



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**KARASU HAVZASI'NDA YAŞAYAN OVA KURBAĞALARINDA
SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ARAŞTIRMALAR
Proje No: 2016/171**

Lisansüstü Öğrenim Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN
Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ (ETÜ), Dr. Yahya TEPE (Fen Fak./Biyoloji), Esra
CANPOLAT (Yüksek Lis. Öğr.)

Eylül 2017

ERZURUM



ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

ÖNSÖZ

Projede Karasu Havzası'nda (Erzurum) yaşayan ova kurbağalarında (*Pelophylax ridibundus*) sitogenetik ve genotoksik araştırmalar yapılmıştır. Özellikle sitogenetik olarak karyotip analizi bölge için ilk olma özelliği taşımaktadır. Diğer soğukkanlı hayvanlarda olduğu gibi kurbağalarda da karyotip analizleri canlı bireyler kullanılarak yapılmakta ve kısa sürede sonuç alınabilmektedir. Canlı yakalanan bu kurbağaların toplandığı alanlar da kirlilik açısından değerlendirilmek adına özenle seçilmiştir. Çünkü kurbağaların çevre ile olan temasları diğer sucul ve karasal omurgalılardan biraz farklıdır. Biyolojileri gereği hem karasal hem de sucul ekosistemi kullanan kurbağalar, her iki ekosistemdeki kirlilikten etkilenebilmektedirler. Bu prensip doğrultusunda yapılan projede tarım yapılan yerlerden yakalanan kurbağaların kanları incelendiğinde genotoksik etkilerin arttığı tespit edilmiştir. Ancak kromozom yapı ve işleyişinde herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır ve Atatürk Üniversitesi Fon Saymanlığı tarafından **BAP 2016/171** nolu proje ile desteklenmiştir.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	40
7. EKLER	47

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Tablo 4.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un barsak dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi	24
Tablo 4.2. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un kemik iliği dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi	24
Tablo 4.3. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un kromozomlarının ölçümleri ve sentromerik endeksleri	26
Tablo 4.4. Seçili lokalitelerinden yakalanan <i>Pelopylax ridibundus</i> kurbağaların periferik eritrositlerindeki çekirdek anormallikleri ve frekansları	29
Tablo 4.5. Söğütlü Köyü'nden yakalanan kurbağaların genotoksisitesinin mevsimsel değişimi.	30
Tablo 5.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un karyotipik özellikleri	35
Şekil 3.1. 1. İstasyon: Dereboğazı Köyü. Erzurum- Dereboğazı Köyü 28.6. km. 39°49'17.7 K, 41°00'56.8 D	16
Şekil 3.2. 2. İstasyon: Dereboğazı Köyü. Erzurum- Dereboğazı Köyü 27. km. 39°49'34.3 K, 41°01'36.1 D	17
Şekil 3.3. 3. İstasyon: Söğütlü Köyü. Erzurum- Söğütlü Köyü 17.7. km. 39°53'16.0 K, 41°06'34.5 D	18
Şekil 3.4. <i>Pelophylax ridibundus</i> (Ova kurbağası, ♂), dorsal görünüş	19
Şekil 3. 5. Kurbağa femurundan çıkarılan kemik iliği	20
Şekil 4.1. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un giemsa ile boyanmış (G bantlama) metafaz plağı (A) ve karyotipi (B)	25
Şekil 4.2. <i>Pelophylax ridibundus</i> 'un idiyogramı	27
Şekil 4.3. <i>Pelophylax ridibudus</i> 'da NOR bölgelerini gösteren gümüş nitrat boyalı metafaz plağı	28
Şekil 4.4. <i>P. ridibudus</i> 'da konstitütif heterokromatin kısımlarını gösteren C-bantlama yapılmış metafaz plağı	28
Şekil 4.5. <i>Pelophylax ridibudus</i> 'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri. A) Normal çekirdekli eritrosit. B) Çentikli çekirdekli eritrosit	31
Şekil 4.6. <i>Pelophylax ridibudus</i> 'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri. A) Böbrek şeklinde çekirdekli eritrosit. B) Lopluk çekirdekli eritrosit.	32

ÖZET

Erzurum il sınırları içinde olan Karasu Havzası Fırat Nehri'nin kaynağını oluşturmaktadır. Tarımsal kaynaklı suni gübrelerin, insektisitlerin, kanalizasyon, sanayi ve fabrika atıklarının bu havzayı kirlettiği düşünülmektedir. Bu havzadaki kirlilik Fırat Havzası'nı tehdit eder niteliktedir. Son yıllarda çevresel kirlilikteki artışla beraber amfibi populasyonlarında ciddi azalmalar meydana geldiği bilinmektedir. Bu amfibi türlerinden biri olan ova kurbağaları (*Pelophylax ridibundus*) Karasu Havzası'nda yaşamaktadır. Bu çalışmada önce *Pelophylax ridibundus*'un karyotipik özellikleri kemik iliği ve barsaklarından elde edilen metafaz kromozomları incelenerek araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kurbağalar Karasu Havzası'nın 3 farklı noktasından yakalanmıştır. Kurbağalar canlı olarak laboratuvara getirilmiş ve analizden önce akvaryumlara yerleştirilmiştir. Kurbağaların barsak epitel ve kemik iliği ana hücreleri karyotip analizi için kullanılmıştır. Bu hücrelerden en iyi metafaz kromozom yayımları 1 saat hipotonik (0.075 M KCl) uygulama, soğuk hazırlanmış karnoy solüsyonu (3 metanol: 1 glacial asetik asit) ile fiksasyon ve %10'luk Giemsa ile 20 dakika boyama sonucu elde edilmiştir. Kemik iliğinden ve barsaklardan elde edilen mitotik kromozom preparatlarına daha sonra gümüş nitrat (AgNOR) boyama ve C-bantlama teknikleri uygulanmıştır. Hazırlanan preparatlarda yapılan incelemeler sonucunda her iki hücre tipinde *Pelophylax ridibundus*'un $2n=26$ kromozoma sahip olduğu anlaşılmıştır. Karyotip analizi sonucunda *Pelophylax ridibundus*'da 7 metasentrik, 5 submetasentrik ve 1 subtelosentrik kromozom çifti olduğu belirlenmiştir (14M+10SM+2ST). Kol sayısı FN=52 olarak tespit edilmiş ve Ag-NOR pozisyonunun 10. kromozom çiftinin uzun kolunda olduğu bulunmuştur. C-bantlama ile yapılan karyotiplerde ise C-pozitif heterokromatin bantlarının kromozomların telomerlerinde olduğu görülmüştür. Karyotip simetri/asimetri indeksi 1.53 olarak hesaplanmıştır. Araştırmanın ikinci kısmında ise çevresel kirliliğin etkilerini tespit etmek amacıyla havzanın tarım yapılan alanlarından (Dereboğazı Köyü ve Söğütlü Köyü) yakalanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda genotoksik çalışmalar yapılmıştır. Kurbağalarda genotoksisite, eritrositik çekirdek anormalliklerinin (EÇA) oluşumuna bakılarak tespit edilmiştir. Böbrek şekilli çekirdek, çentikli çekirdek ve loplu çekirdek anormallikleri kurbağaların eritrositleri kullanılarak belirlenmiştir. Genotoksisite bakımından Dereboğazı Köyü'nden yakalanan kurbağalarda istatistiksel olarak bir artış gözlenmemiştir. Ancak Söğütlü Köyü'nden yakalanan kurbağalarda genotoksitesinin arttığı ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pelophylax ridibundus*, Su Kirliliği, Karasu Havzası, Kromozom, Karyogram, İdiyogram, Genotoksisite, Eritrositik Çekirdek Anormalligi.

ABSTRACT

Karasu Basin, in Erzurum boundary, is the source of the Euphrates River. It is considered that artificial fertilizers, insecticides, municipal sewage, industrial and factory wastes are polluted the basin. The pollution in the Karasu Basin also threatens the Euphrates basin. During the last few years, many amphibian populations have been decreasing dramatically by environmental pollution. An amphibian species marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) are distributed in Karasu Basin. The karyotypic characteristics of *Pelophylax ridibundus* have been investigated by examining metaphase chromosome spreads obtained from bone marrow and intestine epithelium. The frogs used in the study were caught from three stations of the Karasu Basin. The frogs were transported to the laboratory as live, and kept in aquarium before the analysis. Bone marrow and intestine of frogs were used for karyotype analysis. The best treatment parameters for preparing good metaphase chromosome spreads from the cells were optimized as hypotonic 1 hour (0.075 M KCl) treatment, fixation with carnoy solution (3 methanol: 1 acetic acid) and stained 10% Giemsa for 20 minutes. The prepared mitotic chromosomes were also analysed silver staining (AgNOR) and C-banding techniques. It was determined that *Pelophylax ridibundus* had $2n=26$ chromosomes by investigation of the chromosome spreads. *Pelophylax ridibundus* karyotypes were determined as being composed of 7 metacentric, 5 submetacentric and 1 subtelocentric chromosome pairs (14M+10SM+2ST). The fundamental arm numbers of chromosomes were determined FN=52 and Ag-NOR positions located in the long arm of chromosome pair 10. The C-banded karyotypes showed C-positive heterochromatin bands at the telomeric regions of the chromosomes. Karyotype symmetry/asymmetry index was 1.53. Secondly, to determine the environmental pollution effects, we performed the genotoxicity studies in *Pelophylax ridibundus* frogs collected at agricultural areas in the Karasu Basin (Dereboğazı Village and Söğütlü Village). Genotoxicity assays such as erythrocytic nuclear abnormalities (ENA) were carried out on the frogs studied. ENA named kidney-shaped nucleus, notched nucleus and lobed nucleus were assessed in peripheral blood erythrocytes of the frog. The genotoxic effects did not show significant increasing between frog species caught from Dereboğazı Village, statistically. However, the toxic effects increased in Söğütlü Village and this increase was found to be statistically significant.

Keywords: *Pelophylax ridibundus*, Water Pollution, Karasu Basin, Chromosome, Karyogram, Ideogram, Genotoxicity, Erythrocytic Nuclear Abnormalities.

1. GİRİŞ

Orta Avrupa ve Batı Asya'nın yaygın kurbağa türlerinden olan *Pelophylax ridibundus* Pallas,1771 (Anura; Ranidae) Ülkemizde de yaşamaktadır. Diğer omurgalılarda olduğu gibi kurbağalarda da sitotaksonomik analizler hayvanların sistematigi ve yayılışları hakkında güvenilir bilgiler verme noktasında oldukça etkilidirler. Özellikle karyotip analizleri bu konuda en yaygın kullanılan tekniktir. Kurbağalarda yapılan karyotip analizlerinde özellikle *Rana* (sinonim=*Pelophylax*) cinsinde kromozom sayısının populasyonlar arası farklılıklara rağmen $2n=26$ olduğunu göstermektedir (Kuramoto 1990). Yakın türlerde ise ayırım kromozomları C-bantlama tekniği ile ayırmak mümkün olmaktadır. Bu teknikle kromozomların heterokromatin bölgeleri yönünden değerlendirilmektedir. Ülkemizde *Pelophylax ridibundus* türüne ait ilk karyotip Alpagut ve Falakalı (1995) tarafından yapılmıştır. Sonrasında ise Orta Anadolu'da yayılış gösteren aynı türe ait C-bantlama ve gümüş nitrat boyama teknikleri ile karyotip oluşturulmuştur (Arslan et al. 2010). Ancak Erzurum'da yayılış gösteren *Pelophylax ridibundus* türüne ait bu anlamda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu eksiklik mevcut proje çalışması ile giderilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Yeryüzünde bulunan milyonlarca canlı türünü sınıflandırmak, insanoğlunun en nihai hedeflerinden biridir. Bu hedef doğrultusunda canlıları sınıflandırarak, bilmediği ve hükmedemediği bir şeyden korkma, kontrol altında tutamama korkusunu yenmiştir. Aynı zamanda sınıflandırma işlemini yaparak doğayı ve doğada bulunan tüm canlıları kendi isteği ve menfaati doğrultusunda daha verimli olarak kullanmayı başarmıştır. Canlıların sınıflandırma tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Nitekim Aristo ile başlayan bu işlem günümüze kadar devam etmiştir. Yeni türlerin keşfiyle gelecekte de sınıflandırma olgusu varlığını devam ettirecektir.

Biyolojinin herhangi bir dalında görev alan kişi, incelediği bir organizmanın ya da analiz ettiği numuneye ait canlıyı sistematikteki yerini belirleyemediği takdirde, gerektiği şekilde ve derinlemesine bir çalışma yapamaz ve yorumlarında yetersiz kalabilir. Ekolojik araştırmalarda da çalışma alanından toplanan verileri değerlendirmek için ilk olarak eldeki örneklerin türlerinin teşhis edilmesi ve sistematik yerinin iyi bilinmesi şarttır. Üzerinde çalışılan bölgenin ekolojik olarak hakkıyla değerlendirilmesi için o alanda yaşayan bütün canlı gruplarının daha

yakından tanınması gerekmektedir (Yılmaz, 2012). Canlılar âleminin en önemli özelliklerinden birisi değişebilme ve zengin bir çeşitlenme potansiyeline sahip olmasıdır. Aynı türde yer alan fertlerin herbiri diğerinden birçok özelliği açısından farklı olabilirken, farklı türlerin veya cinslerin daha fazla karakter bakımından farklı olacağı aşikardır. Taksonomistin vazifelerinden birisi, incelediği ya da mukayese ettiği taksonların hangi özellikler bakımından birbirlerinden ne derece farklı olduğunu ortaya koyup, elde edilen bilgiler ışığında ele aldığı canlı grubun hangi türe, alttüre veya cinse ait olabileceği hususunda bir karara varmaktır. Bunu yapmanın en kolay yöntemi ise elindeki örneklerin morfolojik olarak farklı olup olmadıklarını tespit etmektir (Yılmaz, 2012)

Geçmişte sınıflandırma yapılırken; morfolojik karakterlere, direkt gözlemlere, sayımlara ve ölçümlere dayalı tespitler yapılıyordu. Bu durum taksonomide büyük önem taşıyordu. Canlılarda ayak sayısı, ayakların tırnaklı veya perdeli olması, göz kapağının varlığı veya yokluğu, tüy, kıl, pul gibi yapıların bulunup bulunmamasına bağlı olarak yapılan karşılaştırmalar ile elde edilen sonuçlar herhangi bir alet gerektirmediğinden bu işlemlerin daha pratik olarak yapılmasını sağlıyordu. Elbette geçmişte sınıflandırma yapmak için kullanılan yöntemler ile günümüzde kullanılan yöntemler arasında azami farklar vardır. Günümüzde artık dış görünüme bakılarak, metrik veya meristik yöntemlerle yapılan sınıflandırma bazı alt türlerin veya keşfedilmemiş türlerin tespitini zorlaştırmaktadır. Zamanla bu şekilde doğrudan nitel gözlem yoluyla ve alet kullanmadan değerlendirilebilecek karakterler arasındaki uyum tespiti, tür ve alttür seviyelerinde yetersiz kalmıştır. Bu sebeple daha ayrıntılı yapılarda, daha özel ayırıcı özelliklerin varlığı varsayılarak, daha hassas gözlemlere başlanmıştır. Ayrıca, aynı dönemde bu ihtiyaca paralel olarak gelişen ışık mikroskopları, faz-kontrast ve polarizasyon mikroskopları gibi büyütme gücü çok yüksek olan gözlem araçlarının gelişmesinin de hayvanların daha ince yapı özelliklerini açığa çıkarmada önemli avantajlar sağlamıştır (Yılmaz, 2012).

