmiştir. ClustalW (1.83) programı ile hizalanmış (Şekil 2.3.). Hizalama sonucunda genlere ait korunmuş bölgeler belirlenmiştir. Bu korunmuş bölgeler kullanılarak *Triops cancriformis* için PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere yarı bozuk primerler tasarlanmıştır. Kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olan kısımları ortalama olarak 20–30 bp arasında olan dış primerler tasarlanmıştır.

Primerlerin Tm değerleri $[2(A+T)+4(G+C)]-5$ denkleminde göre hesaplanmıştır. Dış primerler için Tm değeri 67 °C olarak optimize edilmiştir. Dış primerler ATG başlangıç ve TGA dur kodonlarına karşılık gelen dizileri de içermektedirler. İlgili primerlere ait dizi bilgisi aşağıdaki gibidir.

Gen Spesifik İleri Primer:

18S rRNA-F

5'CATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCC 3'

Tm: 50Mm Na⁺ da 60 °C

Gen Spesifik Geri Primer:

18S rRNA-R

5'GGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCT 3'

Tm: 50Mm Na⁺ da 62 °C

```
CGGCCTCGCCCCGGTCC-CITTTGGTGACTCTAGATAAACCTCGGGCCGAT
-----TTTGGTGACTCTAGATAAACCTCGGGCCGAT
-----TTTGGTGACTCTAGATAAACCTCGGGCCGAT
CG--CCCGGCCCGGGTCC-CITTTGGTGACTCTAGATAAACCTCGGGCCGAT
CGGGGCCGGCGCCGGTAAACCTTGGTGACTCTGGATAAACCTCAGGCCAAT
CGGGGCCGGCGCCGGTAAACCTTGGTGACTCTGGATAAACCTCAGGCCGAT
***** **
```

```
CGCGCGCCCTCCGCGGCGCGACGATTCTTTCGAATGCTGCCCTATCAA
CGCGCGCCCTCCGCGGCGCGACGATTCTTTCGAATGCTGCCCTATCAA
CGCGCGCCCTCCGCGGCGCGACGATTCTTTCGAATGCTGCCCTATCAA
CGCGCGCCCTCCGCGGCGCGACGCTTCATTCGAATGCTGCCCTATCAA
CGCGCGCCCTCC-CGGCGGCACAATTCTTTCAATGCTGCCCTATCAA
CGCGCGCCCTCC-CGGCGGCGACGATTCTTTCGAATGCTGCCCTATCAA
***** **
```

```
CTTTCGATGGTACTTTAGGCGCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGA
CTTTCGATGGTACTTTAGGCGCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGA
CTTTCGATGGTACTTTAGGCGCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGA
CTTTCGATGGTACTTTAGGCGCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGA
CTTTCAATGGTACTCTAGGCGCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGAA
CTTTCGATGGTACTTTAGGCGCCTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGA
***** **
```

```
ATCAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
ATCAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
ATCAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
ATCAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
ATCAGGGTTCAATTCGGAAAGGGAGCCTGAAAAACGGCTACCACATCCA
ATCAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
**
```



```

AAGCGCGGGTCA TAAGCTCGCGTTGATT AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
AAGCGCGGGTCA TAAGCTCGCGTTGATT AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
AAGCGCGGGTCA TAAGCTCGCGTTGATT AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
AAGCGCGGGTCA TAAGCTCGCGTTGATT AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
AAGCGCGGGTCA TAAGCTCGCGTTGATT AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
AAGCGCGGGTCA TAAGCTCGCGTTGATT AAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
*****

CCGCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGTCCTCGGATCGG
CCGCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGTCCTCGGATCGG
CCGCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGTCCTCGGATCGG
CCGCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGTCCT-GGACCGG
CCGCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGG
CCGCCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGG
*****

CCCCGCCGGGGCTCCTCGC-GGGCCCTGGCGGAGCGCCGAGAAGACGATC
CCCCGCCGGGGCTCCTCGC-GGGCCCTGGCGGAGCGCCGAGAAGACGATC
CCCCGCCGGGGCTCCTCGC-GGGCCCTGGCGGAGCGCCGAGAAGACGATC
CCCCGCCGGGGCTCTTCAACGGGCCCTGGCGGAGCGCTGGGAAGACGATC
CCCCGCCGGAGCTCCTCGC-GGGCCCTGGCGGAGCGCTGAGAAGACGGTC
CCCCGCCGGAGCTCCTCGC-GGGCCCTGGCGGAGCGCTGAGAAGACGGTC
*****

AAACTTGATCATCTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAG-
AAACTTGATCATCTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG
AAACTTGATCATCTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG
GAACTTGAATATCTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG
AAACTTGAATATCGGGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG
AAACTTGAATATCGGGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGG
*****

```

Şekil 2.2. 18S rRNA genine uygun primerin tasarlanması için yapılan hizalama

2.2.4. PZR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR toplam reaksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde aşağıdaki bileşenler bir PZR tüpüne konulmuştur. Reaksiyonda 18S rRNA-F (forward) 5‘CATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCC3’ ve 18S rRNA-R (reverse) 5’GGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCT3’ primerleri kullanılmıştır. Karışıma en son enzim eklenmiş ve PZR’ de kullanılacak malzemeler çalışma sırasında buz üzerinde muhafaza edilmiştir. PZR reaksiyonu aşağıdaki gibi düzenlenmiştir:

Çizelge 2.1. PZR’de kullanılan bileşenler ve miktarları

BİLEŞENLER	MİKTARLAR
dNTP	0.5µL
10X Tampon	2.5µL
MgCl ₂	2.5µL
Primer Forward	2.5µL
Primer Reverse	2.5µL
Kalıp DNA	1.0µL
Taq DNA Polimeraz	0.25µL
Steril distile su	13.25µL

PZR tüpüne konan bileşenlerin iyice karışması için çok kısa bir süre (1-2 saniye) santrifüjleme işleme yapılmıştır. Tüpler PZR cihazına yerleştirilmiş ve PZR döngüsü için değerler çizelgedeki gibidir ve döngü sayısı 30 olarak girilmiştir.

Çizelge 2.2. PZR döngüsü için değerler

Başlangıç Denatürasyon Basamağı	Denatürasyon Basamağı	Bağlanma Basamağı	Uzama Basamağı	Son uzama Basamağı
5 dakika 94 °C	30 saniye 94 °C	45 saniye 60 °C	3 dakika 72 °C	10 dakika 72°C

2.2.5. Agaroz Jel Analizi ve Jel Görüntüleme İşlemi

Agaroz jelde yürütülen DNA’nın UVP transilluminator cihazında oluşan bantların varlığı kontrol edilmiş ve UV fotometer jel dökümantasyon aleti (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

2.2.6. PZR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması

PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar uygun marker (100 bp- 10 KB DNA Logical Ladder) kullanılarak tespit edilmiştir.

Bu tespit edilen bantlar jelden kesilerek elde edilmiş ve GE Healthcare İllustra GFX PCR DNA ve Gel Band Purfication kit protokolüne uygun olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işlemi aşağıdaki yapılmıştır;

- 1- DNaz- free olan mikrosantrifüj tüplerin darası alınmıştır.
- 2- İçinde jel bulunan tüpler tartılmış ve bulunan sonuçtan darası alınan mikrosantrifüj tüplerinin daraları çıkarılarak jelin miktarı bulunmuştur.
- 3- Jelin her 1 mg için 10 µL capture buffer type 3'den eklenmiştir
- 4- Tüp, içindeki jel çözününceye kadar ortalama 15 ile 30 dakika kadar 60 °C'ye ısıtılan su banyosunda bekletilmiştir.
- 5- Kitin içinde bulunan collection tüplerin içine kolonlar yerleştirilmiştir ve 600 µL capture buffer ile karışmış olan örnekler kolondan geçirilmiştir.
- 6- 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 16.000 g'de 30 saniye santrifüj ettirilmiş ve süpernatant dökülmüştür.
- 7- Kolonda kalan örnek üzerine 500 µL wash buffer type 1'den eklendikten sonra 30 saniye 16.000 g'de döndürülmüş ve süpernatantın biriktiği collection tüp atılmıştır.
- 8- Kolon temiz bir DNaz- free olan mikrosantrifüj tüpüne taşınmıştır.
- 9- 40 µL elution buffer type 4 eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 10- 1 dakika 16.000 g'de santrifüj edilmiş ve kolon atılmıştır. Saflaştırılan DNA süpernatant kalmıştır.
- 11- Saflaştırılmış DNA -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.7. DNA Dizi Analizi

