



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI DENİZ HIYARI (Aspidochirotida:
Holothuroidea) TÜRLERİNİN GENETİK YAPISININ MİTODNA COI VE
16S rRNA GEN BÖLGELERİNİN DİZİ ANALİZİ İLE
BELİRLENMESİ**

OZAN ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ORDU 2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

OZAN ŞEN

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün TF-1305 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ BAZI DENİZ HIYARI (*Aspidochirotida: Holothuroidea*) TÜRLERİNİN GENETİK YAPISININ mtDNA COI VE 16S rRNA GEN BÖLGELERİNİN DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

OZAN ŞEN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 66 SAYFA

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. YILMAZ ÇİFTÇİ

Bu çalışmada, Holothuriidae ailesine ait ve Ege denizlerinden örneklenen *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* ve *Holothuria sanctori* türleri incelenmiştir. Türlerin mtDNA üzerinde bulunan 16S rRNA ve COI gen bölgeleri PZR ile amplifiye edilmiş ve dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler GenBank'tan alınan verilerle birlikte değerlendirilerek türler arası ilişkiler belirlenmiştir.

Filogenetik analizlerde COI gen bölgesi için *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* olarak 3 farklı türde çalışılmış olup 6 haplotip belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesi için *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata*, *Holothuria sanctori* olarak 4 farklı tür çalışılmış ve 6 haplotip belirlenmiştir.

COI ve 16S rRNA gen bölgeleri için haplotip çeşitliliği ve nükleotit çeşitliliği sırasıyla Hd: 1,000, Pi: 0,09590; Hd: 0,9290, Pi: 0,10408 olarak bulunmuştur. Elde edilen matrikslerde baz kompozisyonları COI gen bölgesi için A:%27.98, C:%26.43, G:%18.93 ve T:%26.64 ve 16S gen bölgesi için A: %29.88, C: %23.13, G: %21.30 ve T: %25.67 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, ülkemiz sularında yayılış gösteren ve önemli ticari türleri de içerisinde barındıran Holothuroidea ve Stichopodidae familyaları hakkında oldukça yetersiz ve eksik olan moleküler filogenetik araştırmaların, çalışmada değerlendirilmiş COI gen bölgesi için 3 türün ve 16S rRNA gen bölgesi için 4 türün bireyleri mtDNA üzerindeki iki gen bölgesi açısından giderilmiştir. Ayrıca bu

Çalışmada bazı türler için ilk kez elde edilmiş ve sonraki çalışmalar için referans olabilecek sekans verileri GenBank'a yüklenecektir.

Anahtar Kelimeler: COI, Filogenetik, Holothuroidea, mtDNA, Sekans Analizi, 16S rRNA

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC STRUCTURE OF SOME SEA CUCUMBER SPECIES (*Aspidochirotida: Holothuroidea*) IN TURKEY BY SEQUENCE ANALYSIS OF MtDNA COI AND 16S rRNA GENE REGIONS

OZAN ŞEN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

FISHERIES TECHNOLOGY ENGINEERING

MASTER THESIS, 66 PAGES

SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. YILMAZ ÇİFTÇİ

In this study, the species belongs to the Holothuriidae family which sampled from Turkish waters (Aegean sea); *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* and *Holothuria sanctori* have been examined. 16S rRNA and COI gene regions which found on the mtDNA were amplified by PCR and sequence analysis has been performed. The obtained data were evaluated together with the data obtained from GenBank have been carried inter-species relationships were determined.

In the study, 6 haplotypes for COI gene region, and 6 haplotypes for 16S rRNA gene region have been identified. Haplotype diversity and nucleotide diversity has been found for the region COI and 16S rRNA gene, respectively; Hd: 1,000, Pi: 0,9590; Hd: 0,9290, Pi: 0,10408. On the resulting matrices base compositions for the COI gene region A:%27.98, C:%26.43, G:%18.93, T:%26.64 and for the 16S rRNA gene region: A: %29.88, C: %23.13, G: %21.30,T: %25.67 has been determined.

According to phylogenetic analysis, the species of *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* have been researched and 6 haplotypes detected for COI gene region and for 16S rRNA gene region, 4 species *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* and *Holothuria sanctori* have been researched and for these species 6 haplotypes detected as well.

As a result of the study, data deficiency of families of Holothuriidea and Stichopodidae which including the commercially important species from Turkish waters has been improved with this study in terms of three gene regions on mtDNA for 5 species. In addition, sequence data obtained the first time for some species will be uploaded to the GenBank in order to be a reference for future studies.

Keywords: COI, Holothuriidae, mtDNA, Phylogenetics, Sequence Analysis, 16S rRNA,

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın gerekleőtirilmesinde değerli bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaőan, desteğini ve varlığını hiçbir zaman eksik etmeyen saygıdeğer danıőman hocam Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTCİ'ye, çalıőmamın bir kısmının Portekiz'de tamamlanmasına öncülük eden, çalışma içerisinde alanıyla ilgili bütun sorularıma cevap vererek desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet AYDIN'a, çalıőmalarım boyunca görüőlerinden faydalandığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI'ya, yüksek lisans sürecim boyunca hertürlü desteği veren, motivasyonumu yüksek tutan sevgili hocam ve arkadaőım Dr. Öğr. Üyesi Koray KORKMAZ'a, gerek laboratuvar çalıőmalarım gerekse tez çalıőmalarımda bana yardım eden sevgili arkadaőım Ümit GÜR'e, teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
ÇİZELGE LİSTESİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
1.GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Deniz Hıyarı Materyalleri.....	12
3.1.1. <i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin, 1788).....	12
3.1.2. <i>Holothuria polii</i> (DelleChiaje, 1823).....	14
3.1.3. <i>Holothuria mammata</i> (Grube, 1840).....	15
3.1.4. <i>Holothuria sanctori</i> (DelleChiaje, 1823).....	16
3.2. Örneklemeler.....	18
3.3. Yöntemler.....	20
3.3.1. Toplam DNA İzolasyonu.....	20
3.3.2. Elde Edilen DNA'nın Agaroz Jel Elektroföresi ile Kontrolü.....	21
3.3.3. Mitokondriyal DNA 16S rRNA ve COI Gen Bölgelerinin PZR ile Amplifikasyonu.....	22
3.3.4. Agaroz Jel Elektroföresi ile Çoğaltılan Gen Bölgelerinin Gözlenmesi.....	24
3.3.5. PZR Ürünlerinin Dizi Reaksiyonu ve Dizilerin Elde Edilmesi.....	25
3.3.8. Genetik Verilerin Analizi.....	27
3.3.8.1. Genetik Çeşitlilik Parametreleri.....	27
3.3.8.2. Distance (Uzaklık) Analizi.....	27
3.3.8.3. Parsimoni (Tutumluluk) Analizi.....	28
3.3.8.4. Likelihood (Maksimum Olasılık) Analizi.....	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	29
4.1. DNA Dizin Analizi.....	29
4.2. COI Gen Bölgesi.....	29
4.2.1. COI Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri.....	29
4.2.2. COI gen bölgesi için tür içi ve türler arası genetik mesafenin belirlenmesi.....	31

4.2.3. COI geni filogenetik analizleri	33
4.3. mtDNA 16S rRNA geni.....	37
4.3.1. 16S rRNA gen dizi karakterleri, haplotip ve nükleotit özellikleri.....	37
4.3.2. 16S rRNA gen bölgesi için tür içi ve türler arası genetik mesafenin belirlenmesi.....	37
4.3.3. 16S rRNA geni filogenetik analizleri	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	43
6. KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	1950 ve 2016 yılları arasında dünyadaki balıkçılık ve su ürünleri üretimi (Milyon ton) (FAO, 2016)..... 3
Şekil 3.1.	<i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin, 1788) türünün coğrafik dağılımı (Samyn, 2013)..... 13
Şekil 3.2.	<i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin, 1970)'nin 'ün genel görüntüsü (https://alchetron.com/Holothuria-tubulosa)..... 13
Şekil 3.3.	<i>Holothuria polii</i> (DelleChiaje, 1823) türünün coğrafik dağılımı (Mercier, 2013)..... 14
Şekil 3.4.	<i>Holothuria polii</i> (DelleChiaje, 1823)'nin genel görüntüsü (http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=image&pic=48194&tid=124525)..... 15
Şekil 3.5.	<i>Holothuria mammata</i> (Grube, 1840) türünün coğrafik dağılımı (Mercier ve Hamel, 2013a)..... 16
Şekil 3.6.	<i>Holothuria mammata</i> (Grube, 1840)'nin genel görüntüsü (https://www.sealifebase.ca/photos/ThumbnailsSummary.php?Genus=Holothuria&Species=mammata)..... 16
Şekil 3.7.	<i>Holothuria sanctori</i> (DelleChiaje, 1823) türünün coğrafik dağılımı (Mercier ve Hamel, 2013b)..... 17
Şekil 3.8.	<i>Holothuria sanctori</i> (DelleChiaje, 1823)'nin genel görüntüsü (https://www.divingincyprus.net/Marine-Life-Paphos.html) 18
Şekil 3.9.	Örneklerin toplandığı lokalitler..... 20
Şekil 3.10.	Ekstraksiyon sonrası jelde yürütülen DNA örneklerinin UV altında görüntüsü..... 22
Şekil 3.11.	PZR sonuçlarının jel elektroforezinde 16S rRNA gen bölgesine ait jel görüntüsü..... 25
Şekil 3.12.	COI-F primer ile elde edilen ham sekans verisi..... 26
Şekil 4.1.	COI geni haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Olasılık ağacı..... 34
Şekil 4.2.	COI geni veri setinin Maksimum Parsimoni metoduna dayalı genetik analizi sonucunda üretilen % 50 Majority Rule Konsensus ağacı..... 35
Şekil 4.3.	COI veri TIM2+I değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı..... 36
Şekil 4.4.	16S rRNA geni haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Olasılık ağacı. 40
Şekil 4.5.	16S rRNA geni veri setinin Maksimum Parsimoni metoduna dayalı genetik analizi sonucunda üretilen % 50 Majority Rule Konsensus ağacı..... 41
Şekil 4.6.	16S rRNA veri setinin TIM2+I değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı..... 42

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Çalışılan Türlerin Sistematığı.....	12
Çizelge 3.2. Bu çalışmaya dahil edilen Deniz hıyarı türleri, referanslar, GenBank ulaşım numaraları ve örneklerin lokasyonları.....	19
Çizelge 3.3. Jele yüklemek için kullanılan çözelti ve örnek miktarları.....	22
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan mtDNAsegmentleri ve primer sekansları	23
Çizelge 3.5. COI ve 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarları.....	23
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan primerler için belirlenen PZR programları	24
Çizelge 4.1. Holothuriidae ve Stichopodidae familyasına ait 5 türden COI ve 16S rRNAgenleri için dizin analizi yapılan birey sayısı.....	29
Çizelge 4.2. Çalışılan tür örneklerinden elde edilen haplotiplere ait COI geni nükleotit frekansları.....	30
Çizelge 4.3. Kuşadası ve Ayvalıktan örneklenen deniz hıyarı örnekleri için belirlenen COI haplotiplerinin türlere dağılımı ve frekansları.....	32
Çizelge 4.4. COI verileri için hesaplanan türler arası ve içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri.....	33
Çizelge 4.5. Kuşadası ve Ayvalıktan örneklenen deniz hıyarı örnekleri için belirlenen 16S rRNA haplotiplerinin türlere dağılımı ve frekansları.....	38
Çizelge 4.6. 16S rRNA verileri için hesaplanan türler arası ve içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	:	Adenin
bç	:	Baz çifti
C	:	Sitozin
°C	:	Santrigrat derece
COI	:	Sitokrom oksidaz alt ünite I
dATP	:	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	:	Deoksisitozin trifosfat
ddH₂O	:	İki defa distile su
dGTP	:	Deoksiguanozin trifosfat
dk	:	Dakika
dNTP	:	Deoksiribonükleozit trifosfat
dTTP	:	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
G	:	Guanin
Hd	:	Haplotip çeşitliliği
mg	:	Miligram
MgCl₂	:	Magnezyum Klorür
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
ml	:	Mililitre
ML	:	Maksimum Olasılık
MP	:	Maksimum Parsimoni
mtDNA	:	Mitokondriyal DNA
ng	:	Nanogram
NJ	:	Komşu Katılım
Pi	:	Nükleotit çeşitliliği
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyon
rpm	:	Dakikada dönüş hızı
rRNA	:	Ribozomal RNA
T	:	Timin
TBE	:	Tris-borat-edta
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt

1.GİRİŞ

Okyanuslar, yaklaşık olarak dünya yüzeyinin %71'ini kaplayan, biyolojik çeşitliliğin en eski rezervleri olmakla birlikte bizim hayatımızı destekleyen esas sistemi de oluşturmaktadır. İnsanlığın faydalanacağı ürünler ve hizmetleri sağlayan biyoçeşitlilik büyük ve sürekli artan bir listeyi kapsamaktadır (Roff ve Zacharias, 2011).

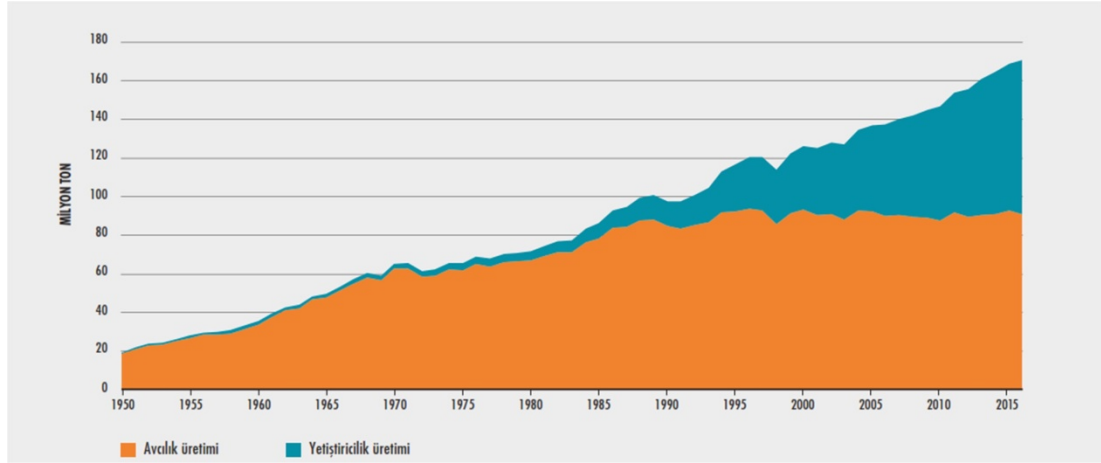
Dünya, son yüzyıllarda önemli derecede artan bir nüfusa maruz kalmıştır. Bu nüfus 1700'lü yıllarda 600 milyon iken 2003 yılında yaklaşık olarak 6.3 milyar insan seviyesine ulaşmıştır (Cohen, 2003). Son tahminlere göre, şu anda 7.2 milyar olan Dünya nüfusunun 11 yıl içerisinde 1 milyar daha artacağı ve hatta 2050 yılıyla birlikte 9.6 milyar kişiye ulaşılacağı düşünülmektedir (Birleşmiş Milletler, Ekonomi ve Sosyal İşler Bakanlığı, 2013). Bu nüfus artışının bir sonucu olarak, özellikle deniz kaynaklarından olmak üzere yiyecek talebi de artmaktadır.

Bu bağlamda, ticari hedef olan türlerin aşırı avcılığı gen kaynaklarının geri dönüşümsüz azalmasına neden olmaktadır. Aşırı avcılığın yanı sıra çok sayıda potansiyel tehdit de bulunmaktadır. Gen kaynaklarının azalmasına neden olan bu tehdit faktörlerin başında; çevresel kirlilik ve çeşitli aktivitelerle canlı habitatlarının bozulması gelir. Bu faktörlerin artan bir şekilde devam etmesi popülasyonların yok olmasına kadar gidecek endişe verici ciddi bir durum göstermektedir (Çiftci, 2006). Böylece insan yaşamında önemli bir yeri olan denizel canlılardan uzun süre faydanın sağlanması için moleküler genetik çalışmalara ağırlık verilmektedir. Bu durumda genetik farklılığın korunması ve gen havuzunun korunması olarak iki farklı yaklaşıma dikkat çeker (Çiftci, 2006). Burada genetik farklılık, popülasyonlar arasında genellikle genetik olarak birbirinden farklı bireylerin göç etmesi ile meydana gelirken popülasyonlar içinde genlerin mutasyonu ile oluşur. Tür içi genetik farklılığı önemi ise canlının çevresel değişimlere karşı uyum göstermesinde yardımcı olan en temel unsurlardan biri olmasıdır (Çiftci, 2006).

Bundan dolayı, birçok ülke kendi gen kaynaklarını belirlemek amacıyla sahip olduğu türler üzerinde yoğun genetik çalışmalar yürütmektedir. Ülkemizde ise

filocoğrafik ve filogenetik yapının belirlenmesi konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Zengin biyolojik çeşitliliğe sahip Türkiye denizlerinde yaşayan yaklaşık 350'nin üzerinde tür ve alt türe sahip Osteichthyes sınıfına dahil deniz balığı türü bulunmaktadır. Ayrıca Türkiye denizlerinde dağılım gösterdiği bilinen yaklaşık 2700 omurgasız türünden 57'si ekonomik değere sahiptir. Bu türlerin Türkiye kıyılarında dağılımları incelendiğinde Akdeniz ve Ege Denizi'nde 48'er, Marmara ve Boğazlar'da 44, Karadeniz'de ise 21 ekonomik tür bulunmaktadır. Kıyusal hayat ve ekosistem için önemli kaynaklar arasında yer alan deniz hıyarlarını da içine alan bu türlerin büyük bir kısmı insan besini olarak tüketilmekte ve bu türlerin yaklaşık %50'si yurt dışına ihraç edilerek ülke ekonomisine katkı sağlamaktadır.

