

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ TÜR *Paradiplozoon bingolensis* SP. N.'İN TÜR TEŞHİSİ VE SU
KİRLİLİĞİ AÇISINDAN SİTOGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KADİR MİRAC DAŞBİLEK

TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ULUPINAR

BİNGÖL-2022



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YENİ TÜR Paradiplazoon bingolensis SP. N.'İN TÜR TEŞHİSİ VE SU KİRLİLİĞİ
AÇISINDAN SİTOGENETİK ANALİZİ**

Dr.Öğr. Üyesi Mehmet ULUPINAR danışmanlığında, Kadir Mirac DAŞBİLEK tarafından hazırlanan bu çalışma 01/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Ali Rıza DEMİRKIRAN *İmza* :
Üye : Dr.Öğr. Üyesi Mehmet ULUPINAR *İmza* :
Üye : Prof.Dr. İbrahim TÜRKEKUL *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve .../..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sunulması aşamalarında çalışmanın tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren, tez konusunun belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, deneysel çalışmaların yapılması ve yorumlanması esnasında yardımlarını ve bilgi birikimlerini esirgemeyen çalışmamı tamamlamam için bana gerekli tüm desteği veren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ULUPINAR'a gösterdiği yakın ilgi, vermiş olduğu destek ve emeklerinden dolayı saygılarımı ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez süreci boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ali Rıza DEMİRKIRAN'a, materyal temini için yardımlarını esirgemeyen değerli mesai arkadaşlarım Fuat KORKUT ve Ali UZUN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyerek bu günlere gelmeme vesile olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme, gösterdiği sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı hayat arkadaşım, biricik eşim Gonca DAŞBİLEK'e ve varlığı yaşama sevincim olan biricik oğlum Uras DAŞBİLEK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Kadir Mirac DAŞBİLEK

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. İnterfaz.....	5
2.2. G1 Fazı.....	6
2.3. S Fazı.....	6
2.4. G2 Fazı.....	6
2.5. Mitoz Fazı.....	6
2.6. Mayoz Bölünme.....	8
2.7. Kromozom.....	10
2.8. Sitogenetik Yöntemler.....	13
2.9. Monogenea.....	15
2.9.1. Monogenea Sınıfının Filogenetik Özellikleri.....	16
2.9.2. Monogenea Sınıfının Morfometrik ve Morfolojik Özellikleri.....	17
2.9.3. Bağlanma Organları.....	17
2.9.4. Tegüment.....	18
2.9.5. Sinir Sistemi ve Duyu Organları.....	18
2.9.6. Sindirim Borusu.....	19
2.9.7. Kas Sistemi.....	19
2.9.8. Boşaltım Sistemi.....	20
2.9.9. Yaşam Döngüsü ve Üreme.....	20
2.9.10. Monogenea Sınıfının Sitogenetik Özellikleri.....	21

2.9.11. Family Diplozoidae.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Kromozom Preparasyonları.....	39
3.2.2 Boyama Yöntemleri.....	42
3.2.1.1. Giemsa Boyama.....	42
3.2.2.2. AgNO ₃ Boyama.....	43
3.2.3. Mikroskopi ve Görüntü İşleme.....	44
3.2.4. Mikronuklei Testi.....	45
3.2.5. İstatistiksel Yöntemler.....	46
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
AV	: Ağız Vantuzu
BÇ	: Bağırsak Çekumu
°C	: Santigrat Derece Selsius
cm	: Santimetre
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
CI	: Sentrometrik İndeks
D.	: Diplozoon
DAPI	: Floresan Bir Boya Türü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dk.	: Dakika
E	: Doğu Enlemi Koordinatı
F	: Farinks
FISH	: Floresan In Situ Hybridization (Floresan Yerinde Hibridizasyon)
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
I.Ç.	: Birinci Çekmen Çifti
i.p.	: İnter Peritoneal
KB	: Kaynaşma Bölgesi
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Mono Potasyum Fosfat
M	: Molarite
m	: Metre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
µm	: Mikrometre

M-FISH	: Multicolor Floresan In Situ Hybridization (Çok Renkli Floresan Yerinde Hibridizasyon)
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
N	: Kuzey Boylamı Koordinatı
NaCl	: Sodyum Klorür
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	: Disodyum Fosfat (12 Kez Yıkanmış)
NF	: Temel Kromozomal Kol Sayısı
No.	: Numara
NOR	: Nükleolar Düzenleyici Bölge
OV	: Orta Vantuz
P.	: Paradiplozoom
pH	: Power of Hydrogen (Asitlik Derecesi)
PNS	: Periferik Sinir Sistemi
R.	: Rutilus
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rDNA	: Rekombinant Deoksiribo Nükleik Asit
SKY	: Spektral Karyotipleme
Sp.	: Speciens
t	: Telosentrik
TCL	: Toplam Kromozom Uzunluğu
TLC	: Haploid Genomun Ortalama Toplam Uzunluğu
vd.	: Ve Diğerleri
YO	: Yapışma Organı
YOYO1	: DNA Boyamasında Kullanılan Yeşil Bir Floresan Boya Türü
%	: Yüzde
>	: Büyüktür
~	: Yaklaşık
=	: Eşittir
+	: Artı
±	: Tolerans

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Doktor balık [<i>Garra rufa</i> (Heckel, 1843)].....	1
Şekil 2.1.	Hücre döngüsünün şematik görünümü (Miller, 2010).....	5
Şekil 2.2.	Giemsa boyalı, <i>Paradiplozoon megan</i> (Monogenea, Diplozoidae) spermatozitlerinin Giemsa mayotik bölünmesi (Bombarová ve diğerleri, 2014). a) periferinde tek bir nükleolus bulunan bir Pachytene bivalentleri. b) Bir nükleol kalıntısı olan diploten. c) Çekirdekçik kalıntısı olmayan diyakinez. d) Metafaz I. e) Anafaz I. f) Metafaz II. g) Anafaz II. h) Telofaz II-iki haploid sperm hücresi (spermatozoon). Ok uçları (a,b) nükleolleri gösterir. Ölçek çubuğu=10 µm.....	9
Şekil 2.3.	Kromozom yapısı (URL1).....	11
Şekil 2.4.	Sentromer pozisyonuna, sentromer indeksine ve kol oranına dayalı kromozom sınıflandırması. p kısa kol, q uzun kol (Sumner, 2003).....	12
Şekil 2.5.	Diplozoidae familyasının temel anatomisi (Avenant-Oldewage ve ark., 2014). e yumurta; cv ortak vitellin kanalı; bağırsak sonu; o yumurtalık; testis; sen rahim. Ölçek çubuğu = 1 mm.....	21
Şekil 2.6.	Diplozoidae familyasının yaşam döngüsü (Čítek ve diğerleri, 2002). a) suda özgürce yaşayan bir yumurta. b) <i>Oncomiracidium</i> , ilk istilacı larva evresi. c) <i>Diporpa</i> , ikinci parazit larva aşaması. d) İki <i>diporpa</i> nın gençlik evresine füzyonu. e) Birleştirilmiş dâhili sistemlere sahip yetişkin. f) <i>Diplozoidler</i> , siprinid balıkları.....	25
Şekil 2.7.	Taramalı (scanning) elektron mikroskopundan <i>Eudiplozoon nipponicum</i> 'un gelişim aşamaları (Hodová ve diğerleri, 2010). A – yumurta, B – <i>oncomiracidium</i> , C – <i>diporpa</i> , D – gençlik aşaması (iki <i>diporpa</i> nın füzyonundan sonra), E – yetişkin. Ölçek - çubuklar: A=100 µm; B=50 µm; C, D=200 µm; E=1 mm.....	26

Şekil 2.8.	Karyolojik olarak incelenen diplozoid türlerdeki ikincil daralmanın sayısı ve konumu ile filogenetik ilişkileri hakkında mevcut verilerin özeti (veriler Koroleva, 1968 a, b; Matejusová ve diğerleri, 2004; Košková ve diğerleri, 2011; Bombarová ve diğerleri, 2014). Kromozomların çizimi, haploid tamamlayıcıdaki sayılarını, morfolojilerini ve ikincil daralmanın (kırmızı) konumunu gösterir.....	27
Şekil 2.9.	Göynük Çayı haritası.....	29
Şekil 2.10.	Paradiplozoon bingolensis Sp. n. (Civáňová, et al. 2013).....	30
Şekil 2.11.	P. bingolensis; A:kanca yapısı (skala; 100 µm); B Orta kanca (skala 20 µm).....	31
Şekil 2.12.	Paradiplozoon Bingolensis'in hayat döngüsü A- Serbest yüzen oncomiracidium larvası, B: Kaynaşma öncesi diporpa larvası, C: iki diporpa larvasının kaynaşması, D: Ergin birey hali (YO: Yayışma organı, AV:Ağız vantuzu, F: Farinks, BÇ: bağırsak çekumu, I.Ç: Birinci çekmen çifti, OV: Orta vantuz, KB: Kaynaşma bölgesi).....	32
Şekil 2.13.	(a) Diplozoon kashmirensis, Kaw 1950'in kromozom yayılımı, (b) Diplozoon kashmirensis (Kaw 1950)'in Giemsa ile boyanmış mitotik hücrelerinden oluşturulmuş idiogramı (a=akrosentrik). [Karyotip Formülü: 2n=14a].....	36
Şekil 2.14.	(a) Diplozoon kashmirensis (Kaw 1950)'in idiogramı; (b) Diplozoon kashmirensis (Kaw 1950)'in standart sapmalı hata çubukları.....	37
Şekil 3.1.	Kromozom preparasyonu için yumurtalık ve testislerin parçalara ayrılması.....	41
Şekil 3.2.	Preparasyonların floresan mikroskobu ile analizi (mitotik ve mayotik kromozomların, dijital kamerakullanılarak 100 x büyütmede fotoğraflanması ve kromozomların µm cinsinden ölçülmesi).....	44
Şekil 4.1.	Giemsa ile boyanan Paradiplozoon bingolensis Sp. n.'in kromozom yayımı (Bar: 10 µm).....	47
Şekil 4.2.	Paradiplozoon bingolensis Sp. n.'in karyotipi. (Bar: 10 µm).....	47
Şekil 4.3.	Paradiplozoon bingolensis Sp. n.'in idiogramı ve yedinci (7.) kromozom çifti üzerinde işaretlenmiş ikincil daralmanın gösterimi.....	49

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Diplozoidae familyasındaki karyolojik verilerin irdelenmesi.....	23
Tablo 2.2.	Diplozoon kashmirensis, Kaw 1950'in Kromozom çift numarasına göre kromozom kol uzunlukları, kol oranları, sentromerik indeks ve sınıflandırılması.....	38
Tablo 4.1.	Paradiplozoon bingolensis Sp. n.'in (n=7t) kromozomlarının ölçümleri.....	48

YENİ TÜR *Paradiplozoon bingolensis* SP. N.'İN TÜR TEŞHİSİ VE SU KİRLİLİĞİ AÇISINDAN SİTOGENETİK ANALİZİ

ÖZET

Monogenea, doğrudan ve basit fakat benzersiz bir yaşam döngüsüne sahip, ağırlıklı olarak balık parazitlerinden oluşan bir gruptur. Monogeneanlar üzerine yapılan sitogenetik analizler çok azdır. Ancak bu türlerin kromozomlarının özellikleri hakkında yeni, önemli bilgiler verirken taksonlar içindeki filogenetik ilişkilerin çözülmesine de yardımcı olabilir. Bu çalışma, yaygın bir dr. balık (*Garra rufa*) paraziti olan *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in kromozomları hakkında yeni verileri ortaya koymaktadır.

Bu türün karyotipi yedi çift telosentrik (t) kromozomdan ($2n=14t$, TLC=44,55 μm) oluşur. Sonuçlar, *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in Diplozoidae familyasında yeni tür olarak kabul edilebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n., sitogenetik, karyotip, tür teşhisi, su kirliliği, *Garra rufa*, doktor balık, Bingöl.

NEW SPECIES *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'S SPECIES DIAGNOSIS AND CYTOGENETIC ANALYSIS IN TERMS OF WATER POLLUTION

ABSTRACT

Monogenea are a group of predominantly fish parasites with a direct and simple but unique life cycle. Cytogenetic analyzes on monogeneans are scarce. However, while providing new, important information about the characteristics of the chromosomes of these species, it can also help unravel phylogenetic relationships within taxa. This study is a common Dr. fish (*Garra rufa*) parasite *Paradiplozoon bingolensis* Sp. reveals new data about the chromosomes of n.

The karyotype of this species consists of seven pairs of telocentric (t) chromosomes ($2n=14t$, TLC=44.55 μm). Results, *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n. can be considered as a new species in the family Diplozoidae.

Keywords: *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n., cytogenetics, karyotype, species identification, water pollution, *Garra rufa*, doctor fish, Bingöl.

1. GİRİŞ

Cyprinidae familyası tür sayısı bakımından en zengin balık familyalarından biridir ve dünyanın farklı bölgelerine yayılmıştır. Türkiye’de bulunan kemikli balıkların büyük bir kısmı (30 cins ve 70 türü) bu familyaya aittir ve ülkemizin her bölgesindeki tatlı su kaynaklarında yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin, Garra cinsi balıklar ülkemizin doğu ve güney bölgelerinde bulunmakta olup, özellikle “doktor balık” olarak adlandırılan, Sivas çermiklerinde yüksek sıcaklıkta yaşayan ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Şekil 1.1), Cyprinidae familyasına aittir ve Bingöl ili akarsularında da yaygın olarak yaşamaktadır (Kuru, 1979; Kuru, 1980; Grabda, 1991, Venere vd., 1997). Ulupınar ve ark. (2013), Murat Nehri ve bağlı akarsu kollarının Bingöl ili sınırları içinde kalan kısmında, balık faunasının ortaya konulması amacıyla yaptıkları bir çalışmada; 1’i Mastacembelidae, 1’i Bagridae, 18’i Cyprinidae, 2’i Balitoridae, 1’i Cobitidae ve 2’si de Sisoridae familyasına ait 25 tür tespit etmiş olup, bu taksonlardan Cyprinidae familyası hem tür sayısı hem de bu türlere ait birey sayıları bakımından en baskın familya olduğunu, *Garra rufa*’nın *Chondrostoma regium* ile birlikte özellikle Bingöl İli kaplıcalarına yakın kaynaklarda bolca bulunduğunu kaydetmişlerdir (Ulupınar ve Koyun, 2021).



Şekil 1.1. Doktor balık [*Garra rufa* (Heckel, 1843)]

Ancak, baraj yapımı ve aşırı avcılık gibi nedenlerden dolayı tespit çalışmaları yapılmış olan balık faunasında ilerleyen zamanlarda değişiklikler meydana gelebilmektedir. Diğer taraftan morfolojik karakterlerin yetersiz kaldığı durumlarda bazen tür teşhislerinde de şüpheli durumlar ortaya çıkabilmektedir. Yanlış tür tespitleri nedeniyle bir araştırmacının belirli bir bölgede var dediği balık türünün diğer bir araştırmacı tarafından yok denildiği, söz konusu türün gerçekte farklı bir tür olduğu belirtildiği çok kez yaşanmıştır. Benzer durum parazitler de dâhil birçok canlı organizma için de yaygın olarak karşılaşılan bir husustur. Bu nedenle birçok sistematikçi, morfolojik analizler sonucu karar verilen türlerin genetik analizlerinin de yapılmasını tavsiye etmişlerdir. Öyle ki, yapılan çeşitli genetik araştırmalar sonucu bazı türlerin sistematğinde genus düzeyinde dahi değişiklikler meydana gelebilmektedir. Örneğin; Ülkemizdeki *Barbus* türleri ile Murat Nehri'nde de üyeleri bulunan *Nemacheilidae* familyasında ve *Acanthobrama* (Heckel, 1843) *genusunda* morfolojik taksonomi üzerinde tartışmalar hala devam etmektedir ve genetik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır (Bănărescu and Bogutskaya, 2003; Prokofiev, 2009; Yıldırım ve ark., 2012; Ulupınar ve ark., 2013).

Dolayısıyla morfoloji, habitat ve davranış özellikleri bakımından olduğu kadar taksonomik olarak da geniş bir çeşitliliğe sahip olan canlı grupları arasındaki akrabalık ilişkilerinin tam tespit edilebilmesi için karyolojik çalışmaların da yapılması, tür teşhislerinde artık sitogenetik analizler ve/veya diğer moleküler genetik yöntemlerin de kullanılması gerekmektedir. Aksi takdirde, örneğin değişebilen dış morfolojik karakterlere göre yapılan sistematik çalışmalarda, birbirine yakın ve morfolojik olarak ayırt edilemeyen türlerin, alttürlerin ve izole olmuş grupların sınıflandırılmasında metrik ve meristik karakterlerin yetersiz kalacağı ve türler arasındaki farklılıkların kesin olarak ortaya konulamayacağı aşikârdır. Elbette bölgesel farklılıklar da görülebilir. Örneğin; Karahan (2007), Mersin bölgesinden, Hatay Asi Nehrinden, Kahramanmaraş Andırın Deresi'nden ve Sivas Balıklı Kaplıca'dan *G. rufa* türü ile Mardin Savur Nehri'nden *G. variabilis* türü örneklerini morfometrik ve sitogenetik yönden karşılaştırmış olup, *G. variabilis*'in ayrıntılı karyotipini ilk kez tanımladığı çalışmasında istatistik analizler sonucu bölgeler arasındaki farkları anlamlı bulmuştur.

Bu tezin araştırma konusunu oluşturan *Paradiplozoon bingolensis* Sp.n.'in dahil olduğu *Monogenea* sınıfı bireyleri ile ilgili durum da yukarıda anlatılanlardan çok farklı değildir.

Bu sınıf üyeleri; çoğunlukla balıkların deri ve solungaçlarında parazit olarak yaşayan önemli bir monoksen (monoxenous) helmint grubudur. En dar konukçu aralığına sahip (sınırlı sayıda konukçuda yaşayan) parazitik bir grup olarak kabul edilirler ve bu da büyük morfolojik değişikliklerine yol açar. Diplozoidae familyası ise sadece bir konakçıda benzersiz bir yaşam döngüsüne sahip olması ile karakterize edilir. Bununla birlikte, bir yetişkinin gelişimi, kalıcı çiftleşme adı verilen dikkate değer bir fenomeni gerektirir. Bir bireyin birey oluşumunu tamamlamak için, diporpa adı verilen iki larva evresini birleştirmek ve bunları organ sistemleri düzeyinde birbirine kenetlemek gerekir.

Monogenea sınıfının sınıflandırılması, birçok soru içermektedir. Bu gruplar; davranışlarına, morfometrik özelliklerine, moleküler belirteçlerine veya bütün bu kriterlerin kombinasyonlarına göre sınıflandırılır. Diplozoidae familyası diğer familyalara göre üzerinde daha çok çalışma yapılmış bir familya olmasına rağmen hala genetik araştırmalara ihtiyaç duyulan bir alandır. Elbette taksonomik sınıflandırma ve filogenetik ilişkileri incelemenin en önemli yollarından birisi sitogenetik analizlerdir.

Bu çalışma ile Civanova ve ark. (2013) tarafından Murat Nehri'nin bir kolu olan Göynük Çayı'ndan toplanan *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Cyprinidae) balığının solungaçlarından alınan ve morfometrik teşhisi sonucu yeni bir Diplozoid türü olduğu belirlenen *Paradiplozoon bingolensis* Sp.n.'in (Civáňová, et al. 2013) kromozom yapısının ve sayısının ilk kez ortaya konulması ve söz konusu tür teşhisinin yeniden irdelenmesi, ayrıca su kirliliği durumunun bir göstergesi olarak mikronüklei testi yapılması amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hücre bölünmesi, temel hücre süreçlerinden biridir. Hücre bölünmesi ile hücre sayısı artar. Hücrelerin bölünme yeteneği ise her bir canlı organizmanın kendine özgüdür ve her hücrenin genetik bilgisinde kodlanmıştır. Genetik bilgi, kromozomlarda meydana gelen lineer bir DNA molekülünde gizlidir (Kuglık, 2000).

Hücre bölünmesi iki eşleştirilmiş sürece ayrılabilir:

- Büyüme fazı [interfaz]
- Bölünme fazı [çekirdek bölünmesi (mitoz) ve hücrenin iki kardeş hücre oluşturan sitoplazma bölünmesi (sitokinez)].

Bölünme süreci, DNA replikasyonu ile başlar, ardından kromozomların ve sitoplazmanın, her biri ana hücrenin genetik materyalinin tam bir kopyasını alan iki yeni yavru hücreye dağılımı izler. Bu süreç için karakteristik olan olaylar dizisine hücre döngüsü denir (Sumner, 2003). Hücre döngüsü, hücrenin başlangıcından hücrenin iki yavru hücreye ayrıldığı aşamaya kadar olan dönem olarak tanımlanır. 1953'te bilim adamı Howard ve Pelc hücre döngüsünü dört aşamaya ayırmıştır (Şekil 2.1):

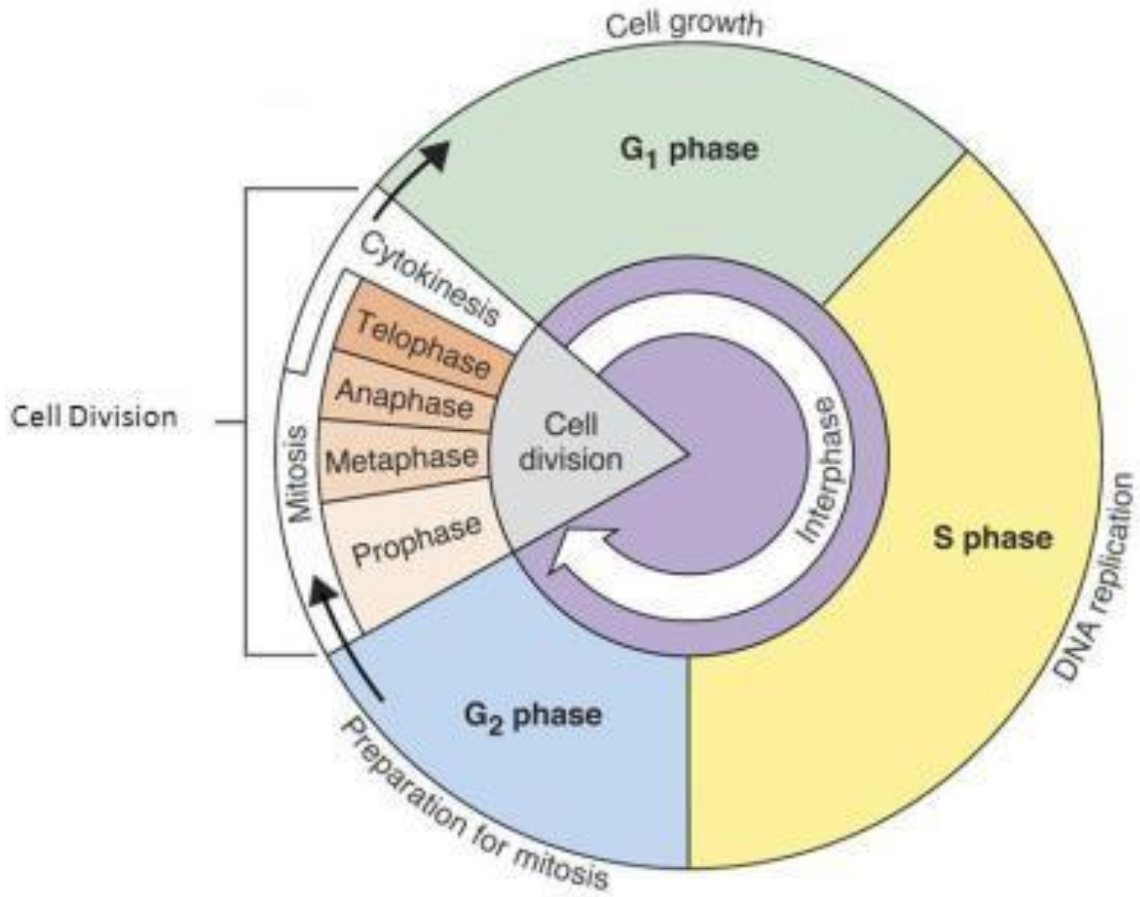
- G1 aşaması (postmitotik/presentetik),
- S fazı (sentez),
- G2 fazı (postsentezik),
- M fazı (mitoz).

