



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

# Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

## Çevresel DNA (eDNA) Analizi

Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

Prof. Dr. Özgür EMİROĞLU



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIĞI



ÇEVRESEL DÖĞEMLER VE  
KURUMSAL DEĞERLER



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIĞI



TERIAS

DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

# Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

## İstilacı Balık Türlerinin Belirlenmesinde Kullanılan eDNA Analiz Yöntemi

Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞAM İLİ MÜHÜRÜ  
SEKTÖR ÖZELİNDEN YERLEŞTİRİLMİŞTİR



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

- **Çevresel DNA**, belli bir bölgede yaşayan canlılara ait o bölgede bulunan DNA materyali olarak tanımlanabilir. Environmental DNA olarak tanımlandığı için kısaca eDNA olarak ifade edilmektedir.
- **Çevresel DNA teknolojisi** ise; hedef olarak seçilen bir bölgenin hava veya sudan alınan örneklerle bir ekosistemde hangi bitki ya da hayvan türleri olup olmadığını, yani biyoçeşitliliğini örnek içindeki DNA'lara bakarak belirlemeye çalışan bir yöntem olarak tanımlanabilir. Ayrıca son dönemde yurt dışında özellikle istilacı türlerin erken belirlenmesinde etkin olarak kullanılan bir yöntem olmuştur.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

# 1. Giriş ve Amaç

Proje kapsamında Seyitler Barajının farklı bölgelerinden alınan su örneklerinden hedef türümüz olan *Carassius gibelio* varlığının eDNA yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmaktadır.



*Carassius gibelio*



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞARIMCILIK VE İÇİŞİREKÇİLİK BAKANLIğI



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Filtrasyon Aşaması

- Projede su yüzeyinden yaklaşık 50 cm derinlikten, 3 L gl suyu temiz numune kaplarına alındı.
- Su numuneleri alındıktan sonra, +4 °C 'de taşınarak 24 saat geçmeden laboratuvara getirildi.
- Ardından alınan su numuneleri filtrasyon aletine konularak vakum pompa sistemi sayesinde önce 8 µm'lik, daha sonrada aynı su numuneleri 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek szld.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

- Süzme işlemini su da bulunan balıklara ait hücrelerin filtre kağıtlarında tutulması için yapıldı.



**Resim 1 .** Süzme işleminde kullanılan filtre genel görüntüsü



**Resim 2.** e-DNA filtrasyon sistemi genel görüntüleri



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇEVRE, ŞEHİRCİLİK VE İKLİM  
DEĞERLERİ BAKANLIğI



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

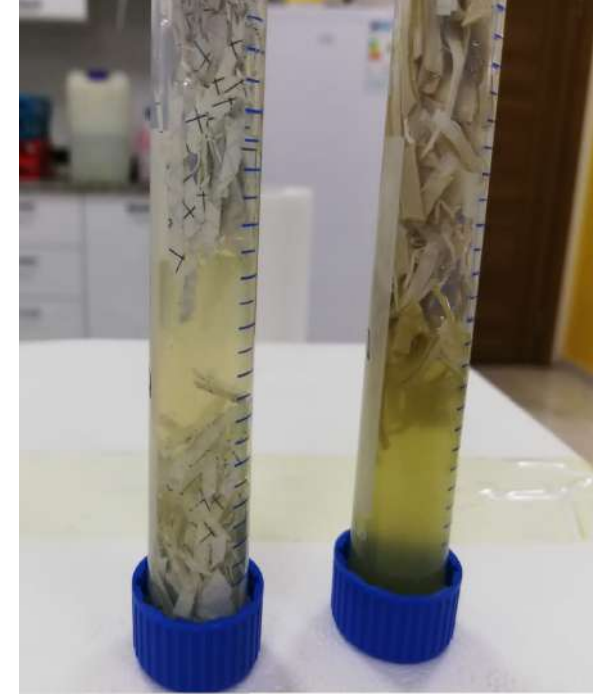
DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

### Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

- Daha sonra 8 ve 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik filtre kağıtları küçük parçalara kesilerek elution buffer içeren 15 mL'lik falkon tüplerine kondu. Bir gün boyunca bekletildi.
- Bu solüsyon kullanılarak filtre üzerinde bulunan hücre yada DNA'nın kağıt üzerinden ayrılarak sıvıya geçmesi sağlandı.