Dünya da balıkçılığın durumu ve Deniz Hıyarı ticaretine bakıldığında, Dünya yüzeyinin yaklaşık %71'ini kapsayan okyanuslar, temel yaşam destek sistemimiz olan biyolojik çeşitliliğin en eski rezervuarı olarak kabul edilmektedir. İnsana fayda sağlayan denizel biyoçeşitliliğin sunduğu hizmet ve ürünler hala önemini korumaktadır ve her geçen gün değeri daha da artmaktadır (Roff ve Zacharias, 2011). Dünya nüfusu 1700'lü yıllarda yaklaşık 600 milyon insandan 2017'de 7.53 milyar'a kadar önemli bir büyüme yaşamış ve Birleşmiş Milletler (BM)'in son tahminlerine göre dünya nüfusunun 2030'da 8,6, 2050'de 9,8 ve 2100'de 11,2 milyarı geçmesinin beklendiğini, Türkiye nüfusunun ise 2050'de 95 milyonu geçeceği öngörmektedir (Birleşmiş Milletler, 2017). Bu nüfus artışının bir sonucu olarak, özellikle deniz kaynaklarından olan gıda talebi de giderek artmaktadır. Genel küresel balık avcılığının belirgin bir şekilde dengelenmesine rağmen (90 milyon ton; Şekil 1.1.), aşırı sömürülen stokların yüzdesi, son on yılda genel bir artış eğilimi göstermiştir (2008 yılında küresel stokların %32,5'i aşırı sömürülmüştür). Son veriler aşırı avcılığın 2011'de %28,8'e düştüğünü göstermektedir (FAO, 2014).



Şekil 1.1. 1950 ve 2016 yılları arasında dünyadaki balıkçılık ve su ürünleri üretimi (Milyon ton) (FAO, 2016).

2016 yılında küresel su ürünleri üretimi, 80,0 milyon ton insan gıdası olarak tüketilen balığı ve 30,1 milyon ton su bitkisi ile 37.900 ton tüketim dışı ürünleri içermektedir. Çiftlik balıkları üretimi 54,1 milyon ton yüzgeçli balıkları, 17,1 milyon ton yumuşakça, 7,9 milyon ton kabukluları ve 938.500 ton kaplumbağalar, deniz hıyarları, deniz kestaneleri, kurbağalar ve yenilebilir denizanası gibi diğer suda yaşayan canlıları içermektedir. 1991 yılından bu yana her yıl dünyanın geri kalanından daha fazla balık üreten Çin 2016 yılında da en fazla çiftlik balıkları üreticisi olmuştur. Ayrıca, Çin ve Endonezya, 2016 yılında en fazla su bitkileri üreten ülkeler arasında ilk sıraları almaktadır. 2016 yılında 16 büyük istatistiksel alan arasında, Akdeniz ve Karadeniz, Güneydoğu Pasifik ve Güneybatı Atlantik değerlendirilen Stokların yüzdeleri sürdürülemez seviyelerde avlanırken, Doğu Orta Pasifik, Kuzeydoğu Pasifik, Kuzeybatı Pasifik, Batı Orta Pasifik ve Güneybatı Pasifik en düşük değerlere sahiptir. Ana pazarda orkinosa ait stokların yüzde 43'ü biyolojik olarak sürdürülemez seviyelerde, yüzde 57'si ise biyolojik olarak sürdürülebilir seviyelerde avlanıldığını göstermektedir (FAO, 2016). 2015 yılında toplam deniz hıyarı istihsal miktarı 35.819,95 ton olup en fazla üretim yapan ülkeler sırasıyla Endonezya (%24,1), Kanada (%23,2) ve Rusya (%14,4)'dır.

Aşırı deniz hıyarı avcılığı, küresel populasyonlarının tükenmeden önce birkaç türünün korunması konusundaki endişeleri tetiklemiştir. Stichopodidae ve Holothuriidea populasyonları üzerine bu endişe hem FAO (Birleşmiş Milletlerin

Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından ifade edilmiş hem de CITES (Yok olma tehdidi altındaki Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme) aracılığıyla vurgulanmıştır. Deniz hıyarı popülasyonlarının sürdürülebilir bir şekilde korunması ve yönetilmesi için bu sözleşmenin Ek II kısmında listelenmiştir (Choo, 2008).

Türkiye'de Ege Denizi, Akdeniz ve Marmara Denizi'ndeki ticari deniz hıyarı türleri yurt içinde tüketilmemektedir, ancak Asya ülkelerine ihraç edilmektedir. Deniz hıyarlarının stoklarını korumak amacıyla 2002 yılından sonra üreme döneminde deniz hıyarı balıkçılığını yasaklayan bir düzenleme yapılmıştır (Anonim, 2002). Ancak, Türkiye'deki mevcut deniz hıyarı stokları ve balıkçılık faaliyetleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Aydın, 2008). Deniz hıyarının Türkiye'de 1996 yılından itibaren ihracatı yapılmakta olup ticareti yapılan türlerden yoğun olarak kara sularımızda *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata*, *Stichopus regalis* bulunmaktadır. Türkiye'deki üretim son yıllarda 500 tona kadar ulaşmıştır (Gonzalez-Wangüemert vd., 2014 ve 2015).

Deniz hıyarı (Deniz Patlıcanı)'nın ekosistemdeki önemine bakacak olunursa, omurgasız türlerin yer aldığı 6 sistematik gruptan (Porifera, Cnidaria, Polychaeta, Crustacea, Mollusca, Echinodermata) biri olan Echinodermata (derisi dikenliler) grubunun deniz hıyarı olarak bilinen Holothuroidea sınıfı içinde olan canlıdır. Hemen hemen her deniz ekosisteminde yaşayabilen bu canlılar daha çok tropikal sığ sularda ve mercan resif alanlarında bulunup, sığ sulardan derin okyanus tabanlarına kadar yayılış gösterirler. Eşeyli üremekle birlikte dış döllenme yapan deniz hıyarları deniz dibinde çökelti halde bulunan ölü organik madde ya da organik atıklarla beslenerek doğal bir dönüşümü gerçekleştirirler. Denizlerin kurdu olarak adlandırılan deniz hıyarları substratunu karıştırmak ve değiştirmekten sorumludurlar (Bruckner vd., 2003). Holothurianlar, büyük miktarda sedimenti barsaklarından geçirerek, başta canlı diatomlar olmak üzere bakteri, detritus ve düşük içerikli organik maddeyi asimile eden sediment süzücü canlılardır (Yingst, 1976; Moriarty, 1982; Uthicke, 1999). Ağızlarına aldıkları partiküllerin boyutunu değiştirebilir ve sediment olarak dönüşümünü sağlayabilirler. Substratum daha küçük partiküllere parçalanarak, resiflerin dalyanların veya diğer habitatların üst sediment tabakasına dönüşür ve oksijenle penetrasyon sağlanmış olur (Bruckner vd., 2003). Deniz hıyarları gömülme

hareketiyle, deniz zemininin üst tabakasının gevşemesine neden olur. Hem beslenme hem de hareket aktivitesiyle, aneorobik koşulların oluşmasını engelleyerek (Kitano vd., 2003) ortam koşullarını iyileştirir ve tür çeşitliliğinde artışa neden olur. Bazı bölgelerde deniz hıyarının bulunmayışı, deniz tabanının katılaşmasına neden olabilmekte, bu durum diğer bentik ve gömülü yaşayan canlılar için gerekli habitatın yok olmasına neden olabilmektedir (Bruckner vd., 2003). Deniz hıyarı bentik döngü sisteminin önemli bir komponenti (Uthicke, 1999) ve bentik koşullarını iyileştirici olması (Kitano vd., 2003) nedeniyle ekosistem için önemli bir su ürünleri türüdür.

Deniz Hıyarı'nın Dünya'daki ve Türkiye'deki Dağılımına bakıldığında, Dünya denizlerinde 1200'e yakın deniz hıyarı türü bulunmakla birlikte ticari avcılığı yapılan yaklaşık 70 tür bulunmaktadır. Bu canlılar 40'tan fazla ülkede avlanmakta ve hasadın çoğu işlendikten sonra Asya pazarına ihraç edilmektedir. Deniz hıyarı avcılığı, Doğu ve Güney Afrika ülkeleri, Kuzey Pasifik ve Kuzey Atlantik okyanuslarına kadar özellikle tropikal sularda olmak üzere tüm dünya ülkelerinde yapılmaktadır. Türkiye denizlerinde yapılan araştırmalarda 144 tür Echinodermata'nın üçte birinin Holothuridler olduğu saptanmıştır (Tortonose, 1965). Akdeniz'de bilinen 5 takım 9 familyaya ait 37 tür bulunmaktadır (Fischer vd., 2014). Ülkemizde Ege Denizi, Akdeniz ve Marmara Denizi'nde dağılım gösteren ve deniz patlıcanı olarak da bilinen deniz hıyarları, 8 tür ile temsil edilmektedir (Aydın, 2015). Bu türler *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata*, *Holothuria (Platyperona) sanctori*, *Holothuria forskali*, *Stichopus regalis*, *Synaptulare ciprocans* ve *Stereoderma kirschbergi*'dir.

Gıda sektöründe pişirilmiş ya da çiğ olarak tüketilen deniz hıyarları 18.yy'dan bu yana dünyanın çeşitli ülkelerinde gıda ürünü olarak yerini almaktadır. Bazı insanlar vücut duvarlarını çiğ olarak genellikle limon suyuyla tüketirken, Fijililer Hindistan cevizi sütünde pişirirler, Papua Yeni Gineliler ızgarasını yaparlar (Preston, 1993), Japonya'da ise tütsülenmiş çiğ et sirke ve soya sosuyla tüketilir. Deniz hıyarının diğer organları da tüketilebilmektedir. Ovaryumları kurutularak ya da tuzlanarak ve fermente edilerek gıda tüketiminde önemli bir yer almaktadır. Bağırsakları hatta solunum aracı olarak adlandırdığımız kısım da besin maddesi olarak tüketilir (Richards, vd., 1994).

Sağlık sektöründe deniz hıyarları gıda sektöründe kullanılmasının yanında, kozmetik, tıp, alternatif tıp ve ilaç sanayinde de kullanılmaktadır. Malezya’da “Gamat” olarak adlandırılan deniz hıyarından geleneksel olarak gamat yağı ve gamat suyu elde edilmekte, diş macunu ve sabun yapımında kullanılmaktadır (Choo ve Williams, 2004). Çin’de “Trepan” olarak adlandırılan deniz hıyarı kuvvet verici ve geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Böbrek sistemi bozukluğu, barsak hastalıkları (kabızlık ve sık idrar yapma) gibi hastalıkları iyileştirmek için eski çağlardan beri deniz hıyarı tüketilmektedir. Ayrıca kapsül ve tablet şeklinde, vitamin ve ek besin kaynağı olarak satılmaktadır. Polisakkaritcondroitin sülfatın zengin kaynağı olan deniz hıyarı eklem iltihabı (arthritis) ağrılarını da azaltmaktadır. Saponin ve polisakkarit içermesinden dolayı anti kanserojen madde olarak ilaç sanayisinde kullanılmaktadır (Chen, 2003).

Bu çalışmada ana konusu olan genetik çeşitlilik, bir türün genetik yapısındaki toplam genetik özellik miktarı olarak tanımlanır ve türlerin “sağlığını” veya uygunluğunu değerlendirmek için yararlı bir parametredir. Ayrıca, popülasyonların değişen ortam şartlarına uyum sağlaması için bir araç olarak hizmet etmektedir. Daha fazla varyasyonla birlikte, popülasyondaki bireylerin çevreye uygun alel çeşitliliğine sahip olma olasılığı daha da artacaktır. Bu alel genleri taşıyan bireylerin yeni yavrular üretmek için hayatta kalma olasılıkları da daha yüksektir. Popülasyon, bu bireylerin hayatta kalma başarısından dolayı nesiller boyu devam edecektir. Uluslararası Doğanın Korunması Birliği (IUCN) tarafından genetik çeşitlilik türlerin evrimsel potansiyelinin korunması için kabul edilen üç biyoçeşitlilik türünden biri gibi kabul edilmektedir (Roff ve Zacharias, 2011). Popülasyonların aşırı sömürülmesi ya doğrudan popülasyon büyüklüğünün azalmasına yada stoklar arasındaki göç miktarını azaltarak, genetik çeşitliliğin kaybolmasını neden olacaktır (Allendorf vd., 2014; Pinsky ve Palumbi, 2014). Bununla birlikte, popülasyon genetiğinde etkili popülasyon büyüklüğü veya “Ne” (Watts vd., 2007) olarak tanımlanan ve üreme açısından başarılı bireylerin sayısı, doğurganlık seviyesini ve genetik çeşitlilikteki azalmanın oranını belirler. Bir tür aşırı avlanma yoluyla popülasyon büyüklüğünde aşırı azalmalar yaşıyorsa genetik sürüklenmenin stokastik etkisi artar. Bu da mutasyon hızının (yani çeşitlilik kaynağı) genetik sürüklenme tarafından belirlenen genetik çeşitlilik kaybını dengelemek için yeterli olmayacağı

anlamına gelmektedir. Üstelik, etkili popülasyon büyüklüğü (N_e) azaldığı gibi, doğal seleksiyon ve genetik sürüklenme arasındaki denge de değişir, bu da gen frekansındaki değişikliği desteklemektedir (Hare vd., 2011). Azalan bir N_e , seçim yoluyla seçilen adaptif alellerin sabitlenmesi, genel uygunluğun azaltılması ve çevresel değişime adaptif tepkilerin sınırlandırılması yerine, zararlı alellerin sabitlenme olasılığını artırarak genetik çeşitliliğe zarar verebilir (Allendorf vd., 2014). Diğer yandan, geçmişe dönük N_e 'nin kullanımı balıkçılık yönetimi için çok faydalı olabilir, çünkü popülasyonların aşırı avcılık öncesi tahminleri, balıkçılık kaynaklarından gelen demografik verilerin doğrulanmasına katkı sağlayabilir (Ovenden vd., 2016).

Çalışmanın gerekçesi ve amacı kapsamında değerlendirme yapıldığında, son yıllarda sucul üretimdeki genişleme ve büyüme çevre üzerinde baskı oluşturmakta; baskının balık çiftliklerinin atıkları ve besleyici tuzlar nedeniyle olduğu kabul edilmektedir. Askıda ki katı maddeler taşınan sularda çözülmüş oksijen değerlerinin düşmesine neden olmaktadır. Besleyici tuzlar (nutrient) ve bu sebeple artan alg artışı ise kıyısız ve iç sularda ötrofikasyona sebep olur. Bu da ekosistemde hızlı bir şekilde organik madde artışına neden olmaktadır (Nixon, 1995). Deniz hıyarı, böyle bir biyolojik kirliliği engelleyebilecek bir canlıdır. Deniz hıyarının artan piyasa talebi ile birlikte kontrolsüz ve/veya yetersiz balıkçılık yönetiminden kaynaklı aşırı avcılığı büyük bir önem teşkil etmektedir. Benzer morfolojiye sahip olmalarından dolayı tür ayrımının çok zor yapılması, yaşam stratejileri, popülasyon dinamikleri ve evrimsel tarihleri hakkında çok az bilgiler bulunması en temel sorunlardır.

Ülkemizde bu türün filogenetik yapısının belirlenmesi konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Zengin biyolojik çeşitliliğe sahip Türkiye denizlerinde yaşayan bu ticari türlerin kendi aralarındaki filogenetik ilişkinin bu çalışmayla ortaya konulması amaçlanmaktadır. Bu örneklerin genetik yapısı mtDNA'nın farklı gen bölgeleri sekans analiz yöntemiyle belirlenecek ve elde edilen sonuçlar bu aile üyeleri üzerine yapılmış diğer çalışmalarla karşılaştırılacak ve kendi aralarındaki akrabalık ilişkileri belirlenecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında çoğunlukla yabancı araştırmacılar tarafından Atlantik ve Akdenizde yürütülen çalışmalar olduğu ve bu çalışmaların bir kısmında Ege türlerini de içeren ekolojik ve sınırlı miktarda moleküler araştırmayı kapsadığı görülmektedir. Her geçen yıl ekolojik dengesinde değişimlerin saptandığı Türkiye kıyılarındaki araştırma sayısının azlığı dikkat çekicidir.

Aydın (2008) çalışmasında Türkiye'deki potansiyel deniz hıyarı balıkçılığı incelenmiş ve Ege Denizi, Akdeniz ve Marmara Denizi'ndeki deniz hıyarı türlerinin ticari durumu hakkında bilgiler vermiştir. Türkiye'de 2002 yılına kadar ticari deniz hıyarı hasadına ilişkin bir düzenleme olmadığı fakat ancak 2002 yılından sonra, deniz hıyarı stoklarını korumak amacıyla üreme döneminde deniz hıyarı avcılığını yasaklayan bir yönetmelik çıkarıldığı belirtilmiştir.

El-Naggar ve ark. (2008), Holothuroidea'ların Kızıldeniz'deki sistematüğını ve taksonomisini netleştirmek için moleküler filogenetik analizi yapmışlar ve bu bağlamda dört deniz hıyarı türünden mitokondriyal 16S rRNA genine ait DNA dizisi elde etmişlerdir. Holothuroidea'nın maksimum olasılık yöntemini kullanarak elde edilen moleküler filogeni sonuçlarının büyük ölçüde kalkerli parçaların morfolojisine dayanan mevcut taksonomisiyle çeliştiğı gözlenmiştir. Mevcut sonuçlar, *Holothuria fuscogilva*, *Actinopyga mauritiana* ve *Holothuria nobilis* türlerinin, *Cucumaria frondosa*, *Pentacta pygmaea*, *Cucumaria pseudocurata* ve *Psolus fabricii* türleri ile %100 benzer olduğu doğrulamışlardır. Araştırmacılar, deniz hıyarı ailesinin derinlemesine filogenetik analizi için genom/genlerin daha yavaş evrimleşen bölgelerinin de incelenmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Borrero-Perez ve ark. (2009) çalışmalarında, moleküler ve morfolojik verileri, Akdeniz ve Atlantik Okyanusu'ndan Holothuriidae familyası üyeleri, *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1790, *Holothuria stellate* Delle Chiaje, 1823, *Holothuria mammata* Grube, 1840 ve *Holothuria dakarensis* Panning, 1939 türlerinin taksonomik durumunu değerlendirmek için kullanmışlardır. 16S rRNA geni, türler arasında net genetik farklılaşma ile iyi desteklenmiş üç kladı ayırt etmiştir. Morfometrik karakterler, kladları yansıtsalar da, büyük değişkenlik olduğunu ve farklı kladlardan bazı

örneklerin üst üste geldiğini göstermiştir. Morfolojik veriler ve literatür, kladların *H. dakarensis*'e (Cape Verde Adaları'ndan), *H. mammata*'ya (Atlanto-Akdeniz bölgesinden) ve *H. tubulosa*'ya (Akdeniz'den) karşılık geldiğini göstermiştir. Ayrıca, *Holothuria stellati* türünün *H. tubulosa*'nın sinonimi olduğu kabul edilmiştir.

