

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FIRAT NEHRİ'NDE YAŞAYAN BARBUS VE LUCIOBARBUS CİNSİNE  
AİT TÜRLERİNİN MİTOKONDİYER DNA MARKÖRLERİ İLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

**ELİF KORKMAZ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2022**

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FIRAT NEHRİ'NDE YAŞAYAN BARBUS VE LUCIOBARBUS CİNSİNE  
AİT TÜRLERİNİN MİTOKONDİYER DNA MARKÖRLERİ İLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

**ELİF KORKMAZ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2022**

Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ danışmanlığında ELİF KORKMAZ'ın hazırladığı **“Fırat Nehri’nde Yaşayan Barbus ve Luciobarbus Cinsine Ait Türlerinin MtDNA Markörler İle Filogenetik Analizi”** konulu bu çalışma 31/01/2022 tahinide aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ .....

Üye : Prof. Dr. S. Ahmet OYMAK .....

Üye : Dr. Öğr.Üyesi M. Yaşar DÖRTBUDAK .....

**Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.**

**Doç. Dr. İsmail HİLALİ**

**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma HÜBAP Tarafından Desteklenmiştir.**

**Proje no: 21070**

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

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

|                                                                        |                                  |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| ÖZET .....                                                             | i                                |
| ABSTRACT .....                                                         | ii                               |
| TEŞEKKÜR .....                                                         | iii                              |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                  | iv                               |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                | v                                |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                   | vi                               |
| 1. GİRİŞ .....                                                         | 1                                |
| 1.1. Mitokondriyal DNA .....                                           | 5                                |
| 1.2. Neden mtCOI ve cyt-b Genleri? .....                               | 6                                |
| 1.3. PCR Tekniği .....                                                 | 7                                |
| 1.4. Agaroz jel elektroforezi .....                                    | 8                                |
| 1.5. DNA Barkodlamanın Avantajları .....                               | 8                                |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                             | 9                                |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM .....                                            | 14                               |
| 3.1. Çalışma Materyali Olan Balıkların Sistematikteki Yeri .....       | 15                               |
| 3.2. Çalışmada Kullanılan Balıklar .....                               | 16                               |
| 3.2.1. Arabibarbus grypus (Gray, 1883) .....                           | 16                               |
| 3.2.2. Carasobarbus luteus (Karaman, 1971) .....                       | 17                               |
| 3.2.3. Barbus lacerta (Heckel, 1843) .....                             | 18                               |
| 3.2.4. Luciobarbus xanthopterus (küpeli) .....                         | 18                               |
| 3.2.5. Luciobarbus esocinus (Turna) .....                              | 19                               |
| 3.2.6. Luciobarbus kersin .....                                        | 19                               |
| 3.3. Balık Örneklerinin Toplanması .....                               | 20                               |
| 3.4. DNA Ekstraksiyonu .....                                           | 20                               |
| 3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Uygulaması .....                | 21                               |
| 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....                                    | 24                               |
| 3.7. DNA Dizileme .....                                                | 27                               |
| 3.8. mtDNA COI Dizilerinin Analizi .....                               | 28                               |
| 3.9. mtDNA İstatistik Veri Analizleri .....                            | 30                               |
| 3.9.1. Komşu birleştirme ağacı (Neighbour Joining Tree) analizi .....  | 30                               |
| 3.10. mtDNA Cyt-b Dizilerinin Analizi .....                            | 30                               |
| 3.11. mtDNA İstatistik Veri Analizleri .....                           | 32                               |
| 3.11.1. Komşu birleştirme ağacı (Neighbour Joining Tree) analizi ..... | 32                               |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....                               | 33                               |
| 4.1. Mitokondriyal COI Geni İle İlgili Bulgular .....                  | 33                               |
| 4.1.1. COI sekans görüntüsü .....                                      | 33                               |
| 4.1.2. Bioedit görüntüsü .....                                         | 34                               |
| 4.1.3. Mega fotoğrafı .....                                            | 35                               |
| 4.1.4. Filogenetik ağaç (Neighbourjoining tree) .....                  | 36                               |
| 4.2. Mitokondriyal Cyt b Geni İle Oluşan Sonuçlar .....                | 38                               |
| 4.2.1. Cyt b sekans görüntüsü .....                                    | 38                               |
| 4.2.2. Bioedit görüntüsü .....                                         | 39                               |
| 4.2.3. Mega fotoğrafı .....                                            | 39                               |
| 4.2.4. Neighbour joining .....                                         | 40                               |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....                                          | 42                               |
| 5.1. Sonuçlar .....                                                    | 42                               |
| 5.2. Öneriler .....                                                    | 43                               |
| KAYNAKLAR .....                                                        | 45                               |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                         | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### FIRAT NEHRİ'NDE YAŞAYAN BARBUS VE LUCIOBARBUS CİNSİNE AİT TÜRLERİNİN MtDNA MARKÖRLER İLE FİLOGENETİK ANALİZİ

ELİF KORKMAZ

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ  
YIL:2022, Sayfa:50

Biyolojik çeşitlilik doğada bulunan canlıların farklılıkları, birbirleri ile ilişkileri, ekolojik nişleri gibi çeşitliliği ifade eder. Biyolojik çeşitlilik içerisinde genetik çeşitlilik, tür çeşitliliği ve ekosistem çeşitliliği gibi kavramlar bulunmaktadır. Ekonomik öneme sahip olan Cyprinidea familyasına ait bazı türleri çabuk büyümeleri, yapay yolla döllenerek yetiştirmelerinin kolaylığı nedeniyle doğal habitatlarından farklı olarak birçok bölgeye taşınmışlardır. Cyprinidae familyası örnekleri arasında bulunan morfolojik farklılaşmalar bu familya üyelerinin taksonomik olarak sınıflandırılmasında bazen yetersiz kalmaktadır. Bu familya üyelerinin taksonomik olarak sınıflandırılmasının doğru bir şekilde yapılabilmesi için genetik özelliklerinin incelenmesi, filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi, türlerin kökeninin belirlenmesi gibi çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle Barbus, Luciobarbus, Capoeta cinsleri ve diğer cinslerin tür olarak gruplandırılmasında ciddi sıkıntılar oluşmaktadır. Çalışmamızda *Barbus lacerta*, *Luciobarbus esocinus*, *Luciobarbus kersin*, *Luciobarbus xanthopterus*, *Arabibarbus grypus*, *Carasobarbus luteus* türleri olmak üzere ekonomik değere sahip 6 tür balığın mitokondri Sitokrom oksidaz I (COI) ve Sitokrom b (cyt b) genleri baz alınarak filogenetik analizleri yapılmıştır. Özellikle IUCN Kırmızı Liste kriterlerine göre tür sayısı bakımından koruma durumunda olan *Luciobarbus esocinus*, *Luciobarbus xanthopterus* ve *Arabibarbus grypus* türlerinin moleküler çalışmaları çok önemlidir. Çalışma sonucunda bu altı türe ait gen benzerlikleri ortaya çıkarılmıştır. Mega formatına göre komşu birleştirme ağaçları oluşturulmuştur. Bu ağaçlara göre; öncelikle türler 2 kola ayrılmıştır. Bir kol üzerinde *Luciobarbus* ve *Barbus* cinsine ait türler, diğer dalda ise *Carasobarbus* ve *Arabibarbus* türleri ayrılmaktadır daha sonra ise *Barbus* ve *Luciobarbus* yine 2 kol üzerinden ayrılmıştır. Buna göre *Luciobarbus* ve *Barbus* cinsleri birbirine daha yakın, diğer türlere daha uzak akrabadır.

**ANAHTAR KELİMELEER:** *Barbus*, *Luciobarbus*, Sitokrom oksidaz I (COI), Sitokrom b (cyt b), Filogenetik Analiz.

## ABSTRACT

### Master Thesis

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF SPECIES BELONGING TO THE GENUS BARBUS AND LUCIOBARBUS LIVING IN THE EUPHRATES RIVER WITH mtDNA MARKERS

ELİF KORKMAZ

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arif PARMAKSIZ

Year: 2022, Page: 50

Biological diversity refers to the diversity of living things found in nature, their relationship to each other, ecological niches, as well as differences. APR. There are concepts such as genetic diversity, species diversity and ecosystem diversity in biological diversity. Some species belonging to the Cyprinidae family, which are of economic importance, have moved to many regions unlike their natural habitats due to their rapid growth, the ease of their cultivation by artificial insemination, and the ease of their cultivation. The morphological differences found among the specimens of the family Cyprinidae are sometimes insufficient to decipher the taxonomic classification of the members of this family. In order to correctly classify the members of this family taxonomically, studies such as studying their genetic characteristics, determining their phylogenetic relationships, determining the origin of species are needed. In particular, there are serious difficulties in grouping the genera Barbus, Lucibarbus, Capoeta and other genera as species. In our study, Barbus lacerta, Luciobarbus esocinus, you're luciobarbus credit, Luciobarbus xanthopterus, Arabibarbus grypus, Carasobarbus luteus 6 types fish species that have economic value to the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome b (cyt B) gene based on phylogenetic analyses are reviewed. In particular, molecular studies of the species Luciobarbus esocinus, Luciobarbus xanthopterus and Arabibarbus grypus, which are in a state of conservation in terms of the number of species according to the IUCN Red List criteria, are very important. As a result of the study, gene similarities belonging to these six species were revealed. Neighboring join trees have been created according to the mega format. According to these trees; firstly, the species is divided into 2 branches. On one branch, the species belonging to the genera Luciobarbus and Barbus are separated, and on the other branch, the species of Carasobarbus and Arabibarbus are separated, and then Barbus and Luciobarbus are again divided into 2 branches. Accordingly, the genera Luciobarbus and Barbus are closer together and more distantly related to other species.

