



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON BİRİMİ
PROJE SONUÇ RAPORU

**Yeşil Deniz Kaplumbağası (*Chelonia mydas*) Yavrularında Morfolojiye ve Moleküler
Analize Dayalı Cinsiyet Belirlenmesi**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ

Bektaş SÖNMEZ

YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR

Efkan BAĞDA

Onur CANDAN

Hasan Emre YILMAZ

Bu proje Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından
KMYO-004 Numaralı Katılımlı Araştırma Projesi Olarak Desteklenmiştir

SİVAS 2017

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	II
ÇİZELGELER LİSTESİ	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOT	9
2.1. Proje Alanı.....	9
2.2. Cinsiyet Tayini ve Gonad Histolojisi	11
2.3. Klasik Morfometri Çalışması.....	12
2.4. Geometrik Morfometri Çalışması.....	15
2.5. Moleküler Analiz Çalışmaları.....	16
2.6. Verilerin Analizi.....	25
3. BULGULAR	26
3.1. Klasik Morfometri	26
3.2. Geometrik Morfometri	33
3.3. Moleküler Analiz.....	38
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
TEŞEKKÜR	44
KAYNAKLAR.....	44
EK: Arazi Çalışmaları Hakkında Görseller	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Samandağ ve Sugözü Kumsalları (1: Akkum Kumsalı 2: Sugözü Kumsalı 3: Botaş Kumsalı 4: Hollanda Kumsalı).....	10
Şekil 2. Dişi ve erkek yavru bireylerin ölçümü alınan morfolojik karakterleri	14
Şekil 3. Farklı vücut bölgelerinden alınan landmark noktaları	16
Şekil 4. Total genomik DNA agaroz jel (% 0.8) görüntüsü (Mavi etiketliler erkek bireyleri, pembe etiketliler dişi bireyleri temsil etmektedir. M: 100 bp).....	18
Şekil 5. Etiketsiz primerler kullanılan seçici amplifikasyon ürünlerinin native jel görüntüleri.....	24
Şekil 6. Floresans boya etiketli <i>EcoRI</i> seçici primerleri ile çoğaltılmış AFLP fragmanları a) jel görüntüsü, b) pikler.....	25
Şekil 7. Cinsiyetlerin % 95 güven aralıklı kanonik ayırıcı fonksiyon analizinde şekilsel görünümü.....	30
Şekil 8. Morfolojik karakterlerin temel bileşenler analizi sonucu vektörel dağılımı.....	32
Şekil 9. Dişi ve erkek bireylerde karapasta seçilen landmarkların dağılımı	33
Şekil 10. Temel bileşenler analizi sonucu erkek ve dişi bireylerin karapas landmarklarının % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiği	34
Şekil 11. Dişi ve erkek bireylerde plastronda seçilen landmarkların dağılımı.....	35
Şekil 12. Temel bileşenler analizi sonucu erkek ve dişi bireylerin plastron landmarklarının % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiği.....	36
Şekil 13. Dişi ve erkek bireylerde kuyrukta seçilen landmarkların dağılımı.....	37
Şekil 14. Temel bileşenler analizi sonucu erkek ve dişi bireylerin kuyruk landmarklarının % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiği.....	38

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1. Moleküler çalışmada kullanılan <i>C. mydas</i> örnek bilgileri.....	16
Çizelge 2. Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ve dizileri.....	22
Çizelge 3. Doğrusal morfometri için ölçümü alınan ve birbirlerine oranlanan karakterlerin tanımlayıcı istatistiği	27
Çizelge 4. Değişkenlerin rotasyona tabii tutulduktan sonra temel bileşenler altındaki değerleri	31

Yeşil Deniz Kaplumbağası (*Chelonia mydas*) Yavrularında Morfolojiye ve Moleküler Analize Dayalı Cinsiyet Belirlenmesi

ÖZET

Deniz kaplumbağalarında cinsiyet ve cinsiyetin oranının bilinmesi onların yaşam öyküsü içinde popülasyon dinamiğinin belirlenmesi için gerekli bir parametredir. Deniz kaplumbağalarında genç ve yavru bireylerin cinsiyetlerini belirlemek güçtür. Bu nedenle araştırmacılar yavru popülasyonlarında cinsiyet oranlarının ölçülmesi için farklı teknikler kullanmaktadırlar. Bu projede, cinsiyetleri önceden gonad histolojisi ile belirlenmiş yeşil deniz kaplumbağası (*Chelonia mydas*) yavrularında, klasik morfometri, geometrik morfometri ve moleküler analiz yöntemleri ile cinsiyetler arası farkın ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Hatay ili Samandağ kumsalı ve Adana il Yumurtalık kumsallarında, 2014, 2015 ve 2016 yılı üreme sezonlarında toplam 255 demorfe olmamış ölü yavru kaplumbağa toplanmış ve bunların 158 tanesinden gonad histolojisi sonucu cinsiyet tayini yapılabilmektedir. Cinsiyet tayini sonucu toplam 12 erkek ve 146 dişi birey tespit edilmiştir. Klasik morfometri çalışmasında, 12 erkek ve dişiler arasından rastgele seçilmiş 12 dişi yavrudan toplam 16 karakterin ölçümü ve bu karakterlerin birbirine oranı şeklinde 20 oransal ölçüm yapılmıştır. Bu şekilde toplam 36 karakter, çoklu varyans analizi (MANOVA), ayrımcı fonksiyon analizi (DFA) ve temel bileşenler analizi (PCA) ile analiz edilmiştir. Klasik morfometri analizi sonucunda cinsiyetler birbirlerinden ayrım göstermemiştir. Ancak kuyruk uzunlukları ve kuyruk uzunluklarının diğer ölçümü alınan karakterlere oranları, temel bileşenler analizinde (PCA) istatistiksel olarak anlamlı olmasada diğer karakterlere göre görsel olarak ayrılma göstermiştir. Geometrik morfometri analizi için, kumsallardan şekilsel olarak bozulmuş göstermemiş ve yeni ölmüş yavruların 3 farklı vücut bölgesinden (karapas, plastron ve kuyruk) 23 cm uzaklıktan fotoğrafları çekilmiş ve 2 dişi yavrunun fotoğrafı çekilemediği için 10 erkek ve 10 dişi yavru geometrik morfometri için analiz edilmiştir. Her üç vücut bölgesinden toplam 60 landmark noktası (36 karapas, 17 plastron, 7 kuyruk) belirlenmiştir. Her üç vücut bölgesi çoklu varyans analizi (MANOVA), ayrımcı fonksiyon analizi (DFA) ve temel bileşenler analizi (PCA) ile analiz edilmiş ve cinsiyetler karapas, plastron ve kuyruk şekil farklılığı yönünden birbirlerinden ayrılma göstermemiştir. Ancak, kuyruk üzerinde ki landmarkların şekilsel farklılığı testinde, hem temel bileşenler analizi hem de ayrımcı fonksiyon analizi daha yüksek oranda sınıflandırma göstermiştir.

Moleküler analiz çalışmasında, AFLP (Artırılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) tekniği ile cinsiyet belirteçleri tanımlanmaya çalışılmıştır. Toplamda 55 farklı oligonükleotid kombinasyonu, cinsiyet temelli havuz stratejisi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bant profillerine bakıldığında; çalışma kapsamında kullanılan AFLP oligonükleotid kombinasyonlarının *C. mydas* örneklerinde cinsiyet ayrımının yapılması için kullanışlı olmadığı anlaşılmıştır. Ancak bu ve benzer çalışmaların sonuçları dikkate alındığında, *C. mydas*'a özgü AFLP cinsiyet belirteçlerinin tanımlanabilmesi veya durumunun tartışılabilmesi için daha fazla sayıda primer kombinasyonu kullanılmasını önermekteyiz. Ayrıca farklı populasyonlar arasındaki olası polimorfik AFLP belirteçlerinin belirlenmesinin, cinsiyetler arası farklılıkların test edilmesinde destek sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Geometrik Morfometri, AFLP, Cinsiyet Belirleme, Yeşil Deniz Kaplumbağası, Samandağ, Yumurtalık

ABSTRACT

Knowledge of the sex ratio of gender in sea turtles is a necessary parameter for determining population dynamics within their life story. It is difficult to determine the sex of hatchlings and juvenile in sea turtles. For this reason, researchers use different techniques to determine sex and sex ratios in hatchlings. In this project, it is aimed to reveal the difference between the sexes by classical morphometry, geometric morphometry and molecular analysis methods in the green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings whose sexes were previously determined by gonad histology. A total of 255 dead hatchlings that have not been decomposed, have been collected during the 2014, 2015 and 2016 nesting seasons in Samandağ beach in Hatay and Yumurtalık beach in Adana. The gonad histologic resultant genders could be determined from 158 of them. A total of 12 males and 146 females were identified as a result of sex discrimination. In the classical morphometry study, a total of 16 characters were measured in randomly chosen 12 females and 12 males. Also, 20 proportional measurements of 16 characters were performed as a one-to-one ratio. In this way, a total of 36 characters were analyzed by multiple variance analysis (MANOVA), discriminant function analysis (DFA) and principal component analysis (PCA). As a result of classical morphometry analysis, sexes did not distinguish between each other. However, even if the tail lengths and ratios of tail lengths to other characters have not been statistically significant, relative to other characters was showed differences in the analysis of principal components (PCA). For the geometric morphometry analysis, photographs from newly dead hatchlings without formal deformity on the beaches were taken from a distance of 23 cm from 3 different body regions (carapace, plastron and tail), and 10 male and 10 female hatchlings were analyzed for geometric morphometry because 2 female hatchlings could not be photographed. A total of 60 landmark (36 carapaces, 17 plastrons, 7 tails) were identified from all three body regions. All three body regions were analyzed by multiple variance analysis (MANOVA), discriminant function analysis (DFA) and principal component analysis (PCA), and sex of hatchlings not showed differ in terms of carapace, plastron and tail shape differences. However, the landmarks on the tail, both the principal component analysis and the discriminant function analysis showed a higher order classification.

In the molecular analysis methods, it was tried to define sex markers with AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique. A total of 55 different oligonucleotide combinations were analyzed using gender based pool strategy. According to

the obtained tape profiles; it was understood that the AFLP oligonucleotide combinations used in the study were not useful for gender discrimination in *C. mydas* specimens. However, when we consider the results of these and similar studies, it is recommended that larger numbers of primer combinations should be used for identification of sex-specific AFLP markers and discussion of possible alternatives. We believe that identification of possible polymorphic AFLP markers in different populations will support understanding of differences between genders.

Key Words: Geometric Morphometry, AFLP, Gender Determination, Green Sea Turtle, Samandağ, Yumurtalık.

1. GİRİŞ

Yaşayan yedi deniz kaplumbağası türünden beşi; *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Ertmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766), *Lepidochelys kempii* (Garman, 1880) ve *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761) Akdeniz’de görülürken, bunlardan sadece *C. mydas* ve *C. caretta* türleri Akdeniz sahillerinde düzenli olarak yuva yaparlar (Groombridge, 1990). CITES (Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme) ve Bern Anlaşması (1979) (Avrupa Doğal Hayatı ve Yaşamı Koruma Anlaşması) ile koruma altında olan her iki türde IUCN (Dünya Doğayı Koruma Birliği) kırmızı listesinde (2000) küresel düzeyde “yakın gelecekte nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan tür”, Akdeniz altpopulasyonu için *C. mydas* ayrıca, “kritik olarak tehlike altında olup çok yakın gelecekte nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan tür” olarak listelenmiştir. Eti, kemiği ve kabuğu için avlanan, yumurtlama alanları olan sahillerde ağır turizm ve yerleşim baskısı altında olan, balıkçı ağlarına takılan ve doğal avcılarının tehdidi altında yaşam savaşı veren deniz kaplumbağaları, nesli tehlike altında olan türler içermesi ile bilimsel ilgiyi üzerine çekmektedir. Bununla beraber, yüz milyon yıldan daha uzun süredir okyanuslarda yaşamını sürdüren ve doğal dengeye katkısını sunan deniz kaplumbağaları, uzun yaşam süreleri, göçmen doğası, farklı habitatlarda geçirdiği yaşam safhaları ve çok geniş yayılım alanları ile bilimsel cazibesi yüksek fakat incelenmesi zor türlerdendir. Deniz kaplumbağaları ile ilgili yapılan koruma uygulamaları genellikle esaret altında yetiştirme ve yuva alanlarıyla ilgili yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

Eşeyssel üreyen canlılarda, bireyin cinsiyeti en önemli fenotipik özelliktir. Bir embriyonun, dişi ya da erkek olarak farklılaşması onun yaşam öyküsü, davranışı, fizyolojisi, morfolojisi ve uyum gücü üzerinde önemli sonuçlar açığa çıkarır. Populasyon içindeki fenotipik varyasyonun en zengin kaynağı olan cinsiyetin tanımlanması özellikle ekoloji, davranış, koruma ve genetik çalışmalarında önemlidir. Bu nedenle cinsiyet gelişimini yöneten

faktörler bilimsel ilginin odağında olan önemli bir çalışma alanıdır (Mittwoch, 2000; Warner, 2011). Sürüngenlerde cinsiyet belirleyici mekanizmalar, tamamen genetik kontrol altında olanlar ve embriyonik gelişim sürecinde ki sıcaklık değişimine yüksek oranda bağlı olanlar arasında değişen altı kategoriye sokulmakla birlikte geleneksel olarak iki ana başlıkta toplanmaktadır. Bunlardan birincisi genetik faktörlerin (GCB); ikincisi ise çevresel faktörlerin rol aldığı (ÇCB) cinsiyet belirleme mekanizmalarıdır. Sürüngenlerde embriyonik gelişim süresinde sıcaklığın etkisi diğer çevresel faktörlere göre daha çok hissedilir. Bu nedenle sıcaklık etkili cinsiyet belirleme mekanizması (SCB) sürüngenlerde en sık rastlanan ÇCB yoludur. Karşılaştırmalı analizler, SCB'nin kaplumbağalar için atasal durumu ifade ettiğini (Janzen ve Krenz, 2004; Organ ve Janes, 2008), GCB'nin ise en az 6 kez bağımsız olarak ortaya çıktığını göstermiştir (Janzen ve Krenz, 2004). Yüz kırk dokuz kaplumbağa türüne ait karyotip verileri, sadece 8 türde heteromorfik cinsiyet kromozomu olduğunu açığa çıkarmıştır (Warner, 2011). Yapılan yumurta inkübasyon deneylerinde ise tanımlanmış herhangi bir cinsiyet kromozomu olmadığı halde cinsiyet oluşumunda sıcaklık etkisinin bulunmadığı bazı kaplumbağa türlerinin de olduğu gösterilmiştir (Warner, 2011). Ancak test edilen türlerin çoğunda (%81) SCB'nin temel mekanizma olduğunu gösteren deneysel kanıtlar elde edilmiştir.

Deniz kaplumbağaları uzun ömürlü, geç erginleşen ve tam çözülmemiş karmaşık bir yaşam hikayesine sahiptirler. Bundan dolayı yavru cinsiyet oranlarının sonraki popülasyonlarda görülecek sonuçları hesaplanamamakla birlikte yaygın bir etkiye sahip olacağı bilinmektedir (Kaska vd., 2006). Deniz kaplumbağalarında cinsiyet tahmini ve cinsiyet ayrımının yapılması ile ilgili çalışmalar yaklaşık 35 yıldır yapılıyor olmasına rağmen ülkemizde bu konu ile ilgili çalışmalar 20 yıl öncesine dayanmaktadır. Deniz kaplumbağalarında cinsiyet ve cinsiyetin oranının bilinmesi onların yaşam öyküsü içinde popülasyon dinamiğinin belirlenmesi için gerekli bir parametredir. Bununla birlikte yaşam

döngüleri içinde sıcaklığa bağlı cinsiyet değişimi (SCB) göstermelerinden dolayı küresel iklim değişikliğinden olumsuz etkilenebilirler ve bu var olan popülasyonları etkilemesinin yanında gelecekte ki popülasyonu da etkileyebilir. Küresel iklim değişikliği sonucunda üreme kumsallarının cinsiyet oranlarının bilinmesi türün geleceği ve etkin koruma planının ortaya çıkarılması için önemlidir. Çünkü uzun dönemli hayatta kalmaları hem dişi hem de erkek üretimine bağlıdır (Janzen, 1994). Diğer sürüngenlerde olduğu gibi deniz kaplumbağaları heteromorfik cinsiyet kromozomundan yoksun olup cinsiyetleri de yuva çevresinin sahip olduğu fiziksel şartlardan sıcaklığın etkisi (SCB) ile şekillenmektedir ve cinsiyet ile kuluçka sıcaklığı arasında ki ilişki, eşik sıcaklık derecesi ile karakterizedir (Kaska vd. 1998). Eşik sıcaklık derecesi, eşit oranda dişi ve erkek bireylerin oluşmasını sağlayan sıcaklıktır. Sürüngenlerde sıcaklığa bağlı üç tip cinsiyet değişimi görülmektedir; **1-)** Kuluçka sıcaklığı eşik sıcaklığın altında olduğu zaman erkek yavru oluşumu (Deniz kaplumbağaları) (Mrosovsky, 1994), **2-)** Kuluçka sıcaklığı eşik sıcaklığın üstünde olduğu zaman erkek yavru oluşumu (Kertenkele ve Amerikan timsahları) (Wagner, 1980), **3-)** Kuluçka sıcaklığı sadece eşik sıcaklıkta olduğu zaman erkek yavru oluşumu (Leopar gekkolar ve timsahlar) (Gutzke ve Paukstis, 1984). Yapılan arazi çalışmaları doğal popülasyonlarda yavru ve juvenil dişi cinsiyet oranının 1:1'den (Wibbels vd., 1993) 9:1'e (dişi:erkek) (Mrosovsky ve Provancha 1992) değiştiğini göstermektedir Yuva manipülasyonları yavruların cinsiyet oluşumunu etkileyerek popülasyon cinsiyet oranlarını değiştirir. Cinsiyet oranlarını izlemek için, manipüle edilmiş yuvalarda, yavruların salınmadan önce cinsiyetlerinin tam olarak belirlenmesi doğal cinsiyet oranlarının korunması için önemlidir (Hamann vd., 2010).