Borrero-Perez ve ark. (2010) çalışmalarında Holothuridae türlerinin Kuzey Atlantik ve Akdeniz'de ki taksonomik yapısını moleküler filogenetik analiz yöntemi ile incelemişlerdir. Ayrıca mitokondriyel markır ve moleküler saat hipotezi kullanarak aile çeşitliliği için bir zaman ölçeği oluşturmuşlardır. Sonuç olarak, alt cins olan *Holothuria* ve *Roweothuria* parafiletik olarak alınmış ve dört ayrı nesil farklı zaman aralığında tanımlanmıştır. Ayrıca, bilinen uzun evrimsel tarihe sahip en az üç tür tespit edilmiş (*Holothuria forskali*, *Holothuria sanctori* ve *Holothuria impatiens*) ve sırasıyla *Holothuria*, *Roweothuria* ve *Vaneyothuria*'ya ait altı tür birbiri ile farklılaşmıştır.

Vergara-Chen ve ark. (2010) çalışmalarında, COI ve 16S olmak üzere iki ayrı gen bölgesini kullanarak Mar Menor kıyusal lagünü ve deniz kıyısı boyunda küçük ölçekli bir alandaki *Holothuria polii*'nin genetik yapısını incelemişlerdir. Ayrıca mitokondriyel sekanslara ait data seti, kıyusal lagün alanları ve deniz suyu arasındaki çevresel farklılıkların popülasyon genetik yapısı üzerindeki etkisini test etmekte kullanılmıştır. Bütün örneklenen lokasyonlar, yüksek seviyede haplotip çeşitlilik ve düşük değerlerde nükleotid çeşitlilik göstermiştir. Küçük farklılıklar için COI gen bölgesi ve farklı mutasyon oranına ya da özel haplotiplerin sayısına bağlı olabilecek küçük değişiklikler için 16S gen bölgesi kullanılarak, bu iki gen bölgesi genetik farklılaşım işaretlerini birbiriyle karşılaştırarak göstermiştir. Popülasyon büyümesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmış özel haplotipler ve aşırı derecede yeni mutasyonlar belirlenmiştir. Selektif işlemler, kullanılan gen markırlarını etkiliyor olsa da yüksek önem taşıyan yaygın ek modeller, 16S geninden ve sıcaklık ve tuzluluk gibi bağımsız değişkenlerden gelen veriler dikkate alınarak gözlemlenmiştir.

Borrero-Perez ve ark. (2011), yaygın olarak dağılm gösteren deniz hıyarı *Holothuria mammata* Grube, 1840 popülasyonlarının genetik yapısını ve deniz ortamında bulunan engellerinin gen akışı ve tarihsel süreçler üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, dört Atlantik lokasyonundan ve dört Akdeniz

lokasyonundan 177 örnekte mitokondriyal 16S ve COI gen dizilerini analiz etmişler ve her iki gen bölgesi için Haplotip çeşitliliğinin yüksek (16S için $Hd = 0.9307$ ve COI için 0.9203) ve haplotiplerin yakından ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (16S için $p = 0.0058$ ve COI için 0.0071). En düşük genetik çeşitlilik Ege Denizi popülasyonunda bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, COI geninin popülasyon yapısının tespiti için 16S geninden daha değişken ve daha etkili olduğunu göstermiştir. MtDNA haplotiplerinden popülasyon çiftleri için hesaplanan F değerleri ve AMOVA sonuçları sırasıyla: (i) Ege Denizi'ndeki popülasyon ile diğer bölgelerdekiler arasında, her iki mitokondriyal gen tarafından desteklenen önemli bir genetik kırılma olduğu (ii) Kanarya ve Azor Adaları'nın diğer popülasyonlardan zayıf da olsa farklılaştığı ancak, Macaronezya Adaları, Algarve ve Batı Akdeniz'den gelen popülasyonların panmiktik bir metapopülasyon olduğu belirlenmiştir.

Mezali (2011), çalışmasında, Cezayir kıyılarındaki çeşitli sığ su bölgelerinden taksonomik belirsizlikler taşıyan beş farklı türün 22 bireyini örnekleyerek 600bç uzunluğunda 16S rRNA gen bölgesinde filogenetik analiz yapmıştır. Bu çalışmada ilk olarak bazı yayınlarda tartışılan iki farklı renkli morfolojiye sahip *Holothuria sanctori*'nin aynı soydan geldiği tanımlanmıştır. Her zaman karışıklık gösteren *Holothuria stelatti*'nin genetik olarak diğer türlerden ayrı olduğu, Akdeniz'de en iyi bilinen ve en yaygın tür olan *Holothuria tubulosa*'nın birbirinden ayrı iki popülasyonun da aynı soydan geldiği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada toplanan türlere ait birkaç örneğin sekansında tespit edilen farklılaşmanın muhtemelen daha önce bilinmeyen bir türü ya da iki bilinen tür arasındaki bir hibriti (*Holothuria polii* ve *Holothuria stelatti*) temsil edebileceği belirtilmiştir.

Valente ve ark. (2014) çalışmalarında *Holothuria polii*'nin mtDNA COI ve 16S rRNA gen bölgelerini kullanarak türün genetik yapısını analiz etmişlerdir. Örnekler Akdeniz'de çok sayıda türün dağılım gösterdiği 7 lokasyondan toplanmıştır. Toplam 142 *H. polii* bireyinde 517bç uzunluğunda COI gen bölgesi ve 134 bireyinde 447 bç uzunluğunda 16S rRNA gen bölgesi analiz edilmiştir. COI gen bölgesi için yüksek haplotip çeşitliliği ($Hd=0.9297$), 16S rRNA gen bölgesi için orta derecede çeşitliliği ($Hd=0.6537$) ve iki gen bölgesi için düşük nükleotit çeşitliliği belirlenmiştir. COI gen bölgesi için sonuçlar devam eden popülasyon büyümesini belirterek birkaç mutasyonal değişimle birlikte birçok yeni ve özel haplotiplerin olduğunu göstermiştir. Doğu

Akdenizden Kuşadası örneklerini de içeren çalışmada COI gen bölgesi için Kuşadası örnekleri diğer örnekleme lokalitelerine göre daha yüksek sayıda haplotip, özel haplotip, polimorfik site ve haplotip çeşitliliğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Gonzalez-Wangüemert ve ark. (2015) çalışmalarında Türkiye’de iki hedef tür olan *Holothuria polii* ve *Holothuria tubulosa*’nın genetik yapısı ve biyometrisi üzerinde avlanmanın etkisini incelemişlerdir. Ayvalık ve Kuşadası’ndan 42 *H. polii* bireyi üzerinde yapılan 517bp uzunluğundaki COI sekans analizi bize 23 farklı haplotip olduğunu göstermiştir. Bunlardan 7 tanesi hem Kuşadası hem de Ayvalık’taki bireyleri kapsarken diğer haplotipler Kuşadası 10 ve Ayvalık 6 olmak üzere bölgelere dağılmıştır. 16SrRNA genini aynı bireyler için analiz edildiğinde 432bp’de 16 haplotip gözlemlenmiştir. 4 haplotip lokaliteler arasında paylaşılmıştır ve her lokaliteye özgü 6 haplotip belirlenmiştir. Kuşadasında avcılığın yasak olduğu bölgedeki büyük *Holothuria polii* bireylerinin en yüksek genetik çeşitliliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca benzer sonuçlar *Holothuria tubulosa* için de gözlemlenmiştir.

Henriques ve ark. (2016) çalışmalarında 9 yeni polimorfik mikrosatelit markırı *Holothuria mammata* için geliştirmiş ve bu mikrosatelitler üç farklı örnekleme lokasyonunda test edilerek karakterize edilmiştir. Bu 9 mikrosatelinin tamamı 11’den 22’ye sıralı yüksek sayıda alellerle ve 0.52 ve 0.92 arasındaki beklenen heterozigotlukla birlikte yüksek polimorfizm ve çeşitlilik göstermiştir. Popülasyonlar arasında önemli derecede genetik farklılıklar görülmüştür. Bu mikrosatelit markırının, aşırı avlanmaya maruz kalmış popülasyonlarda, stokların belirlenmesi, genetik çeşitliklerin değerlendirilmesi, gen akışı tahminini ve avcılık etkisinin gözlemlenmesinde içine alan avcılık yönetiminde uygulanabilecek çok önemli bilgiler sağladığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deniz Hıyarı Materyalleri

Çalışmada, Holothuriidae ailesine dahil ve Türkiye denizlerinde yayılım gösteren *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788), *Holothuria polii* (DelleChiaje, 1823), *Holothuria mammata* (Grube, 1840) ve *Holothuria sanctori* (DelleChiaje, 1823) türlerinin örnekleme yapılmıştır.

Holothuriidae familyasında denizhıyarı türlerinin sistematik kategorisi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan Türlerin Sistematiği

Alem	Animalia
Şube	Echinodermata
Altşube	Eleutherozoa
Sınıf	Holothuroidea
Takım	Aspidochirotida
Aile	Holothuriidae
Cins	Holothuria
Tür	<i>Holothuria tubulosa</i> <i>Holothuria polii</i> <i>Holothuria mammata</i> <i>Holothuria sanctori</i>

3.1.1. *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788)

Bu tür, Cezayir, Hırvatistan, Fransa, Cebelitarık, İtalya, Karadağ, Portekiz ve Türkiye'den Akdeniz ve çevresindeki Atlantik sularında bulunur (Samyn, 2013). Ülkemizde *Holothuriatu tubulosa* Ege denizinde sıkça rastlanan türlerden biridir. Kumlu, çamurlu ve yumuşak zeminleri tercih ederler. Ayrıca deniz çayırlarının kenarlarında ve az miktarda da olsa kayalık sert zeminlerde bulunabilirler (Şekil 3.1). Yoğun olarak 0-20 m derinliklerde yaşasalarda 50m derinlikteki sularda da yaşayabilirler (Aydın, 2016). Dorsalde, koyu kahverengi renkte olup, vucut kalın çıkıntılarla kaplıdır, ventralde ise daha açık renkli olup çok sayıda tüp ayaklar (podia)

mevcuttur. Genellikle, zeminde bulunan organik partiküllerle beslenmektedirler. Diğer deniz hıyarlarında olduğu gibi rahatsız edildiklerinde kasılmaktadırlar. Özellikle, Haziran-Eylül ayları arasında suların sıg kesimlerinde ürerler. Larvaları planktoniktir ve yaklaşık 7-13 hafta süren bu dönemden sonra dibe yerleşirler. Yaklaşık olarak 8 yıldan daha uzun yaşayan bireyler 5-6 yılda cinsel olgunluğa ulaşmaktadırlar (Aydın, 2016) (Şekil 3.2).



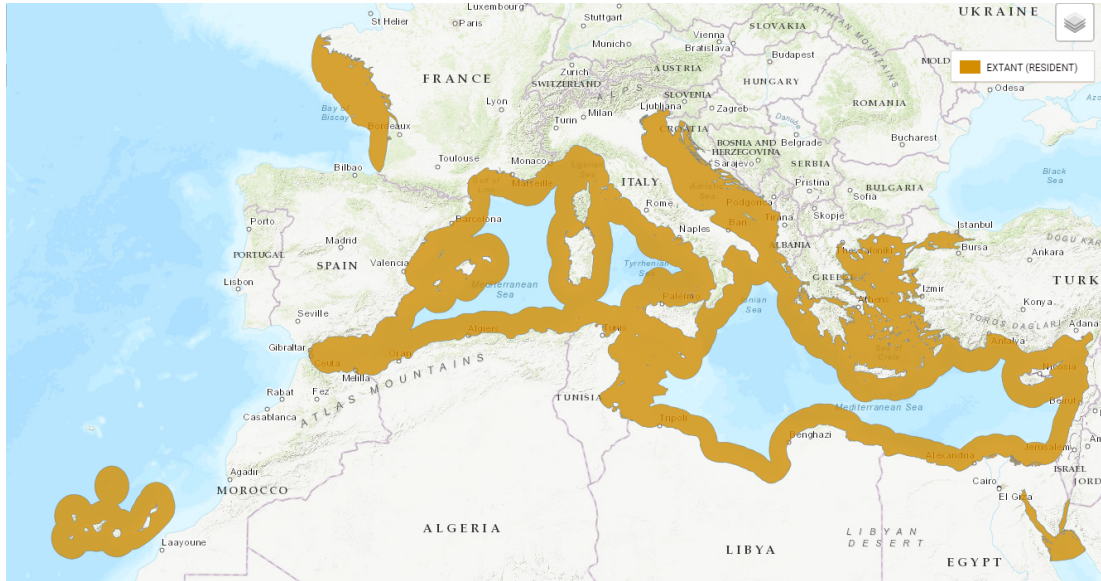
Şekil 3.1. *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) türünün coğrafik dağılımı (Samyn, 2013). Kahverengi ile belirtilmiş kısımlar dağılım alanlarını göstermektedir.



Şekil 3.2. *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1970)'nın 'ün genel görüntüsü (Anonim, 2018).

3.1.2. *Holothuria polii* (DelleChiaje, 1823)

Bu tür, Cezayir, Hırvatistan, İtalya, İspanya (ayrıca Kanarya Adaları), Fransa (ayrıca Atlantik kıyısı) ve Türkiye dahil olmak üzere Akdeniz'de bulunur. Kuzey Kızıldeniz'deki Süveyş Körfezi'nde de bulunur (Mercier, 2013). *H. polii*, özellikle Türkiye de, Ege Denizi'nin Kuzeyinde bulunan en yaygın deniz hıyarı türüdür (Şekil 3.3). Bu tür daha çok *H. tubulosa* türü ile aynı ortamları paylaşır ve benzer şekilde deniz çayırlarının etrafında bulunan çamurlu yumuşak zeminleri yaşam alanı olarak tercih ederler (Aydın, 2016). Genellikle, vücut kahverengi veya siyah renkte olup ventral kısmın yüzeyinde çok sayıda tüp ayaklar (podia) bulunmaktadır ve büyük bireylerde tüp ayakların uç kısımları beyaz renklidir. Dorsal de çıkıntılar bulunmamaktadır. Ülkemizde bulunan türler arasında en küçük tür olması ve et içerisinde kalkerik yapıların çok olmasından dolayı diğer türlere göre ticari olarak az tercih edilirler (Aydın, 2016) (Şekil 3.4).



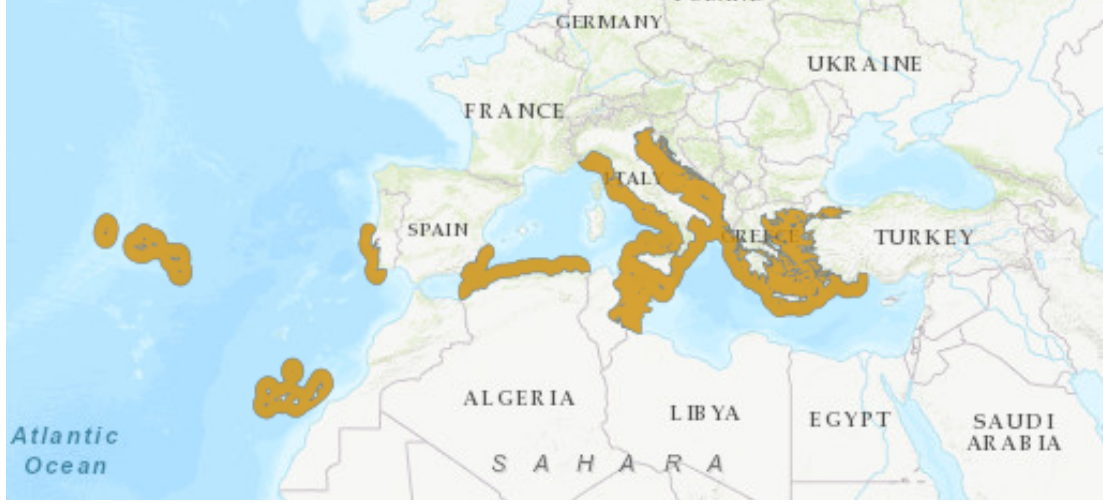
Şekil 3.3. *Holothuria polii* (DelleChiaje, 1823) türünün coğrafik dağılımı (Mercier, 2013). Kahverengi ile belirtilmiş kısımlar dağılım alanlarını göstermektedir.



Şekil 3.4. *Holothuria polii* (DelleChiaje, 1823)'nin genel görüntüsü (Anonim, 2012a).

3.1.3. *Holothuria mammata* (Grube, 1840)

Bu tür, İspanya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Hırvatistan ve İtalya dahil olmak üzere Akdeniz'de bulunur ve Meksika'nın doğu kıyısındaki Meksika Körfezi'ndeki bir bölgeden de kayıtlar mevcuttur (Borrero-Perez ve ark. 2009). Aynı zamanda güney Portekiz ve Azor ve Kanarya Adaları'nda (Borrero-Perez ve ark. 2009), Cezayir'de (Mezali, 2011) ve Malta'da (Tanti ve Schembri, 2006) görülür (Mercier ve Hamel, 2013a) (Şekil 3.5). *Holothuria mammata* ticari olarak çok tercih edilen bir tür olsa da Ege denizinde *H. tubulosa* ve *H. polii* kadar yoğun bulunmamaktadır. Vücudun da, deri üzerinde çok sayıda kalın çıkıntılara sahiptir. Renk kırmızıya çalan eflatun rengindedir. Et kalınlığı fazladır. *H. tubulosa* türüne çok benzediğinden türün ayrımı yapmak kolay değildir. Diğer türlerle birlikte yaşarlar fakat daha sert zeminleri tercih etmektedirler (Aydın, 2016) (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. *Holothuria mammata* (Grube, 1840) türünün coğrafik dağılımı (Mercier ve Hamel, 2013a). Kahverengi ile belirtilmiş kısımlar dağılım alanlarını göstermektedir.



