T.C
HAKKARİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Eirenis thospitis SCHMIDTLER & LANZA, 1990 (HAKKARİ YILANI)'İN mtDNA ve nuDNA GEN BÖLGELERİ İLE MOLEKÜLER OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Oğuzhan BALİ

Danışmanlar
Prof. Dr. Can YILMAZ
Prof. Dr. Aziz AVCI

Hakkari
Ağustos 2023

T.C.

HAKKARİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

HAKKARİ

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Oğuzhan BALİ tarafından hazırlanan **‘‘***Eirenis thospitis* **Schmidtler & Lanza, 1990 (Hakkari Yılanı)’in mtDNA ve nuDNA Gen Bölgeleri ile Moleküler Olarak Değerlendirilmesi’’** başlıklı tez, 24.08.2023 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. M. Sait TAYLAN	Hakkari Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Can YILMAZ	Hakkari Üniversitesi	
Üye :	Doç. Dr. Emin BOZKURT	Çankırı Karatekin Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu **yüksek lisans** tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ……Sayılı kararıyla ……. tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Enstitü Müdürü

T.C.

HAKKARİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

24/08/2023

Oğuzhan BALİ

ÖZET

Eirenis thospitis Schmidtler & Lanza, 1990 (Hakkari Yılanı)'in mtDNA ve nuDNA Gen Bölgeleri ile Moleküler Olarak Değerlendirilmesi

Oğuzhan BALİ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Danışmanlar
Prof. Dr. Can YILMAZ
Prof. Dr. Aziz AVCI

2023, 30s

Bu çalışmada, Cytb ve 16S rDNA mtDNA ve C mos nuDNA dizileri kullanılarak *Eirenis thospitis* Schmidtler & Lanza, 1990 (Hakkari Yılanı)'in taksonomik değerlendirilmesi için moleküler filogenisi çalışılmıştır. *Eirenis thospitis thospitis* ve *Eirenis thospitis hakkariensis* alttürlerinden 3'er birey toplamda 6 birey analiz edilmiştir. Bu bireyler ve Genbank'tan elde edilen 13 taksona ait diziler filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Genbank'tan elde edilen *Eirenis thospitis*'in alttürlerinin ve bu çalışmadaki alttürlerin toplam Cyt b + 16S rDNA + C mos gen bölgelerine ait dizilerinin hem Maksimum Likelihood (ML) hem de Bayesian Inference (BI) yaklaşımı filogenetik ağaçlarında farklılık olmadığı gözlenmiştir. Morfolojik farklılıklara dayanarak tür seviyesine çıkarılan *Eirenis hakkariensis*'in *Eirenis thospitis hakkariensis* Schmidtler & Eieslt 1991 alttürü olarak kalması daha doğru olacaktır. Kladogenetik olayların tarihlendirilmesi işlemleri sonucunda *Eirenis* cinsi türlerin 0.05 milyon yıl önce farklılaşmaya başladığı tespit edilmiştir. *Eirenis thospitis'*in ise 0.025 milyon yıl önce *Eirenis medus* (Chernov 1940)'tan ayrıldığı belirlenmiştir. Bu farklılaşmaya son buzul dönemlerinden biri olan Würm (12-110 bin yıl)'daki iklim değişimlerinin etkili olduğu ortaya konulmuştur. Morfoloji ve moleküler genetik verilerin birlikte değerlendirildiği integratif taksonomik yaklaşımların, taksonların güncel durumunu belirlemek için daha kullanışlı olacağı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Eirenis*, mtDNA, nuDNA, Moleküler filogeni

ABSTRACT

Molecular Evaluation of *Eirenis thospitis* Schmidtler & Lanza, 1990 (Hakkari Snake) with mtDNA and nuDNA Gene Regions

Oğuzhan BALİ

Master of Science Thesis, Biology

Supervisors

Prof. Dr. Can YILMAZ

Prof. Dr. Aziz AVCI

2023, 30p

In this study, the molecular phylogeny of *Eirenis thospitis* (Hakkari Snake) was studied for taxonomic evaluation using Cyt b and 16S rDNA mtDNA and C mos nuDNA sequences. A total of 6 individuals, 3 *Eirenis thospitis thospitis* and 3 *Eirenis thospitis hakkariensis* subspecies were analyzed. These individuals and the sequences of 13 taxa obtained from the Genbank were subjected to phylogenetic analysis. It was observed that the total Cytb + 16S rDNA + Cmos gene region sequences of the subspecies of *Eirenis thospitis* obtained from Genbank and the subspecies in this study were not different in both maximum likelihood (ML) and Bayesian approach (BI) phylogenetic trees. *Eirenis hakkariensis*, which was upgraded to species level based on morphological differences, should remain the subspecies *Eirenis thospitis hakkariensis*. As a result of the dating of cladogenetic events, it was determined that the species of the genus *Eirenis* started to differentiate 0.05 mya. *Eirenis thospitis* diverged from *Eirenis medus* (Chernov 1940) 0.025 mya. It was revealed that climate changes during the Würm (12-110 thousand years), one of the last glacial periods, were effective in this differentiation. Using morphology and DNA data together in taxonomic studies will be more appropriate for the classification of species.

Key words: *Eirenis*, mtDNA, nuDNA, Molecular phylogeny

ÖNSÖZ

Bu çalışmamın örnekleri Hakkari Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı FM19BAP No'lu ve ''Hakkari İli Amfibi ve Sürüngen Türlerinin Morfolojik Olarak Tanımlanması ve Biyoçeşitliliğe Katkısı'' isimli proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Can YILMAZ ve Prof. Dr. Aziz AVCI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamım yürütülebilmesi için FM22LTP1 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Hakkari Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Aileme bana verdiği maddi ve manevi desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Oğuzhan BALİ

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI ii
ÖZET iii
ABSTRACT iv
ÖNSÖZ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELERDİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 3
3. MATERYAL VE YÖNTEM 5
3.1. Materyal 5
3.2. Yöntem 5
3.2.1. Total DNA İzolasyonu 5
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 6
3.2.2.1. Cyt b reaksiyon koşulları 6
3.2.2.2. 16S rRNA reaksiyon koşulları 7
3.2.2.3. C mos reaksiyon koşulları 8
3.2.3. DNA Dizi Analizleri 9
3.2.4. DNA Veri Analizleri 10
3.2.4.1. Uygun modelin belirlenmesi 10
3.2.4.2. RAxML ve Mr bayes ile ağaç çizimi 10
3.2.4.3. Kladogenetik Olayların Tarihlendirilmesi (Moleküler Saat Uygulaması) 11
4. BULGULAR 12
4.1. DNA Dizi Analizleri ve Kompozisyonu 12
4.1.1. Mitokondriyal DNA (mtDNA) 12
4.1.2. Nükleer DNA (nuDNA) 13
4.2. Filogenetik Analiz Sonuçları 15
4.2.1. Maksimum Olasılık Analizi ile Elde Edilen Filogenetik Ağaç 15
4.2.2. Bayesian Yaklaşımı ile Elde Edilen Filogenetik Ağaç 16
4.2.3. *Eirenis* Cinsine Ait Türlerin Farklılaşma Zamanı 17

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 20
KAYNAKLAR 23
ÖZGEÇMİŞ 30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

˚C :	Santigrat derece
µl :	Mikrolitre
µm :	Mikrometre
g :	Gravite
KCl :	Potasyumklorür
M :	Molar
$MgCl_2$:	Magnezyumklorür
mM :	Milimolar
NaCl :	Sodyumklorür
ng/µl :	Nanogram/mikrolitre

Kısaltmalar

AIC:	Akaike information criterion
Bç:	Baz çifti
BI:	Bayesian Inference
C mos:	Oocyte maturation factor Mos
Cyt b:	Cytochrome b
DNA :	Deoksiribonükleik asit
dNTP :	Di nüklotid tri-fosfat
DTT:	Dithiothreitol
ML :	Maksimum Likelihood (olasılık)
MP :	Maksimum Parsimony (tutumluluk)
rRNA :	Ribozomal ribonükleikasit
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. *Eirenis thospitis* (Hakkari Yılanı)'in alt türleri baş ve boyun yapısı 2
Şekil 1.2. *Eirenis thospitis* (Hakkari Yılanı)'in dorsal pul sayısı gösterimi 2
Şekil 3.1. Cyt b gen bölgesi PZR ürünleri 8
Şekil 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR ürünleri 9
Sekil 3.3. C mos gen bölgesi PZR ürünleri 10
Şekil 3.4. BioEdit programı tarafından görüntülenen bir DNA dizisi 10
Şekil 4.1. *Eirenis thospitis thospitis*'in Cyt b geni nükleotid eşleşme sonucu 12
Şekil 4.2. *Eirenis thospitis thospitis*'in 16S rRNA geni nükleotid eşleşme sonucu 13
Şekil 4.3. *Eirenis thospitis thospitis*'in C mos geni nükleotid eşleşme sonucu 14
Şekil 4.4. Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgeleri için oluşturulan maksimum olasılık ağacı (ML) 15
Şekil 4.5. Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgesi dizileri ile oluşturulan ML ağacı 15
Şekil 4.6. Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgesi dizileri ile oluşturulan BI ağacı 16
Şekil 4.7. BEAST analizi sonucu elde edilen, ESS (Effective Sample Size), tahmini posterior dağılım (estimated posterior distribution) parametreleri ve özet istatistik verileri..... 17
Şekil 4.8. BEAST analizi sonucu elde edilen, TRACE (iz) uygulaması ile tahmini posterior dağılım (estimated posterior distribution) parametreleri 18
Şekil 4.9. *Eirenis* cinsine ait türlerinin 16S rDNA gen bölgesi dizileri kullanılarak yapılan, BEAST programı ile elde edilen moleküler saat uygulamasıyla, farklılaşma zamanlarını gösteren ağaç (0,009 = 0.009 milyon yıl, taksonların yanındaki numaralar gen bölgesini erişim numarasıdır (accession number))..... 19
Şekil 5.1. *Eirenis medus*'un yayılışı 21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Jmodeltest uygulama verileri 12

1. GİRİŞ

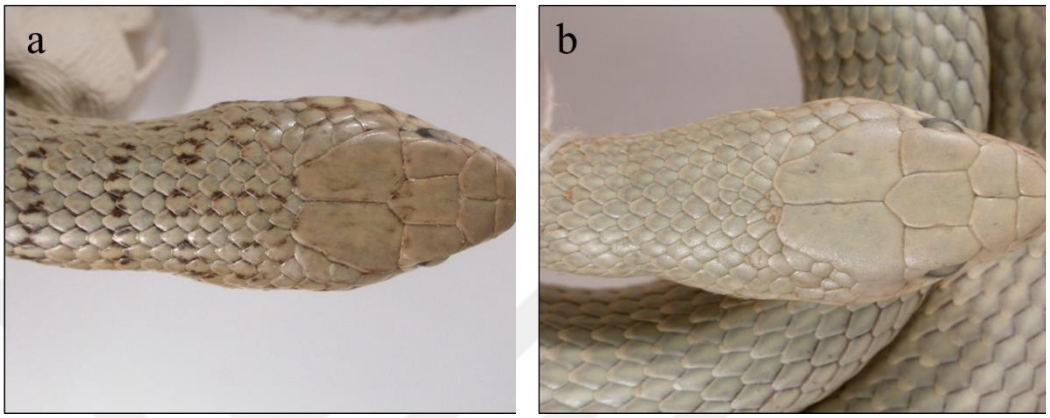
Dünya üzerinde Reptilia (Sürüngenler) sınıfında günümüzde yaşayan Rhynchocephalia (Kalakbaşlılar), Testudinata (Kaplumbağalar), Crocodilia (Timsahlar) ve Squamata (Pullular) olmak üzere 4 büyük takım (Ordo) bulunmaktadır. Bunların içinden Squamata (Pullular); Ophidia (Yılanlar) Lacertilia (Kertenkeleler) ve Amphisbaenia (Kör Kertenkeleler) olmak üzere 3 alttakım (subordo)'a ayrılır (Budak ve Göçmen, 2008). Ophidia (Yılanlar) alttakımında ise günümüzde 4038 yılan türü yer almaktadır (Uetz vd., 2023). Ülkemizde ise 61 yılan türü yer almaktadır (Baran vd., 2021; Yılmaz vd., 2021).