Gelişen teknolojiyle beraber sınıflandırmada kullanılan yöntemler de (sitogenetik, karyotip analizi, elektroforez, biyoakustik metodlar, kromozom çalışmaları gibi) daha kesin ve net ayırım yapmamızı sağlamıştır. Böylece sadece morfolojiye bağlı olarak yapılan çalışmalar ile birbirlerinden ayrılması güç olan türleri ayırmak için daha iyi ve daha kesin sonuçlar verebilecek taksonomik karakterler üretimi hedeflenmiştir (Sevindik, 2013). Populasyon genetikçileri yıllardan beri, bireyler arasındaki farklı tohum ve çiçek rengi ya da

beneklenmedeki çeşitlilik gibi fenotipik farklılıkları göz önüne alarak tür içi çeşitliliği tahmin etmişlerdir. Canlıların kalıtım materyali olan DNA, populasyondaki bireyler arasındaki genetik farklılıkları belirlemek ve nicelleştirmek için doğrudan kullanılan moleküler bir materyaldir. Bu yöntem, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik varyasyonları belirlemek ve değerlendirmek için çok önemli bir araç olmuştur. Çekirdek, mitokondri ve kloroplastda bulunan DNA'lar genetik varyasyon seviyesini belirlemek için analiz edilebilir. İlgili türün DNA'sı ile gerçekleştirilen DNA profil analiz yöntemleriyle, koruma biyologları tarafından genetik varyasyon dağılımını ve düzeyini incelemekte ve koruma gayretlerine yardımcı olmakta kullanılmaktadır (Klug and Cummings, 2009).

Hayvanların sahip olduğu morfolojik, fizyolojik ve biyokimyevi özellikleri genetik ve çevre şartlarının bir görüntüsü olarak ortaya çıktığından sitotaksonomik çalışmalardan, hücre seviyesinde bilgi elde edilir. Hücrenin kromozomlarına kodlanmış olan genetik bilgileri çekirdeğinde olduğundan (yunanca : *karyon* = *çekirdek*) bu çalışmalar karyoloji adı altında yürütülmektedir. Sitotaksonomik çalışmaların çoğu, önceleri kromozom sayıları, morfolojileri ve davranışlarıyla ilgili olduğu halde bugün sitokimyevi çalışmalarda oldukça hızlanma durumuna girmiştir. Kromozom analizleri yardımıyla hayvan populasyonlarının genetik yapılarının belirlenmesi popülasyonlar arası ve populasyon içi (hatta bireysel) kromozom polimorfizmi tesbit edilebilir. Ayrıca su kirliliği göstergesi olarak, kromozomal hastalıkların tesbitinde, filogenetik ilişkilerinin ortaya konulabilmesinden dolayı önemlidir. Özellikle amfibi ve sürüngenlerin iyi bir genel çevre sağlığı göstergesi olduğu da düşünülmüştür (Pollet and Bendell-Young, 2000).

İki yaşamlılar-Amphibia (eski Yunanca Amphi=iki; Bios=yaşam) sınıfı içinde yer alan *Pelophylax ridibundus* Pallas,1771 (Anura; Ranidae) Batı Palearktik su kurbağaları içinde en eski tanımlanmış türlerden biridir. Türün tip lokalitesini Dubois and Ohler (1994), Hazar Denizi'nin kuzey kıyıları ve Volga Nehri olarak belirtilmekte ve dağılım alanının Orta ve Kuzey Avrupa'dan Asya'nın batı kısmına kadar uzandığı ifade etmişlerdir. Birçok amfibinin gelişimi başkalaşımla (metamorfoz) olur. Başkalaşımda, suda yaşayan ve solungaçlarıyla soluyan larvalardan, sınırlı koşullarda da olsa karada yaşayan erginler gelişir. Larvalar (iribaşlar) başlangıçta bir tabakalı epidermise, dış ve iç solungaçlara, göz kapaksız gözlere, gerçek dişlerin yerine boynuzumsu dişlere, büyük ölçüde balıklarinkine benzeyen bir dolaşım sistemine, yanal çizgiye ve kuvvetli bir kuyruğa sahiptir (Kuru, 2004). *Pelophylax ridibundus*

(Pallas 1771) türü dünya üzerinde Kuzey Afrika, Orta ve Güney Avrupa ve Batı Asya'ya kadar dağılım gösterir. *P. ridibundus* Anura takımına ait olup Ülkemizde de bu takım 7 familya, 16 tür ve bunların alttürleri ile temsil edilir (Özeti ve Yılmaz, 1994; Baran ve Atatür, 1997).

P. ridibundus'da vücut boyu 15 cm kadar, kulak zarı bariz ve baş yanlarındaki koyu renkli şerit yoktur. Deri kıvrımları sırt yanlarında boydan boya uzanmıştır ve iyi gelişmiştir. Deri genellikle pürüklüdür. Dış ses kesesi erkeklerde belirgindir. Hayvanın hakim rengi sırt tarafta yeşilimsi gri, açık veya koyukahverengi olabilir. Koyu lekeler bu zemin üzerinde görünür. Bazılarının sırtlarının tam ortasında boyuna uzanan açık renkli bir şerit bulunabilir. Karın tarafının hakim rengi ise genellikle kirli beyaz veya sarımsı olup çoğunlukla küçük lekeli. Ender de olsa alt tarafı kırmızımsı olanlara da rastlanır (Baran, 2005). Bazen akıntılı sularda da bulunur. Besinlerini böcek türleri teşkil eder. Tarıma zarar veren böcek türleri ile sivrisinek popülasyonlarını dengede tutmaya katkı sağlayan kurbağa türüdür. Ancak ihraç edilmek için gereken kurbağa örnekleri üreme mevsiminde toplandığından ova kurbağası popülasyonları büyük ölçüde azalmıştır. Türkiye'de uygun biyotop olan bütün bölgelerde yayılmıştır. Deniz seviyesinden 2500 m. yüksekliğe kadar bulunur ve ülkemizde iki alt türünün yaşadığı bildirilmiştir (Baran, 2005).

Kurbağalar gibi dünyanın hemen hemen her yerinde olabilen canlı türlerinde tür içi ve türler arası varyasyonları belirlemek zor olmaktadır. Bundan dolayı morfolojik metrik ve mersitik karakterlerle beraber sitogenetik ve moleküler çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Sitogenetik tekniklerin gün geçtikçe gelişmesi, canlı grupları arasındaki karyotipik farklılıkların ortaya konması açısından bir fırsattır. Omurgalı hayvanlarda karyoloji ile ilgili farklılıkları ortaya koyacak çeşitli çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir (Alpagut and Falakalı, 1995; Ergene et al., 1999; Uğurtaş vd., 2001; Ergene and Çavaş, 2002; Lymberakis et al., 2007; Mindrescu and Ghiorghita, 2008; Martirosyan and Stepanyan, 2009; Napoli et al., 2009; Arslan vd., 2010; Ergene vd., 2010; Kılıç and Şişman, 2016; Şişman ve ark., 2016). Örneğin *Rana esculenta*'nın *Rana ridibunda* ve *Rana lessonae*'nin hibridogenetik ürünü olduğu konusunda yapılan çalışmalardan doğru sonuç alınması için çeşitli sitogenetik çalışmalar yapılmıştır (Spasic-Boskovic et al., 1999).

Sitogenetik çalışmalarda öncelikli hedef, incelenen canlının kromozomunu ve dağılımını belirlemek için karyotip çalışmasını yapıp ardından, uygun bantlama teknikleri ile kromozomal formlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Bantlama çalışmaları, bantlama sonucu elde edilen bant durumlarının filogenetik analizlerde kullanılabilecek karakterler olduğunu göstermesiyle, önem kazanmıştır (Dobingy et al., 2004). İnsan kromozomlarını birbirlerinden ayırt etmek için basit ve kullanışlı bir tekniğin geliştirilmesine ihtiyaç duyulması bantlama metotlarının gelişimi için önemli bir kolaylık sağlamıştır ve bantlama teknikleri, özellikle insanlar üzerinde yapılması planlanan çalışmalar için geliştirilmiştir. İlk bantlama tekniği 1968’de uygulanmış ve bu teknik ile kromozomlar üzerinde bantlar halinde dizilmiş sekansların ayırt edilmesi kolaylaşmıştır (Caspersson et al., 1968).

Kromozomlar üzerinde bantlanmış bölgeleri oluşturarak kromozomları ayırt etmeye yönelik birçok teknik tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri C, G, R bantlarıdır. Bunlardan başka daha az kullanılan ve hazırlanması daha zor olan Q bandı tekniği de vardır (Gosden, 1994). Memeliler arasındaki sistematik ilişkileri belirlemeyle ilgili problemleri çözmede karyotip çalışmaları büyük öneme sahiptir. Taksonomik bir karakter olarak karyotipin başlıca avantajı yapısının çevrenin direk adaptif etkilerinden etkilenmemesidir. Yani hava sıcaklığı, nem, su miktarı, besin çeşidi ve miktarı gibi faktörler canlının dış görünüşü üzerinde çeşitli değişiklikler oluştursa da gen ve kromozom yapısı bu fiziksel çevre şartlarından etkilenmez. Ayrıca karyolojik farklılıklar, birbirleriyle karşılaştırılan formların direk olarak üreme izolasyon derecesini gösterebilir. Karyolojik metotlar akraba türlerin taksonomik ve sistematik durumlarıyla ilgili problemlerin çözümünde ve benzer özelliklere sahip türlerin morfolojik olarak ayırt edilmesinde çok yararlı metotlardır. Karyotip populasyon içi değişimi ve populasyonlar arasındaki ilişkileri türün karakteristik yapısına göre ortaya çıkaracak kesin sonuçlara ulaştırır. (Sumner, 2008).

Karyolojik teknikler, sitotaksonomik analizler ile dünyanın her yerinde yayılış gösteren *Pelophlax* cinsinin karyotipini karakterize etmek için güvenilir bir araçtır. Ayrıca pestisit kirliliğini belirlemede, kromozomların sayı ve yapısında meydana gelen değişiklikleri açığa çıkarmada, erozyon, orman tahribi, yapılaşma, kimyasal mücadele, izolasyon gibi durumların türleşmeye katkısı olup olmadığı ya da hibrid türlerin açığa çıkmasında ne derece etkili olduğunu tesbit etmek için bu tekniklerin kullanılması şarttır.

Avrupa türleri de dahil amfibiler ve sürüngenlerle ilgili taksonomik isimlendirme listesi sürekli değişmektedir. Bu durum, türlerin birbirinden ayrılmasında, yeni gizli türlerin açığa çıkmasında protein elektroforezi, sitogenetik, biyoakustik metodlar, kromozom çalışmaları gibi yeni tekniklerin kullanılmasını gerektirmektedir. Dubois (1998) tarafından da çoğunlukla vurgulandığı gibi, bu değişiklikler yeni tekniklere ve bazı 'alttürler'in durumunu yeniden değerlendiren yeni konseptlere, ayrıca sınıfların sistematik benzerliklerinden dolayı sınıflandırma uzmanlarının tamamen dikkatinden kaçmış olan yeni sınıfların keşfine dayanmıştır. Yeni türlerin açığa çıkarılmasını kolaylaştıran bu çalışmalar aynı zamanda; kromozomlarda meydana gelen değişikliklerin açığa çıkarılmasında, mikronukleus analizlerinde, nuklear anormallikler ve yoğun tarımsal faaliyetlerde kullanılan pestisitlerin genotoksik etkileri hakkında bilgi sahibi olabilmemizi sağlamıştır.

Son yıllarda, mikroçekirdek (MÇ) testinin ucuz, basit olması, ister laboratuvar ortamında isterse doğal ortamda uygulanabilir olmasından dolayı kromozomların sayısal ve yapısal hasarlarının belirlenmesi amacıyla balıklar üzerine etkin bir biçimde kullanılmaya başlanmıştır (Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2005). Amfibilerde de çekirdekli alyuvar bulunması nedeniyle MÇ testleri bu canlılarda kullanışlı hale gelmektedir. Memeli sistemlerde, MÇ deneylerinin duyarlılığı ve kullanılabilirliği yeni bir teknik olan, hücre bölünmesi esnasında henüz yeni oluşmuş iki nükleuslu hücrelerde mikronükleus sayımına olanak veren bloke-sitokinez metodu ile önemli oranda arttırılmıştır (Fenech and Morle, 1985). Amfibiler ve balıklarda ise çekirdekli eritrositlerde sadece mikro çekirdek değil loplu, çentikli, tomurcuklu, çift çekirdek ve böbrek şekilli çekirdek oluşumları gibi oldukça geniş bir yelpazede genotoksisite taramaları yapılmaktadır.

Birçok karsinogen ve mutajen madde DNA'da hasara yol açar, ya da DNA'nın düzgün olarak eşlenmesini önler. DNA hasarlarının genotoksik sonuçları DNA eşlenmesi gerçekleşinceye kadar ve hücre döngüsü tamamlanıncaya kadar görülmez. Genotoksik madde etkisini göstermeden önce hasarların tamirini sağlamak üzere işleyen çeşitli biyokimyasal basamaklar vardır. Mikronükleuslar ya asentrik kromozom fragmentlerinin ya da anafaz sonrasında ana nükleus içinde yer alamayan tüm bir kromozomun kondensasyonu sonucu oluşur. Başka bir ifade ile doğrudan DNA'da ya da iğ ipliğinde meydana gelen hasar ile hücre bölünmesi sonunda ana nükleusa dahil olmayan kırık kromozom fragmentlerinden ya da tüm

kromozomun kromatin haline dönüşmesi ile oluşur. Bir hücrede görülen mikronükleus o hücredeki sayısal veya yapısal bir genetik hasarı işaret eder (Heddle et al., 1983).

Türlerin populasyon durumlarının belirsiz olması, bu grup üzerindeki yapılacak çalışmalara ve elde edilecek bilgilere büyük ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ülkemizdeki amfibi populasyonlarını tehdit eden başlıca doğal ve yapay faktörler; orman tahribi ve erozyon, tatlısu ortamlarının kurutulması, biyolojik ve kimyasal mücadele, ötrofikasyon, tarımsal girdiler ve çıktılar, yapılaşma ve ihracattır (Çiçek vd., 2011). Yapılan araştırmalarla dünya çapında, özellikle son 20 yıl içerisinde kurbağalarda deformasyonların görülme sıklığı artmış ve populasyon azalmaları gözlenmiştir (Houlahan et al., 2000; Sparling et al., 2001). Bu azalmayı durdurabilmek için, hangi faktörlerin rol oynadığını belirlemek önemlidir. Amfibi sayısındaki bu yaygın azalmalara dair kanıtlar hızla ortaya konmakla beraber bu azalmaların altında yatan sebepler hala tam olarak açıklanamamıştır. Artık günümüzde bu azalmalara neden olan bir faktör olarak pestisit kirliliği de dikkate alınmakla beraber bu konuya ilişkin bilimsel araştırmalar hala yeterli değildir.