**KEY WORDS:** *Barbus*, *Luciobarbus*, Sitokrom oksidaz I (COI), Sitokrom b (cyt b), Phyloenetik Parse.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ'a, çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen balık uzmanı Necmettin DOĞAN'a, laboratuvar çalışmalarında destek veren yüksek lisans arkadaşlarıma, Arş. Gör. Dilara hocam'a ve en büyük desteği veren aileme teşekkürlerimi sunarım.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Mitokondriyal DNA .....                                                             | 6  |
| Şekil 3.1. Balıkçılardan analiz edilmek üzere alınan <i>Luciobarbus xantopterus</i> türü. .... | 14 |
| Şekil 3.2. Balıkçılardan alınan balıklar .....                                                 | 15 |
| Şekil 3.3. <i>Arabibarbus grypus</i> 'un genel vücut görünümü (Orjinal).....                   | 17 |
| Şekil 3.4. <i>Carasobarbus luteus</i> 'un genel vücut görünümü (Orjinal) .....                 | 17 |
| Şekil 3.5. <i>Barbus lacerta</i> 'nın genel vücut görünümü (Orjinal).....                      | 18 |
| Şekil 3.6. <i>Luciobarbus xantopterus</i> 'un genel vücut görünümü (Orjinal).....              | 19 |
| Şekil 3.7. <i>Luciobarbus esocinus</i> 'un genel vücut görünümü (Orjinal).....                 | 19 |
| Şekil 3.8. <i>Luciobarbus kersin</i> 'in genel vücut görünümü (Orjinal).....                   | 19 |
| Şekil 3.9. Balıklardan kas dokunun alınması (a) ve ependorf tüplere koyulması (b) .....        | 20 |
| Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan PCR cihazı .....                                              | 24 |
| Şekil 3.11. PCR ürünlerinin agaroz jel kuyucuklarına yüklenmesi .....                          | 25 |
| Şekil 3.12. UV altında ürünler için görüntüleme cihazı .....                                   | 26 |
| Şekil 3.13. DNA örneklerinin COI PCR sonuçları (L: Leader, bç:Baz çifti) .....                 | 27 |
| Şekil 4.1. COI sekans görüntüsü .....                                                          | 34 |
| Şekil 4.2. COI geni Bioedit Görüntüsü .....                                                    | 35 |
| Şekil 4.3. COI geni Mega programı fotoğrafı .....                                              | 36 |
| Şekil 4.4. COI geni Filogenetik ağacı (Neighboor joining tree).....                            | 37 |
| Şekil 4.5. Cyt b sekans görüntüsü .....                                                        | 39 |
| Şekil 4.6. Cyt b Bioedit fotoğrafı .....                                                       | 39 |
| Şekil 4.7. Cyt b Mega fotoğrafı .....                                                          | 40 |
| Şekil 4.8. Cyt b geni Filogenetik ağacı (Neighboor joining tree).....                          | 41 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. IUCN (International Union for Conservation of Nature) verilerine göre koruma durumları..... | 16 |
| Çizelge 3.2. mtDNA COI-625 primerinin yükseltgenmesinde uygulanan PCR koşulları.....                     | 27 |
| Çizelge 3.3. mtDNA COI-625 primerinin yükseltgenmesinde kullanılan PCR kağıdını.....                     | 28 |
| Çizelge 3.4. COI mega değerleri Çizelgesi .....                                                          | 29 |
| Çizelge 3.5. Cyt-b mega değerleri Çizelgesi .....                                                        | 31 |



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                    |                                 |
|--------------------|---------------------------------|
| Ark                | Arkadaşları                     |
| ATP                | Adenozin trifosfat              |
| bç                 | Baz çifti                       |
| C                  | Sitozin nükleotidi              |
| COI                | Sitokrom C oksidaz I            |
| Cyt b              | Sitokrom b                      |
| DNA                | Deoksiribonükleik asit          |
| D-loop             | Displacement loop               |
| ddH <sub>2</sub> O | Distile su                      |
| ddNTP              | Dideoksiribonükleozit trifosfat |
| dNTP               | Deoksiribonükleozit trifosfat   |
| EDTA               | Etilendiamintetraasetik asit    |
| EtBr               | Etidyum Bromid                  |
| HCl                | Hidro klorik asit               |
| M                  | Molar                           |
| Mg                 | Miligram                        |
| MgCl <sub>2</sub>  | Magnezyum klorür                |
| mtDNA              | Mitokondrial DNA                |
| nDNA               | Çekirdek DNA                    |
| PCR                | Polymerase Chain Reaction       |
| PZR                | Polimeraz Zincir Reaksiyonu     |
| TBE                | Tris/ Borik asit/ EDTA Tamponu  |
| T <sub>m</sub>     | Primerlerin erime sıcaklığı     |
| rRNA               | Ribozomal Ribo Nükleik Asit     |
| tRNA               | Taşıyıcı Ribo Nükleik Asit      |
| UV                 | Ultraviyole                     |
| ml                 | Mililitre                       |
| °C                 | Santigrad derece                |
| µl                 | Mikrolitre                      |

## 1. GİRİŞ

Biyolojik çeşitlilik doğada bulunan canlıların farklılıkları, birbirleri ile ilişkileri, ekolojik nişleri gibi çeşitliliği ifade eder. Biyolojik çeşitlilik içerisinde genetik çeşitlilik, tür çeşitliliği ve ekosistem çeşitliliği gibi kavramlar bulunmaktadır. Türkiye, sahip olduğu coğrafik, iklimsel, jeolojik ve hidrobiyolojik koşullar sebebiyle birçok tür barındırmaktadır.

Biyoçeşitliliği korumak için popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin korunması gerekir. Avcılığın aşırı yapılması, çevrenin çeşitli sebeplerle bozulması gibi nedenlerle canlıların çok fazla etkilendiği durumlarda genetik çeşitliliğin korunması çok önemlidir. Balıklardaki genetik varyasyonların belirlenmesi ve bu varyasyonların yapılacak çalışmalarla desteklenmesi çok önemlidir (Eroğlu, 2008).

Canlılığın nereden geldiğiyle ilgili insanoğlunun merakı tarihin en erken zamanlarında başlamıştır. Canlılar arasında çok fazla biyolojik çeşitliliğin bulunması, çeşitlilik ve farklılıkların nereden geldiği bu merakın en önemli etkenidir. Bu merakı çözmek için en iyi bilimsel açıklama doğal seleksiyon olarak ifade edilmiştir. Bilim insanları uzun zaman boyunca dünyadaki biyoçeşitliliği tanımak ve açıklamak için çalışmalar yapmışlardır. Bilim insanları canlıları benzerliklerine ve yaşadığı ortamlara göre gruplandırarak ilk sınıflandırmayı yapmışlardır. Zamanla canlılara ait daha çok bilginin elde edilmesiyle bu bilgiler ışığında sınıflandırma kriterleri daha bilimsel bir hale getirmiştir. Sistematik biyolojinin ortaya çıkışı ile canlıların gruplandırılmasında başka modeller oluşmaya başlamıştır. Sadece morfolojik olarak değil genetik çeşitliliğinde tanımlanmasıyla son yıllarda yapılan çalışmalarda filogenetik akrabalıklara bakılarak canlıların sınıflandırılması amaçlanmıştır (Budak, 2007).

Hayvanlar aleminin omurgalılar şubesinde yer alan balıklar taksonomik araştırmalara göre dünyada 34700 türden oluşmaktadır (Froese ve Pauly, 2021). Bulunan yeni türlerle bu sayıda sürekli artış olmaktadır. Türkiye'deki deniz balığı tür

sayısı 2014 yılında 512 olarak belirtilirken (Bilecenoğlu vd., 2014) yakın zamanda eklenen yeni türler ile birlikte Türkiye'deki deniz balığı tür sayısı 560 olmuştur (Froese ve Pauly, 2021). İç sularda ise tür sayısı 370'i aşmıştır (Çiçek ve ark., 2015, 2016; Birecikligil ve ark., 2016). Türkiye iç sularındaki sayı son verilere göre 38 familyaya ait 387 tür olup bunların 54 tanesi endemiktir (Froese ve Pauly, 2021).

Sulardaki balık türlerinin tanımlanması, miktarlarındaki değişimin belirlenmesi ve ekolojik nişlerinin tam olarak ortaya çıkarılmasının balıkçılığa ve su yönetiminde önemli bir rol oynayacağı kesindir (Çiçek ve Birecikligil, 2015). Bir su ekosisteminin genel durumunu değerlendirmek için balık topluluklarını kullanmak önemlidir. Çünkü balıklar su ekosisteminde meydana gelebilecek değişimlerde çok iyi bir indikatör durumundadır. Balıklar su ekosisteminde uzun ömürlü hayvanlardır. Balıklar ekosistem içinde bir dizi trofik seviyeden oluşur ve su ortamında besin zincirinin en üst basamağındadır. Balıklar karada yaşayan canlılar içinde iyi bir besin kaynağıdır. En önemlisi de insanlar tarafından tüketilirler. Avcılık yöntemleri ile balıkların toplanması ve özelliklerine göre kabaca tanımlanması kolaydır.

Cyprinidea familyası içerdiği tür sayısından dolayı zengin ve önemli balık familyalarından birisidir. 151 cinse ait 1682 tür içermektedir (Froese ve Pauly, 2021). Cyprinidea familyası birçok araştırmacı tarafından alt familyalara ayrılarak sınıflandırılmıştır. Yapılan bu sınıflandırmalar karmaşık bir duruma neden olmuştur. Familyalarda bulunan türler arasındaki ilişkiler tam olarak anlaşılmamış olup farklı araştırmacılar tarafından değişik şekilde sınıflandırmalar ileri sürülmekte ve farklı alt familyalar ve cinsler önerilmektedir (Froese ve Pauly, 2021; Birecikligil, 2016). Cyprinidea familyası Van der Laon vd. (2015) tarafından 15 alt familya ile değerlendirilmektedir. Giderek gelişen moleküler genetik teknikler Cyprinidae familyasındaki ilişkilerin çözülmesinde kullanışlı yöntemlerdir. Son yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar birçok sistematik karışıklığın kısmen sonuca ulaştırmışsa da pek çok tür ve cins için henüz yeterli bilgi sağlayamamıştır. Günümüzde kullanılan moleküler teknikler, araştırmacıların cyprinidae çeşitliliği, anatomi, biyoloji gibi verileri yorumlamada, taksonlarla ilgili literatürün gözden geçirilmesinde ve sistematik verilerin açıklanmasında uygulanması gereken

yöntemlerdir (Froese ve Pauly, 2021; Birecikligil, 2016). Ekonomik öneme sahip olan Cyprinidea familyasının bazı üyeleri çabuk büyümeleri, yapay döllenme yoluyla yetiştirilmesinin nispeten kolay olması nedeniyle yaşam alanlarının dışındaki birçok ülkeye yayılmışlardır (Geldiay ve Balık, 2007; Birecikligil, 2016).