Yunan Mitolojisi'ndeki "Barış Tanrıça"sında ismini alan *Eirenis* cinsi (Yunanca'da Eirene sakin ya da barış anlamına gelmektedir), halk arasında uysal yılan olarak bilinir. Günümüzde türler *Eirenis* cinsi altında toplanmış ve bu isim ise ilk olarak Jan (1863) tarafından kullanılmıştır. *Eirenis* cinsine dahil yılanlar günümüze kadar *Coluber* Linnaeus, 1758, *Coronella* Laurenti, 1768, *Zamenis* Wagler, 1830, *Calamaria* Schlegel, 1837, *Ablabes* Duméril, Bibron ve Duméril, 1854, *Cyclophis* Günther, 1858, *Homalosom*a Jan, 1862 ve *Contia* Boulenger, 1894 cinsleri altında da değerlendirilmiştir (Avcı, 2008).

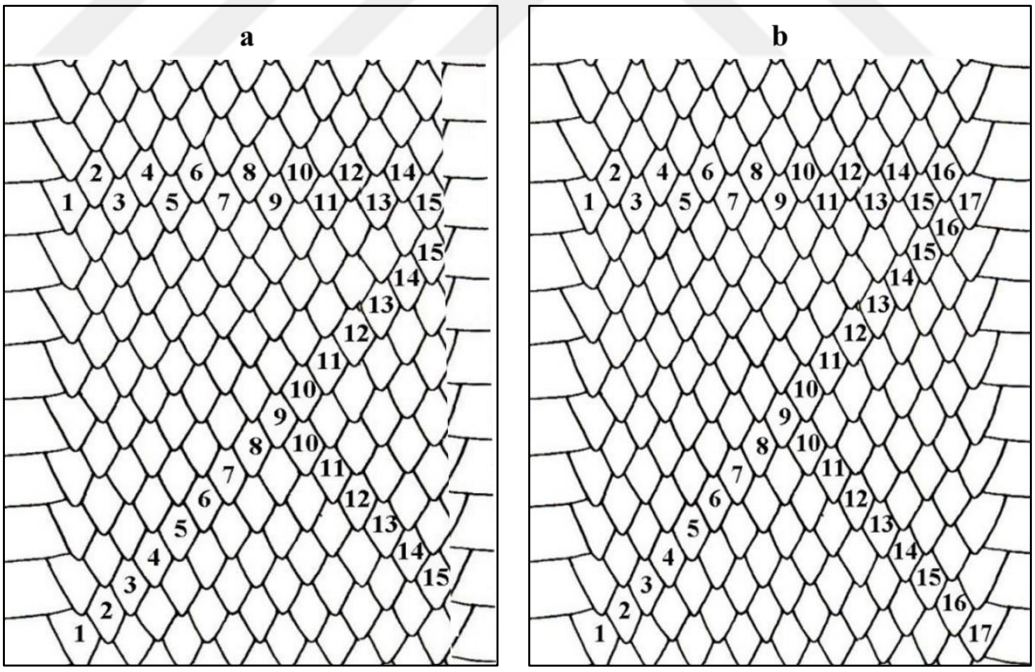
Colubridae familyasının *Eirenis* cinsi dünyada 22 tür ile temsil edilmektedir (Uetz vd., 2023). *Eirenis* cinsi yılanlar; Kuzeybatı Afrika, Güneydoğu Avrupa ve Asya'da yayılış gösterir (Gasperetti 1988; Latifi 1991; Leviton vd., 1992; Baran ve Atatür, 1998). *Eirenis* cinsinde ülkemizde 13 tür bulunmaktadır. Literatür çalışmalarına göre bu türlerden 5 tanesi (*Eirenis collaris* (Ménétriés, 1832), *Eirenis eiselti* Schmidtler & Schmidtler, 1978, *Eirenis occidentalis* (Rajabizadeh, Nagy, Adriaens, Avcı, Masroor, Schmidtler,. Nazarov, Esmaeili, ve Christiaens, 2015), *Eirenis punctatolineatus* (Boettger, 1892) ve *Eirenis thospitis* Schmidtler & Lanza, 1990) Hakkari İli'nde yayılış göstermektedir (Baran vd., 2021).

Ülkemize endemik olan *E. thospitis* (Hakkari Yılanı) literatür bilgisine göre Bitlis, Van ve Hakkari illerinde yaşadığı bilinmektedir (Akman vd., 2018; Baran vd., 2021). *E. thospitis*'in ülkemizde *Eirenis thospitis thospitis* Schmidtler & Eieslt, 1990 ve *Eirenis thospitis hakkariensis* Schmidtler & Eieslt 1991 olmak üzere 2 alttür ile temsil edilir. Bu iki alttür birbirlerinden vücut renklenmesi (*E. t. thospitis*:

baş ve arkasında geriye doğru siyah ve koyu lekeler bulunur; *E. t. hakkariensis*: bu lekeler bulunmaz) ve vücut ortasındaki pul sırası sayısı (*E. t. thospitis*: 15 sıralı; *E. t. hakkariensis*: 17 sıralı) bakımından ayrılmaktadır (Şekil 1.1, Şekil 1.2). *Eirenis hakkariensis* morfolojik farklıklarına göre yeni bir tür olarak tanımlamıştır (Schmidtler ve Eiselt, 1991).



Şekil 1.1. *Eirenis thospitis* (Hakkari Yılanı)'in alt türlerinin baş ve boyun üstten görünümü **a:** *E. t. thospitis,* **b:** *E. t. hakkariensis*



Şekil 1.2. *Eirenis thospitis* (Hakkari Yılanı)'in dorsal pul sayısı gösterimi (**a:** *E. t. thospitis* 15 sıra, **b:** *E. t. hakkariensis* 17 sıra)

Canlıların fenotipik benzerliklerine bakılarak yapılan sınıflandırma birbirlerine çok benzeyen organizmaların ayrılmasında başarılı değildir. Moleküler

genetik alanında yapılan çalışmaların artması ve ilerlemesiyle bu tip problemler çözülmeye başlamış ve taksonomik çalışmalar daha doğru olarak yapılabilmiştir. Nükleik asitlerin kullanılması ile yapılan tür tayinleri kullanışlıdır ve türler arasındaki akraba ilişkileri daha net ortaya çıkarabilmektedir (Gül, 2012). Moleküler biyolojide kullanılan indikatör genler morfolojik analizlere destekleyici faktörlerdir ve morfolojik analizlerin cevaplayamadığı birçok soruya cevap verebilmektedir

Moleküler filogenetik çalışmalar türlerin homolog oldukları varsayılan genler arasındaki benzerlikler baz alınarak yapılır ve amacı türler veya genler arasındaki ilişkileri soy ağaçlarında göstermektir (Dowell, 2008; Lemey vd., 2009). Çalışmalarda kullanılan genler, ilgili taksonomik seviyede filogenetik geçmişi yansıtan korunmuş bilgiler içermelidir. Canlılarda kullanılan en yaygın moleküler belirteçler mitokondriyal (mtDNA) ve nükleer (nuDNA) genler birçok canlı grubunda birçok filogenetik soruyu cevaplaya bilmektedir (Hertwig vd., 2004).

Halkasal yapıda olan omurgalı hayvanların mitokondriyal DNA'sında bir replikasyon kontrol bölgesi, 2 rRNA geni, 22 tRNA geni ve 13 protein kodlayan bölge bulunmaktadır. Mitokondriyal DNA'nın yaklaşık olarak 16000-18000 bç uzunluğundadır (Inoue vd., 2003). Moleküler çalışmalarda mtDNA bazı özelliklerinden dolayı kullanıma oldukça uygundur. Bu özellikler; (1) maternal kalıtılması, (2) nükleer genomun ¼'ü kadar etkili populasyon büyüklüğüne sahip olması (Avise vd., 1987), (3) görece hızlı bir moleküler evrim oranına sahip olmasıdır (Brown vd., 1982). Nükleer DNA'da ise Cmos sürüngenlerin filogenetik çalışmalarında yaygın kullanılmaktadır (Nagy vd., 2003; Avcı vd., 2015). Sonuç olarak moleküler filogenetik çalışmalar, moleküler olmayan yöntemlerden daha yüksek çözünürlükle sahiptir.

E. thospitis ve *E. hakkariensis* türlerinin morfolojik olarak farklı olması ve moleküler düzeyde farklılık bulunmaması oldukça ilgi çekici bir durumdur. *E. thospitis hakkariensis*'in tür seviyesine çıkarılıp çıkarılmaması hakkında bilim dünyasında hala tartışmalar devam etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada Hakkari İli'nde yakalanan örnekler iki mtDNA (Cytochrom b, 16S rRNA) ve bir nuDNA (Cmos) genleri ile yeniden değerlendirilmiş ve türün tartışmalı durumu ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Eirenis cinse ait türlerle ilgili ilk çalışma Azerbaycan'da (Beşparmak Dağı, Bakü'nün kuzeyi) Ménétriés (1832) tarafından gerçekleştirilmiştir (*Coluber collaris* olarak tanımlanan *Eirenis collaris*). Daha sonraki çalışmalar Ortadoğu ve civarında gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda tür sayısında artmalar meydana gelmiştir. Çalışmalarda Suriye'den *Calamaria coronella* (Schlegel, 1837) ve *Ablabes decemlineatus* (Duméril vd., 1854) Trabzon'dan *Coronella modesta* (Martin, 1838) ve Kudüs'den *Eirenis rothi* (Jan, 1863) tanımlanmıştır.

