

Farklı istiridyeye türlerinin tespitinde RAPD-PZR kullanımı

Identification of different oyster species using RAPD-PCR

Emel Özcan Gökçek* • Aynur Lök • Bilge Karahan • Evrim Kurtay

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Bornova, İzmir, Turkey

* Corresponding author: emel.ozcan.gokcek@ege.edu.tr

Received date: 04.10.2016

Accepted date: 21.11.2016

How to cite this paper:

Gökçek-Özcan, E., Lök, A., Karahan, B. & Kurtay, E. (2017). Identification of different oyster species using RAPD-PCR. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(1): 25-30. doi:10.12714/egejfas.2017.34.1.04

Öz: Bu çalışmada, Ege Denizi'nde gözlemlenen ve istilacı tür olduğu düşünülen bazı istiridyeye örnekleriyle, yerli istiridyeye türü olan *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758) örnekleri arasındaki genetik farklılıkların tespitinin, RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)-PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yardımıyla hızlı bir şekilde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, denizlerimizin yaygın türü olan *Ostrea* genusundan morfolojik olarak farklı olduğu gözlenen ve *Crassostrea* genusuna ait özellikler gösteren istiridyeye bireyleriyle, yerli tür 8 adet RAPD profili kullanılarak genetik olarak ayırt edilmiştir. Çalışmada toplam 343 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı *Crassostrea* sp.'ye ait örneklerde daha yüksek bulunmuştur. Ele alınan lokuslardan 6 tanesinin ayırıcı gücü yüksek çıkmıştır. İstilacı türe ait 11, yerli türe ait 5 adet toplamda 16 adet türe-özgül diagnostik bant belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Genetik analiz, RAPD, belirteç, istiridyeye, istilacı tür

Abstract: Rapid determination of the genetic differences between some oyster samples observed in the Aegean Sea that were assumed as an invasive species and domestic oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758) using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR (Polymerase Chain Reaction) markers was aimed in this study. In this regard, domestic species samples and the other samples collected from Altınoluk coasts which were morphologically different than *Ostrea* species and were showing similarities to *Crassostrea* genus were genetically identified by using 8 RAPD profiles. Total 343 bands were observed in the study. Polymorphism rate was found higher in the samples that might belong to *Crassostrea* genus. 6 of all loci considered in this study were found highly identical for these species. Total of 16 species-specific diagnostic bands: 11 bands for the invasive species and 5 bands for the domestic species, were determined.

Keywords: Genetic analysis, RAPD, marker, oyster, alien species

GİRİŞ

Antartika ve bazı Okyanus adaları hariç bütün dünya deniz kıyılarında dağılım gösteren (Gunter, 1950), yetiştiriciliği ve avcılığı oldukça yoğun bir biçimde yapılan Ostreidae familyasına ait türler yüksek ekonomik öneme sahiptir. İstiridyeye yetiştiriciliği alanındaki ilk çalışmalar 17. yüzyılda Japonya'da başlamıştır. Bu familya içerisinde *Crassostrea* sp. ve *O. edulis* yetiştiricilik açısından ticari öneme sahip türlerin başında gelmektedir (Lök, 2000). Türkiye kıyılarında en yaygın görülen istiridyeye türü olan Avrupa istiridyesi (*O. edulis*) olmakla birlikte son yıllarda İndo-Pasifik kökenli *Crassostrea gigas* (Pasifik istiridyesi) türünün İldır-Çeşme kıyılarında varlığı tespit edilmiştir (Doğan vd., 2007). İndo-Pasifik türlerin yetiştiricilik, avcılık ve pazarlama açısından taşıdıkları ekonomik katma değere karşı, doğal populasyonların gen havuzunun korunmasında tehdit unsuru oluşturuyor olmaları takip edilmesi gereken konuların başında gelmektedir (Acarlı vd., 2015).

İndopasifik türler Akdeniz'e ticari deniz taşımacılığı, akuakültür ve diğer insan aktiviteleriyle giriş yapmaktadır (Crocetta vd., 2015). Akdeniz faunası, Atlantik ve Süveyş

kanalından gelen istilacı türler ile yoğun bir etkileşim içindedir. Çınar vd. (2011) Türkiye denizlerinde 400 adet istilacı türün varlığını bildirmişlerdir ve bunlar içinde yumuşakçalar 105 türle en başta gelmektedir. Ostreidae familyasına ait türlerden *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas* ve *Saccostrea cucullata* türlerinin Türkiye denizlerindeki varlığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Çınar vd., 2011; Öztürk vd., 2014; Acarlı vd., 2015).