Deniz kaplumbağası yavrularında cinsiyet belirlenmesi çalışmalarında Dünya'da değişik araştırmacılar tarafından değişik metotlar ile araştırılmıştır. Bunlardan McCoy vd. (1983) ve van der Heiden vd. (1985), *Lepidochelys olivacea* ve *C. mydas* türü deniz kaplumbağası yavrularında, doğrudan veya gliserin ile gonadların morfolojik yapısını

gözlemleyerek, dişi ve erkek yavru bireyler arasında cinsiyet ayrımı yapmışlardır. Bir başka cinsiyet ayırma çalışması ise gonad histolojisi ile cinsiyet ayrımının yapılması olup en sağlıklı cinsiyet ayrımı metodu olarak bilinmektedir ve birçok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (Yntema ve Mrosovsky, 1980; Merchant-Larios vd., 1989; Godfrey ve Mrosovsky, 2006). Kandaki plazma steroid yoğunluğunun Radioimmunoassay (RIA) ile ölçülmesi sonucunda cinsiyet tespiti yapmak deniz kaplumbağa yavrularında son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir metottur (Owens vd., 1978; Gross vd., 1995). Gonadların doğrudan canlı içinde gözlenmesi olarak bilinen laparoskopi, canlı bireylerde ya da ölü bireylerde kullanımı ile ilgili araştırmalar mevcuttur. (van der Heiden vd., 1985; Valenzuela vd., 2004). Michel-Morfin vd. (1995), Olive Ridley türü deniz kaplumbağası yavrularında morfolojik olarak cinsiyet ayrımını araştırmışlar ve karapas, plastron ve yüzgeç uzunluklarının da içinde bulunduğu 9 karakter yönünden dişi ile erkek yavrular arasında morfolojik farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir. Godley vd. (2002) deniz kaplumbağalarının erginlerine yönelik dişi ve erkek bireyler arasında morfolojik farklılıkları ortaya koymuş ve erkeklerin dişilere göre daha küçük olduğunu belirlemişlerdir. Valenzuela vd. (2004) deniz kaplumbağası olmayan türlerde dişi ve erkek yavru bireyler arasında geometrik morfolojik farklılıkları araştırmışlar ve her iki cinsiyet içinde karapas şekil benzerliği yönünden önemli farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir. Grossman vd. (2007), Brezilya kıyılarında yetişkin dişi ve erkek yeşil deniz kaplumbağalarının morfolojik farklılıklarını araştırmışlar ve erkek bireylerin dişi bireylere göre daha küçük olduğunu rapor etmişlerdir. Ceriani ve Wyneken (2008) deniz kaplumbağalarında üreme sistemlerinin morfolojik karşılaştırmasını yapmışlar ve ovaryumların testislere göre oransal olarak daha büyük olduğunu belirtmişlerdir. Lubiana ve Ferreira Junior (2009) Brezilya Banana Adasında *Podocnemis expansa* kaplumbağası yavrularında karapas şekil benzerliği yönünden dişi ve erkek yavruları karşılaştırmışlar ve her iki cinsiyet arasında önemli farklılıklar belirlemişlerdir.

Cinsiyet tespitinde yukarıdakilerden farklı bir yaklaşım ise dişi ve erkek yavru bireyler arasında çıplak gözle görülmeyen morfolojik farklılıkların olabileceğidir (Valenzuela vd., 2004). Tipik olarak doğrusal ölçümler alınması ve istatistiksel farklılıklar ile dişi ve erkek yavru bireyler arasındaki bu farklılıkları ortaya koyulabilir (Valenzuela vd., 2004). Buna karşın bazı araştırmacılar yavru ve genç kaplumbağalarda cinsiyet ayrımının yapılamamasının en büyük nedenini morfolojik farklılığın olmaması ve bunun için kullanılan bir tekniğin bulunmaması olarak belirtmişlerdir (Lubiana ve Ferreira-Junior, 2009). Yavru bireyler arasında morfolojik yöntem ile cinsiyet ayrımı *L. olivecea* deniz kaplumbağası yavrularında başarıyla kullanılmıştır (Michel-Morfin vd., 2001). Adı geçen bu çalışmada her iki cinsiyet arasında 9 morfolojik karakter bakımından farklılık olduğu belirtilmiştir. Benzer bulgular deniz kaplumbağası olmayan türler içinde bulunmuştur. Valenzuela vd. (2004), *Chrysemys picta* ve *Podocnemis expansa* türlerinde karapas şekil benzerliği yönünden dişi ve erkekleri karşılaştırmışlar ve istatistiksel olarak önemli farklar bulmuşlardır. Ancak deniz kaplumbağası olmayan bazı türlerde ise bu teknik kullanılamamıştır (Burke vd., 1994; Hildebrand vd., 1997). Yavrularda morfolojiye dayalı cinsiyet ayrımının yapılması, verilerin analizi için en iyi istatistiksel yaklaşımı tespit etmek ve morfolojik karşılaştırmada en iyi metodu seçmek için önemlidir (Valenzuela vd., 2004). Sürüngenlerde yavruların sahip olduğu büyüklük, ağırlık ve vitellus miktarı gibi karakterlerin kuluçka çevresi ile ilişkili olabileceği ve kuluçka çevresi, dişi ve erkek yavru bireylerin bu karakterlerine farklı etki yapıyor olabileceği belirtilmiştir (Charnov ve Bull, 1977). Kuluçka çevresinin manipule edilmesi sonucunda dişi ve erkek yavru bireylerin fenotipleri ile çevresel varyasyonlar arasında bir interaksiyon olabileceği bilinmektedir. Reece vd. (2002), *C. caretta* yuvalarında kuluçka çevresinin, dişi ve erkek yavru bireylerin morfolojilerini farklı bir şekilde etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Dişi ve erkek yavru fenotipleri ile değişik çevresel etmenler (sıcaklık, nem vb.) arasında bir etkileşim bulunmaktadır (Reece vd., 2002). Glen vd. (2003) yapmış oldukları bir çalışmada vücut

büyükliğünün kuluçka sıcaklığından etkilendiğini vurgulamıştır. Kuluçka sıcaklığı cinsiyeti belirlediği için de (Yntema ve Mrosovsky, 1980) dişi ve erkek yavru bireyler arasında morfolojik farklılıklar beklenebilir.

Birçok alanda kullanılan geometrik morfometri, örneklerin sahip olduğu şekilsel farklılıkların belirlenmesi amacıyla, araştırması yapılan bireyler üzerindeki noktaların belirlenerek bilgisayar simülasyonları ile bu noktaların benzerlik ve farklılıklarının ortaya çıkarılmasıdır. Bu noktaların işaretlenmesi için biyolojik organizmalarda landmarklar kullanılmakta ve formdan forma gerçek homolojiyi ifade etmektedirler. Landmark noktaları yalnızca kendilerine ait lokasyonlara sahip olmamakla birlikte, araştırmada yer alan diğer formların her biriyle de aynı lokasyonlara sahiptirler (Bookstein, 1991). Landmark incelenen objenin belirli bir özelliğine uygun gelen iki veya üç boyutlu uzayda bir noktadır (Lele ve Richtsmeier, 2001). Landmarklar büyüklük, şekil, ölçek ve oryantasyon ile ilgili gerekli bilgileri sunmakta (Elewa, 2004) ve her bireyde aynı yerden seğıilen homolog noktalar olup, organizma üzerinde çalışılacak bölgenin şeklini betimleyebilecek şekilde ya da diğer bir deyişle sınırlarının birleşme ve uç noktalarını gösterecek şekilde seğıilmektedir. Bu şekilde klasik morfometriden farklı olarak bireyler arasında şekilsel farklılıklar ortaya çıkarılabilmektedir.

Yavrularda cinsiyet belirleme için ideal yöntem; hızlı, ekonomik, arazide uygulanabilir, sadece ölü yavrularda uygulanmayan, canlı yavrularda ise yavruda en az strese neden olanıdır. Cinsiyet tayini için yukarıda anlatıldığı gibi birçok teknikler geliştirilmiştir, her birinin avantajlı ve dezavantajlı olduğu noktalar bulunmaktadır. Bu nedenle, teknik seğıimi, finansal kısıtlamalar ve mevcut teknik uzmanlar gibi faktörlerin yanı sıra izlenen araştırma sorusuna ve ihtiyaç duyulan çözüme dayalı bir uzlaşma gerektirmektedir (Mueller ve Wolfenbarger, 1999). Mevcut tekniklerin yuva manipölasyonu, ağır invaziv uygulamalar,

ötenazi, uzun ve karmaşık laboratuvar süreçleri ve pahalı uygulamalar alternatif yöntemler geliştirilmesini motive etmektedir. Soruna ideal bir yaklaşım sunan DNA parmak izi tekniği olan ve Vos vd. (1995) tarafından geliştirilmiş AFLP'dir. AFLP tekniği ucuz, kolay, hızlı bir metot olup aynı anda yüzlerce anlamlı genetik belirteç meydana getirmek için kullanışlıdır (Vos vd., 1995; Mueller ve Wolfenbarger, 1999; Başıbüyük vd., 2000). Bu metot için DNA sekansının önceden bilinmesine gerek yoktur. AFLP ile aynı anda birçok farklı DNA bölgesi taranabilir. Farklı bir çok canlı grubunda (bitki, hayvan, bakteri vb.) birbirine çok yakın olan ikiz türlerin ve hibrit türlerin teşhisinde, populasyon yapısı ve farklılaşmalarının incelenmesinde tür ve tür altı seviyelerde, ebeveyn analizleri ve bireysel teşhisler için AFLP belirteçleri kullanışlıdır (Russell vd., 1997; Waugh vd., 1997; İncirli vd., 2001; Innan vd., 1999; Knorr vd., 2001; Li vd., 2002). AFLP ayrıca çok sayıda farklı grupta cinsiyet belirleyici marker olarak kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Griffiths ve Orr, 1999; Felip vd., 2005). AFLP tekniği, restriksiyon enzimlerle kesilen genomik DNA parçalarının bir kısmının PZR ile seçici amplifikasyonuna dayanan bir metottur (Vos vd., 1995; Mueller ve Wolfenbarger, 1999; Başıbüyük vd., 2000). AFLP tekniği güçlü ve güvenilirdir, çünkü RFLP tekniğinin güvenilirliği, PZR tekniğinin gücü ile birleşmiştir (Vos vd., 1995). İdeal olarak bu parmak izi tekniği; sekans analizi, primer sentezi veya DNA problemlerinin karakterizasyonu açısından önceden araştırma yapılmasını gerektirmez (Vos vd., 1995). AFLP metodunun anahtar özelliği, genom üzerinde rasgele dağılım gösteren birçok farklı DNA bölgelerinin eşzamanlı taramasını yapma kapasitesidir (Mueller ve Wolfenbarger, 1999). Hemen hemen sınırsız belirteç AFLP-PZR ile üretildiği için, (bir dizi değişik kombinasyonlarda primer kullanılarak) her organizmanın genomundaki en küçük değişiklikler bile gözlenebilir. Tek nükleotid değişikliği, poliakrilamid jelde veya otomatik genotipleycilerle saptanabilir.

AFLP daha önce herhangi bir gen bölgesi üzerinden tanımlanmamış ve cinsiyet oluşumundan sorumlu olan olası gen bölgelerinin tespitinde güvenilir bir alternatif sunar.

Tüm genom içinde dağılmış farklı bölgeleri eş zamanlı taranmasından dolayı kullanışlı bir yoldur. AFLP ile cinsiyet belirleyici markerların taranması şu şekilde gerçekleştirilir: Erkek ve dişi bireylerden oluşturulmuş iki farklı DNA havuzundan farklı primer kombinasyonları kullanılarak AFLP fragmanları çoğaltılır. Denatüre edici jelde görüntülenen bant profilleri 3 farklı şekilde beklenir; **(1)** Her iki cinsiyette de olan, **(2)** sadece erkeklerde olan ve **(3)** sadece dişilerde olan. Sadece bir cinsiyette amplifiye olan fragmanlar o cinsiyete ait bir belirteç olarak tanımlanır ve DNA dizi verileri oluşturularak cinsiyet belirleyici özellikleri tartışılır.

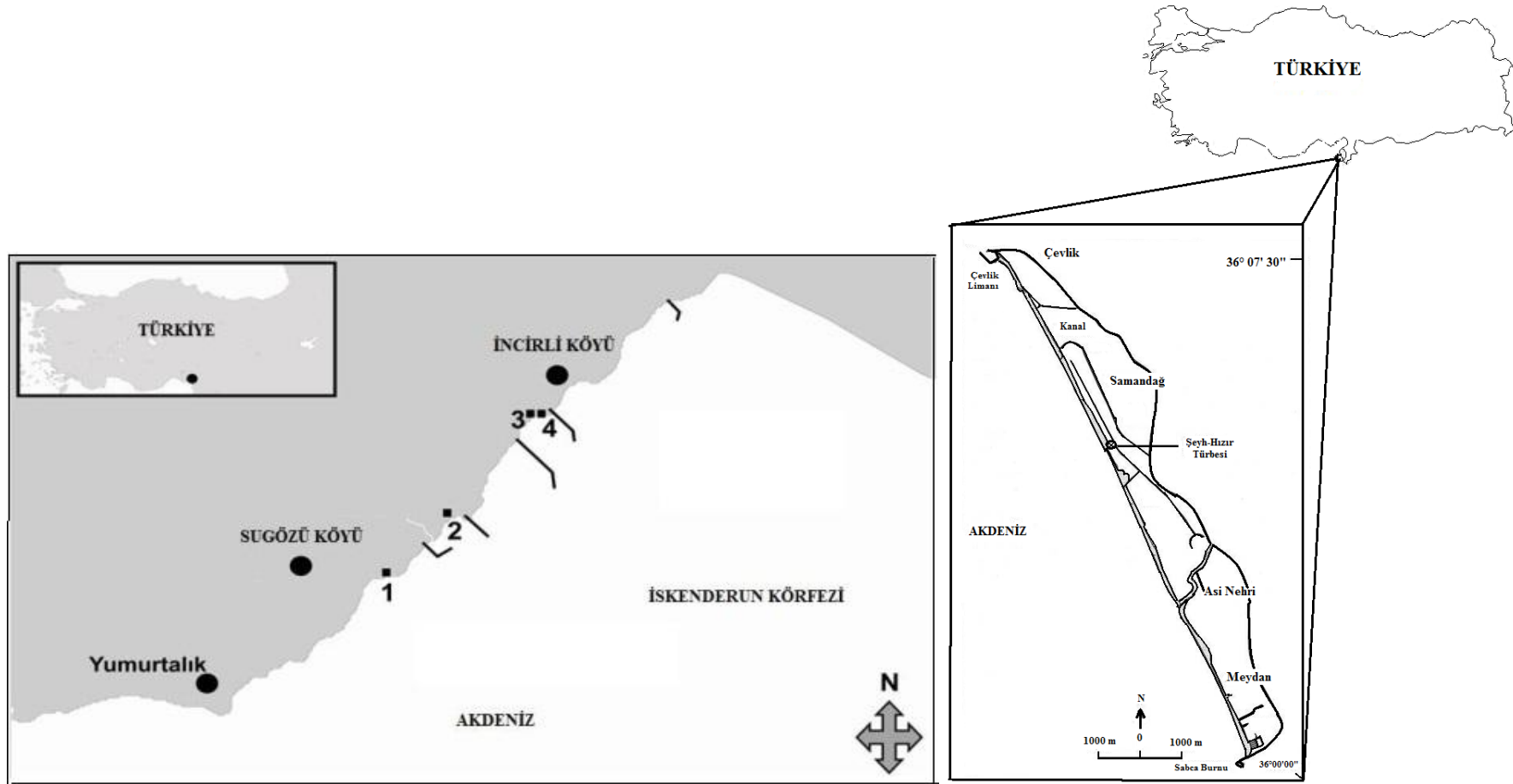
Bu projenin amacı aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

- Gonad histolojisi ile cinsiyeti belirlenmiş ve önceden morfolojik ölçümleri alınmış yeşil deniz kaplumbağası yavrularının, dişi ve erkek bireyleri arasında klasik morfometri istatistiksel analiz ile anlamlı farklılıkların olup olmadığının test edilmesi,
- Gonad histolojisi ile cinsiyeti belirlenmiş ve önceden dijital olarak fotoğrafları çekilmiş yeşil deniz kaplumbağası yavrularının, dişi ve erkek bireyleri arasında geometrik morfometri analizi ile aralarında anlamlı farklılıkların olup olmadığının test edilmesi,
- Gonad histolojisi ile cinsiyeti belirlenmiş ve önceden doku örneği alınmış yeşil deniz kaplumbağası yavrularının, dişi ve erkek bireyleri arasında DNA parmak izi tekniği olan AFLP analizi ile anlamlı farklılıkların olup olmadığının test edilmesi.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Proje Alanı

Projenin araştırma alanı, yeşil deniz kaplumbağalarının önemli yuvalama kumsallarından olan Hatay ili Samandağ kumsalı ile Adana ili Yumurtalık Sugözü kumsalıdır. Samandağ kumsalı toplam 14 km uzunluğunda olup kumsal Kuzey – Güney doğrultusundadır. Kumsal Çevlik, Şeyh-Hızır ve Meydan alt bölgeleri olmak üzere üç alt bölgeye ayrılarak araştırılmaktadır (Şekil 1). Yumurtalık Sugözü kumsalının kumsal uzunluğu toplam 3.4 km olup, batıdan doğuya doğru Akkum (1.4 km), Sugözü (1.0 km), Botaş (0.6 km) ve Hollanda (0.4 km) kumsalları olmak üzere dört alt bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1). Birbirinden bağımsız alt bölgelerde Akkum ile Sugözü kumsalları arasında 2,82 km, Sugözü ile Botaş kumsalları arasında 4,81 km mesafe bulunmaktadır. Botaş ile Hollanda kumsalları arasında ise 0,12 km gibi bir mesafe bulunmaktadır.



Şekil 1. Samandağ ve Sugözü Kumsalları (1: Akkum Kumsalı 2: Sugözü Kumsalı 3: Botaş Kumsalı 4: Hollanda Kumsalı)

2.2. Cinsiyet Tayini ve Gonad Histolojisi

Projenin temel hipotezini oluşturan morfolojiye ve moleküler analize dayalı cinsiyet tayini, önceden arazi çalışmaları sırasında ters yönelim göstermiş ve yuva dışında yeni ölmüş, karapas bozulması oluşmamış, plastron kısmı düzgün, eğilme ve bükülme olmamış yavruların toplanarak cinsiyetlerinin gonad histolojisi ile tespit etme fikrine dayanmaktadır. Kumsalda ölü olarak bulunan ve yukarıda belirtilen özelliklere sahip ve bozulma olmamış yavrular, öncelikle geometrik morfometri analizi için fotoğraflanmıştır. Fotoğrafi çekilen her bireyin klasik morfometri için gerekli ölçümleri alınmıştır. Ölçümleri alınan örneklerin gonad histolojisi için böbrekleri gonadlar ile birlikte çıkarılmış ve formaldehit içerisine fikse edilmiştir. Böbrekleri çıkarılan örneğin sağ ön yüzgeci moleküler analiz için alınmış ve alkol içerisine fikse edilmiştir. Bu şekilde, önceden hem morfolojik hem de moleküler analiz için gerekli olan bilgiler elde edilmiş ve toplanan yavru bireylerin cinsiyeti gonad histolojisi ile tespit edilmiştir. Cinsiyeti tespit edilen dişi ve erkek örnekler ayrılarak karşılaştırmalı inceleme yapılabilmektedir. Gonad histolojisi ile cinsiyet belirleme çalışmasında, fiksasyonu uzaklaştırmak için akan suda bırakılan örnekler bu işlem bittikten sonra yoğunluğu derece derece artan alkol serilerinden geçirilmiş ve daha sonra kesik ucu aşağıya gelecek şekilde mikrotom ile 6 – 8 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Ksilen banyosu ve hidrasyon aşamalarından sonra; çekirdeği 20-30 saniye Harris Hematoksilin ile boyanmış ve muslukta yıkandıktan sonra Eosin ile 20-30 saniye boyanmıştır. Ksilen – Alkol serisinde 5 dakika bekletildikten sonra dehidrasyon basamaklarından geçirilmiştir. Daha sonra kesitler lam üzerine alınmış ve bir damla Entallen damlatılarak ve kesitleri kaplayacak büyüklükte hava kabarcığı kalmayacak şekilde 45° açıyla lamelle kapatılıp kurumaya bırakılmıştır. Histolojik aşamaları tamamlanan örnekler mikroskop altında bağımsız 3 uzman tarafından incelenmiştir.