Bu bilgiler ışığında proje kapsamında daha önce kromozom sayıları tespit edilmemiş Karasu Havzası'nda yaşayan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların kromozom sayılarının tespiti ve buna bağlı olarak kurbağaların yaşadığı tarımsal ortamlardaki muhtemel çevresel kirliliğinin kurbağaların genetik yapısı üzerine olabilecek olumsuz etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Bölgeleri

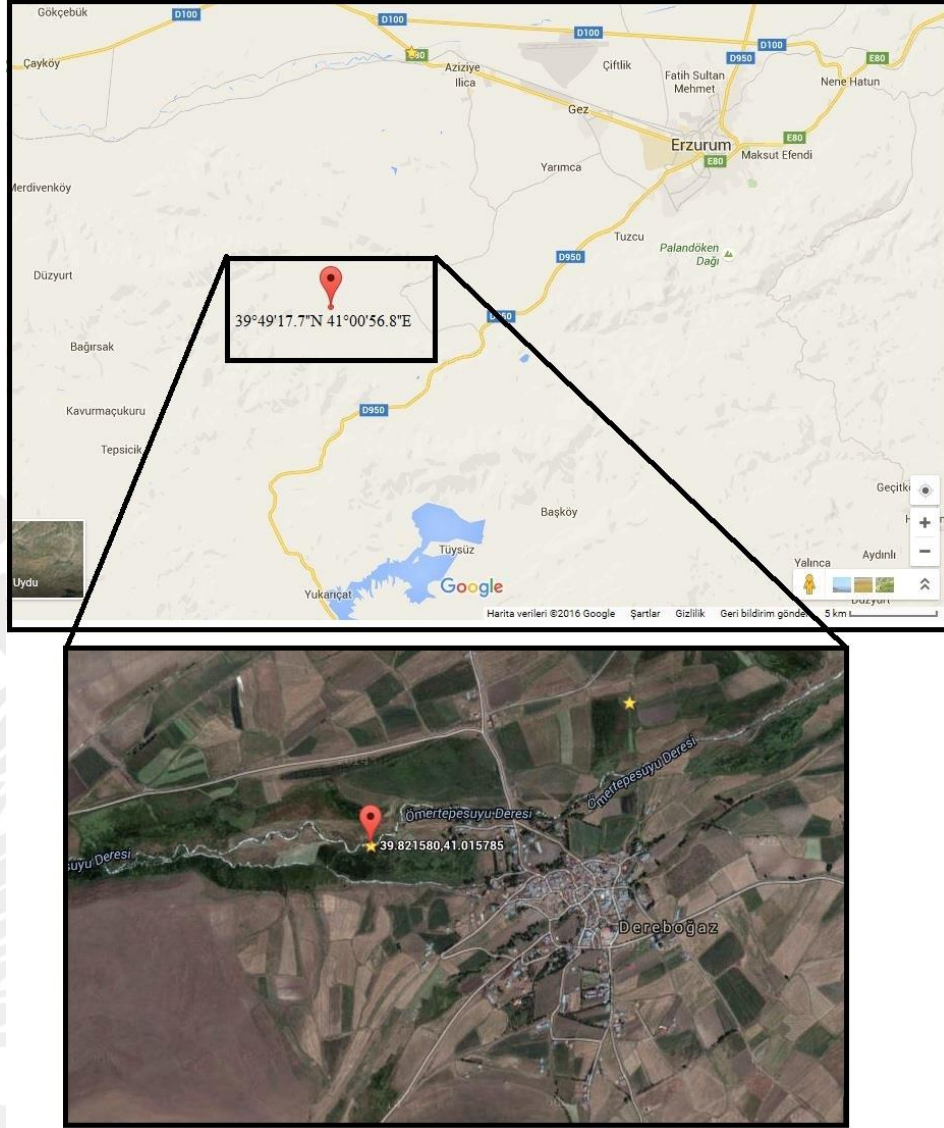
Karasu Havzası ismini içinden geçen Karasu Nehri'nden almaktadır. Nehir 1890 m rakımlı Erzurum Ovası'nın tek akarsuyudur. Fırat Nehri'nin önemli iki kolundan biri olan Karasu Nehri, Erzurum sınırları içinde Dumlu Dağı'nın eteklerinden doğar ve Erzurum Ovası'nı doğu-batı yönünde geçerek ovanın kuzeydoğusundaki 3000-3500 m yükseklikteki Karacağız, Güvercin ve Kandil Dağları'ndan gelen Köşk, Karagöbek ve Dumlu Derelerinin birleşmesinden sonra Karasu adını alır. Önce güneybatıya doğru akar, sonra batıya yönelir. Ilıca ilçesinden Pulur Çayı'nı alır ve İspir yolu üzerinde bulunan Serçeme Deresi'yle de birleşerek ovayı terk eder. Suyunu Fırat Nehri üzerine kurulmuş Elazığ'da bulunan Keban Baraj Gölü'ne ulaştırmaktadır. Karasu Nehri'nin Erzurum ili içindeki drenaj alanı 1642 km² ve ortalama akımı 4,304 m³/sn dir (Sönmez, 2011).

Araştırmamızda tarımsal faaliyet çeşitliliği durumu göz önüne alınarak 3 istasyon seçilmiştir. Bunlardan ilki Erzurum'un merkez köylerinden olan Dereboğazı Köyü'nden geçen Ömertepesuyu Deresi'nin köye giriş noktasıdır. Burası kirliliğin hiç olmadığı referans istasyonu olarak kabul edilmiştir (1. İstasyon). Diğerleri aynı derenin köy çıkışında olan ve suni gübrelemenin yapıldığı alan olarak seçilmiştir (2. İstasyon). Son istasyon ise yoğun tarımsal faaliyetin yapıldığı ve pestisit kullanımının tespit edildiği, aynı dereден sulamanın yapıldığı Söğütlü Köyü olmuştur (3. İstasyon).

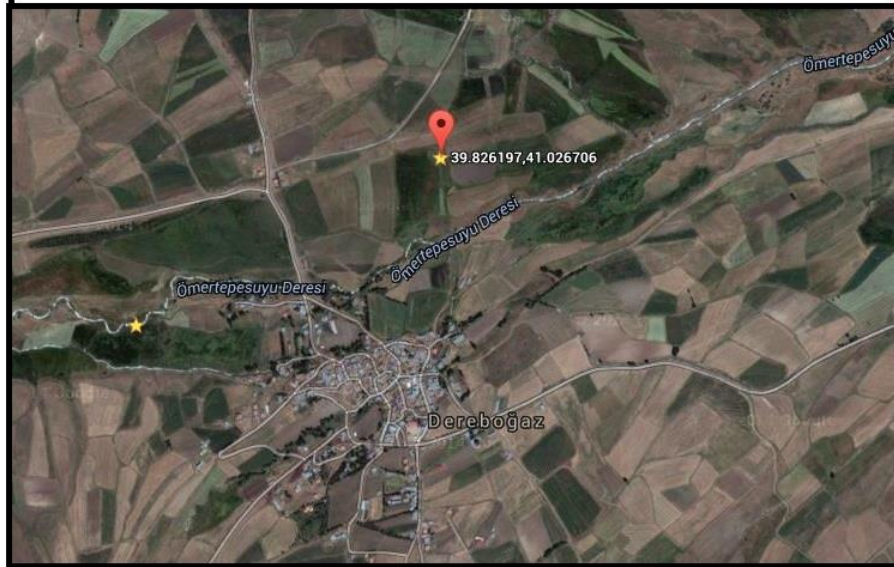
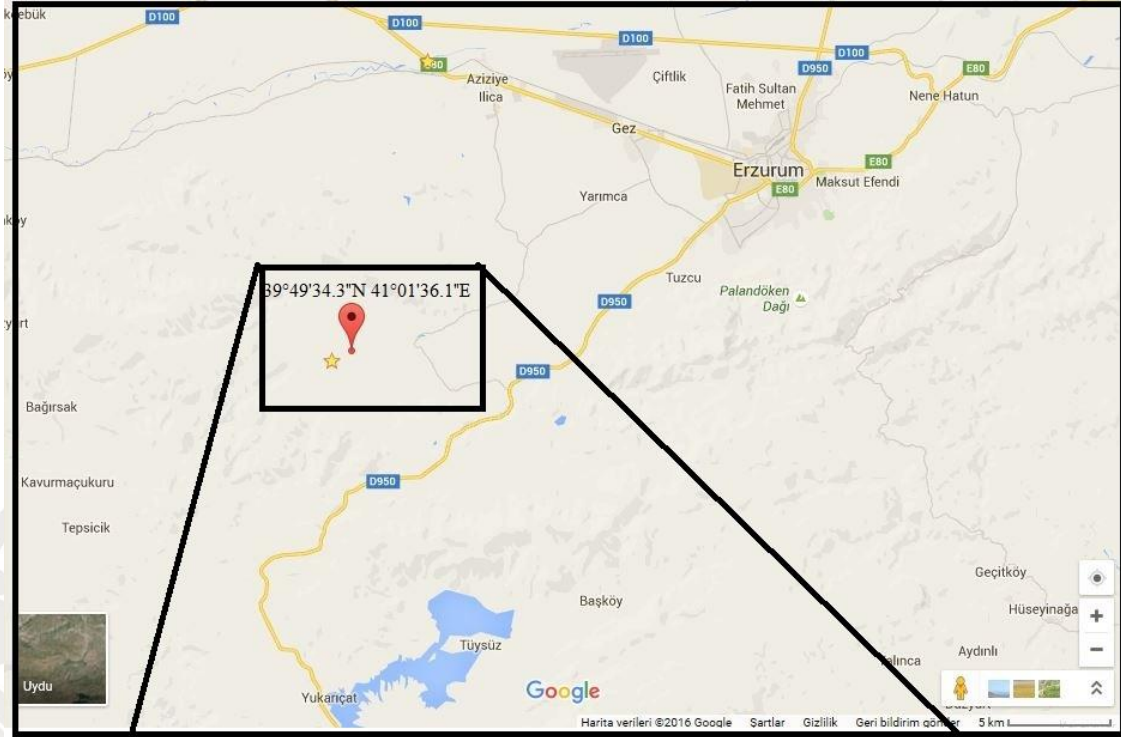
1. İstasyon: Dereboğazı Köyü I. Erzurum- Dereboğazı Köyü 28.6. km (Şekil 3.1)

2. İstasyon: Dereboğazı Köyü II. Erzurum- Dereboğazı Köyü 27. km (Şekil 3.2)

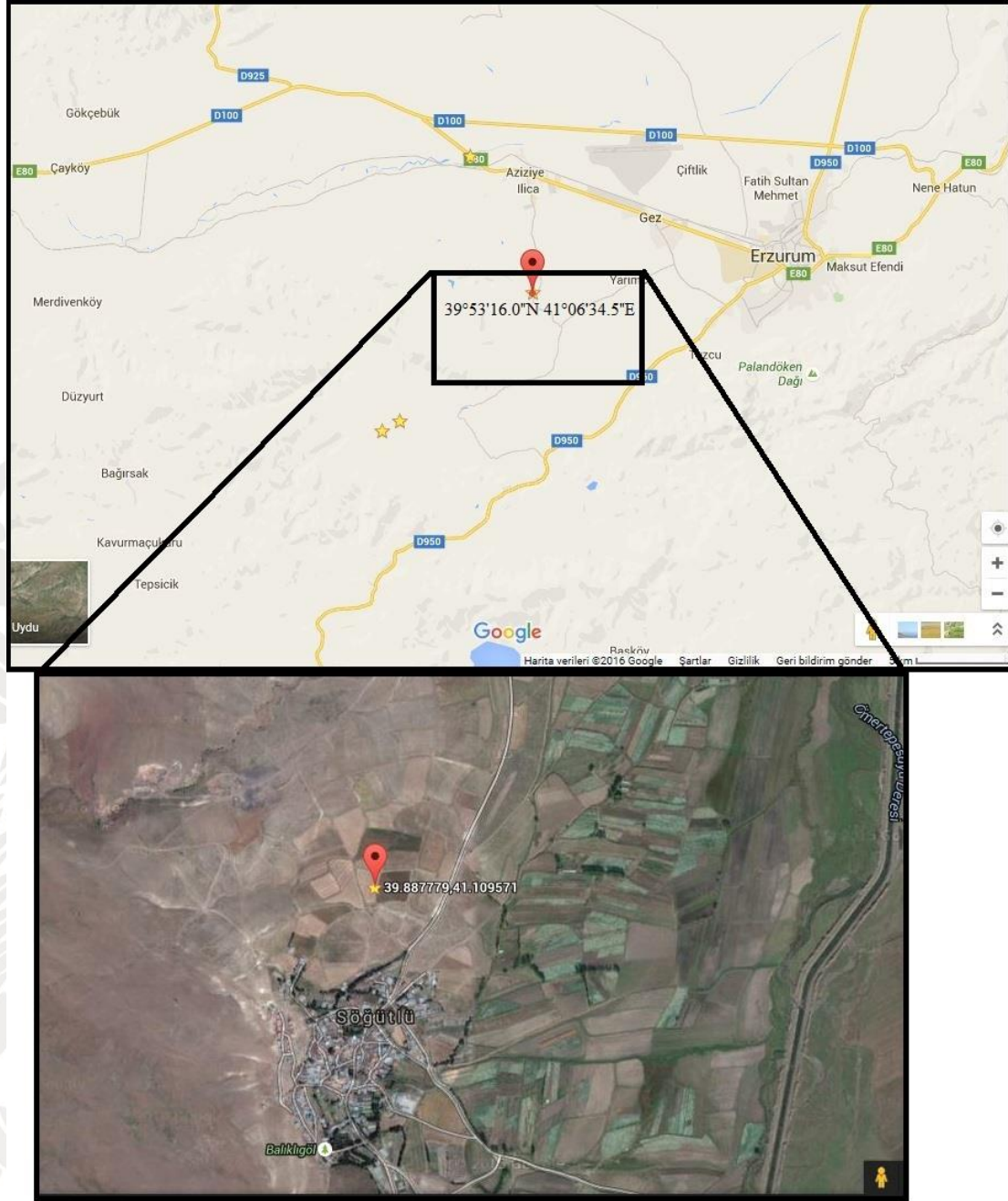
3. İstasyon: Söğütlü Köyü. Erzurum- Söğütlü Köyü 17.7. km (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. 1. İstasyon: Dereboğazı Köyü. Erzurum- Dereboğazı Köyü 28.6. km. 39°49'17.7 K, 41°00'56.8 D.

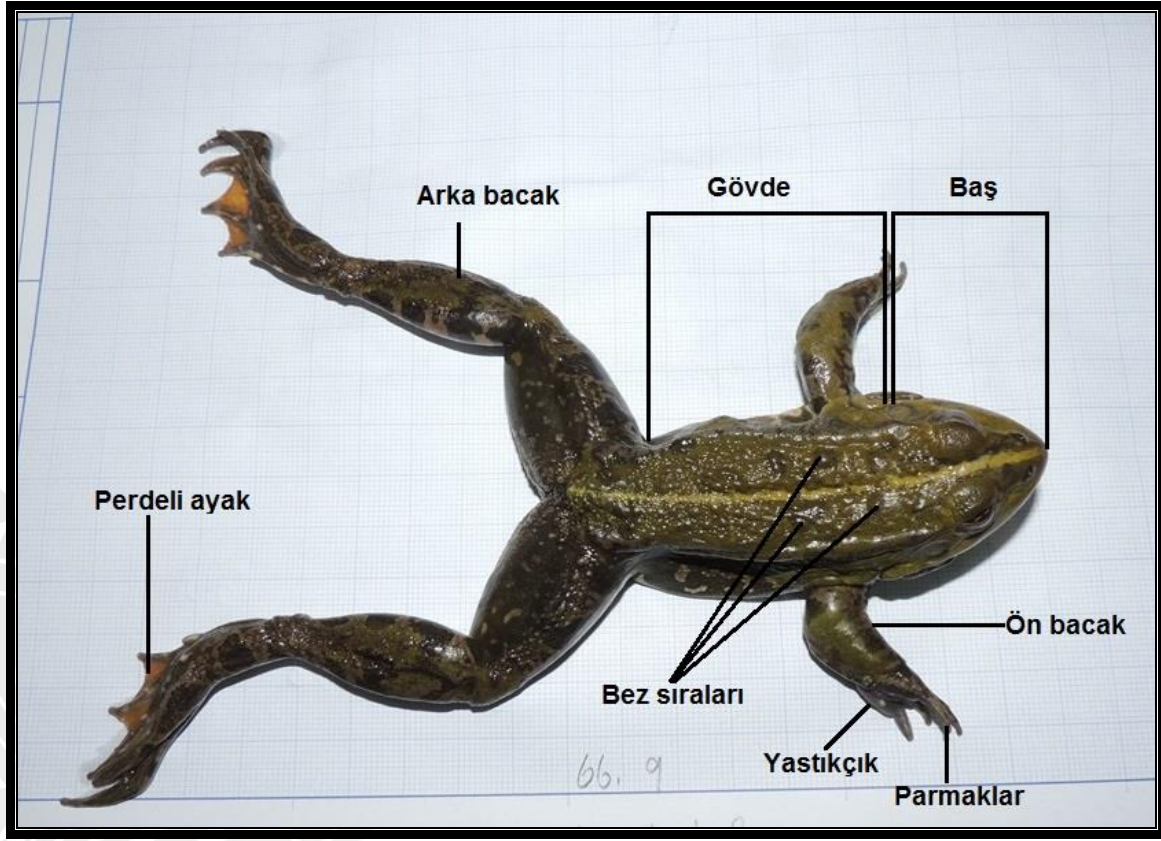


Şekil 3.2. 2. İstasyon: Dereboğazı Köyü. Erzurum- Dereboğazı Köyü 27. km. 39°49'34.3 K, 41°01'36.1 D.