Şekil 3.6. *Holothuria mammata* (Grube, 1840)'nın genel görüntüsü (Anonim, 2008).

3.1.4. *Holothuria sanctori* (DelleChiaje, 1823)

Bu tür Hırvatistan, Fransa, İtalya, Portekiz, Saint Helena, İspanya'nın güneyinde, Türkiye (Aydın, 2008), Cape Verde (Wirtz, 2009), Kanarya Adaları (Borrero-Perez ve ark. 2009), Cezayir (Mezali, 2011) ve Meksika'da bulunmaktadır (Mercier ve Hamel, 2013b) (Şekil 3.7). Ülkemizde *Holothuria sanctori*, Akdeniz, Ege ve Marmara'da bulunan ve daha çok karanlık kayaların arasında, mağaralarda ve oyuklarda yaşayan bir türdür. Cuvier organları vardır ve herhangi bir tehlike sezdikleri durumda ortama ağ şeklinde salgı yayarlar. Bu tür, Ticari bir tür olmasına rağmen

stoklarının küçük olması ve salgılarından dolayı toplamasının zor olmasından dolayı çok fazla tercih edilmezler. *H. sanctori* türün de kahverengi renk baskın olup vücut üzerinde boyuna dizilmiş halde sarı renkli ve orta kısımları kahverengi konik yapıda Papilaları bulunmaktadır. Dış görünüşlerindeki bu özellikleri ile diğer türlerden ayırt edilmesi nispeten kolaydır. Tür, ventral de sarımsı renkte olup dorsal kısma göre daha açık renklidir. Yaygın bulunan bir tür değildir ve daha çok kayalık bölgelerde, kaya oyuklarında ve mağaralarda sert yüzeylerde yaşarlar (Aydın, 2016) (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. *Holothuria sanctori* (DelleChiaje, 1823) türünün coğrafik dağılımı (Mercier ve Hamel, 2013b). Kahverengi ile belirtilmiş kısımlar dağılım alanlarını göstermektedir.



Şekil 3.8. *Holothuria sanctori* (DelleChiaje, 1823)'nin genel görüntüsü (Anonim, 2012b).

3.2. Örnekleme

Bu çalışmada Ege denizinde dağılım gösteren *Holothuria* türlerine ait mitokondriyal 16S rRNA ve COI gen bölgelerine ait sekanslar elde edilerek filogenetik analizlerinin yapılması amacıyla, ülkemizde dağılım gösteren 4 tür ve her türden 5'er örneğin çalışılması planlanmıştır. Ege denizi Kuşadası ve Ayvalık lokasyonlarında dağılım gösteren tüm türler (*Holothuria polii*, *H. tubulosa*, *H. mammata*, *H. sanctori*) örneklenmiştir. Ayrıca GenBank'ta bulunan Holothuriidae'nin Akdeniz ve Ege denizinde dağılım gösteren türlerine ait sekans verileri Gen bankasından alınarak birlikte analiz edilmiştir (Çizelge 3.2). Ege denizi örnekleri İzmir ilinde deniz hıyarı işleme tesisinden ticari amaçla yakalanmış deniz hıyarlarından elde edilmiştir. Türkiye'de Ege denizinden, 2 farklı lokaliteden (Şekil 3.9) 4 türe ait 20 örnek toplanmıştır. Örneklem yapılırken deniz hıyarlarının kas dokuları neşter yardımıyla yaklaşık 2 cm kesildikten sonra 1,5 ml'lik eppendorf tüplerde %98'lik etanole konularak laboratuvara getirilmiştir. *Stichopus regalis* türü ise trol gemisinden çıkarıldıktan sonra bütün canlı %98'lik alkole konularak laboratuvara ulaşımı sağlanmış ve laboratuvar çalışması yapılana kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Bu çalışmaya dahil edilen Deniz hıyarı türleri, referanslar, GenBank ulaşım numaraları ve örneklerin lokasyonları

Türler	Referanslar	GenBank Ulaşım No		Lokasyon
		16S rRNA	COI	
<i>H. mammata</i>	Bu çalışma	(M3)	(M1)	Ege Denizi, Kusadasi, Turkey
<i>H. mammata</i>	Bu çalışma	-	(M2)	Ege Denizi, Ayvalık, Turkey
<i>H. mammata</i>	2; 1	EU191949	GQ214743	Canary Islands, Spain
<i>H. mammata</i>	2; 1	EU191957	GQ214744	Azores Islands, Portugal
<i>H. mammata</i>	1	GQ214729	GQ214745	Cabo de Palos, Spain
<i>H. mammata</i>	2; 1	FJ231190	GQ214746	Algarve, Portugal
<i>H. tubulosa</i>	Bu çalışma	(T3)	(T1)	Ege Denizi, Kusadasi, Turkey
<i>H. tubulosa</i>	Bu çalışma	-	(T2)	Ege Denizi, Ayvalık, Turkey
<i>H. tubulosa</i>	1	GQ214731	GQ214749	Aguilas, Spain
<i>H. tubulosa</i>	1	GQ214732	GQ214751	Gerona, Spain
<i>H. tubulosa</i>	4		KJ719531	Aegean Sea, Kusadasi, Turkey
<i>H. tubulosa</i>	5		JN207602	Azores, Portugal
<i>H. dakarensis</i>	2; 1	EU191979	GQ214752	Cape Verde Islands
<i>H. arguinensis</i>	1	GQ214735	GQ214755	Algarve, Portugal
<i>H. arguinensis</i>	3		JX125700	Algarve, Portugal
<i>H. polii</i>	Bu çalışma	(P2)	(P1)	Ege Denizi, Kusadasi, Turkey
<i>H. polii</i>	Bu çalışma	(P4)	(P3)	Ege Denizi, Kusadasi, Turkey
<i>H. polii</i>	1	GQ214738	GQ214758	Mar Menor, Spain
<i>H. polii</i>	4	KJ408308	KJ493933	Ege denizi Kuşadası; Crete, Eastern Mediterranean
<i>H. polii</i>	4		KJ493917	Mallorca, Western Mediterranean
<i>H. lentiginosa</i>	1	GQ214733	GQ214753	Alboran Island, Spain
<i>H. impatiens</i>	1	GQ214739	GQ214760	Cabo de Palos, Spain
<i>H. sanctori</i>	Bu çalışma	(S1)	-	Ege Denizi, Kusadasi, Turkey
<i>H. sanctori</i>	Bu çalışma	(S4)	-	Ege Denizi, Kusadasi, Turkey
<i>H. sanctori</i>	1	GQ214741	GQ214763	Canary Islands, Spain
<i>H. sanctori</i>	1	GQ214742	GQ214764	Cabo de Palos, Spain
<i>P. regalis</i>	6	KM048346	KM048377	Spain
<i>P. regalis</i>	6	KM048345	KM048352	Spain
<i>Cucumaria frondosa</i>		KF479389		Outgrup

Refs. (1) Borrero-Pérez vd. (2010); (2) Borrero-Pérez vd. (2009); (3) González-Wangüemert ve Borrero-Pérez (2012); (4) González-Wangüemert vd. (2015); (5) Honey-Escandon vd. (2012); (6) Maggi ve Gonzalez-Wanguemert (yayınlanmamış).



Şekil 3.9. Örneklerin toplandığı lokalitler. 1-Aydın (Kuşadası); 2-Balıkesir (Ayvalık)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Toplam DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu %98'lik etanol'de saklanan örneklerin kas dokularından yapılmıştır. Toplam DNA'nın ekstraksiyonunda fenol/kloroform-CTAB-Merkaptanol yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Kaliteli ve optimum DNA eldesi için yaklaşık olarak 200 ile 300mg arası doku örneği kullanıldı. Dondurma işleminden önce alınan doku örnekleri alkollerini uçana kadar 2-3dk havlu kâğıt üzerinde bekletildi. Bu işlemden sonra -80°C'de 18 saat dondurulup havanda ezilen doku örneği 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere konuldu. Daha sonra Eppendorf tüplere 700 µl Homojenizasyon çözeltisi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılıp santrifüj yapılarak 60°C'de 1.5-2 saat sarsaklı inkübatöre konarak homojenizasyon işlemi yapıldı.

Dokular 15'er dakika arayla kontrol edilerek vortekslendi. Homojenize olmuş örnekler santrifüj yapılarak üst kısım yeni tüplere aktarıldı. 700µl (eşit hacimde) kloroform: isoamil alkol (24:1) ilave edilip elle tabakalaşma kaybolana kadar ters-düz edilerek karıştırıldı. 10.000 rpm'de 5 dk. santrifüj yapılarak üstte oluşan faz, orta faza zarar verilmeden dikkatli bir şekilde pipet yardımıyla yeni tüplere alındı. Bu yeni tüplere alının üst fazın eşit hacminde fenol/kloroform: isoamil alkol (24:1) ilave edilip

yine elle ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra 10.000 rpm’de 5dk. santrifüj edildi. Oluşan üst faz yine pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarılarak, eşit hacimde kloroform: isoamil alkol (24:1) eklendi ve elle ters düz edildikten sonra 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan faz ayrı bir eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine eşit hacimde isopropanol eklenip elle ters düz edildikten sonra 1 saat süre ile -20°C’de bekletildi.

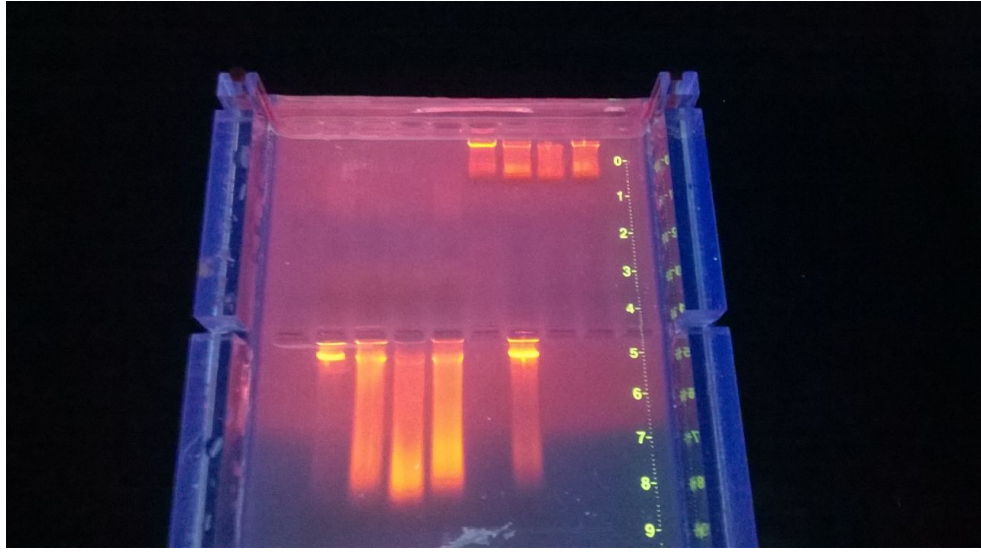
Bütün örneklerde bu işlemler gerçekleştirildikten sonra soğutmalı santrifüjde +4°C’de 13.000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilerek DNA’nın pelet haline gelmesi sağlanmış oldu. Tüplerin içerisindeki isopropanol peletlerin düşmediğinden emin olarak dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve daha sonra peletler 500 µl %70 lik etanolle yıkanarak 13.000 rpm’desantrifüj edildi. Bu işlem iki defa yapıldıktan sonra tüplerin içerisindeki alkol dikkatli bir şekilde peletlere zarar vermeden uzaklaştırılarak peletler 5 dk. süre ile kurumaya bırakıldı. Son olarak tüplere 50 µl destile su ilave edilerek DNA’nın çözülmesi sağlanmış ve uzun süreli muhafaza etmek üzere örnekler -20°C’de dondurucuya konulmuştur.

3.3.2. Elde Edilen DNA’nın Agaroz Jel Elektroföresi ile Kontrolü

Pelet halindeki DNA çözüldükten sonra agaroz jelde bütünlüğü kontrol edilmiştir. Kullanılacak tankın hacmi için yapılan hesaplamalara göre %0,8’lik 130 ml jel hazırlandı. Bunun için 123,5ml saf su 6,5ml 20x TBE ile karıştırılarak 1,04gr Agaroz homojen bir şekilde eriyinceye kadar mikrodalga fırına kondu. Agaroz tümüyle eridikten sonra 4µl ethidiumbromide ilave edilerek karıştırıldı ve jel küvetine dökülerek tüm kabarcıklar temizlendikten sonra örnek sayısına uygun taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Donma gerçekleştikten sonra jel üzerine az miktar 1xTBE buffer döküldükten sonra taraklar çıkarılarak küvet tank içine uygun şekilde yerleştirilip tank üzerinde belirtilen çizgiye kadar 1xTBE buffer ile dolduruldu. Soğutucu da +4°C’ye kaldırılan örnekler parafilm üzerinde distile su ve LoadingDye (Çizelge 3.3.) ile pipetajlanarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi ve 100 V’da 60 dakika yürütülerek UV görüntüleyici altında bantlar gözlenerek DNA varlığı ve kalitesi gözlemlendi (Şekil 3.10.). Uygun kalitede bant veren örnekler sekans için PZR’a hazırlanmak üzere ayrıldı, uygun bant vermeyen örnekler için farklı numunelerden ekstraksiyon yenilenecek bu işlemler tekrarlandı.

Çizelge 3.3. Jele yüklemek için kullanılan çözelti ve örnek miktarları

Her bir örnek için	Miktar
DNA örneği	3µl
Distile su	2µl
6xLoading Dye	1µl



Şekil 3.10. Ekstraksiyon sonrası jelde yürütülen DNA örneklerinin UV altında görüntüsü

3.3.3. Mitokondriyal DNA 16S rRNA ve COI Gen Bölgelerinin PZR ile Amplifikasyonu

Holothuriidea örneklerinden elde edilen mitokondriyal DNA'nın 16S rRNA ve COI bölgeleri, bu bölgeler için başka araştırmacılar tarafından geliştirilen primer setleri (Çizelge 3.4.) kullanılarak ThermalCycler (TC PLUS, TECNE) yardımıyla çoğaltılmıştır. Yükseltgeme işlemi her bir örnek DNA'sı ile birlikte 50 µl'lik PZR karışımıyla yürütülmüş ve sırasıyla; forward ve reverseprimerler, PZR Master Mix, 2X (PROMEGA) (Reaksiyonbuffer (pH 8,5) içinde, önceden karıştırılmış olarak; 50 ünite/ml Taq DNA Polimeraz enzimi, 400 µMdATP, 400 µMdGTP, 400 µMdCTP, 400 µMdTTP, 3 mM MgCl₂ bulunmaktadır) ve ddH₂O karışımından oluşan kokteyl solüsyon hazırlanmış ve 0,5 ml'lik PZR tüplerine dağıtılmıştır (Çizelge 3.5.).

Örneklerin spesifik gen bölgelerinin çoğaltılmasında Çizelge 3.6.'de verilen PZR programları, yapılan optimizasyon denemelerinde tatmin edici sonuçlar vermiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan mtDNA segmentleri ve primer sekansları

mtDNA Segmenti	Primer Dizisi	Kaynaklar
COI	F: 5' -ATAATGATAGGAGGRTTTGG-3'	(Arndt ve ark., 1996)
	R: 5' -GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3'	
16S rRNA	L: 5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	(Palumbi ve ark., 1991)
	H: 5' -CTCCGGTTTGAACCTCAGATCA-3'	

Çizelge 3.5. COI ve 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri	Miktar (1 örnek için)		
	COI	16S rRNA	Negatif kontrol
2xReaksiyon Buffer			
50u/ml Tag DNA Polimeraz			
3mM MgCl ₂	25µl	25µl	25µl
400µM dNTPs (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)			
İleri yönlü Primer (10pmol/µl)	5µl	5µl	5µl
Geri yönlü Primer (10pmol/µl)	5µl	5µl	5µl
Kalıp DNA (40ng/ml)	10µl	10µl	-
Nucleaz içermeyen saf su (NFW)	5µl	5µl	5µl
Toplam	50µl	50µl	50µl

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan primerler için belirlenen PZR programları

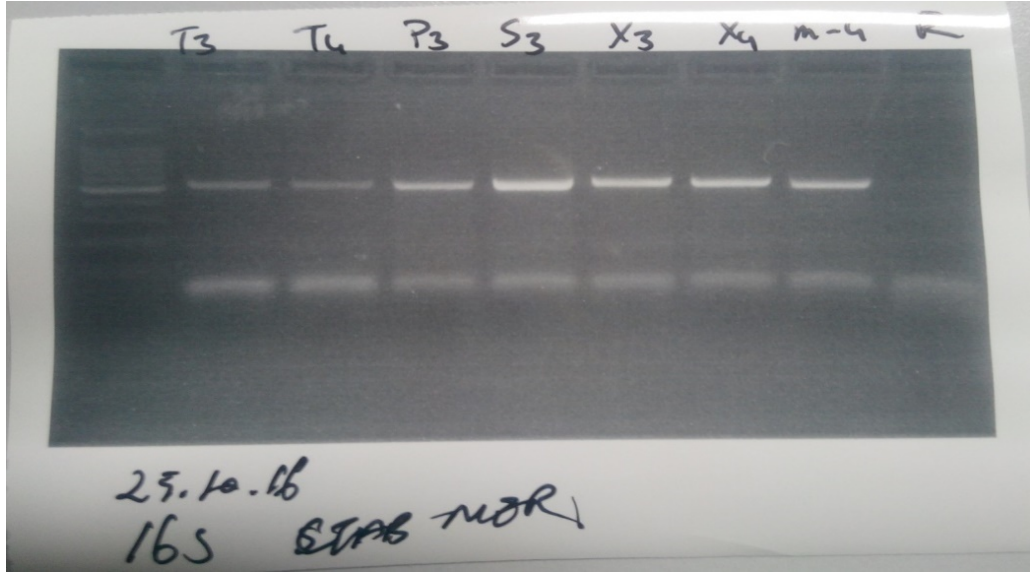
PZR Kondisyonu	Mt DNA Segmenti					
	COI			16S rRNA		
	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Birinci denatürasyon	95	3 dk	1	95	2 dk	1
Denatürasyon	95	60 sn	}	95	45 sn	}
Bağlanma	52	51 sn		52	55 sn	
Yeni zincir sentezi	72	120 sn		72	90 sn	
Final zincir sentezi	72	5 dk	1	72	5 dk	1
Saklama	4	∞		4	∞	

3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi ile Çoğaltılan Gen Bölgelerinin Gözlenmesi

PZR yükseltgemesi sonrası 5 µl PZR ürünü + 1 µl 6X yükleme boyası (Loading dye) ve 50 yada 100 bp'lik DNA boy belirteci (3 µl boy belirteci + 1 µl 6X yükleme boyası), ethidium bromid yoğunluğu 0,01 mg (1mg/100µl) olacak şekilde hazırlanan %1,2'lik agaroz jel üzerinde 1xTBE tampon sisteminde koşturulmuştur (Şekil 3.11). Jeller her bir fragment modeli için istenilen ayrıştırma ve jel konsantrasyonuna bağlı olarak yaklaşık olarak 100V/cm'de 40-50 dk. koşturulmuştur. Ethidium bromid'le boyanan DNA parçaları UV illüminatörle görüntülenmiştir. Jel görüntüleri jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France) ve termal yazıcı (Mitsubishi, P91D) kullanılarak kayıt edilmiştir.