**Resim 3.** Elution buffer içeren 15 mL'lik falkon tüplerinde bulunan filtre kağıtlarının genel görüntüsü



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞANIMSIZLIK VE EKİŞARCIYI PAZARLA  
SÜREKLİ EKİŞARCIYI DEĞERLENDİRME



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

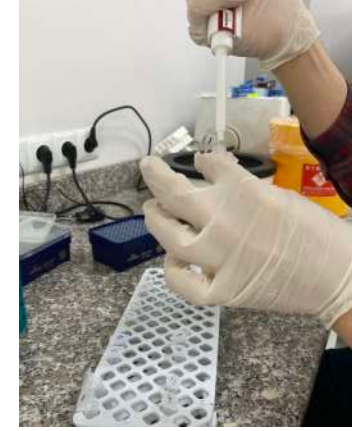
DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İ Sulara İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

## 2.2 DNA İzolasyonu



- Süre sonunda filtre üzerine yapışmış halde bulunan hücreleri uzaklaştırmak amacı ile tüpler vorteks ile karıştırıldı. Her istasyon için 2 tane 2 mL'lik eppendorf tüpleri hazırlandı. Tüplerinin dip kısmına 15  $\mu$ L Proteinaz K enzimi konuldu.

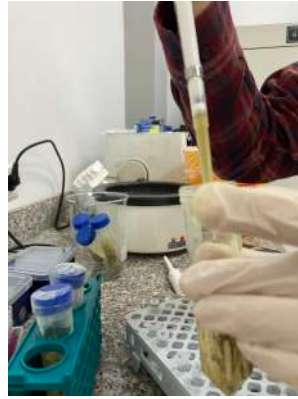




Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

## 2.2 DNA İzolasyonu

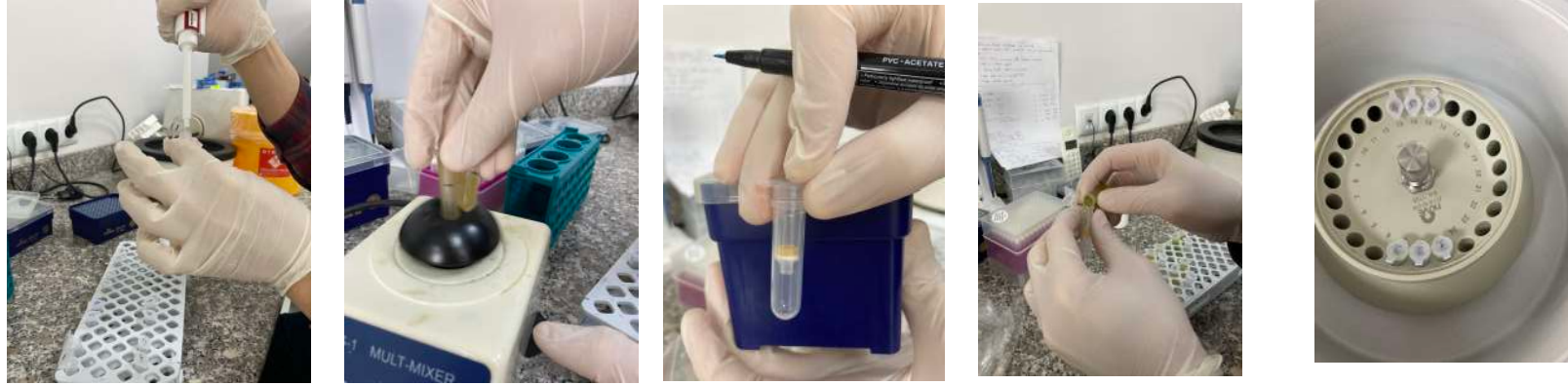


- Bu tüplere daha sonra vortekslenen karışımdan 1000  $\mu$ L konularak proteinaz K'nın iyice karışması amacıyla tekrar vortekslendi. İşlem bitince tüplerin üzerine 500  $\mu$ L ekstraksiyon buffer ilave edilerek tekrar vortekslendi ve 15 dakika 56  $^{\circ}$ C sıcaklıkta aralıklarla vortekslenerek inkübe edildi.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi



- Ardından 350  $\mu$ L binding buffer konularak vortekslendi. Ardından DNA örneklerini toplamak için örnekleri spin kolon içeren tüplere aktardık. Örnekleri spin kolanlardan geçirmek için 10.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

- Tüm hacim kolonlardan geçene kadar bu işlem 4-5 kez tekrarlandı. Ardından Spin kolona 650  $\mu$ L wash buffer 1 eklendi ve 10.000 rpm'de 1dk santrifüjlendi. Ardından spin kolona 500  $\mu$ L wash buffer 2 eklendi ve 10.000 rpm'de 1dk santrifüjlendi. Daha sonra 250  $\mu$ L wash buffer 2 eklenerek 14.000 rpm'de 3dk santrifüjlendi. Spin kolon yeni 2 mL'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Spin kolonun üzerine 30  $\mu$ L DNAase free su eklenip 5 dk. beklendikten sonra 10.000 rpm'de 1dakika son kez santrifüjlendi. Spin kolon atıldı.