Cinsiyetlerin birbirinden ayrımı Yntema ve Mrosovsky, (1980); Merchant-Larios vd. (1989); Merchant-Larios, (1999) göre yapılmıştır.

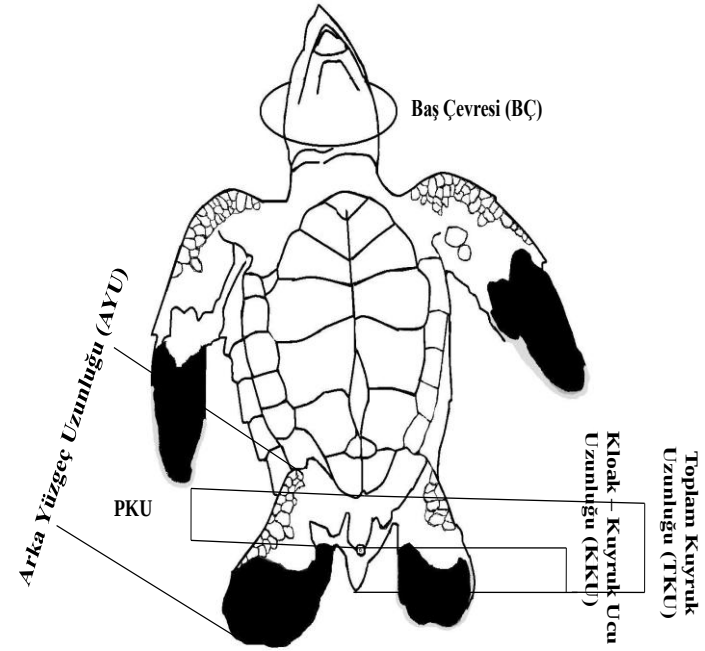
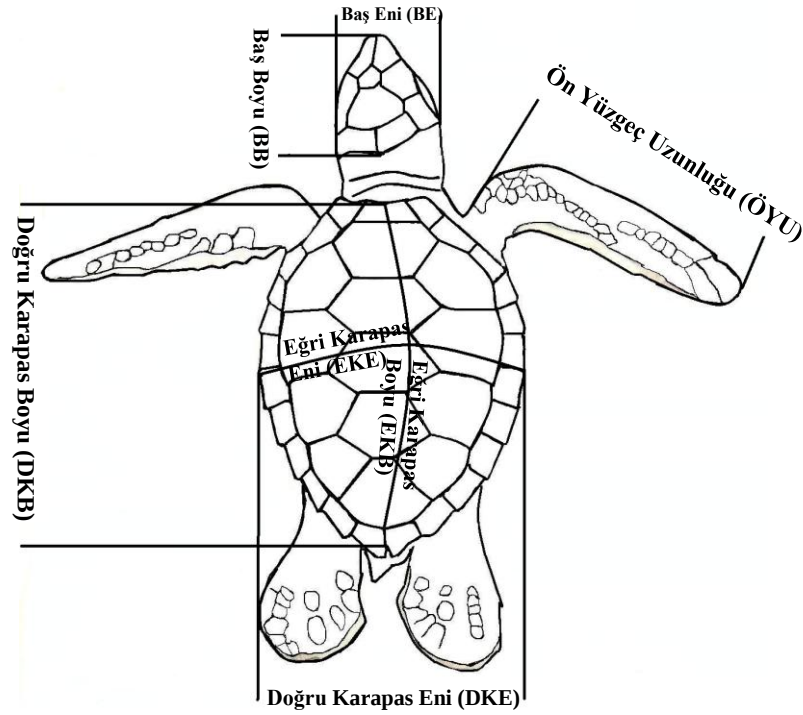
2.3. Klasik Morfometri Çalışması

Her iki üreme kumsalının 2014, 2015 ve 2016 yılı üreme sezonlarında kumsalda demorfe olmamış ölü yavru kaplumbağalar toplanmıştır. Toplam 255 örnek toplanmış ve bu örneklerin 158 tanesinden gonad histolojisi sonucu cinsiyet tayini yapılabilmektedir. Cinsiyet tayini sonucu toplam 12 erkek ve 146 dişi birey tespit edilmiştir. Doğrusal morfometri için her bir yavru kaplumbağadan alınan morfometrik ölçümler aşağıda belirtilmiş ve Şekil 2’de gösterilmiştir. Toplam 16 karakterin ölçümü yapılmış ve bu karakterlerin birbirilerine oranı şeklinde 20 oransal ölçüm yapılmıştır. Bu şekilde toplam 36 karakterin ölçümü yapılmıştır. Doğrusal uzunluk ölçümleri için 0,1 mm hassasiyetinde milimetrik kumpas, eğrisel uzunluk ölçümleri için elastik şerit metre ve ağırlık için ise 0,1 g hassasiyetinde tartı kullanılmıştır. Karakterlerin ölçümünde daha önce uygulanan yöntem kullanılmıştır (Kamazaki ve Matsui, 1997; Özdemir ve Türkozan, 2006).

Ölçümü yapılan karakterler; **Doğru Karapas Boyu (DKB)**: Nukhal plakanın ortasından subrakaudal plakaların çentiğine kadar ki doğrusal uzunluk. **Doğru Karapas Eni (DKE)**: Karapasın en geniş olduğu, sağ ve sol marjinal plakaların dış kenarından geçen doğrusal uzunluk. **Eğri Karapas Boyu (EKB)**: Nukhal plağın ortasından subrakaudal plakaların çentiğine kadar olan eğri hattın uzunluğu. **Eğri Karapas Eni (EKE)**: Karapasın en geniş olduğu, sağ ve sol marjinal plakaların dış kenarından geçen eğri hattın uzunluğu. **Ön Yüzgeç Uzunluğu (ÖYU)**: Ön yüzgeçlerin humerus kemiğinin omuz kemiğine bağlandığı noktadan en uzun parmak kemiği arasında uzanan hattın uzunluğu. Özellikle ölçüm yapılırken esnek olan yüzgecin şeklinin bozulmamasına dikkat edilmiştir. Her iki ön yüzgeç ölçülmüştür. **Arka Yüzgeç Uzunluğu (AYU)**: Arka yüzgeçlerin femur kemiğinin

başnoktasından en uzun parmak kemiği arasında uzanan hattın uzunluğu. Özellikle ölçüm yapılırken esnek olan yüzgecin şeklinin bozulmamasına dikkat edilmiştir. Her iki arka yüzgeç ölçülmüştür. **Toplam Kuyruk Uzunluğu (TKU):** Plastronun bittiği yerin uç kısmından kuyruk ucuna kadar uzanan hattın uzunluğu. **Kloak - Kuyruk Ucu Uzunluğu (KKU):** Kloakın orta kısmından kuyruk ucuna kadar uzanan hattın uzunluğu. **Plastron – Kloak Arası Uzunluk (PKU):** Plastronun bittiği yerin uç kısmından kloakın orta kısmına kadar uzanan hattın uzunluğu. **Vücut Derinliği (VD):** Karapasın en yüksek noktasından plastrona paralel uzanan dikey hattın uzunluğu. **Baş Eni (BE):** Başın en geniş bölgesinde uzanan doğrusal hattın uzunluğu. **Baş Boyu (BB):** Başın burun ucundan kafanın arka kısmında uzanan supraoccipital kemiğin son kısmının çıkıntı yaptığı yer arasında uzanan doğrusal hattın uzunluğu. **Baş Çevresi (BÇ):** Başın en geniş olduğu bölgenin dairesel uzunluğu.

Oransal karakterler; **DKB/BE:** Doğru karapas eninin baş enine oranı. **EKB/BE:** Eğri karapas eninin baş enine oranı. **DKB/BB:** Doğru karapas boyunun baş boyuna oranı. **EKB/BB:** Eğri karapas boyunun baş boyuna oranı. **OYU/AYU:** Her iki ön yüzgecin kendi simetrisinde ki arka yüzgece oranı. **DKB/TKU:** Doğru karapas boyunun toplam kuyruk uzunluğuna oranı. **EKB/TKU:** Eğri karapas boyunun toplam kuyruk uzunluğuna oranı. **DKE/TKU:** Doğru karapas eninin toplam kuyruk uzunluğuna oranı. **EKB/TKU:** Eğri karapas eninin toplam kuyruk uzunluğuna oranı. **AYU/TKU:** Her iki arka yüzgecin toplam kuyruk uzunluğuna oranı. **AYU/KKU:** Her iki arka yüzgecin kloak kuyruk ucu uzunluğuna oranı. **FLL/TTL:** Her iki ön yüzgeç uzunluğunun toplam kuyruk uzunluğuna oranı. **DKB/KKU:** Doğru karapas boyunun kloak kuyruk ucu uzunluğuna oranı. **DKE/KKU:** Doğru karapas eninin kloak kuyruk ucu uzunluğuna oranı. **EKB/KKU:** Eğri karapas boyunun kloak kuyruk ucu uzunluğuna oranı. **EKE/KKU:** Eğri karapas eninin kloak kuyruk ucu uzunluğuna oranı.



Şekil 2. Dişi ve erkek yavru bireylerin ölçümü alınan morfolojik karakterleri (Sönmez, 2010)

2.4. Geometrik Morfometri Çalışması

Toplam 10 dişi ve 10 erkek yavru kaplumbağa kullanılmıştır. Geometrik morfometri için üç vücut bölgesi (plastron, karapas ve kuyruk) kullanılmıştır. Yavru kaplumbağaların belirli bir uzaklıktan (23 cm) resimleri çekilip dijital ortama aktarılmıştır. Her bir vücut bölgesi için 3-4 adet fotoğraf çekilmiştir. Landmarklar için kullanılan resimler fotoğraflanırken, ortamın ışık kalitesine, makinenin örneğe paralel olmasına ve aynı mesafeden fotoğraflanmasına ve örneğin kum vb. maddelerden tam olarak temizlenmesine özen gösterilmiştir. Ayrıca karapas plak sapması gösteren veya herhangi bir üyesi olmayan örneklerin fotoğrafı çekilmemiştir. Toplam 60 landmark tanımlanmış olup, bunların 36 tanesi karapas üzerinde, 17 tanesi plastron üzerinde ve 7 tanesi kuyruk üzerindedir (Şekil 3). Her bir örneğin landmarkları tpsDIG2 programında işaretlenmiştir (Rohlf, 2015). Daha sonra landmarklar Microsoft Office metin belgesine aktarılmış, metin belgelerinde ki sayısal koordinatlar MorphoJ (Klingenberg, 2011) paket programına aktarılarak istatistiksel analize hazır hale getirilmiştir. Paket programa aktarılan her bir veri seti için, süperimpozisyon, translasyon, rotasyon ve skala değişiklikleri, Procrustes ile kaldırılmış (Rohlf ve Slice, 1990) ve bir kovaryans matrisi oluşturulmuştur. Bu işlemlerden sonra data setleri istatistiksel analize hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3. Farklı vücut bölgelerinden alınan landmark noktaları

2.5. Moleküler Analiz Çalışmaları

Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Moleküler çalışmalarda kullanılan *C. mydas* doku örnekleri 2014-2015 üreme sezonunda toplanmıştır (Çizelge 1). Doku örnekleri ölü yavruların ön sağ yüzgeçlerinden steril bir makas yardımı ile alınmış ve dokular, DNA çalışmaları için, %96'lık etanol içinde fiksle edilerek saklanmıştır. Laboratuvar ortamına getirilen örneklerin alkolleri periyodik olarak değiştirilerek oda koşullarında saklanmıştır.

Çizelge 1. Moleküler çalışmada kullanılan *C. mydas* örnek bilgileri

Cinsiyet	Yuva numarası 2014	Yuva numarası 2015
Dişi	S26, S29	S2, S7, S10
Erkek	S5, S23	S1, S34

Total Genomik DNA İzolasyonu

Total genomik DNA izolasyonu, standart fenol-kloroform protein çöktürme protokolünde (Hillis ve Moritz, 1990) bazı iyileştirmeler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

1. Çeker ocak altında, alkolü uzaklaştırılarak kurutulmuş doku örneklerinden steril bir makas yardımı ile 50 mg tartılarak etiketli temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılır.

2. Tüp içerisindeki doku üzerine 500 µL STE (100 mM NaCl, 50 mM Tris ve 10 mM EDTA, pH= 8.0) homojenizasyon tamponu ilave edilir. Doku, ince uçlu, steril bir makas yardımıyla STE tamponu içerisinde parçalanır.

3. Üzerine 25 µL proteinaz K (%10) ve 50 µL SDS (%10) eklenip, ara sıra alt üst edilerek, 2 saat 55 °C’de inkübe edilir.

4. Homojenat üzerine eşit hacimde PCI (Fenol:Kloroform:İzoamil alkol; 25:24:1) eklenerek 10 dk alt üst edilerek inkübe edilir. 12.800 g’de 5 dk santrifüj edilir. Mikropipetle üst faz alınarak yeni bir tüpe aktarılır. Bu basamak tekrar edilir.

5. Örnek üzerine % 99 EtOH eklenerek, -20 °C’de yaklaşık 30 dk bekletilir. Örnekler 12.800 g’de 1 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür.

6. Alkol dökülerek, tüplerde kalan alkolün buharlaşması için tüpler ağzı açık şekilde 37 °C’de kurumaya bırakılır.

7. Pelet 100 µL 1xTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde çözdürülerek, -20 °C’de saklanır.

Genomik DNA’nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen total genomik DNA örneklerinin konsantrasyon, saflık ve kalitelerinin belirlenmesi, agaroz jel elektroforezi ile spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm dalga boyundaki

soğurumları okunarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Okunan optik dansite (O.D.) değerlerinden yararlanılarak aşağıdaki formülle DNA konsantrasyonu hesaplanmıştır:

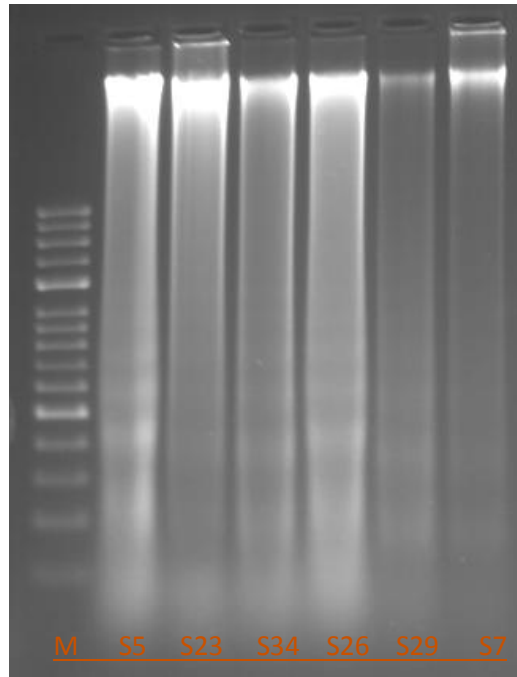
$$C_{DNA} = O.D. \times S.K. \times 50$$

O.D. : Optik Dansite (260 nm’de okunan absorbans değeri)

S.K. : Sulandırma katsayısı

50 : Çift iplikli DNA için her absorbanstaki µg DNA miktarı

DNA’nın kalitesi ise % 0.8’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4). Kantitesi ise bilinen bir DNA belirteci ile kıyaslanarak, tahmini olarak belirlenmiştir. DNA çözeltileri, PZR uygulamaları için 50 ng/µL’ye seyreltilmiştir.



Şekil 4. Total genomik DNA agaroz jel (% 0.8) görüntüsü (Mavi etiketliler erkek bireyleri, pembe etiketliler dişi bireyleri temsil etmektedir. M: 100 bp)

AFLP Reaksiyonu

AFLP fragmanlarının DNA örneklerinden amplifikasyonunda Vos vd. (1995) tarafından geliştirilmiş AFLP reaksiyon protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır.

AFLP reaksiyonu 3 adımda gerçekleştirilmiştir; **(1)** total genomik DNA'nın sindirilmesi ve adaptörlerin ligasyonu, **(2)** oluşan DNA parçalarının seçici amplifikasyonu, **(3)** seçici olarak çoğaltılan DNA parçalarının elektroforetik analizi.

Genomik DNA'nın Sindirilmesi

AFLP reaksiyonlarının tamamında erkek ve dişi bireylere ait total genomik DNA örneklerinden eşit hacimlerde alınarak oluşturulan havuzlar kullanıldı. Genomik DNA (50 ng/μL) sindirim için üzerine 10 U/μL *EcoRI* ve *MseI* (Fermentas, MBI) restriksiyon endonükleaz enzimleri ve 10 x Y⁺/TANGO tamponu (Fermentas, MBI; 33 mM Tris-asetat, 10 mM magnezyum asetat, 66 mM potasyum asetat, 0.1 mg/mL BSA; pH: 7.9) karıştırılarak 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Sindirim sonrası reaksiyon ortamı 70°C'de 15 dk tutularak enzimlerin inaktivasyonu sağlandı.

Sindirimi gerçekleştirilmiş DNA fragmanlarının üzerine, 1 μg/μL *EcoRI* adaptörü, 0.5 μg/μL *MseI* adaptörü, 1 U/μL T4 DNA ligaz (Fermentas, MBI) ve 10x T4 DNA ligaz tamponu (Fermentas, MBI; 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH: 7.8; 25°C'de) eklendi. Karışım vortekslendi ve çok kısa santrifüj edildi. Oda sıcaklığında, her saat başı karıştırılarak 4 saat inkübe edildi ve adaptörlerin ligasyonu gerçekleştirildi.

Adaptörlerin hazırlanması

Çalışmada AFLP analizi için primer ve adaptör olarak kullanılan bütün oligonükleotidler HPLC saf olarak "Alpha DNA'dan" satın alındı.

Adaptörler, ayrı oligonükleotid zincirleri halinde satın alınarak laboratuvar ortamında bir araya getirildi. Adaptör karışımları aşağıda verildiği oranlarda PZR tüpleri içerisinde

hazırlanarak 65°C’de 10 dk, 37°C’de 10 dk ve 25°C’de 10 dk tutuldu ve kullanılmak üzere - 20°C’de saklandı.