Bu görüntüler üzerinden PZR çoğaltmasının etkinliği kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Aynı zaman da PZR ürün boyu beklenen ürün boyu ile karşılaştırarak kontrol edilmiştir. COI ve 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılan yaklaşık ürün boyları sırasıyla 536 ve 443 bp büyüklükte olduğu bulunmuştur.

Kontrol sonrası başarılı bulunan PZR ürünleri yakın zamanda kullanılmak üzere 4°C'de tutulmuş veya daha uzun süreli kullanım için derin dondurucuya (-20°C) konulmuştur.



Şekil 3.11. PZR sonuçlarının jel elektroforezinde 16S rRNA gen bölgesine ait jel görüntüsü

3.3.5. PZR Ürünlerinin Dizi Reaksiyonu ve Dizilerin Elde Edilmesi

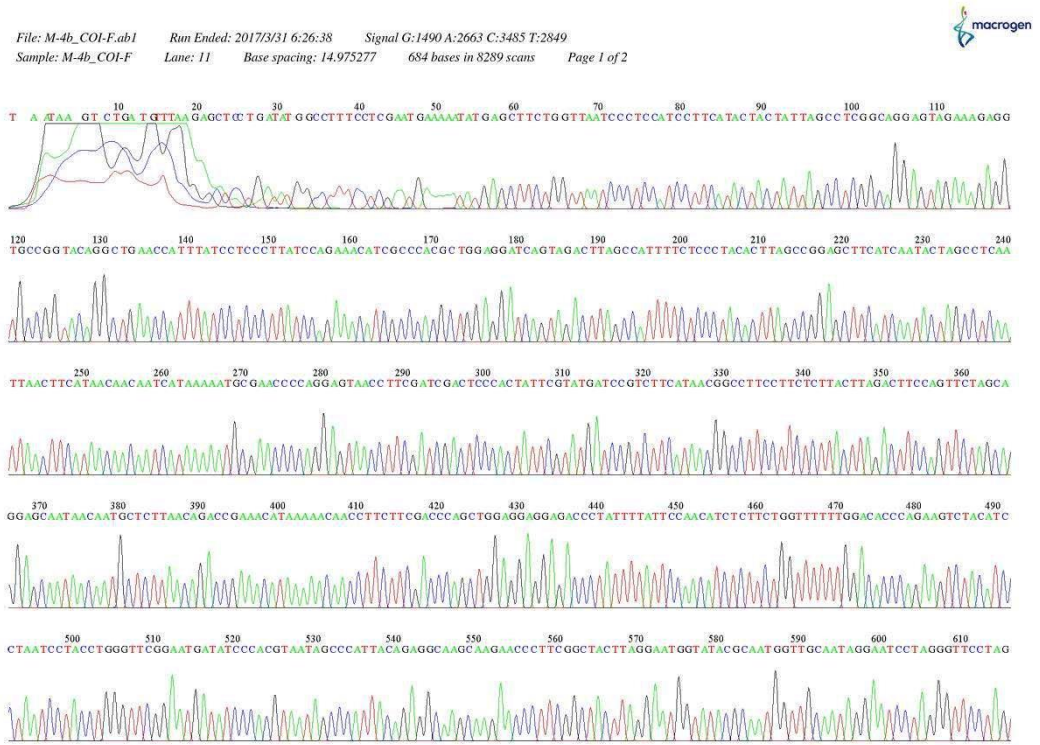
Mitokondrial gen bölgelerinin çoğaltılmasında doku örneklerinden elde edilmiş total DNA kullanılmıştır. Mitokondriyal DNA'nın farklı gen bölgeleri (COI ve 16S rRNA) PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ile çoğaltımda reaksiyon başına kullanılacak DNA kalıp miktarı, MgCl₂, primer ve dNTP konsantrasyonları optimize halde gelen çözelti kullanılarak sağlanmıştır. PZR ürünleri ve primerler dizi analizi yapılması için paketlenerek Güney Kore'deki Macrogen firmasına gönderilmiştir. Ürünün saflaştırılması ve okunması burada yapılmıştır. Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, dizi ürünleri ABI 3730XL kapillar otomatik sekans aletinde yürütülmüş ve elde edilen ham veriler internet yoluyla alınmıştır.

3.3.6. Dizilerin Okunması ve Hizalanması

BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak her 2 gen bölgesi için elde edilen ham diziler her bir birey için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. COI gen bölgesi için kullanılan 2 primere ait ham dizilerden her bir birey için bir COI "contig" dizisi, yine 16S rRNA gen bölgesi için kullanılan ileri ve geri yönlü primerlere ait ham dizilerden her bir birey için "contig" dizisi elde edilmiştir. Bu işlem sırasında her bir birey için Forward ve Reverse okuma grafikleri karşılıklı açılmış ve en doğru okumalar karşılaştırmalı olarak doğrulanmıştır. COI geninin *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata*

türlerinde 536 bç ve 16S rRNA geninin *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata*, *H. sanctori* türlerinde 443bç'lik diziler elde edilmiştir.

Kendi içinde ayrı ayrı hizalanmış COI ve 16S rRNA gen bölgelerine ait olan dizi dosyaları, genetik ilişkilerinin belirlenmesi için seçilen ve daha önceki çalışmalarda yakın taksonlarda kullanıldığı bildirilen mtDNA'nın COI ve 16S rRNA gen bölgelerine ait analizlerde kullanılmış GenBank verileri ile BioEdit (Hall 1999) içindeki Clustal W (Thompson vd., 1994) modülü kullanılarak hizalanmış ve her bir baz tek tek kontrol edilmiştir (Şekil 3.12.). "Full Multiple Alignment" algoritması geçerli ayarlar değiştirilmeden kullanılmıştır.



Şekil 3.12. COI-F primer ile elde edilen ham sekans verisi.

3.3.7. Veri Setlerinin Hazırlanması

Baz dizilerinin gerekli formatlara dönüştürülmesinde ClustalW (Thompson vd., 1994) programı kullanılmıştır. Elde edilen COI ve 16S rRNA genlerine ait ayrı ayrı hizalanmış dosyalar FASTA ve NEXUS (Maddison vd., 1997) formatına dönüştürülmüş ve kaydedilmiştir. Tür içi varyasyonu gösteren bir ağ oluşturmak için Network 4.6 (Fluxus Technology Ltd. 1999-2014) programında kullanılmıştır. Filogenetik analizlerde bilgisayar çalışma süresini kısaltmak için DnaSP 4.50 (Rozas

vd., 2003) programı kullanılarak nükleotit içeriği ile ilgili istatistikler, haplotip ve nükleotit değişim değerleri ve moleküler haplotipler arasındaki mutasyon miktarı ve haplotipler belirlenmiş ve haplotip verilerini içeren yeni birer veri matrisi oluşturulmuştur. Yine aynı program ile nükleotit çeşitliliği belirlenmiştir. Ayrıca, jModeltestv.0.1 (Posada, 2008) ve TCS (Clement vd., 2000) programı kullanılarak yapılacak uygun baz değişim modeli seçimi ve Network analizi için veri setleri PHYLIP formatında kaydedilmiştir.

3.3.8. Genetik Verilerin Analizi

3.3.8.1. Genetik Çeşitlilik Parametreleri

COI ve *16S rRNA* bölgeleri için nükleotid çeşitliliği ve haplotip çeşitliliği DnaSP 4.50 (Rozas vd., 2003) bilgisayar programı kullanılarak ve JC modeli altında yapılmıştır. Her iki gen bölgesi için türler arasındaki genetik uzaklık matrisi MEGA X (Kumar et al. 2018) programı ile Kimura 2 parametre (Kimura, 1980) mesafe metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Standart hataları hesaplamak için 10000 replikasyon kullanılmıştır.

3.3.8.2. Distance (Uzaklık) Analizi

Uzaklık Analizi PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998) kullanılarak yapılmıştır. *COI* ve *16S rRNA* bölgeleri için veri setine en uygun baz değişim modelini (substitution model) belirlemek için, jMODEL TEST V.0.1.1 programı kullanıldı (Posada, 2008). Akaike Information Criterion (AIC) ve Bayesian Information Criterion (BIC) tahmin testleri, veri setleri için en uygun baz değişim modellerinin sırasıyla *COI* gen bölgesi için TIM2+G ve TIM2ef+G, *16S rRNA* gen bölgesi içinse her iki modelin de TIM3+G olduğunu ortaya koymuşlardır. Baz değişim modellerinin belirlenmesinden sonra sekans veri seti PAUP* V.4.0b10 (Swofford, 1998) programına aktararak *COI* gen bölgesi için TIM2+G ve TIM2ef+G, *16S rRNA* gen bölgesi içinse TIM3+G değişim modelleri ile distance analizi yapıldı. Distance analizlerinde ağaç üretme tekniği olarak NJ (Neighbor Joining) algoritması kullanılmıştır. NJ ağacındaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini belirlemek amacıyla bootstrap (10000 replikasyon) analizi yapıldı ve bootstrap değerleri NJ ağacı üzerinde gösterilmiştir.

Her bir baz değişim modeli için ayrı ayrı NJ ağaçları elde edildi. Bunların yanında daha basit modeller olan JC (Jukes-Cantor; Jukes ve Cantor, 1969 ve K2P (Kimura 2-parameter; Kimura, 1980) modelleri de analizde denenmiş ve ayrı ayrı bootstrap yapılmıştır (10000 rep.). Aynı modeller kullanılarak bootstrap analizleri sonucunda en yüksek Bootstrap değerlerini veren evrimsel model ile oluşturulan ağaçlar kullanılmıştır.

3.3.8.3. Parsimoni (Tutumluluk) Analizi

Parsimoni Analizi PAUP* 4.0b10 kullanılarak yapılmıştır. Maksimum parsimoni analizi, buluşsal (Heuristic Search) araştırma metoduna göre 10000 rastgele ilave tekrarlar oluşturulup, seç bağla (bootstrap) testi ile 1000 tekrar yapılmış ve TBR swapping algoritması kullanılmıştır. Parsimoni analizi sonrası kaydedilen parsimonik ağaçlar birbirleri ile Kishino-Hesegawa Test kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca elde edilen ağaçlar için CI (Cosistency Index), RI (Retention Index) ve değerleri ve ağaç uzunlukları tespit edilmiştir. Elde edilen bu parsimonik ağaçlar kullanılarak 50% Majority Rule ve Stric Consensus ağaçlar oluşturulmuştur.

3.3.8.4. Likelihood (Maksimum Olasılık) Analizi

Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) analizi PHYML v. 3,0 (Guindon ve Gascuel 2003) kullanılarak yapılmıştır. İki gen bölgesine ayrı ayrı Modeltest uygulanmış ve önerilen en uygun baz değişim modelleri, baz frekansları, G, I ve Ti/tv değerleri girilmiş ve bu değerler kullanılarak Heuristic araştırma metodu kullanılmıştır. ML analizinde bootstrap değerleri elde edilirken 1000 replikasyon yapılmıştır. Maksimum-Likelihood analizlerinde en yüksek Bootstrap değerlerini veren evrimsel model ile oluşturulan ağaçlar kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. DNA Dizin Analizi

Bu çalışmada Ege Denizlerinden temin edilen Holothuriidae familyasına ait toplam 4 türden COI geninin *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata* türlerinde 536 bç ve 16S rRNA geninin *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata*, *H. Sanctori* türlerinde 443bç'lik sekansı için DNA dizi analizi yapılmıştır. Çalışılan gen bölgeleri için 4 Holothuriidae türünden dizi analizi yapılan birey sayısı Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Holothuriidae familyasına ait 4 türden COI ve 16S rRNA genleri için dizin analizi yapılan birey sayısı

Türler	COI	16S rRNA
<i>Holothuria tubulosa</i>	2	2
<i>Holothuria polii</i>	2	2
<i>Holothuria mammata</i>	2	2
<i>Holothuria sanctori</i>	-	2
TOPLAM	6	8

4. 2. COI Gen Bölgesi

4.2.1. COI Dizin Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri

Üç tür için COI gen bölgesi toplam 6 bireyden yükseltgenmiştir (Çizelge 4.2). *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii* ve *Holothuria mammata* türleri arasında yapılan analiz sonuçlarına göre 536 bç'lik kısmi baz dizilimi hizalanmış, veri setine ait nükleotit pozisyonlarının 441'i (%82,28) sabit, 95'i (%17,72) değişkendir. Değişken karakterlerin 7'si (%92,63) parsimonik bilgi verici karakterdir. Her bir örnek için belirlenen ortalama nükleotid oranları ve her bir kodon için miktarı Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen matrikste baz kompozisyonları A:%27,98, C:%26,43, G:%18,93 ve T:%26,64 olarak belirlenmiştir. Çalışılan populasyonlar için COI gen bölgesinin Adenin, Sitozin ve Timin bakımından zengin, Guanin bakımından ise fakir olduğu tespit edilmiştir. A+T oranının %54,62 olduğu gözlenmiştir. Ti/Tv oranı 2,60 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Çalışılan tür örneklerinden elde edilen haplotiplere ait COI geni nükleotit frekansları

	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
T1	26,5	26,5	27,8	19,2	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	16,8	31,8	41,3	10,1	179	21,3	22,5	25,8	30,3	178
T2	26,5	25,9	28,4	19,2	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	16,8	30,2	43,0	10,1	179	21,3	22,5	25,8	30,3	178
P3	27,4	25,6	27,8	19,2	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	20,7	27,9	41,3	10,1	179	20,2	23,6	25,8	30,3	178
P1	27,6	25,4	27,8	19,2	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	21,2	27,4	41,3	10,1	179	20,2	23,6	25,8	30,3	178
M1	25,7	27,6	28,2	18,5	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	13,4	36,3	42,5	7,8	179	22,5	21,3	25,8	30,3	178
M2	26,1	27,6	28,0	18,3	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	14,5	36,3	41,9	7,3	179	22,5	21,3	25,8	30,3	178
Avg.	26,6	26,4	28,0	18,9	536	41,3	25,1	16,2	17,3	179	17,2	31,7	41,9	9,2	179	21,3	22,5	25,8	30,3	178

COI geni dizi analizi ile üç türe ait 6 bireyden toplamda 6 adet haplotip belirlenmiştir. Çalışmada Ege denizi Kuşadası ve Ayvalık ve Marmara denizinden toplanmış deniz hıyarı örneklerine ait lokalite bilgileri ve bu lokalitelerde bulunan haplotiplerin dağılımı ve frekanslarını içeren veriler Çizelge 4.3’de verilmektedir. Mitokondri COI geni için belirlenen haplotiplerin her biri sadece bir lokasyonda bulunmakta olup türler arasında paylaşılmadığı ve türlere özgü olduğu tespit edilmiştir.

Diğer taraftan, *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii* ve *Holothuria mammata* türlerine ait örneklerinin diğer tüm türlerden ayrılmasına imkân veren kendine özgü tanımlayıcı tek nükleotit polimorfizm (SNP)’lerin varlığı COI geninin bu türlerin karakterlerinin ortaya çıkarılması için uygun bir genetik belirteç olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışılan türlerde belirlenen haplotipler için haplotip çeşitliliği (Hd): 1,000 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca populasyonlar da görülen haplotip miktarı 1-6 arasında dağılım göstermiş, en az Ayvalık populasyonunda, en fazla da Kuşadası populasyonunda görülmüştür. Nükleotit çeşitliliği ise ortalama (π): 0,09590 olarak hesaplanmıştır.