Cyprinidea familyasına ait türler hem akarsu hem de durgun sular gibi çok farklı habitatlarda yaşarlar. Alg, büyük su bitkileri, planktonlar ve küçük hayvanlar ile beslenirler (Geldiay ve Balık, 2007). Cyprinidea familyası üyelerinde baş çıplak, vücut ise sikloit tipteki pullarla örtülüdür. Sırtta tek dorsal yüzgeçleri vardır. Ventral yüzgeç ise bütün türlerinde abdominal tiptedir (Birecikligil, 2016). Genellikle bıyıksızdır ancak bazı üyelerinde bir çift veya iki çift bıyığa rastlanmaktadır.

Türkiye, sahip olduğu 7200 km'lik kıyı şeridi, 175000 km'yi aşan akarsuları, 203000 hektara yakın doğal gölleri ve 100000 hektarın üzerinde baraj gölleri ile büyük bir sucul biyoçeşitliliğe sahiptir. Sucul potansiyel tam olarak ortaya çıkarılmamıştır (Demirsoy, 2008).

Türkiyede Cyprinidae familyasına ait 63 tür bulunmaktadır, bu türlerden 14 tanesi Luciobarbus cinsine ait, 10 tane Barbus cinsine ait, 3 tane Carasobarbus cinsine ait ve 1 tanede Arabibarbus cinsine aittir. Fırat nehri 2815 metre uzunluğa sahip olup nehirde 13 familyaya ait 53 tür balık bulunmaktadır (Froese ve Pauly, 2021).

Cyprinidae familyası üyeleri hemen hemen bütün iç sularda bulunan, çok yüksek bir ekolojik toleransa sahip olan türlere sahiptir. Bir çok çalışmanın konusunu bu familyanın türleri oluşturmaktadır (Bektaş ve ark., 2011; Özdemir, 2013; Özdemir, 2015; Hedayati ve ark., 2016; Levin ve ark., 2017; Gandlin ve ark., 2017). Özellikle balıkçılık faaliyetlerinin artmasına paralel olarak bu familya üyeleri hem yetiştirilme, hem iç sulara yavru olarak bırakılıp balık stoklarının belirlenmesi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Özellikle iç sularda artan istilacı türlerin kökeninin belirlenmesi gibi çalışma alanları da Cyprinidae familyası ile yakından ilişkilidir. İstilacı türlere karşı alınacak önlemler ile endemik ve ekonomik değeri yüksek olan

türlerin korunması için balıkların özelliklerinin tamamen bilinmesi önemli bir etkidir.

Cyprinidae familyası örnekleri arasında bulunan morfolojik farklılaşmalar bu familya üyelerinin taksonomik olarak sınıflandırılmasında bazen yetersiz kalmaktadır. Bu familya üyelerinin taksonomik olarak sınıflandırılmasının doğru bir şekilde yapılabilmesi için genetik özelliklerinin incelenmesi, filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi, türlerin kökeninin belirlenmesi gibi çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle Barbus, Lucibarbus, Capoeta cinsleri ve diğer cinslerin tür olarak gruplandırılmasında ciddi sıkıntılar oluşmaktadır (Turan, 2004; Turan, 2008; Turan ve ark., 2009; Motamedi ve ark., 2014; Özdemir, 2015; Doadrio ve ark., 2016; Ren ve Maylen, 2016; Khaefi ve ark., 2017; Ayata ve ark., 2017).

Canlıların taksonomik çeşitliliğine ilişkin bilgiler, coğrafik alanlarda tür çeşitliliğini ve yapılan çalışmaları anlamak için çok önemlidir. Mitokondri DNA'sının bir bölgesinden elde edilen gen bölgesinin dizilerinden oluşturulan gen ağaçlarında, belirli coğrafi bölgelerden bireyleri içeren çok sayıda kuşak belirgin bir şekilde görülebilmektedir (Lawler ve Duda, 2017).

Cyprinidae ailesi içinde bulunan bazı türlerde açık morfolojik ayırt ediciliğin olmaması ve tanımlanan türler arasında farklılıkların bulunması ve morfolojik geçişlerin varlığı nedeniyle birçok kompleks durum içermektedir. Bazı türler şu anda farklı taksonlar olarak kabul edilmektedir, ancak morfolojik karakterlerle ayırt edilmeleri genellikle zordur ve birçok tür sinonim olarak ifade edilmektedir. Cyprinidae ailesine ait barbus ve luciobarbus cinslerinin sistematığının değerlendirilmesi ve spesifik olarak farklılıklarını anlamak için Fırat Nehri'nde bulunan örneklerden moleküler verilerin incelenmesi bir gereklilik haline gelmiştir.

#### **Bu çalışmanın amacı;**

- Fırat Nehir sisteminde yaşayan cyprinidae familyasına ait Barbus ve Luciobarbus cinslerine ait türlerinden kas doku örnekleri alınarak moleküler göstergelerin kullanılmasıyla türlerin tanımlanması

- Türler arasındaki Taksonomik düzeylerin ortaya konulması
- Ekonomik değeri olan bu türlerin kültür ortamında yetiştirilebilmesi için temel bazı bilgileri ortaya koymak
- Moleküler çalışmalardaki sekans analizinin öğrenilmesi
- Bu balık türlerinin neslinin tehlike altında olması
- Literatürdeki tartışmalı türler hakkında problemlerin muhtemel çözümlerinin ortaya konulması
- İleride yapılacak birçok çalışmaya temel oluşturması amaçlanmıştır.

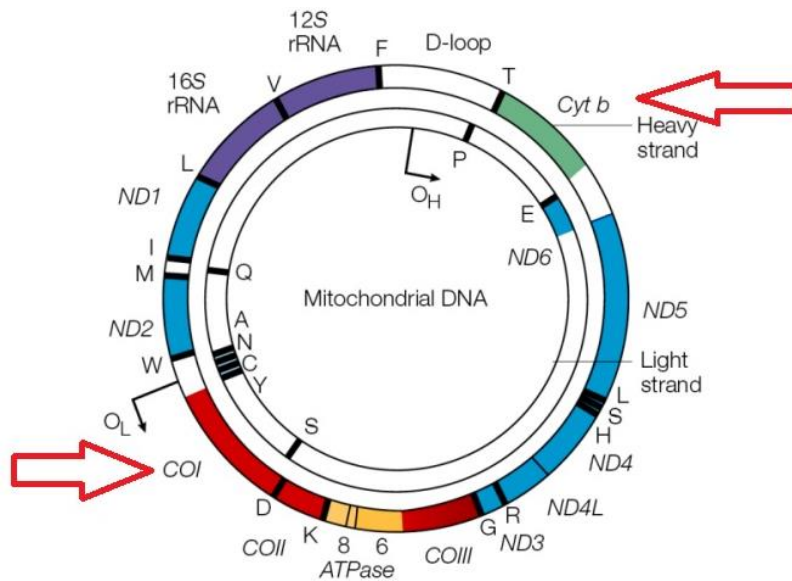
### 1.1. Mitokondriyal DNA

Mitokondriyal DNA (mtDNA) ile ilgili olarak bildiklerimiz azımsanmayacak kadar çoktur. Balıklarında içinde yer aldığı ökaryot hücre tipine sahip organizmaların çoğunda mtDNA kapalı halkasal yapıdaki çift iplikten oluşur. DNA replikasyonunda olduğu gibi mtDNA replikasyonunda yarı korunumlu olarak gerçekleşir. Ancak çekirdek DNA'sı gibi protein sentezi ile çok ilişkili değildir. mtDNA'da 2 rRNA, 22 tRNA ve oksijenli solunumda görevli olan 13 polipeptid kodlayan toplam 37 gen olduğu belirtilmektedir. Ökaryot hücre tipine sahip olup mtDNA'sı doğrusal olan canlılarda vardır. Örneğin bazı silli tek hücreliler. mtDNA, çekirdek DNA'sından çok daha küçük bir yapıya sahiptir. mtDNA replikasyonu prokaryot DNA replikasyonunda olduğu gibi tek bir replikasyon orjininden başlayarak devam eder. mtDNA'nın büyüklüğü canlılar arasında değişiklik gösterir. Genellikle hayvanlar aleminde mtDNA büyüklüğü 16000 ile 18000 bp arasındadır. Maya mantarlarında 75000 bp iken bitkilerde bu miktar çok daha fazladır. Omurgalı hayvanlarda mitokondri organeli başına 5-10 DNA molekülü varken bitkilerde 20-40 DNA molekülü vardır. Maternal kalıtım gösteren mtDNA arasındaki farklılıklar yalnızca mutasyonlar ile ortaya çıkmaktadır. Canlı gruplarındaki bazı istisnalar dışında mtDNA'sında intron bölgeleri yoktur. mtDNA replikasyonu çekirdek tarafından kodlanan enzimlerce yapılır. mtDNA yumurtada bulunup anneden kalıtıldığı için annenin köken sonucunu verir. Bu sebeple mtDNA'dan çıkarılan sonuçlar canlının bütün genom kökenini yorumlamakta kullanılmaz. mtDNA canlı kökenlerinin belirlenmesi, göç yollarının çıkarılması, adli tıp, kanser araştırmaları gibi birçok

çalışma alanında kullanılmaktadır (Klug ve ark., 2009; Rokas ve ark., 2003; Başaran, 2004; Brown, 1985; Bruford ve ark., 2003; Engstrom ve ark., 2007; Avise, 2004).