Schmidtler ve Lanza (1990) *Eirenis thospitis* (Hakkari Yılanı)'i ilk olarak Van İli'nde Kurudağ bozkırında yaklaşık olarak deniz seviyesinden 2000 metre yükseklikte tanımlanmıştır. Bu tür ülkemizde Bitlis, Van ve Hakkari illerinde yayılış göstermektedir (Akman vd., 2018; Baran vd., 2021).

Schmidtler ve Eieslt (1991) *Eirenis thospitis hakkariensis* alt türünü ilk olarak Hakkari İli'nde 1500 ile 1900 metreler arasında tanımlanmıştır. *Eirenis thospitis thospitis* Schmidtler ve Eiselt, 1990 alt türü ise Van Gölü'nün doğusunda bulunmaktadır (Schmidtler ve Eiselt, 1990).

Schmidtler ve Eiselt (1991) *E. t. hakkariensis* alt türünün Van Gölü'nün güneydoğusundaki dağlardan toplanan iki örneğini incelenerek, juveniller de bile aşırı soluk desenler olması ve sırt pullarının sırasının 17 olması nedeniyle *E. hakkariensis* Schmidtler ve Eiselt, 1990 türü olarak tanımlanmıştır.

Nagy vd. (2003) daha sonra iki mtDNA (Cyt b, 16S rRNA) ve bir nuDNA (C mos) genleri ile gerçekleştirilen çalışmada *E. thospitis* ve *E. hakkariensis* türleri arasında moleküler düzeyde farklılık olmadığını göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

E. thospitis'e ait örnekler 2019-2021 yıllarında FM19BAP2 numaralı ve ''Hakkari İli Amfibi ve Sürüngen Türlerinin Morfolojik Olarak Tanımlanması ve Biyoçeşitliliğe Katkısı'' isimli Hakkari Üniversitesi BAP projeleri kapsamında toplanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Total DNA İzolasyonu

%96'lık etanol içinde saklanan altı örnekten DNA izolasyonu için kas veya karaciğer dokusu steril makasla çıkarılarak alınmış ve etanole konulmuştur. Örneklerden total DNA izolasyonu SuTissue-Hair DNA izolasyon kiti (NA02R300) kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyon kitinin protokolü aşağıda verilmiştir.

- 2 ml'lik steril tüpe doku örneği yerleştirilerek alkolü uzaklaştırılmıştır. Tüpe 250 µl "ATL Buffer", 20 µl Proteinaz K ve 10 µl DTT (1M) eklenmiştir.
- Daha sonra vortekste birkaç saniye karıştırılmış ve 57°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
- Bir gece inkübe edilen örnekler birkaç saniye vortekslenmiş ve 200 µl "AL Buffer" eklenmiştir.
- Tekrar birkaç saniye vortekste karıştırılan örnekler 70°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası örnekler 2 dakika boyunca 15.000 × g'de santrifüj edilmiştir
- Santrifüjleme sonrası süpernatant 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 300 µl %100 etil alkol eklenmiştir.
- Sonrasında karışım spin kolona aktarılmıştır. 1 dakika boyunca 6.000 × g'de santrifüj edilip toplama tüpündeki sıvı atık kabına atılmıştır.
- Spin kolana 500 µl "Wash Buffer" eklenip, 6.000 × g'de 1 dakika santrifüj edilerek toplama tüpündeki sıvı, atık kabına atılmıştır.
- Üst adımdaki işlem tekrar edilmiştir.
- Spin kolonda kalan "Wash Buffer" çıkarmak için 15.000 × g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon 1.5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve kolona 50 µl "Elution Buffer" eklenmiştir. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Spin kolon oda sıcaklığında 3 dakika boyunca 15.000 × g'de santrifüj edilmiştir. Kolon atık kabına atılmıştır.

İzole edilmiş total DNA -20°C de saklanılmıştır. İzolasyon sonrası DNA miktar ve saflığını kontrol etmek için Qubit3.0 (USA) cihazında florimetrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.2.2.1. Cyt b reaksiyon koşulları

Mitokondriyal DNA analizinde, daha önce Nagy vd. (2003) tarafından çoğaltılan Cyt b bölgesine ait yaklaşık 370 bç uzunluğundaki gen bölgesi çalışılmıştır.

Bunun için aşağıdaki belirteçler kullanılmıştır.

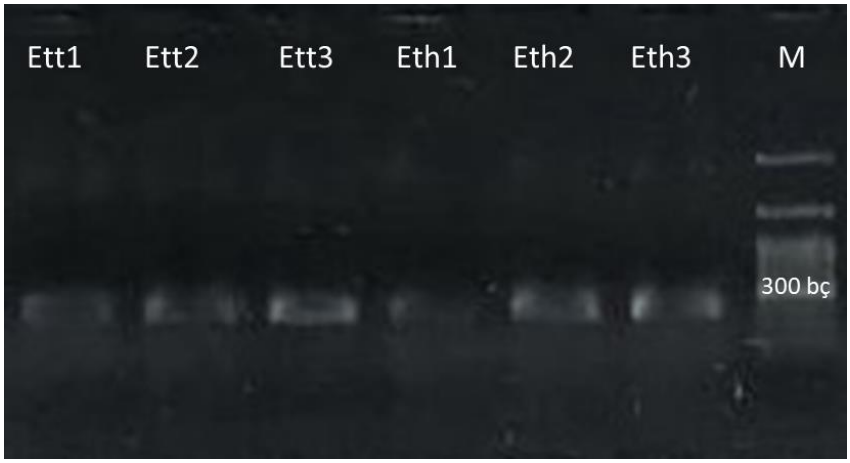
İleri (Forward) belirteç: L-425 5'-ACA GTA ATC ACC AAC CTA CT-3'

Geri (Reverse) belirteç: H-772 5'-TCA CTC TGG TTT GAT GTG TTG-3'

PZR reaksiyonu için 25 µl toplam hacimde, 2 µl kalıp DNA (100 ng/µl), 5µl dNTP mix, 0,1 µl Taq DNA polimeraz (GenTaq), 2,5 µl 10x Taq DNA polimeraz tamponu [20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), %1 Triton X-100, %0,1 jelatin], 0,3 µl L-425 belirteci, 0,3 µl H-772 belirteci ve 14,8 µl saf su kullanılmıştır. PZR reaksiyonlarında 35 döngülük sıcaklık profili kullanıldı. Sıcaklık profili aşağıda verilmiştir.

- Başlangıç Denatürasyonu: 94 ºC'de 7 dakika
- Denatürasyon: 94 ºC'de 40 saniye
- Bağlanma (Annealing): 46 ºC'de 30 saniye
- Uzama-Sentez (Extension): 72 ºC'de 60 saniye
- Son Uzama (Final Extension): 72 ºC'de 7 dakika

PZR sonrasında çoğaltılan diziler %1'lik agaroz jelde yürütülüp kontrol edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Cyt b gen bölgesi PZR ürünleri (M: Markır; bç: baz çifti; Ett: *E. thospitis thospitis*; Eth: *E. thospitis hakkariensis*)

3.2.2.2. 16S rRNA reaksiyon koşulları

Mitokondriyal DNA analizinde, daha önce omurgalılar için kullanılan 16S rRNA (Palumbi vd., 1991) bölgesine ait 517 bç uzunluğundaki gen bölgesi çalışılmıştır.

Bunun için aşağıdaki belirteçler kullanılmıştır.

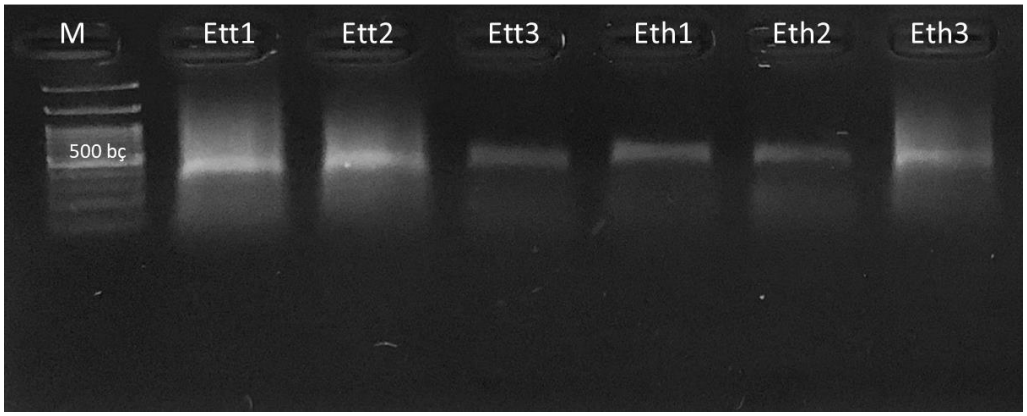
İleri (Forward) belirteç:16Sa 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'

Geri (Reverse) belirteç:16Sb 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'

PZR reaksiyonu için 25 µl toplam hacimde, 2 µl kalıp DNA (100 ng/µl), 5µl dNTP mix, 0,1 µl Taq DNA polimeraz (GenTaq), 22,5 µl 10x Taq DNA polimeraz tamponu [20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), %1 Triton X-100, %0,1 jelatin], 0,3 µl 16Sa belirteci, 0,3 µl 16Sb belirteci belirteci ve 14,8 µl saf su kullanılmıştır. PZR reaksiyonlarında 35 döngülük sıcaklık profili kullanıldı. Sıcaklık profili aşağıda verilmiştir.

- Başlangıç Denatürasyonu: 95 ºC'de 7 dakika
- Denatürasyon: 94 ºC'de 40 saniye
- Bağlanma (Annealing): 55 ºC'de 1 dakika
- Uzama- Sentez (Extension): 72 ºC'de 1 dakika
- Son Uzama (Final Extension): 72 ºC'de 5 dakika

PZR sonrasında çoğaltılan diziler %1'lik agaroz jelde yürütülüp kontrol edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR ürünleri (M: Markır; bç: baz çifti; Ett: *E. thospitis thospitis*; Eth: *E. thospitis hakkariensis*)

3.2.2.3. Cmos reaksiyon koşulları

Nükleer DNA analizinde, daha önce *Eirenis* cinsi için kullanılan 16S rRNA (Lawson vd., 2005) bölgesine ait 560 bç uzunluğundaki gen bölgesi çalışılmıştır.

Bunun için aşağıdaki belirteçler kullanılmıştır.