Şekil 3.3. 3. İstasyon: Söğütlü Köyü. Erzurum- Söğütlü Köyü 17.7. km. 39°53'16.0 K, 41°06'34.5 D.

Çalışmada seçilen istasyonların doğal faunasında bulunan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalar tercih edilmiştir (Şekil 3.4). Örnekler Haziran ve Ekim 2016 tarihlerinde toplanmıştır. Bunun için gerekli izinler olan Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan Etik Kurulu İzni (EK1), Orman ve Su İşleri Bakanlığı'ndan Araştırma İzni (EK2), Gıda tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan Araştırma İzni (EK3) çalışma başlamadan önce ilgili yerlere müracaat edilerek alınmıştır.



Şekil 3.4. *Pelophylax ridibundus* (Ova kurbağası, ♂), dorsal görünüş.

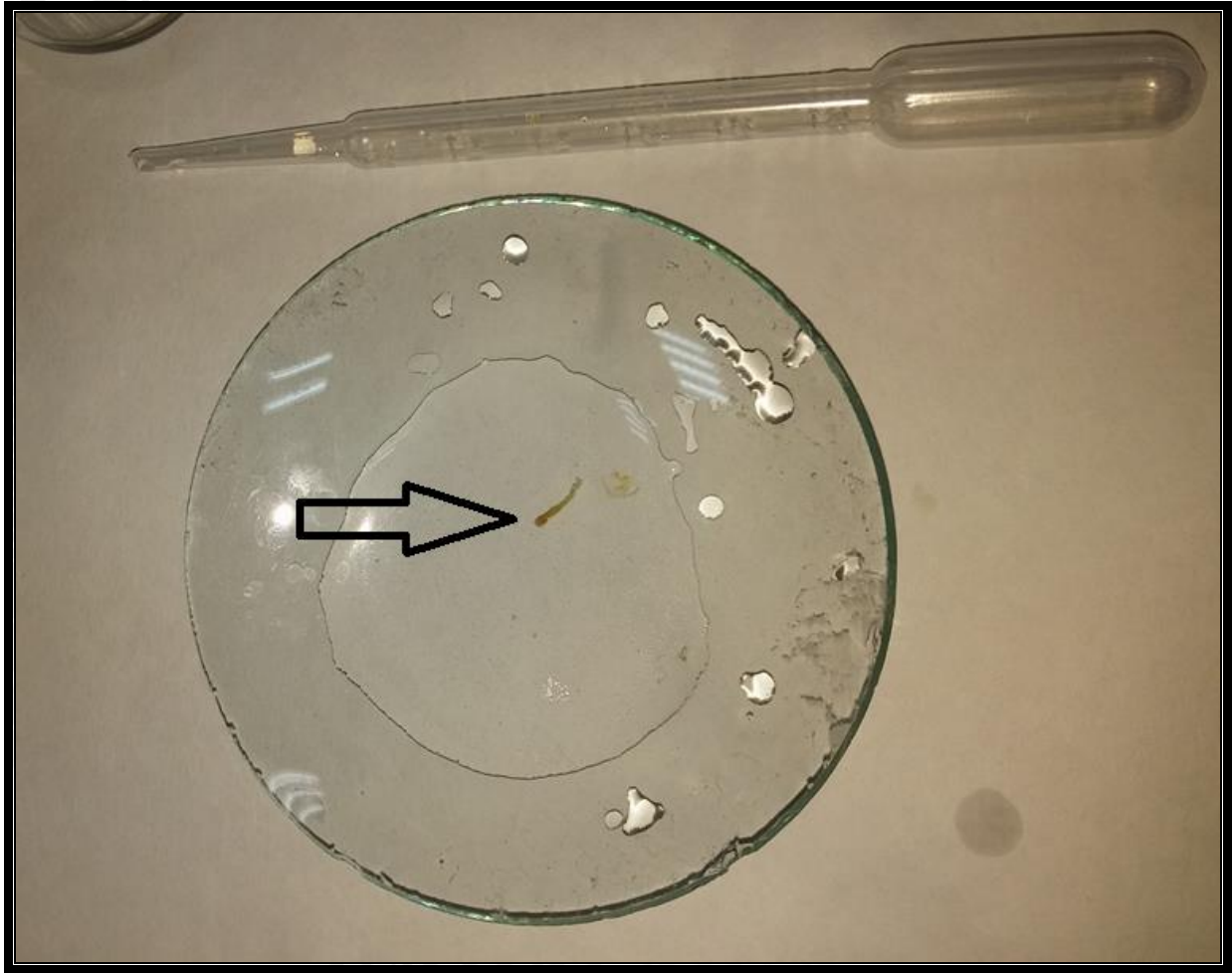
3.2. Sitogenetik Yöntemler

3.2.1. Giemsa boyama (G bantlama)

Karasu Havzası'ndan toplanan toplam 60 kurbağa örneği üzerinde inceleme yapılmıştır. Kurbağalara ilk işlem olarak mitoz bölünmeyi teşvik etmesi amacıyla diseksiyondan 30 saat önce karın bölgelerinden %1'lik fitohemaglutinin verilmiştir. Diseksiyondan yaklaşık 18 saat önce mitozdaki hücreleri metafaz aşamasında durdurmak için %1'lik kolşisin solüsyonundan aynı bölgeye enjekte edilmiştir. Enjeksiyon miktarları 10 g vücut ağırlığı için 1 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra hayvanlar benzocain ile bayıltılıp disekte edilerek önce barsak çıkarılmış, hipotonik sıvı içinde (0,075 M KCl) boydan boya kesilmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık 60 dakika bekletilmiştir. Hücre süspansiyonunu içeren tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 3:1 oranında hazırlanmış carnoy içinde fiske edilmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjlemeden sonra süpernatant atılarak tüpte kalan 0,5 ml'lik hücre süspansiyonu önceden soğutulmuş temiz lamalar üzerine damlatılmış ve

kurumaya bırakılmıştır. Havada kurutulan lamlar fosfat tamponunda hazırlanmış % 10'luk giemsa boyasıyla 20 dakika boyanmış, saf sudan geçirilmiş ve kurutularak incelenmiştir.

Kemik iliğinden kromozom eldesinde ise farklı bir yol izlenmemiştir. Kurbağalar disekte edildikten sonra hayvanın uzun kemikleri olan tibia ve femur, kas ve bağ dokudan iyice temizlenmiş ve kemiklerin epifizleri her iki taraftan düzgünce kesilmiştir. Kemik iliği, 0,075 M KCl içeren bir insülin enjektörü yardımıyla itmek suretiyle bir saat camı içerisine alınmış ve doku küçük parçalara ayrılarak 60 dakika 0.075 M KCl içinde bekletilmiştir (Şekil 3.5). Tespit ve boyama işlemleri yukarıdaki gibi tekrarlanmıştır.



Şekil 3. 5. Kurbağa femurundan çıkarılan kemik iliği (ok).

3.2.2. Gümüş nirtat boyama (AgNOR)

Fikse edilmiş preparatlar %50'lik AgNO_3 içeren solüsyona daldırılmış, kurutmadan lamel kapatılmış, 2 saat 60 derecede inkübe edilmiş, saf suyla yıkanmış, kurutulmuş, %2'lik giemsada 30 dk boyanmış, saf sudan geçirilmiş ve havada kurutularak lamellerin etrafı kanada balsamı ile kapatılarak incelenmiştir.

3.2.3. C Bantlama

Fikse edilmiş preparatlar 0.2 N HCl içinde 30 dk bekletilmiş, sonra saf sudan geçirilmiş ve havada kurutulmuştur. Preparatlar taze hazırlanmış $\text{Ba}(\text{OH})_2$ solüsyonunda 30 derecede 10 dk bekletilmiştir. 0.2 N HCl'ye batırılıp ve sonra saf suyla yıkanmıştır. Sonra 2XSSC içinde 60 derecede 1.5 saat bekletilmiş, saf suyla yıkanmış ve kurutmadan %10'luk giemsada 10 dk boyanmış, yıkanmış, kurutulmuş ve incelenmiştir.

3.2.4. Karyotip Analizi

Karyotipler kromozomların boylarına göre sınıflandırılarak hazırlanmıştır. Kromozom formülünü belirlemek için kromozomlardaki her kol ölçülmüştür. Kol ölçümleri Leica LAS EZ 3.0 görüntü analiz etme bilgisayar programıyla yapılmıştır. Her kromozomun kol oranı (KO), sentrometik endeksi (SE) ve nisbi kol uzunluğu (NKU) hesaplanmıştır. Bunun için aşağıdaki formüllerden yararlanılmıştır.

$\text{KO} = \text{Uzun Kol} / \text{Kısa Kol uzunluğu} (\mu\text{m olarak})$

$\text{SE} = 100 \times \text{Kısa Kol uzunluğu} / \text{Toplam kromozom uzunluğu}$

$\text{NKU} = 100 \times \text{Kromozomun Toplam Boyu} / \text{Kromozomların Boyları toplamı}$

Homolog kromozom çiftlerini ve karyotip formülünü belirlemek için kromozomlar SE değerlerine göre sıralanmıştır. Bu işlem Levan et al. (1964)'ün metoduna göre yapılmıştır. Buna göre SE değeri 50.00-37.51 olan kromozom çiftleri Metasentrik (M), 37.50-25.01 olanlar Submetasentrik (SM), 25.00-12.51 olanlar Subtelosentrik (ST) ve 12.50-0.00 olanlar da Telosentrik (T) olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca Microsoft Office Excel program kullanılarak karyotipin idiyogramı da çıkarılmıştır.

Karyotip simetri ve asimetrisi ise Eroğlu (2015)'na göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$S/A_I = (1 \times M) + (2 \times SM) + (3 \times ST) + (4 \times T) / 2n$$

S/A_I = simetri asimetri indeksi; M = metasentrik kromozom sayısı; SM = submetasentrik kromozom sayısı; ST = subtelosentrik kromozom sayısı; T = telosentrik metasentrik kromozom sayısı; $2n$ = diploid kromozom sayısını göstermektedir. Buna göre S/A_I değeri 1.0-2.0 arasında olan için karyotipi simetrik, 2.1-3.0 olan simetrik asimetrik arasında ve 3.1-4.0 olan karyotipde asimetrik olarak sınıflandırılmaktadır.

3.3. Sitogenetik Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

%1'lik Fitohemaglutinin: 0.1 g fitohemaglutinin 100 ml saf suda çözünerek hazırlanır.

%1'lik Kolşisin: 0.1 g kolşisin 100 ml saf suda çözünerek hazırlanır.

0.075 M KCl: 0.5592 g KCl 100 ml saf suda çözünerek hazırlanır.

Carnoy fiksatif: 150 ml metanol 50 ml asetik asitle (veya 3:1 oranında) karıştırılarak elde edilir.

Fosfat tamponu: İki farklı çözeltinin değişik miktarlarda karıştırılması ile elde edilen tampondur. Karyotip analizlerinde Giemsa boyası pH 6.8 olarak hazırlanan tampon içinde hazırlanmalıdır. Tampon için 2 farklı çözelti hazırlanır.

Çözelti A: Na_2HPO_4 (Disodyum hidrojen fosfat)'ten 11.9 g alınır ve 1000 ml su içinde çözünür.

Çözelti B: KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat)'ten 9.1 g alınır ve 1000 ml su içinde çözünür.

%10'luk Giemsa: Çözelti A'dan 50 ml, Çözelti B'den 100 ml alınır. pH'sı 6.8 olan bu karışımdan 90 ml alınır ve üzerine 10 ml giemsa boyası eklenir.

Ba(OH)₂ Solüsyonu: Her zaman taze hazırlanır. 350 ml'lik beher hafifçe ısıtılır ve içine 55 derecelik su yerleştirilir. Bir kaşık dolusu Ba(OH)₂ bu kaba konur ve karıştırılır. Biraz soğuduktan sonra (50 derecenin altına inince) preparatlar içine daldırılır.

2XSSC: Boyama yapmadan 10 dk önce hazırlanır. 175.32 g NaCl ve 88.23 g Sodyum sitrat 1000 ml saf suya tamamlanarak hazırlanır. Oda sıcaklığında 1 yıl sabitliğini korur.

3.4. Genotoksik Analiz

Genotoksik etkileri belirlemek amacıyla erişkin kurbağaların kanları tercih edilmiştir. Bilindiği gibi kurbağa kanı eritrositleri çekirdekli ve bu hücrelerin çekirdeklerindeki anormallikler (eritrositik çekirdek anormallikleri=EÇA) genotoksitenin bir göstergesidir (Carrasco et al., 1990). Bu amaçla yakalanan her kurbağadan 4 adet yayma kan preparatı hazırlanmıştır. Bu preparatlar 10 dakika etanolde fikse edildikten sonra giemsa boyasında 30 dakika boyanmıştır. Hazırlanan her preparat 100'lük objektif altında 1000 adet eritrosit sayılarak incelenmiştir. İncelenen preparatlarda böbrek şekilli çekirdek, loplu çekirdek ve çentikli çekirdek gibi eritrositik çekirdek anormallikleri ve frekansları tespit edilmiştir.

İstatistik

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi SPSS 20.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her istasyon için elde edilen ortalama EÇA değerlerinin karşılaştırılmasında ANOVA ve LSD testleri kullanılmıştır. Aradaki fark $p < 0.05$ seviyesinde anlam yönünden değerlendirilmiştir.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

4. BULGULAR

4.2. *Pelophylax ridibundus*'un Karyotip Analizi

Ova Kurbağası'nın dişi ve erkek bireylerinin barsak ve kemik iliğinden hazırlanan preparatlarda barsakta 248 ve kemik iliğinde 525 adet metafaz plağı sayılmıştır. Metafaz sıklığının kemik iliğinde daha fazla olduğu bulunmuştur. Metafaz plaklarında sayılan kromozom sayısı barsakta % 4.8 oranında $2n=22$, % 19.0 oranında $2n=44$, % 72 oranında $2n=26$ ve % 4.2 oranında $2n=28$ (Tablo 4.1), kemik iliğinde ise % 1.5 oranında $2n=22$, % 9.3 oranında $2n=24$, % 87.4 oranında $2n=26$ ve % 1.8 oranında $2n=28$ (Tablo 4.2) olarak tespit edilmiştir. En çok tekrar eden değerin hem barsakta hem de kemik iliğinde $2n=26$ olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 4.1. *Pelophylax ridibundus*'un barsak dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi

Preparat No	Metafaz sayısı	$2n=22$	$2n=24$	$2n=26$	$2n=28$
RB1	25	1	4	18	2
RB2	36	2	9	22	3
RB3	38	1	8	27	2
RB4	95	5	15	72	3
RB5	54	3	11	40	-
Toplam	248	12	47	179	10
%		4.8	19.0	72.0	4.2