Hücre döngüsü oldukça düzenlidir. Her fazın süresi, besinlerin mevcudiyetine ve hücre etrafındaki büyüme faktörlerinin konsantrasyonuna bağlıdır. Hücre döngüsü kontrol noktaları (hücrenin hasarlı DNA'yı tanınmasını ve dokuların dengesiz, aşırı büyümesini önlemesini sağlarken, hasarlı veya yıpranmış hücrelerin değiştirilmesini ve

koşullara/gelişimsel ihtiyaçlara göre yeni hücrelerin oluşmasını sağlayan) hücre mekanizmaları vardır (Lodish, 2008).

2.1. İnterfaz

İnterfaz: G₁, S ve G₂ olmak üzere üç aşamada ilerler. Hücre döngüsü için gereken toplam sürenin en az %91'i kadar süren yüksek metabolik aktivite zamanıdır. Tüm hücre tiplerinde interfazın amacı, hücre döngüsünün farklı bir aşamasında gerçekleşen hücre bölünmesine hazırlanmaktır (Cooper ve Hausman, 2000).



Şekil. 2.1. Hücre döngüsünün şematik görünümü (Miller, 2010)

2.2. G1 Fazı

Hücrenin bölünmeye devam edip etmeyeceğini veya uykuda olup olmayacağını belirleme olasılığı olan, büyüme aşaması olarak adlandırılan interfaz içindeki ilk aşamadır. Bu, G1/S siklinleri tarafından düzenlenen G1'den S'ye geçiş olarak adlandırılan ilk hücre döngüsü kontrol noktasıdır. Daha fazla bölünme için hazırlık durumunda, hücrenin ana görevleri, gerekli mRNA ve proteinlerin büyümesi ve sentezidir. Bu tür hücreler S fazına girebilir. Aksine hücre, DNA hasarına tepki olarak hücre döngüsünü durdurabilir ve artık bölünemez. Bu durum G0 fazı için karakteristiktir ve artık bölünmeye ihtiyaç duymayan tamamen farklılaşmış, çoğalmayan hücrelere özgüdür. Sporadik olarak hücreler, gerekirse G0 fazından G1 fazına tekrar girebilir ve tekrar bölünmeye başlayabilir (Pardee, 1989).

2.3. S Fazı

Bu aşamada hücredeki DNA miktarı eşlenir. Her kromozom iki katına çıkar, yani iki kardeş kromatidi vardır. Bu replikasyon, bir sonraki hücre neslinde mutasyon riskini en aza indirmek için aşırı doğrulukla gerçekleşmelidir (Bartek ve diğerleri, 2004).

2.4. G2 Fazı

İkinci büyüme evresi sırasında organeller ve diğer hücresel yapılar kopyalanır. Hücrenin mitoz için sistematik bir hazırlığı vardır. Hücre büyür ve yeni bileşikler oluşur. Fazın bir kısmı, DNA replikasyonunun düzgün yapıldığı ve yapılmadığını ve çekirdeğin bölünme için hazır olup olmadığını kontrol eden ikinci hücre döngüsü kontrol noktasıdır (O'Connell vd., 2000).

2.5. Mitoz Fazı

Çekirdeğin bölünmesi (mitoz) ve sitoplazmanın, organellerin ve hücre zarının bölünmesi (sitokinez) ile oluşan hücre döngüsünün nispeten kısa dönemidir. M evresi sırasında hücre, tüm hücre bileşenlerini yeniden düzenler ve bunları genetik olarak birbirine özdeş iki yavru hücreye eşit olarak böler. M fazı boyunca, çekirdek zarfı tamamen yok olana kadar bozulur ve hücrenin yeniden yapılandırılmasına izin verir. Kromozomların

kıvrılması ve yoğunlaşmasının eşlik ettiği bu aşama, kromozomların yavaş yavaş kısalan ve spiralleşen uzun lifler gibi görüldüğü mikroskobik olarak sıklıkla gözlenir. Sentromerlerdeki bağlantı, hücrenin zıt kutuplarına giden kromatitlerin eşit dağılımını sağlar. İğ kontrol noktası olarak bilinen son kontrol noktası, metafaz/anafaz geçişinde gerçekleşir ve tüm kardeş kromatitlerin iş mili mikrotübüllerine doğru şekilde bağlanıp bağlanmadığını inceler (Musacchio ve Hardwick, 2002). Mitoz süreci, kronolojik sırayla sıralanan beş farklı aşamaya ayrılabilir: Profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz.

Profaz sırasında bölünme için gerekli tüm yapılar toplanır ve gereksiz yapılar yok edilir - çekirdek zarı bozulmaya başlar ve mitotik bir içcik olan bölme aparatı oluşur. Kromatin lifleri ayrı kromozomlarda yoğunlaşmaya başlar. Nucleolus, ribozomal genler (rDNA) etrafında toplanmış büyük bir nükleer alandır. Ribozom üretiminden sorumludur ve profaz sırasında kaybolur, bu nedenle mitoz sırasında rDNA transkripsiyonu durdurulur (Gébrane-Younès ve diğerleri, 1997; Hernandez-Verdun, 2011).

Prometafazda, çekirdek zarfı parçalanır, çekirdek sitoplazma ile birleşir ve ardından mitotik içciklerin mikrotübülleri kromozomal kinetokora bağlanır (Chan ve diğerleri, 2005).

Bir sonraki aşama olan metafaz, maksimum kromozom yoğunlaşması ile karakterize edilir ve bu nedenle, karyotiplerin hazırlanması ve mikroskobik gözlem için çok uygundur. Bu aşamadaki kromozom, iki kardeş kromatitten ve birincil daralma bölgesinde bir sentromerden oluşur. Mitotik milin iki kutbu arasında merkezi olarak yer alan hayali bir bölge olan ekvator düzleminde sıralanırlar (Craig, 1999).

Anafaz, sentromerlerin ayrılmasıyla başlar, bu da iki özdeş kromozomun oluşmasıyla sonuçlanır (her bir kardeş kromatit şimdi bir kız kromozomu olarak adlandırılır). İğ ipliklerinin boylarının kısalması, yeni oluşan yavru kromozomların hücre kutuplarına göç etmesine neden olur.

Son aşama olan telofaz, kromozomların ayrılıp hücrenin zıt kutuplarında toplanıp çözülmeye ve önceki hallerine dönmeye başladıkları zaman meydana gelir. Mitotik içcik ayrışır, yeni nükleer zar oluşur ve nükleoller yeniden oluşur. Bu durumdaki hücrenin iki

kardeş hücre çekirdeği vardır. Hücre bölünmesinin sona ermesi, ana hücrenin bölünmesini gerektirir sitokinez (Glotzer, 2005).

2.6. Mayoz Bölünme

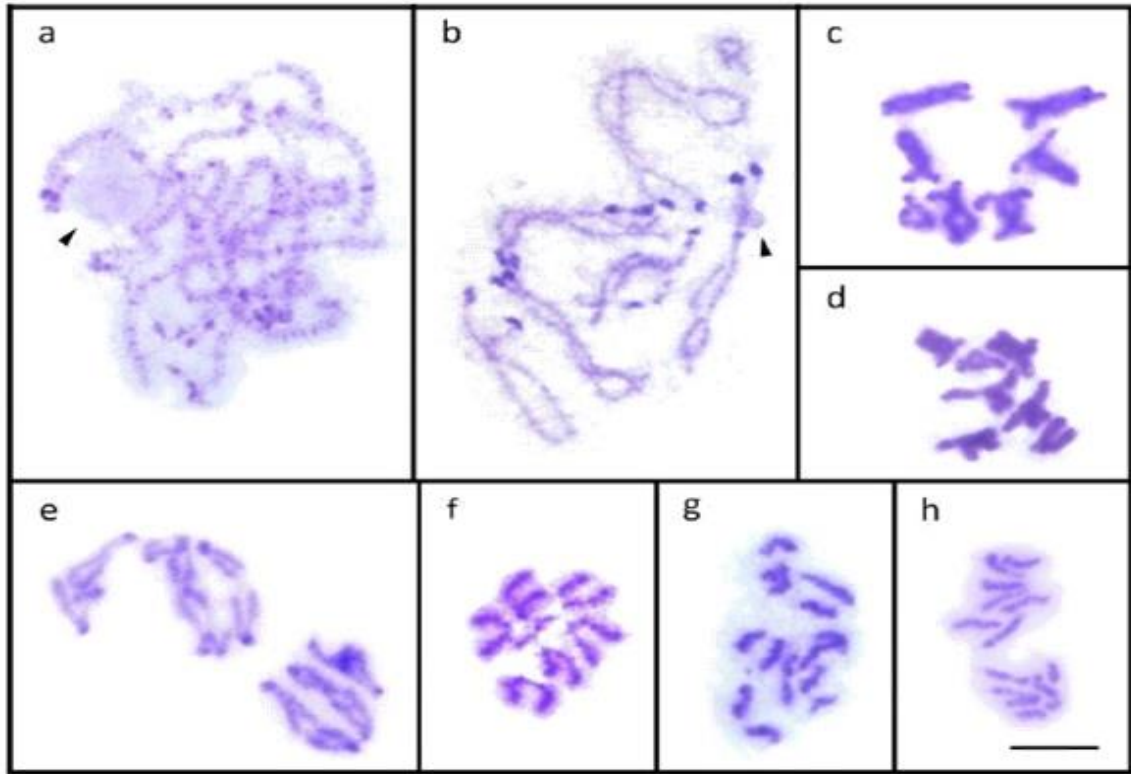
Mayoz - indirgeme bölünmesi, amacı üreme hücrelerinin, gametlerin oluşumu olan özel bir hücre bölünmesi türüdür. Orijinal hücre, spermatogonia veya oogonia ile karşılaştırıldığında haploid kromozom sayısına (n) ve diploid kromozom sayısına (2n) sahiptirler. Mayoz bölünme sırasında kromozom tamamlayıcısının yarıya bölünmesi gerçekleştirilir, çünkü tek bir DNA replikasyonu turunu iki ardışık kromozom segregasyonu turu izler (Kleckner, 1996). Mayoz birçok yönden mitozla benzer. Hücre aynı aşamalardan geçer ve kromozomları yavru hücrelere bölmek için benzer stratejiler kullanır. Kardeş kromatitlerin ayrılması, mitotik bölünme ile aynı şekilde gerçekleşir, ancak öncesinde homolog kromozomların ayrıldığı indirgeme bölünmesi gelir.

Mayozun interfazı, DNA sentezi için bir S periyoduna sahip olan mitozun interfazından farklı değildir. Hücre iki hücre bölünme döngüsü kullanır - Meiosis I ve Meiosis II. Monogean örneklerinin mayotik bölünmesi Paradiplozoon megan, hem heterotipik (Meiosis I) hem de homeotipik bölünmenin (Meiosis II) tipik aşamalarını gösteren Şekil 2.2'de ortaya çıkar. İlk indirgeme (heterotipik) bölünme sırasında homolog kromozomlar ayrılır.

Profaz I'de kromozomlar yoğunlaşmaya başlarken, homolog kromozomlar birbirleriyle eşleşir ve genetik bilgi alışverişi yapılır (homolog rekombinasyon) (Wilkins ve Holliday, 2009). Bölünmenin bu noktası daha karmaşıktır ve beş adıma bölünmüştür: leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez. Leptoten aşamasında, kromatin yoğunlaşır ve kromatitler yakındır. Bir sonraki zigoten aşamasında, homolog kromozomların fiziksel bir teması, sinaps meydana gelir ve bir sinaptonemal kompleks oluşturur. İşlem, dört kromatitli iki değerli/dörtlü kromozomların oluşumuyla sonuçlanır. Bir sonraki adım, kromozomal çaprazlama (crossing over) ve pakiten aşamasında homolog kromozomların kardeş olmayan kromatitleri arasında müteakip rekombinasyondur (bkz. Şekil 2.2'de a). Bu fenomen, ortaya çıkan gametlerdeki genetik değişkenliği artırır. Geçiş noktalarına chiasmata denir. Bu siteler, diploten aşamasında sinaptonemal kompleksin

bozulmasından sonra bile bağlı kalır (bkz. Şekil 2.2'de b). Diakinezi aşaması, çekirdekçik ve çekirdekçik zarının parçalandığı faz I'in son aşamasıdır (bkz. Şekil 2.2'de c) (Pawlovski ve Cande, 2005).

Heterotipik bölünmenin geri kalanı, chiasmata farkıyla mitozda olduğu gibi gerçekleşir. Metafaz I'de (Şekil 2.2'de d'ye bakınız), bivalentler, bağlantının kesilmesini ve Anafaz I'de hücrenin zıt kutuplarına hareket etmesini takiben ekvator düzleminde yer alır (bkz. Şekil 2.2'de e). Telofaz I'de sitokinezden sonra, haploid sayıda iki kromatit kromozomu olan iki yavru hücre oluşur. Interkinesis olarak adlandırılan İnterfaz II, ilk heterotipik bölünmeyi takip eder. Bu aşamada DNA replikasyonu hiç gerçekleşmez. İkincisinde, homeotipik, bölünme kardeş kromatitler mitozda olduğu gibi bölünür. Hücre bölünmesi iki kez gerçekleştiğinden, bir ebeveyn hücre dört haploid gamet üretir bkz. Şekil 2.2'de h'deki iki haploid gamet (Grelon, 2016).

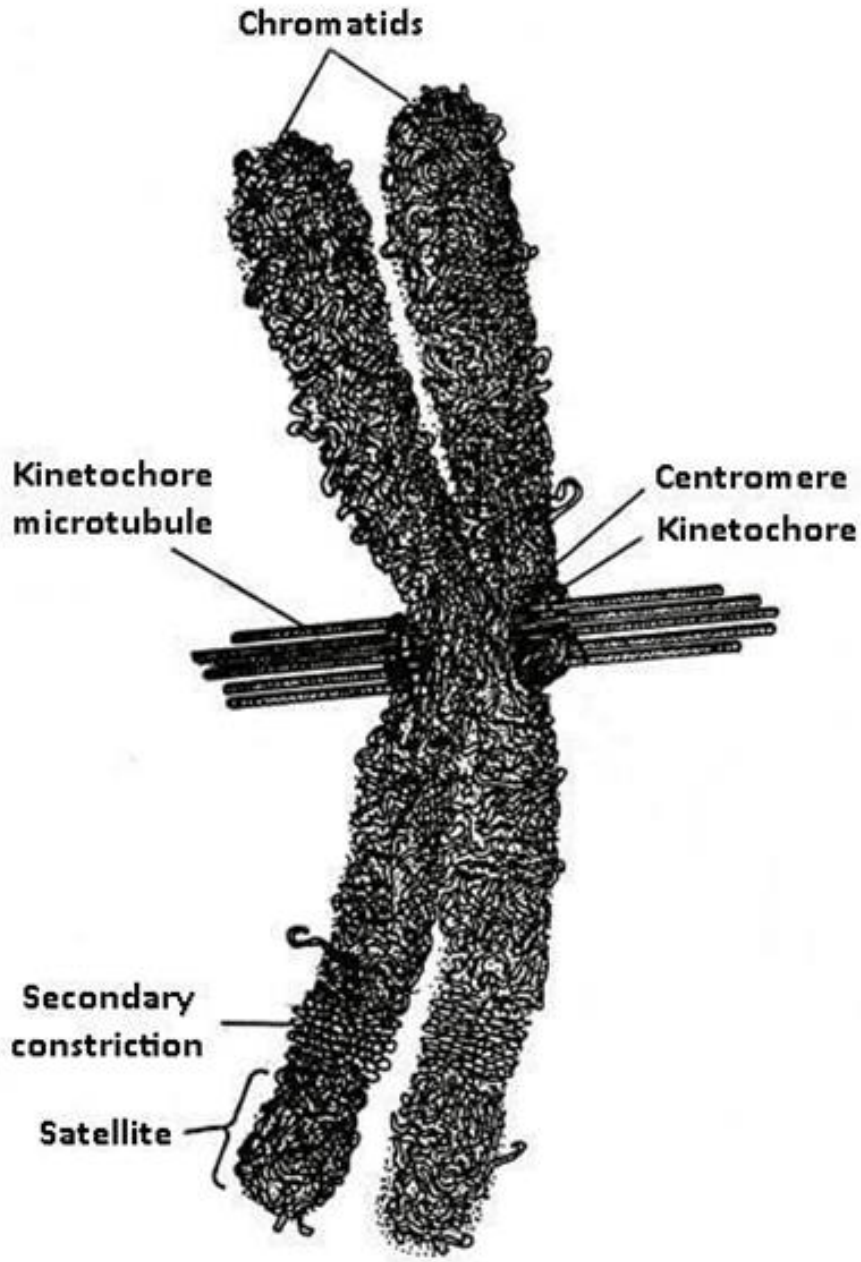


Şekil 2.2. Giemsa boyalı, Paradiplazoon megan (Monogenea, Diplozoidae) spermatositlerinin Giemsa mayotik bölünmesi (Bombarová ve diğerleri, 2014). a) periferinde tek bir nükleolus bulunan bir Pachytene bivalentleri. b) Bir nükleol kalıntısı olan diploten. c) Çekirdekçik kalıntısı olmayan diyakinez. d) Metafaz I. e) Anafaz I. f) Metafaz II. g) Anafaz II. h) Telofaz II – iki haploid sperm hücre (spermatozoon). Ok uçları (a, b) nükleolleri gösterir. Ölçek çubuğu = 10 µm

2.7. Kromozom

Her ökaryotik hücrenin çekirdeğinde, DNA kompleksi ve histon proteinleri kromatin adı verilen yapıyı oluşturur. Birincil işlevi, yaklaşık 140 milyon nükleotid içeren çok uzun DNA molekülü zincirlerini (~5 cm) paketlemektir (Estandarte, 2012). Kromozomlardaki DNA molekülleri, yapısını destekleyen ve koruma sağlayan histon proteinlerinin etrafına birçok kez sıkıca sarılır. Yoğunlaşma seviyesi, belirli hücre döngüsü fazına bağlıdır. Kromozom homojen olarak yoğunlaşmaz. Çok yoğun siteler ve ayrıca gevşek bölümler var. Sıkıştırmaya göre iki temel kromatin yapısı sınıfını ayırt ederiz: transkripsiyonel olarak aktif ökromatin ve transkripsiyonel olarak aktif olmayan heterokromatin. Ökromatin daha az yoğun, daha erişilebilir ve genellikle daha kolay kopyalanır. Aksine, heterokromatin tipik olarak iyi yoğunlaşmıştır, bu da onu transkripsiyon için daha az erişilebilir kılar. Sentromerler ve telomerler gibi yüksek yoğunlukta tekrarlayan DNA elementleri içeren kromozomal bölgelerde sunulur. Hücre döngüsü boyunca yoğunlaşmış olan bölgeler vardır ve bunlar yapısal heterokromatin olarak adlandırılır. İkinci tip olan fakültatif heterokromatinin aktivitesi, hücre bölünmesi aşamasına ve hücre tipine bağlıdır (Grewal ve Jia, 2007).

Kromozomların mikroskopik olarak gözlemlenmesi için en uygun zaman, kromozomların en yoğun olduğu hücre bölünmesinin metafaz aşamasıdır. Metafaz kromozomunda birkaç morfolojik yapı görülebilir (Şekil 2.3).

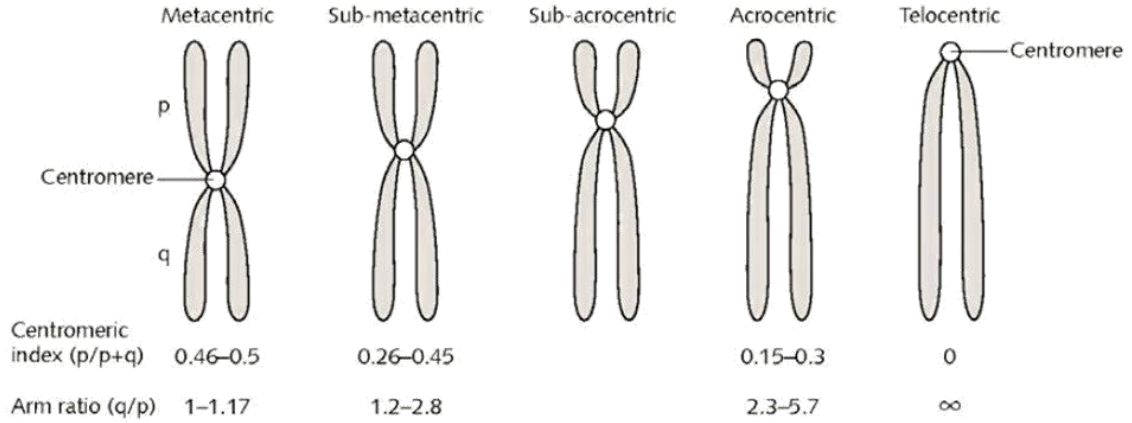


Şekil 2.3. Kromozom yapısı (URL 1)

Centromeren birincil daralma, mikrotübüllerin ve mikrotübül motorlarının, yavru hücelere kromozom ayrımının gerçek mekanik sürecini gerçekleştirmek için bağlandığı kinetochores yapısının oluşumunu belirler. İki tip kromozom vardır: sentromer elemanlarının tüm kromozom uzunluğu boyunca yanal olarak düzenlendiği holosentrik ve kromozom kolundaki birincil bir daralmada tek bir sentromer bölgesinin lokalize olduğu

monosentrik (Belmont, 2006). Birincil daralma, kromozomu iki bölüme veya kollara böler. Daha kısa kollara p kolları, uzun kollara ise q kolları denir.