Doğal populasyonların sahip olduğu genetik çeşitliliğin tespiti yetiştiricilik, ıslah çalışmaları ve populasyon genetiği çalışmaları açısından önemlidir. Selektif çalışmaların etkin bir biçimde devam ettirilebilmesi doğal populasyonların korunmasına bağlıdır. Bu sebeple, istilacı türlerin, genetik açıdan tanımlanması, doğal populasyonların genetik çeşitliliğine olan etkisinin tespiti, hibritleşme vb. etkileşimlerin takip edilmesi gerekmektedir. Genetik belirteçler, taksonomik ve populasyon genetiği çalışmalarında, hatta larval aşamada dahi karşılaşılan tür tanımlama sorunlarının çözülmesinde

yardımcı olan önemli moleküler elemanlardır (Klinbunga vd., 2001).

Farklı türlerin ayırımında morfolojik ölçümlerin yanı sıra moleküler genetik yöntemler etkin bir biçimde kullanılmaktadır. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) sayesinde; RAPD, RFLP, mtDNA ve mikrosatellitler gibi moleküler belirteçler yardımıyla tür ayırımı ve taksonomik çalışmalar daha kolay ve kesin bir biçimde ortaya konulabilmektedir. RAPD yöntemi ise önceden gen dizisinin bilinmesini gerektirmemesi, kolay ve ucuz bir yöntem olması sayesinde bitkisel ve hayvansal örneklerde, genetik farklılıkların ortaya konmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (İlhak ve Arslan, 2007). RAPD yöntemi kolay uygulanabilir olmasının yanında, aynı zamanda incelenen organizmanın genomuna ait bir bilgiye önceden ihtiyaç duyulmaması nedeniyle de oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Williams vd., 1990; David ve Savini, 2011). Bu yöntem sayesinde çok sayıda birey ve çok sayıda lokus aynı anda incelenebilmektedir (Liua ve Cordesb, 2004). Yetiştiriciliği yapılan Pasifik istiridyesi popülasyonlarında genetik uzaklık ve genetik çeşitliliğin belirlenmesinde RAPD markerleri kullanılmaktadır (Aranishi ve Okimoto, 2004; Toro ve Gonzalez, 2009). Taksonomik ve filogenetik çalışmalarda (Atienzar ve Jha, 2006; Sleem ve Ali, 2008) ve anaç popülasyonları oluşturma çalışmalarında; karar vermeyi güçlendirici bir yöntem olan RAPD'den yararlanılmaktadır (Bilgen vd. 2007). Klinbunga vd. (2001) *Crassostrea*, *Saccostrea* ve *Striostrea* türlerinin taksonomik olarak türe-özgü olarak tanımlanmasında RAPD ve RFLP belirteçlerinin kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

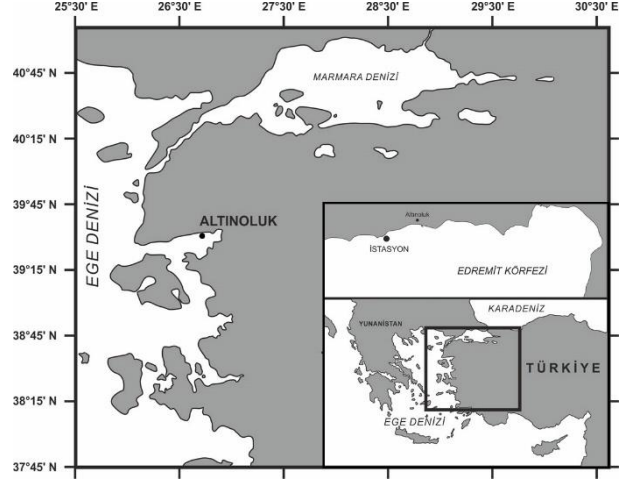
RAPD belirteçlerinin kullanıldığı diğer bir alan gıda işleme sektörüdür. Özellikle insan gıdası olarak tüketime uygun olmayan ve duyuşal testlerle et türünü ayırt etmenin mümkün olmadığı durumlarda, moleküler yöntemler önemli yardımcılardır (İlhak ve Arslan, 2007). RAPD tekniği insan gıdası olarak tüketilen kırmızı et, kanatlı eti (Koh vd., 1998) ve midye eti gibi ekonomik değere sahip olan ürünlerin genetik olarak ayırt edilmesinde etkin bir biçimde kullanılmaktadır (Rego vd., 2002). Ayrıca genotoksisite ve karsinogenezis çalışmalarında istiridyeye, midye gibi çift kabuklu türleri, RAPD yöntemiyle biyo-marker olarak kullanılmaktadır (Atienzar ve Jha, 2006; Farhadi vd. 2011).