## 1.2. Neden mtCOI ve cyt-b Genleri?

Çalışmada neden mitokondriyal DNA'nın COI (sitokrom oksidaz I) ve sitokrom b (cytb) kullandığımızı belirtecek olursak; Mitokondriyal DNA'da bulunan Sitokrom oksidaz I (COI) ve sitokrom b (cyt-b) genleri en fazla korunan genlerdir. Ayrıca nükleotit substitüsyon (nokta mutasyonu) oranının yakın türler ve aynı türde bulunan farklı popülasyonlarda bile ayırmaya yetecek çözünürlüğe sahip olması, haploid kalıtılması, mayoz bölünme geçiremediği için sınırlı rekombinasyona sahip olması, çalışılacak doku örneği sınırlı olsa bile her hücrede birkaç mitokondri ve her bir mitokondride nispeten bol miktarda genomik kopyasının bulunması, gene ait evrensel primerlerin oldukça korunmuş olması ve kriptik türlerinin belirlenmesinde verimli bir şekilde kullanıldığı çok sayıda çalışma ile rapor edilmesi (Carvalho ve Pitcher, 1995; Gray ve ark., 1999; Avise, 2004; Engstrom ve ark., 2007; Lazarova ve ark., 2006; Croos ve Palsen, 2010; Keskin ve Atar, 2012; Keskin ve Atar, 2013; Bucklin ve ark., 2011) şeklinde sıralabilir. Mitokondriyal DNA ve çalıştığımız gen bölgeleri Şekil.1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Mitokondriyal DNA

### 1.3. PCR Tekniği

PCR tekniği biyoteknoloji çalışmalarının en temel tekniklerinden biri olarak gösterilmektedir. PCR tekniği ile araştırmacılar birçok avantaj elde etmektedirler. Bu avantajların başında; in vitro şartlarda yok denecek kadar az olan DNA dizilerinin bir çok kopyası yapılabilmesi, çok kısa sürede PCR sonuçlarının elde etmesi, sonuçların doğruluğunun hızlı bir şekilde değerlendirilmesi ile hata oranının azaltılması ve tekrarlanabilir olması sayılabilir. PCR, 1985 yılında ilk kez Karry Mullis adındaki araştırmacı tarafından çalışılmış ve canlı kalıtsal materyallerinin incelemeleriyle moleküler biyoloji alanındaki çalışmalar için önemli bir teknoloji oluşturmuştur. Kısacası PCR, in vitro şartlarda canlıya ait ana DNA üzerinde bulunan hedef genin tekrar eden çeşitli reaksiyon döngüleriyle, enzimler kullanılarak çoğaltılmaya yarayan özel bir tekniktir. Yapılacak PCR döngüleri, reaksiyona eklenen karışımların belirli sıcaklıklar arasındaki geçişler ile tamamlanır. Reaksiyonlar hangi sıcaklıkta ne kadar süre ve kaç döngü olacağı thermal cycler cihazına yüklenerek yapılmaktadır (Klug ve ark., 2009; Uzmay, 2019).

PCR işlemi 3 aşamada yapılır. Kopyalanmak istenen DNA miktarı bu aşamaların tekrarıyla belirlenir.

1. Aşama: Çoğaltılmak istenen DNA yüksek sıcaklığa (90-95 °C) yaklaşık 5 dakika maruz bırakılıp denatürasyonu sağlanarak tek zincirli hale getirilir.
2. Aşama: Cihazda sıcaklık 50-70 °C arasına düşürülerek hedef DNA'nın uçlarına komplementer olan 15-30 nükleotitlik primerlerin çoğaltılacak tek zincirli olan DNA'ya bağlanması sağlanır. DNA'ya bağlanan primer parçaları çalışılan DNA'nın sentezlenmesi için başlangıç kısmı olarak görev alırlar.
3. Aşama: DNA replikasyonunda görevli olan ve yüksek ısıya dayanabilen Taq polimeraz enzimi reaksiyona katılır ve DNA replikasyonu 70-75 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Yüksek ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi ortamda bulunan serbest nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleme yaparak uzamayı

sağlar. Böylece istenen DNA'nın çift zincirli yeni kopyalarını meydana getirir. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA çift ipliği sayısını her döngü için iki katına çıkmasını sağlar. Eski DNA zincirleriyle birlikte oluşan yeni zincirlerde sonraki aşamalarda kalıp olarak kullanıldığı için PCR bir zincir reaksiyonudur. Ortalama 5 dakikalık döngü çok defa tekrarlanarak 3 saatten kısa bir sürede 25-30 döngü gerçekleşir ve çoğaltılmak istenen DNA'nın miktarı milyonlarca kat artar (Klug ve ark., 2009).

#### 1.4. Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez; oluşturduğu elektrik alanı etkisiyle karışımlarda bulunan molekülleri molekül büyüklüğü esasına dayanarak ayırma yöntemidir. Jel elektroforezi molekül büyüklüğüne bağlı olarak jel matrisinde bulunan gözeneklere dayalı olarak çalışır. Gözeneklerde büyük moleküller küçük olanlara göre daha fazla tutulur. Jel elektroforezinde bantlar oluşur. Oluşan bu bantlar nükleotitlere bağlanan floresan bir boya ile boyanır. Jel elektroforezi ile nükleik asit ve proteinlerin miktar ve monomer çeşitleri belirlenebilmektedir (Klug ve ark., 2009).

#### 1.5. DNA Barkodlamanın Avantajları

Hızlı teşhis ve tanımlama, Teşhis edilecek canlı grubunun uzmanı olmayan kişiler tarafından da kullanılabilmesi, Ergin olmayan bireylerden ve/veya hayvanın bir dokusundan teşhisinin mümkün olması, Kriptik türleri ayırabilmesi, Basit ve güvenilir tanımlaması ve özellikle morfolojik olarak çok benzer türlerin ayrılmasında önemli avantajlar sunmaktadır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünya genelinde Cyprinidae familyasına ait türler ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Genelde Cyprinidae familyası ile ilgili ve özelde Barbus ve Luciobarbus cinslerine ait türlerle ilgili yapılan çeşitli çalışmalar kronolojik sıraya göre aşağıda verilmiştir.

Barbus cinsinin 25 farklı popülasyonunu çeşitli kemik özelliklerine göre incelenmesinin sonucunda Barbus cinslerinin Barbus ve Luciobarbus olarak iki farklı grup oluşturduğu belirmiştir (Doadrio, 1990).

Kuzey Akdeniz Havzasında bulunan Barbus türlerinin enzimatik ve nükleik asit markörlerinin karşılaştırmalı analizi yapılarak, Barbus türlerinin çeşitli evrimsel dalları ve tatlı su balık faunasının ana göç yolları araştırılmıştır (Berrebi, 1995).

Portekiz iç sularında yaşayan Leuciscus türleri arasındaki filogenetik ilişkiler Mitokondriyal DNA sit-b geni kullanılarak belirlenmiştir (Brito ve ark., 1997).

Cyprinidae familyasına ait 29 türün filogenetik ilişkileri sitokrom b gen dizileri karşılaştırılarak incelenmiş, Leuciscus cinsinin parafiletik (ortak atası bilinen ancak torunları henüz keşfedilmemiş) olduğu belirlenmiştir. Özellikle cyrinid türlerinin hibriditasyonu sorununa değinilmiştir (Briolay, 1998).

Cyprinidae familyasına ait 106 taksonun filogenetik ilişkileri, mitokondriyal sitokrom b geninin tam nükleotid sekansına (1140 bp) dayanarak belirlenmiş olup bu çalışma; Moleküler filogeni, Cyprinidae familyasının mevcut sistematığını gözden geçirmek ve geleneksel sistematiğe kullanılan morfolojik karakterlerin filogenetik olarak desteklenmesini amaçlamıştır (Zardoya ve Doadrio, 1999).

Cyprinidae familyasına ait 35 türün mitokondriyal kontrol bölgesi kullanılarak elde edilen verilerin daha önce kullanılan sitokrom b ve 16S rDNA verilerine göre daha doğru ve sağlam olduğu belirtilmiştir (Gilles ve ark., 2001).

Orta Doğu ve komşu biyocoğrafik alanlardan toplanan Cyprinidae familyasına ait 62 tür tam sitokrom b geni (1140 bp) kullanılarak filogenetik analizleri yapılmış ve diğer bazı bölgelerdeki balıklarla akrabalık ilişkileri araştırılmıştır (Durand ve ark., 2002).

Akdeniz çevresindeki tatlı sularda bulunan 64 Barbus türünün filogenetik ilişkileri sitokrom b sekansları kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bu türlerin Barbus ve Luciobarbus olmak üzere iki ana soya ait olduğu belirlenmiştir (Tsigenopoulos ve ark., 2003).

Karadeniz Bölgesinde bulunan akarsulardaki Barbus balıklarının filocoğrafyasını değerlendirmek amacıyla mitokondriyal sitokrom b geni kullanılarak DNA dizi analizi yapılmıştır (Kotlik ve ark., 2004).

Asi Nehri'ndeki Barbus cinsine bazı türlerin sitogenetik analizinin yapılmasıyla kromozom sayıları çıkarılmıştır. Bu çalışmada incelenen balıkların içerdiği diploid (2n) kromozom sayıları; *Barbus rajanorum*un kromozom sayısı 2n=125, *Barbus longiceps*'tin 2n=148 ve *Barbus capito pectoralis*'te 2n= 150 bildirilmiştir (Turan ve ark., 2005).

Rize ve Artvin akarsularında 238 *Barbus tauricus* örneğinin morfolojik olarak özellikleri incelenmiş ve aralarındaki farklılıklara bakılmıştır (Verep ve ark., 2006).

Atatürk Baraj Gölü'nde yaşayan *Arabibarbus grypus* (*Tor grypus*) türünün bazı biyolojik özellikleri ile büyüme ve üreme özellikleri çalışılmıştır (Doğan, 2007).

Barbus türlerinde yapılan çalışma ile sitokrom b primerleri geliştirilmiş, bu primerlerin populasyon ve tür düzeyinde yararlı olduğu ve diğer Cyprinidae familyası türlerinde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Gante ve ark., 2008).

Atatürk Baraj Gölü'ndeki *Luciobarbus mystaceus* türünün eşey dağılımı, yaş, ağırlık ve boy ilişkileri ile yumurta verimi gibi bazı biyolojik özellikleri çalışılmıştır (Dörtbudak, 2010).