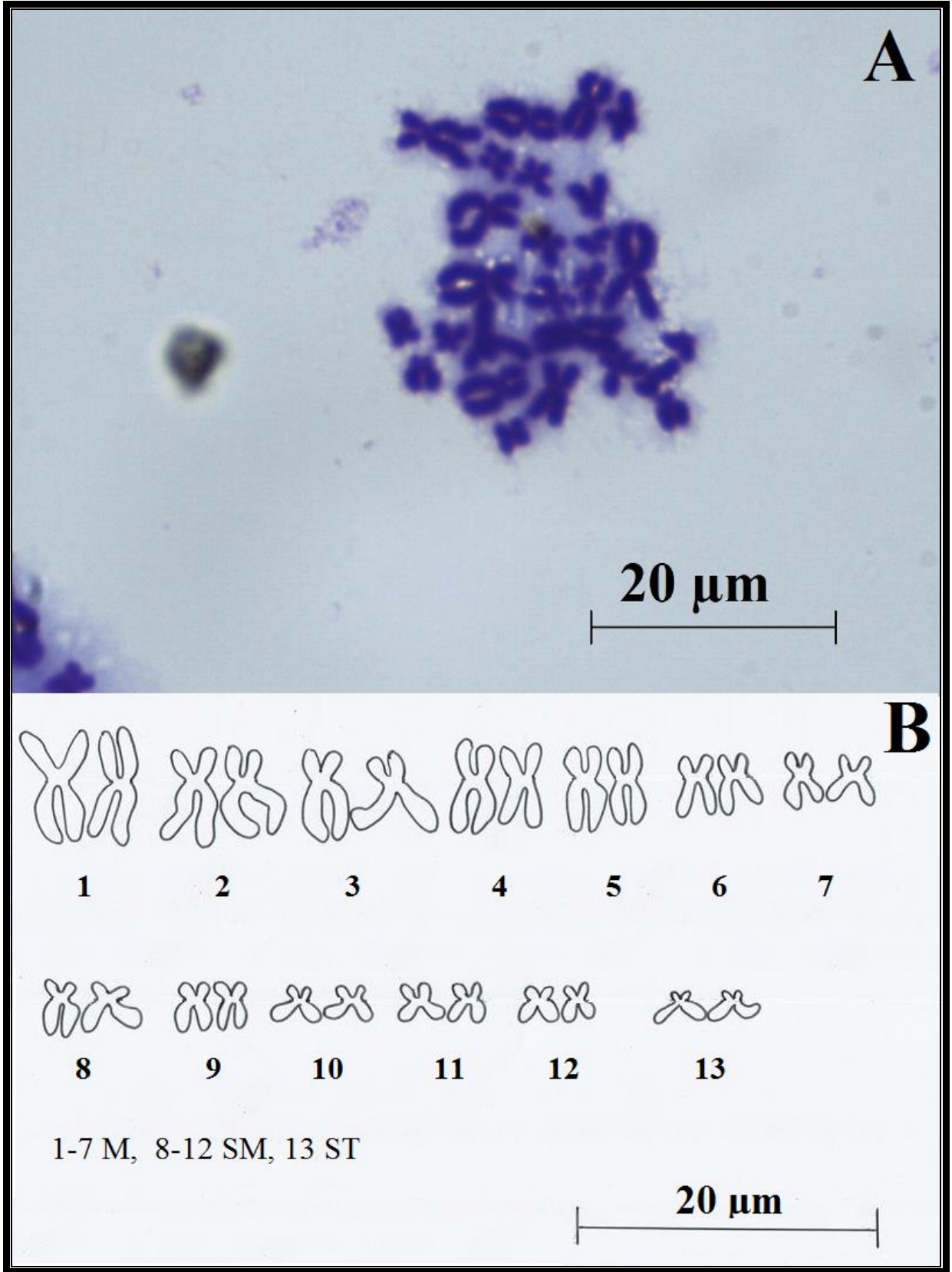
RB: “*ridibunda* barsak” kelimelerinin baş harfidir.

Tablo 4.2. *Pelophylax ridibundus*'un kemik iliği dokusundaki kromozom sayısının sıklık analizi.

Preparat No	Metafaz sayısı	$2n=22$	$2n=24$	$2n=26$	$2n=28$
RK1	85	1	8	74	2
RK2	100	2	12	85	1
RK3	65	1	4	60	-
RK4	95	1	11	82	1
RK5	180	3	14	158	5
Toplam	525	8	49	459	9
%		1.5	9.3	87.4	1.8

RK: “*ridibunda* kemik iliği” kelimelerinin baş harfidir.

İncelenen 773 metafaz plağından en iyi görünen ve en iyi dağılım gösterenlerden hazırlanan karyogramda kromozomlardan 7 çiftinin metasentrik (M), 5 çiftinin submetasentrik (SM) ve 1 çiftinin de subtelosentrik (ST)) olduğu belirlenmiş ve karyotip $14M+10SM+2ST$ olarak düzenlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Pelophylax ridibundus*'un giemsa ile boyanmış (G bantlama) metafaz plağı (A) ve karyotipi (B). Metasentrik (M), submetasentrik (SM) ve subtelosentrik (ST) kromozomlar gruplandırılmıştır (14M+10SM+2ST).

Kromozom kol uzunluklarının 2.16 ile 9.45 µm arasında değiştiği, en uzun kromozomun metasentrik, en kısanın da subtelosentrik olduğu, kromozom kol sayısının (Fundamental Arm Number:FN) ise FN=52 olduğu bulunmuştur (Tablo 4.3).

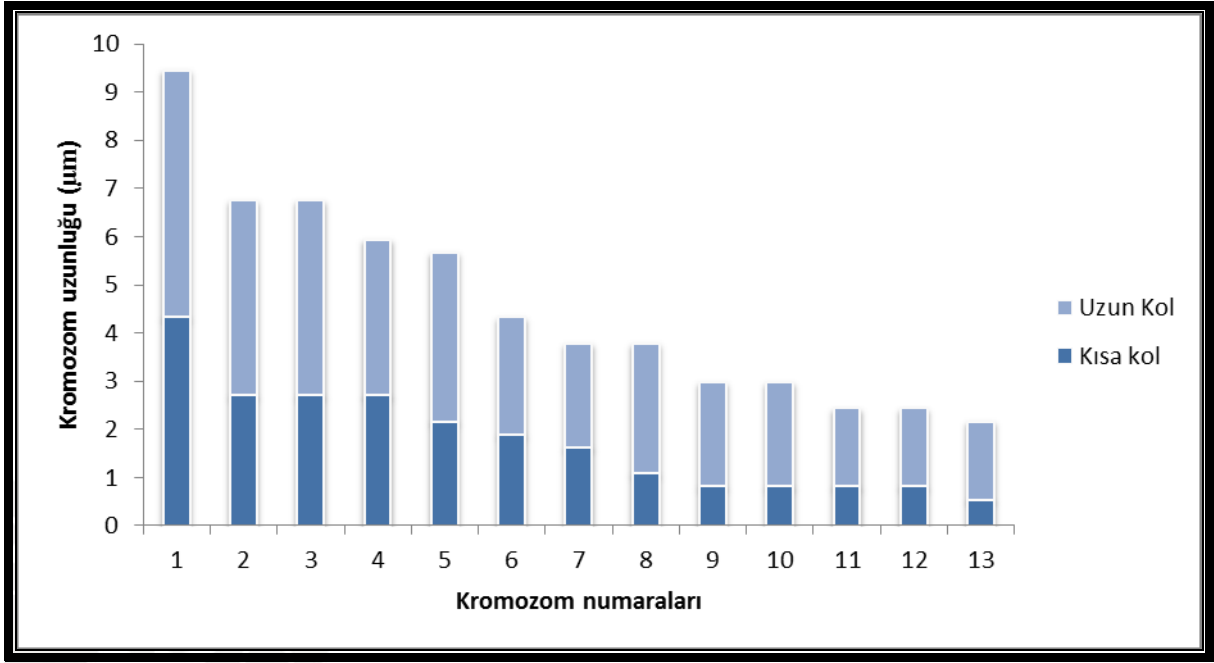
Tablo 4.3. *Pelophylax ridibundus*'un kromozomlarının ölçümleri (µm olarak) ve sentromerik endeksleri

Kromozom numarası	Kısa kol	Uzun kol	Toplam uzunluk	Kol oranı	Sentromerik indeks	Nisbi uzunluğu (%)	kol formu	Kromozom Kol sayısı
1	4.32	5.13	9.45	1.19	45.7	15.9	M	4
2	2.7	4.05	6.75	1.5	40.0	11.4	M	4
3	2.7	4.05	6.75	1.5	40.0	11.4	M	4
4	2.7	3.24	5.94	1.2	45.5	20.2	M	4
5	2.16	3.51	5.67	1.6	38.1	9.5	M	4
6	1.89	2.43	4.32	1.3	43.7	7.3	M	4
7	1.62	2.16	3.78	1.3	42.9	6.4	M	4
8	1.08	2.7	3.78	2.5	28.6	6.4	SM	4
9	0.81	2.16	2.97	2.7	27.2	5.0	SM	4
10	0.81	2.16	2.97	2.7	27.2	5.0	SM	4
11	0.81	1.62	2.43	2.0	33.3	4.1	SM	4
12	0.81	1.62	2.43	2.0	33.3	4.1	SM	4
13	0.54	1.62	2.16	3	25.0	3.6	ST	4
Total			59.4				13	52

*M: metasentrik, SM: submetasentrik, ST: subtelosentrik, T: telosentrik

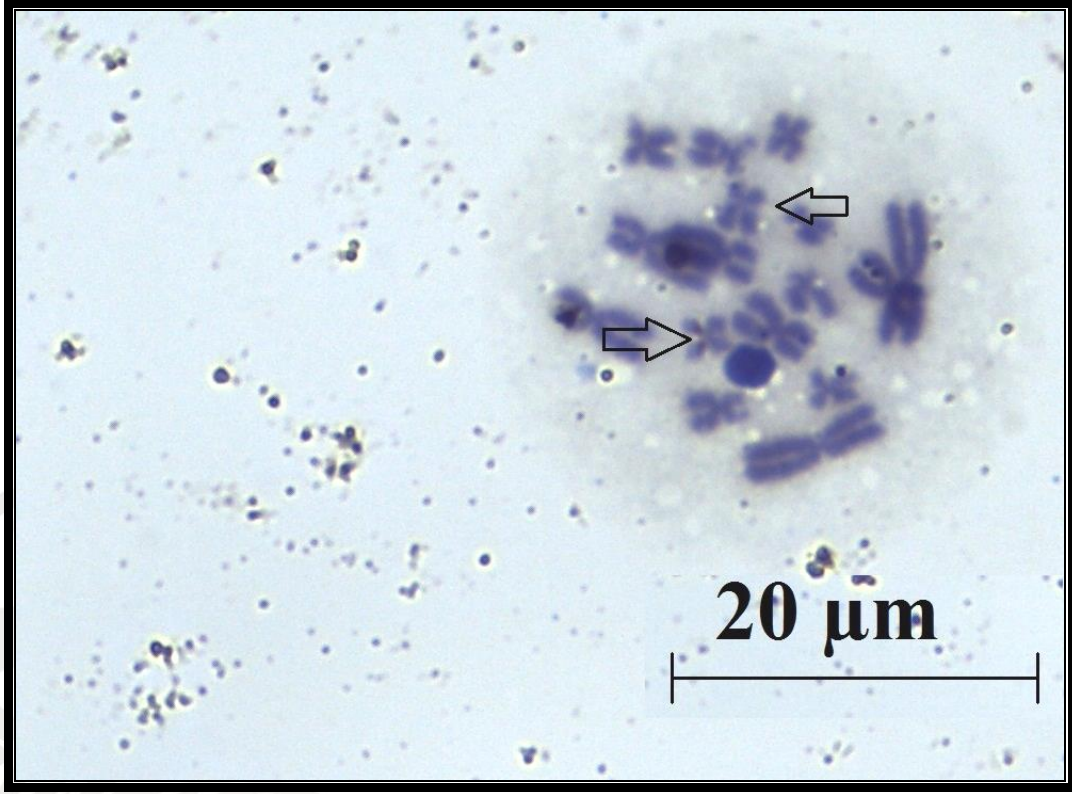
Bu ölçümlere göre hazırlanan idiyogram Şekil 4.2'de gösterilmiştir. 1. 2. 3. 4. 5. 6. ve 7. kromozom çiftleri metasentrik (14M), 8. 9. 10. 11. ve 12. kromozom çiftleri submetasentrik (10SM), 13. kromozom çifti de subtelosentrik (2ST) olarak sırayla gruplandırılmıştır. Bu türde cinsiyete bağlı herhangi bir kromozom tespit edilememiştir. Simetri/asimetri indeksi ise $S/A_I = (1 \times 14) + (2 \times 10) + (3 \times 2) / 26 = 1.53$ olarak tespit edilmiş olup *Pelophylax ridibundus*'un karyotipinin “simetrik” olduğu anlaşılmıştır.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

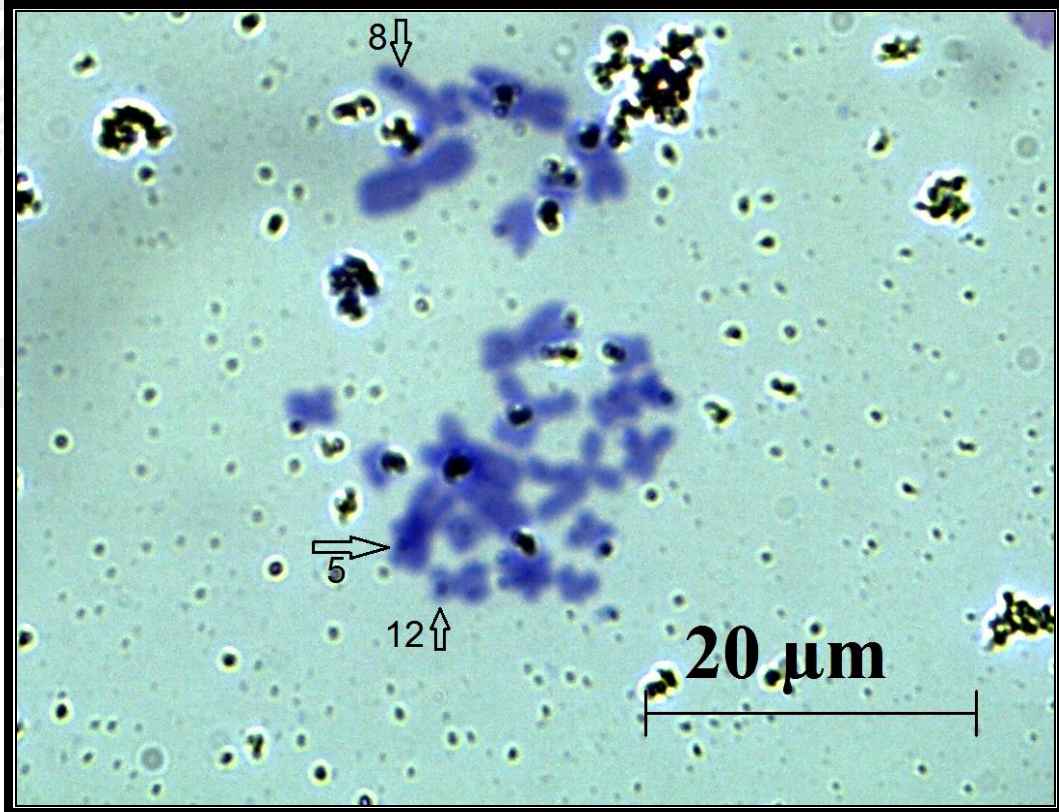


Şekil 4.2. *Pelophylax ridibundus*'un idiyogramı.

Giemsa boyama gibi rutin boyama yöntemleri karyotip hakkında genel bilgi sağlar. Ancak C ve NOR bantlama gibi diğer bantlama yöntemleri ile daha ayrıntılı bilgiler edinilebilmektedir. Bu nedenle *Pelophylax ridibundus*'un karyolojik özelliklerini incelemek amacıyla Giemsa bantlama yönteminden başka gümüş nitrat boyama (Ag-NOR) ve C-Bantlama yöntemlerinden de yararlanılmıştır. Ag-NOR boyama kromozomlardaki nüklear organizatör bölgeleri (NOR) boyar ve gösterir. Yapılan boyama ile *Pelophylax ridibundus*'un NOR bölgesinin 10. kromozom çiftinin uzun kolu üzerinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3). Bir diğer boyama ise C-Bantlama tekniğidir. Bu yöntemle kromozomlardaki yoğun tekrar eden ve ifade edilmeyen DNA bölgeleri belirlenebilmektedir. Yapılan boyama ile *Pelophylax ridibundus*'un konstitütif heterokormatinler 5. ve 8. kromozom çiftlerinin uzun kolunun uç kısımlarında, 12. kromozom çiftinin kısa kolunun uç kısmında lokalize olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *Pelophylax ridibudus*'da NOR bölgelerini gösteren gümüş nitrat boyalı metafaz plağı. Oklar 10. kromozom çiftini göstermektedir.



Şekil 4.4. *P. ridibudus*'da konstitütif heterokromatin kısımlarını gösteren C-bantlama yapılmış metafaz plağı. Oklar ilgili kromozomlardaki (5, 8 ve 12. kromozomlar) heterokromatin noktalarını göstermektedir.