Bu çalışmada 10 adet RAPD primeri yardımıyla, *O. edulis* ve *Crassostrea* genusuna ait olduğu düşünülen örnekler için PZR yöntemiyle genetik açıdan farklılıklar olup olmadığı incelenmiştir. RAPD ürünlerinin kabuklu tür ayırt etme durumu değerlendirilmiştir.

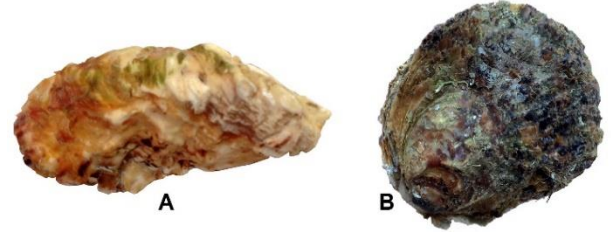
MATERYAL VE METOT

Araştırma kapsamında istiridyeye örnekleri Balıkesir-Altınoluk bölgesinde, 39°33'25.1"N K 26°42'12.7"D koordinatlarında (Şekil 1) 20 metre derinlikten dalarak toplanmıştır. Toplanan istiridyeye örnekleri içerisinde Türkiye kıyılarının yaygın türü olan *Ostrea edulis* yanında *Crassostrea* genusuna morfolojik olarak benzeyen bireyler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Morfolojik yapıları farklılık gösteren istiridyeye bireyleri birbirinden ayrılarak 2 grup oluşturulmuştur. Toplam 10 adet istiridyeye örneği (Şekil

2) -20°C'de dondurulmuştur. Addüktör kasından alınan dokulardan (20-40 mg) DNA izolasyonu amacıyla; ticari kit ve tuz izolasyonu (Aljanabi and Martinez, 1997) yöntemleri olmak üzere iki farklı protokol denenmiştir. İzole edilen genomik DNA örneklerinin, miktar ve saflıkları spektrofotometre ile ölçülerek eşit konsantrasyonlara sulandırılmıştır.



Şekil 1. Örnekleme yapılan istasyon
Figure 1. Sampling station



Şekil 2. *Crassostrea* sp. (A), *O. edulis* (B)
Figure 2. *Crassostrea* sp. (A), *O. edulis* (B)

10 adet 10 bazlık RAPD primeri (Tablo 1) rastgele olarak tercih edilmiştir (Aranishi ve Okimoto, 2004). PZR karışımı Atienzar vd. (2000)'e göre hazırlanmıştır. Buna göre toplam 15 µl olan PCR reaksiyon hacmi; 0,2 ng DNA, 10X Taq tamponu, 2µM primer, 2 mM MgCl₂ (50 mM), 0,33 mM dNTPs, 2,5 µg/µl BSA, 0,08 unit Taq DNA polimeraz (5 U/µl-Geneaid) ve ultra saf suyla hazırlanmıştır. PZR'la DNA'nın çoğaltma işlemi sırasında için başlangıç denatürasyon sıcaklığı: 95°C'de 5 dak, bunu takip eden 95°C'de 45 sn, 48°C'de 45 sn ve 74°C'de 1 dak olan 40 döngü ve son bir döngü 95°C'de 1 dak, 50°C'de 1 dak ve 74°C'de 1 dak olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Farhadi vd., 2011). Bütün primerler için aynı bağlama sıcaklığı (48°C) kullanılmıştır. PZR işleminin optimizasyonu sırasında, DNA miktarları; 0,2-0,8 ng/µL olmak üzere farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Ayrıca farklı Taq polimeraz ve MgCl₂ (2 mM, 3 mM, 4 mM ve 5 mM) miktarları denenmiştir.