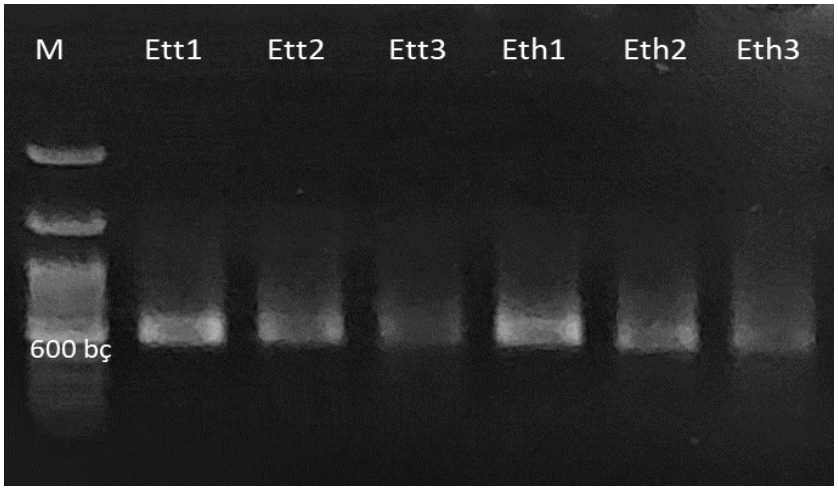
İleri (Forward) belirteç: S77 5'- CAT GGA CTG GGA TCA GTT ATG -3'

Geri (Reverse) belirteç: S78 5'- CCT TGG GTG TGA TTT TCT CAC CT-3'

PZR reaksiyonu için 25 µl toplam hacimde, 2 µl kalıp DNA (100 ng/µl), 5µl dNTP mix, 0,1 µl Taq DNA polimeraz (GenTaq), 2,5 µl 10x Taq DNA polimeraz tamponu [20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), %1 Triton X-100, %0,1 jelatin], 0,3 µl S77 belirteci, 0,3 µl S78 belirteci ve 14,8 µl saf su kullanılmıştır. PZR reaksiyonlarında bir ve otuz dört döngülük sıcaklık profili kullanıldı. PZR döngüsü aşamaları aşağıda verilmiştir.

- Başlangıç Denatürasyonu: 95 ºC'de 1 dakika
- Denatürasyon: 95 ºC'de 1 dakika
- Bağlanma (Annealing): 48 ºC'de 1 dakika — 1 döngü
- Uzama-Sentez (Extension): 72 ºC'de 1 dakika
- Denatürasyon: 95 ºC'de 30 saniye
- Bağlanma (Annealing): 54 ºC'de 45 saniye — 34 döngü
- Uzama-Sentez (Extension): 72 ºC'de 1 dakika
- Son Uzama (Final Extension): 72 ºC'de 5 dakika

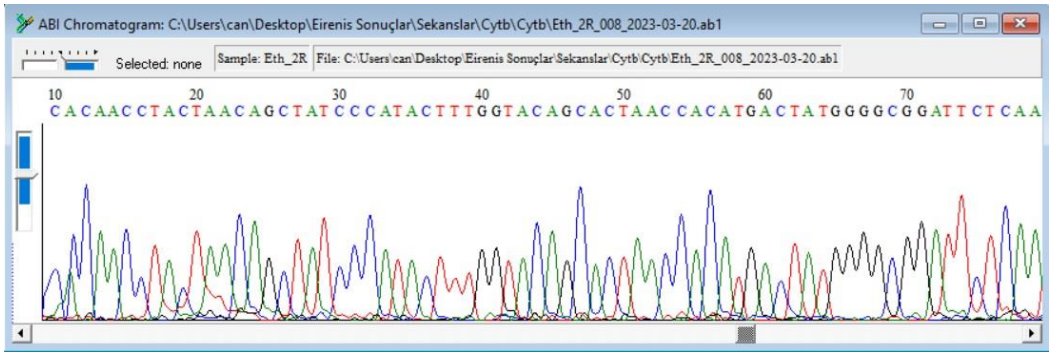
PZR sonrasında çoğaltılan diziler %1'lik agaroz jelde yürütülüp kontrol edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. C mos gen bölgesi PZR ürünleri (M: Markır; bç: baz çifti; Ett: *E. thospitis thospitis*; Eth: *E. thospitis hakkariensis*)

3.2.3. DNA Dizi Analizleri

Agaroz jelde kontrol edilen PZR örneklerine DNA dizi analizi, enzimatik sentez yöntemi kullanılarak gelişmiş bir kapiller sistem ile gerçekleştirildi (Sanger ve Coulson, 1975). BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) kullanılarak DNA dizi analizi sonuçları görüntülendi (Şekil 3.4). Gözle tekrar kontrol edilen DNA dizileri bir dosya oluşturularak Clustal W çoklu dizi hizalama programı ile hizalanmıştır. Dizilerin hepsinin aynı uzunlukta olması sağlanmıştır.



Sekil 3.4. BioEdit programı tarafından görüntülenen bir DNA dizisi

3.2.4. DNA Veri Analizleri

3.2.4.1. Uygun modelin belirlenmesi

jModelTest v2.1.10 (Darriba vd., 2012) programı ile elde edilen DNA verileri için AIC kriterlerine göre 88 modelden uygun olan yöntem belirlenmiştir.

Filogenetik analizlerde Cytb + 16s rRNA + Cmos toplam dizisi için en uygun model olarak GTR +I + G modeli seçilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Jmodeltest uygulama verileri

Model selected	Model = **GTR+I+G**
Partition	012345
-lnL	4453.9015
K	50
freqA	0.3333
freqC	0.2482
freqG	0.1660
freqT	0.2525
R(a) [AC]	16323.3474
R(b) [AG]	70207.0484
R(c) [AT]	14080.1649
R(d) [CG]	7955.1205
R(e) [CT]	119183.9677
R(f) [GT]	1.0000
p-inv	0.6460
gamma	0.4350

3.2.4.2. RAxML ve Mr bayes ile ağaç çizilimi

Maksimum olasılık analizi (ML) RAxML v.8.0.0 (Stamatakis, 2006) programı ile nükleotid baz değişiminin GTR (general time reversible) modeli (GTRGAMMA: hız ve doğruluk arasındaki uygun bir değiş-tokuşu temsil etmektedir) modeli kullanılarak Cyt b + 16S rRNA + Cmos toplam dizisine uygulanmıştır. Bootstrap değeri 1000 olarak ayarlanmıştır.

Bayesiyan filogenetik analizi (BI) Mr.Bayes 3.2.1 (Huelsenbeck vd., 2001) programı ile Cyt b + 16S rRNA+ Cmos toplam olarak uygulanmıştır. Analiz Marcov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiş ve her bir bölümlemenin dal uzunlukları bağlantısız olacak şekilde her 1000 döngüde örneklem alarak $5x10^7$ döngü şeklinde gerçekleştirmiştir. Konsensus ağacı burn-in %25 kuralına göre hesaplanarak elde edilmiştir.

Filogenetik analizlerde *Eirenis* cinsinin farklı türlerine ait Cyt b+16S rRNA+ Cmos dizileri ile dış grup olarak *Telescopus fallax* (Fleischmann 1831) dizileri Genbank veri tabanından alınarak kullanılmıştır. Filogenetik analizler sonucunda elde edilen ağaçlar FigTree v1.3.1 programı kullanılarak görüntülenmiştir (Rambaut, 2009).

3.2.4.3. Kladogenetik Olayların Tarihlendirilmesi (Moleküler Saat Uygulaması)

Eirenis cinsine ait 13 taksonun genetik çeşitlenme ve farklılaşma zamanlarını tahmin etmek için ve tarihsel süreçlerle ilişkilendirdi ve farklılaşma zamanları relaxed moleküler saat uygulaması ve devamında "uncorrelated relaxed lognormal saat" uygulamaları ile gerçekleştirildi. Bu analizler için Bayesiyan çıkarsamalı ve MCMC yaklaşımlı BEAST version 1.6.1 (Drummond ve Rambaut, 2007) programı kullanıldı. Durağanlık yakınsaması ve ESS model parametreleri TRACER 1.5 (Rambaut ve Drummond, 2007) program kullanılarak hesaplandı.

Kladogenetik analizlerde 16S rRNA gen bölgesi dizileri kullanılmıştır. Farklılaşma hızı olarak, yakın zamanda sürüngenlerde mitokondri genomundan elde edilen veri setleri için belirlenen, 16S rDNA geni dizisi için milyon yılda, soy başına % 0,19 farklılaşma hızı kalibrasyonu kullanıldı (Guo vd., 2011).