2.2.7.1. Dizi analizi için PZR

Dizi analizi için PZR reaksiyonu aşağıdaki belirtilen miktarlarda ve toplamda 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2.3. Dizi analizi için PZR bileşenleri ve miktarları

BİLEŞENLER	MİKTARLAR
Mix	3 µL
Buffer	3 µL
Primer	0.65 µL
Steril distile su	1.35 µL
Kalıp DNA	2 µL

Çizelge 2.4. Dizi analizi için PZR değerleri

Denatürasyon Basamağı	Bağlanma Basamağı	Uzama Basamağı
20 saniye 96 °C	20 saniye 50 °C	4 dakika 60 °C

2.2.7.2. Manyetik boncukla saflaştırma

Dizi analizi için yapılan PZR reaksiyonun bitmesinin hemen ardından hazırlanmış olan stop solüsyonundan her tüpe 5,5 µL eklenmiştir. Stop solüsyonu çizelgede belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.5. Stop solüsyonu bileşenleri ve miktarlar

BİLEŞENLER	MİKTARLAR
Steril distile su	50 µL
3M Na-asetat pH: 5.2	20 µL
100 mM Na ₂ - EDTA pH: 8.0	20 µL
20 mg/ ml glikojen	10 µL

- 1- PZR tüpündeki ürünler mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Her 1 µL PZR reaksiyonu için 1 µL manyetik boncuk eklenmiştir. Manyetik boncuk kullanılmadan önce vortekslenmiştir.
- 2- 55 µL % 73'lük isopropanol eklenmiştir

- 3- 10-15 dakika oda sıcaklığında beklenmiş ve manyetik boncuklar dibe çöktüğünden arada tüpün dibine ufak ufak hareketlerle vurulmuş ve karışması sağlanmıştır
- 4- Mikrosantrifüj tüpler manyetik tablaya oturturulmuş ve 3- 5 dakika beklenmiştir.
- 5- Sonra süpernatant dikkatlice alınmış ve atılmıştır.
- 6- 200 µL % 73'lük izopropanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika beklenmiş süpernatant atılmıştır.
- 7- Bu işlem bir kez daha uygulanmıştır.
- 8- Mikrosantrifüj tüpler manyetik tabladan alınarak ağzı açık bir şekilde yaklaşık 20-25 dakika kurumaya bırakılmıştır.
- 9- 40 µL sample loading solution (SLS) kuruyan örnekler üzerine eklenmiş mikropipetle 10-12 kez pipetlenerek çözülmesi sağlanmıştır.
- 10- Mikrosantrifüj tüpleri tekrar manyetik tablaya konulmuş ve 5 dakika beklenmiştir.
- 11- Mikrosantrifüj tüpün içinde bulunan 35 µL içinde örneğin bulunduğu süpernatant manyetik boncuklara değmeden dikkatlice alınmış ve 96'lık örnek tablasının kuyucuklarına yüklenmiştir.
- 12- Kuyucuklara yüklenen örneklerin üzerine birer damla mineral yağ damlatılmıştır.
- 13- Tampon tablasına da kitte bulunana seperation buffer'dan , kuyucukların %70'ini dolduracak kadar eklenir.
- 14- Kapiller aparatı ile jel tüpü cihaza takıldıktan sonra dizi analizi işlemine başlanır

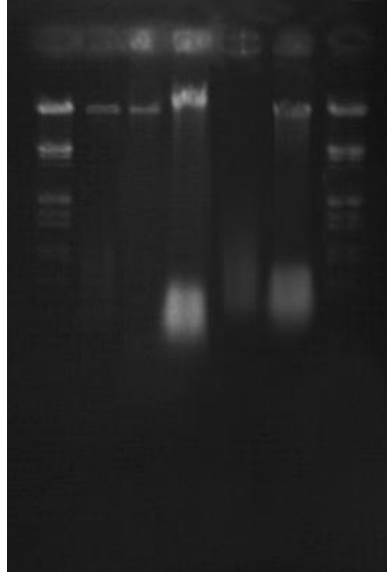
2.2.7.3. Biyoinformatik analiz

Biyoinformatik analizler NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak yapılmıştır. Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi NCBI'ya göre biyoinformatik, biyoloji, bilgisayar bilimi ve bilgi teknolojilerinin birleşiminden oluşan bir disiplin olarak tanımlanmaktadır [22]. Bu veri tabanı kullanılarak hem primer tasarlanmış hemde elde edilen dizi bilgileri ile

veritabanındaki veriler karşılaştırılarak hizalama ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3. BULGULAR

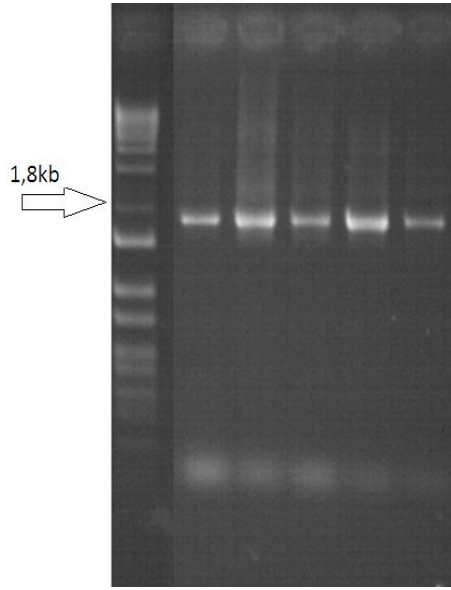
3.1. DNA İzolasyonu



Şekil 3.1. *Triops cancriformis*' ten elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel ile görüntülenmesi

Yapılan genomik DNA izolasyon sonucuna göre beklenen büyüklük olan 1800 bç (1,8kb)'lik 18S rRNA geni olduğu düşünülen gen bölgesi agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir.

