



MAKÜ FEBED
ISSN Online: 1309-2243
<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/makufebed>

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 6(1): 31-35 (2015)
The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University 6(1): 31-35 (2015)

Araştırma Makalesi / Research Paper

Antalya Bölgesindeki İstilacı Bir Salyangoz Türünün Moleküler Filogenisi

Ayşe Gül MUTLU^{1*}, Abdülkerim BİLGİNER¹, Muzaffer DÜKEL¹, Ümit KEBAPÇI¹, Duygu Ceren ÇAĞLAN¹,
Mehmet Zeki YILDIRIM²

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Burdur
² Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 14.12.2015, Kabul Tarihi (Accepted): 29.12.2015

✉ Sorumlu Yazar (Corresponding author)*: agmutlu@gmail.com

☎ +90 248 2133035 📠 +90 248 2133099

ÖZ

Antalya civarında istilacı özellik gösteren bir salyangoz türünün moleküler sistematik açıdan incelenmesi çalışmanın amacıdır. Çalışmada, filogenetik karşılaştırmalar için çok kullanışlı olan mtDNA'nın COI gen bölgesi incelenmiştir. Filogenetik analizler, Neighbor-Joining (NJ) ve Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA) modeline göre MEGA 4 programında gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Elimizdeki örnekler, *Xeropicta derbentina* türüne benziyor olmasına rağmen, oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde, *X. derbentina* türü ile farklı dallarda yer aldığı görülmektedir. Bu bilgiler ışığında Antalya bölgesinden toplanan bu istilacı salyangoz türünün, morfolojik çalışmalar da yapıldıktan sonra yeni bir tür olarak kabul edilebileceği ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Gastropoda, *Xeropicta*, COI, Antalya, Filogeni

Molecular Phylogeny of an Invasive Snail Species in Antalya Region

ABSTRACT

The aim of this study is molecular investigation of an invasive snail species in Antalya region. COI gene sequences in mtDNA was used in our research. COI gene is useful parameter for phylogenetic comparisons. Phylogenetic analysis was achieved by MEGA4 programme with Neighbor-Joining (NJ) and Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA) models. Although our samples resemble *Xeropicta derbentina*, it seems to be a different species in phylogenetic tree. According to these results this invasive snail species may approve as a new species after morphological studies.

Keywords: Gastropoda, *Xeropicta*, COI, Antalya, Phylogeny

GİRİŞ

Gastropodlar yumuşakçalar içinde en yüksek ekolojik ve morfolojik çeşitliliği gösteren sınıftır (Kurabayashi and Ueshima, 2000). Halk arasında sümüklüböcek veya salyangoz olarak isimlendirilen Gastropoda (ka-

rındanbacaklılar) sınıfı üyeleri kabuklu ve kabuksuz salyangozları kapsayan asimetrik yapılu yumuşakçalardır. Genelde sarmal kabukları vardır. Eklembacaklılar'dan sonra en kalabalık ikinci omurgasız hayvan şubesi olan Mollusca'nın (Yumuşakçalar) 80.000 türü bu sınıfa ait olup, bunlardan 31.643 deniz, 8.735 tatlısu ve 24.503

kara olmak üzere 65.000 türün sistematikteki yeri belirlenmiştir (Kebapçı, 2007).

Taksonomi, taksonlar arasındaki benzerlik ve farklılıkların ifade edilmesi, taksonların tanımlanması, yeni taksonların isimlendirilmesi ve uygun bir sınıflandırma sistemi içerisinde verilmesi konularını kapsar. Türler arasındaki taksonomik ilişkileri incelemek, türlerin morfolojik, fizyolojik, ekolojik ve coğrafik yayılış alanlarının da incelenmesini gerektiren çok yönlü kompleks bir iştir. Biyolojik çeşitliliğin ortaya çıkartılmasının yanı sıra, türlerin evrimsel süreçleri de ortaya çıkartılır (Henning, 1965; Sereno, 2005; Godfray et al., 2007).