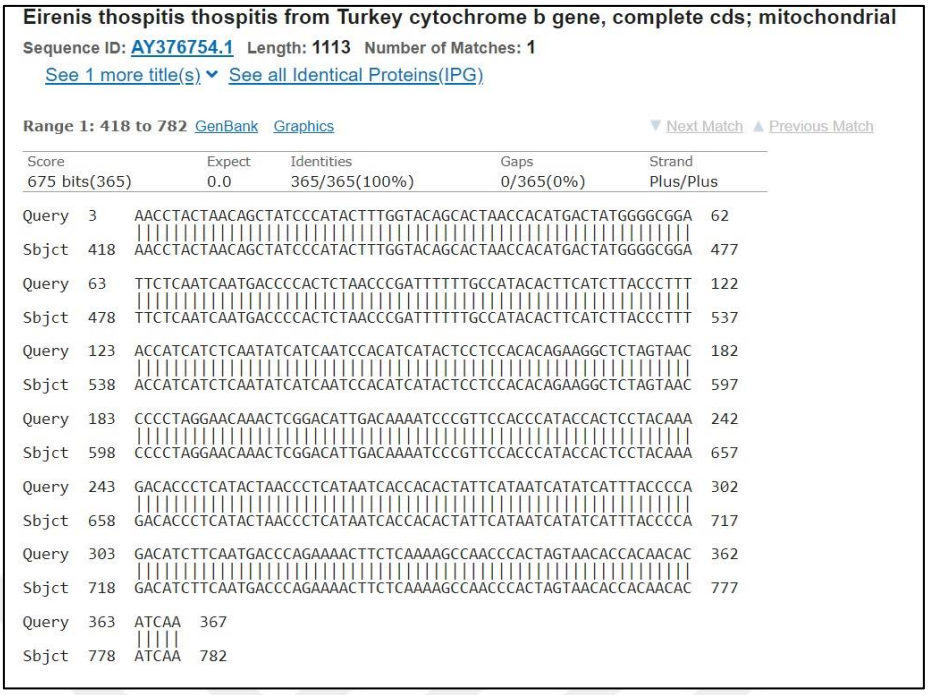
4. BULGULAR

4.1. DNA Dizi Analizleri ve Kompozisyonu

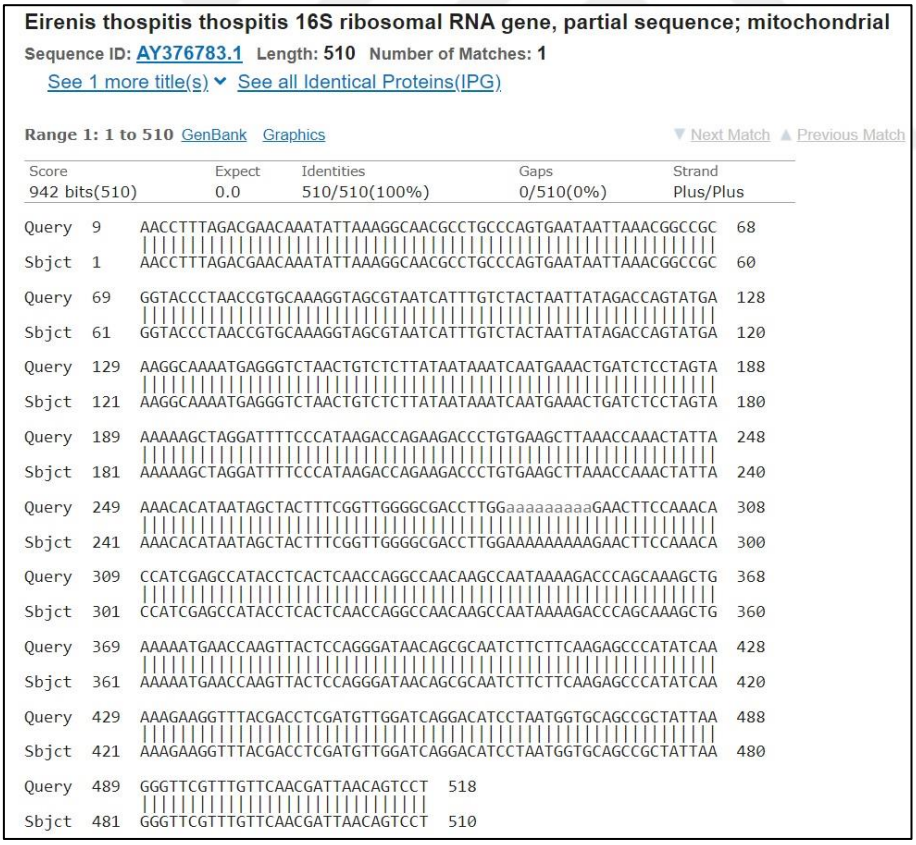
4.1.1. Mitokondriyal DNA (mtDNA)

E. thospitis'e ait Cyt b ve 16S rRNA genleri dizilerinin tümü, Genbank veri tabanına aktarılarak "nucleotide blast" uygulandı. Gerçekleştirilen karşılaştırma sonucunda çoğaltılan gen bölgeleri dizilerinin *E. thospitis*'e ait olduğu gözlendi (Şekil 4.1 ve 4.2).

Toplamda 6 bireyden elde edilen Cyt b ve 16S rDNA geni dizileri düzenlenerek dizileme işleminden sonra, boşluklar (gap) ve eksik (missing) bazlar çıkarılmıştır. Cyt b geninde 370 bç'lik kısım filogenetik analizlerde kullanılırken, 16S rRNA geninde 570 bç'lik kısım kullanılmıştır. 6 örneğin ve GenBank'tan alınan dizilerle birlikte 13 taksonun Cyt b geni baz sıklıkları A: 0.334, C: 0.342, G: 0.086, T(U): 0.238'dir. Toplam 125 nükleotid pozisyonunda (%34) varyasyon gözlenmiştir. Bu pozisyonun 76 tanesi (% 61) parsimonik bilgi içermektedir. 367 nükleotid pozisyonunun 242 (% 66) pozisyonu korunmuştur. 13 taksonun 16S rRNA geni baz sıklıkları A: 0.365, C: 0.227, G: 0.182, T(U): 0.226'dir. Toplam 72 nükleotid pozisyonunda (% 14) varyasyon gözlenmiştir. Bu pozisyonun 32 tanesi (% 44) parsimonik bilgi içermektedir. 515 nükleotid pozisyonunun 442 (% 86) pozisyonu korunmuştur.



Şekil 4.1. *E. thospitis thospitis*'in Cyt b geni nükleotid eşleşme sonucu



Şekil 4.2. *E. thospitis thospitis*'in 16S rRNA geni nükleotid eşleşme sonucu

4.1.2. Nükleer DNA (nuDNA)

E. thospitis'e ait Cmos geni dizilerinin tümü, Genbank veri tabanına birer birer aktarılarak "nucleotide blast" uygulandı. Gerçekleştirilen karşılaştırma sonucunda çoğaltılan gen bölgeleri dizilerinin *E. thospitis*'e ait olduğu gözlendi (Şekil 4.3).

Toplamda 6 bireyden elde edilen Cmos geni dizileri düzenlenerek dizileme işleminden sonra, gaplar ve eksik (missing) bazlar çıkarılmıştır. Cmos geninde 570 bç'lik kısım filogenetik analizlerde kullanılmıştır. 6 örneğin ve Genbank'tan alınan dizilerle birlikte 13 taksonun Cmos geni baz sıklıkları A: 0.293, C: 0.195, G: 0.208, T(U): 0.304'dir. Toplam 13 nükleotid pozisyonunda (% 2) varyasyon gözlenmiştir. Bu pozisyonun 5 tanesi (% 38) parsimonik bilgi içermektedir. 565 nükleotid pozisyonunun 552 (% 98) pozisyonu korunmuştur.



Şekil 4.3. *E. thospitis thospitis*'in Cmos geni nükleotid eşleşme sonucu

4.2. Filogenetik Analiz Sonuçları

4.2.1. Maksimum Olasılık Analizi ile Elde Edilen Filogenetik Ağaç

ML analizi RAxML v.8.0.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz Cytb+16s rRNA+Cmos toplam dizisi ile gerçekleştirilmiştir. *Eirenis* türlerine ait olan maksimum olasılık analizi ile elde edilen ağaç Şekil 4.5.'te verilmiştir.



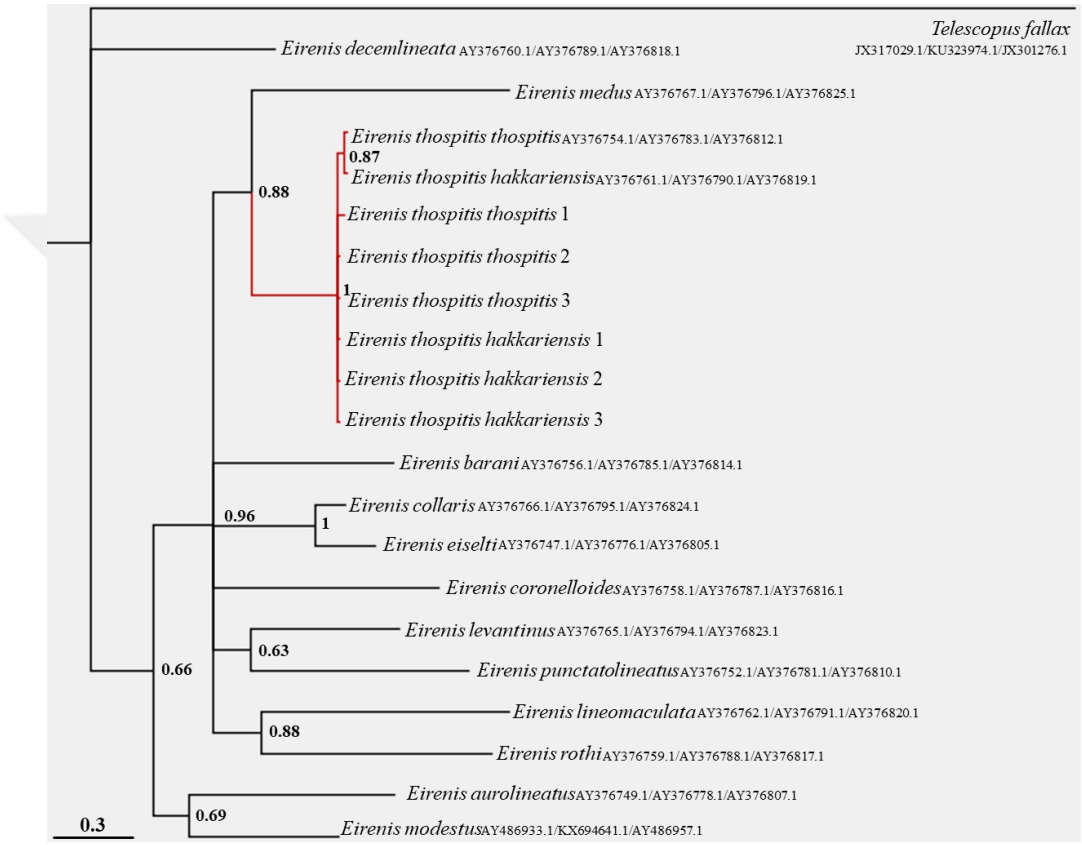
Şekil 4.5. Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgesi dizileri ile oluşturulan ML ağacı (Dallar üzerindeki değerler destek değerleri (BD: bootstrap değerleri)'dir. Taksonların yanındaki numaralar sırasıyla gen bölgelerinin erişim numaralarıdır (accession number))

ML filogenetik ağacında elde edilen destek değerleri (BD) 2 ile 99 arasında değişmektedir. Analiz sonucunda Şekil 4. 5'ten de anlaşılacağı üzere ML filogenetik analizi sonucunda *E. thospitis thospitis* ve *E. thospitis hakkariensis* alttürleri arasında Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgeleri bakımından bir fark

gözlenmemiştir. ML ağacına göre *E. thospitis*, *E. medus* ve *E. barani*'nin bulunduğu klad üzerinde yer almıştır.

4.2.2. Bayesian Yaklaşımı ile Elde Edilen Filogenetik Ağaç

BI analiz MrBayes 3.1.2 ile gerçekleştirilmiştir. Analiz Cytb + 16s rRNA + Cmos toplam dizisi ile gerçekleştirilmiştir. *Eirenis* türlerine ait olan BI analizi ile elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.5.'te verilmiştir.