4.3. *Pelophylax ridibundus*'da Genotoksik Analiz

Araştırma kapsamında özellikle tarımsal faaliyetler dikkate alınarak Karasu Havzası içinde belirlenen bölgelerden yaz başı ve hasat sonrası iki farklı zamanda *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalar genotoksik açıdan incelenmişlerdir. Yakalanan kurbağaların boyutlarının aynı olmasına dikkat edilmiştir. Nitekim Haziran 2016'te yakalanan kurbağaların ortalama ağırlıkları 74.16 g ve burun ucundan kloak kenarı arası ortalama uzunlukları (SVL) 10.4 cm, Ekim 2016'te yakalanan kurbağaların ortalama ağırlıkları 85.37 g ve burun ucundan kloak kenarı arası ortalama uzunlukları 10.37 cm olarak ölçülmüştür.

Dereboğazı I (Kontrol), Dereboğazı II (Sunı gübre alanı) ve Söğütlü Köyü (Pestisit alanı) bölgelerinden yakalanan kurbağaların eritrositik çekirdek anormallikleri (EÇA) frekansları Tablo 4.4'de verilmiştir. Mukayese istasyonlar arasında yapıldığında Dereboğazı I (Kontrol) kurbağalarında EÇA frekansı düşük gözlenmiştir. EÇA frekansı Dereboğazı II (Sunı gübre alanı) kurbağalarında biraz artmış, ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. EÇA'ya bağlı genotoksitenin Söğütlü Köyü (Pestisit alanı) kurbağalarında ise önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

Mevsimsel olarak karşılaştırıldığında ise Söğütlü Köyü'nden haziran ayında yakalanan kurbağalardaki genotoksitenin ekimde yakalananlara göre biraz daha fazla olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni yaz başında uygulanan pestisite maruz kalma olarak gösterilebilir (Tablo 4.5). Uygulanan pestisitlerin zamanla parçalanması ve etkisinin azalması da ekim ayındaki azalan genotoksiteden anlaşılabilir.

Tablo 4.4. Seçili lokalitelerinden yakalanan *Pelopylax ridibundus* kurbağaların periferik eritrositlerindeki çekirdek anormallikleri ve frekansları (ort $\pm$ SH).

Çekirdek anormalliği	Dereboğazı I	Dereboğazı II	Söğütlü
Çentikli çekirdek (Ç)	0.05 $\pm$ 0.01	2.01 $\pm$ 0.90	6.40 $\pm$ 1.20
Loplu çekirdek (L)	0.02 $\pm$ 0.00	0.6 $\pm$ 0.40	1.90 $\pm$ 0.70
Böbrek şekilli çekirdek (BŞ)	0.02 $\pm$ 0.00	0.9 $\pm$ 0.02	1.70 $\pm$ 0.40
Toplam (Ç+L+BŞ)	0.09 $\pm$ 0.01	3.51 $\pm$ 0.00*	10.0 $\pm$ 3.50*

* p<0.05 seviyesinde istasyonlar arasındaki istatistiki olarak farklılığı gösterir.

Tablo 4.5. Söğütlü Köyü’nden yakalanan kurbağaların genotoksisitesinin mevsimsel değişimi.

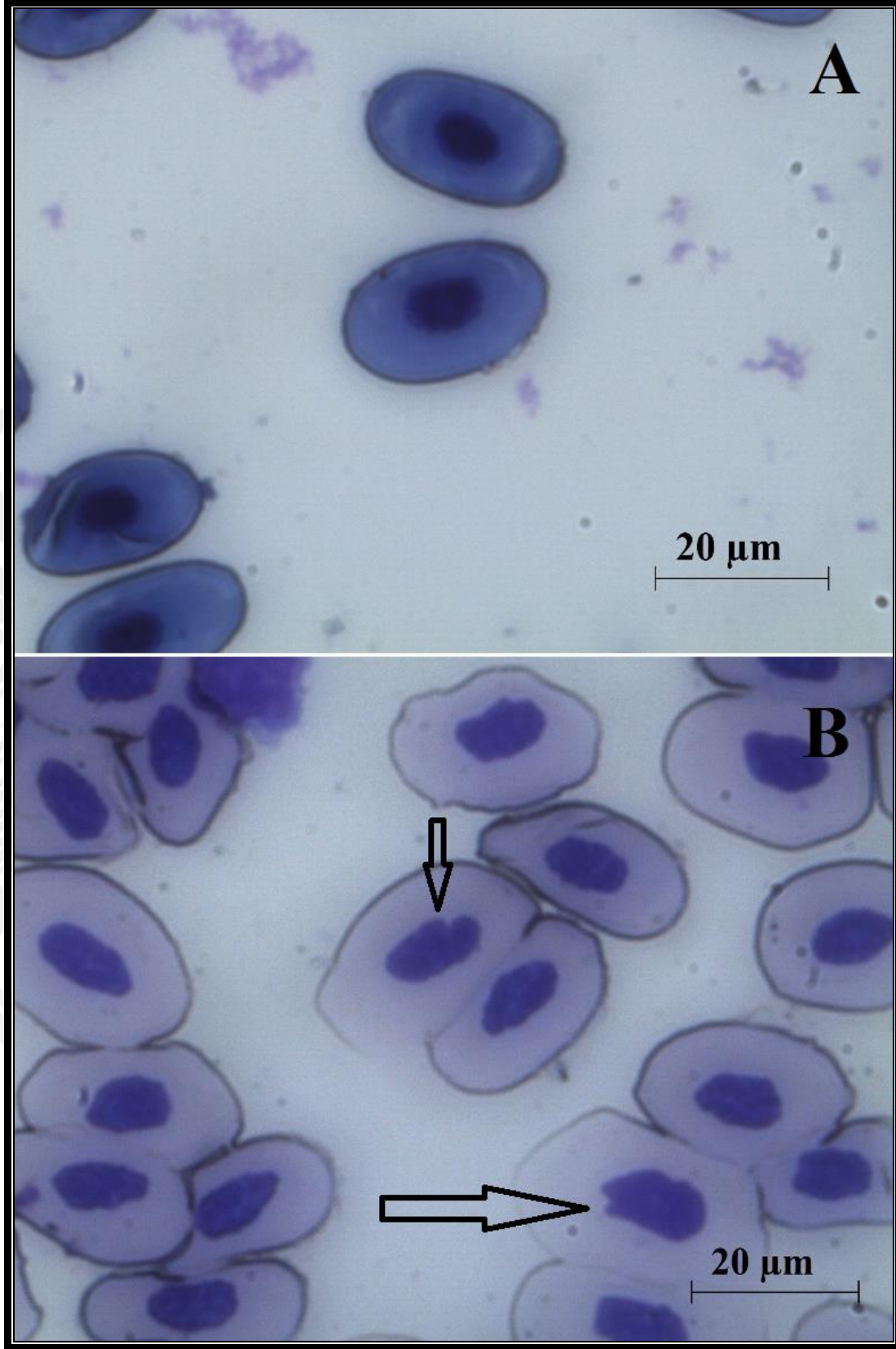
Periferal Eritrosit	Haziran 2016	Ekim 2016
Toplam eritrositik çekirdek anormalliği (EÇA) frekansı*	13.0	11.2

*Sayılar % olarak frekansı göstermekle birlikte her bir kurbağadan hazırlanmış 5’er preparat üzerinden elde edilmiştir.

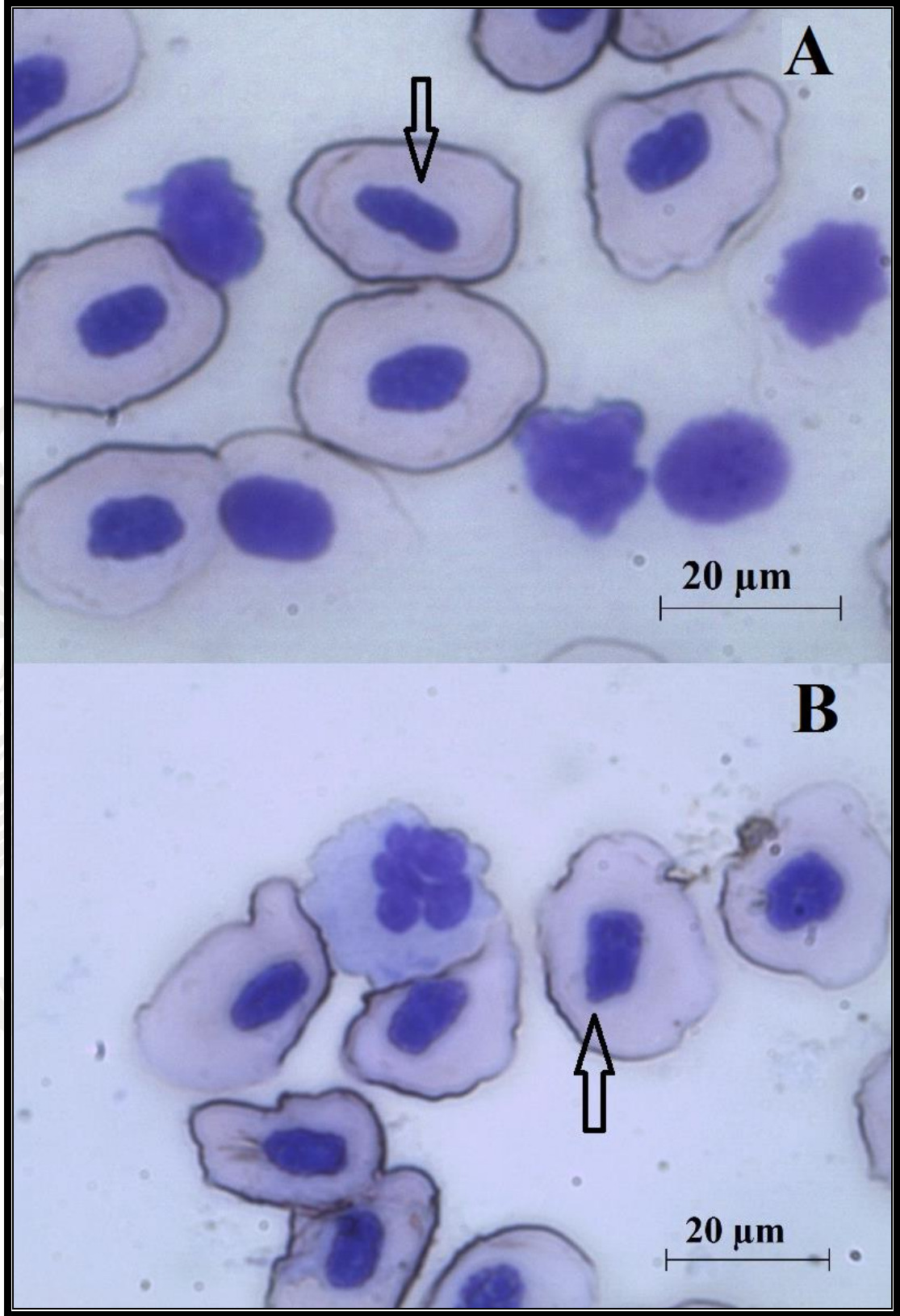
Genotoksik açıdan kurbağalar incelendiğinde en çok tespit edilen çekirdek anormalliğinin çentikli çekirdek (Şekil 4.5B) olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırayla loplu çekirdek (Şekil 4.6B) ve böbrek şekilli çekirdek (Şekil 4.6A) izlemiştir.



ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ



Şekil 4.5. *Pelophylax ridibudus*'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri. A) Normal çekirdekli eritrosit. B) Çentikli çekirdekli eritrosit (oklar)



Şekil 4.6. *Pelophylax ridibudus*'un eritrositlerinde tespit edilen çekirdek anormallikleri. A) Böbrek şeklinde çekirdekli eritrosit (ok). B) Loplü çekirdekli eritrosit (ok).

Tüm bu bulgulardan elde edilen sonuçlar şöyle özetlenebilir:

1- *Pelophylax ridibudus*'un karyotipi $2n=26$, $14M+10SM+2ST$, $FN=52$ olarak tespit edilmiştir.

2- NOR bölgesi 10. kromozomun uzun kolu üzerindedir ve konstitütif heterokromatin 5. ve 8. kromozomların uzun, 12. kromozomun kısa kolu üzerinde olup c-pozitif bölgeler kromozomların telomerlerinde bulunmuştur.

3- Kurbağaların karyolojisi dokular, eşeyler ve istasyonlar arası değişiklik göstermemiştir.

4- Yakalanan tüm kurbağalarda genotoksik hasar tespit edilmiştir.

5- Genotoksik hasar tarım ilacı kullanılan alan olan Söğütlü Köyü kurbağalarında diğer bölge kurbağalarına göre fazla bulunmuştur. Suni gübre kullanım sahasında ise bu oran düşmüştür. Kontrol bölgesi kurbağalarında ise EÇA'ya oldukça seyrek rastlanmıştır.

6- Genotoksik hasarın Haziran ayında Ekim ayına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni yaz başında uygulanan pestisit ve suni gübreyle maruz kalma olarak gösterilebilir.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

1800'lerde buharlı makinelerin icadıyla başlayan çevresel kirlilik her geçen gün artmaktadır. Doğal olmayan her madde ekosisteme girdikçe mevcut organizmaların tamamı etkilenmektedir. 1950 ve sonrasında insan kendini de bu ekosistem içinde bulmuş ve doğanın kaynaklarının sınırsız olmadığını anlayarak yine kendi eliyle kirletmiş olduğu dünyasını temizlemeye, korumaya hatta kurtarmaya başlamıştır. Ancak bir yandan tedbirler alırken bir yandan da sentetik madde üretimine devam etmiştir. Tamda bu noktada iki problem karşısına çıkmıştır. Ne kadar kirletiyoruz ve bu kirlilikten kimler etkileniyor? İster bitki olsun ister hayvan olsun soruların cevabı tüm canlıları ilgilendiriyor. Özellikle hayvanlar kirlilikten etkilenmekle birlikte bu kirliliği besin zincirine dahil etmeleri noktasında oldukça önemli olabiliyorlar. Amfibiler dediğimiz iki yaşamlılar hem suda hem de karada yaşadıklarından çevresel felaketlerden daha çok etkilenmektedirler. Dolayısıyla genetik yapılarında da geçici veya kalıcı hasarlar olabilmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda bulunduğumuz bölgenin en yaygın amfibi türü olan *Pelophylax ridibundus* kurbağaları seçilmiştir. Öncelikle karyotipinin çıkarılması hedeflenen bu kurbağaların yakın akraba populasyonlardan temelde aynı olmasına rağmen bazı farklılıklara sahip olduğunu tespit edilmiştir. Ayrıca bu kurbağaların tarımsal faaliyetlerden etkilenip etkilenmedikleri de genotoksik analizler uygulanarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu bölümde ilgili türün önce karyotipi, sonrada ekotoksikolojik mukayesesi yapılacaktır.