T.C. ÇEVRE VE  
şEHİRCİLİK BAKANLIğI



EMBARCADERO 2007 CANTON PASTOR  
SECTOR EDUCACIONAL PROGRESO



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

DAI human  
dynamics

## 2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Aşamaları

- DNA izolasyonunun ardından göldeki varlığı eDNA yöntemi ile belirlenecek olan *Carassius gibelio*' a ait seçilen referans genin (mitokondrial sitokrom c oksidaz subunit I (COI) primerleri kullanılarak ortamdaki sadece bu türe özgü olan COI geni çoğaltıldı.

Reaksiyon Karışımı	
Master Mix	10 µl
F Primer	1 µl
R Primer	1 µl
DNA	3 µl
Su	5 µl
Total Hacim	20 µl



PCR Protokolü		
95 °C	5dk	40 döngü
95 °C	15sn	
58 °C	30sn	
72 °C	15sn	



Resim 4. Çalışma Applied Biosystems, SimpliAmp marka PZR aleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

## 2.4 JEL ELEKTROFOREZİ

Elde edilen DNA ürünlerinin yeteri miktarda ve doğru olarak elde edildiğini göstermek amacıyla 'DNA Jel Elektroforez Tekniği' kullanıldı.

Jelde görüntüleme için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Jel için 50mL 1X TBE buffer ve 1gr agaroz karıştırılarak kaynatıldı. Soğerken 5mL 20.000X Red Safe boya jele ekledi. Jel kalıba döküldü ve donması beklendi.

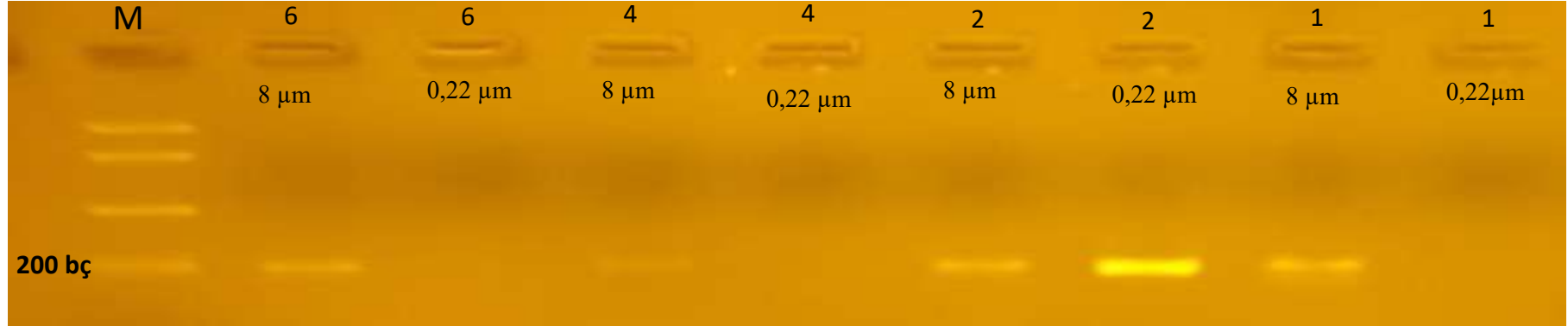
5µL loading dye ile 5 µL PCR örneği karıştırılarak Totalde 10 µL yükleme karışımı hazırlandı. Örnekler jele yüklenerek 160 Voltta, 30 dk. yürütüldü.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

### 3. Sonuçlar



**Resim 5.** Aralık ayında yaptığımız ilk çalışmada her iki filtre kağında da istilacı balık türümüzün DNA örnekleri kalıyor mu diye farklı istasyonlardan alınan su örneklerinin süzöldüğü her filtre kağından ayrı ayrı DNA örneklerini izole ettik. Sonuç her iki filtre kağında eDNA örneklerinin izole edilebildiğini gözlemledik. Sonuç olarak her iki filtre kağını birleştirerek eDNA izolasyonu yapmaya karar verdik. ( )