3.2. PZR Analizi

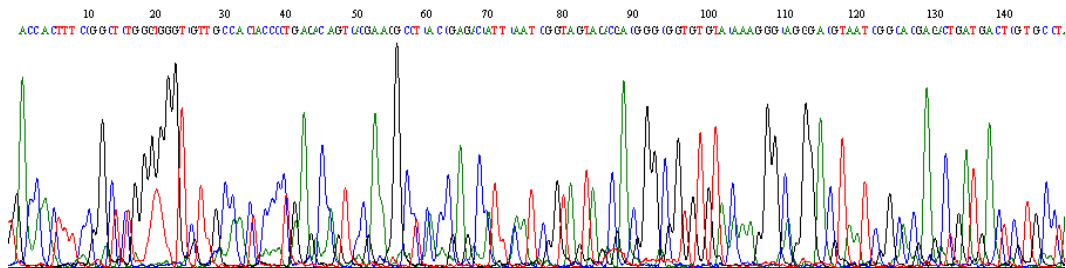


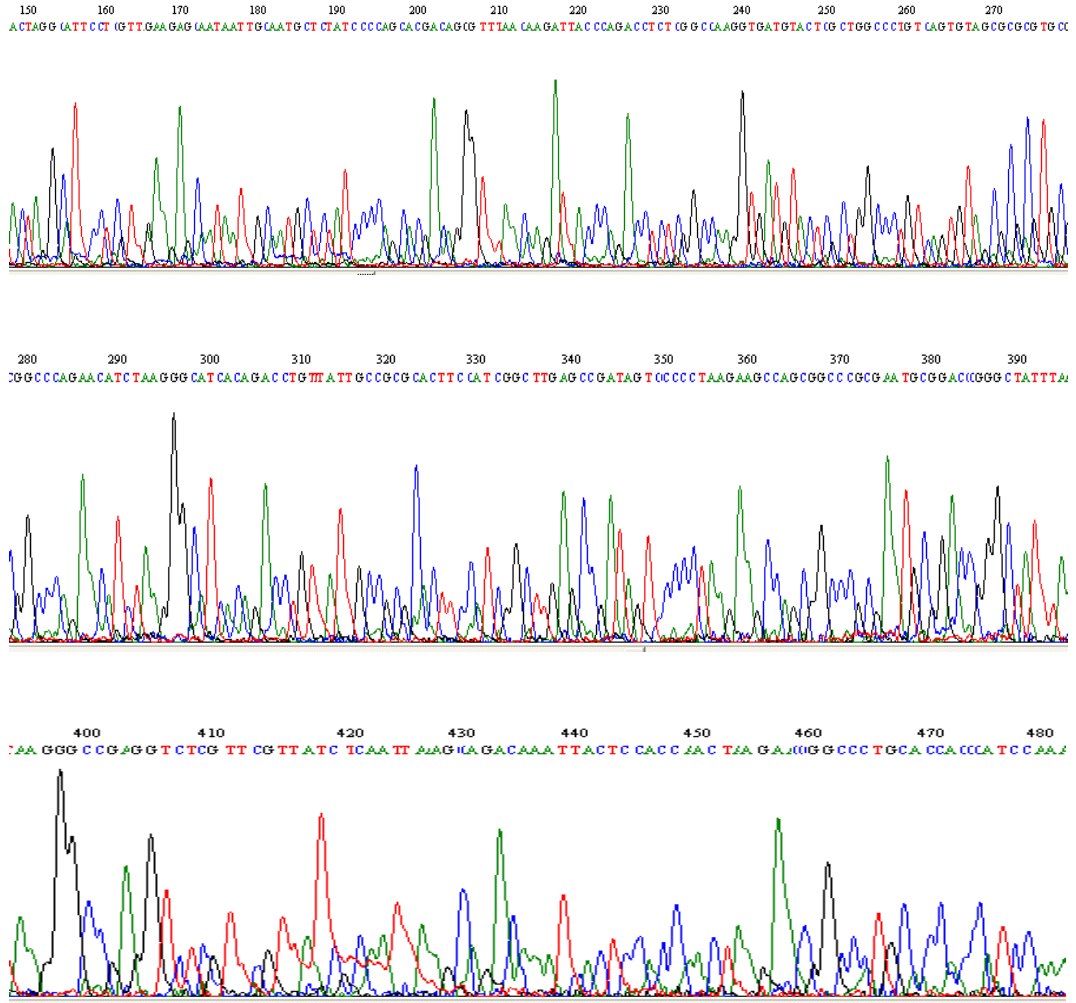
Şekil 3.2. *Triops cancriformis*'in genomik DNA'sı kullanılarak kurulan PZR sonucunun jel görüntüsü.

PZR için yarı bozuk primerler tasarlanmıştır. Bu primerler 18S rRNA genlerine spesifik olarak tasarlanmıştır. PZR sonucunda beklenen büyüklükte 18S rRNA geni elde edilmiştir.

3.3. Dizi Analizi

5 farklı *Triops cancriformis* bireylerinden elde edilen PZR ürünlerine ait dizi analizi sonuçları NCBI veri bankasındaki verilerle karşılaştırılmış ve elde edilen 18S rRNA'ya ait ürünlerin gen bankasında kayıtlı olan *T. cancriformis*'e %81 ve %78 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür (Tablo3.2- 3.4).



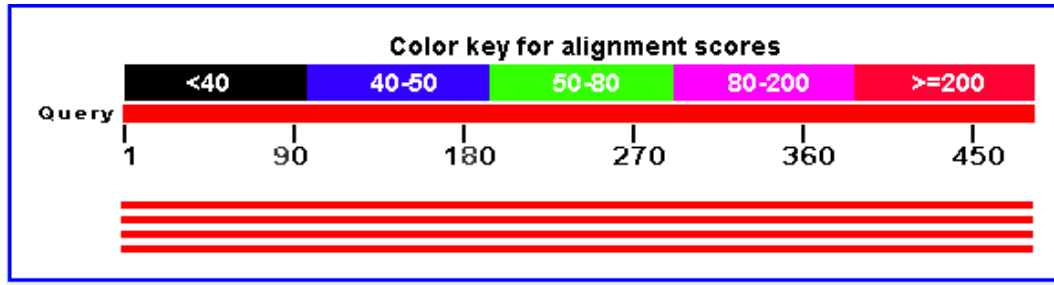


Şekil 3.3. *Triops canciriformis3* 18S rRNA genine ait pikler

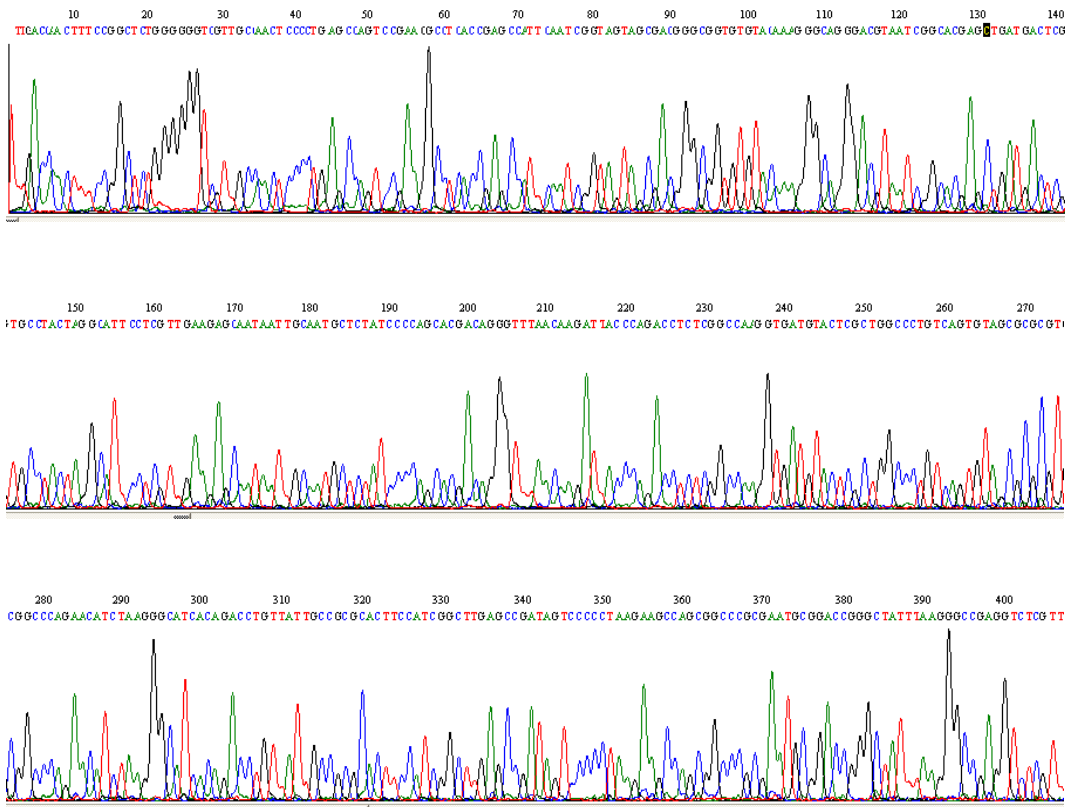
Çizelge 3.1. *Triops canciriformis3* 18S rRNA geninin olası baz dizisi