***EcoRI* adaptör (120 ligasyon için)**

- ✓ *EcoRI*-i oligonükleotid (1 µg/µL) 3.4 µL
- ✓ *EcoRI*-ii oligonükleotid (1 µg/µL) 3.0 µL
- ✓ 10x tampon Y⁺/TANGO (Fermentas, MBI) 6.0 µL
- ✓ dH₂O 107.6 µL

***MseI* adaptör (120 ligasyon için)**

- ✓ *MseI*-i oligonükleotid (0.5 µg/µL) 64 µL
- ✓ *MseI*-ii oligonükleotid (0.5 µg/µL) 56 µL
- ✓ 10x tampon Y⁺/TANGO (Fermentas, MBI) 7.0 µL
- ✓ dH₂O 3 µL

Ligasyon için kullanılan adaptörlerin DNA dizileri aşağıda verildiği gibidir:

- ✓ *EcoRI*:

5'- CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA -5'

- ✓ *MseI*:

5'- GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT -5'

Sindirilmiş DNA Fragmanlarının Seçici Amplifikasyonu

Kompleks genomların AFLP parmakizi analizi iki basamaklı bir amplifikasyon gerektirir (Vos vd., 1995). İlk basamağı oluşturan preamplifikasyon ürünü ikinci basamağı oluşturan seçici amplifikasyon için kalıp DNA olarak kullanılır.

Preamplifikasyon

Preamplifikasyon tek bir seçici nükleotide sahip oligonükleotid çifti kullanılarak yapılır (Vos vd., 1995). Çalışmada kullanılan her iki preamplifikasyon primerine ait DNA dizileri aşağıda gösterilmiştir:

✓ *EcoRI* + **A** oligonükleotid;

5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAA

✓ *MseI* + **C** oligonükleotid;

5'- GAT GAG TCC TGA GTA AC

Sindirilmiş ve adaptörler bağlanmış DNA çözeltisi, 10x PZR [Fermentas, MBI; 100 mM Tris-HCl (pH: 8.8, 25°C'de) tamponu, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40] tamponu, 5 U/μL *Taq* polimeraz (Fermentas, MBI), 100 μM dNTP mix (Fermentas, MBI), 25 mM MgCl₂ (Fermentas, MBI), 50 ng/μL *EcoRI*+A oligo ve 50 ng/μL *MseI*+C oligo içeren çözelti, son hacmi distile su ile 20 μL'ye tamamlanarak DNA amplifiye edildi. PZR (Stuart, UK) makinesi amplifikasyon için; denatürasyon 94°C'de 1 dk, annealing (primer bağlanması) 56°C'de 1 dk ve extension (primerlerin uzaması) 72°C'de 1 dk. 26 döngü sürecek şekilde ayarlandı. Preamplifikasyon ürünü 5 kat seyreltildi ve seçici amplifikasyona kalıp olarak kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

Seçici Amplifikasyon

AFLP seçici amplifikasyon primerleri 3 kısımdan oluşur: çekirdek sekans, enzim spesifik sekans (ENZ) ve seçici uzatma (extension) (EXT) (Vos vd., 1995).

CORE ENZ EXT

EcoRI 5'- GAC TGC GTA CC A ATT C NNN –3'

MseI 5'- GAT GAG TCC TGA G TAA NNN –3'

Çalışmada *EcoRI* ve *MseI* primerleri rastgele ikili kombinasyonlar şeklinde seçilerek kullanıldı (Çizelge 2).

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ve dizileri

EcoRI*-P1	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA CC-3'
EcoRI*-P2	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA CG-3'
EcoRI*-P3	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA TT-3'
EcoRI-P4	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA AA-3'
EcoRI-P5	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA AT-3'
EcoRI-P6	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA AG-3'
EcoRI-P7	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA CA-3'
EcoRI-P8	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA TC-3'
EcoRI-P9	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA TA-3'
EcoRI-P10	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA GC-3'
EcoRI-P11	5'-GAC TGC CTA CCA ATT CA GT-3'

MseI-P1	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC AC-3'
MseI-P2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC TG-3'
MseI-P3	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC TA-3'
MseI-P4	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC GC-3'
MseI-P5	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC GA-3'

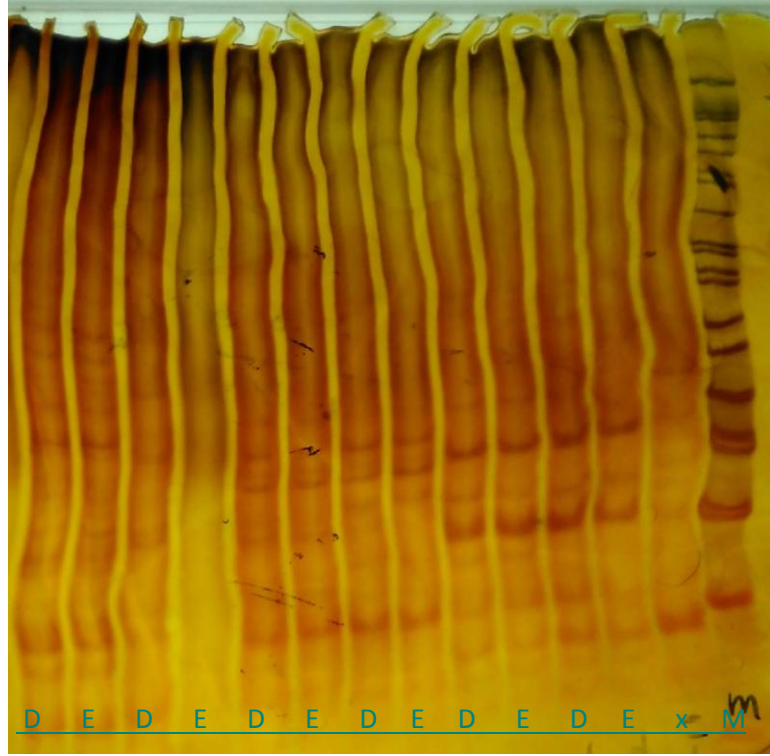
Preamplifikasyon ürünü, 5 kat sulandırılarak seçici amplifikasyon için kalıp DNA olarak kullanıldı. Preamplifiye DNA, 10x PZR (Fermentas, MBI; 100mM Tris-HCl (pH: 8.8, 25°C'de), 500mM KCl, 0.8% Nonidet P40) tamponu, 5 U/μL *Taq* polimeraz (Fermentas, MBI)) tamponu, 100 μM dNTP mix (Fermentas, MBI), 25 mM MgCl₂ (Fermentas, MBI), 50 ng/μL *EcoRI*+ANN oligo ve 50 ng/μL *MseI*+CNN oligo içeren çözelti son hacmi distile su ile 20 μL'ye tamamlanarak amplifiye edildi. Amplifikasyon için; denatürasyon 94 °C'de 30 saniye, primer bağlanması 60°C'de 30 saniye ve primerlerin uzaması 72°C'de 2 dk, primer bağlanma sıcaklığı her bir döngüde 0.7 °C azaltılarak, 12 döngü; denatürasyon 94 °C'de 30 saniye, primer bağlanması 56 °C'de 30 saniye ve primerlerin uzaması 72 °C'de 1 dk 23 döngü boyunca iki aşamada gerçekleştirildi.

AFLP Fragmanlarının Elektroforetik Analizi

AFLP fragmanlarının PAGE analizi, etiketli (15) ve etiketsiz (40) oligonükleotid kombinasyonları kullanılarak iki farklı şekilde gerçekleştirildi.

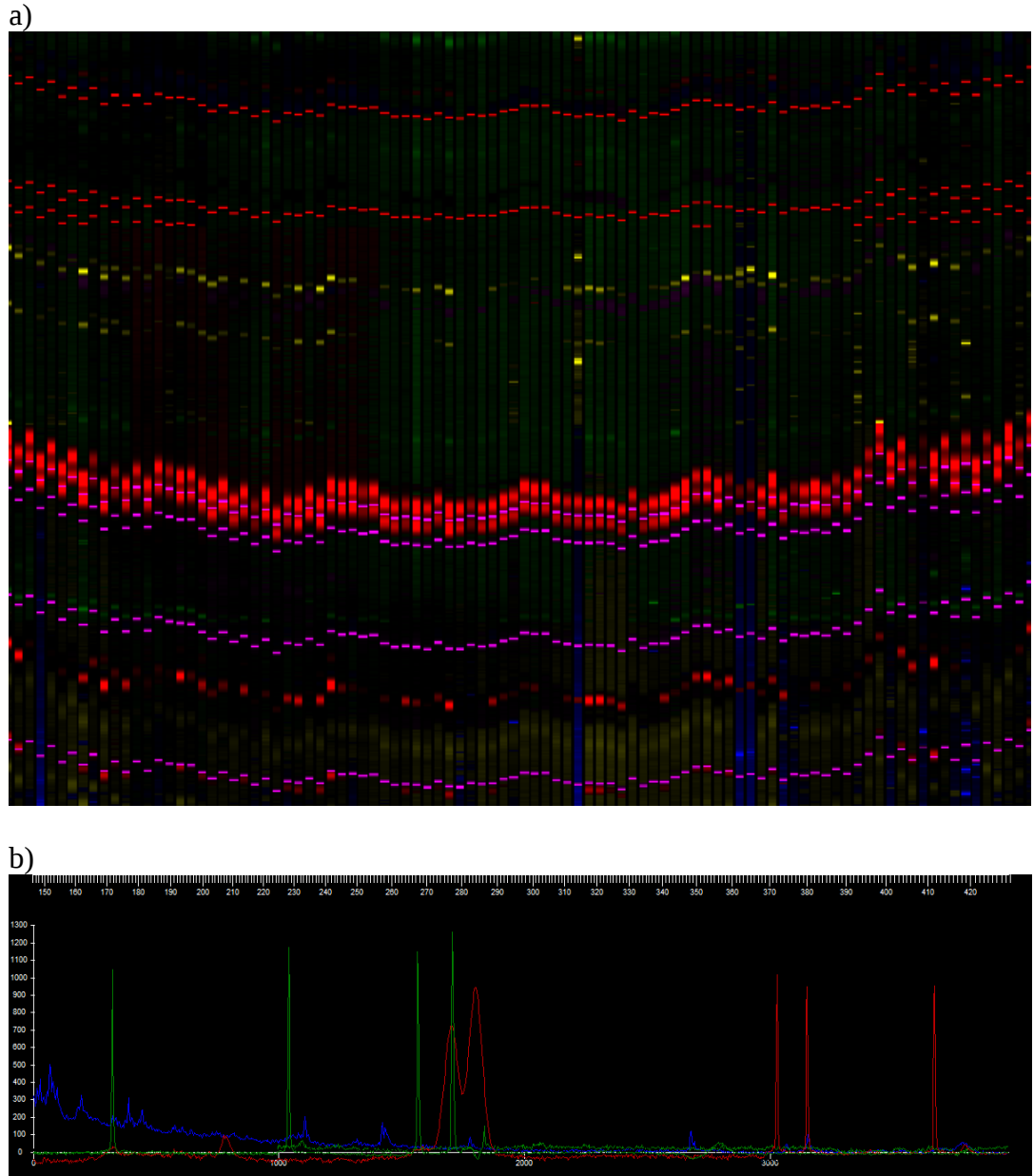
İlkinde, 40 farklı etiketsiz primer kombinasyonu ile elde edilen seçici amplifikasyon ürünleri üzerine 8 µL yükleme tamponu (% 98 deiyonize formamid, ksilen siyanol FF, Bromfenol blue, 0.5 M EDTA, pH: 8.0) eklenerek 90 °C’de 4 dk denatüre edildi ve daha sonra buz üzerinde hızlı bir şekilde soğutuldu. Boya eklenmiş PZR ürünleri, 1xTBE tamponu (10xTBE 0.089 M Tris, 0.089 M Borik asit ve 0.011 M EDTA, pH: 8.3) içinde, %_6’lık denatüre edici poliakrilamid jele yüklendi. Jel matrisi % 40 akrilamid-bisakrilamid (19:1 akrilamid:bisakrilamid), 10xTBE tamponu, 7.5 M üre kullanılarak hazırlandı. Vakum pompası yardımıyla 10 dk çözeltinin gazı uzaklaştırıldı. Jel çözeltisine % 10’luk APS ve TEMED eklenerek jel “ThermoEC160 DNA sequencing system”, 35 x 45 cm jel aparatı kullanılarak döküldü. 4.5 - 6 µL örnek yüklendi. Elektroforez; “ThermoEC4000P (4000 V, 300mA, 300 W)” güç kaynağı kullanılarak 75 W’ta 2 saat 20 dk ila 2 saat 50 dk uygulandı.

Jel, %10’luk glasiyel asetik asit içerisinde, karıştırılarak 30 dk fıkse edildi. Distile su ile 3 kez 3’er dk karıştırılarak yıkandı. Boyama çözeltisi (% 0.1 AgNO₃, % 0.15 formaldehit- % 37) içinde 45 dk karıştırılarak boyandı. Jel distile su içine batırılıp çıkarıldı. Distile sudan geçirilen jel geliştirici çözelti (% 3 Na₂CO₃, % 0.15 formaldehit- % 37, 400 µL sodyumtiyosülfat-10 mg/mL) içerisinde bant gelişimi gözleninceye kadar karıştırıldı. Bant oluşumu tamamlandığı sırada geliştirici çözeltisinin üzerine fiksatif çözeltisi eklendi. Kararmanın durması için 15 dk beklendi. Jel distile su ile yıkandı, kurutuldu ve bantların okunması için streçfilm ile pakتلendi. Dişi ve erkek bant profilleri arasında farklılıkların olup olmadığı gözle kontrol edildi.



Şekil 5. Etiketsiz primerler kullanılan seçici amplifikasyon ürünlerinin native jel görüntüleri (Primer çiftleri soldan sağa doğru MseI-1/EcoRI-6, MseI-2/EcoRI-7, MseI-3/EcoRI-8, MseI-4/EcoRI-5, MseI-5/EcoRI-4, MseI-1/EcoRI-10, Marker: 50 bç).

Diğer bir çalışmada ise seçici amplifikasyon için floresans etiketli primerler içeren 15 farklı oligonükleotid kombinasyonu denendi. İşlemin başarılı olup olmadığı denatüre edici olmayan poliakrilamid jelde (native PAGE) (%40 Akrilamid-Bisakrilamid, 1xTris-Borik Asit-EDTA, %10 Amonyumpersülfat, TEMED) yürütülerek, gümüş boyamayla görüntülendi. Zayıf çalışan primerler optimize edildi. Bu işlemlerin ardından hizmet alımı yoluyla Macrogen Europa firmasında fragment analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar (.fsa dosyaları) Geneious 7.0 programı kullanılarak açıldı. Jel görüntüsü ve pikler (Şekil 6) karşılaştırılarak dişi ve erkek bant profilleri arasında farklılıkların olup olmadığına bakıldı.



Şekil 6. Floresans boya etiketli *EcoRI* seçici primerleri ile çoğaltılmış AFLP fragmanları a) jel görüntüsü, b) pikler.

2.6. Verilerin Analizi

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği “Levene Statistic” ile test edilmiş ve verilerin normal dağılım gösterdiği bulunmuştur ($P > 0,05$). Klasik morfometri analizinde cinsiyetler arası morfometrik karakterlerin çoklu istatistiksel önem düzeylerinin

karşılaştırılmasında çoklu varyans analizi (MANOVA) kullanılmıştır. Morfometrik karakterin cinsiyete göre ayrılıp ayrılmadığı Ayrımcı Fonksiyon Analizi (DFA) ile test edilmiş ve bu test ile kendi orijinal guruplarına göre sınıflandırılma yapılmıştır. Aynı zamanda veriler Temel Bileşenler Analizine (PCA) tabi tutulmuş ve verilerin şekilsel görünümünde birinci ve ikinci temel bileşenler kullanılmıştır. Geometrik morfometri analizinde, Genel Procrustes Analiz (GPA) uygulanmıştır. Cinsiyetlerin şekilsel farklılıkların karşılaştırılmasında Procrustes ANAVO testi yapılmış, bu farklılıkların istatistiksel olarak ayrılıp ayrılmadığı Ayrımcı Fonksiyon Analizi ile test edilmiştir. Ayrıca Temel Bileşenler Analizi ile şekilsel görünüm elde edilmiş ve bunun için ilk iki Temel Bileşen kullanılmıştır. Klasik morfometrik testleri SPSS 17.0 ile analiz edilmiş, geometrik morfometri analizi MorphoJ 1.02d ile analiz edilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak gösterilmiştir. Erkek ve dişi yavru bireylerin karşılatırılması yapılırken doğrusal morfometri için, gonad histolojisi sonucu erkek olarak tespit edilen 12 bireye karşılık dişi bireylerden rastgele 12 birey seçilmiş ve cinsiyetler arası eşit birey sayısı ile çalışılmıştır. Ayrıca geometrik morfometri analizi için cinsiyet tespiti yapılan 12 erkek bireyden 2'sinin fotoğrafı olmadığı için 10 erkek ve rastgele seçilmiş 10 dişi birey ile karşılatırma yapılmıştır. Her iki analiz için rastgele seçilen dişiler aynıdır.

3. BULGULAR

3.1. Klasik Morfometri

Her iki üreme kumsalında gonad histolojisi sonucu cinsiyeti belirlenen 12 erkek ve 12 dişi bireylerden alınan ölçümler ve onların birbirlerine oranlarının tanımlayıcı istatistiği Çizelge 3' te gösterilmiştir.