PZR ürünleri, %1.5'lük 0.5X'lik TAE (Tris-EDTA-Asetik Asit, pH:8) tamponuyla hazırlanan agaroz jelde yürütülmüş ve boya olarak RedSafe (Intron) kullanılmıştır. Elektroferez işlemi 180 voltta ve yaklaşık 2 saat süreyle yapılmıştır. Daha sonra jellerin fotoğrafı UV görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat- ECX-F26-M) yardımıyla çekilerek değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tablo 1. RAPD primer dizileri

Table 1. Sequences of RAPD primers

	Primer	Sekans (5'- 3')
1	GEN13	ACGGTGCCTG
2	GEN15	GAGATCCGCG
3	GEN19	TGCAGCACCG
4	GEN20	CAGACACGGC
5	GEN23	GTGTAGGGCG
6	GEN24	CGGGTCGATC
7	GEN27	GAGACCTCCG
8	GEN30	TGCACGGACG
9	GEN31	TCCCTGTGCC
10	GEN33	GAGACGTCCC

BULGULAR

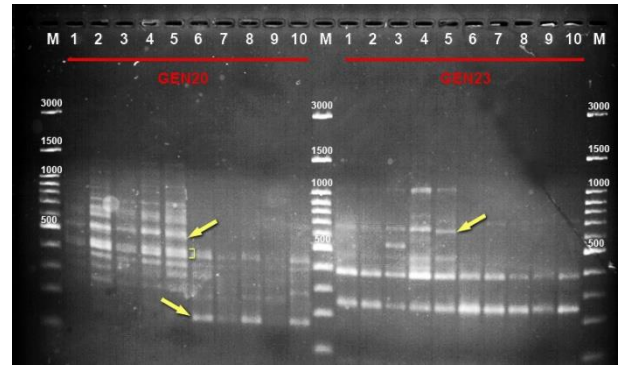
Çalışmada iki farklı DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Ticari kitle yapılan izolasyon sonucu elde edilen örneklerde, universal tuz izolasyon yöntemine göre nispeten daha az miktarda DNA elde edilmiştir. Uzun süre -20°C'de saklanan örneklerde tuzla yapılan izolasyon, kite göre daha iyi sonuç vermiştir. PZR için, MgCl₂ miktarı 2mM ve DNA için 0.2 ng/μL olan karışımda ve 48°C bağlanma sıcaklığında en optimum sonuçlar alınmıştır.

İki farklı tür olduğu gözlemlenen örneklerde 10 adet oligonükleotid primeri yardımıyla her bir populasyondan örneklenen 5'er bireye ait bant desenleri analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda toplam 343 adet RAPD bantı (140-1400 bp) elde edilmiştir (Tablo 2). GEN13 (8 bant), GEN19 (5 bant), GEN20 (9 bant), GEN23 (7 bant), GEN24 (9 bant), GEN27 (7bant), Gen30 (9 bant), GEN33 (10 bant) olmak üzere sırasıyla; 50, 28, 48, 37, 51, 43, 41 ve 45 adet RAPD genotipi elde edilmiştir. *Crassostrea* sp. örneklerinde, Avrupa istiridyesine göre daha fazla polimorfizm bulunmuştur (Tablo 3). Her iki tür için de polimorfizm GEN27 ve GEN30 (Şekil 6) lokuslarında görülmüştür. GEN19, GEN23, GEN24 ve GEN33 (Şekil 3, 4, 5 ve 7) sadece *Crassostrea* sp.'de polimorfik bant desenleri göstermiştir. GEN13 ve GEN20 (Şekil 3 ve 4) her iki türde ve GEN23, GEN24, GEN33 (Şekil 4, 5 ve 7) ise sadece *O. edulis*'te monomorfik bantlar vermiştir. GEN15 için her iki türde de yapılan PZR denemeleri sonucunda ürün elde edilememiştir. GEN31'de ise okunabilir net bantlar elde edilememiştir (Şekil 7).



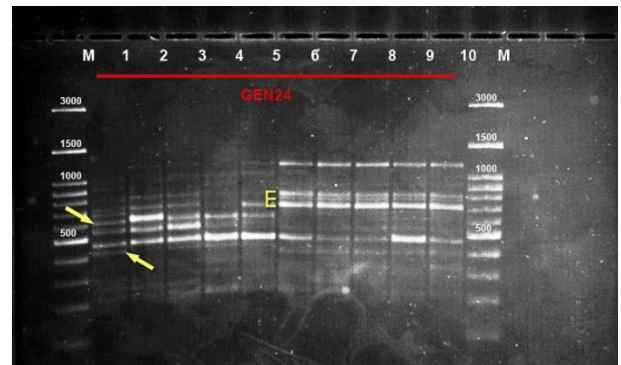
Şekil 3. *Crassostrea* sp. örnekleri (1, 2, 3, 4, 5), *O. edulis* örnekleri (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