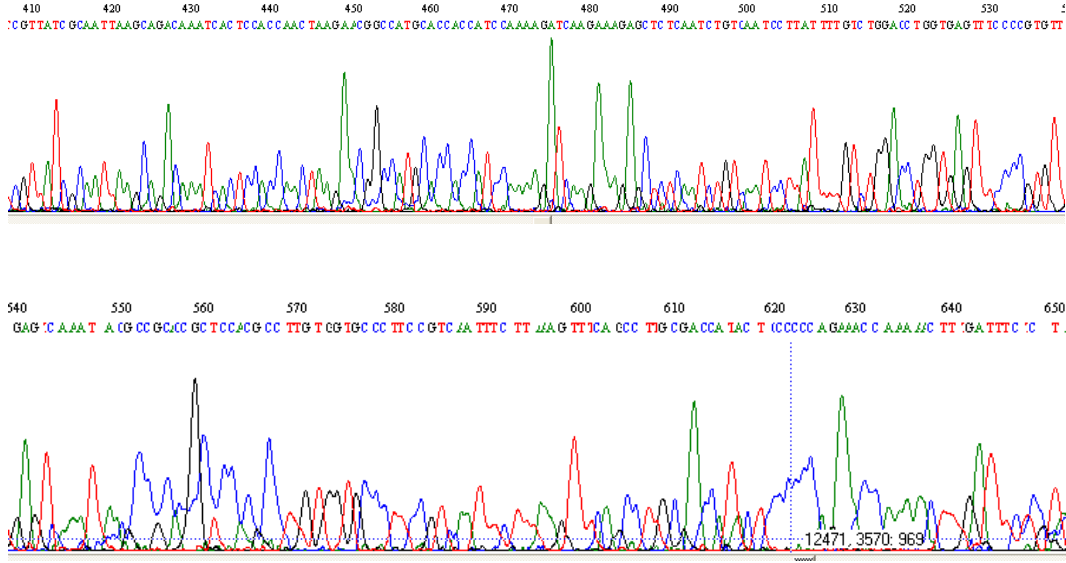
TTCAATCGGTAGTAGACGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCGGC
 ACGAGACTGATGACTCGTGCCTACTAGGCATTCCTCGTTAGAAGAGCAATAATTG
 CAATGCTCTATCCCCAGCACGACAGGGTTTAAACAAGATTACCCAGACCTCTCGGC
 CAAGGTGATGTACTCGCTGGCCCTGTCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCAGAACAT
 CTAAGGGCATCACAGACCTGTTTATTGCCGCGCACTTCCATCGGCTTGAGCCGAT
 AGTCCCCCCTAAGAAGCCAGCGGCCCGCGAATGCGGACCCGGGCTATTTAAGGGC
 CGAGGTCTCGTTCGTTATCTCAATTAAGCCAGACAAATTACTCCACCAACTAAG
 AACCCGGCCCTGCACCACCCATCCAAAAGATCAAGAAAGAGCTTTC AATCTGTTA
 ATTCTTTATTTTGTNTGGACCTGGTGAGTTTCCCGTGTTGA

Çizelge 3.2 NCBI veritabanına göre renk anahtarı

Çizelge 3.3. *Triops cancriformis* 3' ün NCBI veri tabanındaki türlere benzerliği

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU370422.1	<i>Triops cancriformis</i> strain C1 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	272	272	100%	3e-74	78%
EF189638.1	<i>Triops cancriformis</i> ZMUC CRU-9950 18S ribosomal RNA gene, partial	272	272	100%	3e-74	78%
EF189637.1	<i>Triops australiensis</i> ZMUC CRU-9940 18S ribosomal RNA gene, partial	272	272	100%	3e-74	78%
AF144219.1	<i>Triops longicaudatus</i> 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	272	272	100%	3e-74	78%





Şekil 3.4. *Triops cancriformis*4 18S rRNA genine ait pikler

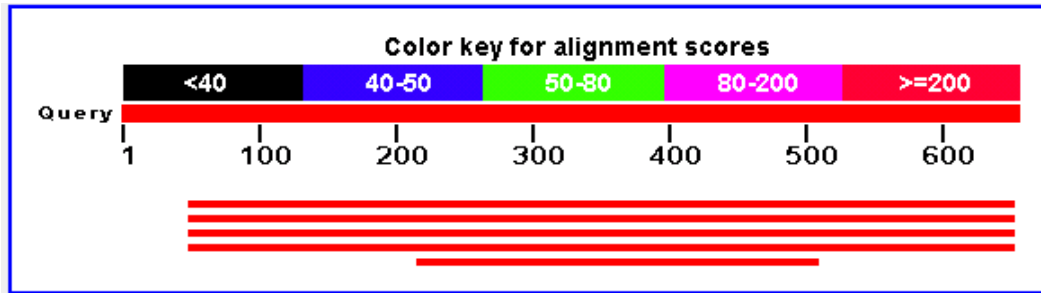
Çizelge 3.4. *Triops cancriformis*4 18S rRNA geninin olası baz dizisi:

```

TTGACCAACTTTCCGGCTCTGGGGGGTCGTTGCCAACTCCCCTGAGCCAGTCCGA
AGGCCTCACCGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGC
AGGGACGTAATCGGCACGAGCTGATGACTCGTGCCTACTAGGCATTCCTCGTTGA
AGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACAGGGTTTAAACAAGATTACC
CAGACCTCTCGGCCAAGGTGATGTACTCGCTGGCCCTGTCAGTGTAGCGCGCGTG
CGGCCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCGCGCACTTCCATCG
GCTTGAGCCGATAGTCCCCCTAAGAAGCCAGCGGCCCGCAATGCGGACCGGGCT
ATTTAAGGGCCGAGGTCTCGTTCGTTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCAC
CAACTAAGAACGGCCATGCACCACCATCCAAAAGATCAAGAAAGAGCTCTCAATC
TGTC AATCCTTATTTTGTCTGGACCTGGT GAGTTTCCCCGTGTTGAGTCAAATAC
GCCGCACCGCTCCACGCCTTGTGGTGCCCTTCCGTCAATTTCTTAAAGTTTCAGC
CTTGCGACCATACTCCCCCAGAAACCAAAAACCTTTGATTTCTCT

```

Çizelge 3.5. NCBI veri tabanına göre renk anahtarı



Çizelge 3.6. *Triops cancriformis*4' ün NCBI veri tabanındaki türlere benzerliği

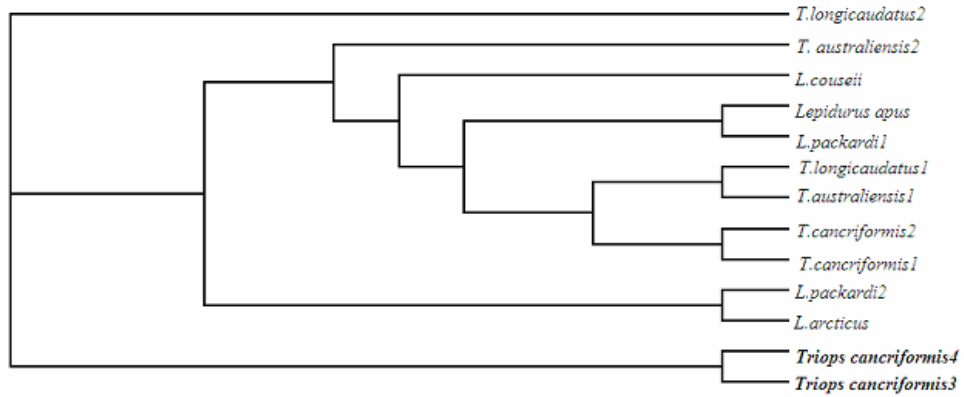
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU370422.1	Triops cancriformis strain C1 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	479	479	92%	2e-136	81%
EF189638.1	Triops cancriformis ZMUC CRU-9950 18S ribosomal RNA gene, partial	479	479	92%	2e-136	81%
EF189637.1	Triops australiensis ZMUC CRU-9940 18S ribosomal RNA gene, partial	479	479	92%	2e-136	81%
AF144219.1	Triops longicaudatus 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	479	479	92%	2e-136	81%
AF070519.1	Triops longicaudatus small subunit ribosomal RNA gene, partial seque	219	219	44%	5e-58	81%

Yapılan dizileme sonucunda elde edilen genin 18S rRNA geni olduğu ve bu dizilerin gen bankasındaki veriler ile karşılaştırıldığında büyük oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

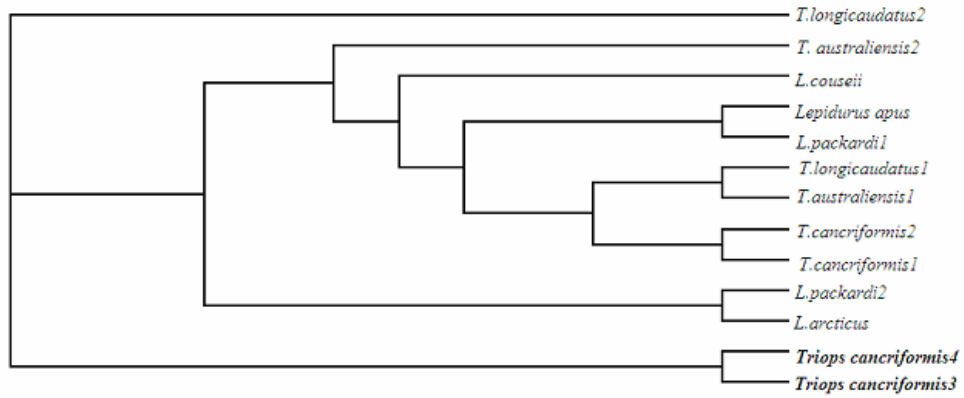
3.4. Filogenetik Ağaç

Eskişehir- Alpu bölgesinde bulunan *T. cancriformis* türünün 5 farklı bireyi arasında analiz yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla dizi analizi sonucu ilk olarak NCBI veri tabanında nükleotid BLAST yapılarak kontrol edilmiştir. Elde edilen 18S rRNA bölgesi nükleotid dizilerinden, PHYLIP-3.69 MEGA4_5 ve BIOEDİT bilgisayar programları yardımıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Elde edilen ağaçların görüntülenmesi TreeV32 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