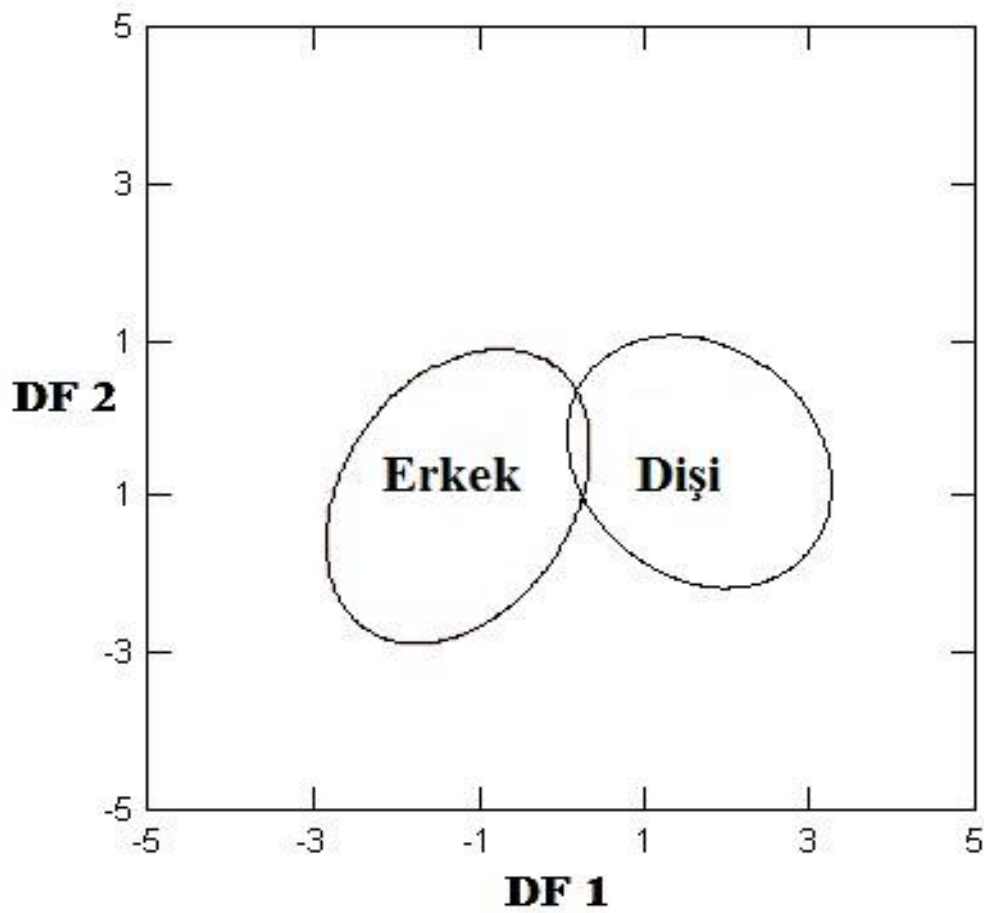
Çizelge 3. Doğrusal morfometri için ölçümü alınan ve birbirlerine oranlanan karakterlerin tanımlayıcı istatistiği

Karakter	Cinsiyet	N	Ortalama	SD	Min	Max
DKB	Erkek	12	4,53	0,21	4,20	4,90
	Dişi	12	4,45	0,29	3,70	4,90
	Toplam	24	4,49	0,25	3,70	4,90
DKE	Erkek	12	3,48	0,25	3,00	3,90
	Dişi	12	3,55	0,36	2,90	4,50
	Toplam	24	3,52	0,30	2,90	4,50
EKB	Erkek	12	4,80	0,28	4,10	5,10
	Dişi	12	4,90	0,35	4,60	5,90
	Toplam	24	4,85	0,32	4,10	5,90
EKE	Erkek	12	4,00	0,14	3,80	4,30
	Dişi	12	4,01	0,09	3,90	4,20
	Toplam	24	4,00	0,12	3,80	4,30
OYU	Erkek	12	4,33	0,83	3,46	6,50
	Dişi	12	4,21	0,33	3,67	4,90
	Toplam	24	4,27	0,62	3,46	6,50
AYU	Erkek	12	2,41	0,30	1,81	2,90
	Dişi	12	2,46	0,21	2,10	2,90
	Toplam	24	2,44	0,25	1,81	2,90
TKU	Erkek	12	1,23	0,22	0,92	1,60
	Dişi	12	1,31	0,25	0,90	1,70
	Toplam	24	1,27	0,23	0,90	1,70
PKU	Erkek	12	0,73	0,22	0,50	1,20
	Dişi	12	0,83	0,19	0,50	1,20
	Toplam	24	0,78	0,20	0,50	1,20
KKU	Erkek	12	0,49	0,12	0,27	0,70
	Dişi	12	0,48	0,12	0,35	0,80
	Toplam	24	0,49	0,12	0,27	0,80
VD	Erkek	12	1,61	0,18	1,30	2,00
	Dişi	12	1,73	0,17	1,40	2,00
	Toplam	24	1,67	0,18	1,30	2,00
BB	Erkek	12	2,03	0,09	1,90	2,20
	Dişi	12	2,14	0,19	2,00	2,70
	Toplam	24	2,09	0,15	1,90	2,70
BE	Erkek	12	1,45	0,08	1,30	1,60
	Dişi	12	1,41	0,08	1,30	1,60
	Toplam	24	1,43	0,08	1,30	1,60
BC	Erkek	12	4,92	0,21	4,50	5,20
	Dişi	12	4,91	0,09	4,70	5,00
	Toplam	24	4,92	0,16	4,50	5,20

AĞIRLIK	Erkek	12	16,94	2,41	15,00	22,40
	Dişi	12	17,80	2,31	13,50	20,60
	Toplam	24	17,37	2,35	13,50	22,40
DKE/BE	Erkek	12	2,40	0,14	2,20	2,60
	Dişi	12	2,52	0,27	2,10	3,20
	Toplam	24	2,46	0,22	2,10	3,20
EKE/BE	Erkek	12	2,76	0,18	2,50	3,10
	Dişi	12	2,86	0,18	2,40	3,20
	Toplam	24	2,81	0,19	2,40	3,20
DKB/BB	Erkek	12	2,21	0,10	2,00	2,40
	Dişi	12	2,10	0,24	1,40	2,30
	Toplam	24	2,15	0,19	1,40	2,40
EKB/BB	Erkek	12	2,35	0,15	2,20	2,70
	Dişi	12	2,30	0,25	1,70	2,80
	Toplam	24	2,32	0,20	1,70	2,80
ÖYU/AYU	Erkek	12	1,80	0,21	1,50	2,40
	Dişi	12	1,72	0,12	1,60	2,00
	Toplam	24	1,76	0,17	1,50	2,40
DKE/TKU	Erkek	12	2,90	0,51	2,20	3,90
	Dişi	12	2,80	0,66	2,10	3,80
	Toplam	24	2,85	0,58	2,10	3,90
DKB/TKU	Erkek	12	3,77	0,61	2,90	5,00
	Dişi	12	3,51	0,80	2,80	5,10
	Toplam	24	3,64	0,71	2,80	5,10
EKE/TKU	Erkek	12	3,32	0,55	2,50	4,30
	Dişi	12	3,17	0,69	2,40	4,60
	Toplam	24	3,25	0,61	2,40	4,60
EKB/TKU	Erkek	12	3,99	0,69	3,00	5,30
	Dişi	12	3,84	0,80	2,90	5,60
	Toplam	24	3,91	0,74	2,90	5,60
AYU/TKU	Erkek	12	2,00	0,25	1,60	2,50
	Dişi	12	1,92	0,35	1,50	2,70
	Toplam	24	1,96	0,30	1,50	2,70
AYU/KKU	Erkek	12	5,08	1,03	3,80	6,70
	Dişi	12	5,31	1,10	3,40	7,30
	Toplam	24	5,20	1,05	3,40	7,30
ÖYU/TKU	Erkek	12	3,55	0,56	2,80	5,00
	Dişi	12	3,27	0,51	2,50	4,30
	Toplam	24	3,41	0,55	2,50	5,00
DKB/KKU	Erkek	12	9,74	2,88	6,60	16,90
	Dişi	12	9,63	2,21	5,90	13,40
	Toplam	24	9,68	2,51	5,90	16,90
DKE/KKU	Erkek	12	7,50	2,30	5,00	13,20
	Dişi	12	7,70	1,92	4,50	11,30

	Toplam	24	7,60	2,08	4,50	13,20
EKB/KKU	Erkek	12	10,29	3,04	7,10	18,10
	Dişi	12	10,64	2,70	6,10	14,80
	Toplam	24	10,46	2,82	6,10	18,10
EKE/KKU	Erkek	12	8,58	2,46	5,70	14,80
	Dişi	12	8,71	2,01	5,00	12,00
	Toplam	24	8,65	2,20	5,00	14,80

Cinsiyetlerin ölçümü yapılan ve oranlanan karakterler bakımından çoklu karşılaştırma (MANOVA) ile önemlilik düzeyi karşılaştırılması yapıldığında cinsiyetler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Wilks' Lambda=0,106, df=21, P=0,215). Ayrıca, cinsiyetler arası karakterlerin istatistiksel olarak önemlilik düzeylerinin tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) karşılaştırılmasında tüm morfolojik karakterler istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P > 0,05$). Dişi ve erkek bireylerin sahip olduğu 36 morfolojik karakter, cinsiyetler arası ayırıcı fonksiyon analizinde (DFA) çapraz doğrulama (Cross-validated Test) ile sınıflandırma istatistiğine tabi tutulmuş ve birbirlerine benzerlik oranları bulunmuştur. Bu test sonucunda, erkek bireyler % 33,3 oranla kendi gurubuna doğru sınıflandırılırken, dişi bireyler % 41,7 ile kendi gurubuna doğru sınıflandırılmıştır. Toplamda tüm guruplar % 37,5 oranında benzerlik göstermiştir. Kanonik ayırıcı fonksiyon analizi sonucu cinsiyetler % 95 güven aralıklı elips grafiğinde ayrılma göstermemiş ve üst üste kümelenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Cinsiyetlerin % 95 güven aralıklı kanonik ayırıcı fonksiyon analizinde şekilsel görünümü

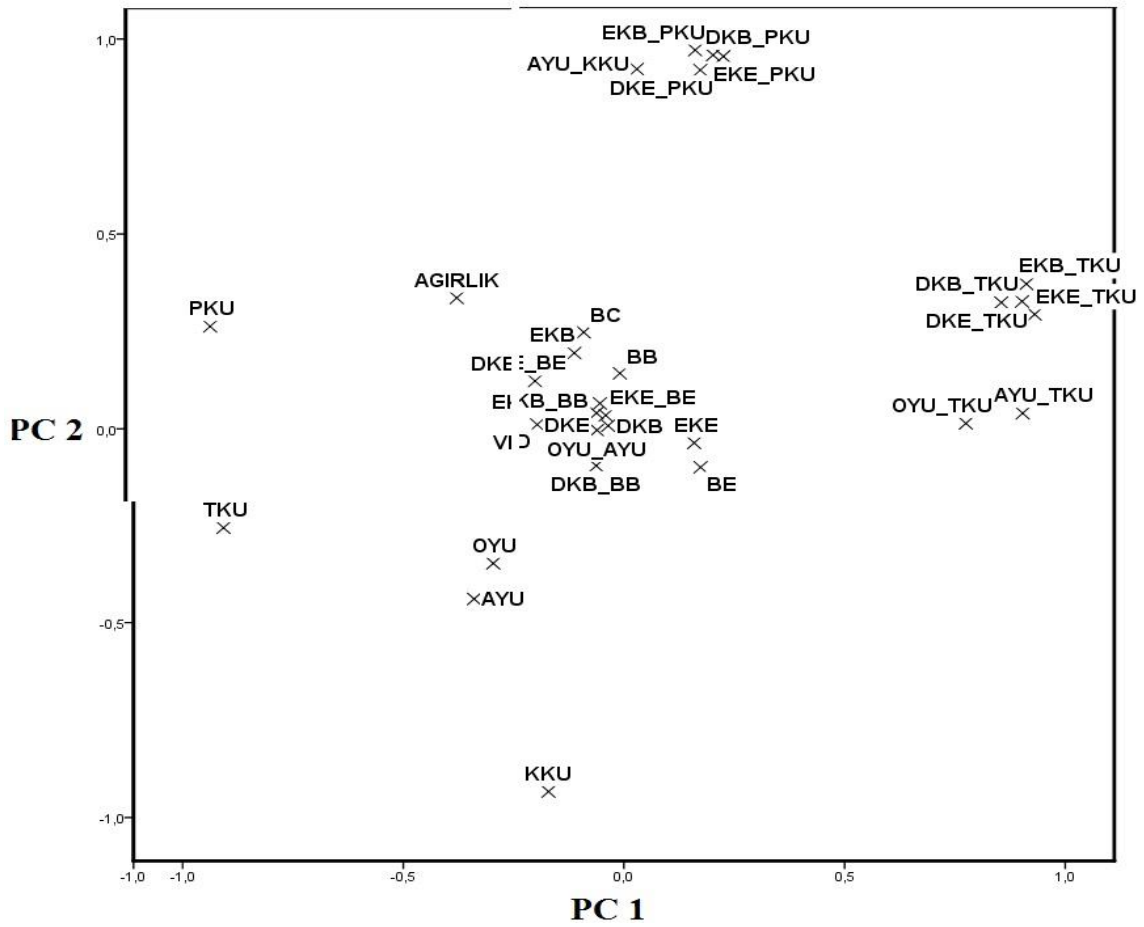
Ölçümü yapılan ve oranlanan karakterler temel bileşenler analizine (PCA) tabi tutulmuş ve değişkenlerin daha az sayıda ve bu değişkenlerin doğrusal bileşeni olan yeni değişkenler ile ifade edilmesi ve görselleşmesi sağlanmıştır. Temel bileşenler analizi sonucu 7 temel bileşen elde edilmiştir. Temel bileşenlerin sahip olduğu varyasyon yüzdelerine bakıldığında, toplam varyansın % 30,7'si birinci temel bileşende (PC1), % 18,1'i ikinci temel bileşende (PC2) toplanmıştır. Böylece ilk iki temel bileşen, toplam varyansı tek başına % 48,8 oranında açıklamıştır. Temel bileşenler analizi altında değişkenler rotasyona tabii tutulduktan sonra değerleri Çizelge 4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. Değişkenlerin rotasyona tabii tutulduktan sonra temel bileşenler altındaki değerleri (Rotasyon=Varimax, Kaiser normalizasyon)

	PC1	PC2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7
EKE/TKU	0,931	0,291	-0,035	-0,182	-0,047	0,014	0,060
PKU	-0,920	0,263	0,091	0,228	-0,042	-0,050	0,074
EKB/TKU	0,912	0,369	-0,070	0,021	0,023	-0,037	0,048
TKU	-0,907	-0,257	0,059	0,294	0,011	-0,010	0,051
AYU/TKU	0,904	0,037	0,068	0,149	0,069	-0,125	-0,234
DKB/TKU	0,902	0,324	-0,178	-0,056	0,096	-0,125	0,044
DKE/TKU	0,855	0,321	0,326	-0,136	0,104	-0,056	-0,089
OYU/TKU	0,775	0,011	-0,034	0,170	0,118	0,527	-0,141
EKB/PKU	0,161	0,969	0,019	0,080	-0,027	-0,019	0,087
DKB/PKU	0,202	0,956	-0,085	0,001	0,032	-0,076	0,098
EKE/PKU	0,225	0,953	0,052	-0,108	-0,059	0,011	0,111
KKU	-0,171	-0,933	-0,042	0,173	0,093	0,066	-0,028
AYU/KKU	0,029	0,920	0,153	0,203	-0,030	-0,112	-0,087
DKE/PKU	0,173	0,918	0,329	-0,038	0,025	-0,026	-0,023
BB	-0,009	0,140	0,902	-0,151	0,082	-0,087	0,213
DKE	-0,054	0,062	0,870	0,296	0,212	-0,044	-0,099
DKB/BB	-0,063	-0,097	-0,800	0,461	0,090	-0,010	-0,033
DKE/BE	-0,202	0,120	0,800	0,138	-0,374	-0,092	-0,134
EKB	-0,112	0,192	0,025	0,831	0,031	0,065	0,219
EKB/BB	-0,062	0,038	-0,611	0,707	-0,128	0,160	-0,053
AYU	-0,340	-0,439	0,215	0,699	0,080	-0,085	-0,180
DKB	-0,036	0,005	-0,380	0,639	0,310	-0,208	0,312
EKE/BE	-0,041	0,032	0,037	0,068	-0,952	0,022	0,254
BE	0,174	-0,102	0,045	0,203	0,914	0,119	0,052
OYU/AYU	-0,061	-0,006	-0,128	0,003	0,102	0,924	0,113
OYU	-0,296	-0,348	0,044	0,549	0,132	0,631	-0,090
BC	-0,091	0,245	0,237	0,243	0,322	-0,554	0,320
VD	-0,197	0,008	-0,257	-0,055	-0,123	-0,332	0,701
EKE	0,159	-0,039	0,251	0,418	-0,214	0,308	0,668
AGIRLIK	-0,361	0,336	0,200	0,143	-0,004	0,140	0,602

Özellikle hem doğru hem de eğri karaps boyu ve eninin ve her iki yüzgecinde toplam kuyruk uzunluğuna oranı birinci temel bileşen altında ağırlık göstermiştir. Bununla birlikte,

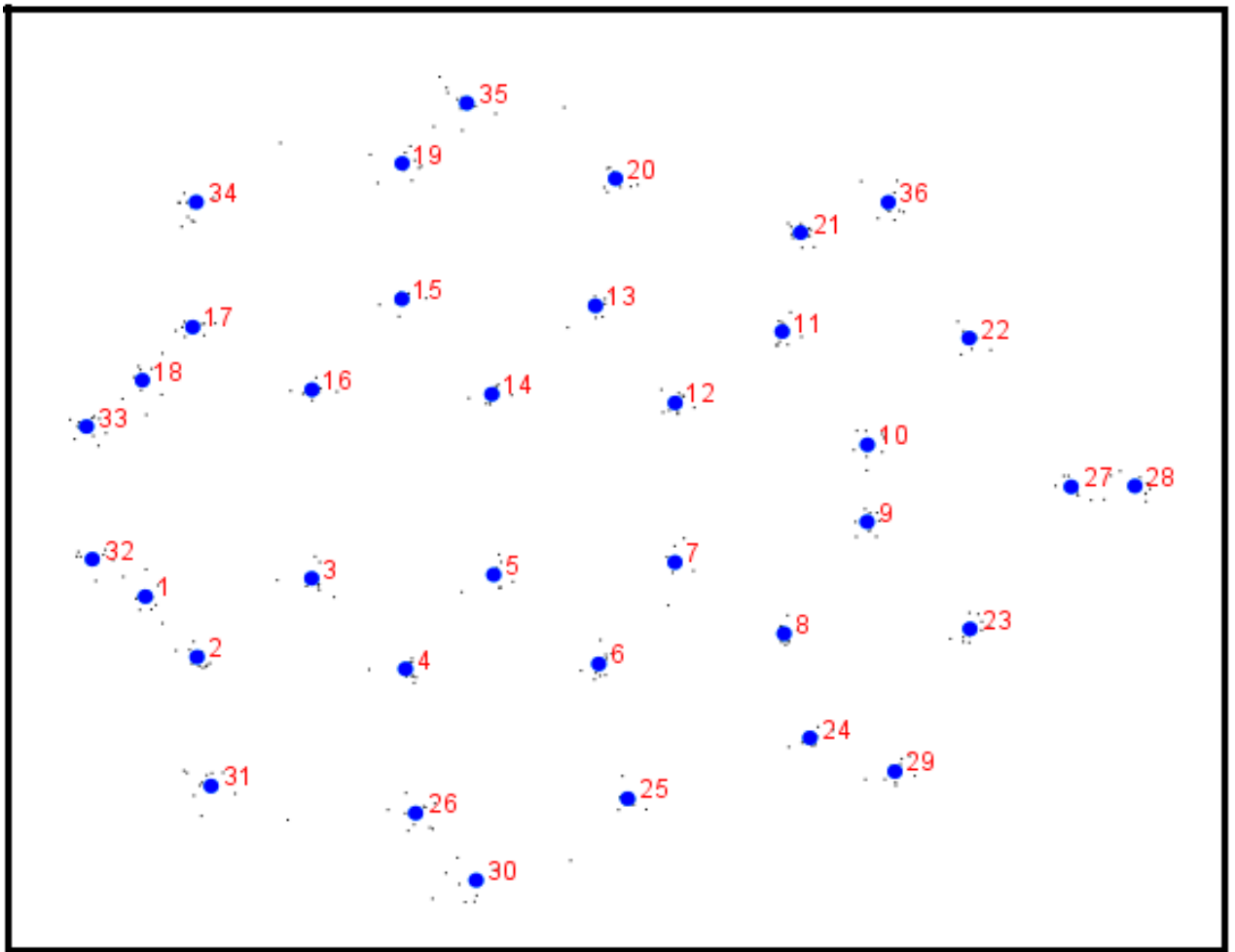
hem doğru hem de eğri karapas boyu ve eninin plastron-kloak arası uzunluğa (PKU) oranları ikinci temel bileşende altında toplanmıştır. Morfolojik karakterlerin birbirleri ile korelasyonları sonucu değişkenlerin azaltılarak temel bileşenler altında toplanması sonucu, kuyruk uzunlukları ve bunların karapas ve yüzgeçe oranlarının diğer morfolojik karakterlere göre daha önemli olduğu görülmüştür. Bu korelasyonlar morfolojik karakterlerin temel bileşenler analizi sonucu vektörel görünümünde açıkça görülmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Morfolojik karakterlerin temel bileşenler analizi sonucu vektörel dağılımı