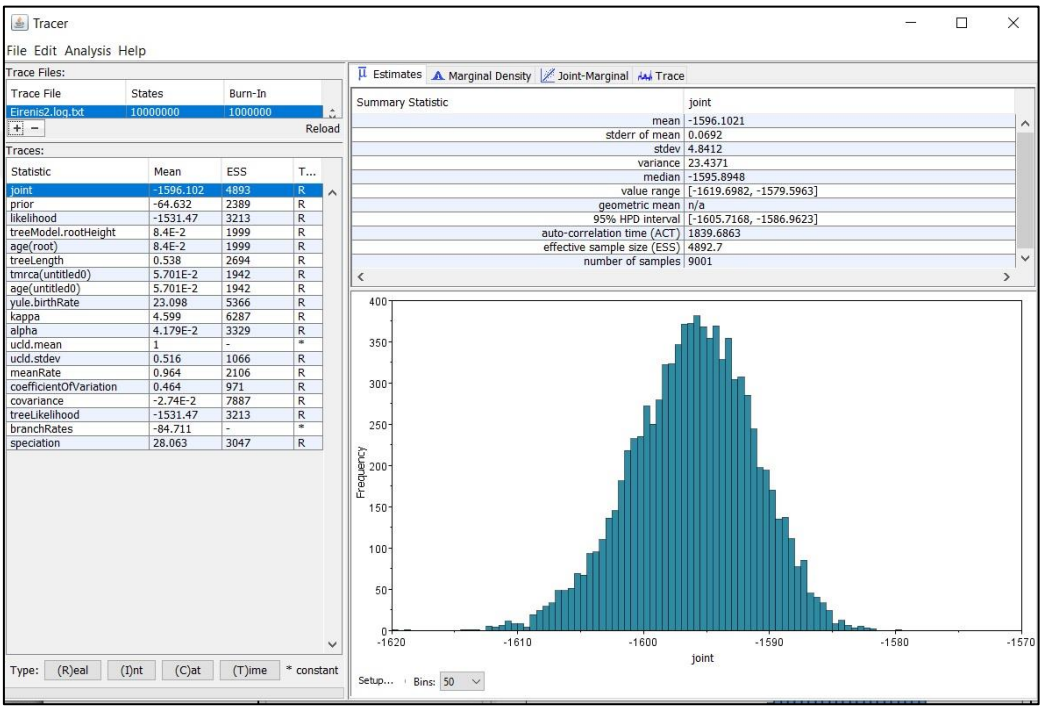
Şekil 4.6. Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgesi dizileri ile oluşturulan BI ağacı (Dallar üzerindeki değerler soncul olasılık (PP: Posterior probabilities) değerleridir, taksonların yanındaki numaralar sırasıyla gen bölgelerinin erişim numaralarıdır (accession number))

BI elde edilen soncul olasılıklar (PP: posterior probabilities) 0,63 ile 1,00 arasında değişmektedir. Analiz sonucunda Şekil 4.6'dan da anlaşılacağı üzere Bayesiyan filogenetik analizi sonucunda *E. thospitis thospitis* ve *E. thospitis hakkariensis* alttürleri arasında Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgeleri bakımından

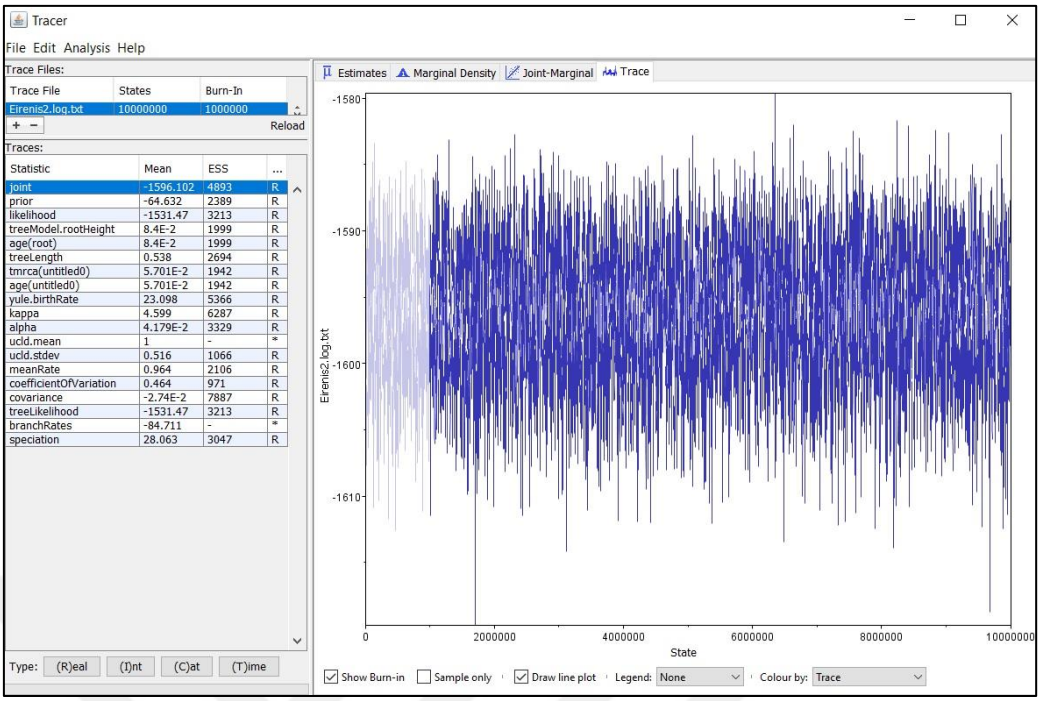
bir fark gözlenmemiştir. BI ağacına göre de *E. thospitis*, *E. medus* ve *E. barani*'nin bulunduğu klad üzerinde yer almıştır.

4.3. *Eirenis* Cinsine Ait Türlerin Farklılaşma Zamanı

E. thospitis ve Genbank veri tabanında bulunan *Eirenis* cinsine ait türlerin 16S rDNA dizileri kullanılarak, kladogenetik olayların tarihlerinin tahmini için yapılan ESS (Effective Sample Size), TRACE ve moleküler saat uygulanması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7, 4.8).

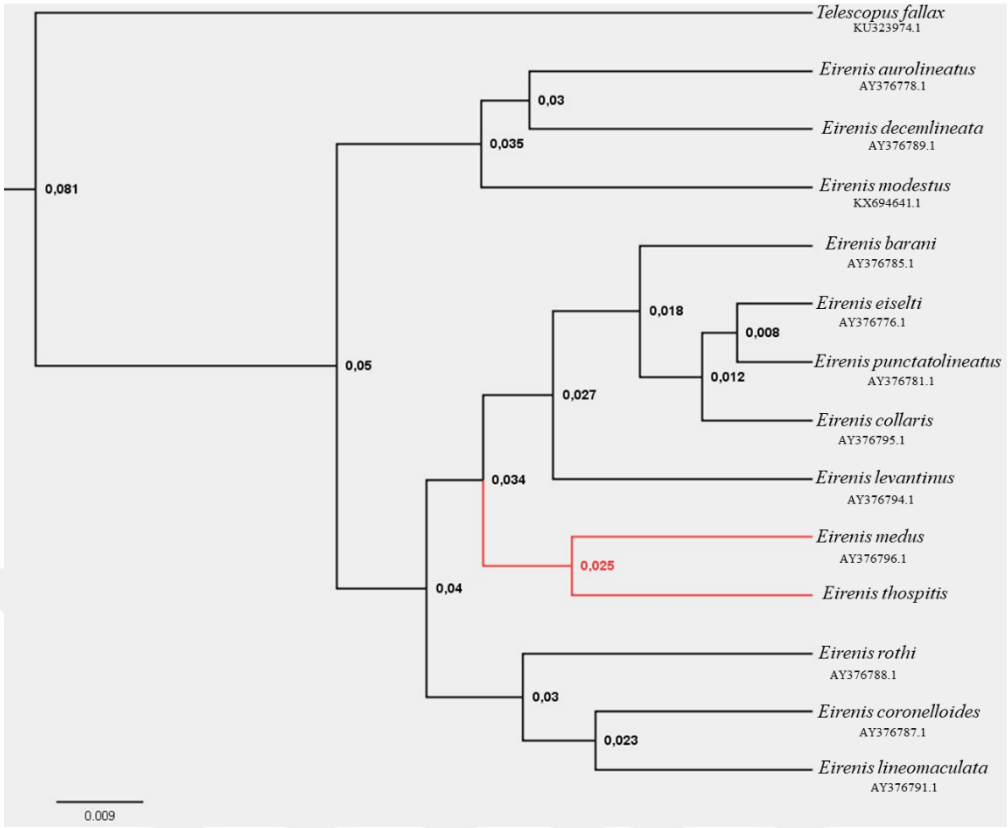


Şekil 4.7. BEAST analizi sonucu elde edilen, ESS (Effective Sample Size), tahmini posterior dağılım (estimated posterior distribution) parametreleri ve özet istatistik verileri



Şekil 4.8. BEAST analizi sonucu elde edilen, TRACE (iz) uygulaması ile tahmini posterior dağılım (estimated posterior distribution) parametreleri

Yapılan analiz sonucunda *Eirenis* türlerinin dış grup olan *T. fallax*'tan 0.081 milyon yıl önce ayrıldığı tespit edilmiştir. *Eirenis* cinsine ait türlerinin 0.05 milyon yıl önce farklılaşmaya başladığı belirlenmiştir. *E. thospitis* 'in *E. medus* (Chernov, 1940)'tan 0.025 milyon yıl önce farklılaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Eirenis* cinsine ait türlerinin 16S rDNA gen bölgesi dizileri kullanılarak yapılan, BEAST programı ile elde edilen moleküler saat uygulamasıyla, farklılaşma zamanlarını gösteren ağaç (0,009 = 0.009 milyon yıl, taksonların yanındaki numaralar gen bölgesini erişim numarasıdır (accession number))

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Taksonomik araştırmalarda türlerin sınıflandırılmasında geleneksel olarak morfolojik veriler kullanılmaktadır. Ancak türler arasında sınırlı sayıdaki morfolojik farklılıklar türlerin sınıflandırılması için yeterli olmayabilir ve yeni türlerin tanımlanmasını engelleyebilir (Carvalho vd., 2020). Ayrıca tek başına morfolojik veri aynı evrimsel soya (yani türlere) ait bireylere birden fazla ismin verilmesine de neden olabilir. (Carvalho vd., 2020; Mângia vd., 2020).

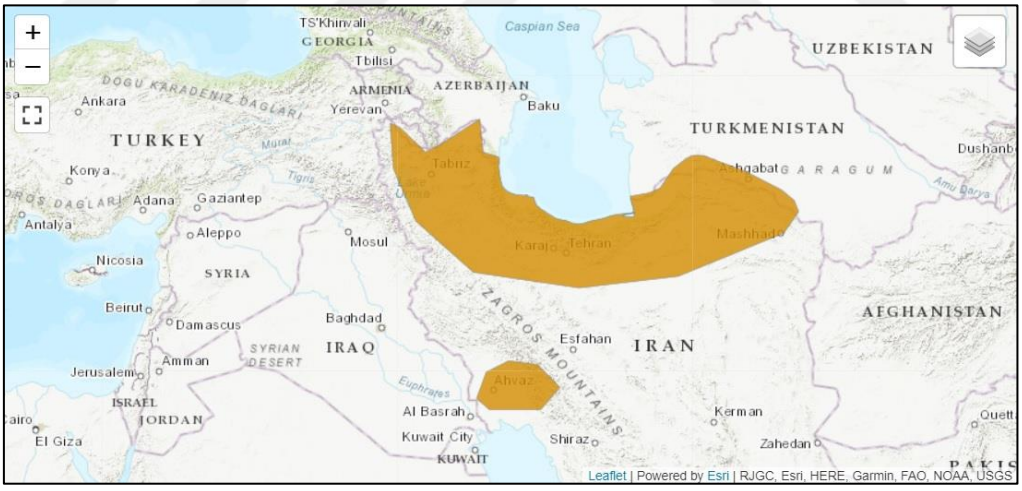
Morfolojik özellikler arasında yer alan renklenme varyasyonları, taksonomik çalışmalarda türlerin hatalı adlandırılmasına yol açabilir (Entiauspe-Neto vd., 2019). Hayvan renklenmesinin, termoregülasyon, sinyal verme ve koruma dahil olmak üzere çeşitli uyarlanabilir işlevleri vardır ve genellikle ontogenetik dimorfizmle ilişkilendirilen renklenme modellerindeki çeşitlilik (polikromatizm) taksonların hatalı isimlendirmelerine yol açabilir (Carvalho vd., 2020).