Kinetochores, mitotik milin mikrotübüllerini sabitlemeye hizmet eden sentromerin yüzeyinde bulunur. Bölünme sırasında kromozomların hücrenin zıt kutuplarına hareketini sağlar. En iyi bilinen kromozom sınıflandırması, sentromer pozisyonuna dayanmaktadır. Şekil 2.4, metasentrik, sub-metasentrik, subakrosentrik, akrosentrik ve telosentrik kromozomlar dâhil olmak üzere farklı sentromer pozisyonuna sahip ana kromozom tiplerini göstermektedir. Sınıflandırma, sentromerik indeks ve kol oranı hesaplamalarına dayanmaktadır. Sentromerik indeks, kısa kolun uzunluğunun kromozomun mutlak uzunluğuna bölünmesidir. Metasentrik kromozom için 0,5'ten telosentrik kromozom için 0'a kadar değişir. Kol oranı, uzun kolun uzunluğunun kısa kolun uzunluğuna bölümüdür. Metasentrik kromozom için 1 ile telosentrik kromozom için ∞ arasında değişir (Guerra, 1986).



Şekil 2.4. Sentromer pozisyonuna, sentromer indeksine ve kol oranına dayalı kromozom sınıflandırması. p kısa kol, q uzun kol (Sumner, 2003)

Karyotip terimi, ökaryotik hücrenin çekirdeğindeki bir dizi kromozomu karakterize eder. Kromozom sayısının, toplam boyutlarının, kol boyutlarının oranının ve her kromozomun morfolojisinin bir tanımını içerir. Birçok hücrenin karyotipinin gözlemlenmesine ve ölçülmesine dayanan kromozomların şematik sunumu bir idiogramdır. Ayrıntılı DNA dizi analizi, gen haritalaması ve kromozom yapısı veya işlevi hakkında bilgi sağlar (Bickmore, 2001).

Telomerler, ökaryotik kromozomların fiziksel uçları olarak tanımlanır ve DNA ve telomer bağlayıcı proteinlerin uzun ardışık tekrarlarından oluşur. Rollerini, kromozomun uçtan uca kaynaşmasını, kromozom uçlarının rekombinasyonunu ve bozulmasını önlemektir (Wai, 2004). Hayvanlarda (Metazoa) sadece 5 motif bulunduğundan telomerik tekrar motifleri oldukça korunmuş görünmektedir. İlk, heksamerik tekrar (TTAGGG)_n, tüm Metazoa için atadan kalma bir telomerik tekrar motifi olarak kabul edilir (Traut ve diğerleri, 2007). Bilinen diğer telomerik tekrar motifleri, nematodlardaki heksamerik tekrardır (TTAGGC)_n (Müller ve diğerleri, 1991; Wicky ve diğerleri, 1996; Niedermaier ve Moritz, 2000; Ahn ve Winter, 2006; Bombarová ve diğerleri, 2009), (TGTGGG)_n bdelloid rotiferlerde (Gladyshev ve Arkhipova, 2007), eklembacaklılarda pentamerik tekrar (TTAGG)_n (Okazaki ve diğerleri, 1993; Sahara ve diğerleri, 1999; Vítková ve diğerleri, 2005) ve türevleri form, (TCAGG)_n, un böceğinde bulunur (Osana ve diğerleri, 2006). Bununla birlikte, birkaç tür grubu orijinal telomerik tekrar motifini kaybetti veya farklı telomer koruma mekanizmaları geliştirdi (Garavís ve diğerleri, 2013). Monogenea'da sadece bir tür, Paradiplazoon homioion, telomerik tekrar motifi için çalışılmış ve atalara ait heksamerik tekrar (TTAGGG)_n bulunmuştur.

Kromozom yapısında ikincil daralma da gözlenebilir. Ribozomal RNA'ya (rRNA) kopyalanan ribozomal genlerin (rDNA) art arda tekrarlanan dizilerinden oluşan nükleolar düzenleyici bölgeyi (NOR) temsil eder. Ökaryotlarda bu bölge, 18S, 5,8S ve 28S ribozomal RNA'yı kodlayan üç genenden oluşur. Bu genlerin tekrarları, bir ila birkaç kromozom çifti üzerinde kümeler oluşturur. Kromozomun sonuna yakınsa, kolun uydu adı verilen terminal bölümünü ayırır. NOR'ların sayısı ve konumu her tür için karakteristiktir (McStay, 2016).

2.8. Sitogenetik Yöntemler

Sitogenetik yöntemler, hücrelerdeki genetik materyalin mikroskopik düzeyde çalışmasına izin verir. Tüm sitogenetik tekniklerin amacı, tüm kromozomlar veya özel ilgi alanları için optimum çözünürlüğü elde etmektir. Yaygın sitogenetik geleneksel boyama, örneğin Giemsa bazlı boyama (bknz. Şekil 2) sitogenetikteki önemli rolünü korur. Kromozomların sayısı, temel morfolojisi ve önemli yapısal değişiklikleri hakkında bilgi verir (Dolan, 2011). Bu yöntemler yüksek çözünürlüklü sonuçlar vermese de daha ileri

moleküler yöntemlerin anlaşılmasında ve geliştirilmesinde önemli adımlar atmaktadır (Bates, 2011). Giemsa bazlı boyama, monogeneanların tüm sitogenetik çalışmalarında mevcuttur.

Boyama işlemini değiştirerek, her tür için özel olan tipik çizgili kromozomlarla sonuçlanan farklı boyama elde edebiliriz. Bununla birlikte, diferansiyel teknikler, kromozom kümelerindeki belirli yapıları da görselleştirebilir. Monogeneanlarda kullanılan tek farklı boyama, gümüş nitrat boyama tekniğidir (Bombarová ve diğerleri, 2014). Hücre döngüsü sırasında sayı ve lokalizasyona özgü NOR bölgelerini tespit eder. Gümüş boyamanın sadece önceki interfaz sırasında fonksiyonel olarak aktif olan NOR'ları ortaya çıkardığı bilinmektedir (Roussel ve Hernandez-Verdun, 1994).

Son yıllarda floresan boyaların kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Popüler bir karşı boyama olan DAPI, çift sarmallı DNA'ya bağlandığında mavi floresan yayar (Heng ve Tsui, 1993). Birkaç monogenean türü DAPI ile muamele edildi (Kořková ve diğerleri, 2011; Bombarová ve diğerleri, 2014). Karşılaştırıldığında, YOYO1, yeşil flüoresans emisyonu için bilinen daha az bilinen flüoresan boyadır (Günther ve diğerleri, 2010). Yalnızca bir monogenean karyolojik analizde kullanıldı (Bombarová ve diğerleri, 2014). Floresansları, DAPI'de 20x (Farahat ve diğerleri, 2017) ve YOYO1'de 1000x (Hirons ve diğerleri, 1994) olmak üzere DNA'ya bağlandıktan sonra çarpıcı biçimde yoğunlaşır. Öte yandan, floresanları stabil değildir ve solmalarını azaltmak için antifade kullanılması uygundur. Floresan boyaların avantajı Giemsa bazlı boyamada olduğu gibi ön işlem gerektirmemeleridir. Böylece kromozomlardan protein ekstraksiyonu önlenmiş olur (Estandarte, 2012). Ayrıca, floresan boyalar hücrelerin eşzamanlı olarak lekelenmesine ve problarla yerinde hibritlenmesine izin verir (Christian ve diğerleri, 1998).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), bir kromozom, doku kesiti ve hatta tüm doku üzerindeki spesifik nükleotit sekansının tespiti ve lokalizasyonu için kullanılan moleküler bir tekniktir. Yöntem, numunenin tamamlayıcı dizisine hibridize olan problar olarak adlandırılan etiketli tek iplikli dizileri kullanır. Sitogenetikte bu yöntem, tek kopya genleri, tekrarlayan dizileri, kromozom yapılarını (sentromerler, telomerler, kromozom kolları gibi), tüm kromozomları veya belirli bir türün tüm genomunu görselleştirir

(Jensen, 2014). Monogeneanlarda, Paradiplazoon morganii'nin rDNA genlerini saptamak için FISH'i kullandığı bilinen tek bir çalışma vardır (Bombarová ve diğerleri, 2014).

Karşılaştırmalı genomik in situ hibridizasyon, çok renkli floresan in situ hibridizasyon (M-FISH) ve spektral karyotipleme (SKY) gibi diğer ileri moleküler teknikler, Monogenea'nın hiçbir örneğinde gerçekleştirilmedi. Şu anda, bu analizler, genetik materyalin genel bütünlüğünü incelemek için etkili bir yöntem olmaya devam etmektedir. Moleküler sitogenetik teknikler, geleneksel sitogenetik yöntemlerin kabiliyetini büyük ölçüde geliştirir. Avantaj, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında kullanılmaları ve dolayısıyla metafaz tarafından herhangi bir sınırlamadır. Bu yöntemler hem klinik tanı hem de araştırmalarda günlük olarak kullanılmaktadır (Hsieh, 2011).

2.9. Monogenea

Platyhelminthes'deki üç sınıfın tümü - Trematoda, Cestoda ve Monogenea (subphylum Neodermata) (Lockyer ve diğerleri, 2003), dorsoventral olarak düzleştirilmiş ve bilateral simetrik gövdelerin ortak özelliğine ve koruyucu tabaka ile kaplı karakteristik dış yüzeye sahiptir - çok işlevli sinsityal tegument (neodermis) (Halton, 1997). Yine de, Monogenea sınıfı birçok yönden benzersizdir. Konağın dış yüzeylerini enfekte eden neredeyse tamamen ektoparazitik helmint grubudur. Monogeneanların %95'inden fazlasının balıkların deri ve solungaçlarında parazit olduğu tahmin edilmektedir (Euzet ve Combes, 1998). Bununla birlikte, Enterogyrus sp. gibi belirli türlerde iç habitatlar da bilinmektedir. Balıkların bağırsaklarında parazitlenme (Cone ve diğerleri, 1987), balıkların burun dokusunda *Merizocotyle icopae* (Cribb ve diğerleri, 2003), kurbağaların mesane ve idrar yollarında parazit yapan Polystomatidae familyasının türleri (MacDonald ve Combes, 1978; Aisien ve Du Preez, 2009) veya Oculotrema hipopotam su aygırı gözü (Thurston ve Laws, 1965). Ek olarak, solungaç paraziti amfibdelidler, örneğin Amphibdella flavolineata, elektrik ışınlarının kanında genç aşamalara sahiptir (Lyons, 1971). Kopepodlardaki Udonella fugu gibi omurgasızlarda da çok sayıda tür bulunur (Kearn, 1998). Tüm su ekosistemlerinde, tatlı su, nehir ağzı ve deniz habitatlarında meydana geldikleri bilinmektedir (Gilmore et al., 2012). Temsilciler, ev sahibi ve organ lokalizasyonu için yüksek özgüllüğe sahiptir ve bu grubun ortak evrimsel ve ekolojik çalışmalar için çekiciliğine katkıda bulunur (Whittington ve diğerleri, 2000).

Monogenean istilalar tahrişe ve aşırı mukus üretimine neden olur ve bakteri, viral veya mantar istilası için bir açıklık oluşturur. Sağlıklı olgun bir balık üzerindeki birkaç monogenean genellikle önemli değildir (Reed ve diğerleri, 2009). Bununla birlikte, az sayıda örnek kuluçkahanelerde yavaş yüzme, anemi, kanama, doku kaybı, iltihaplanma ve hatta ciddi ölümlere neden olabilir (Ogawa, 2015). Su ürünleri endüstrisindeki ciddi ekonomik etkilerden monogenean parazitler sorumludur. Örneğin, *Gyrodactylus salaris*, vahşi Atlantik somon stokları için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Müteakip kayıplar, yıllık zararın 55 milyon ABD dolarının üzerinde olduğu Norveç'te büyük önem taşımaktadır (Denholm ve diğerleri, 2016).

2.9.1. Monogenea Sınıfının Filogenetik Özellikleri

3000 ile 4000 arasında monogeneanın tanımlandığı tahmin edilmektedir (Whittington, 1998). Bunların en konakçıya özgü parazitler arasında olduğuna inanılır ve genellikle her balık türünün en az bir benzersiz Monogenea türüne sahip olduğu varsayılır. 25.000'den fazla teleost balık türü biliniyorsa, Monogenea sınıfının aynı sayıda türe sahip olduğunu varsayabiliriz. Bu nedenle parazit türleri açısından en zengin gruptur (Whittington, 2005; Buchmann ve Bresciani, 2006).

Monogeneanların mevcut taksonomisi, geniş çeşitliliklerinden dolayı tam olarak açık değildir ve bu sınıfı sınıflandırmanın birkaç yolu vardır. Çoğu morfolojik özelliklere dayanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan sınıflandırma, Monogenea sınıfını 47 anatomik ve ultrastrüktürel özelliğe göre (örneğin bağlanma organlarının yapısı, osmoregülasyon sistemi, duyu organları) Monopisthocotylea ve Polyopisthocotylea alt sınıflarına ayırır (Boeger ve Kritsky, 2001). Bu iki vergideki temel fark, besleme stratejisidir. Monopisthocotyleanlar epitel dokusu ile beslenirken, poliopisthocotyleanlar konağın kanında varlığını sürdürür.

Filogenetik analizler ayrıca sperm yapısına (Justine, 1991) ve mitokondriyal moleküler verilere (Perkins ve diğerleri, 2010) ve nükleer belirteçlere dayanıyordu. En yaygın olarak kullanılan nükleer belirteçler, ribozomal genler, 28S rDNA (Rohde ve Justine, 2001), 18S rDNA (Rohde ve diğerleri, 1993) ve dâhili kopyalanmış aralayıcılar, ITS1 ve ITS2'dir (Matejusová ve diğerleri, 2001a). Çalışmalar Monogenea sınıfının filogenisi

açısından uyuşmamaktadır. Morfolojik bulgulara göre, monogeneanlar kesinlikle monofiletiktir (Boeger ve Kritsky, 2001), bazı moleküler analizlerde olduğu gibi (Lockyer ve diğerleri, 2003). Diğer moleküler analizler, sınıfın parafili olduğunu bildirir (Rohde ve diğerleri, 1993; Perkins ve diğerleri, 2010). Genel olarak, monogenean filogenetik ağaç, mevcut aşamada yetersiz bir şekilde çözülmüştür.

2.9.2. Monogenea Sınıfının Morfometrik ve Morfolojik Özellikleri

Monogeneanların gövdesi tipik olarak 0,15 - 20 mm uzunluğunda, maksimum 30 mm uzunluğundadır. Boyut, belirli monogenean türlerine bağlı olarak değişir. Poulin (1996), vücut boyutunun sıcaklık, enlem, konaktaki bağlanma yeri veya su habitatı türü gibi dış faktörlerden kaynaklanabileceğini öne sürerek konakçı boyutu ile parazit boyutu arasında bir ilişki olmadığını beyan etmiştir. Matejusova ve ark. (2002), ev sahibi balığın boyutunun bağlanma organlarının morfometrik özelliklerini etkilediğini öne sürmüştür. Vücut genellikle renksizdir.

2.9.3. Bağlanma Organları

Evrim sırasında, monogeneanların bağlanma organları çeşitlendi. Monogeneanlarda bağlanma organlarının yapısı (üreme sisteminin yapısıyla birlikte) familya ve takım düzeyinde ve ayrıca tür belirlemede sınıflandırma için bir temel görevi görür (Pouyaud ve diğerleri, 2006).

Monogeneanlar ağırlıklı olarak ektoparazitlerdir (yukarıda birkaç istisnadan bahsedilmiştir), konakçının yüzeyine etkili bir şekilde bağlanmaya bağlıdır. Balık konakları tarafından üretilen güçlü solungaç havalandırma akımlarına sürekli olarak maruz kalırlar (Kearn, 2011). Bu nedenle, bir parazit kendini solungaçlara sağlam bir şekilde tutturmalıdır. Bu, iyi gelişmiş ve genellikle oldukça karmaşık bir posterior yapışkan organ olan haptor (veya opisthaptor) tarafından sağlanır (Halton, 1982). Haptorda geliştirilen klemler, düz konak yüzeylere emme yoluyla bağlanan dairesel, kaslı organlar olabilir, yani *Capsala* sp. (Ingram ve Parker, 2005). Haptorun daha karmaşık yapıları birçok destekleyici iskelet elemanı içerir, yani *Gyrodactylus* sp. (García-Vásquez ve diğerleri, 2011). Bu yapılar, solungaç filamentlerinin yüzeyleri

etrafında çene benzeri bir kenetlenme sağlar. Karmaşık kıskaçlara sahip solucanlar, emici görevi gören kıskaçlara sahip olanlardan daha hareketsiz olma eğilimindedir (Hayward, 2005). Kelepçeler, sayı ve şekil olarak değişen sert skleritler veya küçük kancalarla dâhili olarak desteklenir (Whittington, 2005). Ek olarak, bazı ailelerde epitel hücrelerini ve ekstra kavrama için dişlere, çivilere ve/veya dikenlere benzeyen küçük skleritleri barındırmak için sıkı bağlanma için hamuli adı verilen kancalar bulunur, yani *Monocotyle* sp. (Santos ve diğerleri, 2006).

Vücudun ön kısmı olan prohaptor, özellikle hareket, beslenme ve üremede etkilidir (Whittington ve ark., 2000). Doku yapışması vücudun ön kısmının en önemli görevidir. Özellikle monopisthocotylean monogeneanlar, yani *Diplectanum* sp. (Hadied ve diğerleri, 2015). Bu monogeneanlar, siteden siteye hareket ettiklerinde ön uçtan yapıştırıcılar salgırlar. Birkaç tür, kancalar ve/veya emme yoluyla mekanik tutturma işlemini desteklemek veya değiştirmek için arka uçta ikincil olarak yapıştırıcılar geliştirmiştir, yani *Pseudodactylogyrus anguillae* (Arafa ve Reda, 2012). Aynı çalışma, haptorda bulunan bezlerin, hamülün konakçının yüzeyine nüfuz etmesini kolaylaştıran histolitik bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

2.9.4. Tegüment

Birçok işlevi olan vücut yüzeyi, tegument, Platyhelminthes'in tüm sınıflarında gelişmiştir. Erişkin tegumenti, larvanın kirpikli epidermisinin yerini alan cilalı olmayan bir sinsi neodermis tarafından oluşturulur (URL 2). Vücudun iç desteğini sağlar, besinlerin parazite geçişine katılır, salgı, atılım ve ozmoregülasyonda rol oynar ve duyuşsal bir işlevi vardır. Ek olarak, bağışıklık reaksiyonlarına ve konak enzimlerine karşı koruma bölgesidir (Esh ve Fernandez, 2013).

2.9.5. Sinir Sistemi ve Duyu Organları

Monogenean sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (CNS) ve periferik sinir sistemi (PNS) olarak ikiye ayrılır. CNS, eşleştirilmiş serebral ganglionlardan ve enine komissürlerle bağlantılı üç çift uzunlamasına sinir gövdesinden (dorsal, merkezi ve lateral) oluşur. Haptorda, sinir kökleri, kancalara veya kelepçelere bağlı bağlanma kaslarının

innervasyonu için çevreye uzanır. Tüm ana anatomik elemanlar PNS tarafından innerve edilir (Halton ve diğerleri, 1998).

Monogeneanlarda kemoreseptörler, tangoreseptörler, reoreseptörler ve fotoreseptörler gibi çeşitli duyu organları mevcuttur (Buchmann ve Bresciani, 2006). Fotoreseptörler genellikle larvalarda bulunur ve yetişkinlerde sıklıkla azalır veya yoktur (Lyons, 1973).

2.9.6. Sindirim Borusu

Monogeneanlarda sindirim kanalı, hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak iyi farklılaşmış bir yapıdır ve ön bağırsak ve bağırsak çekumuna bölünmüştür. Ön bağırsak, yapı olarak farklılık gösterir, ancak esas olarak ağız, farinks ve yemek borusundan oluşur. Ağız, basit bir tüp, emicileri olan bir bukkal huni veya oral bir emici ile çevrili bir açıklık olabilir. Bağırsak çekumu genellikle çifttir ve basit ve dallanmamış olabilir veya medial ve lateral olarak dallanabilir (Halton, 1982). Başka bir deyişle, sindirim ve damar sisteminin işlevlerini birleştiren bir gastrovasküler sistemdir (URL 2). Sindirimden sorumlu olan proteolitik enzimler, esas olarak ön bağırsak bölgesinde bulunan sindirim bezleri tarafından salgınır. Gastrodermis, besin emici görevi görür ve gıda türüne göre geliştirilmiştir. Poliopisthokolyleanlar, özellikle kanlı solucanlar, hemoglobinin absorpsiyonuna uyarlanırken, opisthocotyleanlar epitel hücrelerinin ve mukusun sindirimine uyarlanır (Halton, 1975).