3.2. Geometrik morfometri

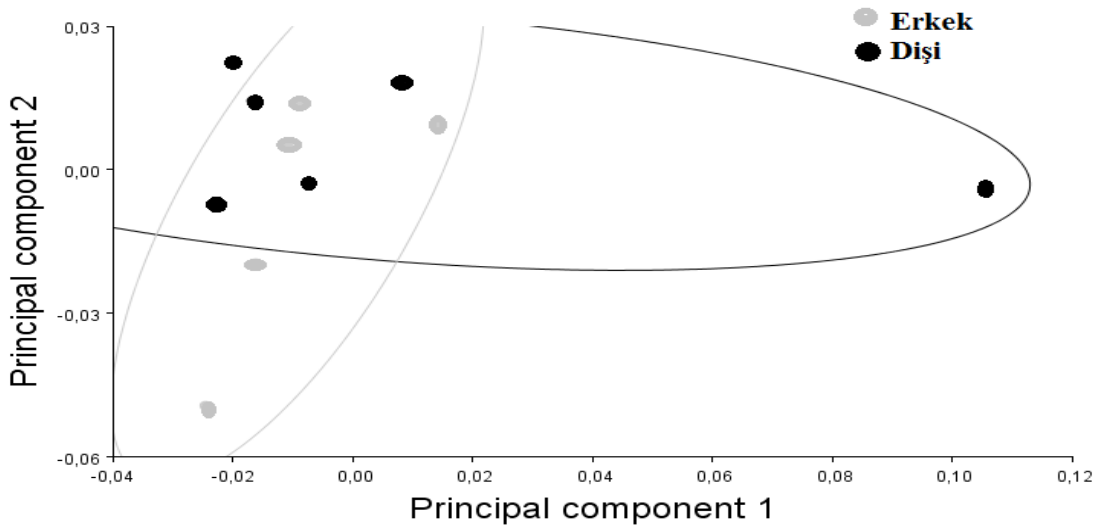
Her iki üreme kumsalından 10 erkek ve rastgele seçilmiş 10 dişi örnek üç farklı vücut bölgesinden geometrik morfometri analizine tabi tutulmuştur. Her üç vücut bölgesinden toplam 60 landmark belirlenerek cinsiyetler arası geometrik morfometri bakımından anlamlı farklılıkların olup olmadığı test edilmiştir. Karapas için sadece 5 erkek ve 6 dişinin karapas fotoğrafı çekildiğinden 11 birey karşılaştırılmıştır. Karapastan alınan toplam 36 landmarkın dağılımı Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9. Dişi ve erkek bireylerde karapasta seçilen landmarkların dağılımı

Her iki cinsiyetteki landmark noktaları Procrustes Shape ANOVA analizinde anlamlı farklılık göstermemiştir ($F=0,89$, $df=68$, $P=0,7204$). Ayrımcı fonksiyon analizi sonucu

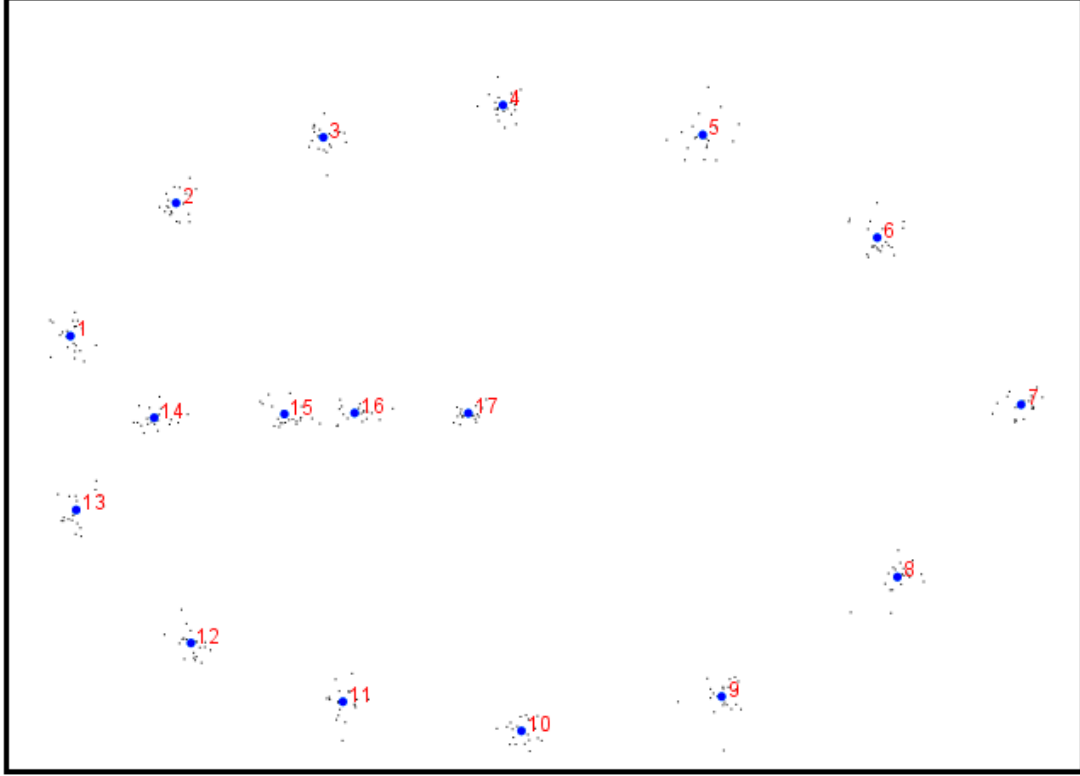
cinsiyetler ayrılma göstermemiş ($P = 0,99$) ve çapraz doğrulama (Cross-validated Test) ile sınıflandırma testinde her cinsiyet ortalama % 40,3 oranında kendi gurubuna benzerlik göstermiştir. Erkek bireyler kendi gurubuna % 20 oranında benzerlik gösterirken, dişi bireyler kendi gurubuna % 66,6 oranında benzerlik göstermektedirler. Karapas üzerinden landmark seçme yöntemiyle yapılmış olan temel bileşenler analizinde, toplam 9 temel bileşen üretilmiştir. İlk temel bileşen toplam varyansın % 50'sini açıklarken ikinci temel bileşen toplam varyansın % 14'ünü açıklamaktadır. Bu şekilde ilk iki temel bileşen toplam varyansın % 64'ünü açıklamaktadır. Ancak, toplam varyan yüksek oranda olmasına rağmen, % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiğinde cinsiyetler ayrılmamış ve üst üste kümelenmiştir (Şekil 10). Aynı sonuç kanonik varyasyon analizinde de (CVA) ortaya çıkmış ve cinsiyetler karapas landmark noktaları bakımından ayırım göstermemiştir.



Şekil 10. Temel bileşenler analizi sonucu erkek ve dişi bireylerin karapas landmarklarının % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiği

Geometrik morfometri analizi için plastrondan fotoğraflanan ve cinsiyeti belirlenen 10 dişi ve 10 erkek bireyin landmark dağılımı Şekil 11'de gösterilmiştir. Cinsiyetler,

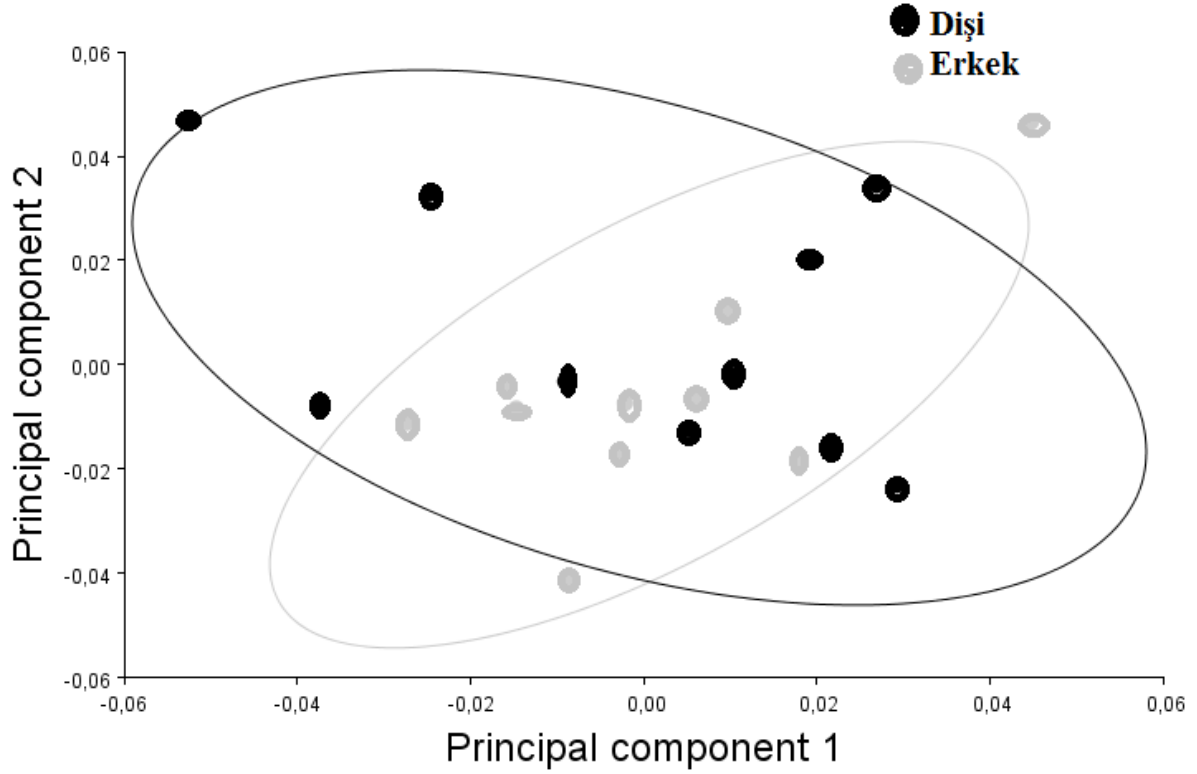
plastrondaki landmark dağılıma göre Procrustes Shape ANOVA analizinde anlamlı farklılık göstermemiştir ($F=0,29$, $df=30$, $P=0,5956$).



Şekil 11. Dişi ve erkek bireylerde plastronda seçilen landmarkların dağılımı

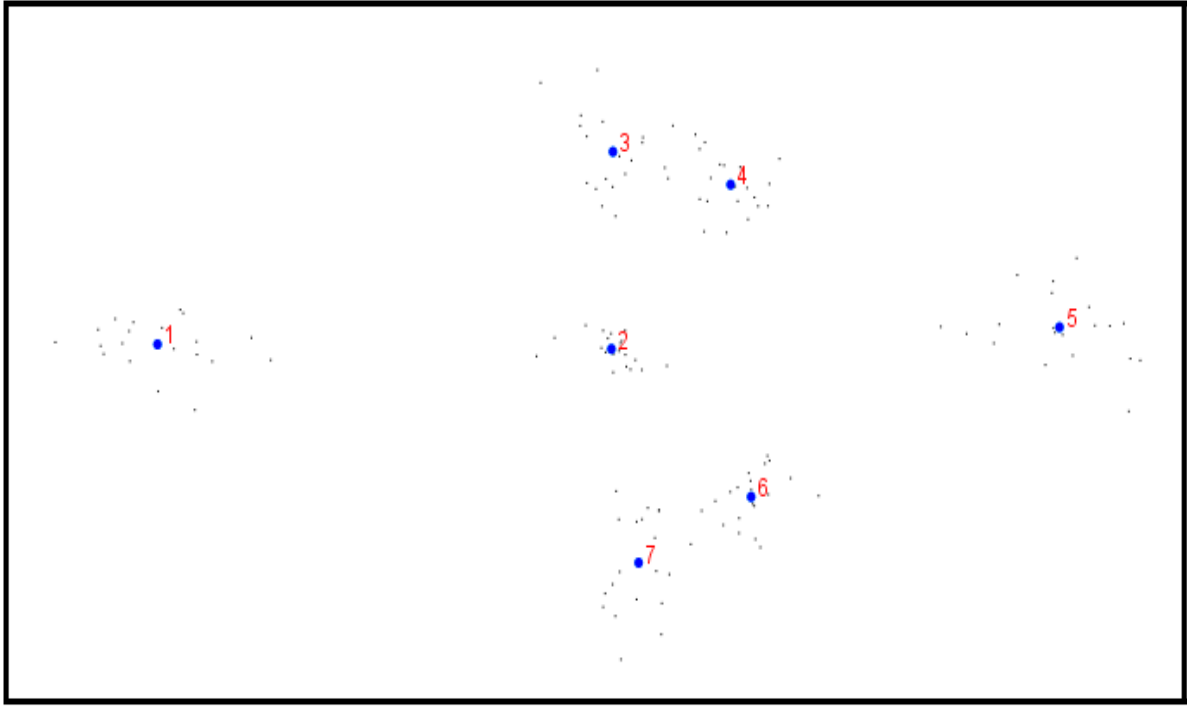
Ayrımcı fonksiyon analizi sonucu cinsiyetler ayrılma göstermemiş ($P = 0,95$) ve çapraz doğrulama (Cross-validated Test) ile sınıflandırma testinde her cinsiyet ortalama % 45 oranında kendi gurubuna benzerlik göstermiştir. Erkek bireyler kendi gurubuna % 20 oranında benzerlik gösterirken, dişi bireyler % 70 oranında benzerlik göstermektedirler. Plastron üzerinden landmark seçme yöntemiyle yapılmış olan temel bileşenler analizinde, toplam 19 temel bileşen üretilmiştir. İlk temel bileşen toplam varyansın % 22,5'ini açıklarken ikinci temel bileşen toplam varyansın % 21,7'sini açıklamaktadır. Bu şekilde ilk iki temel bileşen toplam varyansın % 43,2'sini açıklamaktadır. Ancak, ilk iki temel bileşen altında % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiğinde cinsiyetler ayrılmamış ve üst üste kümelenmiştir

(Şekil 12). Aynı sonuç kanonik varyasyon analizinde de (CVA) ortaya çıkmış ve cinsiyetler plastron landmark noktaları bakımından ayrım göstermemiştir.



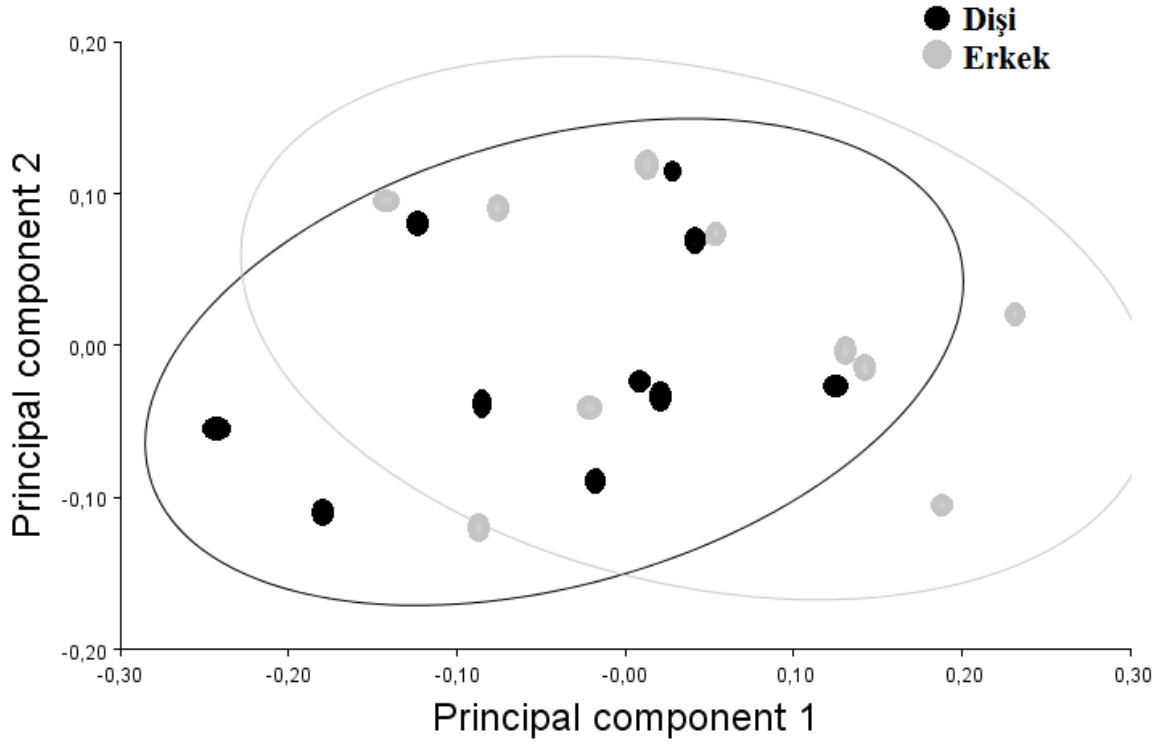
Şekil 12. Temel bileşenler analizi sonucu erkek ve dişi bireylerin plastron landmarklarının % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiği

Dişi ve erkek bireylerin kuyruklarından alınan toplam 7 landmarkın dağılımı şekil 13'te gösterilmiştir. Cinsiyetler, kuyruktaki landmark dağılıma göre Procrustes Shape ANOVA analizinde anlamlı farklılık göstermemiştir ($F=1,72$, $df=10$, $P=0,08$).



Şekil 13. Dişi ve erkek bireylerde kuyrukta seçilen landmarkların dağılımı

Ayrımcı fonksiyon analizi sonucu cinsiyetler ayrılma göstermemiş ($P = 0,58$) ve çapraz doğrulama (Cross-validated Test) ile sınıflandırma testinde her cinsiyet ortalama % 55 oranında kendi gurubuna benzerlik göstermiştir. Erkek bireyler kendi gurubuna % 60 oranında benzerlik gösterirken, dişi bireyler % 50 oranında benzerlik göstermektedirler. Kuyruk üzerinden landmark seçme yöntemiyle yapılmış olan temel bileşenler analizinde, toplam 10 temel bileşen üretilmiştir. İlk temel bileşen toplam varyansın % 51,7'sini açıklarken ikinci temel bileşen toplam varyansın % 22,5'ini açıklamaktadır. Bu şekilde ilk iki temel bileşen toplam varyansın % 74,3'ünü açıklamaktadır. Ancak, ilk iki temel bileşen altında % 95 güven aralıklı elipstik şekil grafiğinde cinsiyetler ayrılmamış ve üst üste kümelenmiştir (Şekil 14). Aynı sonuç kanonik varyasyon analizinde de (CVA) ortaya çıkmış ve cinsiyetler plastron landmark noktaları bakımından ayrım göstermemiştir.