Elazığ Keban Baraj Gölü'nde *Luciobarbus esocinus* türünün eşey dağılımı, yaş, ağırlık, boy, yumurta verimi gibi bazı biyolojik özellikleri çalışılmıştır (Çoban ve ark., 2012).

Capoeta, Luciobarbus ve Barbus cinslerinin filogenetik ilişkisi incelenmiş evrimsel filogenisini incelemişlerdir. Capoeta'nın Luciobarbus cinsi içinde bir monofiletik grup olduğu ilk kez ortaya koyulmuştur (Levin ve ark., 2012).

Faddagh, M. S. 2016'da Irak sularındaki *Luciobarbus xanthopterus*'un genetik çeşitliliğini ortaya çıkarmak için çalışma yapmıştır (Faddagh, 2016).

Barbus cinsi Cyprinidae familyasında bulunan bir gruptur. Barbus cinsine ait olan türler birbirinden farklı boylara sahiptir. Bu nedenle sistematik olarak çok fazla karışıklık yaşanmaktadır. Barbus cinsi ile Luciobarbus, Carasobarbus, Arabibarbus cinsleri yakın zamanda farklı cinsler olarak ayrılmıştır. Bu nedenle bu türlerin isimlendirilmesinde genellikle çelişkiler yaşanmaktadır (Korkmaz, 2017).

Türkiye'deki Barbus cinsine ait türlerle ilgili olarak sistematığın açığa kavuşturulması amacıyla filogenetik analizleri, metrik ve meristik ölçümleri, radyografi görüntüleri alınarak türler arası ve tür içi varyasyonlarının belirlenmesi amacıyla çalışma yapılmıştır (Korkmaz, 2017).

Fırat ve Dicle nehirlerinde yaşayan *Barbus grypus* (Heckel, 1843) populasyonlarındaki genetik çeşitlilik mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz alt

ünite I (mtDNA COI) gen bölgesinin dizi analizleri bakılarak yapılmıştır (Parmaksız ve ark., 2017).

*Luciobarbus esocinus* türünün proteinlerinin patates ve mısır cipsine eklenmesi ile besin içeriğinin zenginleştirilebileceği ortaya konmuştur (Kuzgun, 2017).

Keban Baraj Gölü ve Karakaya Baraj Göllerinde bulunan *Luciobarbus xanthopterus* ve *Luciobarbus esocinus* türlerinde ağır metal miktarları birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Düşükcan ark., 2014, 2017).

Keban Baraj Gölü’nde yaşayan *Luciobarbus esocinus* türünün dişi ve erkek bireylerinde karşılaştırmalı olarak bazı iç organlar ve kas dokularında oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ile, A, E, C vitaminleri ve  $\beta$ -karoten seviyeleri araştırılmıştır (Barata ve ark., 2017).

Keban Baraj Gölü Kemaliye Bölgesinde ekonomik değere sahip olan *Luciobarbus xanthopterus* ve *Luciobarbus esocinus* türlerinin yıllık verimlilikleri tespit edilmiştir (Karlıdağ ve Duman, 2018).

Fırat ve Dicle’de endemik olarak bulunan *Arabibarbus grypus* popülasyonlarının genetik çeşitliliği sitokrom b geni kullanılarak belirlenmiştir (Parmaksız ve Şeker, 2018).

Abbasi Dehkord, A. ve arkadaşları 2018’de İran sazanları olarak isimlendirilen ve doğada iyi gelişim gösteren *Luciobarbus esocinus*, *L. schejch*, *L. Xanthopterus* ve *Tor grypus* gibi bazı türlerin mitokondriyal durumunu araştırmışlardır. Bu çalışmada sitokrom oksidaz alt birim (COI) gen dizileri kullanılarak bu balıkların genetik barkodu hazırlanmıştır (Abbasi ve ark., 2018).

Fırat ve Dicle nehir sistemlerinde bulunan *Achantobrama marmid* (Heckel, 1843)’in genetik çeşitliliği mtDNA cyt b bölgesine bakılarak çıkarılmış ve önemli bir veri seti oluşturulmuştur (Parmaksız ve Altundağ, 2018).

Irak'taki Al-Diwaniya Nehri'nde bulunan *Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843)'nin bazı biyolojik özellikleri incelenmiş ve *Arabibarbus grypus*'un su bitkileri, böcek ve alglerle beslenen omnivor bir tür olduğu belirtilmiştir (Al Jubouri ve Mohamed, 2019).

Fırat nehrinde bulunan *Arabibarbus grypus*'un içerdiği amino asit durumu analiz edilmiştir (Palalı, 2019).

Balık vücudunda çevresel stresle ilgili çalışmaların temeli, büyüme hızı hayatta kalma ve kan parametreleri düzeyidir. Aga mohammad ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre Şabut (*Arabibarbus grypus*)'un farklı tuzluluk seviyelerine sahip sulara uygun büyüme ve hayatta kalma durumu ile fizyolojik toleransı belirlenmiş ve tuzluluk stresinin kan parametreleri üzerindeki etkisini araştırılmıştır (Aga mohammad ve ark.,2019).

Karakaya Baraj Gölü'nde avlanan balık türleri ve miktarları ile yıllık balık verimlilikleri tespit edilmiştir (Dartay, 2019).

Keban Baraj Gölü'nde *Luciobarbus mystaceus* (Pallas, 1814) ve *Luciobarbus esocinus* (Heckel, 1843) türlerinde bulunan parazitler belirlenmiştir (Aktürk ve ark., 2020).

Asi Nehrinde bulunan *Luciobarbus pectoralis* türünün büyüme ve stok durumunu belirlemek amacıyla boy-ağırlık ve boy-boy ilişkileri tespit edilmiştir (Ergüden, 2020).

*Arabibarbus grypus*'un larval dönemden itibaren morfolojik değişiklikleri incelenmiş ve balığın gösterdiği gelişim, pigmentleşme ve avlanma becerileri ele alınmıştır (Soleimanian ve ark, 2021).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma materyalini oluşturan Barbus cinsine ait bireyler, 2020-2021 yıllarında Adıyaman/Merkez, Adıyaman/ Kahta, Adıyaman/Samsat, Şanlıurfa/Bozova, Şanlıurfa/Hilvan ve Şanlıurfa/Siverek'te balıkçı tezgahları ve yöre balıkçı teknelerinden alınmıştır (Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Balıkçılardan analiz edilmek üzere alınan *Luciobarbus xantopterus* türü.



Şekil 3.2. Balıkçılardan alınan balıklar

### 3.1. Çalışma Materyali Olan Balıkların Sistematikteki Yeri

İncelediğimiz balıkların sistematikteki yeri, Çiçek ve ark. (2020) ye göre aşağıda verilmiştir. Ayrıca balıkların endemiklik durumu ve IUCN Kırmızı Liste kriterlerine göre tür sayısı bakımından koruma durumları da yanlarında parantez içinde belirtilmiştir.

**Alem:** Animalia

**Şube:** Chordata

**Alt Şube:** Gnathostomata

**Üst sınıf:** Pisces

**Sınıf:** Osteichthyes

**Altsınıf:** Actinopterygii

**Üst takım:** Teleostei

**Takım:** Cypriniformes

**Alttakım:** Cyprinoidei

**Familiya:** Cyprinidae (Rafinesque, 1815)

**Altfamiliya:** Barbinae (Bleeker, 1859)

**Cins:** Barbus

**Tür-1:** *Barbus lacerta* (Heckel, 1843). Endemik Değil-(LC), Lizard barbel/Bıyıklı balık

**Tür-2:** *Luciobarbus esocinus* (Heckel, 1843).Endemik Değil-(VU) Pike barbel

**Tür-3:** *Luciobarbus kersin* (Heckel, 1843).Endemik Değil- (DD) Kersin barbel/ Kersin balığı

**Tür-4:** *Luciobarbus xanthopterus* (Heckel, 1843). Endemik Değil-(VU), Maya balığı

**Alt Familya:** Torinae (Karaman, 1971)

**Cins:** Tor

**Tür-1:** *Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843). Endemik Değil-(VU), Shabout/Şaput, şabot

**Tür-2:** *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843). Endemik Değil-(LC), Bizir

### **IUCN Kırmızı Liste kriterlerine göre tür sayısı bakımından çalıştığımız balıkların koruma durumları**

Çizelge 3.1. IUCN (International Union for Conservation of Nature) verilerine göre koruma durumları

|                                 |
|---------------------------------|
| <b>VU = Zarar Görebilir</b>     |
| <b>LC = En Az Endişe Verici</b> |
| <b>DD = Veri Yetersiz</b>       |

Çizelge 3.1.'de çalışılan türlerin IUCN (International Union for Conservation of Nature) verilerine göre koruma durumları verilmiştir. Buna göre; *Luciobarbus esocinus*, *Luciobarbus xanthopterus* ve *Arabibarbus grypus* türleri IUCN verilerine göre Zarar görebilecek olan hassas türlerdir.

## **3.2. Çalışmada Kullanılan Balıklar**

### **3.2.1. Arabibarbus grypus (Gray, 1883)**

İlk bulunuş yeri: Dicle (Musul)

Türkçe isim: Bıyıklı balık, Şaput

Sinonimleri: *Barbus grypus* Heckel, 1843, *Labeobarbus kotschy* Heckel, 1843, *Barbus kotschy*, Gunther 1874



Şekil 3.3. *Arabibarbus grypus*'un genel vücut görünümü (Orjinal)

### 3.2.2. *Carasobarbus luteus* (Karaman, 1971)

İlk bulunuş yeri: Asi nehri

Türkçe isim: Bizir

Sinonimleri: *Systomus luteus* Heckel 1843, *Systomus albus* Heckel 1843, *Barynotus luteus* Gunther 1874, *Barbus luteus* Berg 1949



Şekil 3.4. *Carasobarbus luteus*'un genel vücut görünümü (Orjinal)

### 3.2.3. *Barbus lacerta* (Heckel, 1843)

İlk bulunuş yeri: Halep

Türkçe isim: Bıyıklı balık

Sinonimleri: *Barbus plebejus lacerta* Heckel, 1843, *Barbus scincus* Heckel, 1843, *Barbus cyri* De Filippi, 1865, *Barbus caucasi* Kessler, 1877, *Barbus angustatus* Kamensky, 1899, *Barbus armenicus* Kamensky, 1899, *Barbus bortschalinicus* Kamensky, 1899, *Barbus sursunicus* Kamensky, 1899, *Barbus toporovanicus* Kamensky, 1899.