Bugüne kadar *Rana* ve *Pelophylax* cinslerinin yaklaşık 300 türünden daha fazlası için karyotip çalışmaları yapılmıştır. Bu türler için kromozom sayısının $2n=26$ olup (bazılarında 22 veya 24) kromozom tipleri metasentrik, submetasentrik ve subtelosentrik olarak tespit edilmiştir (Martirosyan and Stepanyan, 2009). Proje kapsamında Karasu Havzası'nın tarım yapılan alanlarından yakalanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda yapılan karyotip analizi Doğu Anadolu Bölgesi için ilk olma özelliğindedir. Bu bağlamda ilgili türün kromozom sayısının $2n=26$ olduğu ve kromozm tiplerinin de metasentrik, submetasentrik ve subtelosentrik morfolojisinde olduğu bulunmuştur. Çalışılan türün dişi ve erkek bireylerinde ise herhangi bir eşey kromozomuna rastlanmamıştır. Karyotip 3 farklı metoda göre hazırlanmıştır. Giemsa boyama, C-Bantlama ve Ag-NOR boyama. Araştırmamız neticesinde *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda 7 metasentrik, 5 submetasentrik ve 1 subtelosentrik kromozom çifti olduğu belirlenmiştir ($14M+10SM+2ST$). Kol sayısı $FN=52$ olarak tespit

edilmiş ve Ag-NOR pozisyonunun 10. kromozom çiftinin uzun kolunda olduğu bulunmuştur. C-bantlama ile yapılan karyotiplerde ise C-pozitif heterokromatin bantlarının 5. 8. ve 12. kromozomların telomerlerinde olduğu görülmüştür. Karyotip simetri/asimetri indeksi de 1.53 olarak hesaplanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mukayesenin daha kolay yapılabilmesi için aşağıdaki tablo oluşturulmuştur (Tablo 5.1)

Tablo 5.1. *Pelophylax ridibundus*'un karyotipik özellikleri (q: uzun kol, p: kısa kol)

Populasyon yeri	2n	Eşey kromozomu	c-bant	NOR	Karyotip formülü	Simetri/asimetri indeksi	Kaynak
Karasu havzası Erzurum	26	-	5q, 8q, 12p	10q	14M+10SM+2ST	1.53-simetrik	Bu proje
Mersin Göksu	26	-	-	-	14M+10SM+2ST	1.53-simetrik	Ergene ve ark. 2010
Ermenistan	26	-	2q, 5p, 9q, 10q, 12p	10q	10M+12SM+4ST	1.76-simetrik	Martirosyan and Stepanyan, 2009
İzmir (I)- Beyşehir (II)	26	XX, XY	-	10q 9q	I-16M+4SM+6ST II-15M+5SM+6ST [♀] 14M+8SM+4ST [♂]	1.61 1.65, 1.61-simetrik	Alapagut ve Falakali, 1995
Suudi Arabistan	26	XX, XY	-	10q	14m+12sm	1.46- simetrik	Al-Shehri, Al-Salech, 2005
Makedonya	26	XX, XY	3p	10q	8m+14sm+4st	1.84- simetrik	Spasic-Boskovic et al. 1999
Orta Avrupa	26	-	(1,2p,3q 4i,5i,7p, 9p,10qi, 11p) .(4qi,5p, 8qi,13q)	10q	10m+16sm	1.61- simetrik	Schmid, 1978
Gürcistan	26	-	-	10q	10m+16sm	1.61- simetrik	Ivanov, Madjanov, 1973
Rusya	26	-	-	9q	10m+12sm +4st	1.76- simetrik	Kaybeleva et al., 2004
Ukrayna		-	-	9q	8m+14sm+4st	1.84- simetrik	Suryadnaya, 2003
Çin	26	-	-	-	14m+12sm	1.46- simetrik	Gang Wei et al., 1992

Yukarıdaki tablo incelendiğinde *Pelophylax ridibundus*'un Çin'den Orta Avrupa'ya kadar en önemli ortak noktası kromozom sayısının $2n=26$ olması ve kromozom simetri/asimetri değerinin 1.46-1.84 arasında olup "simetrik" kromozom yapısına sahip oluşudur. Ancak kromozom yapısında bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar da genellikle metasentrik ve submetasentrik kromozomlardan ve özellikle 6 ve 13. kromozom çiftlerinden kaynaklanmaktadır. Karasu Havzası, İzmir, Ermenistan, Suudi Arabistan, Ukrayna, Rusya, Avrupa ve Çin popülasyonlarının kromozom sayıları aynı olduğu, ilk 5 çift kromozomun metasentrik, ikinci 5 çiftin submetasentrik ve sonuncu çiftin de subtelosentrik olduğu görülmüştür (Tablo 5.1). Sentromerik indeks bakımından Erzurum kurbağalarındaki subtelosentrik kromozom değeri 25.0 iken Ermenistan popülasyonunda da bu değer 25.0, Suudi Arabistan ve Avrupa kurbağalarında bu değer 21.9-24.7 arasında değişmektedir. Bu benzerlik bize en yakın coğrafya olan Ermenistan popülasyonu ile Karasu havzası popülasyonlarının birbirine daha yakın olduklarını göstermektedir. Literatüre göre C-heterokromatin Ranidae familyasının birçok türünde kromozomun sentromerinde yoğunlaşmıştır (Schmid, 1978; Miura 1995). *Pelohylax ridibundus*'da telomerik bantlar 3. ve 5. kromozom çiftlerinin kısa kolu üzerinde tespit edilmiştir (Heppich, 1978). Ermenistan kurbağalarında C-pozitif heterokromatin bölgeleri 2q, 5p, 9q, 10q, 12p olup Karasu Havzası kurbağalarında C-pozitif heterokromatin bölgeleri 5q, 8q, 12p kromozomlarında bulunmaktadır. Buradaki benzerlik 5 ve 12. kromozomlarda görülmektedir. Ag-NOR boyamalardan elde edilen sonuçlar mukayese edildiğinde 10q kromozomunda olan NOR bölgesi hem Karasu Havzası kurbağalarında hem de Ermenistan, Suudi Arabistan, Makedonya, Orta Avrupa ve Gürcistan kurbağalarında da tespit edilmiştir.

P. ridibundus'un Türkiye'deki popülasyonları ile ilgili 2 önemli çalışma yapılmıştır. Bunlardan ilkinde Alpagut and Falakalı (1995) yapmış oldukları karyotip çalışmasında İzmir ve Beyşehir kurbağalarını karşılaştırdıklarında kromozom sayısının aynı olduğunu ancak karyotipin farklı olduğunu bulmuşlardır. İzmir popülasyonunun karyotipi $16M+4SM+6ST$ olup eşeyler arasında bir farklılık yokken Beyşehir popülasyonunda dişiler $15M+5SM+6ST$, erkekler $14M+8SM+4ST$ karyotipli olarak tespit edilmiştir. Ancak kromozom simetri/asimetri durumlarının neredeyse aynı olduğu görülmektedir (Tablo 5.1). Karasu Havzası kurbağalarının karyotipleri metasentrik kromozom bakımından bu kurbağalarla benzerlik göstermektedir. Diğer çalışmada ise güney batı Anadolu'da yayılış gösteren 91 adet kurbağada mitotik ve mayotik kromozom analizi yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda İzmir,

Bulca, Pazarağaç bölgesinden yakalanan kurbağaların kuzey bölgedeki *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarla aynı olduğu, ancak Göller Bölgesi'nden yakalanan kurbağaların Balkan türleri olan *Rana epeirotica* ve *Rana shqipericica*'ya karyolojik olarak daha çok benzediği sonucuna varılmıştır (Alpagut and Falakalı, 2006). Bu iki çalışma gösteriyor ki aynı coğrafyada yaşayan kurbağalar da bile türleşme noktasında farklılıklar olabilir ve bu farklılıklar karyolojik olara da ortaya konabilmektedir. Yukarıdaki kurbağanın karyotipi ile ilgili ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada, Ergene vd. (2010) Mersin bölgesinde yakalanan *P. ridibundus* örneklerinde kromozom sayısının $2n=26$ olduğunu, kromozomlarının 14 metasentrik, 10 submetasentrik, 2 akrosentrik olduğunu belirlemişlerdir. Bu değerler Karasu Havzası kurbağalarının karyotipleri ile tamamen örtüşmektedir. Ranidae familyasına dahil türlerde diploid kromozom sayısı genelde 26 olmasına karşın kromozom sayısı 14-30 arasında değiştiği bildirilmiştir (Keskin, 2000). Arslan vd. (2010) ise Konya ili Meram, Beyşehir, Hadim lokalitelerinden toplanan 9 *Pelophylax ridibundus* örneğinde karyotipin 14 metasentrik ve 12 submetasentrik (14M+12SM) kromozomdan oluştuğunu, diploid kromozom sayısının da $2n=26$ ve kol sayısının FN=52 olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada bu türün kromozomlarının tamamının sentromerik konstitütif heterokromatine sahip olduğu ve Ag-NOR boyama tekniği ile 8 nolu submetasentrik kromozomun uzun kolu üzerinde nükleolar organizatör bölge (ikincil boğum) olduğu da tespit edilmiştir.

Pelophylax ridibundus'un karyotipi ile ilgili ülkemiz dışında yapılan çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiştir. *Rana* cinsinin çeşitli tür ve alttürlerine ait farklı populasyonlarda karyotipik farklılıkların olduğu daha önce yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Birstein, 1984; Green, 1985; Napoli et al., 2009). *Rana ridibunda* ve *Rana esculenta* türlerinin sitogenetik olarak incelendiği bir çalışmada Moldovya'nın kuzeyinden toplanan bu iki türün de $2n=26$ kromozoma sahip olduğu belirtilmiştir. Her iki türün kromozomlarının boyutlarına göre yapılan iki gruplu değerlendirmede ise ilk grubun 1-5 numaralı büyük kromozom çiftinden, ikinci grubun ise 6-13 numaralı küçük kromozom çiftlerinden oluştuğu rapor edilmiştir (Mindrescu ve Ghiorghita, 2008). Paleartik zoocoğrafik bölge sınırlarında kalan Ermenistan'ın 9 farklı lokalitesinden toplaana *Pelophylax ridibundus* örnekleri üzerinde yapılan karyolojik inceleme sonucunda bu türün diploid kromozom sayısının $2n=26$ olduğu tespit edilmiştir. Bu türde karyotipin 10 metasentrik, 12 submetasentrik ve 4 subtelosentrik kromozomdan oluştuğunu, 10. kromozom çiftinde ikincil boğum bulunduğunu; 2. ve 10. kromozom çiftlerinin uzun kollarında, 9. kromozom çiftinin uzun kolunun telomerik

bölgesinde ve 5. kromozom çiftinin kısa kolunda C heterokromatin bölgelerin bulunduğu da belirtilmiştir (Martirosyan ve Stepanyan 2009). Karasu Havzası kurbağalarının karyotipi Ermenistan popülasyonuna da benzerlik göstermektedir.

Günümüzde teknolojinin ilerlemesine paralel olarak çevreye bırakılan ağır metal iyonu miktarının ve çeşidinin artması, tarımda zirai ilaçlama faaliyetlerinin ve suni gübre kullanımının çoğalması, gıda tüketimindeki artışla birlikte suni üretim artışına gidilmesi gibi bazı faktörleri de içine alan pek çok sebepten dolayı canlı çevrenin kirlenip, bozulduğu görülmektedir. Buradan yola çıkarak çalışmamızın ikinci kısmında Karasu Havzası içinde zirai tarımın yapıldığı, özellikle pestisit ve suni gübre kullanımının olduğu bölgelerde yaşayan ova kurbağalarının (*Pelophylax ridibundus*) bundan etkilenip etkilenmedikleri araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmada Karasu Havzası'nda belirlenen üç istasyondan (Dereboğazı I, II ve Söğütlü) yakalanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağalarda çevresel kirliliğinin etkileri genotoksik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla kurbağaların periferik kan eritrositlerinde çekirdek anormallikleri tespit edilmiştir. Söğütlü köyü kurbağalarında tespit edilen çekirdek anormalliğinin diğer istasyonlardan fazla bulunmuştur. Dereboğazı Köyü (II) istasyonunda ise Dereboğazı Köyü (I-Kontrol) istasyonuna kıyasla çekirdek anormallikleri frekansında biraz artışın olduğu gözlenmiştir. Karasu Havzası'ndaki tarımsal ve endüstriyel kaynaklı kirlenmenin doğal fauna ve florayı olumsuz yönde etkilediği yaptığımız bu çalışma ve diğer çalışmalarla net olarak gösterilmiştir. Örneğin Şişman et al. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada Karasu Havzası'nın tek akarsuyu olan Karasu Nehri ve civarında yaşayan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların sucul kirlilikten etkilenip etkilenmediğini aynı yöntemle araştırmışlar ve çimento fabrikası yakınlarında yaşayan bu kurbağalarda mikro çekirdek, böbrek şekilli çekirdek, çentikli çekirdek ve loplu çekirdek anormallikleri tespit etmişlerdir. Kirlenmiş bölge kurbağalarının kanlarında çekirdek anormalliği frekansı temiz bölge kurbağalarına göre önemli ölçüde arttığı tespit edilen genotoksitenin endüstriyel, tarımsal ve evsel aktivitelerle ilgili olabileceği kanaatine varmışlardır. Benzer sonuçlar Aymak (2010)'ın Mersin yöresi *Rana ridibunda* türü kurbağalarda da tespit edilmiştir. İlgili araştırmada çekirdek anormalliği frekansı özellikle ağır metal kirliliğinin olduğu yerde yaşayan kurbağalarda oldukça fazla bulunmuştur. Bir diğer çalışmada Vize Dağı (Kırklareli) ve Ida Dağı (Çanakkale) etrafından toplanan *Pelophylax ridibundus* türü kurbağaların eritrostilleri üzerine çekirdek anormallikleri araştırılmıştır. Sonuçta her iki alan kurbağalarında

da toplam çekirdek anormalliğinin oldukça fazla olduğu, özellikle Vize dağında mikro çekirdek frekansının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Gürkan et al., 2012).

Amfibi eritrositleri oldukça esnek hücrelerdir. Bu hücreler için mikro çekirdek testini ilk geliştiren kişi Jaylet et al. (1986)'dır. Buna göre kurbağanın periferal yayma kan preparatları hazırlanır ve her 1000 hücrede meydana gelen çekirdek anormallikleri sayılır. Bu test 1999 yılından itibaren amfibilerde genotoksik ajanların varlığını tespit etmek kullanılmaya başlamıştır (Zoll-Morreux and Ferrier, 1999). Mikroçekirdek ve diğer çekirdek anormallikleri özellikle sulardaki kirlenmenin bir derecesi olarak da kabul edilmiştir (Compana et al., 2003; Gauthier et al., 2004). Bu çalışmada da kullanılan yöntemle Karasu Havzası'nda tarım yapılan alanlardaki kurbağalarda çeşitli çekirdek anormallikleri tespit edilmiştir.

Ülkemizde özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki kurbağalarla ilgili karyotip ve kirlilik analizi için daha önceden yapılmış kapsamlı bir araştırma bulunmamaktadır. Karasu Havzası içinde tarım yapılan bölgelerden yapılan kurbağa örneklemeleri neticesinde tüm alanlardan yakalanan kurbağaların karyotipleri $14M+10SM+2ST$, $2n=26$ ve $FN=52$ olarak tespit edilmiştir. Kirlilik açısından yapılan değerlendirmede ise Söğütlü Köyü yerleşkesi kurbağalarında genotoksisitenin anlamlı bir şekilde arttığı, Dereboğazı II bölgesindeki kurbağalarında azaldığı ve Dereboğazı I kurbağalarındaki anormallik frekansının ise önemsiz olduğunun bulunması Söğütlü bölgesi kurbağalarının buradaki tarımda kullanılan pestisitlerden etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Kurbağaların özellikle pestisit uygulanmış tarlalardan seçildiğini hatırlarsak yorumu daha anlamlı ve net yapabiliriz. Dereboğazı II bölgesinde ise suni gübre kullanımına bağlı olarak kurbağalarda hafif bir genotoksisite artışının olduğunu düşünebiliriz. Dereboğazı I ise çevresel kirlilik etkilerinin neredeyse sıfır olduğu bir bölge olduğu için buradaki kurbağalarda anormallik durumların çok az olduğu bulunmuş, bu da mevsim, beslenme ve yaşa bağlı olarak ortaya çıkabilen hafif değişiklikler olarak değerlendirilmiştir. Mevcut kirliliğin burada yaşayan kurbağalar kadar aynı ortamdaki diğer canlıları da etkilediğini unutmamak gerekir. Keza besin zincirine karışan pestisit ve kalıntıları hem uygulandığı bitki ile hem de bu bölgenin otlaklarında yayılan mera hayvanları yolu ile insana kadar ulaşabileceği göz ardı edilmemelidir. Herhangi bir önlem alınmadığı takdirde yakın gelecekte tarımsal ve endüstriyel gelişmelere bağlı olarak Karasu Havzası'ndaki kirliliğin daha fazla artabileceği ve belki buradaki amfibi ve diğer omurgalılarda kalıcı hasarlara yol açabileceği de öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Alpagut, N., Falakalı, B. 1995. Karyotype analysis of two *Rana ridibunda* (Ranidae; Anura) populations in Turkey, Israel Journal of Zoology, 41 (4): 523-531.