Şekil 14. Temel bileşenler analizi sonucu erkek ve dişi bireylerin kuyruk landmarklarının % 95 güven aralıklı eliptik şekil grafiği

3.3. Moleküler Analiz

Çalışma kapsamında toplamda 55 farklı primer çifti kullanılarak yapılan AFLP analizi sonucunda dişi ve erkek *C. mydas* örnekleri arasında herhangi bir bant (fragman) farklılığına rastlanmadı. Dişi ve erkek cinsiyetlerine ait AFLP bant profilleri arasında farklılık görülmemesi çalışılan primer çiftlerine ait bir cinsiyet belirteci olmadığı anlamına gelmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hem klasik hem de geometrik morfometri analiz sonucunda cinsiyetler morfolojik olarak farklılık göstermemiştir. Ancak klasik morfometri sonuçlarında, kuyruk uzunlukları ve kuyruk uzunluklarının vücut bölgelerine oranı (karapas, yüzgeç ve baş) temel bileşenler

analizinde önemli farklılıklar ortaya koymasına rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemiştir. Aynı zamanda geometrik morfometri sonuçları da gösterdiği kuyruk üzerinden alınan landmarkların analizi, plastron ve karapasa göre hem ayrımcı fonksiyon analizinde hem de temel bileşenler analizinde daha yüksek yüzde değer göstermiştir.

Deniz kaplumbağa yavrularında cinsiyetler arası morfolojik farklılığın ve bu ayırım için kullanılan bir tekniğin olmaması, cinsiyet ayırımının yapılamamasının en büyük nedenini olarak gösterilmektedir (Lubiana ve Ferreira Junior, 2009). Ancak geçmiş yıllarda deniz kaplumbağa türlerinden *L. olivacea* türünde; karapas, plastron, ön yüzgeç uzunluğu ve baş eninin de içinde bulunduğu 9 morfolojik karakter bakımından ayrımcı fonksiyon analizi sonucu (DFA) dişi ve erkek yavru bireyler arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Michel-Morfin vd., 2001). Benzer şekilde, Sönmez vd. (2016) yeşil deniz kaplumbağası yavrularında 21 karakter bakımından 3 karakterin, cinsiyetler arasında anlamlı farklılıklar gösterdiğini ve özellikle plastron kloak arası mesafenin dişi ve erkek ayırımında önemli olacağını belirtmişlerdir. Önceki çalışmalarda deniz kaplumbağalarının yetişkin erkeklerinin dişilerine göre daha uzun kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir (Hendrickson, 1958; Wibbels vd., 1991). Bu projede, klasik morfometri analizinde, temel bileşenler analizi (PCA) sonucu 3 farklı kuyruk uzunluğunun karapas, yüzgeç ve başa oranları, anlamlı olmasa da ayırım göstermiştir. Casele vd. (2005) *C. caretta* türü yetişkin deniz kaplumbağalarında, dişi ve erkek bireylerin kuyrukları üzerinde 6 farklı ölçümü karşılaştırmışlardır. Plastron kuyruk arası mesafenin yetişkin dişi ve erkek bireyleri ayırmada daha etkin olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda, genç dişi ve erkek *C. caretta* bireylerinin kuyruk uzunluğu karşılaştırılmasında, genç erkek bireylerin daha uzun kuyruğa sahip olduğu belirtilmiştir (Wibbles vd., 1987). Bununla birlikte, genç dişi ve erkek *C. caretta* bireyleri arasında kuyruk uzunluğunun doğru karapas

uzunluğuna oranı bakımından anlamlı farklılıklar olabileceği belirtilmiştir (Wibbles vd., 1987). Erkek bireylerin kuyruk uzunluklarının ve vücutun farklı bölümlerine oranlarının farklılığı, yaşamlarının ilk yıllarında farklılık göstermeye başlamış olabilir. Ancak Wibbles vd. (1987), genç *C. caretta* bireylerinde, kuyruk uzunluğu ve doğru karapas genişliğinin boyuna oranının (DKE/DKB), cinsiyet ayrımı için iyi bir indikatör olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, Delgado vd. (2010) genç *C. caretta* bireyleri üzerinde yaptıkları klasik morfometri karşılaştırmasında, toplam kuyruk uzunluğu, plastron-kloak arası uzunluk, kloak-kuyruk ucu uzunluğu, ön yüzgeç uzunluğu ve eni, baş eni ve doğru karapas boyunun cinsiyetler arasında anlamlı farklılıklar oluşturmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde deniz kaplumbağası olmayan türlerde de klasik morfometri karşılaştırmasında cinsiyetler arası anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Hildebrand vd. (1997), *Podocnemis expansa* tatlısu kaplumbağası yavrularında, karapas boyu ve eni, plastron uzunluğu, plastron kuyruk uzunluğu, yüzgeç ve baş uzunlukları gibi 25 morfolojik karakteri dişi ve erkek yavrular arasında karşılaştırmışlar ve her iki cinsiyetin farklılık göstermediğini bulmuşlardır. Benzer sonuç *Gopherus agassizii* türü kara kaplumbağaları içinde tespit edilmiştir (Burke vd., 1994; Boone ve Holt, 2001). Buna karşın, Bonnet vd. (2010), yetişkin *Chelodina colliei* ve *Mauremys leprosa* türü tatlısu kaplumbağalarında dişilerin erkeklere göre daha büyük ve ağır olduğunu, aynı zamanda da erkeklerin daha kısa plastrona sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ancak cinsiyetler arasındaki bu farklılık, deniz kaplumbağalarında olduğu gibi yetişkinler arasında görölmektedir. Ancak, *Chelydra serpentina* türü kara kaplumbağası yavrularında cinsiyetler arası morfolojik farklılıklar tespit edilmiştir. Erkek yavrular daha uzun plastrona ve daha geniş karapasa sahiptirler (Ceballos ve Valenzuela, 2011).

Doğrusal ölçümler ölçölerek yapılan ve geleneksel klasik morfolojiye göre daha doğru sonuçlar veren geometrik morfoloji üzerine olan çalışmalar, genelde iki boyutlu kanat

yapısının görüntülenebildiği insecta sınıfı üzerinde yoğunlaşmasına rağmen (Aytekin vd., 2007), balıklar (Telli, 2008), kertenkeleler (Bruner vd., 2005; Kaliontzoupoulou vd., 2007) tatlısu ve kara kaplumbağaları (Valenzuela vd. 2004; Depecker vd., 2006; Rivera ve Claude, 2008) ile ilgili çalışmalara da rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda, organizmaların filogeni, dişi-erkek farklılığı, farklı coğrafi bölgeler arası değişimler gibi konular incelenmiştir. Deniz kaplumbağaları ile ilgili geometrik morfometri çalışmaları sınırlıdır (Türkecan 2010; Ferreira Junior vd., 2011; Casele vd., 2017). Bu çalışmalar ise daha çok *C. caretta* türü deniz kaplumbağası üzerine gerçekleşmiştir. Ferreira Junior vd. (2011) kuluçku süreleri üzerinden yola çıkarak tahmin ettikleri dişi ve erkek yavru bireyleri, karapas ve plastron şekil farklılığı yönünden geometrik morfometri analizi ile karşılaştırmışlardır. Karapas ve plastron üzerinden belirledikleri landmark noktalarını temel bileşenler analizi (PCA) ve ayrımcı fonksiyon analizi (DFA) ile karşılaştırdıklarında, karapas için gurupların % 84,7 ve plastron için % 77,8 oranında kendi gurubuna doğru sınıflandığını ve MANOVA ile her iki gurubun anlamlı bir şekilde birbirinden ayrıldığını belirtmişlerdir. Ancak, cinsiyet tahmini için kullandıkları pivotal kuluçka süresi, metodolojik problemleride beraberinde getirmiştir. Çünkü pivotal kuluçka süresi cinsiyet tayininden çok tahmini bir değer sunmakta ve ayrıca kuluçka süresi çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Benzer bir şekilde, Türkecan (2010), Akyatan kumsalında denize uzaklıkları farklı olan 5 yuvadan (40 metre ve 20 metre) çıkış yapan 48 yavrunun kuyruk üzerinden belirlediği 5 landmark noktasının şekilsel farklılığını incelemiştir. Çoklu karşılaştırma (MANOVA) ile önemlilik düzey karşılaştırmasında denize uzaklıkları farklı olan yuvaların anlamlı farklılıklar gösterdiği yazar tarafından belirtilmiştir. Ancak kanonik varyasyon analizinde (CVA) yuvalar ayırım göstermemiştir. Türkecan (2010) tarafından, denize uzaklıkları farklı ve dolayısıyla sıcaklıkları farklı olabilecek yuvalardan çıkan yavruların, kuyruk şekilleri bakımından farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Deniz

kaplumbağası dışındaki kaplumbağa türleri içinde geometrik morfometri karşılaştırılması yapılmış ve cinsiyetler arası karapas şekil farklılığının olduğu belirtilmiştir. Valenzuela vd. (2004) tarafından, Kolombiya’da *P. expansa* ve *Chrysemys picta* türü tatlısu kaplumbağa yavrularında karapas üzerinden belirledikleri 30 landmark noktasını farklı istatistiksel yöntemler ile cinsiyetler arasında karşılaştırmışlardır. Çoklu karşılaştırma (MANOVA) ile önemlilik düzey karşılaştırmasında her iki tür için cinsiyetler arasında karapas şekil farklılığının istatistiksel olarak önemli farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca her tür için cinsiyetlerin ayırımında üç farklı istatistiksel yöntem kullanmışlar (K-ortalamlar yöntemi, çoklu lojistik regresyon ve ayırmacı fonksiyon analizi) ve her üç yöntemde de cinsiyetler, karapas şekil benzerliği yönünden anlamlı olarak ayrılmıştır. Ayrıca üç yöntemin etkinliğini değerlendirilmiş ve ayırmacı fonksiyon analizinin, cinsiyetleri ayırmada en etkin olduğu belirtilmiştir (Valenzuela vd., 2004). Bu projede de cinsiyetlerin ayırımında, ayırmacı fonksiyon analizi kullanılmıştır. Ancak, Valenzuela vd. (2004), erkek ve dişi karapasları arasında en çok değişen varyasyonu elde eden tanısal doğrusal ölçümlerin bir alt kümesini bulamadıklarını belirtmişlerdir. Buna karşın cinsiyetler arasında karapasın anal bölgesinin daha anlamlı farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Brezilya’da, *P. expansa* türü için benzer bulgular, Lubiana ve Ferreira Junior (2009) tarafından da bulunmuştur. Karapas şekil benzerliği yönünden dişi ve erkek bireyler birbirlerinden anlamlı bir şekilde ayrılmışlardır. Benzer bir şekilde, Ceballos ve Valenzuela (2011) tarafından, *C. serpentina* türü kara kaplumbağası yavruları karapas ve plastron şekil farklılığı yönünden incelenmiş ve cinsiyetlerin plastron şekil farklılığı yönünden anlamlı bir şekilde ayrıldığını belirtmişlerdir.

AFLP parmakizi tekniği kullanılarak *C. mydas* örneklerine ait cinsiyet belirteçlerinin belirlenmesine yönelik bu çalışmada kullanılan primer kombinasyonlarının nispeten az (n = 55) sayısı bir dezavantaj gibi görünmektedir. Ancak daha küçük sayıda primer

kombinasyonlarının uygulandığı- bazı çalışmalarda cinsiyete özgü belirteçler geliştirilmişken [(Agarwall vd., 2011; n = 16) (Ma vd., 2010; n = 64), (Koshimizu vd., 2010; n = 64)], daha yüksek primer kombinasyonları kullanıldığı diğer bir çok çalışmada cinsiyete özgü belirteçleri tanımlamakta başarısız olunmuştur [Sriphairoj vd. 2007; n = 570), (Wuertz vd., 2006; n = 128-396), (Felip vd, 2005; n = 486)].

Bazı araştırmacılara (Kovács vd, 2001; Brunelli ve Thorgaard, 2004; Felip vd., 2005) göre, cinsiyete özgü belirteçlerin tanımlanmasının başarısı, büyük oranda bir cinsiyet kromozomunun varlığına bağlıdır. Ancak hedef türlerde bazen kromozomal olmayan genetik cinsiyet belirleme mekanizmalarınada (Griffiths vd., 2000) rastlanır. Bu nedenle çalışma kapsamında cinsiyete bağlı belirteçlerin belirlenememesi, *C. mydas* için cinsiyet kromozomlarının bulunmaması kaynaklı olabilir. Wuertz vd.'ne (2006) göre, cinsiyet belirteçlerinin tanımlanamamasının diğer nedeni de, araştırılan organizmada cinsiyet belirleme sisteminin bir gen dozaj etkisi temelinde işlemesindendir.

Elde edilen sonuçlara ve literatürde yer alan yukarıdaki gerekçelere dayanarak, *C. mydas* örneklerinde cinsiyet belirteçlerinin durumuna ilişkin tam bir yargıya varmak için çoklu AFLP primer kombinasyonlarının araştırılmasını öneriyoruz. Ayrıca diğer gen ekspresyonu ve gen dozaj çalışmalarında paralel çalışmalar olarak yürütülmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bazı tatlısu, kara ve deniz kaplumbağası yavrularında tespit edilen hem klasik hem de geometrik morfometri ayrımı, yeşil deniz kaplumbağası yavrularında tespit edilememiştir. Bunun nedenleri arasında düşük örnek sayısının olması olabileceği gibi, belkide dişi ve erkek yeşil deniz kaplumbağası yavruları morfolojik olarak farklılık göstermemektedirler. İlerki çalışmalarda, benzer çalışmaların, sabit sıcaklık değerleri altında

elde edilen cinsiyetler ile daha yüksek sayıda örnek ve daha farklı karakterlerin ve landmark noktalarının belirlenerek yapılması, diğer kaplumbağa türlerinde ortaya çıkan morfolojik farklılığın deniz kaplumbağaları içinde ortaya çıkmasını sağlayabilir. Ayrıca, moleküler analiz sonucunda, bu çalışma primer kombinasyonlarının seçimi için ileriki araştırmalara rehberlik edecektir.

TEŞEKKÜR

Projenin, Samandağ ve Yumurtalık arazi çalışmalarında gönüllü olarak katılan öğrencilere, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar VII. Bölge Müdürlüğüne, Samandağ Kaymakamlığına, Samandağ Çevre Koruma ve Turizm Derneği yönetici ve üyelerine, projenin moleküler çalışmalar kısmına altyapı olanakları sağlayan CÜTAM'a (Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Merkezi) sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H., 2011. Development of sex-linked AFLP markers in *Simmondsia chinensis*. *Plant Breeding* 130, 114-116.

Aytekin, A., M., Terzo, M., Rasmont, P., Çağatay, N., 2007. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *sibiricobombus vogt* (Hymenoptera:Apidae: *Bombus Latreille*). *Annales de la Société Entomologique de France*. 43 (1): 95-102.

Başıbüyük, H. H.,Bardakcı, F., Belshaw, R., Quicke, D. L. J., 2000. *Phylogenetic Systematics*, “A practical guide to theory and practice”. Önder Matbaa, Sivas, Turkey. ISBN 975-93823-0-X.

Bonnet, X., Delmas, V., El-Mouden, H., Slimani, T., Sterijovski, B., Kuchling, G. 2010. Is sexual body shape dimorphism consistent in aquatic and terrestrial chelonians? *Zoology*, 113: 213-220.

Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Camb. Uni. Press, 452s

Boone, J. L., ve Holt, E.A. 2001. Sexing young free-ranging desert tortoises (*Gopherus agassizii*) using external morphology. Chel. Conserv. Biol. 4:28–33

Brunelli, J. and Thorgaard, G.H., 2004. A new Ychromosome-specific marker for Pacific salmon Trans. Am. Fish. Soc., 33, 1247–1253.

Bruner, E., Costantini, D., Fanfani, A., Dell'Omo, G. 2005. Morphological variation and sexual dimorphism of the cephalic scales in *Lacerta bilineata*. Acta Zoologica (Stockholm) 86: 245–254

Burke, R. L., Jacobson, E. R., Griffith, J. M., Guillette, I. J. 1994. Non-invasive sex identification of juvenile gopher and desert tortoises (genus *Gopherus*). Amphib.-Reptilia, 15: 183–189.

Casale, P. Freggi, D., Rigoli, A., Ciccocioppo, A., Luschi, P. 2017. Geometric morphometrics, scute patterns and biometrics of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean. Amphibia-Reptilia, 38(2): 145 – 156.

Casale, P., Freggi, D., Basso, R., Argano, R. (2005) Size at male maturity, sexing methods and adult sex ratio in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Italian waters investigated through tail measurements. Herpetological Journal 15:145 - 148.

Ceballos, C.P. ve Valenzuela, N. 2011. The Role of sex-specific plasticity in shaping sexual dimorphism in a long-lived vertebrate, the snapping turtle *Chelydra serpentina*. Evol. Biol. 38:163–181

Ceriani, S. A. ve Wyneken, J. 2008. Comparative morphology and sex identification of the reproductive system in formalin-preserved sea turtle specimens. Zool., 111:179–187.

Charnov, E. L. ve Bull, J. J. 1977. When is sex environmentally determined? Nature, 266: 828–830.

Delgado, C., Canario, A.V.M., Dellinger, T. 2010. Sex ratios of loggerhead sea turtles *Caretta caretta* during the juvenile pelagic stage. Mar. Biol. 157:979–990.

Depecker, M., Berge, C., Penin, X., Renous, S. 2006. Geometric morphometrics of the shoulder girdle in extant turtles (Chelonii). J. Anat. 208, pp35–45.

Elewa, Ashraf M. T. 2004. Morphometrics–Applications in Biology and Paleontology. Springer-Verlag Publishers, Heidelberg, Germany. 263 pp.

Felip, A., Young, W. P., Wheeler, P. A. and Thorgaard, G. H., 2005. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247, 35– 43.

Felip, A., Young, W. P., Wheeler, P.A. and Thorgaard, G.H. 2005. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247, 35– 43.

Ferreira Junior, P.D., Treichei, R.L., Scaramussa, T.L., Scalfoni, J.T. 2011. Morphometric pattern in *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Cheloniidae) hatchlings from nests with different embryo development rates. *Braz. J. Biol.* 71(1):151-156.

Glen, F., Broderick, A. C., Godley, B. J., Hays, G.C. 2003. Incubation environment affects phenotype of naturally incubated green turtle hatchlings. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 83: 1183-1186.

Godfrey, M.H. ve rosovsky, N. 2006 Pivotal temperature for green sea turtles, *Chelonia mydas*, nesting in Suriname. *Herpetological Journal* 16: 55-61.