Şekil 3.5. *Barbus lacerta*'nın genel vücut görünümü (Orjinal)

### 3.2.4. *Luciobarbus xanthopterus* (küpeli)

İlk bulunuş yeri: Halep

Türkçe: küpeli, kersit



Şekil 3.6. *Luciobarbus xantopterus* 'un genel vücut görünümü (Orjinal)

### 3.2.5. *Luciobarbus esocinus* (Turna)



Şekil 3.7. *Luciobarbus esocinus* 'un genel vücut görünümü (Orjinal)

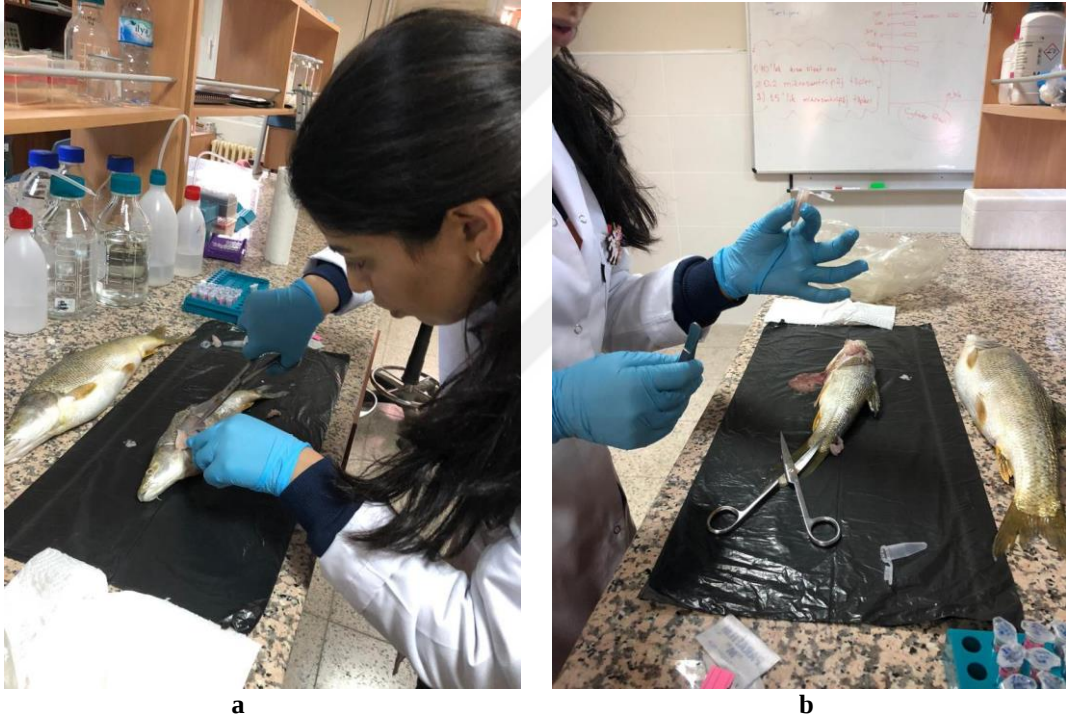
### 3.2.6. *Luciobarbus kersin*



Şekil 3.8. *Luciobarbus kersin* 'in genel vücut görünümü (Orjinal)

### 3.3. Balık Örneklerinin Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan balıklar balıkçılardan alındıktan sonra soğuk zincir yoluyla Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan laboratuvara getirilmiştir. Örneklerin bir kısmı soğuk zincir yoluyla laboratuvara getirilmiş ve bir kısımda arazide örneklenmiştir (Şekil 3.9). Örnekleme pektoral yüzgeçlerinin bağlandığı kas doku ve çevre kaslardan bir miktar kas dokusu steril bir makas yardımıyla alınarak % 96 etil alkol eklenmiş 1.5 ml ependorf tüplere konmuş ve izolasyon sürecine kadara +4 °C’de buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3.9. Balıklardan kas dokunun alınması (a) ve ependorf tüplere koyulması (b)

### 3.4. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada yapılan DNA Ekstraksiyonu; Thermo Scientific Gene JET Genomic DNA Purification Kit’i kullanılarak yapılmıştır. Üretici firmadan temin edilen kitte bulunan protokol çalışmaya en uygun şekilde kullanılarak DNA’ları elde edilmiştir. Kit protokolü aslına uygun olarak aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

Hassas terazide balıklardan alınan kas örnekleri peçete ile kurutulduktan sonra 20 mg olarak tartılmıştır. Daha sonra kas örneği olan doku saf suda bekletilmiş ve tekrar kurutulup buz kalıbı üzerinde doku dövme işlemi yapılarak doku iyice parçalanmıştır. Parçalanmış doku 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne (Isolab ETTP0003) konulup üzerine 180 µl Digestion solüsyon ve 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra pipetleme işlemi yapılarak 15-30 dakika vorteks cihazında homojen bir karışım haline gelmesi sağlanmıştır. Homojen hale getirilen doku 56 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında vorteks veya 37 °C'ye ayarlanmış su banyosu kullanılmıştır. Elde edilen karışıma 20 µl RNase eklenerek tekrar vortekslenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 200 µl Lysis Solution eklenerek 15 saniye vorteksleme işlemi yapılmış ve yarım saat buz üzerinde örnekler bekletilmiştir. Üzerine 400 µl % 50 Ethanol eklenip, pipetlenerek vorteksleme işlemi yinelenmiştir. Karışım Genomic DNA Purification Column tüpüne transfer edilerek 1 dakika 6000 devirde santrifüj yapılmıştır. Altta toplanan sıvıyla birlikte tüpte atılmıştır. 2 ml'lik tüpe Genejet Genomic DNA Purification Colomu yerleştirilmiştir. Her kullanımda kapak sıkıca kapatılmıştır. 500 µl Wash Buffer I eklenerek 1 dakika 8000 devirde santrifüjlenmiş ve altta kalan sıvı dökülmüştür. Daha sonra 500 µl Wash Buffer II eklenmiş ve 3 dakika 12000 devirde santrifüjlenmiştir. Column yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarılmıştır. 200 µl Elution Buffer column'un merkezine dökülerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında 1 dakika 8000 devirde santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Purification column'u atılarak Purifiye DNA -20 °C 'ye konulmuştur.

### 3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Uygulaması

PCR işlemi Klug ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle göre 3 aşamada yapıldı. Kopyalamak istediğimiz DNA miktarı bu aşamaların tekrarıyla belirlenmiştir.

1. Aşama: Çoğaltılmak istenen DNA yüksek sıcaklığa (90-95 °C) yaklaşık 5 dakika maruz bırakılıp denatürasyonu sağlanarak tek zincirli hale getirilir.

2. Aşama: Cihazda sıcaklık 50-70 °C arasına düşürülerek hedef DNA'nın uçlarına komplementer olan 15-30 nükleotitlik primerlerin çoğaltılacak tek zincirli olan DNA'ya bağlanması sağlanır. DNA'ya bağlanan primer parçaları çalışılan DNA'nın sentezlenmesi için başlangıç kısmı olarak görev alırlar.

3. Aşama: DNA replikasyonunda görevli olan ve yüksek ısıya dayanabilen Taq polimeraz enzimi reaksiyona katılır ve DNA replikasyonu 70-75 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Yüksek ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi ortamda bulunan serbest nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleme yaparak uzamayı sağlar. Böylece istenen DNA'nın çift zincirli yeni kopyalarını meydana getirir. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA çift ipliği sayısını her döngü için iki katına çıkmasını sağlar. Eski DNA zincirleriyle birlikte oluşan yeni zincirlerde sonraki aşamalarda kalıp olarak kullanıldığı için PCR bir zincir reaksiyonudur. Ortalama 5 dakikalık döngü çok defa tekrarlanarak 3 saatten kısa bir sürede 25-30 döngü gerçekleşir ve çoğaltılmak istenen DNA'nın miktarı milyonlarca kat artar (Klug ve ark., 2009).

Yaptığımız çalışmada kas örneklerindeki mtDNA COI gen bölgesini çoğaltmak için kullandığımız primerlerin dizileri Darabi ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu çalışmadan alınmıştır. Primer dizileri aşağıda verilmiştir:

**COI-625F:5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3'**

**COI-625R:5'- GAC TTC TGG GTG GCC AAA GAA TCA-3'**

Yaptığımız çalışmada kas örneklerindeki mtDNA cyt-b bölgesini çoğaltmak için kullandığımız primerlerin dizileri ise Briolay 1998 yılında yapmış olduğu çalışmadan alınmış olup aşağıda verilmiştir:

**L15267 F: 5' -GTT TGA TCC CGT TTC GTG TA-3'**

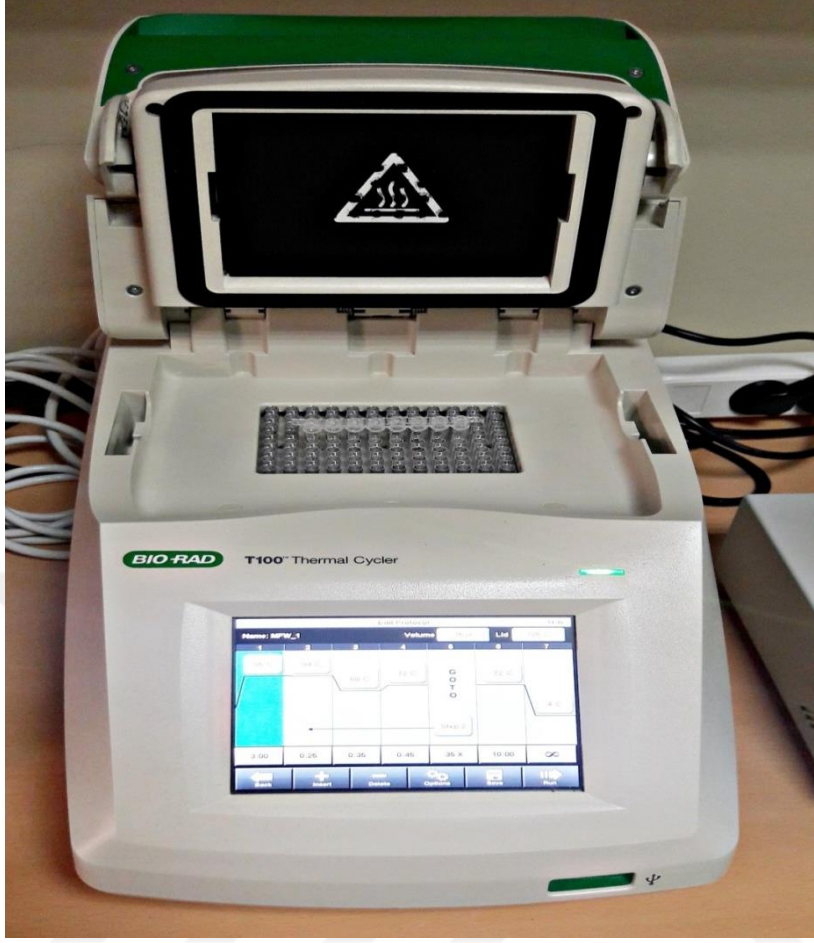
**H15891 R: 5' -AAT GAC TTG AAG AAC CAC CGT-3'**

Bu çalışmamızda PCR işlemi BIO-RAD T100™ Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada yapılan PCR koşulları sırasıyla:

1. 95 °C sıcaklıkta 3 dakika süren ilk denatürasyon,
2. 95 °C sıcaklıkta 30 saniye ikinci denatürasyon,
3. 62 °C sıcaklıkta 45 saniye süren bağlanma aşaması,
4. 72 °C sıcaklıkta 1 dakika süren uzama aşaması olmak üzere toplamda 35 döngü gerçekleştirilmiş.
5. Son olarak örnekler 72 °C sıcaklıkta 10 dakika süre tutulmuş ve işlem sonlandırılmıştır.

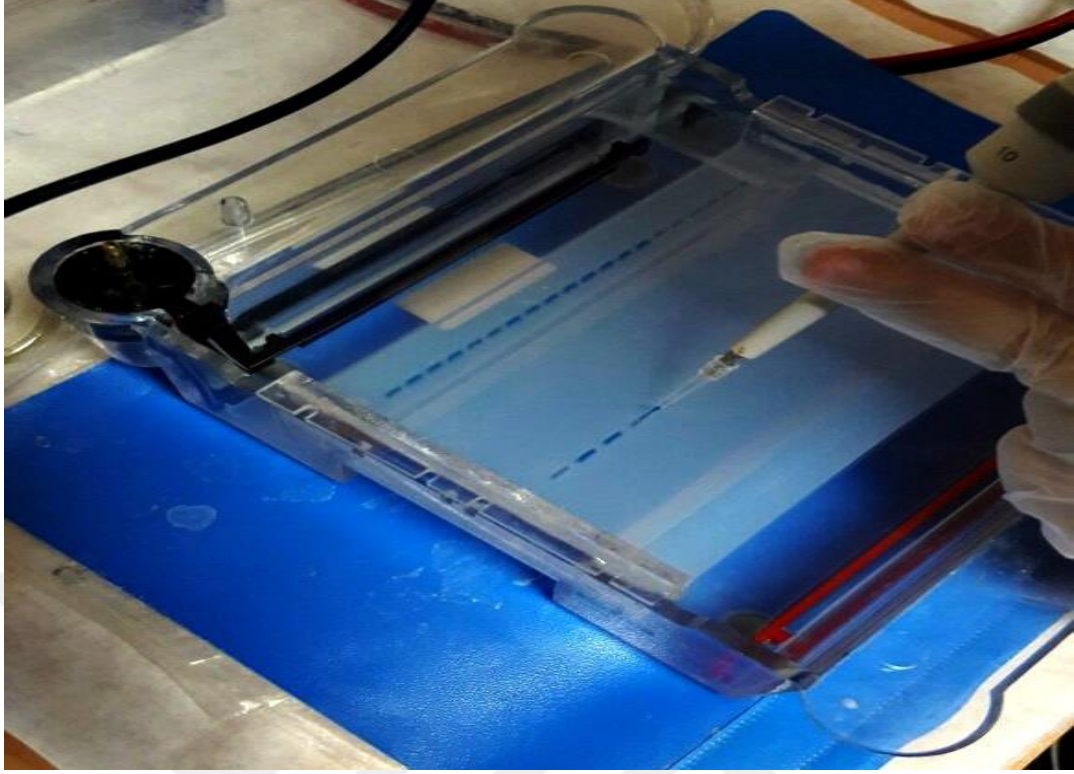
PCR cihazı ile yapılan çoğaltma işlemlerinde kullanılan DNA'nın miktarı ile kimyasalların derişimleri ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları PCR cihazında optimize edilmiştir. Çalıştığımız bölgenin çoğaltılmasında kullandığımız PCR karışımı; toplam olarak 25 µl olacak şekilde; 15.09 µl dH<sub>2</sub>O, 2.5 µl 1x PCR buffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl dNTPs, 1 µl primer (F+R), 0.1 µl Taq polimeraz ve 30 ng/µl template DNA şeklindedir. PCR basamağından sonra elde edilen ürünlerin kontrolü için % 1.5 agaroz jel kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız PCR cihazı Şekil 3.10.'da verilmiştir.



Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan PCR cihazı

### 3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel hazırlama işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Agaroz jel üstüne TBE eklenerek mikro dalgada ısıtılmış daha sonra jel'e Syber Green eklenerek tank'a aktarılmıştır. Sonrasında ise PCR ürünleri kuyucuklara yüklenmiştir. Şekil 3.11.'de PCR ürünlerinin agaroz jel kuyucuklarına yüklenmesi gösterilmiştir.



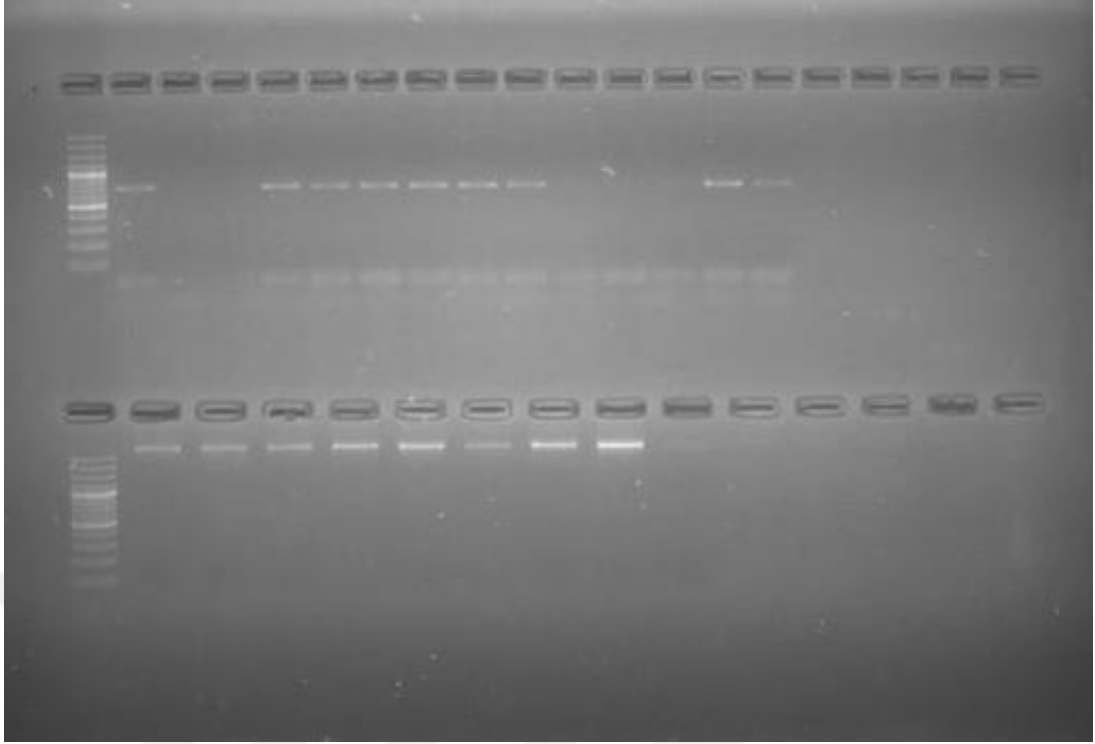
Şekil 3.11. PCR ürünlerinin agaroz jel kuyucuklarına yüklenmesi

SYBR Green eklediğimiz agaroz jeli, 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) solüsyonu içeren tanka yerleştirerek PCR’da elde ettiğimiz ürünlerimizden 2 µl kuyulara yükledikten sonra 100 V elektrik akımında 30 dakikalık süre yürüterek ultraviyole (UV) ışık veren görüntüleme cihazında görüntüledik. Şekil 3.12.’de UV görüntüleme cihazı gösterilmiştir. Böylece PCR işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir. Jelde görüntülenen örnekler, önce PCR saflaştırma işlemine tabi tutulmuş daha sonra da dizileme işlemine geçilmiştir.



Şekil 3.12. UV altında ürünler için görüntüleme cihazı

Jel fotoğrafları Biolab jel görüntüleme cihazında çekilmiş, örnek olarak çekilen bir jel görüntüsü Şekil 3.13.'te verilmiştir.