2.9.7. Kas Sistemi

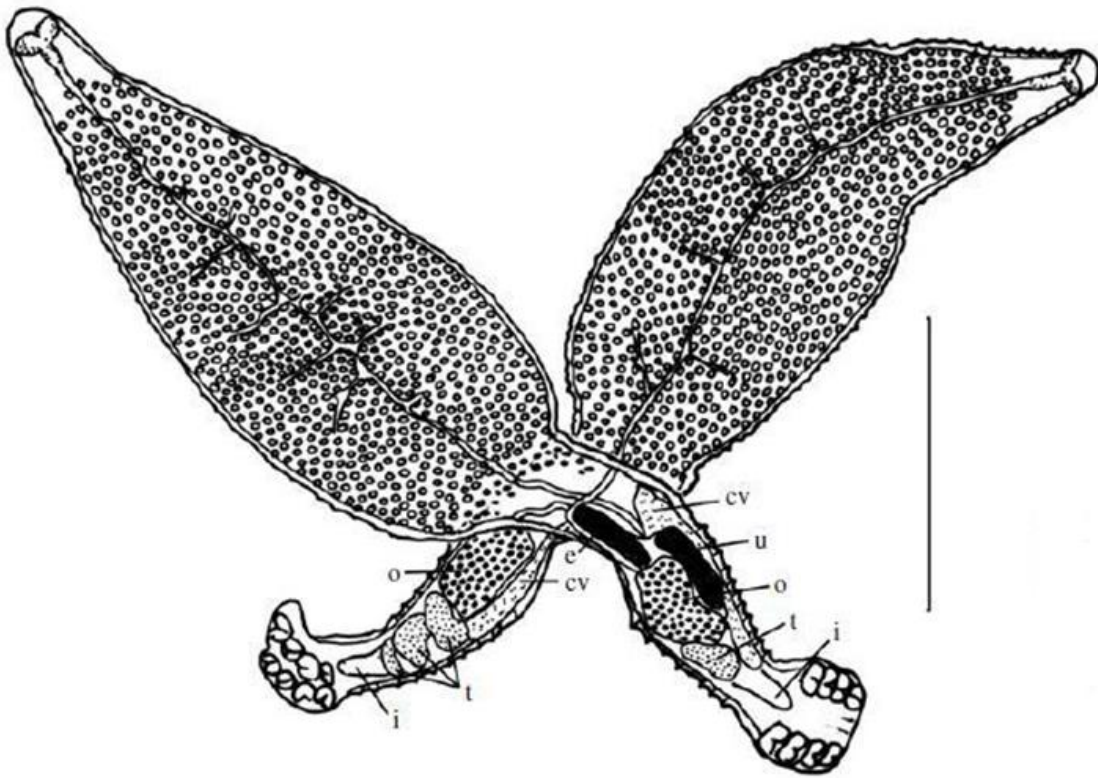
Birçok monogenea kalıcı olarak bağlıyken, diğerleri konakçının vücudunun yüzeyi üzerinde hareket edebilir veya konumlarını bir bölgeden diğerine değiştirebilir. Tipik olarak, sülük benzeri bir şekilde hareket ettikleri görülebilir. Parazitin vücudunun gerilmesini temsil eder, solucanın ön kısmını tutturur, vücudu bükerken arka kısmını ayırır. Bağlanma organlarına ek olarak kaslar, erkek ve dişi çiftleşme organlarının ve sindirim kanalının ağız ve farinksinin hareketinde işlev görür (Buchmann ve Bresciani, 2006).

2.9.8. Boşaltım Sistemi

Protonephridial boşaltım sisteminin temel bileşenleri, toplayıcı kanallarla birbirine bağlanan protonephridialardır (alev hücreleri). Birlikte, vücudun ön kısmındaki boşaltım gözeneklerine devam eden daha büyük kanallar oluştururlar (Volf a Horák, 2007).

2.9.9. Yaşam Döngüsü ve Üreme

Bu helmintlerin yaşam döngüsü doğrudan ve monoksendir, yani ara konakçıların katılımı olmadan. Monogeneanlar hermafrodit yassı solucanlardır ve bir yumurtalık ve testislerle donatılmıştır. Ek olarak, vitellaria, bir ootip ve bir seminal hazne mevcut olabilir. Sert sklerotinize yapılar sirus (penis) ve vajinada bulunabilir ve önemli tanısal özellikler olarak kullanılır (Buchmann ve Bresciani, 2006). Çoğu monogenean tür, yumurtadan çıkar ve kuluçkadan çıktıktan sonra enfektif kirpikli larvaları (oncomiracidia) salan yumurtalar üretir. Nispeten kısa bir serbest yaşam evresinin ardından larvalar, konağın yüzeyine yerleşir ve yetişkin evrelerine dönüşür. Diğer monogeneanlar canlıdır, canlı doğurur ve neredeyse tamamen gelişmiş yavrulardır. Döngü her zaman su ortamına bağlıdır. Sıcaklık, monogenean popülasyonları etkileyen ana abiyotik faktördür. Bu nedenle, hem yumurtlayan hem de canlı olan monogeneanların üremesi büyük ölçüde sıcaklığa bağlıdır. Yumurtlayan türlerde, yumurta üretimi, yumurtadan çıkma ve larva sonrası gelişme gibi üreme süreçlerinin belirli sınırlar içinde sıcaklıkla arttığı gözlemlenmiştir (Buchmann ve ark., 2004). Benzer şekilde, canlı türlerde üreme hızı, bir üst sınıra kadar sıcaklıkla pozitif olarak ilişkilidir (Jansen ve Bakke, 1991). Tek genlilerde başarılı üreme şansını artıran hem kendi kendine dölleme hem de çapraz dölleme gözlenmiştir (Hoai ve Hutson, 2014). Şekil 2.5, üreme organlarına odaklanarak Diplozoidae familyasının temsilcisinin temel anatomisini göstermektedir.



Şekil 2.5. Diplozoidae familyasının temel anatomisi (Avenant-Oldewage ve ark., 2014). e yumurta; cv ortak vitellin kanalı; bağırsak sonu; o yumurtalık; testis; sen rahim. Ölçek çubuğu = 1 mm

2.9.10. Monogenea Sınıfının Sitogenetik özellikleri

Monogenea sınıfının sitogenetik bilgisi zayıftır. Şimdiye kadar yayınlanan çalışmalar kısmi veya eksiktir. Bilinen yaklaşık 4000 türden sadece 21'i karyolojik olarak analiz edilmiştir, bu parazitlerin toplam sayısının % 0,5'inden azdır. Diplozoidae familyası diğer familyalara göre sitogenetik açısından 12 türün karyotipi ile en çok çalışılan familyadır. 8 tanımlanmış tür ve 4 sınıflandırılmamış tür içerir. Bu karyotiplerin sınıflandırılması ile birlikte detaylı bilgiler Tablo 1'de özetlenmiştir. Diplozoidae familyasına ek olarak Mazocraidae ve Gyrodactylidae familyalarından 9 tür daha karyotipik olarak analiz edilmiştir (Harris, 1985; Rohde, 1994; Cable ve Harris, 2002). Diplozoidae familyasının karyotipik olarak incelenen türlerinde haploid kromozom sayısı $n=4$ (*Diplozoon paradoxum*) ile $n=7$ (*Eudiplozoon nipponicum*, *Paradiplozoon megan*, *P. bliccae*, *P. sapae*, *P. nagibinae*, *P. Pavlovskii*, *P. homoion*) arasında değişmektedir (Rohde, 1994; Košková ve diğerleri, 2011; Bombarová ve diğerleri, 2014). Gyrodactylidae'de 6 kromozom (Harris, 1985; Cable ve Harris, 2002) ve Mazocraeidae'de 8 kromozom

(Rohde, 1994) olmak üzere, diğerk familyalardan türlerin haploid tamamlayıcısında benzer sayıda kromozom vardır. İlgili karyotiplerin çoğı için, Giemsa kullanılarak geleneksel boyama gerçekleştirilmiştir. İkincil daralma sadece 5 türde gözlemlendi. *P. megan* ve *P. bliccae*'nin ikincil daralması No. 7 kromozom çiftinde yer almaktadır. *P. nagibinae* ve *P. sapae*, 4. kromozom çiftinin uzun kollarında ikincil daralma sergilemiştir. *D. paradoxum*, 1. kromozom çiftinde ikincil daralmaya sahip tek diplozoiddir. Floresan boya DAPI ile ileri boyama sadece diplozoidlerde kullanıldı (Kořková ve diğerkleri, 2011; Bombarová ve diğerkleri, 2014). Bu çalışmalar, heterokromatinin boyutu ve miktarı hakkında yeni bilgiler getirmiştir.

Kořková et al. (2011) ve Bombarová ve diğerkleri. (2014), pericentromerik bölgelerde heterokromatin blokları ortaya çıkardı, bu da diplozoidlerin küçük bir tekrarlayan DNA kaynağına sahip olduğunu öne sürdü. AgNO₃ boyama ve floresan boya YOYO-1'in kullanımı daha az yaygındır. YOYO-1 sadece *P. megan* karyotipinde kullanılmış ve profazın erken evrelerinde nükleolusun varlığını ve diplotende parçalandığını ortaya çıkarmıştır (Bombarová ve ark., 2014). AgNO₃ henüz monogenean karyotipte uygulanmadı. Son teknoloji sitogenetik yöntemi, monogeneanlarda yalnızca bir kullanımla *floresan in situ hibridizasyon*dur. Bu yöntemle 18S rDNA probu, 7 No'lu kromozom çifti üzerinde bir sinyal ile *P. megan*'daki ribozomal genlerin yerini ortaya çıkarmıştır.

Tablo 2.1. Diplozoidea familyasındaki karyolojik verilerin irdelenmesi

Tür	Konukçu balık	2n, (n)	NF	Kaynak
<i>Eudiplozoon nipponicum</i>	<i>Cyprinus caprio carpio</i>	14	14	Koroleva (1968b)
<i>Paradiplozoon Megan</i>	<i>Leuciscus idus</i>	(7)	14	Koroleva (1968b), Bombarová <i>et al.</i> (2014)
<i>Diplozoon paradoxum</i>	<i>Abramis brama</i>	8, n=3m + 1a	14	Koroleva (1968a, b)
<i>D. paradoxum</i>	<i>A. brama</i>	8, n=3m + 1a	14	Košková <i>et al.</i> (2011)
Diplozoidea sp.	<i>A. brama</i>	(7)	14	Bovet (1967) [Koroleva (1968b)'ya göre yanlış veri]
<i>Paradiplozoon bliccae</i> (syn. <i>Diplozoon gussevi</i> ^a)	<i>Blicca bjoerkna</i>	14, n=7a	14	Koroleva (1968 a, b; 1969)
<i>Paradiplozoon bliccae</i> (syn. <i>D. markewitchi</i> ^a)	<i>Vimba vimba</i>	14, n=7a	14	Koroleva (1968b, 1969)
<i>P. bliccae</i>	<i>B. bjoerkna</i>	14, n=7a	14	Košková <i>et al.</i> (2011)
<i>Paradiplozoon sapae</i>	<i>Ballerus sapa</i>	14, n=7a	14	Koroleva (1969)
<i>P. sapae</i>	<i>B. sapa</i>	14, n=7a	14	Košková <i>et al.</i> (2011)
<i>Paradiplozoon nagibinae</i>	<i>Ballerus ballerus</i>	14, n=7a	14	Koroleva (1969)
<i>P. nagibinae</i>	<i>B. ballerus</i>	14, n=7a	14	Košková <i>et al.</i> (2011)
<i>Paradiplozoon pavlovskii</i>	<i>Aspius aspius</i>	14, n=7a	14	Koroleva (1968 a, b)
<i>Paradiplozoon homoion</i>	<i>Rutilus rutilus</i>	14, n=7a	14	Koroleva (1968 a, b)
Diplozoidea sp.	<i>R. rutilus</i>	14, n=7a	14	Bovet (1967)
Diplozoidea sp. (sp. n.)	<i>Rutilus caspicus</i>	10, n=2m + 3a	14	Koroleva (1969)
Dipl Diplozoidea sp.	<i>Barbus barbus</i>	(7)	14	Baer and Euzet (1961)

2n: diploid kromozom sayısı,
(n): haploid kromozom sayısı,
NF: kromozom kol sayısı, m metasentrik kromozom
a: akrosentrik kromozom

Bu yöntemlerle bilim adamları, heterokromatin blokları, nükleoller, NOR'lar veya ribozomal genler gibi yapıları bulabilirler. Bu yapıların haritasını çıkararak, monogean karyotipin gelişimi ve dolayısıyla tüm sınıfın evrimi hakkında teoriler oluşturulabilir. Koroleva'nın (1969) hipotezi, karyotiplerinde daha fazla sayıda kromozom bulunan türlerin, 2n=14 (*E. nipponicum*, *P. Megan*, *P. bliccae*, *P. sapae*, *P. nagibinae*, *P. pavlovskii*, *P. homoion*) olduğunu öne sürer.), atasaldır ve bir, iki veya üç akrosentrik kromozom çiftinin Robertsonian translokasyonu, karyotiplerinde daha az kromozom bulunan türetilmiş türler, 2n=8'dir. (*D. paradoxum*).

Cyprinid balıkların sistematiklerindeki karışıklık ve özellikle genetik çalışmalardaki eksiklikler bu balıkların parazitlerinin belirlenmesi ve hatta belirlenebilen parazitlerin tür teşhislerinde de yaşanmaktadır. Yetiştiriciliği yapılan balıklar için ekonomik değerlerinden kaynaklı olarak birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen doğal balık türlerinin parazitleri ile ilgili daha az sayıda çalışma bulunmaktadır (Krupp, 1985; Koyun, 2012; Coad, 2014). Hem tüm balık türlerinin var olan parazit türlerinin tespiti hem de belirlenebilmiş olan parazitlerin moleküler düzeydeki tür teşhislerinde büyük eksiklikler bulunmaktadır. Oysa Balıklar, *Plathelminthes*, *Nemathelminthes* ve *Acanthocephala* gibi helmintlere konukçuluk ederler. Bu grupların tatlı ve tuzlusu balıklarında ne zaman, niçin ve ne şekilde parazitlendiği bilim dünyasında merak edilmiş ve dolayısıyla ilgi uyandıran konulardan birini oluşturmuştur.

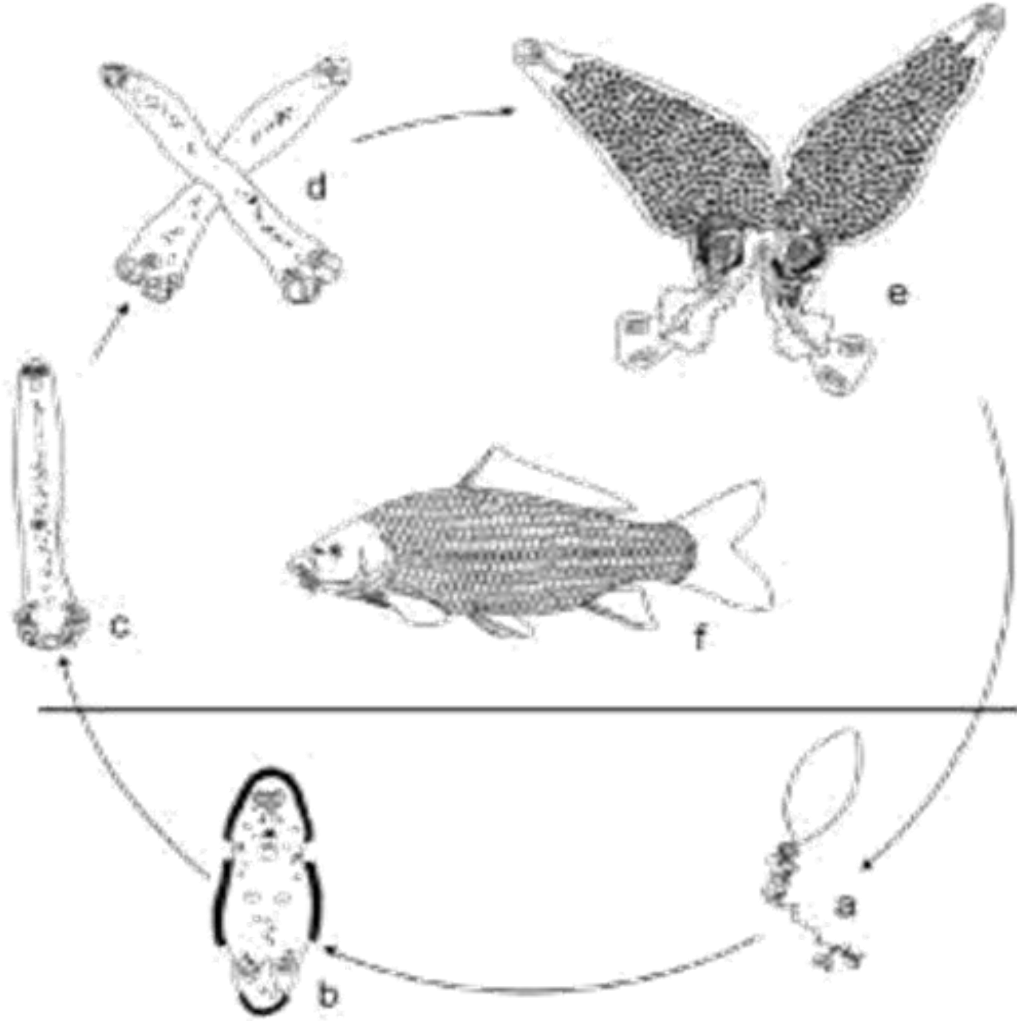
Plathelminthes filumunda yer alan monogenean grubu canlılar çoğunlukla balık parazitidirler. Balıkların solungaç ve vücut yüzeylerinde parazitlenen tek Helmint grubudur. Kısa yaşam döngüleri, yüksek fekonditeleri, konak özgünlükleri, tür sayılarının fazla olmaları ve değişik ortamlarda bulunmaları nedeniyle bilim dünyasında ilgi uyandıran konulardan birini oluşturmaktadır.

2.9.11. Family Diplozoidae

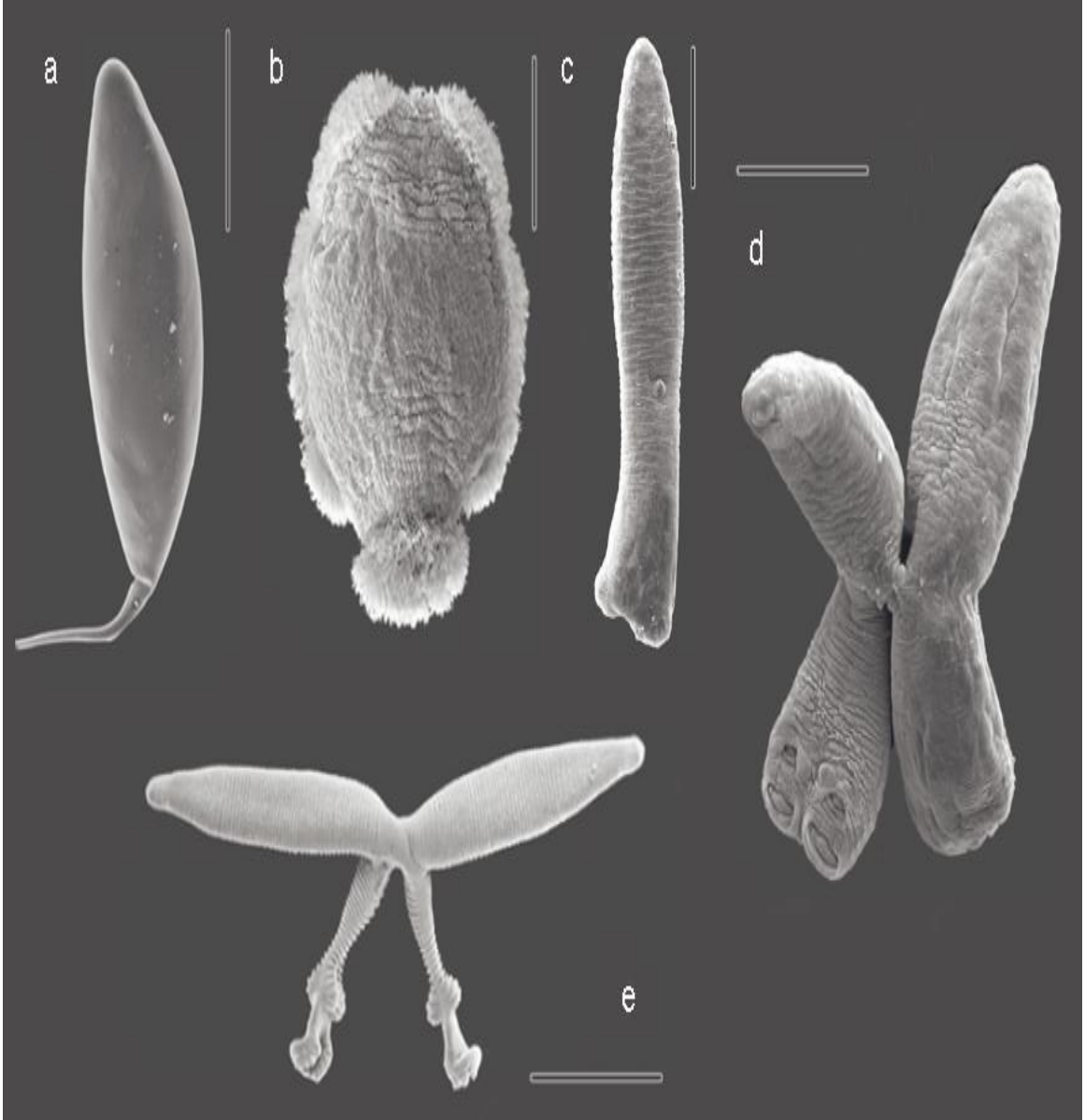
Polyopisthocotylea'ya ait olan Diplozoidae familyası, balıkların kanla beslenen ektoparazitlerini temsil eder. Diplozoidler, Avrupa-Asya ve afro-tropik dağılıma sahip kozmopolit olarak kabul edilir (Stavrescu-Bedivan ve diğerleri, 2009).

Bu ailenin üyeleri, doğrudan yaşam döngüsüne sahip hermafroditlerdir. Yumurtlayan ve benzersiz bir yaşam döngüsüne sahip oldukları bilinmektedir. Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Döllenen sonra yetişkin yumurta bırakır ve suda serbestçe yaşar. İlk istilacı larva aşaması olan bir oncomiracidium, yumurtadan çıkar ve hâlihazırda bir çift bağlantı öbeği ve konağa bağlanmak için bir çift merkezi kanca taşır (Hodová ve diğerleri, 2010). Bu noktadan sonra yaşam döngüsünün geri kalanı balık üzerinde gerçekleşir. Bir oncomiracidium daha sonra diporpa'nın ikinci larva aşamasına geçer. Önceki aşamaya kıyasla, diporpa, balık yüzeyinde ve diğer diporparlarla temas kurmaya yardımcı olan duyu organlarında hareket için emicilere sahiptir. Bir yetişkinin oluşumu için bir sonraki

adım gereklidir. İki diporpa birbirine kaynaşır ve X harfinin karakteristik şekline sahip bir yetişkin birey oluşturur (Valigurová ve diğerleri, 2011). Sinir, beslenme ve genital sistemleri birbirine kaynaşır ve bu da onları ayrılmaz kılar (Zurawski ve ark., 2003). Bu olaya kalıcı çiftleşme denir ve birbirine bağlı iki diporpa, hayatlarının geri kalanında tek bir organizma olarak yaşar. Bu dikkat çekici gelişme, “çifte hayvan” anlamına gelen “Diplozoon” ismine de yansımıştır (Kearn, 2011). Pečínková’ya (2007) göre, Diplozoidae familyasına ait türler, deneysel olarak 20 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda suda yumurta üretmeye başlar ve yeni nesil parazitler 33 gün içinde cinsel olgunluğa ulaşır. Şekil 2.7’de, Monogenea sınıfına dâhil türlerden olan *E. Nipponicum*’un su ortamındaki bağlı yaşam döngüsünün tüm aşamaları gösterilmiştir.