Filogeni organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri anlamamızın temel taşını oluştur ve ekolojik ve evrimsel süreçlerin test edilmesi ve çıkarım yapılması için tarihsel bir temel sağlar (Figueroa vd., 2016). Dünya genelinde yılanların taksonomik durumunu belirlemek için birçok moleküler çalışma gerçekleştirilmiştir (Nagy vd., 2003,2004; Lawson vd., 2005; Castoe ve Parkinson, 2006; Alfaro vd., 2008; Vidal vd., 2008, 2010; Kelly vd., 2008, 2009; Adalsteinsson vd., 2009; Malhotra vd., 2010; Sanders vd., 2010; Murphy ve Sanders, 2011; Pyron vd., 2011; McVay vd., 2015; Teynié vd., 2015; Figueroa vd., 2016;). *Eirenis* cinsi yılanların taksonomik durumu morfolojik çalışmalara ek olarak birçok moleküler çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır (Nagy vd., 2003, 2004; Rajabizadeh vd., 2015; Fathinia vd., 2019; Akbarpour vd., 2020; Smid vd., 2021).

Bu çalışmada *E. thospitis*'in *E. t. thospitis* ve *E. t. hakkariensis*'in üçer bireyi olmak üzere altı bireyin Cytb, 16S rRNA ve Cmos gen bölgelerinin dizileri çalışmıştır. Bu gen bölgeleri *Eirenis* cinsi için daha önceki çalışmalarda da kullanılmış ve filogenetik akrabalıkların ortaya çıkmasında önemli bir moleküler belirteçler olduğu ortaya koymuştur (Nagy vd., 2003; Rajabizadeh vd., 2015; Fathinia vd., 2019; Akbarpour vd., 2020; Smid vd., 2021).

Farklı filogenetik analiz ile elde edilen iki ağacında birbirine çok yakın topolojilere sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6). ML ve BI ile elde edilen filogenetik ağaçların ikisinde de bu çalışma ile elde edilen *E. thospitis*'in alt türleri ve Genbank'tan elde edilen alt türlerin dizileri (Cyt b+16S rRNA+Cmos dizileri) aynı klad üzerinde yer almıştır. *E. t. hakkariensis, E. thospitis*'in alttürü iken morfolojik karakterlere (vücut renklenmesi ve vücut ortası pul sayısı) göre *E. hakkariensis* olarak tür seviyesine çıkarılmıştır. *E. t. hakkariensis*, bu çalışma ve Nagy vd. (2003) göre mtDNA (cyt b, 16S rDNA) ve nuDNA (Cmos) bakımından *E. t. thospitis* alttüründen farklılık göstermemiştir.

Moleküler saat uygulaması sonucunda elde edilen ağaç incelendiğinde *Eirenis* cinsine ait 13 taksonun 0.05 milyon yıl önce farklılaşmaya başladığı görülmektedir. Ayrıca *E. thospitis*'in 0.025 milyon yıl önce *E. medus*'tan farklılaşmaya başladığı görülmektedir. *E. thospitis* Hakkari, Van ve Bitlis illerinde yayılış gösterirken (Akman vd., 2018; Baran vd., 2021) *Eirenis medus* Hakkâri ve Van İllerine komşu olan İran ve Türkmenistan'ın güneyinde yayılış göstermektedir (Latifi, 1991; Rajabizadeh vd. 2012) (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *E. medus*'un yayılışı (Papenfuss vd., 2009)

Hakkari İli'nde yer alan kuzey batıya doğru uzanan ve yükseklikleri 3000 m'yi aşan Sümbül, Çarçal, Cilo, Oramar, Sat ve Gevarruki dağları 80 km uzunluğundadır ve Türkiye, Irak ve İran sınırlarında yer alan Çiyareş Dağı'da yaklaşık 3000 m yüksekliğindedir (Türkünal, 2016). Türkiye-İran sınırı yaklaşık 454 km uzunluğunda ve burada yer alan dağlar 2500-3000 m yüksekliğindedir. Bu dağlar sıradağlar şeklinde uzanmaktadır (Deniz ve Doğu, 2008). Pleistosen'deki son

dört buzul dönemi (Günz, Mindel, Riss ve Würm) Anadolu ve çevresindeki faunal kompozisyonu büyük ölçüde etkilemiştir. Son dört buzul dönemlerinden Günz 621-676, Mindel 424-478, Riss 130-200 ve Würm 12-110 binyıl önce gerçekleşmiştir (Çimen, 2018). Birde bu son buzul döneminde 1000 m'yi aşan sıra dağlar ekolojik koşullar açısından dikey bölgeleşmeye neden olmuştur (Atalay, 2006). Ülkemiz buzullarla kaplı olmamasına rağmen sıcaklık düşüşleri yaşamış ve bölgede birçok türün hayatta kalmasına izin vermiş ve bu nedenle birçok bitki ve hayvan taksonu için bir sığınak görevi görmüştür (Hewitt, 1999). Muhtemelen Würm buzul dönemlerinde Hakkari İli'nde ve Türkiye-İran sınırında yer alan bu dağ sıraları bir bariyer oluşturarak *E. thospitis*' in *E. medus*' tan ayrılarak türleşmesine neden olmuştur.

Sonuç olarak, (1) mtDNA ve nuDNA dizilerine göre *E. thospitis*'in iki alttürü (*E.t. thospitis* ve *E. t. hakkariensis*) arasında farklılık bulunmamıştır. (2) Bu çalışmada elde edilen moleküler genetik veriler *E. thospitis*'in alttürü iken morfolojik farklılıklara dayalı olarak *E. hakkariensis* türüne çıkarılan taksonun *E. t. hakkariensis* alttürü olarak kalmasının daha uygun olduğunu göstermektedir. Özellikle alttürler arasında dorsal pul sayısının farklı olması ve moleküler olarak farklılık olmaması ilgi çekici bir durumdur. Bu nedenle alttürler farklı gen bölgeleri ile moleküler olarak yeniden değerlendirilebilir. (3) Türlerin sınıflandırılması için taksonomik anlayışı geliştirmeye yardımcı olan birden fazla veri setinin (örneğin, DNA dizileri, morfoloji, davranış, vb.) birlikte kullanılması daha güçlü tür hipotezlerinin oluşmasına katkı sunacaktır. (4) *Eirenis thospitis* 0.025 milyon yıl önce (25 bin yıl) *Eirenis medus*'tan farklılaşmaya başlamış ve muhtemelen bu farklılaşmaya Würm buzul döneminde (12-110 bin yıl) Türkiye-İran sınırında yer alan dağ sıraları neden olmuştur.

KAYNAKLAR

Adalsteinsson, S.A., Branch, W.R.,Trape, S.,Vitt, L.J., Hedges, S.B. 2009. Molecularphylogeny,classification,andbiogeographyofsnakesofthefamilyLeptotyphlopidae(Reptilia,Squamata). **Zootaxa,** 2244: 1–50.

Akbarpour, M., Rastegar-Pouyani, N., Fathinia, B., Rastegar-Pouyani, E. 2020. A new species of the genus *Eirenis* Jan, 1863 (Squamata: Colubridae) from Kerman Province in South-central Iran. **Zootaxa,** 4868 (1).

Akman, B., Yildiz, M.Z., Özcan, A.F., Bozkurt, M.A., İğci, N., Göçmen, B. 2018. On the herpetofauna of the East Anatolian Province of Bitlis (Turkey) (Amphibia; Reptilia). **Herpetozoa**, 31 (1/2): 69 – 82.

Alfaro, M.E., Karns, D.R., Voris, H.K., Brock, C.D., Stuart, B.L. 2008. Phylogeny, evolutionary history, and biogeography of Oriental–Australian rear-fanged water snakes (Colubroidea: Homalopsidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 46: 576–593.

Atalay, I. 2006. The effects of mountainous areas on biodiversity: A case study from the Northern Anatolian Mountains and the Taurus Mountains. **Grazer Schriften der Geographie und Raumforschung,** 41: 17-26.

Avcı, A. 2008. Doğu Akdeniz (Hatay, Osmaniye, Adana, Mersin, Kilis ve Gaziantep)' deki Bazı *Eirenis* (Reptilia: Serpentes) Türlerinin (*E. aurolineatus, E. barani, E. coronelloides, E. eiselti, E. levantinus*) Taksonomik Durumu. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi 203 s., Aydın.

Avcı, A., Ilgaz, Ç., Rajabizadeh, M., Yılmaz, C., Üzüm, N., Adriaens, D., Kumlutaş, Y., Olgun, K. 2015. Molecular Phylogeny and Micro CT–Scanning Revealed Extreme Cryptic Biodiversity in Kukri Snake, *Muhtarophis gen. nov.*, a New Genus for *Rhynchocalamus barani* (Serpentes: Colubridae). **Russian Journal of Herpetology,** 22(3): 159-174.

Avise, J.C, Arnold, J., Ball, R.M., Jr, Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intra specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics,** 18, 489-522.

Baran, İ., Atatür, M. K. 1998.Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler) ed: Çevre Bakanlığı, 214 s., Ankara.

Baran, İ., Avcı, A., Kumlutaş, Y., Olgun, K., Ilgaz, Ç. 2021. Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri. Palme Yayınları, Ankara. ISBN 978-605-282-611-9.

Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution, **Journal of Molecular Evolution,** 18:225-239.

Budak, A., Göçmen, B. 2008. Herpetoloji (2. baskı), İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Yayını.

Carvalho, P.S., Zaher, H., da Silva Jr, N.J., Santana, D.J. 2020. A morphological and molecular study of *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Dipsadidae), a widespread species from South America. **PeerJ,** 8:e10073.

Castoe, T.A., Parkinson, C.L. 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 39: 91–110.

Çimen, E. 2018. Geographic Distribution of Genetic Diversity of *Cynips divisa* (Hymenoptera: Cynipidae) in Turkey. Abant İzzet Baysal University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis 93 p., Bolu.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods,** 9(8): 772.