Alpagut Keskin, N., Falakalı Mutař, B. 2006. Rod-Shaped Bivalents indicate new assemblage among Anatolian Water Frog Populations, Amphibia-Reptilia, 27 (1): 47-53.

Al-Sherhi A.H., Al-Salech A.A. 2005. Karyotype of amphibians in Saudia Arabia 1: The karyotype of *Rana ridibunda*. J. Biol. Sci. 5(3): 335-338.

Arslan, E., Arslan A., Gülbahçe, E. 2010. C-Banded Karyotype and Nucleolar Organizer Regions (NORs) of Marsh Frog, *Rana ridibunda* (Ranidae: Anura) in Central Anatolia. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 16 (Suppl-B): S369-S371.

Aymak C. 2010. Determination of heavy metal pollution and its genotoxic effects by using micronucleus test in *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Ranidae, Amphibia) living in Mersin. [PhD Thesis]. Mersin University. 88 p. [in Turkish].

Baran, İ., Atatür, M. 1997. Turkish Herpetofauna (Amphibian and Reptilian), Rep. of Turkey Ministry of Environment, 214 p.

Baran, İ. 2005. Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Pelin Matbaası, 165 s.

Birstein, V.J. 1984. Localization of NORs in Karyotype of four *Rana* species, Genetica, (64): 149-154.

Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian J Fish Aquatic Sci. 47(11):2123-2136.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*. 1968 Jan;49(1):219–222.

Compana A, Panzeri M, Moreno VJ, Dulout FN. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by Pyrethroid insecticide lambda-cytrathrin. *Gen Molecular Biol*. 26(1):99-103.

Çavaş, T. ve Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents”, *Aquatic Toxicology*, 74:264-271.

Çiçek, K., Mermer, A., Ayaz, D. 2011. Uludağ Milli Parkı’nda (Bursa/Türkiye) Yaşayan Kurbağalar, Dağılımları ve Korunmaları. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi* 2(2): 1-6.

Dobingy, G., Ducros, J. F., Robinson, T. J., Volobouev, V. 2004. Cytogenetics and cladistics. *Syts. Biol.*, 53 (3): 470-484.

Dubois, A., Ohler, A. 1994. Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, genus *Rana*): A catalogue of available and valid scientific names, with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities”, *Zool. Poloniae*, 39/3-4: 139-204.

Dubois, A. 1998. List of European species of amphibians and reptiles: will we soon be reaching "stability"? *Amphibia Reptilia*, 19: 1-28

Ergene S., Portakal E., Karahan A. 1999. Karyological analysis and body proportion of Catfish (Clariidae, *Clarias lazera*, Valenciennes. 1840) in Göksu Delta, Turkey. *Tr Journal of Zoology*, 23, 423-426.

Ergene Gözükara, S., Çavaş, T. 2002. Karyological Analysis of *Gobius paganellus* L., 1758 (Pisces:Gobiidae) in Mersin, Turkey, *Folia Biologica*, Vol.50,No:1-2,5-7.

Ergene S., Karahan A., Kuru M. 2010. Cytogenetic analysis of *Pseudophoxinus antalyae*, Boguskaya, 1992 (Pisces: Cyprinidae) from the Eastern Mediterranean River Basin, Turkey, Tr Journal of Zoology , 34, 111-117.

Eroğlu, H.E. 2015. Which chromosomes are subtelocentric or acrocentric? A new karyotype symmetry/asymmetry index. Caryologia, 68: 239-245.

Fenech, M. and Morley, A. A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research, 147: 29-36.

Gang Wei, Ning Xu, Dejun Li, Min Wu. 1992. Karyotypes of two *Rana* from Xinjiang, China // Asiatic Herpetological Res. 4: 141-145.

Gauthier L, Tardy E, Mouchet F. 2004. Biomonitoring of genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the river Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. Sci Total Environ. 323(1):47-61.

Gosden, R. 1994. Chromosome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 29 Humana Press Inc, Totowa, NJ.

Gürkan, M., Hayrettaş, S., Yakın, B.Y., Tok, C.V. 2012. A preliminary study on micronucleus analysis and nuclear anomalies in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Amphibia: Anura) specimens collected around Vize (Kırklareli) and Ida Mountains (Çanakkale, Turkey). Ege J Fish Aqua Sci. 29(3):133-136.

Green, D. M. 1985. Differentiation in amount of centromeric heterochromatin between subspecies of red legged frog, *Rana aorora*, Copeia, 4: 1071-1074.

Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., Salamon, M.F. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity", Mutation Res., 12: 61-118.

Heppich, S. 1978. Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. Z. Zool. Syst. Evolut. 16: 27-39.

Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., & Kuzmin, S. L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature, 404(6779), 752.

Ivanov V.G., Madyanov N.N. 1973. The comparative karyology of frogs of the genus *Rana* // *Tsitologia*. 16: 920-927 (In Russian).

Jaylet A, Deparis P, Grinfeld S, Siboulet R. 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the new *Plerodeles waltl* to detect mutagen in fresh-water pollution. Mutat Res. 164(4):245-257.

Kaybeleva E.I., Zavyalov E.V., Tabachaishin V.G. 2004. Ecologo-caryological peculiarities of the marsh frogs on the north of the Lower Volga region. Povolzskii Ecol. J. 3: 318-319. (In Russian).

Keskin, N. A. 2000. Güneybatı Anadolu *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura: Ranidae) Populasyonlarında Sitogenetik ve İzoenzimik Özelliklerin Karşılaştırmalı İncelenmesi”, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 95s.

Kılıç, D., Şişman, T. 2016. Karyotype analysis the European chub, *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758) from Karasu River-Erzurum, Turkey (Teleostei: Cyprinidae)” Caspian Journal of Environmental Sciences 14 (2): 95-103.

Klug, W.S. and Cummings, M.R. 2009. Genetik Kavramlar (Çeviri). Palme yayıncılık, 784 s.

Kuramoto M. 1990. A list of chromosome numbers of Anuran amphibians. Bull Fukuoka Univ Educ, 39, 83-127.

Kuru, M. 2004. Omurgalı Hayvanlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 841 s.

Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on

Chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.

Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthalou, G., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M. 2007. Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region, Molecular Phylogenetics and Evolution, 44: 115-125.

Martirosyan, A., Stepanyan, I. 2009. Features of the karyotypes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and *Rana macrocnemis* Boulengeri 1885 (Amphibia: Ranidae) from Armenia, Comparative Cytogenetics, 3(1): 11-24.

Mindrescui C.G., Ghiorghyk G. 2008. The preliminary cytogenetic investigations in *R. ridibunda* Pall. and *R. esculenta* L. from the north of Moldavia. Ann. Stcf. Univ. (Genet. Mol. Biol.). 9: 65-69.

Miura, I. 1995. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). Chromosoma. 103: 567-574.

Napoli, M. F., Ananias, F., Fonseca, P. M., & Silva, A. P. Z. (2009). Morphological and karyotypic contributions for a better taxonomic definition of the frog *Ischnocnema ramagii* (Boulenger, 1888)(Anura, Brachycephalidae). South American Journal of Herpetology, 4(2), 164-172.

Özeti, N., Yılmaz, İ. 1994. Türkiye Amfibileri, Ege Üniv. Basımevi, İzmir, 221 s.

Pollet, I. and Bendell-Young, L. I. 2000. Amphibians as indicators of wetland quality in wetlands formed from oil sands effluent. Environmental Toxicology and Chemistry, 19: 2589–2597.

Schmid, M. 1978. Chromosome banding in amphibian. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae // *Chromosoma*. 68: 131-148.

Sevindik, M. 2013. Türkiye Talpa Linneaus, 1758 (Mammalia: Soricomorpha) Türlerinin G Ve C Bantlama Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Sönmez, A.Y., 2011. Karasu Irmağında Ağır Metal Kirliliğinin Belirlenmesi ve Bulanık Mantıkla Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Sparling, D. W., Fellers, G. M., & McConnell, L. L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. Environmental Toxicology and Chemistry, 20(7), 1591-1595.

Spasic-Boskovic, O., Krizmanic, I., Vujosevic, M. 1999. Population composition and genetic variation of water frogs (Anura: Ranidae) from Yugoslavia, Caryologia, 52:1-2, 9-20,

Sumner, A.T. 2008. Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing, 275 s.

Suryadnaya N.N. 2003. The data on caryology of green frogs (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*, *R. esculenta*) from Ukraine // *Vestnik Zoologii*. 37(1): 33-40. (In Russian).

Şişman, T., Aşkın, H., Türkez, H., Özkan, H., İncekara, Ü., Çolak, S. 2015. Determination of Nuclear Abnormalities in Peripheral Erythrocytes of the Frog *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) sampled from Karasu River Basin (Turkey) for Pollution Impacts Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research 1(2): 75-81.

Şişman, T., Şanlı, F., Tepe, Y., Kılıç, D. 2016. Erzurum Karasu Nehri Balıklarından *Chalcalburnus mossulensis*'in (Heckel, 1843) Karyotip Özellikleri. Yunus Araştırma Bülteni. 16 (4): 281-291.

Uğurtaş, İ., Tunca, B., Aydemir, N., Bilaloğlu, R. 2001. A Cytogenetic Study of *Pelobates syriacus* (Amphibia, Anura) in Bursa-Turkey, Turk J. Zool, 25, 159-161. Yılmaz, İ. 2012. Taksonomik Zoolojinin Prensipleri ve Metodları. Sürat Üniversite yayınları, 245.

Zoll-Morreux, C., Ferrier, V. 1999. The Jaylet test and the micronucleus test on amphibian evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. Water Res. 33(10):2301-2314.



ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

EKLER

EK 1



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-132

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

26.09.2013

ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ Fen Fakültesi Dekanlığı	
Tarih :	26.09.2013
Kayıt No :	2482
Oran No :	71

İlgi : 11.09.2013 tarih ve 55885869/1132 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Turgay ŞİŞMAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Hayvan Fizyoloji ve Histolojisi Laboratuvarında ve Doku Kültürü ve Toksikoloji Laboratuvarında yürütülecek olan "Erzurum'daki Akarsu ve Sulak Alanlarda Yaşayan Balık ve Kurbağalar Üzerine Sistematik, Histolojik, Toksikolojik ve Sitogenetik Araştırmalar" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.09.2013 tarih ve 4 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 110 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Biyoloji Bölümü Başkanlığına
23 Eylül 2013

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

Toplantı Tarihi : 25.09.2013

Toplantı Sayısı : 4

KARAR NO : 110- Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı, Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Turgay ŞİŞMAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Hayvan Fizyoloji ve Histolojisi Laboratuvarında ve Doku Kültürü ve Toksikoloji Laboratuvarında yürütülecek olan "Erzurum'daki Akarsu ve Sulak Alanlarda Yaşayan Balık ve Kurbağalar Üzerine Sistematik, Histolojik, Toksikolojik ve Sitogenetik Araştırmalar" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Fen Fakültesi Dekanlığının 11.09.2013 tarih ve 55885869/1132 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 Fax : 0-442-236 08 81 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr



T.C.
ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



Sayı : 72784983-488.04-63471
Konu: Araştırma İzinleri

03.04.2013

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
Personel Daire Başkanlığı
25170 ERZURUM

İlgi : 21.03.2013 tarihli ve 6454 sayılı yazı

Üniversiteniz, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN'ın yürütücülüğünü yapacağı " Erzurum'daki Akarsu ve Sulak Alanlarda Yaşayan Balık ve Kurbağalar Üzerine Sistemik, Histolojik ve Sitogenetik Araştırmalar" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlere zarar vermeyecek şekilde yapılması,
 - Arazi çalışmalarının yapılacağı İlin Valiliğine İlçenin ise Kaymakamlığına bilgi verilmesi,
 - Yapılacak çalışmanın korunan alanlarda gerçekleşmesi halinde ilgili İl Şube Müdürlüğü tarafından görevlendirilecek bir mihmandar eşliğinde araziye çıkılmasının sağlanması,
 - Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
 - Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,
- koşuluyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgeleri ekte gönderilmektedir.

Gereğini rica ederim.

Sabri KIRIŞ
Büro Personeli

Sabri KIRIŞ
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı

EKLER :

1- 1 takım izin dosyası.

DAĞITIM :

Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü
XIII. Bölge Müdürlüğü

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır.
Evrak doğrulama adresi: <http://ebys.ormansu.gov.tr/Dogrulama.aspx?p=667708>

Adres : Söğütözü Cad. No:14/E Beştepe 06560 Yenimahalle -
ANKARA
Telefon :
e-posta : nbahce@cevreorman.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : N. BAHÇE Çevre Mühendisi
Fax :
Elektronik Ağ: www.ormansu.gov.tr



GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü

03.04.13 01406

Sayı : 67852565/140.03.03-863
Konu : Araştırma İzni

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
Personel Daire Başkanlığı
Tel: 0 (442) 231 16 00 Faks: 0 (442) 236 04 42

ERZURUM

İlgi: 21.03.2013 tarih ve 16710634/04-006455 sayılı yazı.

Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Turgay ŞİŞMAN'ın danışmanlığında yürütülecek olan "Erzurum'daki Akarsu ve Sulak Alanlarda Yaşayan Balık ve Kurbağalar Üzerine Sistematik, Histolojik, Toksikolojik ve Sitogenetik Araştırmalar" isimli projenin arazi çalışmaları için yasal izin talep eden ilgi yazı ve ekleri incelenmiştir.

Söz konusu proje kapsamında; Doç.Dr. Turgay ŞİŞMAN, Doç.Dr. Ümit İNCEKARA, Araş.Gör.Dr.Yahya TEPE, Doktora Öğrencileri Hatice DANE ve Şeymanur AYDIN, Yüksek Lisans Öğrencileri Derya KILIÇ, Harun KALKAN, Semra DUMAN ve Doğan ORHANER isimli araştırmacıların katılımlarıyla; 01 Mayıs 2013 – 30 Ekim 2018 tarihleri arasında, altı aylık periyotlarla (Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında) Erzurum il sınırları içerisinde kalan; Karasu Nehri, Çoruh Irmağı, Aras Irmağı, Tortum Çayı, Hınıs Çayı ve bu akarsuların kolları ile etrafında yer alan sulak alanlarda (her akarsuda üç -3- bölge olmak üzere toplam onbeş -15- istasyon) balık avlamak için, germe ağ, serpmeye ağ ve elektroşoker kullanılarak her istasyondan on -10- adet olmak üzere, onbeş -15- istasyondan toplam yüzelli -150- adet balık, kurbağa için ise 50 cm çapında plastik atraplar kullanılarak her istasyondan beş -5- adet olmak üzere, onbeş -15- istasyondan toplam yetmişbeş -75- adet kurbağa örnekleme yapılmasına;

Çalışmaların yapılacağı günlerin; çalışma bölgesinde bulunan Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü'ne önceden bildirilmesi, İl Müdürlüğünde görevli bir personelin proje çalışmalarına katılması, "3/1 ve 3/2 No'lu Su Ürünleri Avcılığı Düzenleyen Tebliğ"lerde belirtilen hükümlere riayet edilmesi, elde edilen su ürünlerinin hiçbir suretle satılmaması ve yurtdışına çıkartılmaması, çalışmalara yabancı araştırmacının katılmaması ve proje çalışma sonuçlarının Bakanlığımıza gönderilmesi şartlarına uyulması kaydı ile uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

(Signature)
Dr. Durali KOÇAK
Bakan a.
Genel Müdür

DAĞITIM:

Gereği:

- Erzurum Valiliğine (İl Müd.)
- Atatürk Üniversitesi
- Fen Fakültesi-Biyoloji Bölüm Başkanlığı

Bilgi:

- İçişleri Bakanlığı
- (Jandarma Genel Komutanlığı)

İ. Kişiler Yolu 9. km. B-Blok 06275 Lodumlu/ANKARA
Genel Ağ: www.tarim.gov.tr

Tel : 0(312) 287 33 60 / 3021
Faks: 0(312) 236 51 23

Bilgi için: Yok.Müh.M.İRCAN
e-posta: muhir.ircan@tarim.gov.tr