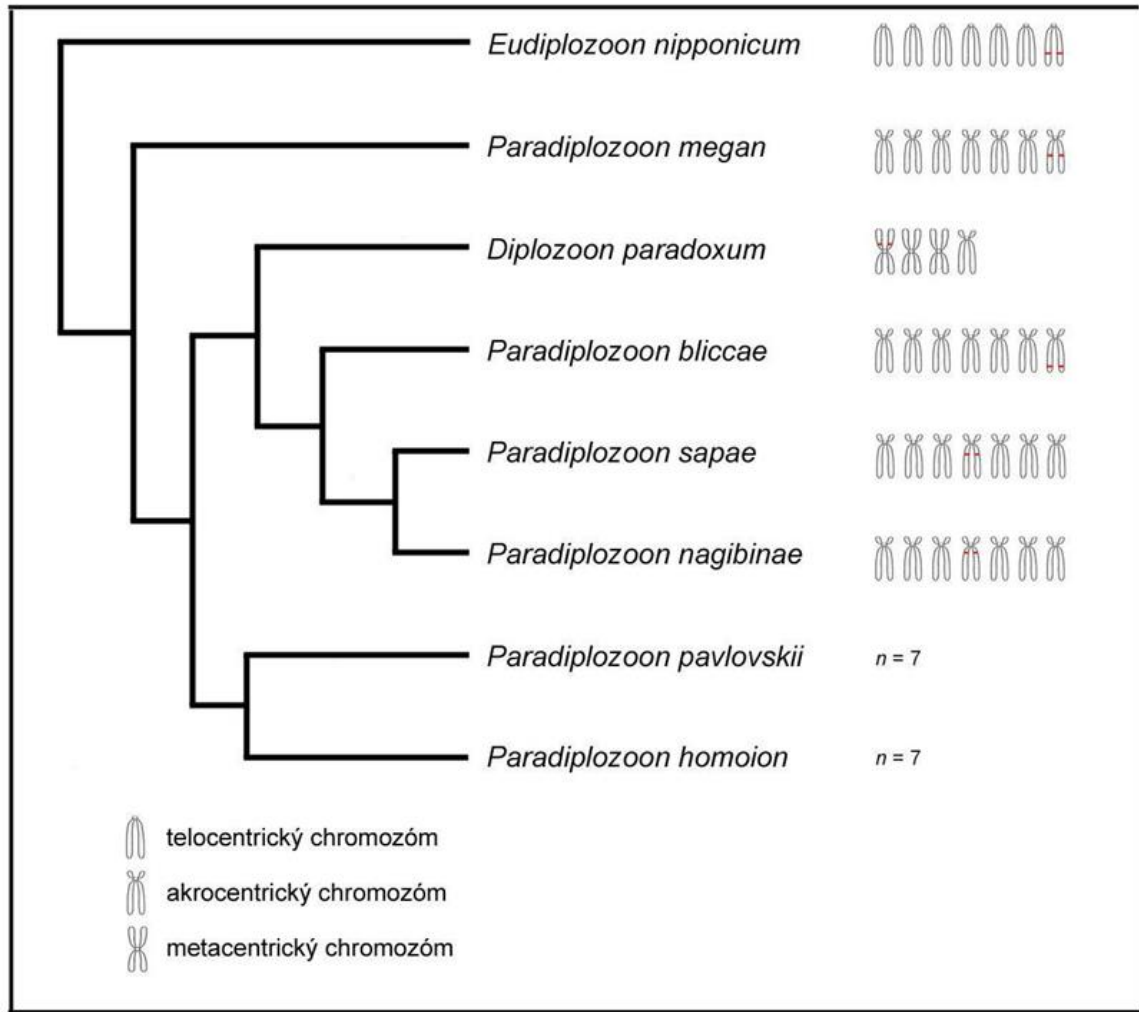


Şekil 2.6. Diplozoidae familyasının yaşam döngüsü (Çitek ve diğerleri, 2002). a) suda özgürce yaşayan bir yumurta. b) Oncomiracidium, ilk istilacı larva evresi. c) Diporpa, ikinci parazit larva aşaması. d) İki diporpanın gençlik evresine füzyonu. e) Birleştirilmiş dâhili sistemlere sahip yetişkin. f) Diplozoidler, siprinid balıkları



Şekil 2.7. Taramalı (scanning) elektron mikroskobundan *Eudiplozoon nipponicum*'un gelişim aşamaları (Hodová ve diğerleri, 2010). A-yumurta, B-oncomiracidium, C-diporpa, D-gençlik aşaması (iki diporpanın füzyonundan sonra), E-yetişkin. Ölçek-çubuklar: A=100 µm; B=50 µm; C, D=200 µm; E=1 mm

Şekil 2.8'de ise karyotipik olarak incelenen Diplozoidae familyasının diğer temsilcileriyle filogenetik ilişkileri gösterilmekte olup, Matejusová ve ark. (2004) Paradiplozoon türlerinin parafiletik kökenli olduğunu öne sürmüştür.



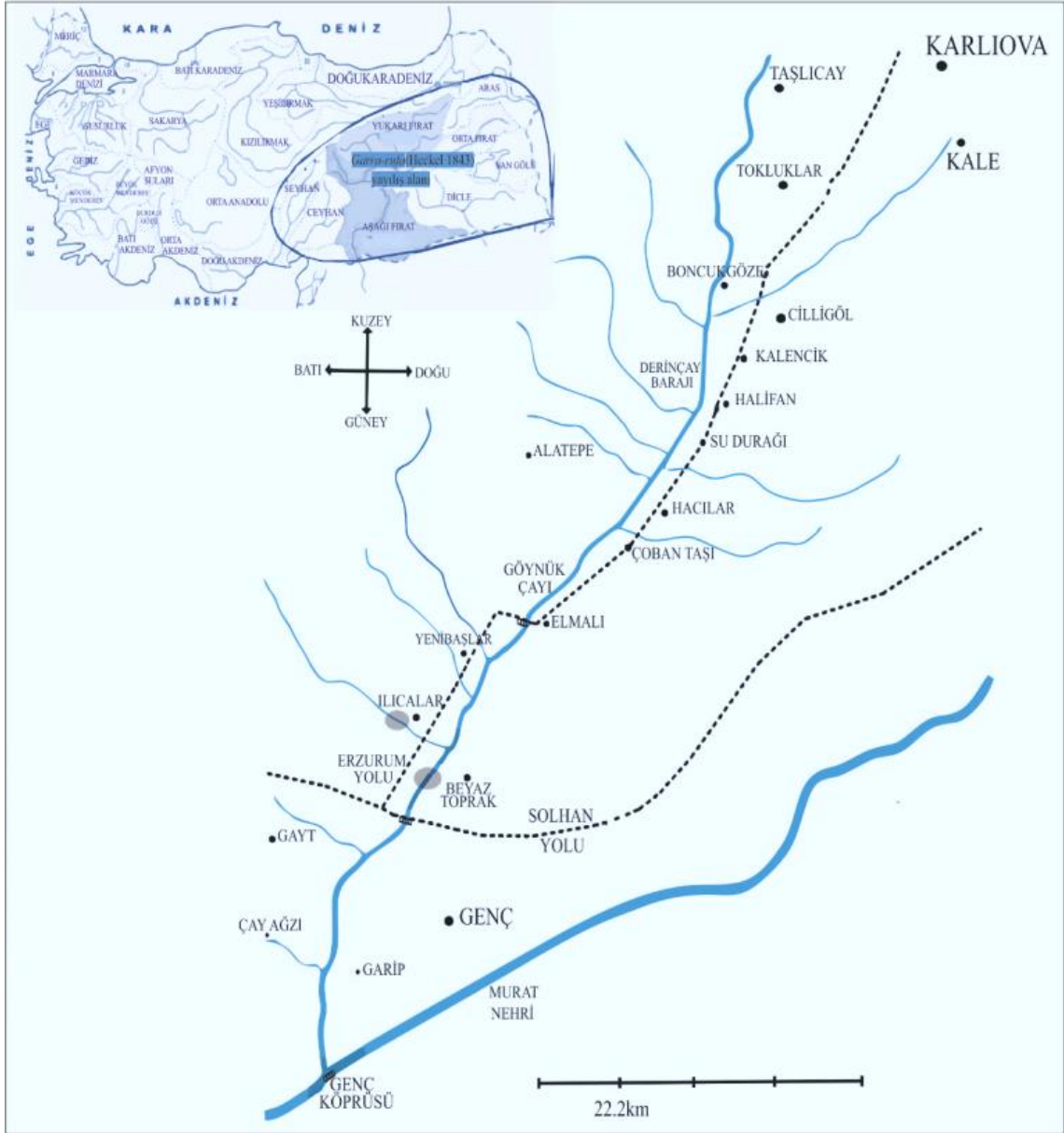
Şekil 2.8. Karyolojik olarak incelenen diplozoid türlerdeki ikincil daralmanın sayısı ve konumu ile filogenetik ilişkileri hakkında mevcut verilerin özeti (veriler Koroleva, 1968 a, b; Matejusová ve diğerleri, 2004; Košková ve diğerleri, 2011; Bombarová ve diğerleri, 2014). Kromozomların çizimi, haploid tamamlayıcıdaki sayılarını, morfolojilerini ve ikincil daralmanın (kırmızı) konumunu gösterir

Bu familyaya ait ilk cinsin tanımlanması 1832 yılında yapılmış olup, *Abramis brama*'nın solungaçlarında *Diplozoon paradoxum*' un kaydedilmesiyle Diplozoon cinsi olarak Diplozoidae familyasına taksonomik olarak yerleştirilmiştir (Matejusova 2001). Bu tarihten itibaren Bychowki ve Nagibina (1959) tarafından *D. pavloski*, *D. megan* ve *D. homonion* türlerini tespit ettiği çalışmasına kadar Avrupa' da bulunan tüm diplozoon türleri *Diplozoon paradoxum* olarak tanımlanmıştır. 1959'dan günümüze kadar Avrupa ve Asya' da çok sayıda balıkta bu genusa ait parazit türü kaydedilmiştir (Matejusova, 2001). Günümüzde ise Diplozoon genusu dışında bu familyaya dâhil Paradiplozoon, Inustiatius, Sindiplozoon ve Eudiplozoon olmak üzere 4 farklı cins daha yer almaktadır. Bu cinslere ait türlerin kayıtlarının bildirildiği çalışmalara dünyanın çeşitli ülkelerinde (Avrupa,

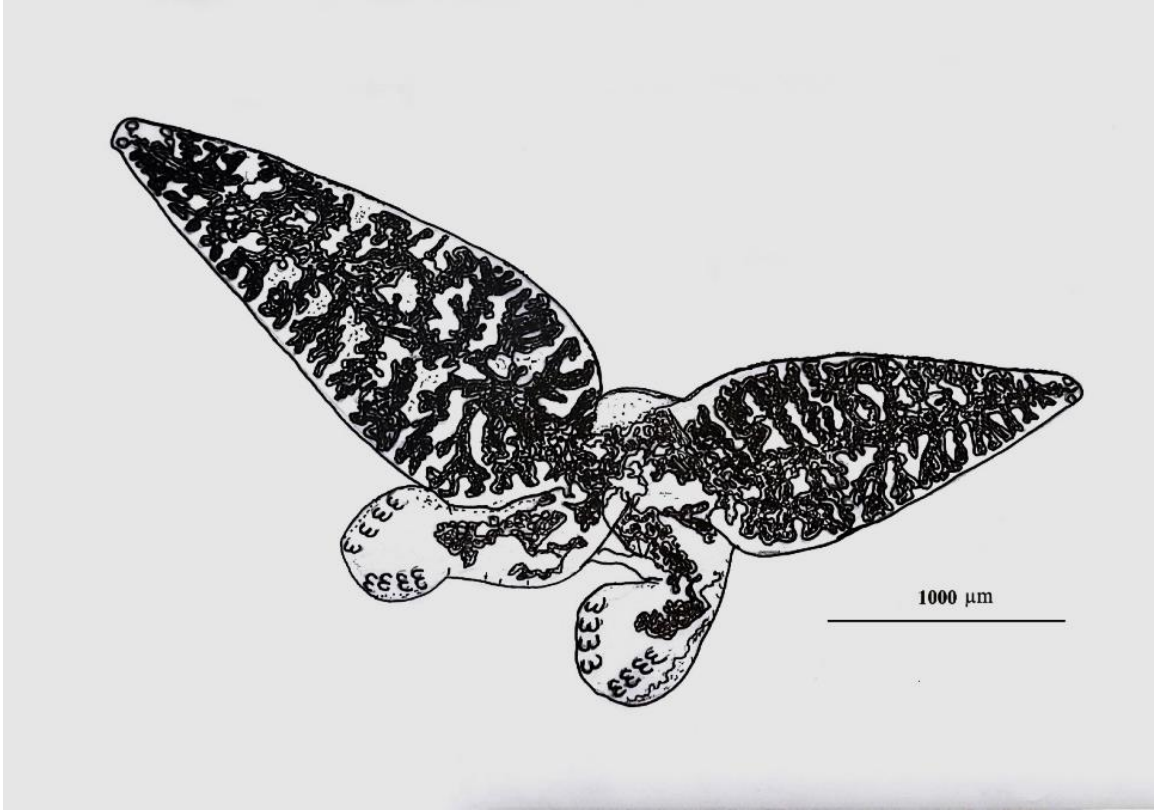
Afrika, Asya vb. kıta ülkelerinde) rastlanılmak mümkündür. Whittigt (1998)'ın de belirttiği gibi monogenea grubu parazitlerin önemli bir özelliğinin konak özgüllüklerinin yüksek olması hatta her balık türü için tek bir monogenean parazit türünün olabileceği ve bu görüşün Meshego (1983) tarafından da desteklenmesi düşünüldüğünde, bugün 24.000–25.000 monogenean parazit türünün kaydının bulunması gerekmektedir.

Ülkemizde 1960'lı yıllarda başlayan ve 2000'li yıllarda yoğunluk kazanan helmint parazitlerinin tespitinin yapıldığı çalışmalarda bugüne kadar monogenea sınıfına ait 82 tür kaydı bildirilmiştir. Bundan sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda kaydedilen türler ise olmayıp, *Paradiplozoon homonion*, *Diplozoon paradoxum* ve *Paradiplozoon sp.* şeklindedir. Bunların bazılarının tür teşhislerinin ise revizyona ihtiyacı vardır (Geldiay ve Balık, 2007). Bu literatür bilgileri de göstermektedir ki ülkemizdeki büyük doğal zenginliklerimize rağmen 371 balık taksonu (Kuru 2004) ve diplozoid parazitlerin türlerinin tespitine yönelik çalışmalar ve kaydı bildirilen tür sayıları oldukça yetersizdir.

Teze araştırma konusunu oluşturan *Paradiplozoon bingolensis* sp. n. monogenea sınıfının üyelerinin tek yaşam döngüleri, onkomirasidum adı verilen serbest yüzen larval safhaları, diporpa adı verilen postonkomirasidumları ve iki diporpanın birleşmesinden oluşan olgun bireyleri ile benzersiz olan Diplozoidae familyasına ait bir parazit türüdür. *P. bingolensis* sp. n.'in tespit edildiği konakçı balık *Garra rufa* ise bölgemizde Dicle ve Fırat nehirleri ve özellikle Murat nehri ve kollarında yaşayan bir türdür. Bingöl ilinin Karlıova ilçesi sınırları içerisinde doğan ve Murat Nehri'ne karışmadan önceki ılıcalar (hamamlar) bölgesinde akan derenin sıcak sularında ise oldukça yoğun olup, her mevsim avlanabilmektedir. Bu balık türünün dahil olduğu aynı familya ve genusta 6 farklı parazit türü tespit edilmiş olmasına rağmen, Cívánová, et al. (2013) tarafından Murat Nehri'nin bir kolu olan Göynük Çayı (38 ° 58' 36.99 "N; 40 ° 40' 42.13" E)'ndan (Şekil 2.9) alınan *G. rufa* örneklerinde *Paradiplozoon bingolensis* sp. (Şekil 2.10) türü ilk kez tespit edilmiştir.



Şekil 2.9. Göynük Çayı haritası



Şekil 2.10. *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n. (Civáňová, et al. 2013)

Taxonomic classification (Khotenovsky, 1985)

- Class : Monogenea (Bychowsky, 1937)
 Subclass : Polyopisthocotylea (Bychowsky, 1937)
 Order : Mazocraeidea (Bychowsky, 1957)
 Subfamily : Diplozoinae (Palombi, 1949)
 Family : Diplozoidae (Palombi, 1949)
 Genera : *Paradiplozoon* (Khotenovsky, 1985)
 Species : *Paradiplozoon bingolensis* (Civáňová, et al. 2013).

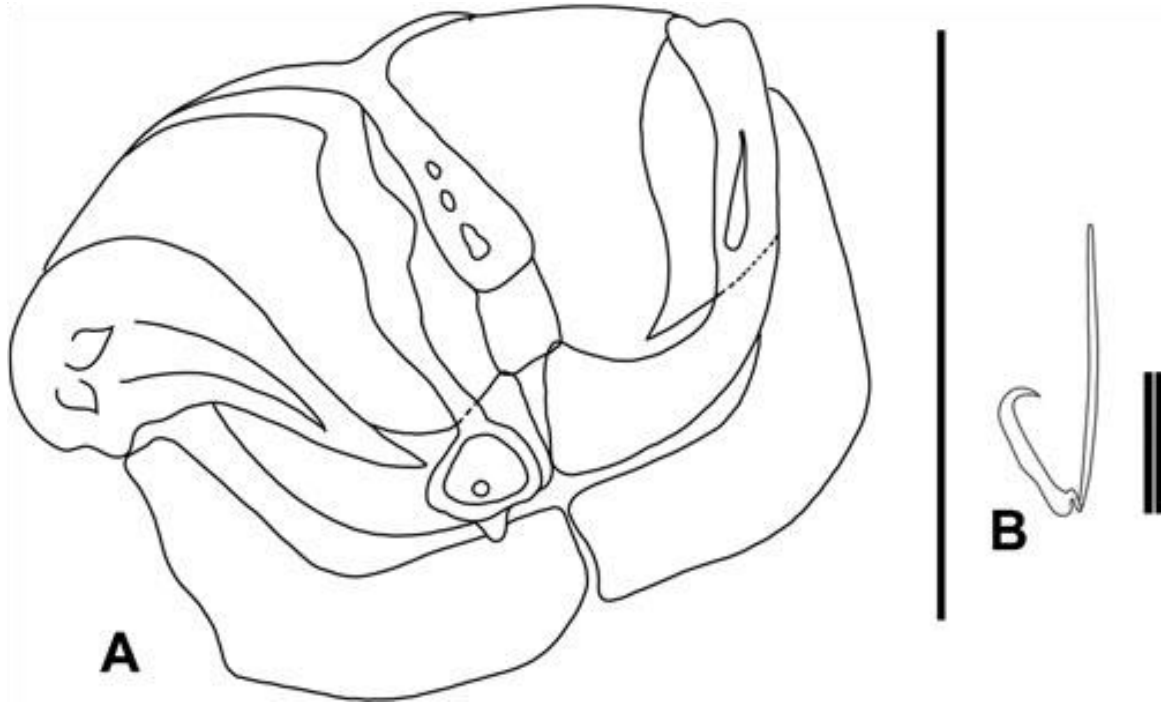
Bu türün dâhil olduğu Diplozoidae familyasına ait parazit grupları iki hayvancık (diporpa)'nın birleşmesiyle meydana gelmeleri ve Cyprinid balıkların solungaçlarında yaygın olarak parazitlenmeleriyle monogenea sınıfının diğer familyalarına benzemeyen ayırt edici bir özelliğe sahiptirler. Bu familyaya ait diplozoid parazit türlerinin morfolojik tür teşhisinde haptor (tutkaç) kısmında bulunan kancaların (merkez kanca; yan kancanlar) şekil ve büyüklüklerinden faydalanılmaktadır. Ancak, diplozoid parazit türlerinin belirlenmesi oldukça zor ve büyük beceri, tecrübe istemektedir. Tür teşhisinde önemli

olan morfolojik kriterlerin yapı ve ölçümlerin değiştiği de dikkate alındığında, bu morfolojik kriterlere ek olarak parazit türlerinin doğru teşhisinin yapılabilmesi için ilave objektif yöntemlere de ihtiyaç duyulmaktadır.

Civáňová, et al. (2013) tarafından 30 adet *G. rufa* (Heckel, 1843) (Actinopterygii, Cyprinidae) örneği üzerinde konakçı olan *P. bingolensis* sp.'de yapılan ölçümlere göre yapılan morfolojik tanımlama ve karakterizasyona göre;

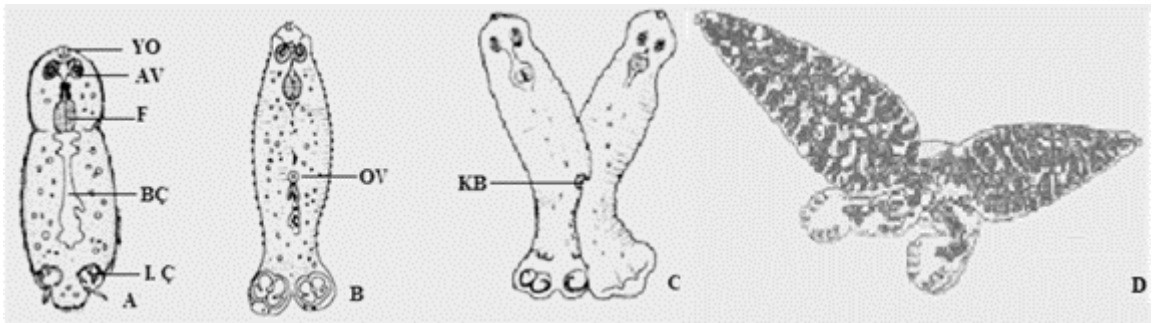
- Yetişkin örneklerin ortalama toplam vücut uzunluğu 3,85 mm (3,2-4,5 mm) 'dır.
- Yetişkinlerin vücudu tipik olarak X şeklinde olup, ön ve arka kısımlara ayrılmıştır. Aralarında bir füzyon bölgesi vardır.
- Vücudun ön kısmı, vitellaria ve neredeyse tüm iç organları (örneğin, sindirim sistemini) içerir.