4.2.2. COI gen bölgesi için tür içi ve türler arası genetik mesafenin belirlenmesi

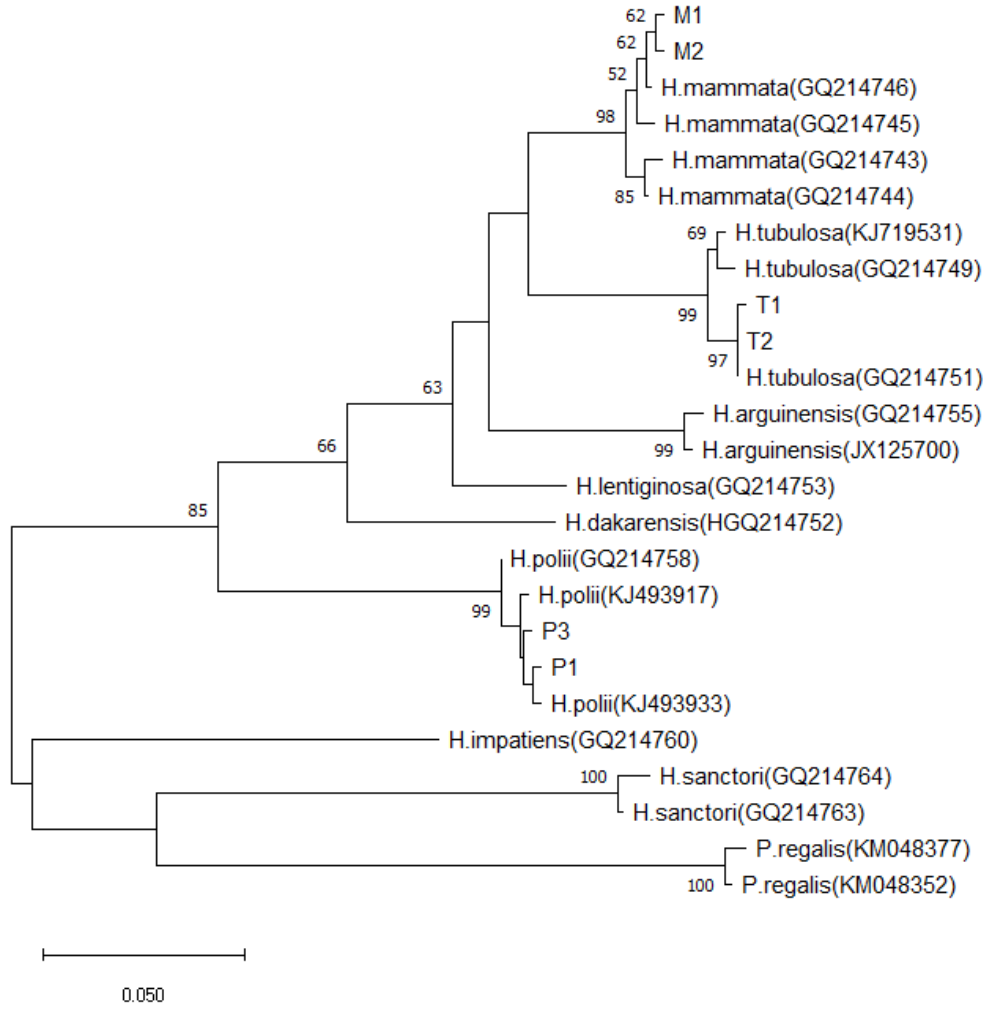
Holothuria genusunun Ege Denizi Türkiye kıyılarında dağılım gösteren türler arası genetik uzaklık matrisi COI gen bölgesi için Kimura 2 parametre mesafe metodu kullanılarak 1.000 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve Çizelge 4.4’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre türler arası genetik mesafenin en düşük %9,30 ile *H. tubulosa* ve *H. mammata* türleri arasında ve en yüksek ise %16,44 ile *H. tubulosa* ve *H. polii* arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4. sol alt diyagonal). Diğer bir taraftan tür içi ikili dizin farklılığı değerleri ise en düşük %0,56 (*H. polii* ve *H. tubulosa*) ile en yüksek %0,75 (*H. mammata*) değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4. diyagonal).

Çizelge 4.4. COI verileri için hesaplanan türler arası ve içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri; sol alt değerler= COI için türler arası genetik uzaklık değerleri, sağ üst değerler= standart hata ve diyagonal (koyu) = türler içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri

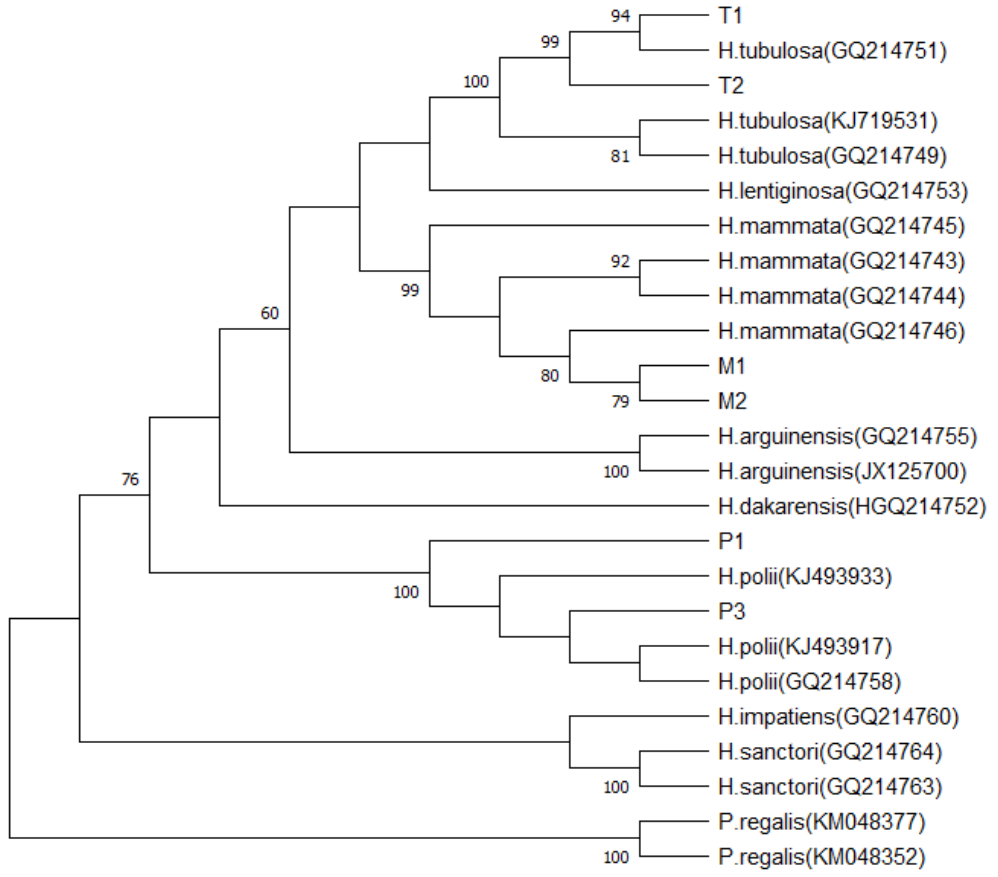
	<i>H. tubulosa</i>	<i>H. polii</i>	<i>H. mammata</i>
<i>H. tubulosa</i>	0,0056	0,0189	0,0137
<i>H. polii</i>	0,1644	0,0056	0,0165
<i>H. mammata</i>	0,0930	0,1373	0,0075

4.2.3. COI geni filogenetik analizleri

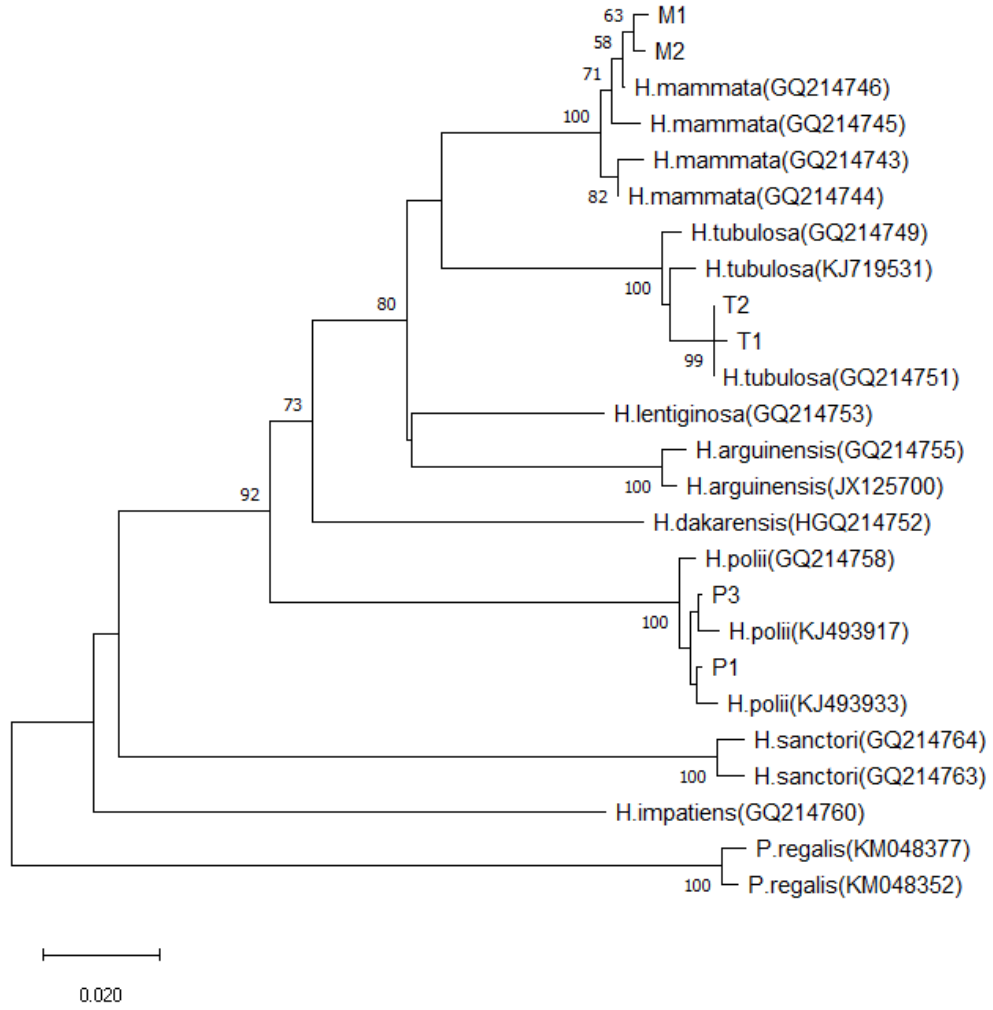
En uygun modelin belirlenmesi için jModelTest v. 0.1 (POSADA, 2008) programı kullanılarak hem Akaike bilgi kriterleri (AIC), hem de Bayesian bilgi kriterlerine (BIC) göre 88 farklı model arasından sırasıyla TIM2+I ve TPM2uf+G modeli seçilmiştir. Her bir model için PYHML v. 3,0 (GUINDON ve GASCUEL, 2003) programı kullanılarak ML filogenetik ağaçları oluşturulmuş ve en yüksek Bootstrap değerini veren TIM2+I modeline göre elde edilen ağaç bu çalışmada gösterilmiştir. TIM2+I modeli ikame durumunun iki tipi olan, eşit olmayan baz frekansları ve Ti/Tv oranı için serbest parametrelerle ilgilenmektedir. Ti/Tv oranı (transisyon-transversiyon oranı); $-\ln L$, ağaç topolojinin maksimum olasılığını gösterir ve son olarak P, değişken olmayan yerlerin olasılığıdır. Seçilen TIM2+I modeli kullanılarak çalışılan veri seti için hesaplanan tüm model parametreleri sırasıyla; A = 0,2921, C = 0,2844, G = 0,1588, T = 0,2646, [AC] = 11,5784, [AG] = 24,1124, [AT] = 11,5784, [CG] = 1,0000, [CT] = 48,0587, [GT] = 1,0000, $-\ln L = 1267,6499$ ve P invar=0,6280 olarak gerçekleşmiştir. Çalışılan tüm *Holothuria* örneklerine ait COI sekans verileri ilk olarak Maksimum olasılık (ML) (Şekil 4.1), Maksimum parsimoni (MP) (Şekil 4.2) ve NJ (Şekil 4.3) dendogramlarının yapılandırılmasında kullanılmıştır. COI haplotiplerinin tüm filogenetik analizleri için dış grup olarak *Parastichopus regalis* (Genbank giriş no: KM048377, KM048352) kullanılmıştır. Farklı filogenetik analizler sonucunda ortaya çıkan ağaçların birbirlerine çok yakın topolojilere sahip oldukları gözlenmiş ve yüksek seç-bağla değerleri ile (51-100) gruplar arasındaki ilişkiyi desteklemiştir. ML, MP ve NJ metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar incelendiğinde elde edilen sonuçların 16S rRNA geni analiz sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.1. COI geni haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Olasılık ağacı. (Sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için seç-bağla değerleri belirtilmiştir.)



Şekil 4.2. COI geni veri setinin Maksimum Parsimoni metoduna dayalı genetik analizi. Seç bağla değerleri 1000 tekrar olarak gerçekleştirilmiş olup %50'den büyük olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.3. COI veri setinin TIM2+I değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı. (Seç bağla değerleri 1000 tekrar olarak gerçekleştirilmiş olup %50'den büyük olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir)

4.3. mtDNA 16S rRNA geni

4.3.1. 16S rRNA gen dizi karakterleri, haplotip ve nükleotit özellikleri

Mitokondri 16S rRNA geninin 443 bç'lik kısmi dizisi, deniz hıyarı türlerine ait bireylerin dağılım gösterdiği 3 farklı lokaliteden örneklenen bireyler için dizi analizi gerçekleştirildi. Analize dahil edilen tüm dizilerin hizalanması sonucunda elde edilen tabloda baz kompozisyonu T: %25,7, C: %23,1, A: % 29,9 ve G: %21,3 olarak hesaplanmıştır. Çalışılan türler için oluşturulan veri setine ait nükleotid pozisyonlarının 348'si (%78,6) korunmuş, 95'i (% 21,4) değişken ve bu değişken bölgelerin 94'ü (% 98,9) parsimonik olarak bilgi vericidir. 16S rRNA gen dizi analizi ile toplamda 6 adet haplotip belirlenmiştir. Mitokondri 16S rRNA geni için belirlenen haplotiplerden her ikisi farklı türleri temsil etmektedir (Çizelge 4.5.). Yürütülen analizler sonucunda belirlenen haplotipler için haplotip çeşitliliği (*Hd*): 0,929 ve nükleotid çeşitliliği (π): 0,10408 olarak hesaplanmıştır.

4.3.2. 16S rRNA gen bölgesi için tür içi ve türler arası genetik mesafenin belirlenmesi

Holothuria genusunun Ege Denizi Türkiye kıyılarında dağılım gösteren türler arası genetik uzaklık matrisi 16S rRNA gen bölgesi için Kimura 2 parametre mesafe metodu kullanılarak 1.000 tekrar olarak gerçekleştirilmiş ve Çizelge 4.6'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre türler arası genetik mesafenin en düşük %4,93 ile *H. tubulosa* ve *H. mammata* türleri arasında ve en yüksek ise %23,16 ile *H. tubulosa* ve *H. sanctori* arasında olmak üzere geniş bir değer aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6. sol alt). Diğer bir taraftan tür içi ikili dizin farklılığı değerleri ise en düşük %0 (*H. mammata* ve *H. tubulosa*) ile en yüksek % 0,68 (*H. sanctori*) değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6. diyagonal).

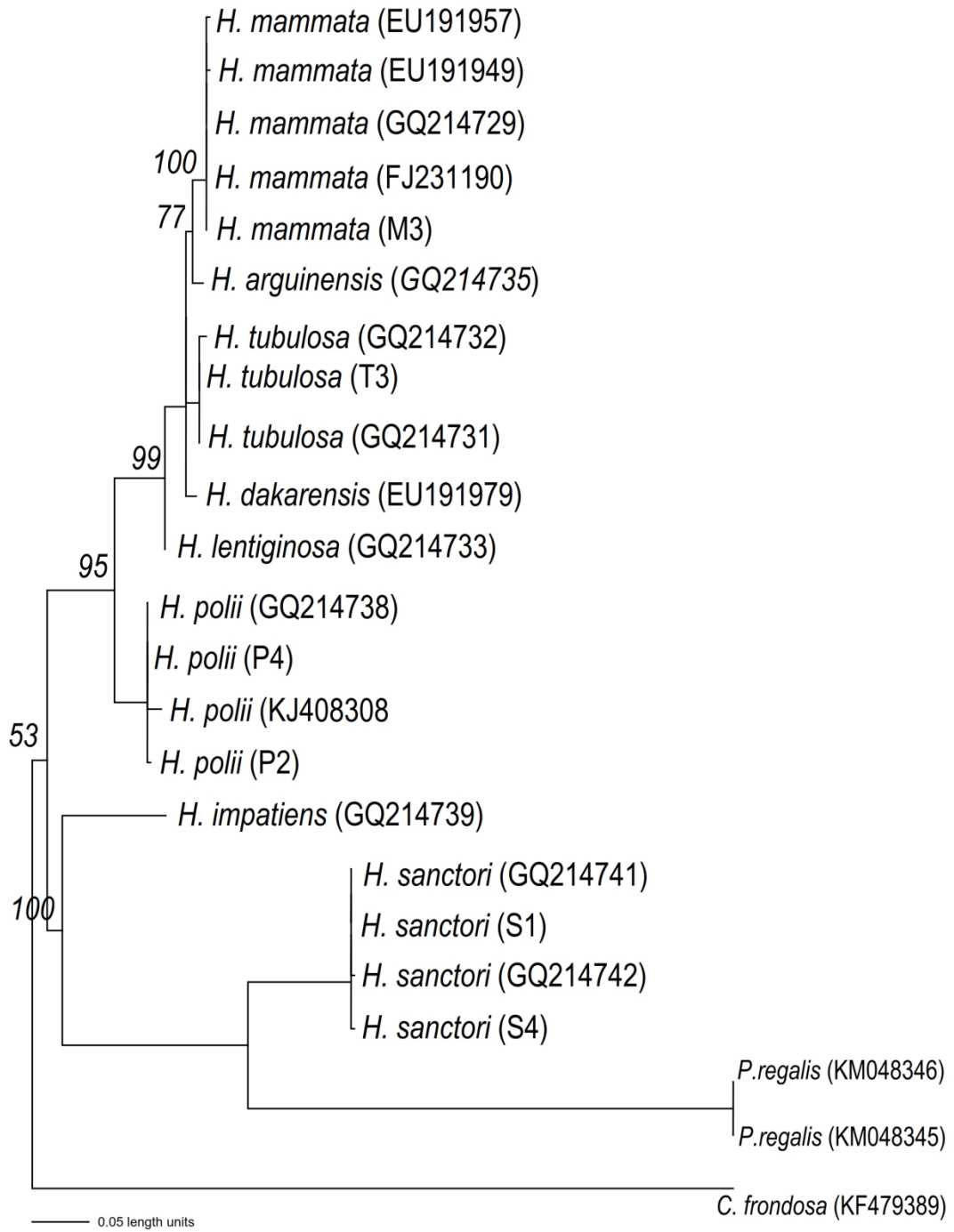
Çizelge 4.6. 16S rRNA verileri için hesaplanan türler arası ve içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri; sol alt diyagonal = 16S rRNA için türler arası genetik uzaklık değerleri, sağ üst diyagonal (koyu) = standart hata ve diyagonal = türler içindeki ortalama genetik uzaklık değerleri.