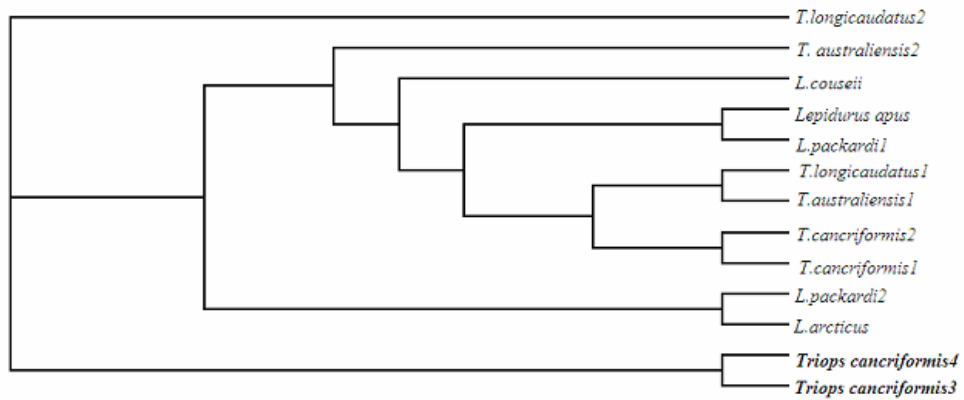
PHYLIP-3.69 bilgisayar programı yardımıyla neighbor-joining metodu kullanılarak yapılan filogenetik analize dayalı ağaçlar şekil 3.5-3.11' de gösterilmiştir.



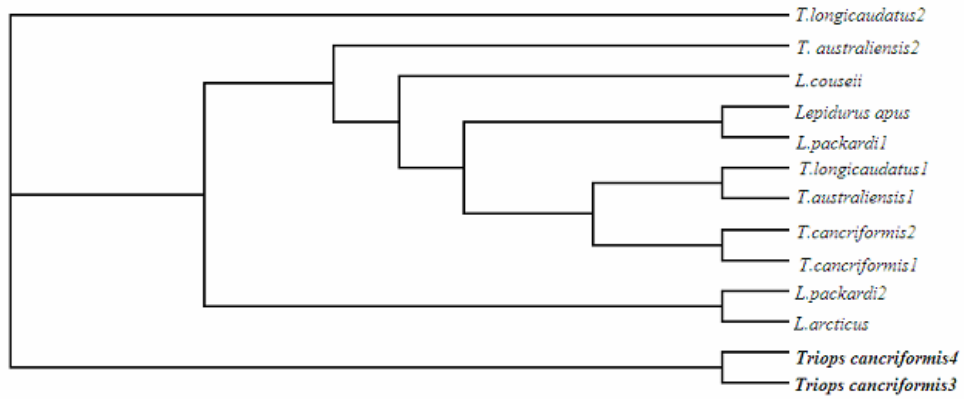
Şekil 3.5. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 1 numaralı ağaç



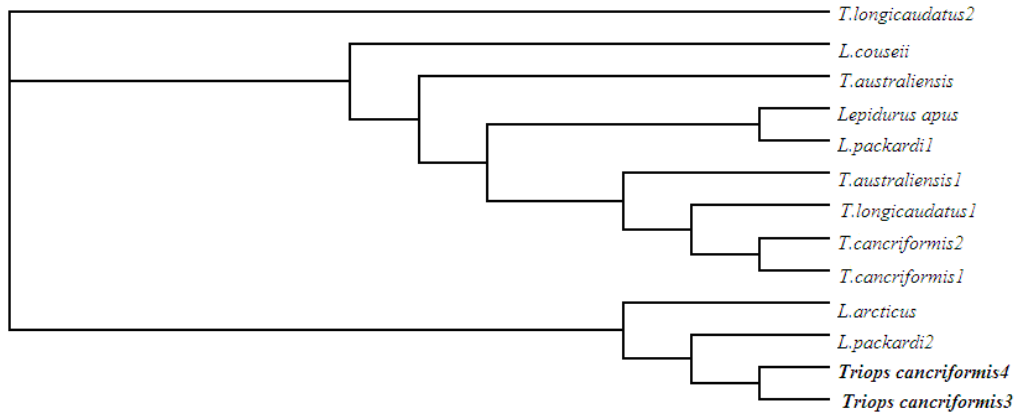
Şekil 3.6. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 2 numaralı ağaç



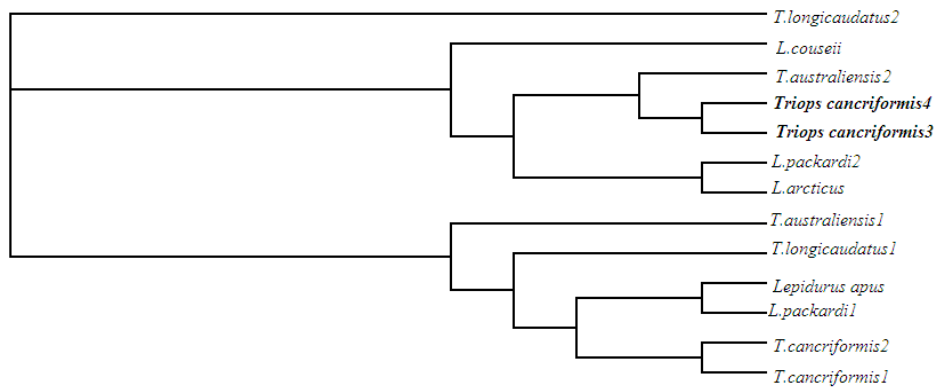
Şekil 3.7. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 3 numaralı ağaç