Dişi ve erkek üreme organları, bağırsak terminal kısmı ve bağlama aparatı arka kısımda bulunmaktadır. Bu (posterior) kısım tegumental sırtlar, kıvrımlar veya tabağa benzer şekiller içermez; bunun bulunmaması *Paradiplozoon*'un tüm temsilcileri için tipiktir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. *P. bingolensis*; A:kanca yapısı (skala; 100 µm); B Orta kanca (skala 20 µm)

- Bağlama aparatı, her opisthaptörün alt (karın) tarafında 4 çift kıskaç (kelepçe, clamp) ve bir çift merkezi kanca (hook) içerir. *P. Bingolensis*'in kıskaçları genellikle güçlü skleritlerden yapılmıştır (Şekil 2.12).
- Orta plakanın ön ucu hafifçe yuvarlaktır. Dikdörtgen ön birleşme (kaynama) skleriti, ön çenenin proksimal ucuna bağlıdır.
- Medyan plakanın (narrow) posterior sonu (arka ucu) daralır ve bir açıklıklı (delikli, ağızlı) geniş bir yuvarlak sklerit ile son bulur; arka birleşme skleriti kısadır.
- Ön ve arka çenelerin skleritleri çok iri; Arka çenelerin skleritleri diğer *Paradiplozoon* türlerinde olduğu gibi iki kısma ayrılmamıştır. Ön çenelerin skleritleri medial çizgide yukarı doğru dönük olup, medial düzlemin ön birleştirici skleritine bağlanır.
- Merkezi kancalar, birinci kelepçe çiftinin yakınında yer alan tipe uygundur. Merkezi kancalar tipe uygundur ve ilk kıskaç (kelepçe, clamp) çiftinin yanında yerleşmiştir.
- İlk kısıncanın uzunluğu × genişliği (N = 30, ölçme mikrometresi değerleri) 144,7-153,3 × 108,5-114,6; ikinci kısıncanın 143,8-146,3 × 101,2-107,4, üçüncü kısıncanın 150,5-151,4 × 97,9-101,3 ve dördüncü kısıncanın 144,7 -153,2 × 108,5- 114,6 olup, orta (merkezi) kanca (hook) orak uzunluğu (N = 30) 17,5-20,8'dir.



Şekil 2.12. *Paradiplozoon Bingolensis*'in hayat döngüsü A- Serbest yüzen oncomiracidium larvası, B: Kaynaşma öncesi diporpa larvası, C: iki diporpa larvasının kaynaşması, D: Ergin birey hali (YO: Yapışma organı, AV:Ağız vantuzu, F: Farinks, BÇ: bağırsak çekumu, I.Ç: Birinci çekmen çifti, OV: Orta vantuz, KB: Kaynaşma bölgesi)

Şimdiye kadar yapılmış olan bazı sitogenetik araştırma ve yayınların önemli bir kısmı yeni türlerin veya morfolojik sistematiginde tereddüte düşülmüş türlerin karyotiplerinin ve dolayısıyla sitotaksonomilerinin yapılması şeklindedir. Bununla beraber, artık sadece

yeni türlerin değil daha önce genomu belirlenmiş türlerin kromozomlarının gelişmiş fluoresans boyama teknikleri boyanmasıyla çok daha detaylı ve kesin sonuçların alındığı gelişen moleküler sitogenetik teknikler uygulanmaya başlanmıştır. Ancak, klasik teknikler (Giemsa, AgNOR, C-, G-vb. boyama/bantlama yöntemleri) daha pratik, ekonomik, onlar kadar kesin ve hızlı sonuç vermektedir (Ulupınar ve Alaş, 2002).

Helwig (1958), her türün kendine has kromozom yapısı ve karyotipi olduğunu ve bu dış morfolojik özelliklerin her bir tür için karakteristik ve teşhis edici olduğunu, bir canlının morfolojik yapısına bakılarak yakın akrabalarından farkının anlaşılabilmesi durumunda kromozom sayısı ve morfolojisindeki farklılıkları ortaya koyan karyolojik çalışmalar ile daha iyi anlaşılabilceğini belirtmiştir. Bu nedenle, türler hakkında sitogenetik bilgi, modern sistematik için çok önemlidir, çünkü türlere bazı belirli genetik sürekliliğin objektif (nesnel) gerçekliği denir. Ayrıca, Nükleer sitogenetik (hücre çekirdeği ile ilgili sitogenetik çalışmalar) farklı hayvan gruplarının soy ağacı çalışmaları için daha güvenilir veriler sağlar. Sitogenetik çalışmalar-diploid sayıların, karyotiplerin, metafaz kromozomlarının metrik verilerinin analizi - yardımıyla; özel kromozomların varlığı, davranışı ve nükleer yapıların düzenlenmesi, akraba türler ve gruplar arasındaki analogi gibi spesifik homoloji ortaya konulabilir (Ulupınar ve Okumuş, 1997a, 1997b).

Diplozoid monogeneanlar -özellikle de Avrupa'daki iki düzine cyprinid balık türünde bulunan- tatlısı solungaç ektoparazitleridirler (Khotenovsky, 1985). Bunlarla ilgili Familya düzeyindeki sistematik çalışmalarda, morfolojik özelliklerdeki nispeten yüksek interspesifik benzerlikler ve sınırlı sayıda türde moleküler karşılaştırmaları yapılabilmüş olması nedeniyle çeşitli sorunlar yaşanmaktadır (Matejusova ve ark., 2001; 2004; Gao ve ark., 2007; Civanova ve ark., 2013; Avenant Ol dewage ve ark., 2014). Bu nedenle, ek yaklaşımların kullanılması türlerin delimitasyonunun (sınırlandırılmasının, özelliklerinin daha net hale getirilmesinin) ve/veya filogenisinin belirlenmesinde yardımcı olacaktır.

Monogenea türlerinin karyolojik karakterizasyonu ihmal edilmiş bir konudur ve diplozoid sitotaksonomi üzerine sadece birkaç çalışma yapılmıştır. Bugüne kadar 17 diplozoid tür sitogenetik olarak incelenmiştir (13 tanımlanmış ve 4 sınıflandırılmamış takson); (Benazzi ve Benazzi Lentati, 1976; Harris, 1985; Rohde, 1994; Cable ve Harris, 2002). Tablo 4'te özetlendiği gibi, incelenen tüm diplozoid türler $2n=14$ kromozom setlerine

sahiptir. İki tür hariç 3 metasentrik ve 1 akro merkezli elementten oluşan akrosentrik elementler. Bir grubun daha az ilerlemiş türlerinin genellikle simetrik olmayan karyotiplere sahip olduğu hipotezi göz önüne alındığında, bu karyotip (White, 1973), atalarının tipini temsil eder (Koroleva, 1969).

Koroleva (1968a, 1968b; 1969) çeşitli balıklarda konakçı 6 türün karyotipini yapmış, Koskova ve ark.(2011) ise bunların dördünün belirli sitogenetik özelliklerini ortaya koymuştur. Bu 6 türden *Parodifozoon bliccae*, *Paradiplozoon sapae*, *Paradiplozoon nagibinae*, *Paradiplozoon pavlovskii* ve *Paradiplozoon homoion* türlerinin diploid setleri 14 akrocentrik kromozom ($2n=14$) içermekte olup, *Diplozoon paradoxum* ise $2n=8$ 'dir. Baer ve Euzet (1961); Bovet (1967); Koroleva (1969), belirsiz üç diplozoidin ya 14 ya da 10 kromozumlu diploid sete sahip olduğunu, Koroleva (1968b) ise diğer iki *Eudiplozoon nipponicum* ve *Paradiplozoon megan* türlerini çalışmış olup, kromozom morfolojisi hakkında fazla bilgi sahibi olunmayan (mayotik bivalentlere dayandırılarak) $n=7$ olduğunu ortaya koymuştur. *Paradiplozoon bingolensis* (Civánová, et al. 2013) türü üzerine yapılmış hiçbir çalışma yapılmamıştır.

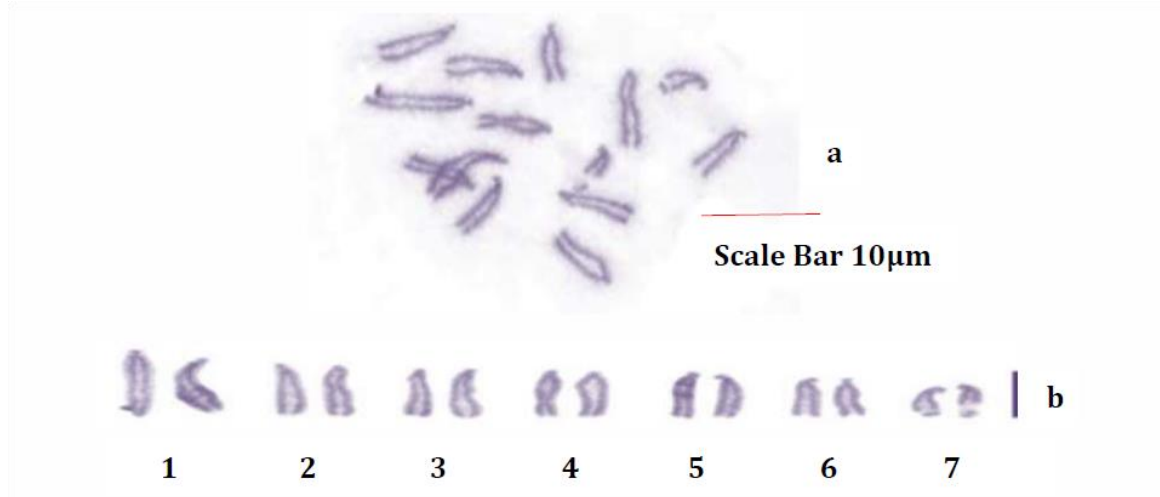
Koroleva (1969), 14'ün altındaki kromozom sayılarına sahip türlerin, yıllar itibariyle Robertsoniyen merkezli füzyon translokasyonları yoluyla ortaya çıkmış olabileceklerini belirtmektedir. *D. paradoxum*, *P. bliccae*, *P. nagibinae* ve *P. sapae*'nin karyotipleri daha önce Koroleva (1968a; 1968b) tarafından incelenmiş ve kromozomların sayı ve sınıflandırılmasına ilişkin veriler şimdiki sonuçlarla, çok uyumlu çıkmıştır. Ayrıca Keşmir Vadisi'ndeki *Diplozoon* türlerinin kromozom ölçümleri hakkında yeni bilgiler ortaya konulmuştur. Koroleva (1968a; 1969)'nin ortaya koyduğu $2n = 14$ 'lü türler ile hiçbir belirgin farklılık göstermemiş, Koroleva (1968a) tarafından da söylenildiği gibi *O*, *P. bliccae* (syn. *Diplozoon gussevi*) 'de 3 ila 5 μm ve *D. paradoxumda* 4 ila 13 μm arasında maksimum kromozom uzunluğuna sahip olduğunu bildirmiştir. Yaptıkları analizler sonucu kromozom uzunluklarının daha az olduğunu, fakat bu farklılığın kullanılan metodolojiler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığını (Reblanova ve ark. 2010) tarafından da belirtildiği gibi hava ile kurulan ve yayılma tekniklerinin daha önce kullanılan balonlardan daha uzun kromozomlar üretmesi nedeniyle belirtmiştir.

P. bliccae, *P. nagibinae* ve *P. sapae* türlerinin her biri akrosentrik olmak üzere çok benzer morfolojiye sahip eşit sayıda 14 kromozomuna sahip olup, üç tür de Diplozoon'un kısa ve uzun kol uzunluğunun değiştiğini ve farklı kromozom morfolojisine sahip 14 kromozom içermektedir (Matejusova ve ark., 2001, 2004; Gao ve ark., 2007).

Diplozoon kashmirensis'in, hepsi akrosentrik ($2n=14=14a$) olan ve 6,21-14,13 μm arasında değişen kromozom uzunluğuna sahip 14 kromozom içerdiğini, *Diplozoon aegyptensis*'in de 14 kromozom içermekle birlikte, üç çift metasentrik ve dört çift akrosentrik kromozom içerdiğini ($2n=14=6m+8a$), en küçük ve en büyük kromozom uzunluklarının 6,84 ve 9,78 μm arasında bulunduğunu belirtmişlerdir. *Diplozoon guptai*'nin ise kromozom morfolojisi bakımından önceki iki türden oldukça farklı olduğunu ($2n=14=2m+2sm+2st+6a$), ancak *D. aegyptensis* ile neredeyse aynı kromozom uzunluğuna sahip olduğunu, yani 5,39 ile 8,02 μm arasında kısa ve uzun kola sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu veriler Koroleva (1969)'un söyledikleriyle, yani *D. paradoxum* karyotipinin, tek kollu çiftler ile atadan gelen bir evrimle ilgili olduğu hipoteziyle iyi bir uyum içindedir. Farklı *Diplozoon spp.* türlerinin türler arası farklılıklarıyla ilgili olarak, göreceli uzunluklarının değişimini gösterirler (Tablo 5). Bu nedenle, *D. kashmirensis*'in *D. aegyptensis* ile olan göreceli uzunluğu karşılaştırılırken, farklar anlamlı değildir (T değeri=-0,00; P-değeri=0,999 ve Pearson korelasyonu=0,190; P-değeri = 0,683; $P>0,05$). *D. kashmirensis*'in *D. guptai* ile (T-Değeri = 0,00; P-değeri=1,000 ve Pearson ilişki = -0,202, P değeri=0,664; $P>0,05$) yine farklılıklar anlamlı değildir ve *D. aegyptensis* ile *D. guptai* karşılaştırıldığında da (T değeri=0,00; P-değeri=0,999 ve Pearson korelasyon = -0,127 P-değeri= 0,787; $P>0,05$) yine farkların statik olarak önemli olmadığı görülmüştür.

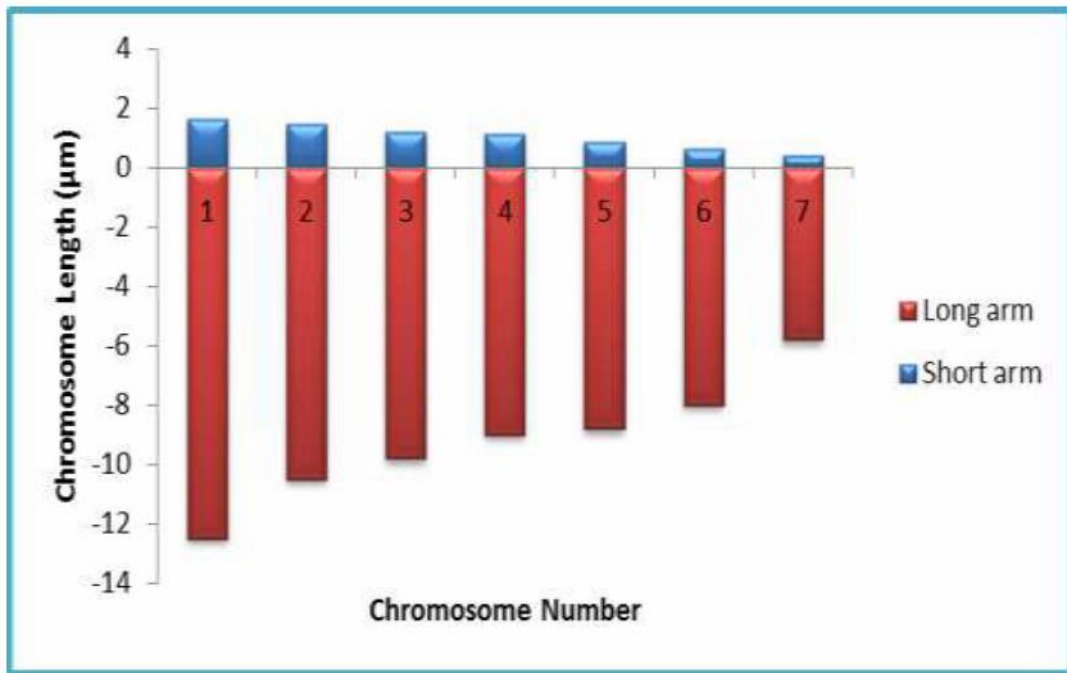
Bu nedenle, bireysel Diplozoon türleri arasındaki göreceli kromozom uzunluklarındaki farklar, Diplozoon türlerinin belirlenmesinde güvenilir bir ölçüt olarak kullanılamaz. Bu nedenle, Diplozoon türleri tanımlamada sentromerik indeks temel alınmalıdır. Dolayısıyla $2n = 14$ olan incelenen tüm spesi- yönlerin akrosentrik kromozomlarında ortaya çıkan pericent-romeric heterochromatin, merkezî füzyon sürecinde kaybolabilir. Daha sonraki diplozoid monologları ayrıntılı olarak sitogenetik çalışmasının, nispeten dar ilginç balık parazitleri grubunda kromozom evriminin genel yollarını daha iyi ortaya koyacağı açıktır.

D. kashmirensis'in 10 numunesinden alınan mitotik metafaz yayılımlarının analizi sonucu, karyotipinin $2n=14$ olup, hepsinin akrocentrik kromozomlardan oluşmaktadır (Şekil 2.13).

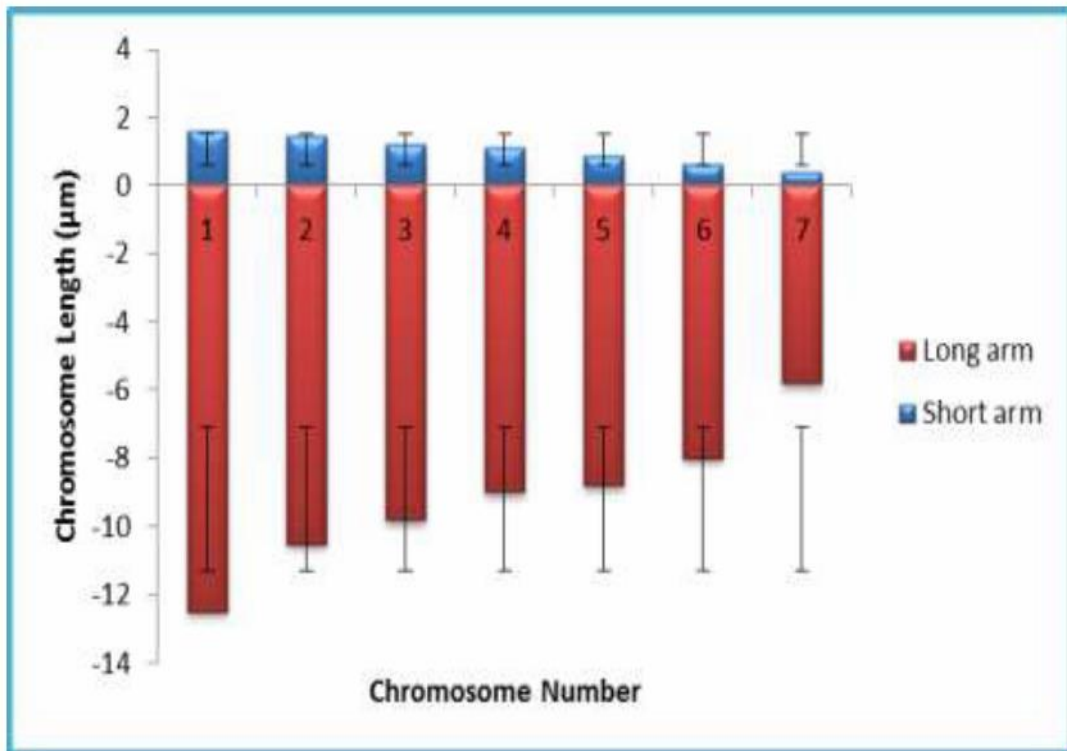


Şekill 2.13. (a) *Diplozoon kashmirensis*, Kaw 1950'in kromozom yayılımı, (b) *Diplozoon kashmirensis* (Kaw 1950)'in Giemsa ile boyanmış mitotik hücrelerinden oluşturulmuş idiogramı (a=akrosentrik). [Karyotip Formülü: $2n=14a$]

En uzun çift $14,13 \mu\text{m}$ ve en kısa çift $6,21 \mu\text{m}$ uzunluğunda, temel kol sayısı (NF)=7 ve toplam kromozom uzunluğu (TCL) $72,57 \mu\text{m}$ dır. Kompleksin kol oranı 7,6-14,15 ve sentromerik indeks ise 6,60 ile 12,28 arasında değişir. 2, 3 ve 4 numaralı kromozom çiftlerinin büyüklükleri neredeyse aynıdır ve kromozom morfolojisi temelinde tanımlanması çok zordur (Student T-testi, P-değeri = 0,002; $P < 0,05$). Uzunluk farklarının önem derecesinin düşük olması nedeniyle ikinci, üçüncü ve dördüncü kromozom çiftlerinin kesin tanımlanması oldukça zordur. Ancak beşinci, altıncı ve yedinci kromozomlar arasında önemli farklar vardır. (P-değeri = 0,000; $P < 0,001$; Student T-testi). Oysaki birinci ile ikinci ($P > 0,05$) ve dördüncü, beşinci, altıncı, yedinci ($P < 0,005$) numaralı kromozom çiftlerinin tespit edilen görelî uzantılarının istatistiksel olarak işlenmesi, aralarındaki uzunluk farkından dolayı önemlidir. Yani mutlak uzunluk ve sentromerik pozisyon temelinde, kromozomlar bir idiogramda azalan uzunluk sırasına göre sıralanmıştır (Şekil 2.14 ve Tablo 2.2).



a



b

Şekil 15. (a) *Diplozoon kashmirensis* (Kaw 1950)'in idiogramı; (b) *Diplozoon kashmirensis* (Kaw 1950)'in standart sapmalı hata çubukları

Tablo 2.2. *Diplozoon kashmirensis*, Kaw 1950'in Kromozom çift numarasına göre kromozom kol uzunlukları, kol oranları, sentromerik indeks ve sınıflandırılması

Kromozom Çifti Sayısı	Kısa Kol Uzunluğu (µm) 'S'	Uzun Kol Uzunluğu (µm) 'L'	Toplam Uzunluk (µm) L+S	Kol Oranı L/S	Bağlı Uzunluk (%)	Sentromer İndeksi (ci)	Sınıflandırma
1	1,63	12,5	14,13	7,67	19,47	11,54	Akrosentrik
2	1,47	10,5	11,97	7,14	16,49	12,28	Akrosentrik
3	1,22	9,80	11,02	8,03	15,19	11,07	Akrosentrik
4	1,12	9,00	10,92	8,03	15,05	10,26	Akrosentrik
5	0,89	8,80	9,69	9,89	13,35	9,19	Akrosentrik
6	0,63	8,00	8,63	12,60	11,89	7,30	Akrosentrik
7	0,41	5,80	6,21	14,15	8,56	6,60	Akrosentrik

T-Değeri= -25,39
P- Değeri = 0,002
P<0,05

T-Değeri= -10,88
P- Değeri = 0,000
P<0,001

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, Haziran 2021 ve Mayıs 2022 tarihleri arasında yapılacaktır. Göynük Çayı'ndan avlanılan 21 adet Garra rufa konakçı balık türünün solungaç epitellerinden 32 adet yetişkin Paradiplazoon bingolensis Sp.n. parazit örneği alındı. Parazit türlerinin belirlenmesi için ise, her bireyin haptörleri kesilecek, amonyum pikrat-gliserin karışımındaki bir lam üzerine konulacak ve "Differential Interference Contrast (Nomarski DIC)"li Olympus BX 50 ışık mikroskobu kullanılarak, tutturma aparatlarının (kısaç ve merkezi kancalar) morfometrelerine göre tespit edilecektir (Ergens, 1969).