Figure 3. The samples of *Crassostrea* sp. (1, 2, 3, 4, 5), The samples of *O. edulis* (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)



Şekil 4. The samples of *Crassostrea* sp. (1, 2, 3, 4, 5), the samples of *O. edulis* örnekleri (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

Figure 4. The samples of *Crassostrea* sp. (1, 2, 3, 4, 5), the samples of *O. edulis* (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)



Şekil 5. *Crassostrea* sp. örnekleri (1, 2, 3, 4, 5), *O. edulis* örnekleri (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

Figure 5. The samples of *Crassostrea* sp. (1, 2, 3, 4, 5), the samples of *O. edulis* (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

Elde edilen jel görüntülerine bakıldığında GEN13, GEN19, GEN20, GEN23, GEN24 ve GEN33 lokuslarının her iki türü ayırt etmede oldukça net bant desenleri verdiği görülmüştür.

GEN27 ve GEN30 lokuslarının ayırım gücünün daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6. *Crassostrea* sp. örnekleri (1, 2, 3, 4, 5), *O. edulis* örnekleri (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

Figure 6. The samples of *Crassostrea* sp. (1, 2, 3, 4, 5), the samples of *O. edulis* (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)



Şekil 7. *Crassostrea* sp. örnekleri (1, 2, 3, 4, 5), *O. edulis* örnekleri (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

Figure 7. The samples of *Crassostrea* sp. (1, 2, 3, 4, 5), the samples of *O. edulis* (6, 7, 8, 9, 10), 100 bp Ladder (M)

GEN13, GEN20, GEN24 ve GEN30 lokuslarında *Crassostrea* sp. için türe-spesifik toplam 11 adet bant belirlenmiştir (Tablo 4) (Şekil 3, 4, 5 ve 6). *O. edulis* için GEN20 ve GEN24 lokuslarında toplam 5 adet türe-özgü bant elde edilmiştir (Tablo 4) (Şekil 4 ve 5).

Tablo 2. Çalışma sonucu çoğaltılan bant büyüklük ve sayıları
Table 2. Sizes and number of amplified bands on this study

Primer	<i>Crassostrea</i> sp.		<i>O. edulis</i>	
	Bant Sayısı	Bant Aralığı (bp)	Bant Sayısı	Bant Aralığı (bp)
GEN13	7	200-790	3	160-310
GEN15	-	-	-	-
GEN19	2-5	270-960	2	270-460
GEN20	7	250-700	4	180-380
GEN23	5-7	245-1020	2	245-390
GEN24	3-6	420-800	5	310-1200
GEN27	4-6	260-930	4-5	140-500
GEN30	4-7	160-800	2-4	160-600
GEN33	6-10	200-1400	3	200-370

Tablo 3. Primerlere ait ortalama bant sayıları, polimorfik ve monomorfik bant oranları ve polimorfik bant oranları

Table 3. Average number of bands per primer, numbers of monomorphic/polymorphic fragments and the percentage of polymorphic bands

Tür	Primer Başına Düşen Ort. Bant. Sayısı	Monomorfik Bant/ Polimorfik Bant	Polimorfik Bant (%)
<i>Crassostrea</i> sp.	27.25	67/151	69.2
<i>O. edulis</i>	15.625	32/93	25.6

Tablo 4. Türe-özgü diagnostik belirteçler

Table 4. Species-specific diagnostic markers

Tür	Primer	RAPD belirteçleri (bp)
<i>Crassostrea</i> sp.	GEN13	480, 530, 590, 680
	GEN20	520, 600, 700
	GEN24	420, 600
	GEN30	600, 700
<i>O. edulis</i>	GEN20	180
	GEN24	450, 700, 750, 800