	<i>H. polii</i>	<i>H. sanctori</i>	<i>H. mammata</i>	<i>H. tubulosa</i>
<i>H. polii</i>	0,0045	0,0228	0,0142	0,0136
<i>H. sanctori</i>	0,1887	0,0068	0,0242	0,0262
<i>H. mammata</i>	0,0799	0,2075	0,0000	0,0103
<i>H. tubulosa</i>	0,0694	0,2316	0,0493	0,0000

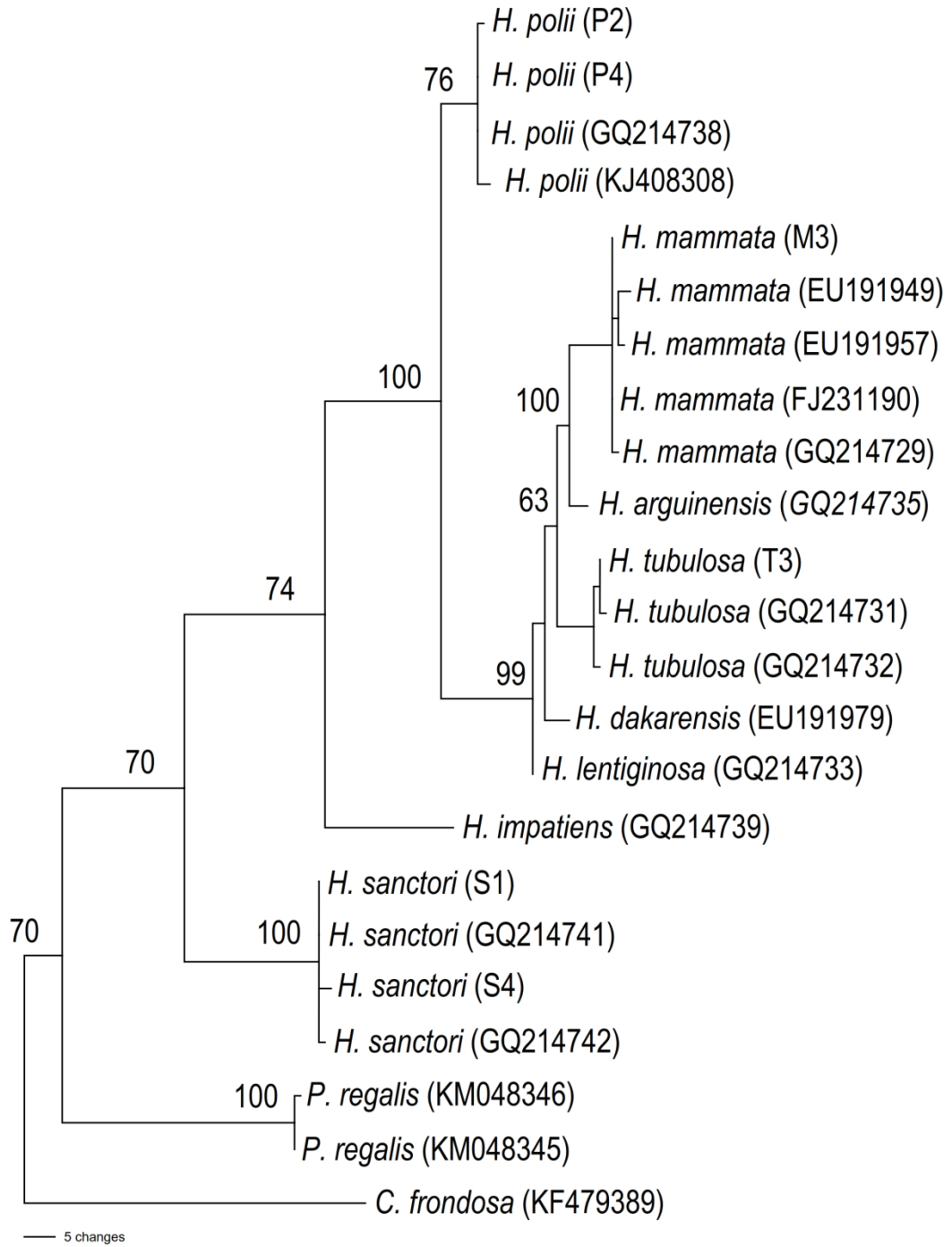
4.3.3. 16S rRNA geni filogenetik analizleri

Yapılan filogenetik analizler sonucunda 3 farklı lokasyondan elde edilen örneklerin baz farklılıklarına bağlı olarak lokaliteler arasındaki genetik yapı incelenmiştir. Bayesian bilgi kriterlerine (BIC) göre 88 farklı model arasından sırasıyla TIM2+I modeli seçilmiştir. TIM2+I modeli kullanılarak çalışılan veri seti için hesaplanan tüm model parametreleri sırasıyla; A = 0,3460, C = 0,2128, G = 0,1837, T = 0,2576, [AC] = 7,3859, [AG] = 12,7633, [AT] = 7,3859, [CG] = 1,0000, [CT] = 55,5279, [GT] = 1,0000, -lnL= 1588.2091 ve gamma shape = 0.3060 olarak gerçekleşmiştir. Seçilen model için PYHML v. 3,0 (GUINDON ve GASCUEL, 2003) programı kullanılarak ML filogenetik ağaçları oluşturulmuştur.

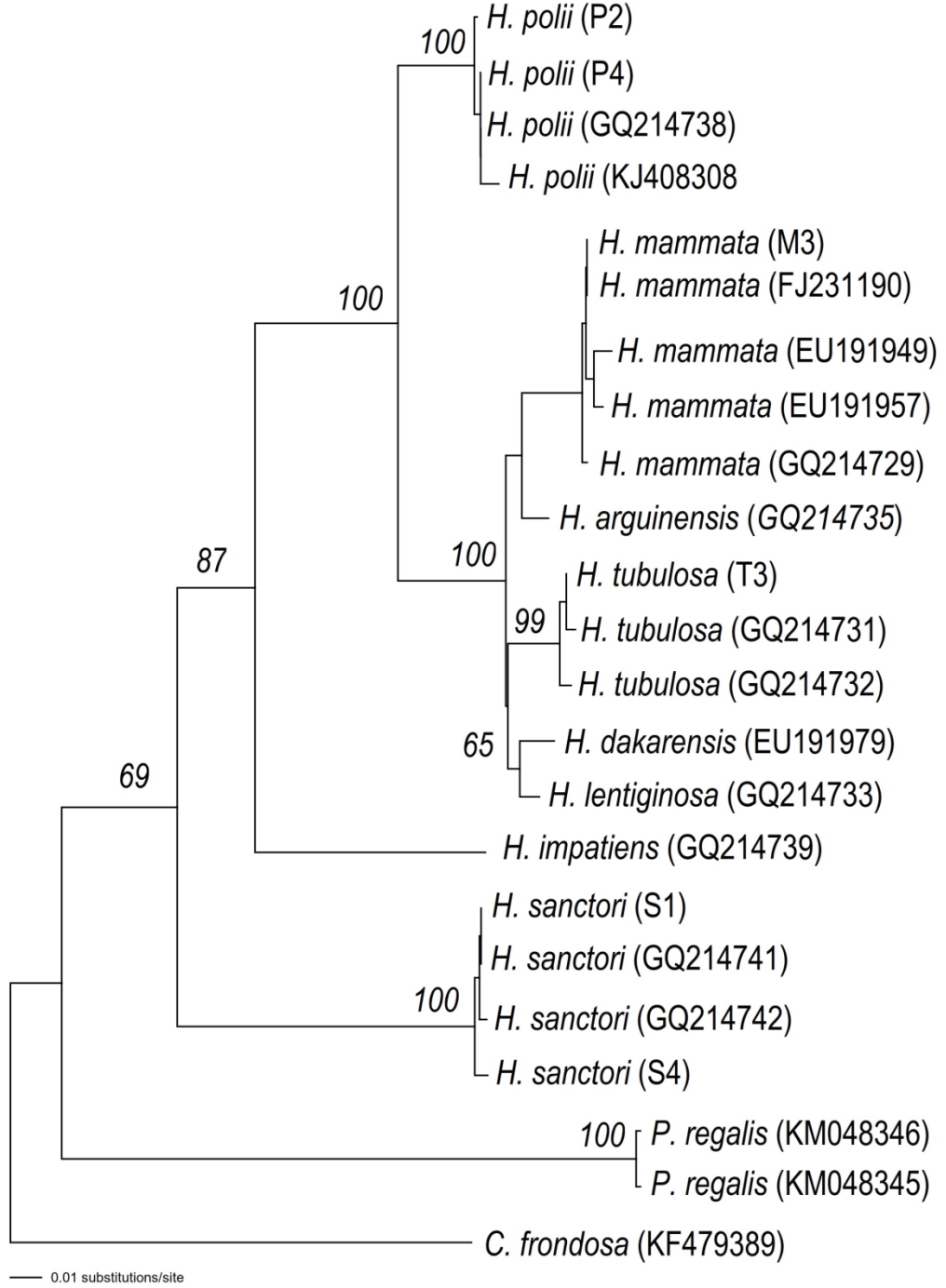
Çalışılan tüm *Holothuria* örneklerine ait 16S rRNA sekans verileri ilk olarak Maksimum olasılık (ML) (Şekil 4.4), Maksimum parsimoni (MP) (Şekil 4.5) ve NJ (Şekil 4.6) dendogramlarının yapılandırılmasında kullanılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçların güvenilirliklerini belirlemek amacıyla Bootstrap analizleri her algoritma için 1000 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. 16S rRNA haplotiplerinin tüm filogenetik analizleri için dış grup olarak *Parastichopus regalis* (Genbank giriş no: KM048346, KM048345) ve *Cucumaria frondosa* (Genbank giriş no: KF479389) kullanılmıştır. Farklı filogenetik analizler sonucunda ortaya çıkan ağaçların birbirlerine çok yakın topolojilere sahip oldukları gözlenmiş ve yüksek seç-bağla değerleri ile (51-100) gruplar arasındaki ilişkiyi desteklemiştir.



Şekil 4.4. 16S rRNA geni haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Olasılık ağacı. (Sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için seç-bağla değerleri belirtilmiştir.)



Şekil 4.5. 16S rRNA geni veri setinin Maksimum Parsimoni metoduna dayalı genetik analizi sonucunda üretilen % 50 Majority Rule Konsensus ağacı. Seç bağla değerleri 1000 tekrar olarak gerçekleştirilmiş olup %50'den büyük olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir.



Şekil 4.6. 16S rRNA veri setinin TIM2+I değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı. Seç bağla değerleri 1000 tekrar olarak gerçekleştirilmiş olup %50'den büyük olanlar düğüm noktalarında gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yürütülen bu çalışmada yaygın olarak kullanılan DNA polimorfizm tekniklerinden biri olan mtDNA sekans analiz yöntemi kullanılmış olup, bu teknikler ile Ege denizinden iki farklı bölgede (Kuşadası ve Ayvalık) dağılım gösteren deniz hıyarı türlerinin genetik yapısı ve birbirleriyle olan yakınlık dereceleri yani benzerlik ve farklılıkları moleküler genetik teknikler ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada, Mitokondriyal DNA'nın iki gen bölgesi (mtDNA COI ve 16S rRNA) kullanılmıştır. Bu gen bölgeleri açısından tür içi ve türler arası genetik çeşitlilik incelenmiştir. Bu bilgilere dayanarak türler için genetik çeşitlilik düzeyleri, türlerin özgünlüğü, çalışılan gen bölgeleri açısından farklılıkları saptanmaya çalışılmış ve yorumlanmıştır.

Çalışma kapsamında üç *Holothuria* türünün COI ve 16S rRNA gen bölgeleri sekanslarına ait baz kompozisyonuna bakıldığında düşük G ve yüksek A içeriğine sahip olduğu görülmüştür. *H. mammata* mtDNA'sının G+C içeriği (% 46), *H. tubulosa* (% 45,4) ve *H. polii* ((% 44,7)'ninkinden daha yüksektir. Fan ve ark.(2011) çalışmalarında, deniz hıyarı *Stichopus horrens* türünün mitokondriyal genomunun karakterizasyonu sonucunda H zincirinin genel baz bileşiminin % 30,8 A, % 23.7 C, % 16.2 G ve % 29.3 T olduğunu tahmin etmişlerdir. Elde edilen bu sonuçların yürütülen bu çalışmaya benzer olduğu görülmüştür. Perna ve Kocher (1995)'in kompozisyon çarpıklığı formüllere göre ($GC\ skew = \frac{(\%G - \%C)}{(\%G + \%C)}$), $AT\ skew = \frac{(\%A - \%T)}{(\%A + \%T)}$) hesaplanmıştır. Çalışılan holothurian türleri mtDNA'sı için GC çarpıklığı negatiftir (COI: -0.17 ve 16SrRNA: -0.040), bu da G'den daha fazla C'nin meydana geldiğini göstermektedir. Fakat, aynı türler için AT çarpıklığı pozitif (COI: 0.026 ve 16SrRNA: 0.076) olarak hesaplanmıştır, bu da T yerine A'ya doğru hafif bir meyili işaret eder. Önceden yürütülen çalışmalar da bu çalışma ile benzer olarak, 5 holothurian (*S. horrens* (Fan ve ark., 2011); *H. forskali*, *Apostichopus japonicas* (Shen ve ark., 2009); *Parastichopus nigripunctatus* ve *Cucumaria miniata* (Scouras ve ark., 2004) mtDNA'sı için AT çarpıklığı pozitifdir (0.010 ila 0.119) ve GC çarpıklığı negatif (-0.271 ila -0.055) olarak hesaplanmıştır.

Genetik çeşitliliğin derecesi, türlerin ve popülasyonların değişen ortam şartlarına adaptasyonunda ve türün uzun süreli hayatta kalmasında çok önemli bir rol oynadığı

bilinmektedir (Lande ve Barrowdough 1987). Genel olarak, yaygın türlerde genetik çeşitlilik, sınırlı alanlara sahip türlere göre daha yüksek olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Sharma ve ark. 2003; Delrieu-Trottin ve ark. 2014). Mevcut çalışmada, Ege denizi Ayvalık ve Kuşadası'ndan örneklenen *Holothuria* türlerinin nispeten yüksek düzeyde bir genetik varyasyonu tahmin edilmiştir. Türlerde görülen haplotip miktarı 1-6 arasında dağılım göstermiş, en az Ayvalık popülasyonunda, en fazla da Kuşadası popülasyonunda görülmüştür. Bu çalışmanın ilk göze çarpan sonucu, sırasıyla COI ve 16S rRNA dizi verileri için *Holothuria* türlerinin yüksek haplotip çeşitliliği ($H_d = 1.000$ ve $0,929$) ve düşük nükleotid çeşitliliği ($\pi = 0,09590$ ve $0,10408$) ile karakterize edilmesidir. Bu durum genellikle, mutasyon yoluyla haplotip sayılarını artırmak için yeterli zamanın olduğu, ancak büyük dizi farklılıklarının birikmesi için yeterli zamanın olmadığı varsayılarak, küçük bir etkili popülasyon boyutundan gelen ani demografik genişlemeye bağlanmaktadır (Avice ve ark., 1984; Rogers ve Harpending, 1992; Grant ve Bowen, 1998; Avice, 2000).

Gonzalez-Wangüemert vd. (2015) çalışmalarında Türkiye'de iki hedef tür olan *Holothuria polii* ve *Holothuria tubulosa*'nın genetik yapısı ve biyometrisi üzerinde avlanmanın etkisini incelemişlerdir. Ayvalık ve Kuşadası'ndan 42 *H. polii* bireyi üzerinde yürüttükleri çalışmada 23 farklı haplotip belirlemişler ve bunlardan 7 tanesinin hem Kuşadası hem de Ayvalık'taki bireyleri kapsarken diğer haplotipler Kuşadası 10 ve Ayvalık 6 olmak üzere bölgelere dağılmıştır. Kuşadası'nda avcılığın yasak olduğu bölgedeki boyca büyük ve ağır olan *Holothuria polii* bireylerinin en yüksek genetik çeşitliliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca benzer sonuçlar *Holothuria tubulosa* için de gözlemlenmiştir. En yüksek genetik çeşitlilik deniz hıyarlarının avlanmasının gerçekleşmediği Kuşadası'ndaki bölgede bulunmuştur. Araştırmacılar, 16S rRNA gen bölgesi için ise Kuşadası yine polimorfik site değeri, haplotip ve nükleotid çeşitliliği dikkate alındığında en yüksek genetik çeşitliliği göstermiştir.

Deniz hıyarları genetiği üzerine daha önceki çalışmalar da bu bulguları desteklemektedir. Foça (*H. mammata*) ve Ayvalık (*H. tubulosa*) gibi balıkçılık baskısı altındaki bu bölgeler, Atlantik Okyanusu (yalnızca *H. mammata*) ve Akdeniz'de (*H. mammata* ve *H. tubulosa*) örneklenen diğer yerlerle karşılaştırıldığında çok düşük genetik çeşitlilik göstermiştir (Borrero-Pe' rez, 2010; Borrero-Pe' rez ve ark, 2011). *H.*

polii üzerine yapılan bir diğer genetik araştırma da, Kuşadası'nda bu türün yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Valente vd., 2014). Eğer, Türkiye sularında *H. polii*'nin kökenini tespit edilirse, Doğu'dan Batı Akdeniz'e bir genetik çeşitlilik derecesi tanımlanabilir. Valente, vd. (2014) çalışmalarında *Holothuria polii*'nin mtDNA COI ve 16S gen bölgelerinin genetik yapısını analiz etmişler ve örnekleri Akdeniz'de çok sayıda türün dağılım gösterdiği 7 lokasyondan toplanmıştır. COI gen bölgesi için yüksek haplotip çeşitliliği ($H=0.6537$, 16S gen bölgesi için orta derecede çeşitlilik ($H=0.6537$) ve iki gen bölgesi için düşük nükleotit çeşitliliği (sırasıyla $\pi = 0.0053$ ve 0.0029) belirlenmiştir. Doğu kısmı COI için batıya göre daha yüksek sayıda haplotip, özel haplotip, polimorfik site ve haplotip çeşitliliği göstermektedir. Kuşadası bütün parametrelerde en yüksek değeri gösteren bölge olmuştur. Elde edilen bu veriler yürütülen çalışma ile de uyumlu olduğu görülmektedir. Mercedes vd. (2015), en eski yayılım süreci ve çalışılan tüm bölgelerin genetik çeşitliliğini (toplam haplotipler, polimorfizm, haplotip ve nükleotit çeşitliliği) koruma alanlarının etkisini görme amacıyla Kuşadası'nda (Türkiye) gözlemlemiştir. Korunan alandaki yüksek genetik çeşitlilik, deniz hıyarı türlerinin hayatta kalması için çok önemli olabileceği vurgulanmaktadır. Kuşadası bölgesinde görülen çok sayıda özel haplotip olağan dışı koşullar altında uyumlulukları arttırabilir (Ryman vd., 1995; Perez-Ruzafa vd., 2006; Vergara-Chen vd., 2010) ve ayrıca çevresel değişime uyum için temel oluşturabilir (Sanford ve Kelly, 2011; Gonzalez-Wanguemert ve Perez-Ruzafa, 2012; Gonzalez-Wanguemert ve Vergara-Chen, 2014). Koruma alanlarının olmaması düşünüldüğünde balıkçılık baskısı, bireylerin büyüklüğünü azaltacak ve Türkiye'nin kıyı bölgelerinde deniz hıyarı stoklarının genetik çeşitliliğinde de azalma olacaktır. Bu ileriki aşamalarda türün yok olmasına kadar gidecek olumsuzluklara neden olabilecektir.