Moleküler biyoloji ve bu alanda kullanılan tekniklerin son yıllarda gelişimi ile birlikte canlılar arasında moleküler düzeydeki farklılıklar da net olarak ifade edilmeye başlanmış, türler ve populasyonlar arasındaki çeşitliliğin belirlenmesinde genetik teknikler yoğun bir şekilde kullanılmıştır (Dükel, 2010; Patwardhan et al., 2014). mtDNA'ya ait gen bölgeleri filogenetik ve evrim çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. mtDNA verileri tür seviyesindeki belirlemelerde çok etkili olabilir (Patwardhan et al., 2014). Mitokondrial genom içerisinde sistematik çalışmalarda en yaygın kullanılan gen bölgelerinden biri sitokrom oksidaz 1 (COI) genidir (Remigio and Hebert, 2003; Liu et al., 2003). mtDNA'nın COI ve COII gen bölgesi filogenetik çalışmalar için çok kullanışlıdır. Hem türler arası, hem de cins ve familya düzeyindeki tanımlamalarda kullanılabilirler. COI, yaklaşık 894 bp lik bir gen bölgesidir. Diğer protein kodlayan mitokondrial gen bölgelerine göre daha yavaş evrimleşir (Patwardhan et al., 2014).

Bu çalışmada Antalya ili civarında istilacı bir özellik gösteren ve morfolojik benzerliği yüzünden *Xeropicta derbentina* olduğu düşünülen bir salyangoz türünün moleküler sistematik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır. *Xeropicta derbentina*'nın adaptasyon yeteneği ve yayılmacı potansiyeli, bu salyangozların istilacı potansiyellerinin yüksek olması sonucunu açığa çıkarır (Aubry et al., 2005).

Xeropicta derbentina'nin sınıflandırması aşağıdaki şekildedir (Krynicky, 1836);

Phylum	:Mollusca
Classis	:Gastropoda
Subclassis	:Orthogastropoda
Ordo	:Pulmonata
Superfamilya	:Helicoidea
Familya	:Hygromiidae
Genus	: <i>Xeropicta</i>
Scientific name	: <i>Xeropicta derbentina</i>

MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan salyangozlar Antalya ili Akdeniz Üniversitesi kampus alanından toplanmıştır. Toplama işlemi nemli yerlerde bulunan taşların üzerinden elle toplama yoluyla gerçekleştirilmiştir. Örnekler %80'lik alkol içeren şişelerde -21 °C de derin dondurucu içinde muhafaza edilmiştir.

DNA İzolasyonu, PCR ve DNA Dizi Analizi

DNA'nın izole edilmesinde kullanılan CTAB prosedürü, Wilke' ye (2006) göre yapılmıştır. Türler arası genetik farklılığın belirlenmesi ve sistematik ağaçlarının oluşturulması için mitokondrial DNA COI (sitokrom oksidaz I) gen bölgesi kullanılmıştır. PCR için termal parametreler aşağıda gösterildiği gibidir. PCR işlemi için SIGMA Taq Ready Mix kullanılmıştır. Primerler Folmer vd tarafından dizayn edilen (1994) ve omurgasızlar için universal primerler olan LCO1490 ve HC02198'dir. PCR analizi, 94 °C da 15 saniye, 52 °C da 45 saniye, 72 °C da 60 saniye ve 25 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi, İntek (İstanbul) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

DNA sekans analizi sonucu elde edilen 3 örneğe ait COI gen bölgesi dizilimi üzerinde BioEdit programı ile kesme ve hizalama işlemleri yapılmıştır. 700 bç uzunluğundaki fragmentlerin başlangıç ve bitiş kısımları kesilerek çıkarılmıştır. Düzeltme işlemleri sonrasında her örnek için mtDNA COI geninin 523 bazlık kısmı değerlendirilmeye alınmıştır. Örneklerin mtDNA COI geni sekans sonuçları ClustalW programı ile karşılaştırılmıştır. Clustal W programıyla yapılan karşılaştırma sonucu elde edilen sekansların kendi aralarında ve dış grup olan diğer türlerle olan mtDNA COI gen dizilimi benzerlik oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