TARTIŞMA VE SONUÇ

İstiridyelerde tür ayırımı, tür içi ve türler arası farklılıkların moleküler markerlerle tespitiyle ilgili dünyada pek çok çalışma yapılmaktadır (Klinbunga vd., 2000; Lam ve Morton, 2003; Crocetta vd., 2014). İstiridyelerin taksonomik olarak sınıflandırılmasında, sadece morfolojik ölçümlerle yapılan tanımlamalar, yetersiz kalmaktadır (David ve Savini, 2011). İstiridyelerin, yüksek oranda eko-morfolojik varyasyona sahip olmalarından dolayı, tür ve alt tür ayırımlarında genetik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Hare ve Avise, 1998). Türkiye denizlerinde istilacı istiridye türleri yoğun olarak görülmektedir (Çınar vd., 2011), fakat bu türlerin moleküler düzeyde tanımlanması ile ilgili çalışmalar oldukça azdır (Acarlı vd., 2015b; Crocetta vd., 2015). Bu çalışmada istilacı bir tür ile yerel türün DNA parmak izleri, RAPD belirteçleri kullanılarak çıkartılmış ve karşılaştırılmıştır. RAPD markerleri, ele alınan türün genomu hakkında önceden bir bilgi mevcut olmadığında, genetik ayırt etmede ilk etapta ele alınabilecek çok kullanışlı belirteçlerdendir (Liua ve Cordesb, 2004). Analiz sonuçlarına göre 11 adet *Crassostrea* sp. ve 5 adet *O. edulis* için türe-özgü diagnostik toplam 16 adet bant tespit edilmiştir. Klinbunga vd. (2000) *C. belcheri*, *C. İredalei*, *S. Cucullata* ve tanımlanamayan 2 grup *Crassostrea* sp. ve *Saccostrea* sp. için türe-özgü diagnostik 15 adet RAPD bantı tespit etmişler ve elde edilen sonuçlara göre bu taksonomideki genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sleem ve Ali (2008) tatlı su çift kabuklularında yaptıkları çalışmada, 13 adet rastgele RAPD primerlerinden 5 tanesinin okunabilir (1-3 bant) bantlar verdiğini ve RAPD belirteçlerinin filogenetik analizlerde kullanılabilecek oldukça kullanışlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğin ve mesafenin hesaplanması için polimorfik belirteçlere ihtiyaç

vardır. Aranishi ve Okimoto (2004) *Crassostrea gigas*'a ait iki ticari popülasyonda genetik mesafeyi RAPD yöntemiyle araştırmışlar ve ele aldıkları 46 primerden 5 tanesini polimorfik bulmuşlardır. Bu çalışmada ise *Crassostrea* sp. için ele alınan 8 primerden 6 tanesi, *O. edulis* içinse 2 tanesi polimorfik bulunmuştur. Lokal türdeki polimorfik bantların düşük bulunmasının sebebinin, *O. edulis*'in döllenme şekli kaynaklandığı düşünülmektedir. Polimorfizm genetik çeşitliliğin bir göstergesidir ve türün üreme özelliğinden doğrudan etkilenir (Lapéque vd., 2008). Bu çalışma, sonuçlarına göre ileride yapılacak çalışmaların planlanmasında referans olabilecek niteliktedir ve tespit edilen polimorfik belirteçler, her iki türü de ele alan popülasyon genetiği çalışmalarında faydalı olacaktır.

RAPD çalışmalarında MgCl₂, DNA konsantrasyonu, primer bağlanma sıcaklığı ve dizilişleri, PZR ürünü elde edilmesini doğrudan etkilemektedir (Lee ve Chang, 1994). Ayrıca RAPD yönteminin bir laboratuvarında uygulandığı şekliyle, başka laboratuvarlarda tekrar edilebilirliğinin nispeten daha düşük olması, uygulanan protokolün tekrarlanarak çok iyi standardize edilmesini gerektirmektedir. RAPD yönteminde karşılaşılan sorunlar agaroz konsantrasyonu artırılarak veya poliakrilamid jel sistemleriyle giderilebilir (Oliveria vd., 2010). Atienzar vd. (2000) yüksek bağlanma sıcaklığı ve uygun PZR konsantrasyonu ile filogenetik olarak farklı gruplardan olan organizmaları, aynı primerlerle ayırt etmeye yarayan yüksek kaliteli RAPD profilleri elde edilebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da PZR için optimizasyon yapılırken kullanılan DNA miktarı ve MgCl₂ azaltılmıştır. Bu sayede verimli bantlar elde edilmiştir.