Şekil 3.8. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 4 numaralı ağaç

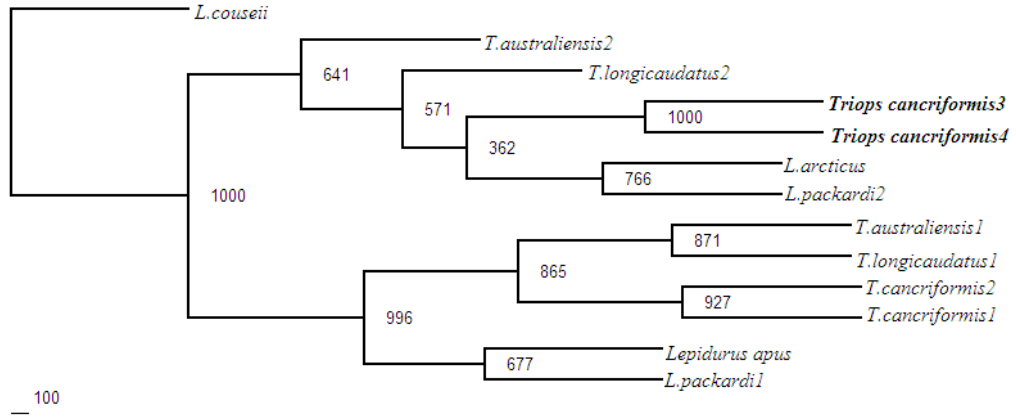


Şekil 3.9. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 5 numaralı ağaç



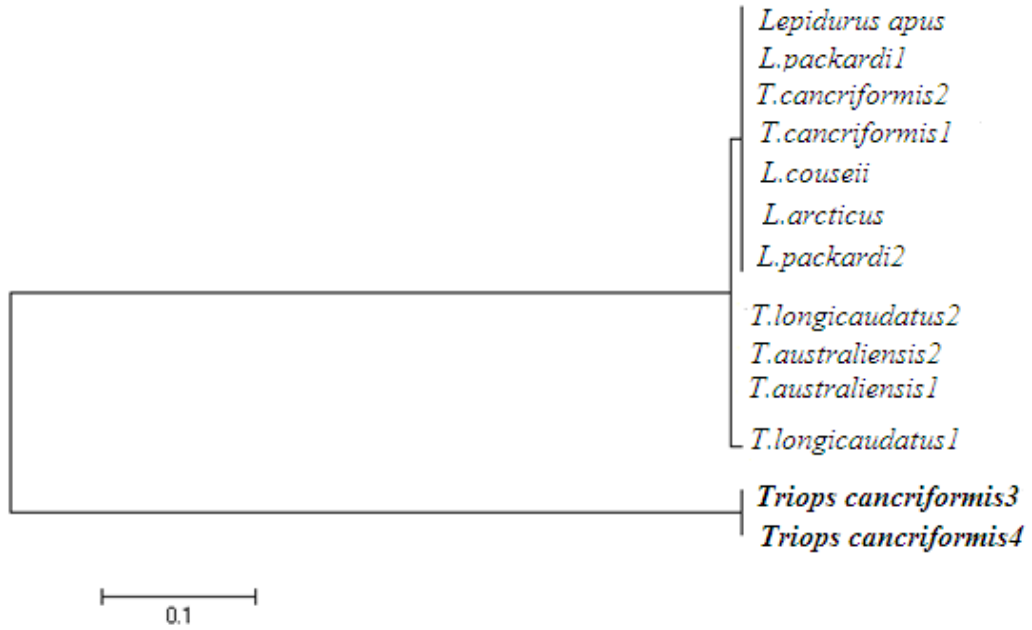
Şekil 3.10. Neighbor-joining sonucunda elde edilen 6 numaralı ağaç

1000 tekrarlı ağaç oluşturmada sonra hangi ağacın en doğru ağaç olduğuna bootstrap analizi ile karar verilmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen ağaç şekil 3.10 da gösterilmektedir.

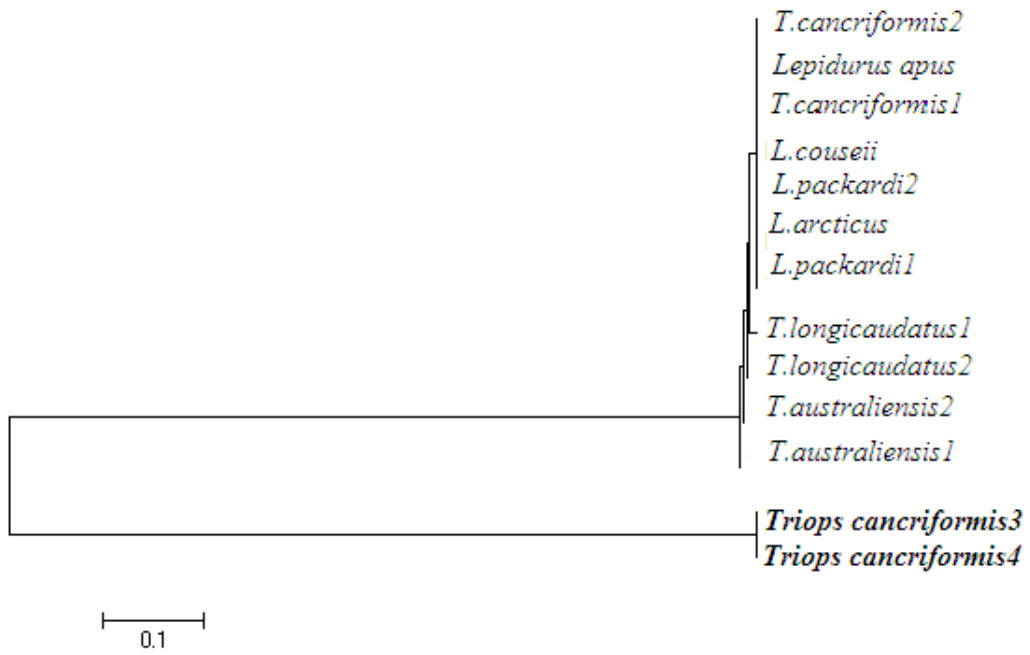


Şekil 3.11. Bootstrap analizi

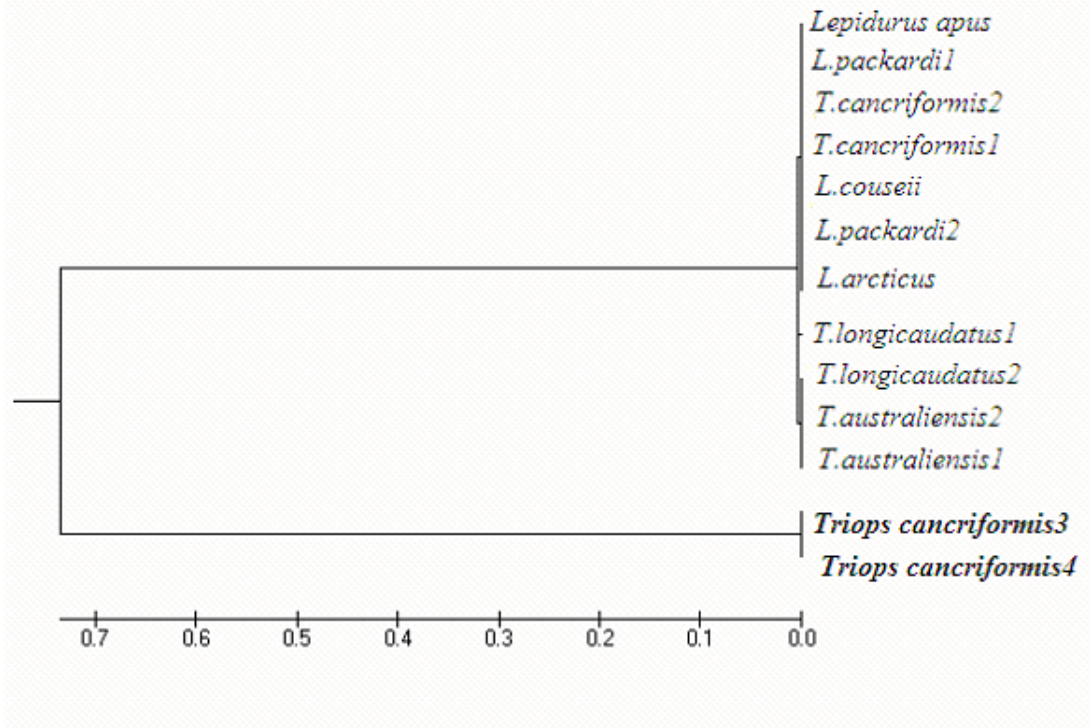
PHYLIP-3.69 bilgisayar programı kullanılarak neighbor joining metoduyla oluşturulan ağaçlara ek olarak birde MEGA 4-5 bilgisayar programı yardımıyla farklı filogenetik metotlar kullanılarak yapılan filogenetik ağaçlar şekil 3.12 - 3.16'da gösterilmiştir.



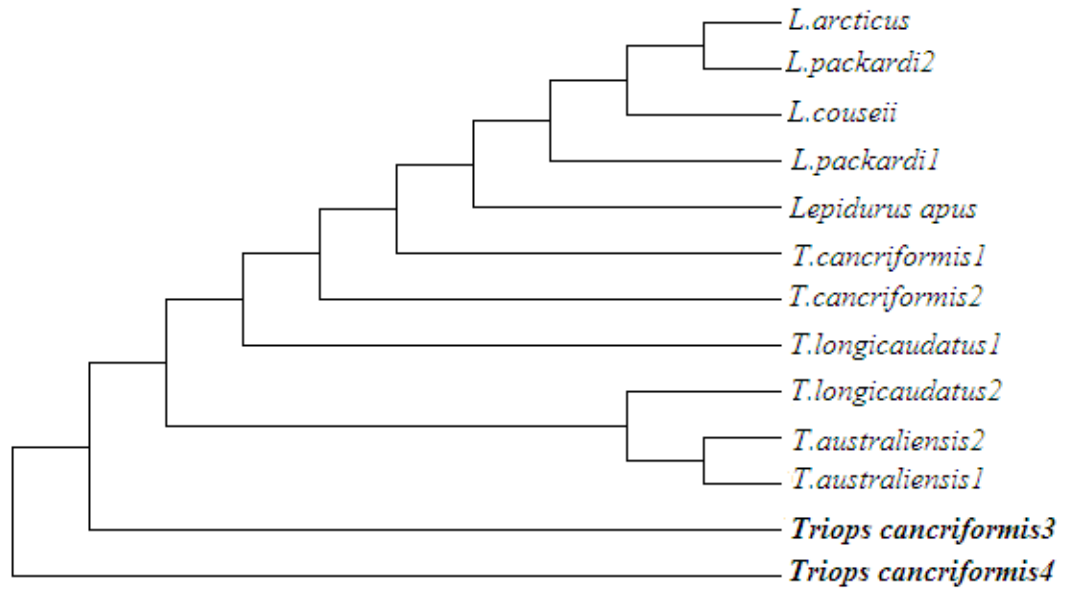
Şekil 3.12. Maksimum olasılık sonucu oluşan filogenetik ağaç