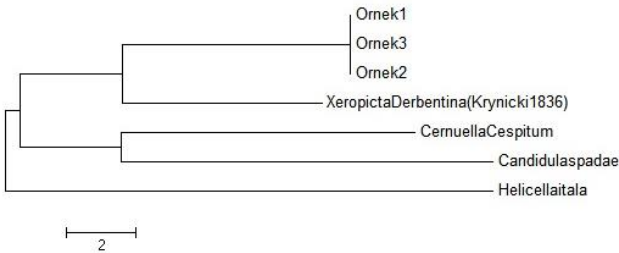
Elde bulunan örneklerin ve dış grupların mtDNA COI genine ait sekans sonuçları incelendiğinde türlerin değişen oranlarda polimorfizme sahip oldukları görülmektedir. Sonuçların benzerlik oranları en sağda yüzde (%) olarak ve karşılaştırılmalı şekilde verilmiştir. Bu çizelgeye göre elimizde bulunan örnek türler en fazla *Xeropicta derbentina* türüyle yüksek benzerlik oranı göstermiştir.

Tablo 1. Clustal W programıyla yapılan karşılaştırılma sonucu elde edilen sekansların kendi aralarında ve dış grup olan diğer türlerle olan mtDNA COI gen dizilimi benzerlik oranları

SeqA	İsim	Uzunluk	SeqB	İsim	Uzunluk	Skor
1	Örnek1	522	2	Örnek2	522	99.0
1	Örnek1	522	3	Örnek3	522	100.0
1	Örnek1	522	4	<i>Cernuella cespitum</i>	522	79.0
1	Örnek1	522	5	<i>Helicellaitala</i>	522	78.0
1	Örnek1	522	6	<i>Candidulaspadae</i>	522	77.0
1	Örnek1	522	7	<i>Xeropicta derbentina</i>	522	86.0
2	Örnek2	522	3	Örnek3	522	99.0
2	Örnek2	522	4	<i>Cernuella cespitum</i>	522	79.0
2	Örnek2	522	5	<i>Helicellaitala</i>	522	78.0
2	Örnek2	522	6	<i>Candidulaspadae</i>	522	77.0
2	Örnek2	522	7	<i>Xeropicta derbentina</i>	522	86.0
3	Örnek3	522	4	<i>Cernuella cespitum</i>	522	79.0
3	Örnek3	522	5	<i>Helicellaitala</i>	522	78.0
3	Örnek3	522	6	<i>Candidulaspadae</i>	522	77.0
3	Örnek3	522	7	<i>Xeropicta derbentina</i>	522	86.0
4	<i>Cernuella cespitum</i>	522	5	<i>Helicellaitala</i>	522	78.0
4	<i>Cernuella cespitum</i>	522	6	<i>Candidulaspadae</i>	522	82.0
4	<i>Cernuella cespitum</i>	522	7	<i>Xeropicta derbentina</i>	522	78.0
5	<i>Helicellaitala</i>	522	6	<i>Candidulaspadae</i>	522	77.0
5	<i>Helicellaitala</i>	522	7	<i>Xeropicta derbentina</i>	522	79.0
6	<i>Candidulaspadae</i>	522	7	<i>Xeropicta derbentina</i>	522	80.0

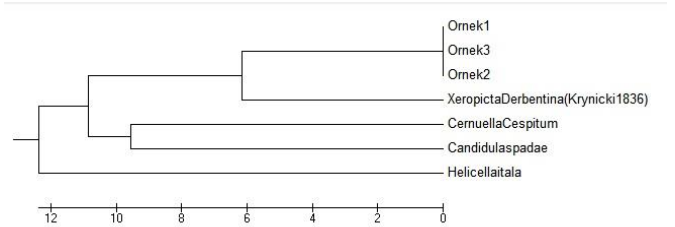
Filogenetik Ağaç

DNA sekanslarının karşılaştırılmasıyla yapılan filogenetik analizler, türler arası ve tür içi evrimsel ilişkileri, canlılar arasındaki genom benzerlikleri ve farklılıkları hakkında bilgi vermektedir. Elimizde bulunan sekans sonuçları BioEdit programıyla gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra RedSeq programı kullanılarak gerekli formatlara çevrilmiştir. Filogenetik analizler K2 parametresi kullanılarak, Neighbor-Joining (NJ) ve Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA) modeline göre MEGA 4 programında gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur (Şekil 1, 2 ve 3). Karşılaştırma yaptığımız tüm dış grupların sekans verilerine Genbank'tan erişim numaralarıyla erişilmiştir.



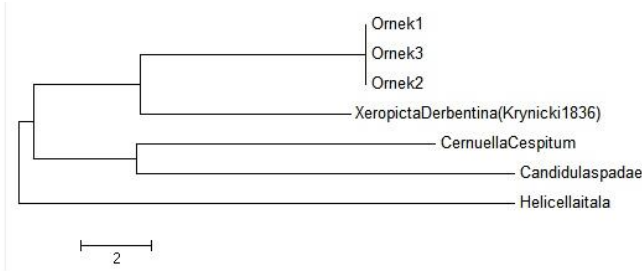
Şekil 1. Örneklerin yakın ve uzak dış gruplar kullanılarak Neighbor Joining (NJ) testi ile elde edilen filogenetik ağacı.

Ağaç incelendiğinde, *Xeropicta derbentina* olduğunu düşündüğümüz elimizdeki örneklerin *X. derbentina* türü ile farklı dallarda yer aldığı görülmektedir.



Şekil 2. Örneklerin yakın ve uzak dış gruplar kullanılarak UPGMA testi ile oluşturduğu filogenetik ağaç.

Bu analizde kullandığımız UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Tartmadan İkili Grup Oluşturma analizi bir takson için uzaklık matrisini kontrol ederken aralarında en küçük uzaklık matrisini baz alır. Neighbor Joining (NJ) analizinde içerik olarak UPGMA kümeleme analiziyle benzer şekilde ancak başka bir genetik uzaklık mantığına (algoritmasına) dayalıdır. Fakat bu metod ağaçların oluşturulmasında benzer verilere sahip taksonların komşu olmasına ve diğer taksonlardan ayrılmasına sonunda da komşuların birbiriyle birleşmesi esasına dayanır (Dükel, 2010).



Şekil 3. Örneklerin yakın ve uzak dış gruplar kullanılarak Minimum Evolution testi ile oluşturduğu filogenetik ağaç.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir türün yaşadığı alanda bulunmasının iki nedeni vardır. Bunlar evrimsel ve ekolojik nedenlerdir. Ekolojik olarak tür yaşadığı habitatın koşullarında yaşamını sürdürecektir ve üreyebilecek uyumlara sahiptir. Evrimsel olarak ise; türün atası orada yaşamıştır ve tür orada oluşmuştur. Ya da tür önce başka yerde oluşmuş yani atası orada yaşamamış sonra oraya taşınmıştır. Akrabalık dereceleri genetik metodlar kullanılarak analiz edilebilir (Ergüden, 2007).

İki popülasyonun ayrı türler olarak değerlendirilebilmesi için birbirinden ne kadar farklı olmaları gerektiği konusunda kesin ifadeler bulunmaz. Türleşmeyi başlatan süreçler hakkında genel olarak kabul gören görüş, coğrafi izolasyonun bu süreçte çok önemli olduğudur. Coğrafi izolasyon yoluyla, iki popülasyon zaman içerisinde farklı selektif baskılara maruz kalacağından farklılaşır. İki popülasyon arasında bağlantı sağlansa bile gen akışının olmayacağı noktada, iki ayrı tür oluşmuştur (Keeton et al., 1999).

Bu çalışmada, Antalya ilinde bahar ve yaz aylarında sayılarını arttıran ve istilacı bir özellik gösteren salyangoz türünün, *X. derbentina* olup olmadığı ve diğer dış gruplara yakınlığının moleküler olarak incelenmesi ve ilişkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan değerlendirme sonucu, *X. derbentina* olduğu düşünülen örneklerin *X. derbentina* türünden genetik benzerlik açısından tür olarak kabul edilecek düzeyde uzak oldukları belirlenmiştir. Antalya'da istilacı özellik gösteren salyangozlardan topladığımız örnekler, UPGMA ve NJ testi analiz sonucu *X. derbentina* ile aynı dalda yer almamıştır. %86 gibi farklı tür olabilecek bir benzerlik oranı da yapılan test sonucu elde edilen bilgiler içindedir (Tablo 1; Şekil 1, 2 ve 3) Zaten bu genetik farklılık örneklerin morfolojisine de etki etmektedir. Toplanan örneklerde dış kabukta koyu renk bantlaşma bulunmaması (düz beyaz renkte) *X. derbentina* türü ile filogenetik ağaçta aynı dalda yer almamasını destekler.

X. derbentina türü Fransa, Hırvatistan, Kuzey Yunanistan, Bulgaristan, Romanya, Kafkaslar ve Türkiye'de bulunan bir türdür (Aubry et al., 2005). Türkiye'de Isparta-Eğirdir, Burdur, Afyon-Acıgöl, Mersin ve Antalya'nın kıyı kesimlerinde bulunmaktadır. Ülkemiz açısından yerli bir tür olmayıp sonradan gelip yerleştiği düşünülmektedir. Antalya'da istilacı özellik göstermiştir. İncelediğimiz salyangoz örneklerinin atalarının, ticaret yollarıyla, ulaşım araçlarıyla, yani insan aracılığıyla gelip Türkiye'ye yerleşmiş *X. derbentina* türüne ait olabileceği ve burada farklı selektif baskılarla evrimleşerek türleşmiş olabileceği ihtimali de söz konusudur.

İstilacı kara salyangozları, tarımsal ve ekonomik açıdan öneme sahip olmakla birlikte, diğer türlerle ilişkileri açısından da ekolojik olarak ayrı bir öneme sahiptir. Bu etkiler hayvanın beslenme şekline göre değişmekle birlikte, istila ettikleri bölgelerdeki diğer türlerin yok olmalarına sebep olmaları veya herbivor olanların tarım arazilerini olumsuz etkilemeleri mümkündür (Aubry et al., 2005).

Bu bilgiler ışığında Antalya bölgesinden toplanan ve çalışma materyali olan bu örnek türün, morfolojik çalışmalar da yapıldıktan sonra yeni bir tür olarak isimlendirilebileceği düşünülmektedir. Bu türün ekolojik ve ekonomik etkileri üzerine de ayrıca çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aubry, S., Labaune, C., Magnin, F., Kiss, L. (2005) Habitat and integration within indigenous communities of *Xeropicta derbentina* (Gastropoda: Hygromiidae) a recently introduced land snail in South-eastern France. *Diversity and Distributions* 11: 539-547.
- Dükel M. (2010) Graecoanatolica türlerinin moleküler sistematik açıdan araştırılması (Yüksek Lisans Tezi) Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur.
- Ergüden D. (2007) Türkiye denizlerindeki tirsilerin (*Aloa* spp.) moleküler sistematigi (Doktora Tezi) Çukurova Üniversitesi, TR
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 295-299.
- Godfray, H.C.J., Clark, B.R., Kitching, I.J., Mayo, S.J., Scoble, M.J. (2007) The Web and the structure of taxonomy. *Society of Systematic Biologist* 56: 943-955.
- Henning, B.W. (1965) Phylogenetic Systematics. *Annu Rev Entomol* 10:97-116.
- Kebapçı Ü. (2007) Kuzeybatı Anadolu'nun karasal gastropodları (Doktora Tezi) Süleyman Demirel Üniversitesi, TR
- Keeton, W.T., Gould, J.L., Gould, C.G. (1999) Biological Science. W.W. Norton and Company, London.
- Liu, P.H., Hershler, R., Clift, K. (2003) Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a wes-

- tern american springsnail. *Molecular Ecology* 12: 2771-2782.
- Patwardhan, A., Ray, S., Roy, A. (2014) Molecular markers in phylogenetic studies –A review. *J Phylogen Evolution Biol* 2: 1-9.
- Remigio, E.A., Hebert, P.D.N (2003) Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular phylogenetics and Evolution* 29: 641-647.
- Sereno, P.C. (2005) The logical basis of Phylogenetic Taxonomy. *Society of Systematic Biologist* 54: 595-619.
- Kurabayashi, A., Ueshima, R. (2000) Complete sequence of the mtDNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genom organisation. *Molecular Biology Evolution* 17: 266-277.
- Wilke, T., Davis, G.M., Qiu, D., Spear, R.C. (2006) Extreme mitochondrial sequence diversity in the intermediate Schistosomiasis host *Oncomelania Hupensis Robertsoni* : Another case of ancestral polymorphism? *Malacologia* 48: 143-157.
-