Godley, B.J., Broderick, A.C., Frauenstein, R., Glen, F., and Hays, G.C. 2002 Reproductive seasonality and sexual dimorphism in green turtles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 226: 125-133.

Griffiths, R. ve Orr, K., 1999. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology*, 8, 671-674.

Griffiths, R., Orr, K.J., Adam, A. and Barber, I., 2000. DNA sex identification in the three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology* 57, 1331–1334

Groombridge, B., 1990. Marine Turtles in the Mediterranean; Distribution, Population Status, Conservation. A Report to the Council of Europe, World Conservation Monitoring Centre, Cambridge, UK.

Gross, T.S., Crain, D.A., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., and Carthy, R.R. 1995. Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/amniotic fluid. Gen. Comp. Endocrin. 99: 204-210.

Grossman, A.,Mendonça, P., Rodrigues da Costa, M., Bellini, C. 2007. Morphometrics of the green turtle at the Atol das Rocas Marine Biological Reserve, Brazil. Marine Turtle Newsletter, 118: 12-13.

Gutzke, W. H. N. ve Paukstis, G. L. 1984. A low temperature threshold for temperature differentiation in the painted turtle *Chrysemy picta*. Copeia, 1984: 546–547.

Hamann, M., Godfrey, M. H., Seminoff, J. A., Arthur, K., Barata, P. C. R., Bjorndal, K. A., Godley, B. J. 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. Endangered Species Research, 11, 245-269.

Hendrickson, J.R. (1958) The green turtle *Chelonia mydas* in Malaya and Sarawak. Proc. Zool. Soc. Lond. 130: 455-535.

Hildebrand, V.P., Bermudez, N., and Penuela, M.C. 1997. La tortuga charapa (*Podocnemis expansa*) en el río Caqueta, Amazonas, Colombia. Aspectos de su biología reproductiva y técnicas para su manejo. Santafé de Bogotá, Colombia, Disloque Editores.

Innan, H., Terauchi, R., Kahl, G., Tajima, F., 1999. A Method for Estimating Nucleotide Diversity From AFLP Data. Genetics. 151: 1157-1164.

İncirli, A., Bilgiç, H., Akaya, M. S. 2001. Assessment of Polymorphic AFLP Markers in *Triticum durum* and *A. egilops* sp. Turkish Journal of Biology, 25, 291-299.

Janzen, F. J. ve Krenz, J. G. 2004. Phylogenetics: which was first, TSD or GSD? In N. Valenzuela & V. A. Lance (Eds.), “Temperature- Dependent Sex Determination in Vertebrates” (pp. 212–130) Washington DC: Smithsonian Institution Press.

Janzen, F.J. 1994. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 7487-7490.

Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Llorente G.A. 2007. Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in podarcis lizards. *Journal of Morphology*, 268:152–165

Kamazaki, N ve Matsui, M. 1997. Allometry in the loggerhead turtle, *Caretta caretta*. *Chelonian Conservation and Biology*, 2 (3): 421-425.

Kaska, Y. Downie, R., Tippet, R. Furness, R. W. 1998. Natural temperature regimes for loggerhead and green turtle nests in the Eastern Mediterranean. *Can. J. Zool.*, 76: 723-729.

Kaska, Y., Ilgaz, Ç., Özdemir, A., Başkale, E., Türkozan, O., Baran, İ., Stachowitsch, M. 2006. Sex ratio estimations of loggerhead sea turtle hatchlings by histological examination and nest temperatures at Fethiye beach, Turkey. *Naturwissenschaften*, 93(7), 338-343.

Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 353-357.

Knorr, C., Cheng, H. H., Dodgson, J. B. 2001. DNA cloning and sequence analysis of chicken AFLP. *Animal Genetics*. 32, 156-159.

Koshimizu, E., Strüssmann, C. A., Okamoto, N., Fukuda, H. and Sakamoto, T., 2010. Construction of a Genetic Map and Development of DNA Markers Linked to the Sex Determining Locus in the Patagonian Pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Marine Biotechnology*, 12:8–13.

Kovács, B., Egedi, S., Bártfai, R. and Orbán, L., 2001. Malespecific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* 110, 267–276.

Lele, S. ve Richtsmeier, J.T. 2001. An invariant approach to statistical analysis of shapes, *Interdisciplinary Studies in Statistics series*, Chapman and Hall-CRC Press

Li, Y., Byrne, K., Miggiano, E., Whan, V., Moore, S., Keys, S., Crocos, P., Preston, N., Lehnert, S., 2002. Genetic Mapping of the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* using AFLP Markers. *Aquaculture*, 62091, 1-14.

Lubiana, A., ve Ferreira-Junior, P.D. 2009. Pivotal temperature and sexual dimorphism of *Podocnemis expansa* hatchlings (Testudines: Podocnemididae) from Banana Island, Brazil. *Zoologia* 26: 527-533.

Ma, H., Chen, S., Chen, Yang, J., Ji, X., Chen, S., Tian, Y. Bi, J. 2010. Isolation of sex-specific AFLP markers in Spotted Halibut (*Verasper variegatus*). *Env Biol Fish* 88, 9– 14.

McCoy, C.J., Vogt, R.C., and Censky, E.J. 1983. Temperature-controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Journal of Herpetology* 17: 404-406.

Merchant-Larios, H. 1999. Determining hatchling sex. (Eds: K. L. Eckert, K. A. Bjorndal, F. A Abreu-Grobois, M. Donnelly). *Research and Management Techniques for the Conservation of SeaTurtles* IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4.

Merchant-Larios, H., Villalpando-Fierro, I., and Centeno-Urruiza, B. 1989. Gonadal morpho-genesis under controlled temperature in the sea turtle. *Herpeto. Monographs* 3: 43-61.

Michel-Morfin, J.E., Gomez Munoz, V., and Navarro Rodriguez, C. 2001. Morphometric model for sex assessment in hatchling olive ridley sea turtles. *Chel. Conserv. Biol.* 4: 53-58.

Mittwoch, U. 2000. Three thousand years of questioning sex determination. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 91, 186–191.

Mrosovsky, N. 1994. Sex ratios of sea turtles. *J Exp Zool.*, 270: 16–27

Mrosovsky, N. ve Provancha, J. 1992. Sex ratio of hatchling loggerhead sea turtles: data and estimates from a 5-year study. *Canadian Journal of Zoology*, 70 (3), 530-538.

Mueller, U. G. ve Wolfenbarger, L. L., 1999. AFLP genotyping and finger printing. *Tree*. Vol. 14, no. 10 October 1999. 389-394.

Organ, C. L. Janes, D. E. 2008. Evolution of sex chromosomes in Sauropsida. *Integrative and Comparative Biology*, 48, 512–519.

Owens, D.W., Hendrickson, J.R., Lance, V.A., and Callard, I.P. 1978. A technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using radioimmunoassay. *Herpetologica* 34: 270-273.

Özdemir, B. ve Türkozan, O. 2006. Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in Northern Cyprus. Turk J. Zool., 30: 141 – 146.

Reece, S.E., Broderick, A.C., Godley, B.J., and West, S.A. 2002. The effects of incubation environment, sex and pedigree on the hatchling phenotype in a natural population of loggerhead turtles. Evolutionary Ecology Research 4: 737-748.

Rivera, G., Claude, J. 2008. Environmental media and shape asymmetry: a case study on turtle shells. Biological Journal of the Linnean Society, 94: 483– 489.

Rohlf, F.J. 2015. The tps series of software. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy 26: 9-12.

Rohlf, F.J. ve Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Syst. Biol. 39: 40-59.

Russell, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W., Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among *Barley accessions* detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor. Appl. Genet. 95, 714-722.

Sönmez, B., Turan, C., Yalçın Özdilek, Ş., Turan, F. 2016. Sex determination of green sea turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings on the bases of morphological characters. J. Black Sea/Mediterranean Environment, Vol. 22,(1): 93-102.

Sriphairoj, K., Na-Nakorn, U., Brunelli, J. P. and Thorgaard, G. H., 2007. No AFLP sex-specific markers detected in *Pangasianodon gigas* and *P. hypophthalmus*. Aquaculture, 273, 4, 739–743

Telli, M. 2008. The relationship between genetic and shape variation in endemic and endangered freshwater fish species *Pseudophoxinus*. PhD thesis submitted to the graduate school of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, 120 s.

Türkecan, O. 2010. Yeşil deniz kaplumbağalarının (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758) biyo-ekolojik özellikleri üzerine incelemeler. Hacettepe Üniversitesi, Doktora Tezi, 177 s.

Valenzuela, N., Adams, D.C., Bowden, R.M., and Gauger, A.C. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia* 4: 735-742.

van der Heiden, A. M., Briseno, R., and Rios-Olmeda, D. 1985. A simplified method for determining sex in hatchling sea turtles. *Copeia* 1985: 779-782.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA finger printing. *NucleicAcidsResearch*. 23: 4407-4414.

Wagner, E. 1980. Temperature-dependent sex determination in a gekko lizard. *Quart. Rev. Biol.*, 55: 21.

Warner, D.A., 2011. Sex Determination in Reptiles. *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 3-Reptiles*.

Waugh, R., Bonar, N., Baird, E., Thomas, B., Graner, A., Hayes, P., Powell, W., 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* 255: 311-321.

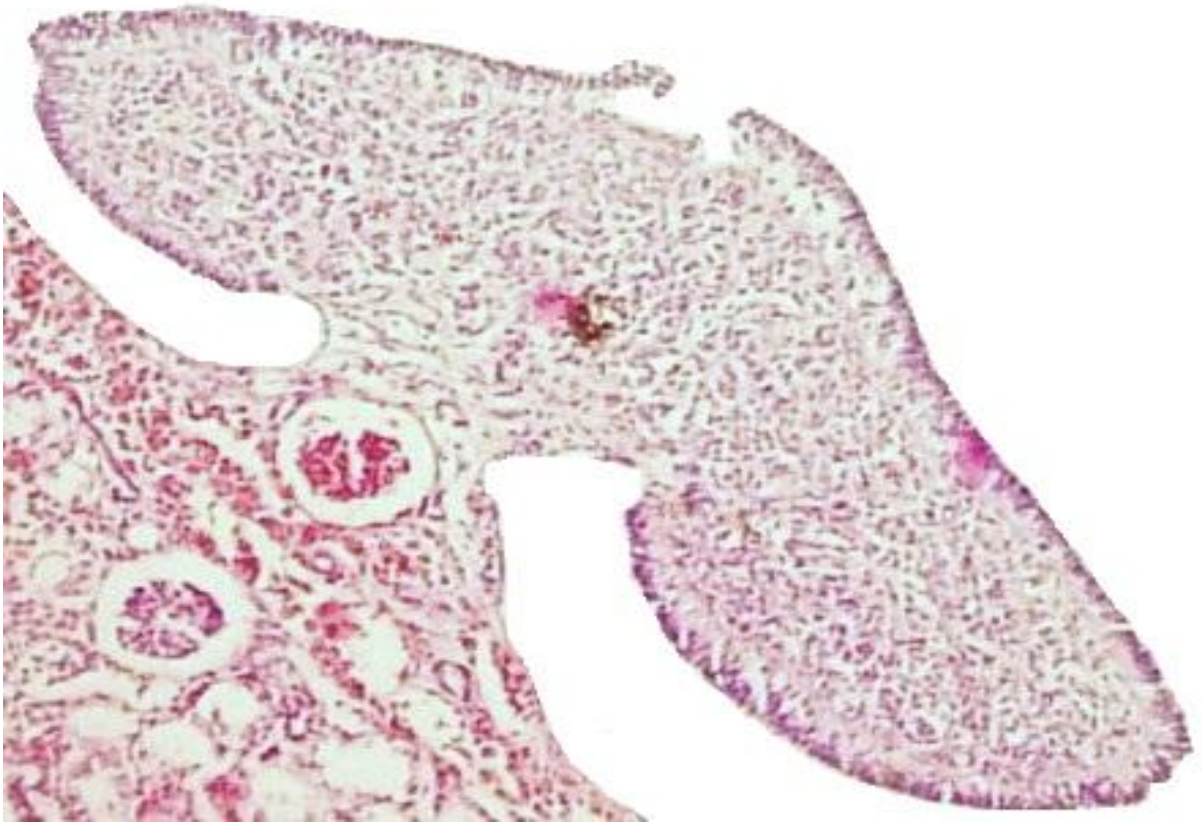
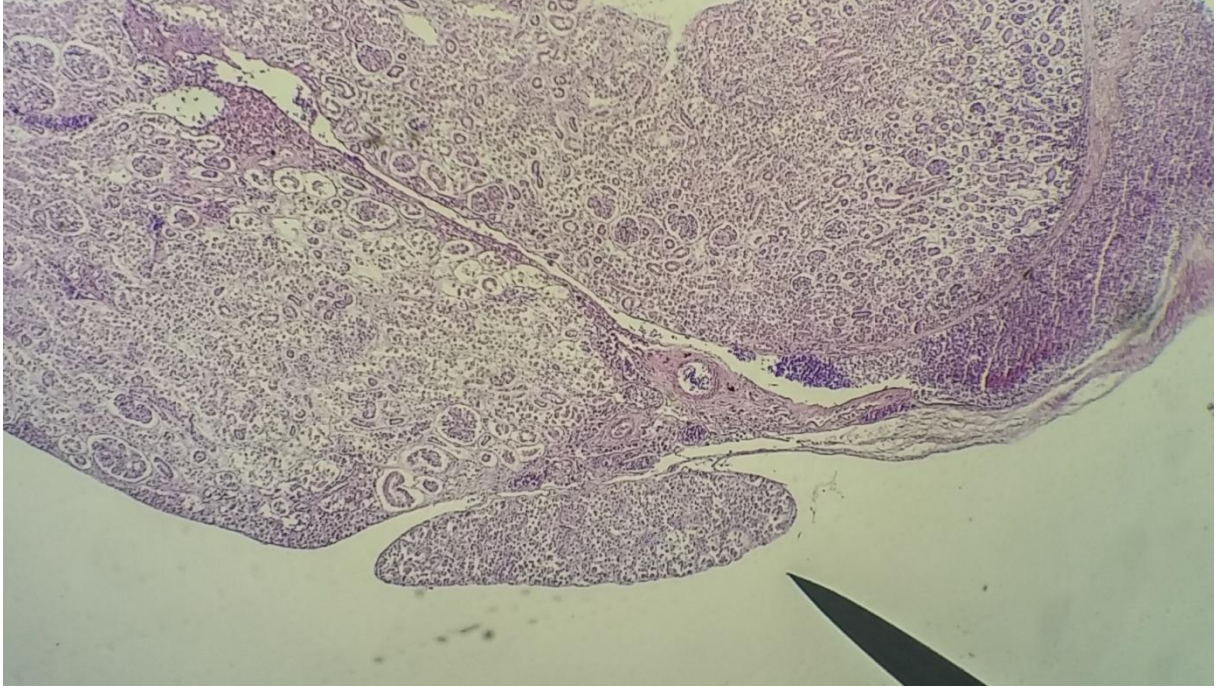
Wibbels, T., Balazs, G. H., Owens, D. W. Amoss, M. S. 1993. Sex ratio of immature green turtles inhabiting the Hawaiian archipelago. *Journal of Herpetology*, 327-329.

Wibbles, T., Owens, D.W., Morris, Y.A., Amos, M.S. (1987) Sexing techniques and sex ratios for immature loggerhead sea turtles captured along the Atlantic coast of the United States. In: *Proceedings of the Cape Canaveral, Florida Sea Turtle Workshop* (ed., Witzell, W.N.) NOAA Technical Report NMFS 53.

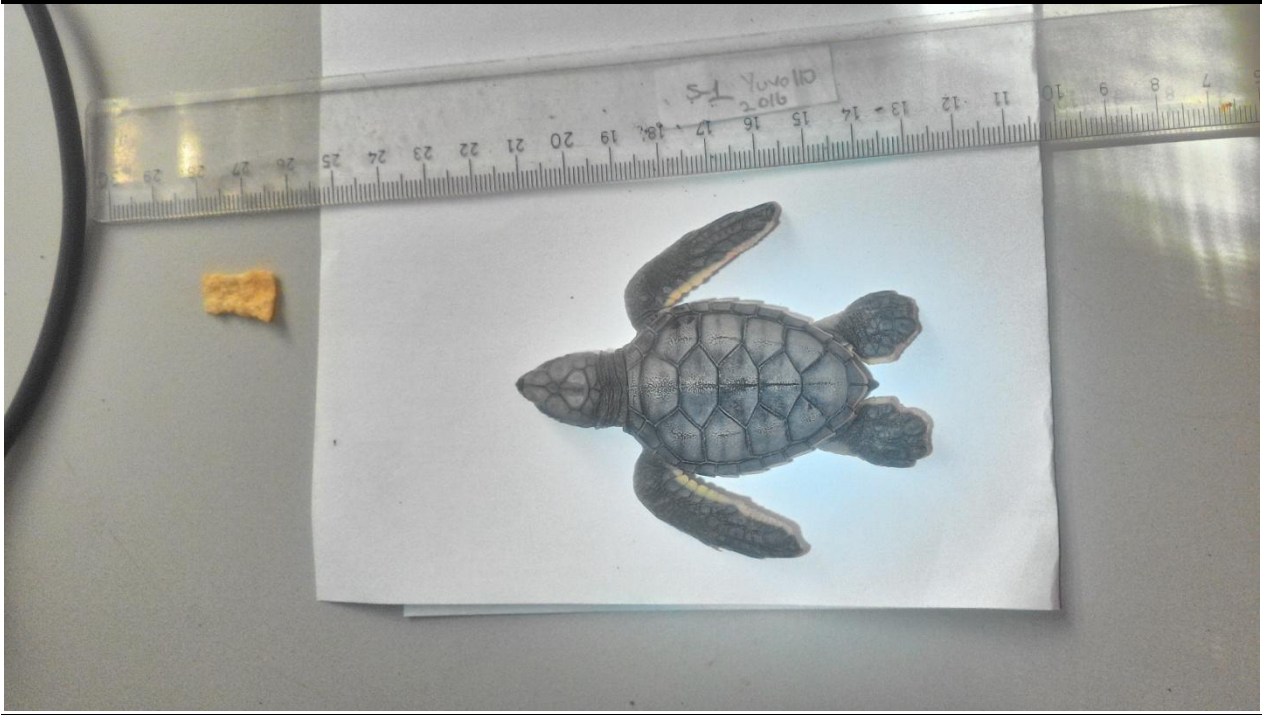
Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L., Grillasca J.P. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquacult.* 258, 685–688

Yntema, C.L. ve Mrosovsky, N. 1980. Sexual differentiation in hatching loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica* 36: 33-36.

EK: Proje Çalışmaları Hakkında Görseller



Histolojik inceleme sonucu erkek ve dişi (sırasıyla) gonad olarak tanımlanan kesitler



Plastron ve karapas vücut bölgelerinden fotoğraf çekimi



Fotoğraf çekim düzeneği ve fotoğrafı çekilecek ve ölü olarak bulunan yavrular



Kumsallarda bulunan ölü yavrular



Yavru ölçümleri