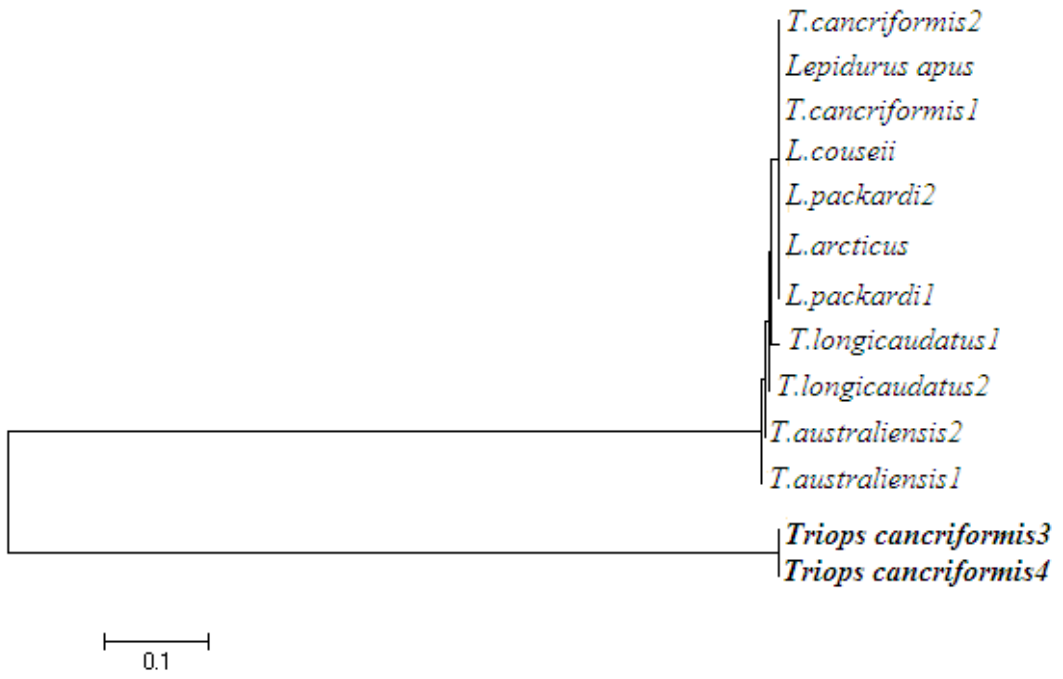
Şekil 3.13. Minimum evrim sonucu oluşan filogenetik ağaç



Şekil 3.14. UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) sonucu oluşan filogenetik ağaç



Şekil 3.15. Maksimum parsimoni sonucu oluşan filogenetik ağaç



Şekil 3.16 NJ (neighbor joining) sonucu oluşan filogenetik ağaç

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİ

Biyoloji’de “tür” kavramı son derece önemlidir. Genel yaklaşımlarda bilim dalları arasında birliktelik olsa da tanımlamalarda farklılıklara rastlanmaktadır. Bunun ana nedeni, yapılan tanımların canlı gruplarının tümünü uygunluk göstermemesidir. Bunlardan birisi tipolojik (morphospecies) olarak adlandırılan ve tipe benzerlik derecesine göre yapılan tür tanımıdır. Ancak bu tanımın sibling türlerde, dimorfizm vb. durumlarda yetersiz kalışı, Mayr’la başlayan biyolojik tür tanımını ortaya çıkarmıştır. Populasyon bireylerinin aralarında üreme potansiyelinin bulunup bulunmamasına bağlı olan bu tanım da eşeysiz üreme, fosil formlar, ölü koleksiyon materyalleri gibi durumlarda uygulanamamaktadır.

Bu ilişkilerin ortaya konmasında belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler kabul edilerek evrimsel değişimler ölçülmeye çalışılır. Diğer bir anlatımla, işlevsel olarak benzer (homolog) makro moleküllerin nükleotid ve aminoasit dizilerindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıkları gösterir. Bu kronometreler arasında en yaygın olanı ribozomal RNA’lardır. Ribozomal RNA’lar, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküler olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Ökaryotlarda ise dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü üzerinde odaklanmıştır [2].

18S rRNA bölgesi dizi analizi sonucu elde edilen veriler ile filogenetik analiz (genetik akrabalık), PHYLIP 3.66, MEGA4_5 ve BioEdit programları ile yapılmıştır.

Son yıllarda bunların yanı sıra grupların akrabalık ilişkilerinin de bu tanımlar içine katılma düşüncesi filogenetik çalışmaları gündeme getirmiştir. Bu yaklaşımda filogenetik ilişkiler soy ağacını yani taksonları oluşturmada tek atadan gelme ölçüsünün kullanılması temeline dayanır. Filogeninin çok yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak bunların yeniden yapılandırılması için birçok metod geliştirilmiştir. Parsimoni en sık çalışılan ve kullanılan filogenetik ağaçtır. Bu metod olası bütün ağaçları değerlendirme ve farklı ağaçlar arasından seçmeye yarayan her biri için bir kriter ya da bir skor verme esasına dayanır. Maksimum Parsimoni’de kriter, verilen ağaçtaki verileri açıklayabilmek için gerçek olduğu

kabul edilen evrimsel değişimlerin sayısıdır. Parsimonisi en yüksek olan ağaç, en tutumlu olan yani genetik ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağaçtır [23].

Bootstrap analizi, elde edilen ağaçların dallarının istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılmasıdır [24]. Burada elde edilen bilgiler değerlendirilerek bazı kopyalar üretilir ve her bir dalın yüzdelik olarak ne oranda desteklendiği belirlenir. Bootstrap değeri % 0 ile % 100 arasındadır. Yapılan çalışmada karakterize edilen bootstrap destek değerlerine göre, \geq % 85 güçlü, % 70-85 arası orta, %50-70 arası zayıf ve $<$ % 50 çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır. Bootstrap destek değerinin %70 ya da daha büyük olması genellikle doğru filogeninin tanımlanması ile alakalıdır. Eğer, belli bir dal için bootstrap destek değeri % 50' nin altında ise; araştırmacı ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda yayınladığı ağaçta, bu dalı tek düğümden çok çatallı olarak verecektir [25].

Bu çalışmanın materyali *Triops cancriformis* yaşıyan fosil olarak anılmaktadır. 300 milyon yıldır fazla bir değişiklik göstermeden bugünlere gelebilmiş bir canlıdır. Bu türün morfolojiye dayanan taksonomik karakterleri bilinmektedir [3]. Literatürde *T. cancriformis*'in 18S Ribozomal RNA geniyle ilgili yapılmış fakat tamamlanmamış iki çalışma da bulunmaktadır [26]. Bu çalışmaların *T. cancriformis*'in 18S Ribozomal RNA geninin tamamını içermemesi ve özellikle çalışmalarda kullanılan *T. cancriformis* örneklerinin farklı coğrafya populasyonlarına ait olması nedeniyle, bu çalışmalarda elde edilmiş sonuçların Türkiye *T. cancriformis* örnekleriyle karşılaştırılması, filogeni alanında önemli veriler sağlayacağı düşünülmüştür.