Deniz, O., Doğu A.F. 2008. Türkiye-İran Sınırı: Sınırın Coğrafi Durumu ve Sınır Köylerimizin Sosyo-Ekonomik Yapıları. **Doğu Coğrafya Dergisi,** 19: 49-71.

Dowell, K., 2008. Molecular Phylogenetics. Technical report, University of Maine.

Drummond, A.J., Rambaut, A. 2007. BEAST v1.4.7. Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees. Computer program. [http://beast.bio.ed.ac.uk./.], Erişim tarihi: 08.11.2022.

Duméril, A.M.C., Bibron, G., Duméril, A.H.A. 1854. Erpétologie générale ou Histoire Naturelle complète des Reptiles. Vol. 7 (partie 1). Paris, xvi +780 s.

Entiauspe-Neto, O.M., De Sena, A., Tiutenko, A., Loebmann, D. 2019. Taxonomic status of *Apostolepis barrioi* Lema, 1978, with comments on the taxonomic instability of Apostolepis Cope, 1862 (Serpentes, Dipsadidae). **Zoo Keys**, 841:71–78.

Behzad, F., Rastegar-Pouyani, E., Shafaeipour, A. 2019. A new species of Eirenis (Ophidia: Colubridae) from highland habitats in southern Iran. **Zoology in the Middle East**, 65 (4): 319-329.

Figueroa, A., McKelvy, A.D., Grismer, L.L., Bell, C.D, Lailvaux, S.P. 2016. A Species-Level Phylogeny of Extant Snakes with Description of a New Colubrid Subfamily and Genus. **PLoS ONE**, 11(9): e0161070.

Gasperetti, J. 1988. Snakes of Arabia, Fauna of Saudi Arabia. 9: 169–450.

Guo, X., Dai, X., Chen, D., Papenfuss, T. J., Ananjeva, N. B., Melnikov, D. A., Wang, Y. (2011). Phylogeny and divergence times of some racerunner lizards (Lacertidae: *Eremias*) inferred from mitochondrial 16S rRNA gene segments. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 61(2): 400–412.

Gül, S. 2012. Türkiye'deki *Hyla orientalis* ve *Hyla savignyi* türlerinin mitokondriyal ve nükleer genler kullanılarak moleküler düzeyde karşılaştırılması. Doktora Tezi Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 63s.

Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** 41: 95–98.

Hewitt, G.M. 1999. "Post-glacial re-colonization of European biota", **Biological journal of the Linnean Society,** 68(1-2): 87–112.

Hertwig, S., De Sa, R.O., Haas, A. 2004. Phylogenetic signal and the Utility of 12S and 16S mtDNA in Frog Phylogeny. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research,** 42: 2–18.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science,** 294: 2310-2314.

Inoue, J.G., Miya, M, Tsukamoto, K., Nishida, M. 2003. Evolution of the deep-sea gulper eelmitochondrial genomes: Large-scale gene rearrangements

originated within the eels. **Molecular Biology and Evolution,** 20: 1917–1924.

Jan, G. 1863. Elenco sistematico degli ofidi e disegnati per l'Iconografia Generale. Milano (Lombardi), 143 S.

Kelly, C.M.R., Barker, N.P., Villet, M.H., Broadley, D.G, Branch, W.R 2008. The snake family Psammophiidae (Reptilia: Serpentes): phylogenetics and species delimitation in the African sand snakes (*Psammophis* Boie, 1825) and allied genera. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 47: 1045–1060.

Kelly, C.M.R., Barker, N.P., Villet, M.H., Broadley, D.G. 2009. Phylogeny, biogeography and classification of the snake superfamily Elapoidea: a rapid radiation in the late Eocene. **Cladistics,** 25: 38–63.

Latifi, M. 1991. The snakes of Iran. Society for the Study of Amphibians and Reptiles., Ohio, USA, Oxford press, 159 pp.

Lawson, R., Slowinski, J.B., Crother, B.I., Burbrink, F.T. 2005. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 37: 581–601.

Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M., 2009. The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. Cambridge University Press, New York. 723.

Leviton, A. E., Anderson, S. C., Adler, K. K., Minton, S. A. 1992. Handbook to Middle East Amphibians and Reptiles, ed: Soc. for the Study of Amphibians and Reptiles, pp: 252. Oxford, USA.

Malhotra, A., Creer, S., Pook, C. E., Thorpe, R.S. 2010. Inclusion of nuclear intron sequence data helps to identify the Asian sister group of New World pitvipers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 172–178.

Mângia, S., Oliveira, E. F., Santana, D. J., Koroiva, R., Paiva, F., Garda, A. A. 2020. Revising the taxonomy of Proceratophry s Miranda- Ribeiro, 1920 (Anura: Odontophrynidae) from the Brazilian semiarid Caatinga: Morphology, calls and molecules support a single widespread species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research,** 58:1151–1172.

Martin, W.C.L. 1838. A Collection of Snakes procured by the Euphrates Expedition. **Proceedings of the Zoological Society of London,** 6: 81–84.

McVay, J.D., Flores-Villela, O., Carstens, B. 2015. Diversification of North American natricine snakes. **Biological Journal of the Linnean Society,** 116: 1–12.

Ménétriés, E. 1832. Catalogue raisonné des objets de zoologie recueillis dans un voyage au caucase et jusqu'aux frontières actuelles de la Perse. De L'Académie Impériale des Sciences, St. Pétersbourg.

Murphy, J. C., Sanders, K. L. 2011. First molecular evidence for the phylogenetic placement of the enigmatic snake genus *Brachyorrhos* (Serpentes: Caenophidia). **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 61: 953–957.

Nagy, Z. T., Schmidtler, J. F., Joger, U., Wink, M. 2003. Systematik der Zwergnattern (Reptilia: Colubridae: *Eirenis*) und verwandter Gruppen anhand von DNA-Sequenzen und morphologischen Daten. **Salamandra**, 39(3/4): 149–168.

Nagy, Z. T., Lawson, R., Joger, U., Wink, M. 2004. Molecular systematics of racers, whipsnakes and relatives (Reptilia: Colubridae) using mitochondrial and nuclear markers. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research,** 42: 223–233.

Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., Mcmillan, W.O., Stice, L., G. Grabowski, G. 1991. The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0. – Hawaii (Univ. Hawaii).

Papenfuss, T., Shafiei Bafti, S., Sharifi, M., Ananjeva, N., Orlov, N. 2009. *Eirenis medus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009: e.T164719A5920494.[https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T164719A5920494.en.], Erişim tarihi: 08.11.2022.

Pyron, R.A., Burbrink, F.T., Colli, G.R., de Oca, A.N.M., Vitt, L.J., Kuczynski, C.A., Wiens, J.J. 2011. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 58: 329–342.

Rajabizadeh, M., Schmidtler, J. F., Orlov, N., Soleimani, G. 2012. Review of Taxonomy and Distribution of the *Eirenis medus* group (Chernov, 1940)

(Ophidia: Colubridae) with Description of a New Species of the Genus *Eirenis* from Kerman Province, Southeastern Iran. **Russian Journal of Herpetology,** 19 (4): 307-313.

Rajabizadeh, M., Nagy, Z. T., Adriaens, D., Avci, A., Masroor, R., Schmidtler, J., Nazarov, R., Esmaeili, H. R., Christiaens, J. 2015. Alpine–Himalayanorogeny drove correlated morphological, molecular, and ecological diversification in the Persian dwarf snake (Squamata: Serpentes: *Eirenis persicus*). **Zoological Journal of the Linnean Society,** 176(4): 878–913.

Rambaut, A. 2009. FigTree v1.3.1. Computer program. [http://tree.bio.ed.ac.uk/ software/ figtree/]. Erişim tarihi: 07.11.2022.

Rambaut, A., Drummond, A.J. 2007. TRACER, version 1.5. [http://evolve.zoo.ox. ac.u/Evolve/Software.html]. Erişim Tarihi: 11.11.2020.

Sanders, K. L., Hamidy, A., Head, J. J., Gower, D. J. 2010. Phylogeny and divergence times of filesnakes (*Acrochordus*): inferences from morphology, fossils and three molecular loci. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 56: 857–867.

Sanger, F., Coulson, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology,** 94: 441-448.

Schlegel, H. 1837. Essais ur la Physionomie des Serpents. Amsterdam. Partie I: 252 pp., Partie 2: 606 pp.

Schmidtler, J. F., Lanza, B. 1990. A new Dwarf–Snake (*Eirenis*) from Lake Van in Eastern Turkey. **Amphibia–Reptilia,** 11; 363–371.

Schmidtler, J. F., Eiselt, J. 1991. Zur Systematik und Verbreitung Ostanatolischer Zwergnattern; Mit Beschreibung von *Eirenis hakkariensis* n. sp., **Salamandra,** 27 (4); 225–237.

Smid, J., Sindaco, R., Shobrak, M., Busais, S., Tamar, K., Aghova, T., Simo-Riudalbas, M., Tarroso, P., Geniez, P., Crochet, P.-A., Els, J., Burriel-Carranza, B., Tejero-Cicuendez, H., Carranza, S. 2021. Diversity patterns and evolutionary history of Arabian squamates. **Journal of Biogeography,** 48 (5): 1183-1199.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC:MaximumLikelihood based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. **Bioinformatics**, 22(21):2688–2690.

Teynie, A., David, P., Lottier, A., Le, M.D., Vidal, N., Nguyen, T.Q. 2015. A new genus and species of xenodermatid snake (Squamata: Caenophidia: Xenodermatidae) from northern Lao People's Democratic Republic. **Zootaxa,** 3926: 523–540.

Türkünal, S. 2016. Hakkâri dağları hakkında jeolojik not. [https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/885646]. Erişim Tarihi: 10.07.2023.

Uetz, P., Freed, P, Aguilar, R., Reyes, F., Hošek, J. (eds.) 2023. The Reptile Database, 28 January 2023 [http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html] Erişim Tarihi: 28.01.2023.

Vidal, N., Branch, W.R., Pauwels, O.S.G., Hedges, S.B., Broadley, D.G., Wink, M., Cruaud, C., Joger, U., Nagy, Z.T. 2008. Dissecting the major African snake radiation: a molecular phylogeny of the Lamprophiidae Fitzinger (Serpentes: Caenophidia). Zootaxa, 1945: 51–66.

Vidal, N., Marin, J., Morini, M., Donnellan, S., Branch, W.R., Thomas, R. et al. 2010. Blindsnake evolutionary tree reveals long history on Gondwana. **Biology Letters**, 6: 558–561.

Yılmaz, C., Ilgaz, Ç., Üzüm, N., Avcı, A. 2021. First record of Jan's Cliff Racer, *Platyceps rhodorachis* (Jan, 1863) (Serpentes: Colubridae) in Turkey. **Zoology in the Middle East**, 67: 92-94.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Oğuzhan BALİ

Doğum Yeri ve Tarihi:

DURUMU

Lisans Öğrenimi :

Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-Posta Adresi :

Tarih : 24/08/2023