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞARIMCILIK VE İKLİM BAKANLIğI  
SÜZÜM VE İKLİM BAKANLIğI



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



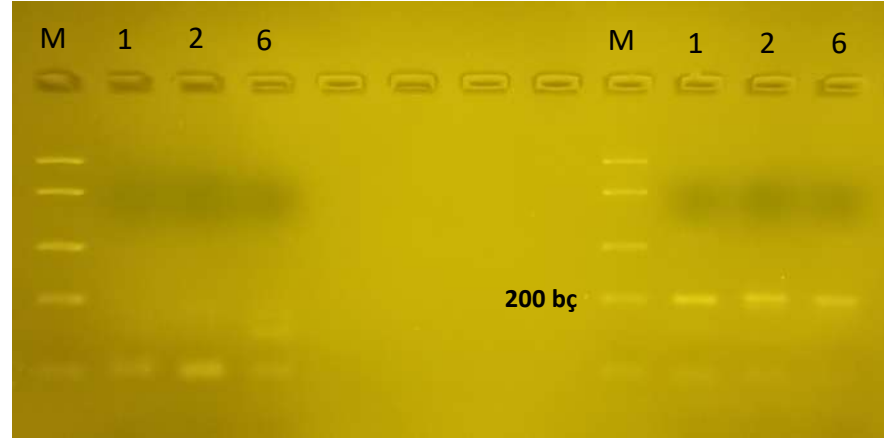
TERIAS

DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi



**Resim 6.** Şubat ayında 1, 2 ve 6. istasyondan alınan su örneklerindeki *Carassius gibelio* ve *Perca fluviatilis* ait eDNA çalışmasının sonuçları görülmektedir. Bu çalışmada *Perca fluviatilis* türü, *Carassius gibelio* türünün eDNA verilerinin karşılaştırılması amacıyla kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda suda *Perca fluviatilis* türüne ait eDNA varlığı çok net gözlemlenirken, *Carassius gibelio* türüne ait eDNA varlığı sadece 6. istasyonda az bir şekilde varlığı tespit edilmiştir. Bu durum alınan suda numunelerinde yeterince *Carrassius gibelio*'ya ait eDNA bulunmadığını göstermektedir.



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞARINININ İKİT ÇİŞİTİRE FAZLA  
SEÇER ÖZKARŞARINININ İKİT



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



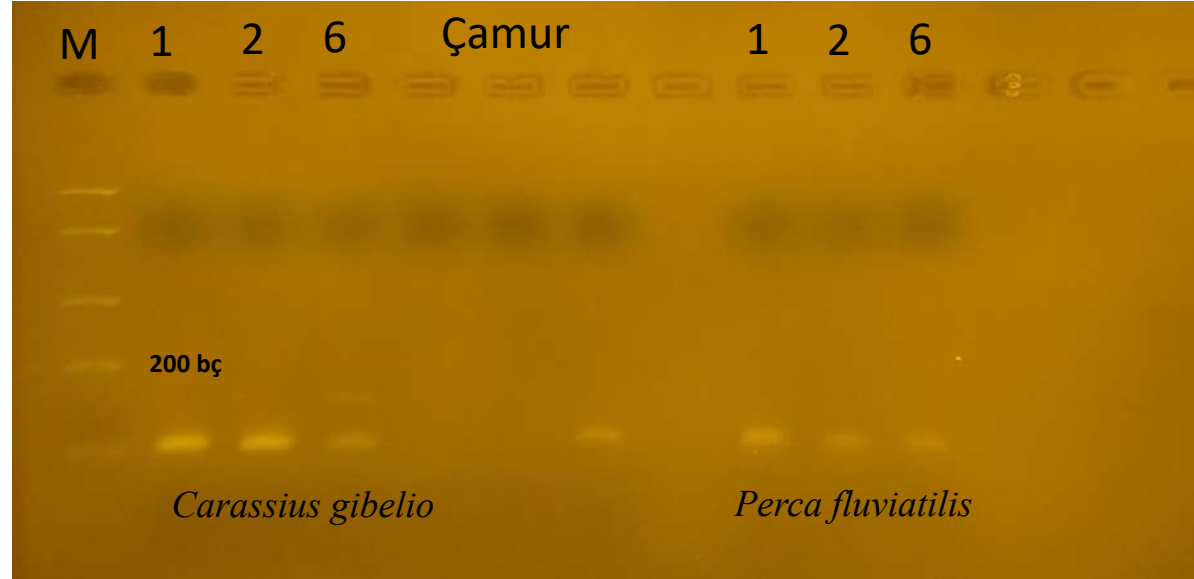
TERIAS

DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi



**Resim 7.** Mart ayında yapılan analiz sonucunda suda *Carassius gibelio* ve *Perca fluviatilis* türüne ait eDNA tespit edilememiştir. Bu durum alınan suda numunelerinde yeterince *Carrassius gibelio* ve *Perca fluviatilis* ait eDNA bulunmadığını göstermektedir.