Türkiye istiridyeye ve diğer çift kabukluların yetiştiriciliği açısından çok avantajlı bir konumda bulunmaktadır. Sürdürülebilir yetiştiricilik ve avcılık çalışmaları için Türkiye'deki denizlerde bulunan doğal popülasyonların sahip olduğu gen kaynaklarının korunması çok önemli bir konudur. Diğer taraftan İndo-Pasifik türler arasında ticari açıdan değerli olan türlerin de yetiştiricilik vb. ekonomik açıdan değerlendirilmesi söz

konusudur. Bu çalışmaların kontrollü bir şekilde yapılabilmesi için genetik markerlerden (DNA barkodlama, mikrosatellitler, AFLP, RFLP, RAPD vb.) destek alınması gerekmektedir. Marmara ve Ege denizlerinde Pasifik istiridyesi (*Crassostrea gigas*) ve Japon akivadesi (*Ruditapes philippinarum*) varlığı tespit edilmiştir (Acarlı vd., 2015a; Acarlı vd., 2015b). Bu çalışma ile Ege Denizi'nin kuzeyinde yer alan Altınoluk Körfezi'nde de dağılım gösteren ve *Crassostrea* genus'una ait olduğu düşünülen türün genetik olarak *O. edulis*'ten farklılık gösterdiği 8 adet RAPD markeriyle ortaya konmuştur. *Crassostrea* sp. gibi ekonomik önem taşıyan çift kabuklu türlerinin, larval aşamada tanımlanması, yetiştiriciliğe adapte edilmesi ve seleksiyon çalışmalarının yürütülmesinde moleküler markerlerin kullanımı gerekmektedir (Klinbunga vd., 2000; David ve Savini, 2011). Bu çalışmada optimize edilen RAPD-PZR yöntem bilgisi, polimorfik ve spesifik marker bilgileri sayesinde, çift kabuklu et ürünlerinin genetik olarak ayırt edilmesinde ve su kirliliği alanında biyo-marker belirleme çalışmalarında literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Atienzar ve Jha. (2006) çalışmalarında RAPD belirteçlerinin biyo-marker olarak kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Çalışmada ele alınan belirteçlerin, ileride yapılacak olan yakın genoslara ait türlerin ayırılmasında ve popülasyon genetiği çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılabilirliği tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu makale bir bölümü, XVIII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu'nda (1-4 Eylül, 2015) poster olarak sunulmuştur. Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı 2001/SUF/039 numaralı proje tarafından desteklenmiştir. Araştırma kapsamında arazi çalışmalarının yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Altan Lök ve Arş. Gör. Aytaç Özgül'e ayrıca şekiller dizininin düzenlenmesindeki yardımlarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Levent Yurga'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKÇA

- Acarlı, S., Yıldız H., Gökçek Ö.E., Karahan, B., Lök, A., Vural, P., Gündüz, F. & Aydın, S. (2015a). Türkiye'de, Marmara, Ege ve Akdeniz Kıyılarındaki Yerli Akivades (*Ruditapes decussatus*) Popülasyonları ile İstilaçı Japon Akivadesi Popülasyonlarının (*Ruditapes philippinarum*) Morfolojik ve Genetik Yapılarının İncelenmesi. 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyum Kitabı (1-4 Eylül 2015, İzmir), 482 (Poster Sunum)
- Acarlı, S., Yıldız H., Gökçek Ö.E., Karahan, B., Lök, A., Vural, P., Gündüz, F. & Aydın, S. (2015b). Bandırma Körfezi İstiridyeye Popülasyonunu PCR Tabanlı Yöntemlerle İncelenmesi. 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyum Kitabı (1-4 Eylül 2015, İzmir), 483 (Poster Sunum)
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22): 4692-4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
- Aranishi, F., & Okimoto, T. (2004). Genetic Relationship between Cultured Populations of Pacific Oyster Revealed by RAPD Analysis. *Journal of Applied Genetics*, 45: 435-443. doi: 10.1007/BF03194632
- Atienzar, F., Evenden, A. J., Savva, D. & Depledge, M. (2000). Optimized RAPD analysis generates High Quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *BioTechniques*, 28(1): 52- 53.
- Atienzar, F.A., & Jha, N.A. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research*, 613, 76- 102. doi: 10.1016/j.mrev.2006.06.001
- Bilgen, G., Akhan, S., Arabacı, M., & Oğuz, İ. (2007). Genetic Diversity of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Broodstocks as Determined by RAPD-PCR. *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgah*, 59 (4): 217- 233.
- Crocetta, F., Mariottini, P., Salvi, D., & Oliverio, M. (2015). Does GenBank provide a reliable DNA barcode reference to identify small alien oysters invading the Mediterranean Sea? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(1): 111-122. doi: 10.1017/S0025315414001027
- Çınar, M.E., Bilecenoğlu, M., Öztürk, B., Katağan, T., Yokeş, M.B., Aysel, V., Açık, S., Dağlı, E., Özcan, T. & Erdoğan, H. (2011). An updated review of