Şekil 3.13. DNA örneklerinin COI PCR sonuçları (L: Leader, bç: Baz çifti)

### 3.7. DNA Dizileme

Elde ettiğimiz PCR ürünlerini ticari firmaya göndererek 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) adlı cihazda dizi analizinin yapılması sağlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız gen bölgesinin yükseltgenmesinde yapılan PCR koşulları Çizelge 3.2.'de ve PCR için kullanılan karışımlar ise Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. mtDNA COI-625 primerinin yükseltgenmesinde uygulanan PCR koşulları

| Basamak      | Sıcaklık | Süre      | Döngü sayısı |
|--------------|----------|-----------|--------------|
| Denatürasyon | 95 °C    | 3 dakika  | 1            |
| Denatürasyon | 95 °C    | 30 saniye |              |
| Bağlanma     | 62 °C    | 45 saniye | 35           |
| Uzama        | 72 °C    | 1 dakika  | 1            |
| Final Uzama  | 72 °C    | 10 dakika |              |

Çizelge 3.2.'de verilen koşullardan önce PCR cihazında bağlanma sıcaklıkları 62 °C – 69 °C arasında ayarlanmış, döngü sayısı da 30-40 arasında ayarlanarak optimizasyonu yapılmıştır. Primerin en iyi bağlandığı ve ürünün en fazla oluştuğu

bağlanma sıcaklığının 62 °C olduğu ve döngü sayısının ise bu sıcaklıkta 35 olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.3. mtDNA COI-625 primerinin yükseltgenmesinde kullanılan PCR karışımı

| Kimyasallar          | 1x      |
|----------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O    | 15.9 µl |
| Buffer (Taq buffer)  | 2.5 µl  |
| MgCl <sub>2</sub>    | 2.0 µl  |
| Dntp                 | 0.5 µl  |
| Primer (I+G)         | 1.0 µl  |
| DNA                  | 3 µl    |
| Taq polimeraz enzimi | 0.1 µl  |
| Toplam               | 25 µl   |

Farklı derişimlerde optimizasyon gerçekleştirilmiş ve en iyi ürünün olduğu derişimlerin Çizelge 3.3.’teki gibi olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen diziler, GenBank’a (nükleotit dizileri ve protein kodlarının yer aldığı, açık erişim bir veri tabanı) yüklenmiştir. GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) tarafından sağlanmaktadır. Sadece orijinal diziler GenBank’a kabul edilir ve dizilere ait erişim numaraları (Accession Number) belirlenir. Bu çalışmada elde edilen mtDNA sekans bilgileri GenBank’a işlenerek erişim numaraları alınmıştır.

### 3.8. mtDNA COI Dizilerinin Analizi

Dizilerin analizinde öncelikle, ticari firmadan gelen mtDNA dizilerinin ham verileri Chromas-Pro v2.0.1 (Technelysium Pt Ltd) programı ile değerlendirilmiş, ileri ve ters PCR primerleri ile elde edilen mtDNA COI gen bölgesine ait diziler, BioEdit software version 7.2.5 programı ile görüntülenmiştir. Daha sonra bu dizilerin hizalaması için Clustal W çoklu dizi hizalama programı (Clustal W multiple sequence alignment program) kullanılarak hizalama işlemi yapılmıştır. Göz ile bakılarakta kontrol edilen hizalama dizileri arasındaki uzunluklara ait farklılıklar dikkate alınmış ve örneklerin başlangıç ile sonlanma kısımlarından hizalama işlemi tekralanarak diziler yapılacak analizlere hazır hale getirilmiş ve FASTA formatında kaydedilmiştir.

Çizelge 3.4. COI mega değerleri Çizelgesi

| Türler                          | <i>Luciobarbus Xanthopterus</i> |       |       | <i>Luciobarbus Kersin</i> |       |       | <i>Luciobarbus Esocinus</i> |       |       |       |       |       | <i>Barbus lacerta</i> |       | <i>Arabibarbus grypus</i> |       |       |       |       | <i>Carasobarbus luteus</i> |       |   |
|---------------------------------|---------------------------------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------------------|-------|---|
|                                 | 1                               | 2     | 3     | 1                         | 2     | 3     | 1                           | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 1                     | 2     | 1                         | 2     | 3     | 4     | 5     | 1                          | 2     | 3 |
| <i>Luciobarbus Xanthopterus</i> | 1                               |       |       |                           |       |       |                             |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 2                               | 0,000 |       |                           |       |       |                             |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 3                               | 0,000 | 0,000 |                           |       |       |                             |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
| <i>Luciobarbus Kersin</i>       | 1                               | 0,028 | 0,028 | 0,028                     |       |       |                             |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 2                               | 0,028 | 0,028 | 0,028                     | 0,000 |       |                             |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 3                               | 0,028 | 0,028 | 0,028                     | 0,000 | 0,000 |                             |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
| <i>Luciobarbus e Socinus</i>    | 1                               | 0,003 | 0,003 | 0,003                     | 0,029 | 0,029 | 0,029                       |       |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 2                               | 0,003 | 0,003 | 0,003                     | 0,028 | 0,028 | 0,028                       | 0,000 |       |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 3                               | 0,003 | 0,003 | 0,003                     | 0,028 | 0,028 | 0,028                       | 0,000 | 0,000 |       |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 4                               | 0,001 | 0,001 | 0,001                     | 0,027 | 0,027 | 0,027                       | 0,001 | 0,001 | 0,001 |       |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 5                               | 0,005 | 0,005 | 0,005                     | 0,030 | 0,030 | 0,030                       | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,003 |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 6                               | 0,001 | 0,001 | 0,001                     | 0,027 | 0,027 | 0,027                       | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,003 |       |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
| <i>Barbus Lacerta</i>           | 1                               | 0,093 | 0,093 | 0,093                     | 0,105 | 0,105 | 0,105                       | 0,094 | 0,093 | 0,093 | 0,095 | 0,091 |                       |       |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 2                               | 0,091 | 0,091 | 0,091                     | 0,103 | 0,103 | 0,103                       | 0,092 | 0,091 | 0,091 | 0,089 | 0,093 | 0,089                 | 0,003 |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
| <i>Arabibarbus Grypus</i>       | 1                               | 0,149 | 0,149 | 0,149                     | 0,132 | 0,132 | 0,132                       | 0,151 | 0,149 | 0,149 | 0,147 | 0,147 | 0,151                 | 0,153 |                           |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 2                               | 0,149 | 0,149 | 0,149                     | 0,132 | 0,132 | 0,132                       | 0,151 | 0,149 | 0,149 | 0,147 | 0,147 | 0,151                 | 0,153 | 0,000                     |       |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 3                               | 0,149 | 0,149 | 0,149                     | 0,132 | 0,132 | 0,132                       | 0,151 | 0,149 | 0,149 | 0,147 | 0,147 | 0,151                 | 0,153 | 0,000                     | 0,000 |       |       |       |                            |       |   |
|                                 | 4                               | 0,149 | 0,149 | 0,149                     | 0,132 | 0,132 | 0,132                       | 0,151 | 0,149 | 0,149 | 0,147 | 0,147 | 0,151                 | 0,153 | 0,000                     | 0,000 | 0,000 |       |       |                            |       |   |
|                                 | 5                               | 0,149 | 0,149 | 0,149                     | 0,132 | 0,132 | 0,132                       | 0,151 | 0,149 | 0,149 | 0,147 | 0,147 | 0,151                 | 0,153 | 0,000                     | 0,000 | 0,000 | 0,000 |       |                            |       |   |
| <i>Carasobarbus Luteus</i>      | 1                               | 0,160 | 0,160 | 0,160                     | 0,150 | 0,150 | 0,150                       | 0,162 | 0,160 | 0,160 | 0,158 | 0,158 | 0,158                 | 0,143 | 0,145                     | 0,061 | 0,061 | 0,061 | 0,061 |                            |       |   |
|                                 | 2                               | 0,160 | 0,160 | 0,160                     | 0,150 | 0,150 | 0,150                       | 0,162 | 0,160 | 0,160 | 0,158 | 0,158 | 0,158                 | 0,143 | 0,145                     | 0,061 | 0,061 | 0,061 | 0,061 | 0,000                      |       |   |
|                                 | 3                               | 0,160 | 0,160 | 0,160                     | 0,150 | 0,150 | 0,150                       | 0,162 | 0,160 | 0,160 | 0,158 | 0,158 | 0,158                 | 0,143 | 0,145                     | 0,061 | 0,061 | 0,061 | 0,061 | 0,000                      | 0,000 |   |

Çizelge 3.4'te mtCOI geninin mega değerleri verilmiştir. Bu değerlere göre filogenetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz filogenetik analizler K2 parametresi ile Komşu birleştirme ağacı (Neighbor Joining Tree) modeline göre MEGA X programında gerçekleştirilmiştir. Buna göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaöta nodların (ağaç kollarının) güvenilirliğini test etmek için ise Bootstrap testi (1000 tekrarlı) kullanılmıştır.

### **3.9. mtDNA İstatistik Veri Analizleri**

#### **3.9.1. Komşu birleştirme ağacı (Neighbour Joining Tree) analizi**

Türler arasındaki genetik uzaklıkların belirlenmesi için farklı metodlar kullanılabilmektedir. Bu metodlara göre de canlılar arasındaki yakınlıklar belirlenebilmektedir. Komşu Birleştirme Ağacı (Neighbour Joining Tree) canlılar arasındaki genetik mesafelerin görselleştirilmesi amacıyla çizilmektedir.

### **3.10. mtDNA Cyt-b Dizilerinin Analizi**

Dizilerin analizinde öncelikle, ticari firmadan gelen mtDNA dizilerinin ham verileri Chromas-Pro v2.0.1 (Technelysium Pt Ltd) programı ile değerlendirilmiş, ileri ve ters PCR primerleri ile elde edilen mtDNA Cyt-b gen bölgesine ait diziler, BioEdit software version 7.2.5 programı ile görüntülenmiştir. Daha sonra bu dizilerin hizalaması için Clustal W çoklu dizi hizalama programı (Clustal W multiple sequence alignment program) kullanılarak hizalama işlemi yapılmıştır. Göz ile bakılarakta kontrol edilen hizalama dizileri arasındaki uzunluklara ait farklılıklar dikkate alınmış ve örneklerin başlangıç ile sonlanma kısımlarından hizalama işlemi tekralanarak diziler yapılacak analizlere hazır hale getirilmiş ve FASTA formatında kaydedilmiştir.

Çizelge 3.5. