








# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## *Marinarozelotes barbatus* (L. Koch, 1866)'un Sitogenetik Analizi

 Hatice POYRAZ<sup>a,\*</sup>,  Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ<sup>a</sup>,  Şeyma CİVAN<sup>a</sup>,  Ümit KUMBIÇAK<sup>b</sup>,  
 Zübeyde KUMBIÇAK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir, TÜRKİYE

<sup>b</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir, TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: [hp.poyraz@gmail.com](mailto:hp.poyraz@gmail.com)

DOI: 10.29130/dubited.1015601

### ÖZ

Örümcekler, en çok çalışılan araknid takımlarından birini temsil etmektedir. Karmaşık cinsiyet kromozomu belirleme sistemleri nedeniyle özellikle sitogenetik açıdan oldukça ilgi çekicidirler. Kromozomal çalışmalarda bu karmaşıklık, örümcek sitogenetiği alanındaki çalışmaların sayısını kısıtlamıştır. Bu çalışmada Türkiye'nin farklı habitatlarından toplanan erkek örümceklerde Gnaphosidae familyasına ait *Marinarozelotes barbatus*'un kromozom özellikleri ilk kez araştırılmıştır. Yer örümceklerini incelemek için standart Giemsa boyaması, hipotonik uygulama, dokuların sabitlenmesi-ezilmesi ve son olarak havada kurutma yöntemleri uygulanmıştır. Türün diploid sayısı  $2n♂=22$  ve eşey kromozom sistemi  $X_1X_20$  şeklindedir. Eşey kromozomların ve otozomların kromozom morfolojisi telosentrik tipte bulunmuştur. Otozomal kromozomlardaki relatif uzunluklar kademeli olarak azalış göstermiştir (%9,85-%7,07). Eşey kromozomlarından  $X_1$  (%11,11)'in karyotipte en büyük kromozom olduğu,  $X_2$  (%6,14)'nin ise en küçük kromozom olduğu hesaplanmıştır. Mayoz bölünmenin profaz 1 evresinde eşey kromozomları pozitif heteropiknotik özellik göstermektedir. Sonuç olarak sunulan ilk karyolojik bulgular, *Marinarozelotes* cinsi için hem yeni veriler sunmakta hem de yer örümceklerinin karyolojik özellikleri hakkındaki bilgilerimizin artmasına katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Karyotip, Kromozom, *Marinarozelotes*, Mayoz, Örümcek

## Cytogenetic Analysis of *Marinarozelotes barbatus* (L. Koch, 1866)

### ABSTRACT

Spiders represent one of the most studied arachnid orders. They are of particular interest from a cytogenetic point of view because of their complex sex chromosome determination systems. This entanglement in chromosomal studies has limited the number of studies in spider cytogenetics. In this study, chromosomal features of *Marinarozelotes barbatus* belonging to the Gnaphosidae family were investigated for the first time in male spiders collected from different habitats in Turkey. Standard Giemsa staining, hypotonic application, fixation- crushing of tissues and finally air drying methods were applied to examine the ground spiders. The diploid number of the species is  $2n♂=22$  and the sex chromosome system is  $X_1X_20$ . Chromosome morphology of sex chromosomes and autosomes was found to be telocentric type. Relative lengths of autosomal chromosomes decreased gradually (9,85%- 7,07%).  $X_1$  (11,11%) of the sex chromosomes was calculated to be the largest chromosome in the karyotype, while  $X_2$ (6,14%) was the smallest chromosome. In the prophase 1 stage of meiosis, the sex

chromosomes show positive heteropycnotic features. As a result, the first karyological findings presented will both provide new data for the genus *Marinarozelotes* and contribute to the increase in our knowledge about the karyological characteristics of the ground spiders.

**Keywords:** *Karyotype, Chromosome, Marinarozelotes, Meiosis, Spider*

## **I. GİRİŞ**

Örümcekler (Arthropoda: Arachnida: Araneae); dünya çapında 132 familya içerisinde 4265 cins ve taksonomisi bilinen 50000'den fazla tanımlanmış türün [1] mevcut çeşitliliği ile karasal canlıların en büyüleyici ve en çeşitli grubu arasında yer almaktadır [2].

Örümcekler, evrimsel bakış açısından Mesothelae, Mygalomorf ve Araneomorf olmak üzere; 3 temel monofiletik sınıfa ayrılmaktadır [3]. Örümcekler üzerinde yapılan kromozomal çalışmalar şu anda 132 örümcek familyasından sadece 80'ine ait olan 1117 türü kapsamaktadır [4]. Türleri karşılaştırmak için kullanılan en önemli karyotip özelliklerinden biri de eşey kromozom sistemidir [5]. Araneomorf alt takımına dâhil edilen gruplar arasında Haplojin soyuna ait örümceklerde X tipi eşey kromozom sistemi ve metasentrik/submetasentrik kromozom morfolojisi baskınken; bu özelliklerin aksine sitogenetik olarak araştırılan en yüksek sayıda tür sergileyen Entelejin örümceklerde ise;  $X_1X_2$  tipinde eşey kromozom sistemi ve akrosentrik/telosentrik morfolojiye sahip kromozomların korunumu mevcuttur [6, 7].

Gnaphosidae familyası (Yer örümcekleri), dünya genelinde coğrafi bir dağılıma sahip olduğu bilinen [8], 145 cins ve 2429 tür olmak üzere tür sayısı bakımından en zengin beşinci örümcek ailesini oluşturmaktadır [1]. Sitogenetik açıdan gnafosidler; Araneidae, Lycosidae ve Salticidae familyaları ile birlikte entelejin örümceklerin en iyi araştırılmış ailelerinden biridir. Buna rağmen karyotipleri bilinmeyen birçok gnafosid cinsi vardır. Şimdiye kadar 24 cinsten sadece 51 gnafosid türü sitogenetik açıdan analiz edilmiştir [4]. Böylece yer örümceklerin bu analizleriyle birlikte etkileyici kısmı, sitogenetik verilerin artan bir temsili olarak aile içinde bulunan karyotipler arasındaki ilişkilerin kurulmasına katkıda bulunması olacaktır [9].

Bu çalışma; Gnaphosidae familyasına ait *Marinarozelotes barbatus* (L. Koch, 1866) türünün kromozomlarını karakterize etmeyi amaçlamaktadır. Elde edilen veriler neticesinde; hem sitogenetik verilere katkıda bulunmak hem de kromozom evrim mekanizmaları ve özellikle de erkeklerde mayoz bölünme sırasında  $X_1X_2$  gibi eşeysel kromozomal sistemlerin davranışları ile ilgili tartışmalara katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

## **II. MATERYAL ve METOT**

Çalışmada kullanılan *M. barbatus* türüne ait örnekler, Nisan 2018 yılında yapılan arazi çalışmaları sonucunda Kayseri- Adana ve Mersin illerinden toplanmıştır. Örümcekler doğal habitatlarından direkt toprak yüzeyinden ve taş altlarından canlı olarak yakalanmıştır (Tablo 1). Örneklerin, deney yapılıncaya kadar haftada iki kez meyve sinekleriyle beslenmesi sağlanmıştır. Örümcekler Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi- Fen Edebiyat Fakültesi- Genetik Laboratuvarı'nda muhafaza edilmiştir. Örneklerin tür teşhisi ise; Dr. Zübeyde Kumbıçak tarafından yapılmıştır.

*Tablo 1. Türün lokasyon bilgileri*

<b>Kullanılan örnek sayısı</b>	<b>Toplama tarihi</b>	<b>Lokalite ve coğrafi koordinat bilgisi</b>
1♂	14.04.2018	Adana, Pozantı

		37°25'35"N, 34°51'42"E
2 ♂♂	21.04.2018	Mersin, Tarsus 36°54'14"N, 34°54'58"E
3 ♂♂	07.04.2018	Kayseri, Pınarbaşı 38°43'20"N, 36°24'25"E

Kromozom preparatlarının hazırlanması Pekár & Král [10] yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Canlı hâldeki ergin erkek örümcekler; pens yardımıyla prosoma bölgesinden sıkılarak öldürülmüştür. Erkek örümcek gonadları; çok sayıda hücre içerdiğinden ve mitotik-mayotik evreleri birlikte değerlendirilmesi mümkün olduğundan tercih edilmiştir [11]. Örümcek gonadları stereomikroskop altında omurgasızlar için fizyolojik tuz çözeltisi içerisinde diseksiyon yapılarak çıkarılmıştır. Daha sonra gonadlar; hipotonik bir solüsyonda oda sıcaklığında 12-15 dakika tutularak hücrelerin şişmesi sağlanmıştır. Bir sonraki basamakta ise gonadlar taze hazırlanmış 3:1 etanol/glasiyal asetik asit çözeltisinde 10 dk. ve 20 dk. olmak üzere iki kez fikse edilmiştir. Temiz lamaların üzerine birkaç damla % 60 'lık asetik asit çözeltisi damlatılarak, ısıtıcı tabla üzerinde (42 °C) yayılarak gonadların eritilmesi sağlanmıştır. Son olarak hazırlanan preparatlar; fosfat tampon içeren (pH= 6.8) % 5'lik Giemsa boyasıyla 50 dk. boyanması sağlanmıştır.

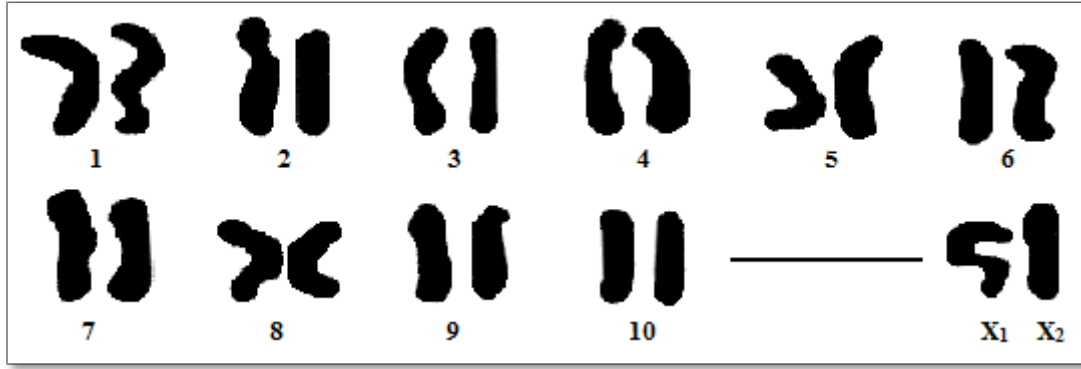
Hazırlanan preparatlardaki kromozomların mitotik ve mayotik safhaları ışık mikroskopundaki-Olympus CX21- 10X büyütmede tespit edilerek; kromozomların ayrıntılı olarak incelenmesi ise 100X büyütmede gerçekleştirilmiştir. *M. barbatus* türüne ait karyotip yapım aşamasında en az 10 metafaz evresi incelenmiş, fotoğraflar ise CellSens programı (BX53 Olympus ışık mikroskobu 100X büyütmede) ile çekilmiştir. Relatif kromozom uzunlukları da mikrometrik ( $\mu\text{m}$ ) olarak bu program ile ölçülerek her bir kromozom çiftinin % değeri hesaplanmıştır. *M. barbatus* türüne ait karyotip fotoğrafı ise Adobe Photoshop CS3 programı kullanılarak hazırlanmıştır. Kromozomların sentromer pozisyonları ise Levan ve ark. [12]'a göre konumlanmıştır.

### **III. BULGULAR**

Bu çalışmada, *M. barbatus*'un sitogenetik özelliklerinden diploid sayısı, eşey kromozom sistemi ve mayoz bölünme sırasındaki davranışları ilk kez araştırılmıştır.

#### **A. *M. barbatus*'un KARYOTİP ve EŞEY KROMOZOM SİSTEMİ**

*M. barbatus*'un erkek bireylerin kromozom seti  $2n=22$  (Şekil 2-a), hem otozom hem de gonozomların kromozom morfolojisi ise telosentrik tiptedir. En büyük kromozom  $X_1$  (%11,11), en küçük kromozom ise  $X_2$  (%6,14) eşey kromozomudur. Otozomal kromozomlar, uzunluklarının kademeli olarak azalan sırasına göre düzenlenmiştir (Tablo 2).

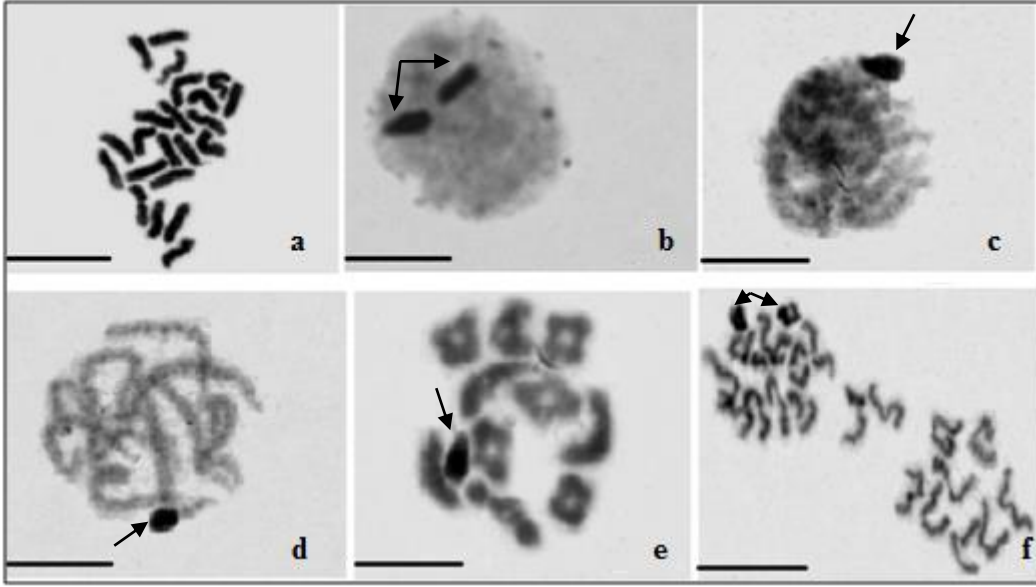


Şekil 1. *M. barbatus*'a ait karyogram (Ölçüm= 20  $\mu$ m)

Tablo 2. *M. barbatus* türün kromozomal kol uzunlukları, relatif uzunlukları ve kromozom morfolojisi

Kromozom Çifti	Toplam uzunluk- ( $\mu$ m) (Uzun kol+ kısa kol)	Relatif uzunluk (%)	Kromozom morfolojisi
1	11.75	9.85	Telosentrik
2	10.73	8.99	Telosentrik
3	10.51	8.81	Telosentrik
4	10.29	8.63	Telosentrik
5	9.94	8.33	Telosentrik
6	9.68	8.12	Telosentrik
7	9.41	7.89	Telosentrik
8	9.09	7.61	Telosentrik
9	8.83	7.40	Telosentrik
10	8.43	7.07	Telosentrik
X <sub>1</sub>	13.26	11.11	Telosentrik
X <sub>2</sub>	7.32	6.14	Telosentrik

Mayotik Profaz 1'in alt evresi olan leptotenden itibaren eşey kromozomları çekirdek yüzeyinde, vezikül hâlinde konumlanmaya başlamış ve ilerleyen safhalarda ise kısalıp kalınlaşması devam ederek daha koyu boyanması (heteropiknotik özellik) neticesinde sayılabilir konuma ulaşmıştır. Böylece mayotik hücrelerde eşey kromozomların tanımlanması, yüksek derecede yoğunlaşma ve pozitif heteropiknotik ile tanımlanmıştır (Şekil 2- b,c,d). Diploten evresinde ise 10 otozomal bivalent ve iki eşey kromozomu gösterilmiştir (Şekil 2- e). İkinci mayotik evrenin başlangıcında süper spiral yapıda olan kromozomlar (Profaz 2), belirgin olmaya başlamış n=12 ve n=10 olmak üzere iki nukleus meydana gelmiştir (Şekil 2-f).



**Şekil 2.** *M. barbatus* türüne ait spermatogonyum bölünme evreleri. (a) Mitotik metafaz  $2n♂=22$  (b- c-d-e) Profaz 1 (Leptoten, geç zigoten, pakiten ve diploten) (f) Profaz 2 ( $n=10+ X_1X_2$  ve  $n=10$  olmak üzere iki nukleus mevcuttur). Oklar eşey kromozomunu göstermektedir. Scala= 20  $\mu$ m.

#### IV. SONUÇ

Kromozom sayılarının analizi, herhangi bir organizma grubunun çalışılmasında temel bir adımı temsil ettikleri için oldukça önemlidir. Kromozom sayımları tüm taksonomik düzeylerde filogenetik ilişkilerin anlaşılmasında katkıda bulunmuştur. Bu kapsamda sitogenetik çalışmalar da çeşitli taksonomik sorunların çözümüne yardımcı olmuştur [13].

Örümcek türlerinin sitogenetik analizi, örümceklerdeki kromozomlar ve karyotip üzerindeki yoğun araştırmalara rağmen, Türkiye örümceklerinden elde edilen sitogenetik veriler çoğunlukla eksik kalmıştır. Bu nedenle bu çalışmamızda Gnaphosidae familyasına ait *Marinarozelotes barbatus* türünün sitogenetik yapısal özellikleri (diploid kromozom sayısı- kromozom morfolojisi ve kromozomların mayoz sırasındaki davranışları- eşey kromozom sistemi) ilk kez araştırılmıştır.

Ülkemizde yayılış gösteren Gnaphosidae familyasına ait 147 tür bulunmaktadır [14]. ‘‘Gnafosid’’ örümceklerdeki diploid sayının  $2n=20-30$  arasında olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [15] Kumbıçak (2014) [16], *M. lyonneti* (Audouin, 1826) ve *M. malkini* (Platnick & Murphy, 1984), Türkiye *Marinarozelotes* cinsi için ilk karyotipini sunmuştur. Yani erkeklerde iki tür için de  $2n=22$  ( $20T+ X_1X_2T$ ) numaralı diploid sayıyı ve mayotik Profaz 1’den itibaren eşey kromozomlarının pozitif heteropiknotik özelliklerinden dolayı otozomlardan kolayca ayırt edilebildiğini tanımlamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada da elde edilen veriler neticesinde diploid sayının  $2n♂=22$ , eşey kromozomunun  $X_1X_20$  şeklinde ve kromozom morfolojisinin telosentrik olarak bulunmasıyla; Gnaphosidae familyası ile yapılan diğer türlerin karyotipik özellikleriyle uygunluk gösterdiğini ve yüksek derecede korunduğunu göstermektedir.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışmada emeği geçen Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederiz.

## V. KAYNAKLAR

- [1] N. I. Platnick. ( 2022, Jul 15). The World Spider Catalog [Online]. Available: <http://wsc.nmbe.ch>.
- [2] P. A. Sebastian and K. V. Peter. Spiders of India. Universities Press/Orient Blackswan. ISBN 978-81 – 7371 -641 -6, 2009.
- [3] J. A. Coddington and H. W. Levi. “Systematics and evolution of spiders (Araneae),” *Annu. Rev. Ecol. Syst.* vol.22, pp. 565–592, 1991.
- [4] D. Araújo, M. C. Schneider, E. Paula-Neto, and D. M. Cella. (2022, Jul 15). The Spider cytogenetic database [Online]. Available: [www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodcytogenetics.bio.br/spiderdatabase).
- [5] L. H. B. Souza, A. D. Brescovit and D. Araujo. “A new species of Synotaxus and the first chromosomal study on Synotaxidae, presenting a rare XY sex chromosome system in spiders (Araneae, Araneioidea),” *Zootaxa*, vol. 4303 no.1, pp. 140, 2017, doi:10.11646/zootaxa.4303.1.9.
- [6] D. Araujo, D.M. Cella and A.D. Brescovit. “Cytogenetic analysis of the Neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining NORs, C-bands and base-specific Fluorochromes,” *Braz. J. Biol.* vol. 65, pp. 193-202, 2005.
- [7] J. Král, J. Musilová, F. St’áhlavský, M. Řezáč , Z. Akan, R. L. Edward, F. A. Coyle and C. R. Almerje. “Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae),” *Chromosome Res.* vol. 14, pp. 859-880, 2006, doi: 10.1007/s10577-006-1095-9.
- [8] T. K. Tuneva and S. L. Eshyunin. “Diversity of fauna and geographic distribution of Gnaphosidae spiders (Aranei) in the Urals,” *Entomological Review*, vol. 89, no. 8, pp. 1001–1012, 2009, doi:10.1134/S0013873809080144.
- [9] Z. Kumbıçak, S. Ergene, Ü. Kumbıçak and E. Ekiz.” A chromosomal analysis of five spider species (Araneae: Gnaphosidae, Miturgidae and Philodromidae) from Turkey,” *Caryologia*, vol. 67 no. 2, pp. 155-159, 2014, <https://doi.org/10.1080/00087114.2014.931637>.
- [10] S. Pekár, J. Král. “A comparative study of the biology and karyotypes of two central European Zodariid spiders (Araneae, Zodariidae),” *Journal of Arachnology*, vol. 29 no. 3, pp. 345-353, 2001, doi:10.1636/0161-8202(2001)029[0345:ACSOTB]2.0.CO;2.
- [11] Ü. Kumbıçak. “Cytogenetic analysis of *Tegenaria elysii* (Araneae: Agelenidae),” *Sakarya University Journal of Science*, vol.22 no. 6, pp. 1669-1673, 2018, doi: 10.16984/saufenbilder.363843.
- [12] A. Levan, K. Fredga and A. A. Sandberg. “Nomenclature for centromeric position on chromosomes,” *Hereditas*, vol 52 no. 2 pp. 201-220, 1964, <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>.
- [13] M. D. Windham, G. Yatskievych. “Chromosome studies of cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilanthes) from the Western United States and Mexico,” *Amer J Bot* vol. 90 no. 12 pp. 1788-1800, 2003, doi: 10.3732/ajb.90.12.1788.
- [14] T. Danişman, K. B. Kunt, and R. S. Özkütük. (2021, Oct 13). The Checklist of the spiders of Turkey [Online] Available: <http://www.spidersofturkey.info>.

[15] Z. Kumbıçak and H. Poyraz. "A cytogenetical study on two ground spider species (Gnaphosidae: *Drassodes*) from Nevşehir District," *Pakistan J. Zool.*, vol. 52 no. 2 pp. 513-517, 2020, doi: <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20180610190658>.

[16] Z. Kumbıçak. "Cytogenetic characterization of ten araneomorph spiders (Araneae): karyotypes and meiotic feature," *Biologia (Bratislava)*, vol. 69, no. 5, pp.644- 650, 2014, doi:10.2478/s11756-014-0350-3.