- alien species on the coasts of Turkey. *Mediterranean Marine Science*. *Mediterranean Marine Science*, 12(2): 257-315.
- David, D.C. & Savini, D. (2011). Molecular Approaches to Bivalve Population Studies: A Review. *Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza", Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*, TOM XII, 1-14.
- Doğan, A., Önen, M. & Öztürk, B. (2007). Ildır Körfezi (İzmir-Çeşme) Bivalvia (Mollusca) Faunası. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3-5 (5-8): 27-35.
- Farhadi, A., Farahmand, H., Mirvaghefi, A., & Khalili, B. (2011). A Genotoxicological Study in Persian Gulf on Rock Oyster (*Saccostrea cucullata*) using Micronuclei and RAPID Assays. *International Journal of Environmental Research*, 5(2): 567-572.
- Gunter, G. (1950). The generic status of living oysters and scientific name of the common American species. *American Midland Naturalist*, 43 (2):438-449.
- Hare, M.P. & Avise, J.C. (1998). Population structure in the American oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Molecular Biology Evolution*, 15:119-128.
- İlhak, O.İ. & Arslan, A. (2007). Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Yöntemiyle Kanatlı Etlerinde Tür Tayini. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 21 (4): 167-171.
- Klinbunga, S., Amparyup, P., Khamnamtong, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. & Yoosukh W. (2000). Molecular Genetic Markers for Taxonomy of Oysters in Thailand. *Fisheries Science*, 68(2): 1087-1090.
- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. & Yoosukh, W. (2001). Genetic diversity and molecular markers of commercial oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand determined by RAPD analysis. *Marine Biotechnology*, 3, 133-144. doi: [10.1007/s101260000057](https://doi.org/10.1007/s101260000057)
- Koh, M.C., Lim, C.H., Chua, S.B., Chew, S.T. & Phang, S.T.W. (1998). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*, 48, 275-285. doi:[10.1016/S0309-1740\(97\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00104-6)
- Lam, K. & Morton, B.(2003). Mitochondrial and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: *Ostreidae*) cultured for centuries in Peral river Delta, Hong- Kong, China. *Aquaculture* 228: 1-13.
- Lapègue S., Beaumont A., Boudry P., & Gouletquer P. (2008). European flat oyster – *Ostrea edulis*. *Genimpact final scientific report*, (s. 70-76).
- Lee, C.J. & Chang, G.J. (1999). Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Science International*, 67, 103-107.
- Liu, Z.J. & Cordesb, J.F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1– 37. doi: [10.1016/j.aquaculture.2004.05.027](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027)
- Lök, A. (2000). İstiridye Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri. T.C.Tarım Orman ve Köyşleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ticari Balık Türlerinin Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri Hizmet İçi Eğitim Seminer Eğitim Kitapçığı, Ankara: 102-121 (çağrılı bildiri)
- Oliveria, A.L.D., Da Silva, D., Manzano, B.C., Abdel-Hamid, A.Z., Marcelino, M.Y., Zanotti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A. & Ribeiro-Paes, J.T. (2010). Genetic differences between strains of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) that are susceptible and unsusceptible to schistosomiasis. *Genetics and Molecular Research* 9 (3): 1450-1459. doi: [10.4238/vol9-3gmr821](https://doi.org/10.4238/vol9-3gmr821)
- Öztürk, B., Doğan, A., Bitlis-Bakır, B. & Salman, A. (2014). Marine molluscs of the Turkish coasts: an updated checklist. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 832-879. doi: [10.3906/zoo-1405-78](https://doi.org/10.3906/zoo-1405-78)
- Rego, I., Martinez, A., Gonzalez-Tizon, A. G., Vieites, J., Leira, F. & Mendez, J. (2002). PCR Technique for Identification of Mussel Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1780-1784.
- Sleem, H.S. & Ali G.T. (2008). Application of RAPD-PCR in Taxonomy of Certain Freshwater Bivalves of Genus *Caelatura*. *Global Journal of Molecular Sciences*, 3 (1): 27- 31.
- Toro, J.E. & Gonzalez, C.P. (2009). The genetic structure of the Chilean oyster (*ostrea chilensis* Philippi, 1845) in natural populations of southern Chile on RAPDs analysis. *Revista de Biología Marina Oceanografía*, 44 (2): 467-476.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Yoosukh, W. & Duangdee, T. (1999). Living Oysters in Thailand. *Phuket Thailand: Phuket Marine Biological Center*, 19: 363- 370.