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞARIM VE ORMAN BAKANLIğI  
Sectoral Development Programme



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

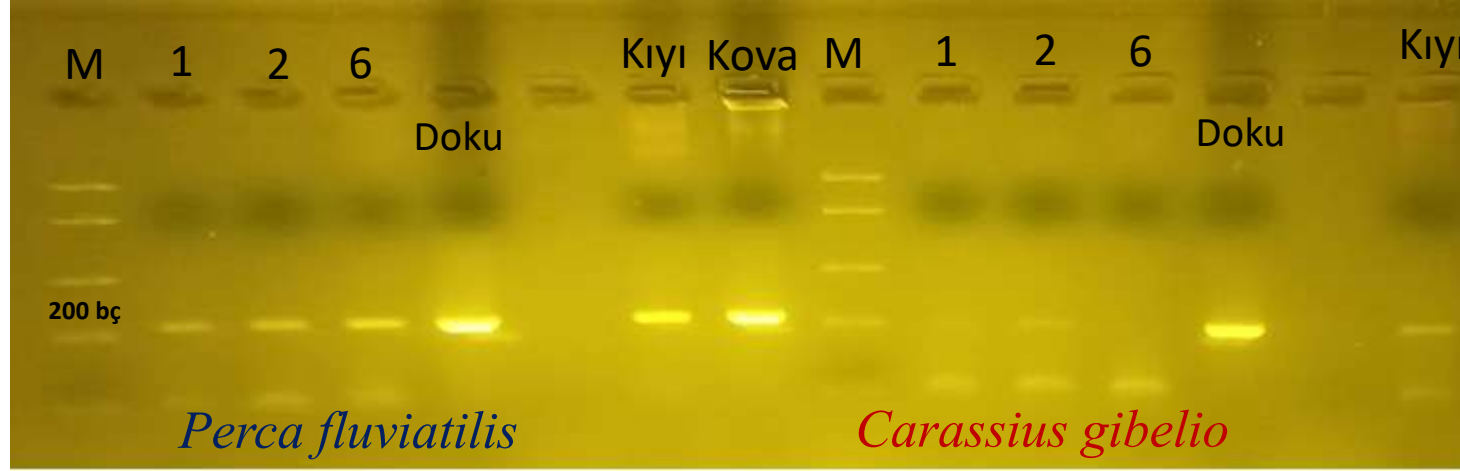
DAI human  
dynamics





Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi



**Resim 8.** Nisan ayında yapılan analiz sonucunda suda *Perca fluviatilis* türüne ait eDNA 3 istasyondan alınan su örneklerinde tespit edilmiştir. *Carrassius gibelio* ait eDNA örnekleri sadece 1 ve 2. istasyonlarda az, 6. istasyonda ise belirlenememiştir.



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



ÇARŞARIMCILIK VE ORMAN BAKANLIğI



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

DAI human  
dynamics



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

## Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi

- Çalışmamızın sonuçlarımıza göre eDNA analizi ile *Carassius gibelio*'nun varlığının belirlenmesinde sırasında özellikle mevsimsel olarak farklılıklar olabileceğini tespit ettik.
- Bu durumun soğuk hava nedeniyle balığın gölde ki yoğunluğunun düşük olmasına yada kış mevsiminde *Carassius gibelio*'nun fazla hareketli olmamasına bağlı olduğu düşünölmektedir. TS EN 14757 standartına göre yapılan klasik avcılık yönteminde de *Carassius gibelio* popölasyon yoğunluğunun aynı dönemlerde çok düşük olması da eDNA verilerimizi desteklemektedir.
- Bu nedenle çalışmamız da en doğru zamanlama metodolojisini bulmak için mevsimsel örneklemelerimiz devam edecektir.



Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir.

**Türkiye'deki Karasal Ortamlarda ve İç Sularda İstilacı Yabancı Türlerin Tehditlerinin Değerlendirilmesi Projesi**

---

# TEŐEKKÜRLER



T.C. ÇEVRE VE  
ŞEHİRCİLİK BAKANLIğI



FAHRETTİN ALTINERLER ENSTİTÜSÜ  
SEOR EKONOMİK PROGRAMI



T.C. TARIM VE  
ORMAN BAKANLIğI



TERIAS

DAI human  
dynamics