3.2. Yöntem

3.2.1. Kromozom Preparasyonları

Techizat

- SuperFrost™ slaytlar (Thermo Fisher Scientific)
- Slayt/Doku Kurutma Tezgahı (Medax International, Inc.)
- Karıştırıcı Su Banyosu SW22 (Julabo)
- Vortex mixer (IKA)
- Santrifüj (Eppendorf)
- Stereo Mikroskop (Olympus)
- Renkli Mikroskop Kamera DFC450 C Leica
- Adobe Photoshop CS 8.0

Kimyasallar

- Colchicine (Merck KGaA)
- KCl (Merck KGaA, Germany)
- 96% Ethanol (Thermo Fisher Scientific)
- Methanol (Thermo Fisher Scientific)
- Acetic acid (Merck KGaA)
- 96% ethanol (Thermo Fisher Scientific)
- HCl (Merck, KGaA)
- Acetic acid (Merck, KGaA)
- KH_2PO_4 (Merck, KGaA)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck, KGaA)
- Giemsa (Merck)
- Gelatine (CentralChem)
- Formic acid (95-97%; Merck, KGaA)
- AgNO_3 (Merck, KGaA)

1. Yüksek kaliteli kromozom yayılımları elde etmek, hücreleri slayt üzerine sabitleyerek boyamaya hazır hale getirmek, karyotipleme ve diğer sitogenetik teknikler maksadıyla; her bir parazitin testis ve yumurtalıkları (parazitin orta kısmı) alınarak (Frydrychova ve Marec, 2002; Orosová ve Špakulová, 2018; Fuková *et al.* (2005) 'ye göre analiz edilmiştir.
2. %1 kolşisin stok solüsyonu için 0,1 g kolşisin tozu 10 ml distile su içinde çözülmüştür.
3. %0,05'lik kolşisin çalışma solüsyonu için 1 ml kolşisin stok solüsyonu 1,5 ml distile su ile seyreltilmiştir.
4. Her bir parazitin testis ve yumurtalık içeren orta kısmı (%0,05'lik kolşisin içeren fizyolojik tuzlu su (%0.65 NaCl) bir Petri kabına yerleştirildi ve oda sıcaklığında 3-4 saat süreyle bekletildi
5. 0,075 M KCl çalışma solüsyonu için 0,5592 g KCl 100 ml distile su içinde çözülmüştür.
6. Parazit doku, oda sıcaklığında 15-20 dakika 0,075 M KCl (hipotonik solüsyon) içeren bir petri kabına konuldu. Hipotonik muamele başarısını test etmek için; Ford

ve Hamerton (1956) tarafından önerilen oda sıcaklığında % 0,9'luk sodyum sitrat çözeltisinde 15 dak. bekletme yöntemi de denenecektir.

7. Doku, yeni hazırlanmış soğuk fiksatif solüsyonu (Carnoy fiksatif) (etanol/kloroform/asetik asit, 6:3:1) içeren bir petri kabına aktarıldı ve oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletildi. Bu işlem, yeni soğuk fiksatif ile bir kez daha tekrarlandı (Materyal genellikle fiksasyondan hemen sonra boyanıp ezildi, ancak fiksasyon işleminden hemen sonra boyanmayacak materyal 1-2 gün içinde incelenmek üzere %70'lik alkolde veya -20°C 'de dondurucuda muhafaza edildi.
8. Carnoy fiksatif ile tespit edildikten sonra, daha önce hazırlanmış temiz bir SuperFrost™ soğuk lam üzerine birkaç damla %60'lık asetik asit damlatıldı ve numunenin testislerini ve yumurtalığını içeren dokular lam üzerindeki fiksatif içine konularak forseps (veya tungsten iğneleri ya da çengelli iğne ucu) yardımıyla (stereo mikroskop altında, asetik asit buharlaşana kadar) mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kromozom preparasyonu için yumurtalık ve testislerin parçalara ayrılması

9. Hücrelerin maksimum yayılmasını sağlamak için lam her yöne eğildi. (Lam üzerine lamel kapayıp sıkı bir basınç uygulayarak dokunun biraz daha ezilmesi sağlandı.)
10. Slaytlar daha sonra bir ısıtma plakasına yerleştirildi. 45°C'de ve hücre süspansiyonunun damlası yavaş yavaş buharlaşana kadar slayt boyunca çekilir.
11. Slaytlar, bir faz kontrast mikroskobu altında kromozom yayılmalarının kalitesi açısından kontrol edildi.
12. %70'lik etanol hazırlamak için 26 ml distile suya %96'lık 70 ml etanol ilave edilmiş, %80'lik etanol hazırlamak için ise 16 ml distile suya %96'lık 80 ml etanol eklenmiştir.
13. Analiz için uygun olan slaytlar, kalan suyu uzaklaştırmak için her biri 1 dakika süreyle %70, %80 ve %96'lık etanolden oluşan etanol serilerinde 1 dakika süreyle dehidre edildi (kurutuldu).
14. Bu havada kurutulmuş slaytlar daha sonra gece boyunca Carbol-fuchsin içinde boyandı (Carbol-fuchsin prosedürü iyi sonuçlar vermesinin yanısıra, havayla kurutulmuş slaytların süresiz olarak saklanabilmesi ve uygun herhangi bir zamanda boyanabilmesi avantajına sahiptir. Ayrıca fırın, buzdolabı vb. gibi laboratuvar ekipmanına ihtiyaç duymaz).
15. %95 alkole daldırma ve 10 dakika boyunca n-bütil alkolde dehidrasyon ile ayırt edildi.
16. Slaytlar son olarak sayım için euparol (veya glycerol veya Canada balsam veya clear nail polish (temiz tırnak cilası) ile monte edildi.

3.2.2 Boyama Yöntemleri

Kromozom boyama yöntemleri, hücre döngüsü sırasında onların morfolojik ve morfolojik özelliklerini, yapılarını ve organizasyonunu görselleştirmemizi sağlar. Bu tezde görünür ışık boyaları (Giemsa-Romanowski solüsyonu, AgNO₃) kullanılmıştır.

3.2.2.1. Giemsa Boyama

Sitogenetikte moleküler tekniklerdeki son gelişmelere rağmen, Giemsa boyaması kromozom analizlerinde en sık kullanılan boyama olmaya devam etmektedir.

Prosedür:

1. KH_2PO_4 stok solüsyonu için 2,2675 g KH_2PO_4 250 ml distile su içinde çözülmüştür.
2. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ stok solüsyonu için 9,59 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml distile su içinde çözülmüştür.
3. Fosfat tamponu için 40 ml KH_2PO_4 stok solüsyonu, 60 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ stok solüsyonu ile karıştırılmıştır.
4. %4'lük Giemsa çözeltisi için 4 ml Giemsa, 100 ml fosfat tamponu (pH. 6,8) ile karıştırıldı.
5. Slaytlar 25 dakika oda sıcaklığında Giemsa solüsyonunda yıkandı.
6. Slaytlar damıtılmış su ile durulandı ve oda sıcaklığında havayla kurutuldu.
7. Slaytlar, bir sonraki kullanıma kadar 4 °C'de karanlıkta saklandı.

3.2.2.2. AgNO_3 Boyama

AgNO_3 , nükleolar düzenleyici bölge bölgeleri (NOR'ler) ile ilişkili olan argentofilik nükleer proteinlere bağlanır. Ancak boyama sadece önceki interfazda fonksiyonel olan NOR'da başarılıdır. Bu teknik, Howell ve Black (1980) tarafından böcek kromozomları için açıklanan prosedürleri temsil eder.

Kimyasallar:

- Jelatin (CentralChem, Slovakya)
- Formik asit (%95-97; Merck, KGaA, Almanya)
- AgNO_3 (Merck, KGaA, Almanya)

Prosedür:

1. %2 jelatin için 2 g jelatin tozu 100 ml distile suda 37 °C'de su banyosunda çözülmüştür. Çözelti oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 1 ml formik asit ilave edildi.
2. %50 AgNO_3 için 0,25 g AgNO_3 0,5 ml distile su içinde çözüldü (3 lam için miktar).
3. Giemsa ile boyanmış lam üzerine 3 damla %2 jelatin ve 6 damla AgNO_3 ilave edildi, kromozom yayılımının yüzeyinde karıştırıldı ve bir lamel ile kapatıldı.
4. Slayt, preparasyonun mor rengi açık kahverengiye dönene kadar 30 °C'ye önceden ısıtılmış bir ısıtma plakasına yerleştirildi.
5. Slaytlar damıtılmış su ile durulandı ve havada kurutuldu.
6. Slaytlar, bir sonraki kullanıma kadar 4 °C'de karanlıkta saklandı.

3.2.3. Mikroskopi ve Görüntü İşleme

Prosedür: Her bir parazit dokusunun en iyi mitotik yayılımından 10 adedinin resimleri çekilerek, kromozom ölçümleri yapıp ortalama mutlak (mean absolute) ve bağıl uzunluklar ile sentromerik indeksler hesaplandı. Bu amaçla;

1. Preparasyonlar, kombine ışık ve floresan mikroskobu ile analiz edildi. Mitotik ve mayotik kromozomlar, bir dijital kamera kullanılarak 100x büyütmede fotoğraflandı ve Adobe Photoshop ile işlendi (Şekil 3.2).
2. Kromozomların sırasıyla hücrelerin morfometrik özellikleri milimetre cetveli ile ölçülmüştür. Elde edilen değerler bar ölçeğine göre μm 'ye çevrildi.
3. Bireysel kromozomların mutlak uzunluğu, kromozom çiftindeki iki homolog kromozomun ortalamasından belirlendi.
4. Kromozomun nispi uzunluğu, haploid genomun (TLC) ortalama toplam uzunluğunun yüzdesi olarak hesaplandı.



Şekil 3.2. Preparasyonların floresan mikroskobu ile analizi (mitotik ve mayotik kromozomların, dijital kamera kullanılarak 100x büyütmede fotoğraflanması ve kromozomların μm cinsinden ölçülmesi)

5. Sentromerik indeks CI'nin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$CI = 100 s / c \quad (3.1)$$

s: kısa kol uzunluğu,

c: kromozomun mutlak uzunluğu.

6. Kromozomlar, (Levan ve ark., 1964; Guerra, 1986) tarafından önerildiği şekilde, sentromer pozisyonu göre aşağıdaki şekilde adlandırılmıştır);

a) Sentromer indeksi (CI) 37,5-50,0 aralığında ise *metasentrik (m)*

b) 25,0-37,5 olması durumunda *submetasentrik (sm)*,

c) 12,5-25,0 ise *subtelosentrik (st)*

d) 12,5'ten küçük (CI <12,5) ise *akrosentrik (a)*;

e) Şayet CI =0 ise *telosentrik (t)*

f) Sentromer pozisyonu iki kategori arasındaki sınırda olduğu zaman, her ikisi de listelenecektir.

3.2.4. Mikronuklei Testi

Bu amaçla Al-Sabti 1986 tarafından önerilen mikronuklei testi metodu uygulanmıştır;

1. Deneyden evvel, ortama alıştırmak amacıyla balıklar içinde 20 °C'lik ve iyi havalandırılmış klorsuz su bulunan bir tankta 14 gün bekletildiler.
2. Kanserojenik -mutajenik amiller vücut ağırlığına göre balığa i.p. enjekte edildi.
3. Grubun birine içinde kimyasal amiller eritilmiş olan solüsyon, diğerine distile su ile enjekte edilir. Bu uygulama, ayrıca, i.p. enjeksiyonu ile de yapıldı.
4. Yayınlar için kan örnekleri, balığın kuyruk toplardamarından elde edildi.
5. Daha sonra 20 dak. saf etanol'de fikse edildi, hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
6. Son olarak, sürümler, Sorenson tamponundaki %20'lik Giemsa ile 15 dak. boyandı.
7. 400x 'da ışık mikroskopunda mikronuklei varlığı incelendi.
8. Lamlar kodlanıp, rasgele dağıtılarak önyargısız/seçmece yapılmaksızın sayıldı.

3.2.5. İstatistiksel Yöntemler

Non-Parametrik testler gibi parametrik testler de kromozomların relative (bağıl) uzunluğunu analiz etmek için kullanıldı. Veri analizi için bir bilgisayar programı (Windows için Minitab) kullanılmıştır.

a) Kromozom uzunluklarındaki istatistiksel önemi görmek için *Ki-Kare* analizi kullanılmıştır.

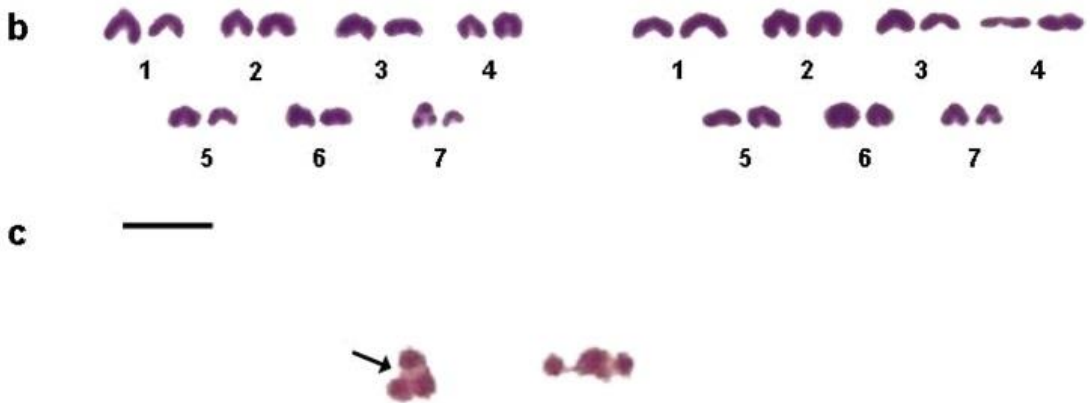
Student's t-testi ise, P-değeri 0,05'den düşük elde edildiği zaman önemli olarak değerlendirilen farklılıkları test etmek için kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Sitogenetik olarak analiz edilen 32 *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in diploid kromozom sayısı 14 ($2n=14$) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Giemsa ile boyanan *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in kromozom yayımı (Bar: 10 μ m)



Şekil 4.2. *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in karyotipi. (Bar: 10 μ m)

Kromozomlar orta uzunlukta ve tek kolludur. Karyometrik analiz için kullanılan 10 metafazda, ilk en uzun çift $8,16\pm 0,63$ μm ve en kısa kromozom 7. $4,74\pm 0,27$ μm uzunluğundadır (Tablo 4.1). Temel kromozomal kol sayısı (NF) 14 olarak belirlenmiş ve haploid genomun (TLC) ortalama toplam uzunluğu ise $44,55$ μm olarak tespit edilmiştir. Böylece karyotip formülü $2n=14$ ($n=7t$) olarak düzenlenmiştir. Sentromer pozisyonuna göre, tüm kromozomlar telosentrik (t) olarak sınıflandırılmış olup, ilk altı çift kromozom, şekil ve büyüklük bakımından göreceli benzerliklerinden dolayı ayırt edilmesinde büyük zorluk yaşanmıştır. Şekil 4.1 ve 4.2’de de görüleceği gibi mitoz bölünme esnasında az çok görülen ikincil daralma, en küçük, 7. kromozom çiftinin uzun kollarının uç kısımlarında gözlemlenmiştir. Şekil 4.3’te *Paradiplozoon bingolensis* Sp.n.’in göreceli uzunluğuna göre kromozom seti (idiogramı) gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Paradiplozoon bingolensis* Sp.n.’in ($n=7t$) kromozomlarının ölçümleri

Kromozom Çifti No	Mutlak Uzunluk (μm)	Bağlı Uzunluk (%)	Sentromer İndeksi	Sınıflama
1	$8,23\pm 0,48$	$18,44\pm 1,32$	0	t
2	$7,20\pm 0,53$	$16,24\pm 1,65$	0	t
3	$6,47\pm 0,51$	$14,78\pm 1,20$	0	t
4	$6,43\pm 0,49$	$14,65\pm 1,27$	0	t
5	$6,01\pm 0,32$	$13,53\pm 0,11$	0	t
6	$5,72\pm 0,51$	$12,87\pm 1,40$	0	t
7	$4,98\pm 0,30$	$10,77\pm 1,34$	0	t

t telosentrik kromozom



Şekil 4.3. *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in idiogramı ve yedinci (7.) kromozom çifti üzerinde işaretlenmiş ikincil daralmanın gösterimi

Su kirliliği durumunun (sudaki kanserojenik-mutajenik amillerin) bir göstergesi olarak gerçekleştirilen mikronüklei testi yapılmış, ancak balık örneklerinin alındığı akarsuda herhangi bir kirleticiye rastlanmamış, dolayısıyla yapılan testler sonucu herhangi bir micronuclei tespit edilmemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Monogenean balık parazitlerinin tür tanımlaması ve ardından cins, familya, alt familya ve daha yüksek taksonlara göre sınıflandırılması çok zordur. Filogenetik ilişkileri belirlemek ise daha da karmaşıktır. Monogeneanların morfometrik ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde, bağlanma organının sklerotize sert yapılarının şekli ve boyutu dikkate alınır (Khotenovsky, 1985). Diplozoidlerde ise, bir çift merkezi kancanın ve 4 çift kelepçenin ölçümleri en çok kullanılan morfolojik belirteçlerdir. Özellikle merkezi kanca olarak uzunluğu ve medyan plakanın ön ucunun şekli ve kısaçların ön birleştirme skleritleri bu ailede tür ayrımı için en önemli özelliklerdir (Civánová ve ark., 2013). Ancak, kısaçlar kademeli olarak büyüdüğü için bu karakterler sabit değildir ve skleritlerin uzunluk ve genişliği ile konukçu balığın uzunluğu arasında önemli bir pozitif ilişki bulunmuştur (Matejusová ve diğerleri, 2002). Tanımlama için kullanılan ikincil özellikler ise çiftleşme organlarının ölçümleridir.

Taksonomik grubun belirlemede üçüncü olası yol da sitogenetik analiz olup, bu amaçla karyotip yapılması ve idiogramlarının çizilmesi bireyi ayırt etmenin en uygun yollarındandır. Bu çalışmada Monogenea sınıfının Diplozoidae familyasından olup, morfolojik karakterlerine bakılarak yeni bir tür olarak teşhisi yapılan *Paradiplozoon bingolensis* Sp. n.'in sitogenetik analizleri yapılarak tür teşhisi doğrulaması yapılmıştır.

Karyolojik analiz için kromozom preparasyonları yapılmış ve ardından Giemsa ile geleneksel boyama gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışma, söz konusu türün kromozomların sayısı ve sınıflandırması ile birlikte temel morfometrik parametrelerini içermekte olup, kromozom morfolojisinin ayrıntılarını ortaya koymak için ileri bantlama metodlarının ve/veya FISH tekniğinin uygulanmasına da ihtiyaç duyulmaktadır.

Paradiplozoid türlerinin çoğunda yedinci telesontrik kromozomda görülen ikincil daralma *Paradiplozoon bingolensis* Sp.n.'in de 7. kromozomunda fakat bu kromozomun daha uç kısmına yakın bölümünde görülmüştür.

Kromozom sayısı, Koroleva'nın (1968b)'in diğer türlerde tespit ettiği haploid kromozom sayısı ($n=7$) ile de uyum göstermektedir. Dolayısıyla aynı haploid sayı sitogenetik olarak incelenen diğer diplozoid türlerinin çoğunda da (*Paradiplozoon Megan*, *P. bliccae*, *P. sapae*, *P. nagibinae*, *P. pavlovskii*, *P. homoion*) görülmektedir (Baer ve Euzet, 1961; Bovet, 1965; Koroleva, 1968a; Koroleva, 1968b; Koroleva, 1969; Košková ve diğerleri, 2011; Bombarová ve diğerleri, 2014). Tek istisna, diploid hücrelerde (Koroleva, 1968a, b) $2n=8$ ($n=3m+1a$) kromozomlu *Diplozoon paradoxum* ve Diplozoidae sp olarak gösterilen sınıflandırılmamış türlerdir.

Kromozomların tanımlaması nispi boyutlarına, sentromer konumlarına ve ikincil daralmalarına (yani kromozomların morfolojik özelliklerine) yapılabilir. Ayrıca, gözlenen hücre döngüsü aşamasının aynı olmasına, kullanılan yöntem ve sitolojik hazırlamanın kalitesine de bağlıdır. Diplozoidlerde, sitogenetik olarak bilinen tüm diplozoidlerin kromozomları, şekil ve uzunluk bakımından çok benzerdir. Geleneksel morfometrik gözlemlerle kolayca saptanan tek tür, haploid tamamlayıcıda $n=8$ kromozomlu *D. paradoxum*'dur. Grubun geri kalan türleri, benzerlikleri nedeniyle her tür birbirinden ayırt edilmesi çok zor $n=7$ tek kollu kromozomlardan oluşur. Türleri tanımlamak ve karşılaştırmak için kullanılan diğer özellikler aşağıda açıklanmıştır.