Bu çalışmada türler arası genetic mesafe, COI ve 16S rRNA gen bölgeleri için Kimuranın 2-parametresine göre hesaplanmış ve %4,93 – %23,16 arasında dağılım göstermiştir. Elde edilen değerlere bakıldığında en düşük uzaklık *H. tubulosa* ve *H. mammata* arasında görülürken en yüksek uzaklık değeri (% 5,288) ise *H. tubulosa* ve *H. sanctori* arasında hesaplanmıştır. Borrero-Pe' rez, (2010) COI geninin 532 bp'lik kısmının sekansını alarak, *H. tubulosa* ve *H. mammata* türleri arasındaki sekans farklılığını ikili düzeltilmemiş p-mesafelerine göre % 8,0 ve *H. mammata* ve *H.*

sanctori arası farklılığı ise % 19,0 arasında değiştiğini göstermiştir. En yüksek uzaklık değeri ise % 19,8 ile *H. tubulosa* ve *H. sanctori* arasında değiştiğini göstermiştir. Ayrıca, çalışmada *H. polii*'nin *H. sanctori* türüne uzak (% 19) iken *H. tubulosa* türüne yakın olduğu (% 11) olduğu görülmüştür. Araştırmacıların sonuçları, yürütülen bu çalışma ile benzer olduğu görülmektedir. Tür içi mesafeler ise COI gen bölgesi için *H. polii* ve *H. tubulosa* % 0,56 ile tür içi farklılığın en düşük görülen türler olurken, *H. mammata*'nın % 0,75 ile en yüksek tür içi farklılığa sahip tür olduğu belirlenmiştir. Diğer bir taraftan 16S rRNA gen bölgesi için tür içi ikili dizin farklılığı değerleri ise en düşük *H. mammata* ve *H. tubulosa* (% 0,0) türlerinde görüldükten, en yüksek değerin *H. sanctori* (% 0,68) türü içinde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada bulunan tür içi farklılıklara benzer değerler, Borrero-Pe'rez, (2010) tarafından yapılan çalışmada da bulunmuştur.

Holothuroid soylarının evrimsel ilişkileri, yakın zamana kadar, tam olarak anlaşılammıştır. Bu kısmen, çalışılan canlıda bütünleşmiş bir iskeletin bulunmamasından dolayı geniş fosil kayıtlarına ulaşmada yaşanan güçlüklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Holothuroidea içindeki ilişkiler hakkında 19. yüzyıla kadar uzanan çok sayıda spekülasyon bulunmaktadır. Modern karşılaştırmalı biyolojik yöntemler karşılaşılan probleme karşı yakın zamana kadar uygulanamamıştır. Sonra Littlewood vd. (1997), ekinodermiler içindeki sınıf-seviye ilişkilerini çözmek için toplam iki ribozomal gen üzerinde çalışmalar yürütmüştür. Analizler Dendrochirotida ve Aspidochirotida arasında yakın bir ilişkiyi desteklemiş, ancak Elasipodida ve Apodida'nın filogenetik pozisyonunu çözememiştir. Smith (1997) daha sonra Elasipodida'nın (Dendrochirotida + Aspidochirotida) ile Apodida'dan daha yakın ilişkili içinde olduğunu savunmuştur. Bu hipotez, Apodida'nın holothuroidlerle kız kardeş olduğuna dair erken dönemde yapılan spekülasyonu (Semper, 1868) tekrar hatırlatmaktadır.

Holothuria örnekleri için yapılan filogFAO

enetik analizler sonucunda oluşturulan NJ, MP ve ML dendogramlarının benzer topolojiler oluşturduğu görülmüştür. Gerek elde edilen sekans verilerinden gerekse gen bankasından alınan verilerle birlikte yapılan filogenetik analizler sonucunda da, bu türlerin üç farklı klada ayrıldığı görülmüştür. İlk klad, *H. mammata* ve *H. tubulosa* türlerinden oluşurken, ikinci klad'da *H. polii* yer almıştır. Basal pozisyonundaki son klad

ise *H. sanctori* türü bulunmaktadır. İlk klad'da yer alan *H. mammata* ve *H. tubulosa* türleri kardeş tür olarak birbirlerine yakın görülmektedir. Borrero-Pe'rez, (2010), yapmış olduğu çalışmada 2 gen bölgesinin (sitokrom c oksidaz (cox1) ve büyük ribosomal alt birim (rrnL)) sekanslarının filogenetik analizleri sonucunda dört lineage tespit edilmiş, *H. mammata*, *H. tubulosa*, *H. polii* ve *H. sanctori* türleri üç ayrı lineage'de yer almış ve yürütülen bu çalışmada olduğu gibi *H. mammata* ve *H. tubulosa* türleri kardeş türler olarak ilk lineage'de birbirine yakın durmuştur. Ayrıca çalışmada, *H. polii* ve diğer türler (*H. impatiens*, *H. sanctori* ve *H. forskali*) arasında derin bir farklılık olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Türkiye'den iki farklı lokaliteden toplanan dört *Holothuria* türü ile yapılan mtDNA sekans (COI ve 16S rRNA) analizleri sonucunda 12 haplotip elde edilmiştir. Bu haplotiplerden 3'ü *H. mammata* örnekleri için, 3 haplotip *H. tubulosa*, 4 haplotip *H. polii* ve 2 haplotip *H. sanctori* örnekleri için bulunmuştur. Yapılan filogenetik analizlerde elde edilen ağaçlarda üç soy hattı olduğu görülmüştür. Bu üç soy hattından *H. mammata*'nın sahip olduğu haplotipler Ege denizi Ayvalık ve Kuşadası'nda, *H. tubulosa*'nın sahip olduğu haplotipler yine Ayvalık ve Kuşadası'nda, *H. polii*'nin sahip olduğu haplotipler Kuşadası'nda ve *H. sanctori*'nin sahip olduğu haplotipler Kuşadası'nda dağılım göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen verilerle ve gen bankası'nda depolanan ve farklı lokalitelerden elde edilmiş (Borrero-Pérez vd. (2010); Borrero-Pérez vd. (2009); González-Wangüemert ve Borrero-Pérez (2012); González-Wangüemert vd. (2015); Honey-Escandon vd. (2012); Maggi ve Gonzalez-Wanguemert) veriler beraber değerlendirilmiş ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Gen bankası sekansları İspanya, Yunanistan, Portekiz ve Türkiye'den örnekler içermektedir. Bu çalışmadaki örnekler ise Ege denizi, Ayvalık ve Kuşadası örneklerini içermektedir. Elde edilen gen bankası verileri bu çalışmanın verileriyle beraber değerlendirilmiş ve bu çalışmada elde edilen bulgularla paralellik gösterdiği görülmüştür.

Bu çalışmada sınırlı sayıda lokaliteden sınırlı sayıda örnek alınmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda aynı ve farklı lokalitelerden daha fazla örnekle çalışmak, mitokondriyal gen bölgeleri ile birlikte nükleer DNA analizlerinin de yapılması gerekmektedir. Ayrıca, aşırı av baskısına maruz kalan türlerin popülasyonlarının

süedürülebilir bir şekilde yönetilebilmesi için popülasyon genetiği çalışmalarının yürütülmesi stokların durumunu belirlemede yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Allendorf, F. W., Berry, O., & Ryman, N. (2014). So long to genetic diversity, and thanks for all the fish. *Molecular ecology*, 23(1), 23-25.
- Anonim, (2008). <https://www.sealifebase.ca/photos/ThumbnailsSummary.php?Genus=Holothuria&Species=mammata> (Erişim Tarihi: 26.06.2021).
- Anonim, (2012b). <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=image&tid=124528&pic=48185> (Erişim Tarihi: 26.06.2021).
- Anonim, (2018). <https://alchetron.com/Holothuria-tubulosa> (Erişim Tarihi: 26.06.2021).
- Anonim,(2012).<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=image&pic=48194&tid=124525> (Erişim Tarihi: 26.06.2021).
- Anonymous, (2002). Regulating the fisheries in 2002– 2004, The Circular No. 35/1. The Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Ankara, Turkey. 11 p (in Turkish).
- Arndt A, Marquez C, Lambert O, Smith MJ (1996). Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Mol Phylogenet Evol* 6:425–437.
- Aydın, M. (2016). Sea cucumber (Holothuroidea) species of Turkey. *Türk Denizcilik ve Deniz Bilimleri Dergisi*, 2(1), 49-58.
- Aydın, M., & Erkan, S. (2015). Identification and some biological characteristics of commercial sea cucumber in the Turkey coast waters. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 3(1), 260-265.
- Aydın M. (2008). The commercial sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 28, 40–41.
- Birleşmiş Milletler (2017). “Population”. (Çevrimiçi), <http://www.un.org/en/sections/issues-depth/population/> (05.01.2019).
- Borrero-Pérez, G. H., Gómez-Zurita, J., González-Wangüemert, M., Marcos, C., & Pérez-Ruzafa, A. (2010). Molecular systematics of the genus *Holothuria* in the Mediterranean and Northeastern Atlantic and a molecular clock for the diversification of the Holothuriidae (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 899-906.
- Borrero-Pérez, G. H., González-Wangüemert, M., Marcos, C., & Pérez-Ruzafa, A. (2011). Phylogeography of the Atlanto-Mediterranean sea cucumber *Holothuria (Holothuria) mammata*: the combined effects of historical processes and current oceanographical pattern. *Molecular ecology*, 20(9), 1964-1975.
- Borrero-Pérez, G.H., Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C., González-Wangüemert, M., (2009). The taxonomic status of some Atlanto-Mediterranean species in the

- subgenus *Holothuria* (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae) based on molecular evidence. *Zool. J. Linn. Soc.* 157, 51–69.
- Bruckner, A. W., Johnson, K. A., & Field, J. D. (2003). Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade. *SPC Bêche-de-mer information Bulletin*, 18(1), 24-33.
- Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC beche-de-mer Information Bulletin*, 18, 18-23.
- Choo, P. S. (2008). The Philippines: a hotspot of sea cucumber fisheries in Asia. *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 516, 119-142.
- Choo, P. S., & Williams, M. J. (2004). Trade and Utilization of Sea Cucumber in Malaysia. *SPC Bech-De-Mer Inf. Bul*, 19.
- Crandall, M. C. D. P. K., Clement, M., & Posada, D. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 9, 1657-1660.
- Cohen, J. E. (2003). Human population: the next half century. *science*, 302(5648), 1172-1175.
- Çiftci, Y. (2006). Türkiye Alabalık (*Salmo Trutta* Linnaeus, 1758 Ve *Salmo Platycephalus* Behnke, 1968) Populasyonlarının Genetik Yapısının Mtdna-Rflp Analiz Yöntemiyle Belirlenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, 195s.
- El-Naggar, A. M., Ashaat, N. A., El-Belbasi, H. I., & Slama, M. S. (2008). Molecular Phylogeny of Egyptian Sea Cucumbers As Predicted From 16s Mitochondrial rRNA Gene Sequences. *World Applied Sciences Journal*, 5(5), 531-542.
- FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 (SOFIA): contributing to food security and nutrition for all Food and Agriculture Organization, Rome (2016), p. 200.
- Fischer, A. H., Mozzherin, D., Eren, A. M., Lans, K. D., Wilson, N., Cosentino, C., & Smith, J. (2014). SeaBase: a multispecies transcriptomic resource and platform for gene network inference. *American Zoologist*, 54(2), 250-263.
- González-Wangüemert, M., & Borrero-Pérez, G. (2012). A new record of *Holothuria arguinensis* colonizing the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, 5.
- González-Wangüemert, M., Aydin, M., & Conand, C. (2014). Assessment of sea cucumber populations from the Aegean Sea (Turkey): First insights to sustainable management of new fisheries. *Ocean & Coastal Management*, 92, 87-94.

- González-Wangüemert, M., Valente, S., & Aydin, M. (2015). Effects of fishery protection on biometry and genetic structure of two target sea cucumber species from the Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 743(1), 65-74.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Honey-Escandon, M., Laguarda-Figueras, A., & Solis-Marin, F. A. (2012). Molecular phylogeny of the subgenus *Holothuria* (Selenkothuria) Deichmann, 1958 (Holothuroidea: Aspidochirotida). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 165(1), 109-120.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kitano, M., K. Kurata, Y. Kozuki, H. Murakami, T. Yamasaki, H. Yoshida and H. Sasayama, (2003). Effects of deposit feeder *Stichopus japonicus* on algal bloom and organic matter contents of bottom sediments of the enclosed sea. *Mar. Poll. Bull.*, 47: 118-125.
- Littlewood, D. T. J., A. B. Smith, K. A. Clough and R. H. Emson. (1997). The interrelationships of the echinoderm classes: morphological and molecular evidence. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 409-438.
- Maddison, D. R., Swofford, D. L., & Maddison, W. P. (1997). NEXUS: an extensible file format for systematic information. *Systematic biology*, 46(4), 590-621.
- Maggi, C. and Gonzalez-Wanguemert, M. (Basilmamış). Characterization of *Parastichopus regalis* populations from Western Mediterranean Sea.
- Mercier, A. & Hamel, J.-F. 2013a. *Holothuria mammata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013:e.T180514A1641636. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180514A1641636.en>. Downloaded on 18 June 2021.
- Mercier, A. & Hamel, J.-F. 2013b. *Holothuria sanctori*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013:e.T180329A1615992. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180329A1615992.en>. Downloaded on 18 June 2021.
- Mercier, A. 2013. *Holothuria poli*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013:e.T180295A1612001. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180295A1612001.en>. Downloaded on 18 June 2021.

- Mezali, K. (2011). Some insights on the phylogeny of Algerian shallowwater sea cucumbers species (Holothuroidea: Aspidochirotida). *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 11, 45-47.
- Moriarty, D. J. W. (1982). Feeding of *Holothuria atra* and *Stichopus chloronotus* on bacteria, organic carbon and organic nitrogen in sediments of the Great Barrier Reef. *Marine and Freshwater Research*, 33(2), 255-263.
- Nixon, S.W. (1995). Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41, 199–219
- Ovenden, J. R., Leigh, G. M., Blower, D. C., Jones, A. T., Moore, A., Bustamante, C., ... & Dudgeon, C. L. (2016). Can estimates of genetic effective population size contribute to fisheries stock assessments?. *Journal of Fish Biology*, 89(6), 2505-2518.
- Palumbi, SR., Martin, A., Romano, S., McMillan, WO., Stice, L., Grabowski, G. (1991). The simple fool's guide to PCR, Version 2.0. Privately published document compiled by Palumbi S. Special Publication of Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.
- Pinsky, M. L., & Palumbi, S. R. (2014). Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular Ecology*, 23(1), 29-39.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 817-818.
- Preston G.L. (1993). Beche-de-mer. p. 371–407. In: Wright A. and Hill L. (eds). Nearshore marine resources of the Southern Pacific: Information for fisheries development and management. Institute of Pacific Studies, Fiji; Forum Fisheries Agency, Solomon Islands; International Centre for Ocean Development, Canada
- Richards, A. H., Bell, L. J., & Bell, J. D. (1994). Inshore fisheries resources of Solomon Islands. *Marine Pollution Bulletin*, 29(1-3), 90-98.
- Roff JC, Zacharias M. (2011). Marine Conservation Ecology. Earthscan: London.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496-2497.
- Samyn, Y. (2013). *Holothuria tubulosa*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013: T180455A1632895. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180455A1632895.en>. Downloaded on 18 June 2021.
- Semper, C. (1868). Reisen im Archipel der Philippinen. 2. Wissenschaftliche Resultate. 1. Holothurien. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Smith, A. B. (1997). Echinoderm larvae and phylogeny. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 219-241.

- Swofford, D.L. (1998). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tanti, C. M., & Schembri, P. J. (2006). A synthesis of the echinoderm fauna of the Maltese Islands. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 86: 163-165.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & 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(22), 4673-4680.
- United Nations Food and Agriculture Organization. (2014). The state of world fisheries and aquaculture 2014. United Nations Food and Agriculture Organization, Rome.
- Uthicke, S. (1999). Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bulletin of Marine Science*, 64(1), 129-141.
- Watts, P. C., Rousset, F., Saccheri, I. J., Leblois, R., Kemp, S. J., & Thompson, D. J. (2007). Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale*: Odonata: Zygoptera) populations: analysis of 'neighbourhood size' using a more precise estimator. *Molecular Ecology*, 16(4), 737-751.
- Wirtz, P. (2009). Thirteen new records of marine invertebrates and two of fishes from Cape Verde Islands. *Arquipélago-Life and Marine Sciences*, (26), 51-56.
- Yingst, J. Y. (1976). The utilization of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit-feeding holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 23(1), 55-69.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ozan ŞEN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fakülte	Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	22.01.2010
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Balıkçılık Teknolojisi
Mezuniyet Tarihi	2021