Çalışılan *T. cancriformis* 4 örneğine ait okunan 650 bazlık dizinin %81 oranında, *T. cancriformis* 3'e ait okunan 480 bazlık dizinin ise %78 oranında NCBI veri tabanındaki diğer *T. cancriformis* türlerine benzediği tespit edilmiştir. Bu benzerlik oranlarının düşük olmasının sebebi ise; 18S rRNA genin uzunluğu 1800 kb olup bu çalışmada ise sadece belirli sayıdaki nükleotit dizilimi belirlendiği için ve bu kısımlar üzerinden bir karşılaştırma söz konusudur. Dizi hizalama sonuçlarına bakıldığında ise Ek1'de gösterildiği üzere çalışılan genin oldukça fazla korunmuş bölge içerdiği görülmektedir. Elde edilen dizi bilgileri ve NCBI veri tabanından aynı familyaya ait 18S rRNA bölgeleri çalışmış türlerin

dizi bilgileri karşılaştırılması sonucunda oluşana filogenetik ağaçlar arasında büyük oranda benzerlik olduğu görülmektedir. Phylip-3.69 bilgisayar programı ile oluşturulan 1000 tekrarlı ağaç arasından rastgele 6 tanesi seçilmiş ve bu ağaçların büyük oranda benzerlik gösterdiği görülmekte olup, bu ağaçlar arasından en doğru ağaca bootstrap analizi ile karar verilmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen filogenetik ağaçtan 1000 tekrarda çalışılan farklı bireylerin birbirine çok yakın, ancak NCBI'daki *T. cancriformis* türlerine uzak olduğu görülmektedir. Bu farklılığın nedeni NCBI *T. cancriformis* örneklerinin birinin Almanya, diğerinin ise Avusturya'dan toplanmış olmasıdır. Yani bu farklılığa, araştırılan örneklerin farklı popülasyonlara ait olmaları neden olmaktadır.

Bu çalışmalara ek olarak aynı veriler MEGA4_5 bilgisayar programına girilerek de filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Bu programda beş farklı metot ile maksimum olasılık, minimum evrim, UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) maksimum parsimoni ve NJ (neighbor joining) metotlarıdır. Bu metotlara göre oluşturulan filogenetik ağaçların büyük oranda benzerlik göstermektedir. MEGA4_5 programı ile oluşturulan ağaçlarda da çalışılan türlerin birbirine yakın, ama diğer *T. cancriformis* türlerinden uzak olduğu görülmektedir. Her iki program karşılaştırıldığında ise elde edilen ağaçların birbirine benzerlik gösterdiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

T. cancriformis'in filogenetik ilişkilerinin tam olarak sonuçlandırılabilmesi için 18S rRNA geni dizisinin tamamının, ayrıca bu alanda bilinmesi gereken diğer verilerin de elde edilmesi gerekmektedir

5. KAYNAKLAR

- [1] Hennig, W., Phylogenetic systematic, University of Illinois Press Urbana Chicago London, 1979.
- [2] Madigan, M.T., Martinco, J.M., Parker, J., 1997. Brock biology of microorganisms. Prentice-Hall, Inc., 165- 168.
- [3] Özkütük, R., S., Alpu (Eskişehir) çevresinde oluşan geçici sular omurgasız faunası üzerine ön çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1997.
- [4] Møller Ole S., Olesen Jørgen, Høeg Jens T., “SEM studies on the early larval development of *Triops cancriformis* (Bosc) (Crustacea: Brachiopoda, Notostraca,” Acta zoologica (Stockholm) **84**: 267-284, 2003.
- [5] Triops. 15.6.2011. <http://triops-eggs.com/>
- [6] Golzari, A., Khodabandeh, S., Seyfabadi, J., 2009. “Some biological characteristics of the tadpole shrimps *Triops cancriformis* from seasonal pools of the west Azarbaijan,” J. Agric. Sci. Technol., **11**: 81-90
- [7] Hughes, I., 1997. “Conservation breeding of the tadpole shrimps *Triops cancriformis* in Britain”. Aquarium Sciences and Conservation., **1**, 5-18.
- [8] Zierold, T., Montero-Pau, J., Hanfling, B., Gomez, A., “Sex ratio, reproductive mode and genetic diversity in *Triops cancriformis*. Freshwater biology”, doi:10.1111, 2009.
- [9] Su, T., Mulla, M.S., “Toxicity and effects of microbial mosquito larvicides and larvicidal oil on the development and fecundity of the tadpole shrimp *Triops newberryi* (Packard) (Notostraca: Triopsidae)”. Journal of Vector Ecolog., **30**, no. 1, 2005.
- [10] Hamasaki, K., Ohbayashi, N., “Effect of water pH on the survival rate of larvae of the American tadpole shrimps, *Triops longicaudatus* (Leconte) (Notostraca: Triopsidae)”. Appl. Entomol. Zool, **35** (2): 225-230, 2000.
- [11] Boix, D., Sala, J., Amich, R. M., “Population dynamics of triops cancriformis (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca) of the Espolla temporary in the northeastern Iberian peninsula”. Hydrobiologia, **486**: 175-183, 2002.

- [12] Machado, M., Cristo, M., Reis, J., Fonseca da Cancela, L., “Biological data on *Triops cancriformis mauritanicus* (Ghigi, 1921) and *Cyzicus grubei* (Simon, 1886) - crustacea, branchiopoda- in SW Portugal temporary ponds”. *Limnetica*, **16**: 1-7, 1999.
- [13] Takahashi, F., “Pioneer life of the Tadpole Shrimps, *Triops spp.* (Notostraca: Triopsidae)”. *Appl. Ent. Zool.* **12** (2): 104-117, 1977.
- [14] Scanabissi, F., Eder, E., Cesari, M., “Male occurrence in Austrian populations of *Triops cancriformis* (branchiopoda, notostraca) and ultrastructural observations of the male gonad”. *Invertebrate Biology*, **124**(1): 57-65, 2005.
- [15] Guadagnoli, J., A., Braun, A., M., Roberts, S., P., Reiber, C., L., “Environmental hypoxia influences hemoglobin subunit composition in the branchiopod crustacean *Triops longicaudatus*”. *Journal of Experimental Biology*, **208**, 3543-3551, 2005.
- [16] Riley, L., G., Tsukimura, B., “Yolk protein synthesis in the riceland tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*, measured by in vitro incorporation of 3H-leucine”. *The Journal of Experimental Zoology*, **281**: 238-247, 1998.
- [17] Mantovani, B., Cesari, M., Luchetti, A., Scanabissi, F., “Mitochondrial and nuclear DNA variability in the living fossil *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca)”. *Heredity*, **100**, 496-505, 2008.
- [18] Richter, S., Olesen, J., Wheeler, W., C., “Phylogeny of Branchiopoda (Crustacea) based on a combined analysis of morphological data and six molecular loci”. *Cladistics* **23**, 301-336. 2007.
- [19] Mantovani, B., Cesari, M., Scanabissi, F., “Molecular taxonomy and phylogeny of the ‘living fossil’ lineages *Triops* And *Lepidurus* (Branchiopoda: Notostraca)”. *Zoologica Scripta*, **33**, 367-374, 2003.
- [20] Umetsu, K., Iwabuchi, N., Yuasa, I., Saitou, N., Clark, P., F., Boxshall, G., Osawa, M., Igarashi, K., “Complete mitochondrial DNA sequence of a tadpole shrimp (*Triops cancriformis*) and analysis of museum samples”. *Electrophoresis* **23**, 4080–4084, 2002.

- [21] Takahashi, F., “*Triops* spp. (Notostraca: Triopsidae) for the biological control agents of weeds in rice paddies in Japan”. *Entomophaga* **22**: 351-357, 1977.
- [22] Bioinformatics. 25.6.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>
- [23] Deniz. G., Türkiye’de Yetişen *Ziziphora* L. (Lamiaceae) Taksonlarının Moleküler Sistematığı, Yüksek lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2007
- [24] Berry, V., Gascuel, O., Caraux, G., "Choosing the Tree Which Actually Best Explains the Data: Another Look at the Bootstrap in Phylogenetic Reconstruction", *Computational Statistics & Data Analysis*, **32/3-4**, 273, 2000.
- [25] Kress, W.J., Liu, A.Z., Newman, M., Li, Q.J., 2005. "The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A Complex and Polyphyletic Genus of Gingers", *American Journal of Botany*, **92**, 167.
- [26] *Triops cancriformis*. 10.02.2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF189638.1>

Ek-1 Hizalama Sonuçları