Bununla birlikte, bu türün diğer diplozoid monogeanlarla filogenetik ilişkisini ortaya koyabilmek için burada ortaya konulan kromozomal verilerin daha ileri sitogenetik analizler ile güçlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mesela; ikincil daralmanın lokalizasyonu, yani bir nükleolar düzenleyici bölge (NOR), diplozoid türlerde değişiklik gösterir. Ör; iki kardeş tür olan *P. nagibinae* ve *P. Sapae*'de, 4 No'lu kromozom çiftinin uzun kolunda, sentromer yakınında bulunur ve dolayısıyla ikincil daralmanın benzer bölgede bulunması söz konusu türlerin yakın ilişkisini gösterir (Şekil 7.). *E. nipponicum*, *P. Megan* ve *P. bliccae*'de ise ikincil daralma son en kısa akrosentrik (a) olan 7. kromozom çifti üzerinde konumlanmaktadır (Aralarındaki fark ikincil daralmanın 7. kromozom çiftini oluşturan kromozomların değişik bölgelerinde olmasıdır.). Yani *P. Megan*'nda aynı kromozom çiftinin orta kısmında NOR görünürken ve *D. bliccae*'de ise 7. kromozom çiftinin sonuna yakın bir yerde NOR bölgesi (yani ikincil daralma) görülmektedir. *D. paradoxum* ise 1 No'lu metasentrik kromozom çifti üzerinde kısa kolların pericentromerik bölgesinde yer alan ikincil daralmaya sahip tek diplozoid türdür.

Diğer taraftan, sudaki kanserojenik-mutajenik kirleticilerin tespiti amacıyla yapılan micronuclei testi sonucu herhangi bir bulguya rastlanılmamış olması, balık örneklerinin alındığı akarsuda herhangi bir kirleticinin bulunmadığı, bu sularla balık yetiştiriciliği veya diğer tarımsal faaliyetlerin rahatlıkla yapılabileceği düşünülmektedir. Hatta Bingöl suları ile ilgili yapılmış deney sonuçları da dikkate alındığında, Bingöl sınırları dahilindeki diğer su kaynaklarıyla geleneksel ve/veya iyi tarım uygulamaları çerçevesinde balık yetiştiriciliği faaliyetlerinde bulunabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

Aisien, M. S., ve Du Preez L. H. (2009). A redescription of *Polystoma africanum* Szidat, 1932 (Monogenea: Polystomatidae). *Zootaxa* 2095, 37-46.

Al-Sabti, K. (1985). "Carcinogenetic-Mutagenic Chemicals Induced Chromosomal Aberrations in the Kidney Cells of Three Cyprinids". *Comparative Biochemistry and Physiology Comparative Pharmacology and Toxicology*, 82(2), 489-493.

Araf, S. Z., ve Reda, E. S. (2012). Surface features of the monogenean gill parasites *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini* from the European eel *Anguilla anguilla* in Egypt. *Parasitology research* 110(1), 127-133.

Avenant-Oltewage, A. L., Le Roux, L. E., Mashego, S. N., ve Van Vuuren, B. J. (2014). *Paradiplozoon ichthyoxanthon* n. sp. (Monogenea: Diplozoidae) from *Labeobarbus aeneus* (Cyprinidae) in the Vaal River, South Africa. *Journal of Helminthology* 88(2), 166-172.

Baer, J. G., ve Euzet, L. (1961). Classe des Monogenes, Monogenoidea Bychowsky. In: Grasse PP (ed) *Traite de Zoologie. Anatomie, Systematique, Biologie. IV. Plathelminthes, Mesozoaaires, Acanthocephales, Nemertiens*. Masson et Cie Editeurs, Paris, p 243-325.

Banarescu, P. M. ve Bogutskaya, N. G. (2003). The Freshwater Fishes of Europe. Cyprinidae 2. Part II: *Barbus*. The Freshwater Fishes of Europe, p 454.

Bartek J., Lukas, C., ve Lukas J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews Molecular cell biology* 5(10), 792.

Bates, S. E. (2011). *Classical cytogenetics: karyotyping techniques in Human Pluripotent Stem Cells*. Humana Press, 177-190.

Belmont, A. S. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Current opinion in cell biology* 18(6), 632-638.

Benazzi, M., ve Benazzi Lentati, G. (1976). *Animal cytogenetics. 1. Platyhelminthes*. Gebruder Borntraeger, Berlin.

Bickmore, W. A. (2001). Karyotype analysis and chromosome banding in *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley.

Boeger, W. A., ve Kritsky, D. C. (2001). Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. *Systematics Association Special Volume* 60, 92-102.

Bombarová, M., Špakulová, M., ve Koubková, B. (2014). New data on the karyotype and chromosomal rDNA location in *Paradiplozoon megan* (Monogenea, Diplozoidae), gill parasite of chubs. *Parasitology research*, 113(11), 4111-4116.

Bombarová, M., Špakulová, M., Kello, M., Nguyen, P., Bazsalovicsová, E., ve Králová-Hromadová, I. (2015). Cytogenetics of *Aspidogaster limacoides* (Trematoda, Aspidogastrea): karyotype, spermatocyte division, and genome size. *Parasitology research* 114(4), 1473-1483.

Bovet, J. L. (1965). Contribution à la morphologie et à la biologie de "*Diplozoon paradoxum*" V. Nordmann, 1832. Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel.

Bovet, J. 1967. Contribution a la morphologie et a la biologie de *Diplozoon paradoxum* v. Nordmann, 1832. *Bull. Soc. Neuchatel. Sci* 3: 64-159.

Buchmann, K., Lindenstrøm, T., ve Bresciani, J. (2004). Interactive associations between fish hosts and monogeneans. *Host-parasite interactions*, 161-184.

Buchmann, K., ve Bresciani, J. (2006). Monogenea (Phylum Platyhelminthes). *Fish diseases and disorders* 1, 297-344.

Bychowsky & Nagibina (1959). versus *P. gracile* Reichenbach-Klinke, (1961) (Monogenea): two species or phenotypic plasticity?. *Systematic Parasitology* 53(1), 39-47.

Bychowsky, B. E. (1961). Monogenetic trematodes. Their classification and phylogeny. *Monogenetic trematodes. Their Systematics and Phylogeny*, 1-627.

Bychowsky, B. E. (1937). Ontogenesis and phylogenetic relationships of Platyhelminthes. *Izdatel'stvo Akademiya nauk SSSR. Series Biology* 4, 1353-1383.

Cable, J., ve Harris, P. D. (2002). Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *International Journal for Parasitology* 32(3), 255-280.

Chan, G. K., Liu, S. T., ve Yen, T. J. (2005). Kinetochore structure and function. *Trends in cell biology* 15(11), 589-598.

Christian, A., McNeil, E., Robinson, J., Drabek, R., LaRuxe, S., Waldren, C., ve Bedford, J. (1998). A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetic and Genome Research* 82(3-4), 172-179.

Civáňová, K., Koyun, M., ve Koubková, B. (2013). The molecular and morphometrical description of a new diplozoid species from the gills of the *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Cyprinidae) from Turkey-including a commentary on taxonomic division of Diplozoidae. *Parasitology research* 112(8), 3053-3062.

Coad, B.W. (2014). "Freshwater Fishes of Iran", <http://www.briancoad.com>

Cooper, G. M., ve Hausman, R. E. (2000). The cell: a molecular approach, Vol. 10. DC: ASM press, Washington.

Craig, J. M. (1999). Isolation of vertebrate metaphase chromosomes and their analysis by FISH in Chromosome Structural Analysis: A Practical Approach. Oxford University Press, 59-80.

Čítek, J., Svobodová Z., ve Tesarčík J. (1992). Nemoci ryb. Informatium, Praha.

Denholm, S. J., Hoyle A. S., Shinn A. P., Paladini G. Taylor N. G. H., ve Norman R. A. (2016). Predicting the potential for natural recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations following the introduction of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea). PloS One 11(12), e0169168.

Dolan, M. (2011). The role of the Giemsa stain in cytogenetics. Biotechnic & Histochemistry 86(2), 64-97.

Esch, G. W., ve Fernandez, J. C. (2013). A functional biology of parasitism: Ecological and evolutionary implications. Springer Science & Business Media.

Estandarte, A. K. C. (2012). A review of the different staining techniques for human metaphase chromosomes. Department of Chemistry, University College London, University of London.

Euzet, L., ve Combes, C. (1998). The selection of habitats among the Monogenea. International Journal for Parasitology 28(10), 1645-1652.

Farahat, A. A., Kumar, A., Say, M., Wenzler, T., Brun, R., Paul, A., Wilson, W. D., ve Boykin, D. W. (2017). Exploration of DAPI analogues: Synthesis, antitrypanosomal activity, DNA binding and fluorescence properties. European journal of medicinal chemistry 128, 70-78.

Fuková, I., Nguyen, P., ve Marec, F. (2005). Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. Genome 48(6), 1083-1092.

Gao, Q., Chen, M.X., Yao, W.J., Gao, Y., Song, Y., Wang, G.T., ve Nie, P. (2007). Phylogeny of diplozoids in five genera of the subfamily Diplozoinae Palombi, 1949 as inferred from ITS-2 rDNA sequences. Parasitol. 134: 695-703.

Garavís, M., Gonzalez, C., ve Villasante, A. (2013). On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution. Genome biology and evolution 5(6), 1142-1150.

García-Vásquez, A., Hansen, H., Christison, K. W., Bron, J. E., ve Shinn, A. P. (2011). Description of three new species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 (Monogenea) parasitising *Oreochromis niloticus niloticus* (L.) and *O. mossambicus* (Peters)(Cichlidae). Acta Parasitologica 56(1), 20-33.

- Gébrane-Younès, J., Fomproix, N., ve Hernandez-Verdun, D. (1997). When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *Journal of cell science* 110(19), 2429-2440.
- Geldiay, R., ve Balık, S. (2007). Türkiye Tatlı Su Balıkları, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No: 46 Ders Kitapları Dizini, No: 16, Bornova-İzmir, s. 532.
- Gladyshev, E. A., ve Arkhipova, I. R. (2007). Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(22), 9352-9357.
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307(5716), 1735-1739.
- Grelon, M. (2016). Meiotic recombination mechanisms. *Comptes rendus biologies* 339 (7-8), 247-251.
- Grewal, S. I. S., ve Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8(1), 35.
- Gilmore, S. R., Cone, D. K., Lowe, G., King, S. K., Jones, S. R. M., ve Abbott, C. L. (2012). Molecular phylogeny of *Gyrodactylus* (Monogenea) parasitizing fishes in fresh water, estuarine, and marine habitats in Canada. *Canadian Journal of Zoology* 90(6), 776-786.
- Guerra, M. S. (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et. *Brazil. J. Genet.* 9, 741-743.
- Günther, K., Mertig, M., ve Seidel, R. (2010). Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA. *Nucleic acids research* 38(19), 6526-6532.
- Hadied, M. A., Khidr, A. A., Samak, O. A., ve Said, A. (2015). Surface topography of the anterior adhesive apparatus of the gill monogenean parasite *Diplectanum* sp. Diesing, 1858, with some surface criteria. *Fisheries and Aquaculture Journal* 6(4).
- Halton, D. W. (1975). Intracellular digestion and cellular defecation in a monogenean, *Diclidophora merlangi*. *Parasitology* 70(3), 331-340.
- Halton, D. W. (1982). Morphology and ultrastructure of parasitic helminths in *Parasites: their world and ours*. Elsevier Biomedical Press.
- Halton, D. W., Maule A. M., Mair G. R., ve Shaw Ch. (1998). Monogenean neuromusculature: some structural and functional correlates. *International journal for parasitology* 28(10), 1609-1623.
- Harris, P. D. (1985). Observations on the development of the male reproductive system in *Gyrodactylus gasterostei* Gläser, 1974 (Monogenea, Gyrodactylidae). *Parasitology* 91(3), 519-529.

Hayward, C. (2005). Monogenea Polyopisthocotylea (ectoparasitic flukes) in Marine Parasitology: CSIRO. Collingwood, Australia & CABI, 55-63.

Helwig, A. Bhat, F.A., Sofi, T. A., Fazili, K. M., ve Sheikh, B. A. (1958). Comparative Karyological analysis of three Diplozoon Species (Monogenea, Diplozoidae), Gill Parasites of Schizothorax species - first report from the Kashmir Valley. India.

Heng, H. H. Q., ve Tsui, L. C. (1993) Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization. Chromosoma 102(5), 325-332.

Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. Nucleus 2(3), 189-194.

Hirons, G. T., Fawcett, J. J., ve Crissman, H. A. (1994). TOTO and YOYO: new very bright fluorochromes for DNA content analyses by flow cytometry. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology 15(2), 129-140.

Hoai, T. D., ve Hutson, K. S. (2014). Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). PLoS One 9(9), e108801

Hodová, I., Matejusová, I., ve Gelnar, M. (2010). The surface topography of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) developmental stages parasitizing carp (*Cyprinus carpio* L.). Central European Journal of Biology 5(5), 702-709.

Howard, A., ve Pelc, R. R. (1953). Division of cell cycle in G₁, S, G₂ and M. Heredity 6 (Suppl.), 261.

Howell, W. M. T., ve Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36(8), 1014-1015.

Hsieh Ch., L. (2011). Cytogenetic Techniques in Encyclopedia of Life Sciences. Wiley.

Ingram, A. L., ve Parker A. R. (2005). The anatomy and attachment mechanism of the haptor of a *Capsala* sp. (Platyhelminthes: Monogenea: Capsalidae) on the blue marlin, *Makaira nigricans* (Istiophoridae). Journal of Natural History 39(42), 3633-3647.

Jansen, P. A., ve Bakke, T. A. (1991). Temperature-dependent reproduction and survival of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes: Monogenea) on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Parasitology 102(1), 105-112.

Jensen E. (2014). Technical review: In situ hybridization. The Anatomical Record 297(8), 1349-1353.

Justine J. L. (1991). Cladistic study in the Monogenea (Platyhelminthes), based upon a parsimony analysis of spermiogenetic and spermatozoal ultrastructural characters. International Journal for Parasitology 21(7), 821-838.

- Karahan, A. (2007). *Garra rufa* ve *Garra variabilis*'in Morfometrik ve Sitogenetik Yönden Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 123.
- Kearn, G. C. (1998). Parasitism and the platyhelminths. Chapman & Hall Ltd.
- Kearn, G. C. (2011). Monogeneans-the ultimate fish parasites. *Monogenea* 58(2), 28-32.
- Khotenovsky, I. A. (1985). Suborder Octomacrinea Khotenovsky. Fauna of the USSR. *Monogenea. New Series* No. 132.
- Kleckner, N. (1996). Meiosis: how could it work?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(16), 8167-8174.
- Koroleva, Y. I. (1986a). Karyological study on several species of Monogenea of the genus Diplozoon. *Zoologia In Russian*, 179, 739-741.
- Koroleva, Y. I. (1969). Karyology of some species of Diplozoon. *Parazitologiya, In Russian* 3, 411-414.
- Košková, E., Špakulová, M., Koubková, B., Reblánová, M., ve Orosová, M. (2011). Comparative karyological analysis of four diplozoid species (Monogenea, Diplozoidae), gill parasites of cyprinid fishes. *Parasitology research* 108(4), 935-941.
- Koyun, M., (2012). "The Occurrence of Parasitic Helminths of *Capoeta umbla* in Relation to Seasons, Host Size, Age and Gender of the Host in Murat River, Turkey" *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(5): 609-614.
- Krupp, F. (1985). "A new species of *Chondrostoma* from the Orontes River Drainage Basin of Turkey and Syria (Pisces: Osteichthyes: Cyprinidae)" *Frankfurt am Main*, 27-33.
- Kuglík, P. (2000). *Vybrané kapitoly z cytogenetiky*. Masaryk University.
- Kuru, M. (1979). "Freshwater Fishes of South-Eastern Turkey 2 (Euphrates-Tigris System)" *Hacettepe Bulletin of Natural Science and Engineering*, 7-8: 105-114.
- Kuru, M. (1980). "Key to the inland waters of Turkey", *Hacettepe Bulletin of Science and Engineering*, 9:103-133.
- Kuru, M. (2004). "Türkiye İçsu Balıklarının Son Sistematik Durumu", *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24(3), 1-21.
- Levan, A., Fredga, K., ve Sandberg, A. A. (1964). "Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes", *Hereditas*, 52, 201-220.
- Lockyer, A. E., Olson, P. D., ve Littlewood, D. T. J. (2003). Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata

(Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. *Biological Journal of the Linnean Society* 78(2), 155-171.

Lodish, H. (2008). Life begins with cells. Chapter 1 in *Molecular Cell Biology*. 6th ed. Freeman & Company.

Lyons, K. M. (1971). Comparative electron microscope studies on the epidermis of the blood living juvenile and gill living adult stages of *Amphibdella flavolineata* (Monogenea) from the electric ray *Torpedo nobiliana*. *Parasitology* 63(2), 181-190.

Lyons, K. M. (1973). The epidermis and sense organs of the Monogenea and some related groups. *Advances in parasitology* 11, 193-232.

MacDonald, S., ve Combes, C. (1978). The hatching rhythm of *Polystoma integerrimum*, a monogenean from the frog *Rana temporaria*. *Chronobiologia* 5(3), 277-285.

Matejusová, I., Gelnar, M., McBeath, A. J. A., Collins, C. M., ve Cunningham, C. O. (2001a). Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *International Journal for Parasitology* 31(7), 738-745.

Matejusová, I., Koubková, B., D'amelio, S., ve Cunningham, C. O. (2001b). Genetic characterization of six species of diplozoids (Monogenea; Diplozoidae). *Parasitology* 123(5), 465-474.

Matejusová, I., Koubková, B., Gelnar, M., ve Cunningham, C. O. (2002). *Paradiplozoon homoion* Bychowsky & Nagibina, 1959 versus *P. gracile* Reichenbach-Klinke, 1961 (Monogenea): two species or phenotypic plasticity?. *Systematic Parasitology* 53(1), 39-47.

Matejusová, I., Koubková, B., ve Cunningham, C. O. (2004). Identification of European diplozoids (Monogenea, Diplozoinae) by restriction digestion of the ribosomal RNA internal transcribed spacer. *Journal of Parasitology* 90(4), 817-823.

McStay, B. (2016). Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes & Development* 30(14), 1598-1610.

Meshego, N., Crafford, D., Luus-Powell, W., ve Oldewage, A. A. (1983). Monogenean parasites from fishes of the Vaal Dam, Gauteng Province, South Africa II. New locality records *Acta Parasitologica*, ISSN 1230-2821, 59(3), 485-492.

Müller, F., Wicky, Ch., Spicher, A., ve Tobler, H. (1991). New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell* 67(4), 815-822.

O'Connell, M. J., Walworth, N. C., ve Carr, A. M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends in cell biology* 10(7), 296-303.

Ogawa, K. (2015). Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology* 142(1), 178-195.

Okazaki, S. A., Tshida, K., Maekawa, T. H., Ishikawa, H., ve Fujiwara, H. (1993). Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Molecular and Cellular Biology* 13(3), 1424-1432.

Orosová, M., ve Oros, M. (2012). Classical and molecular cytogenetics of *Khawia sinensis* (Cestoda: Caryophyllidea), invasive parasite of carp, *Cyprinus carpio*. *Parasitology research* 110(5), 1937-1944.

Orosová, M., ve Špakulová, M. (2018). Tapeworm chromosomes: their value in systematics with instructions for cytogenetic study. *Folia parasitologica* 65, 001.

Osanai, M., Kojima, K. K., Futahashi, R., Yaguchi, S., ve Fujiwara, H. (2006). Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). *Gene* 376(2), 281-289.

Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246(4930), 603-608.

Pawlovski, W. P., ve Cande, W. Z. (2005). Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends in cell biology* 15(12), 674-981.

Perkins, E. M., Donnellan, S. C., Bertozzi, T., ve Whittington, I. D. (2010). Closing the Mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers 80.

Prokofiev, A. M. (2009). "Problems of the classification and phylogeny of Nemacheiline loaches of the group lacking the preethmoid I (Cypriniformes: Balitoridae: Nemacheilinae)", *Journal of Ichthyology*, 49(10), 874–898.

Reblánová, M., Špakulová, M., Orosová, M., Králová-Hromadová, I., Bazsalovicsová, E., ve Rajský, D. (2011). A comparative study of karyotypes and chromosomal location of rDNA genes in important liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae). *Parasitology research* 109(4), 1021-1028.

Rohde, K. (1994). Chromosomes of *Kuhnia scomбри* and *K. sprostonae* (Monogenea, Polyopisthocotylea, Mazocraeidae). *Acta Parasitologica* 39(3), 117-119.

Ulupınar, M., ve Okumuş, İ. (1997a). Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) kromozom preparasyonu için ıslah edilmiş bir metod, IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Eğirdir-İSPARTA. s. 594-600.

Ulupınar, M., ve Okumuş, İ. (1997b). "Balıklarda Sitogenetik Yöntemler Yardımıyla Sudaki Mutajenik ve Kanserojenik Kirleticilerin Belirlenmesi", IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 17-19 Eylül 1997, Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Eğirdir-Isparta. Cilt I. s. 408-503.

Ulupınar, M., ve Okumuş İ. (2002b). "Detection of mutagenic-carcinogenic pollutants in aquatic systems using cytogenetic methods in fish", *Turkish J. Zool.*, 26, 141-148.

Ulupınar, M. ve Alaş, A. (2002). Balık Sitogenetiği ve Laboratuvar Teknikleri, ISBN: 975-93178-0-X, ISPARTA. s. 371.

Ulupınar, M., Koyun M., ve Yıldırım, T. (2013). Murat Nehri Balık ve Zooplankton Faunasının Tespiti, Bingöl Üniversitesi, BÜBAP, Proje No: 2010/018.

Ulupınar, M. ve Koyun M. (2021). Bingöl İli Balıklarının Özellikleri ve Avlanma Kuralları. İKSAD Yayınevi, Bingöl-Türkiye. s. 82.

Whittington, I. D. (1998). Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. *International Journal for Parasitology* 28 (10), 1481-1493.

Yıldırım, T., Şen, D., Eroğlu, M., Demirel, F. ve Gündüz, F. (2012). Keban Baraj Gölü Balık Faunasının Tespiti, GTHB Tarımsal araştırmalar Genel Müd. Elazığ Su Ürünleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Proje No: TAGEM/HAYSÜD/ 2004/07/03/01.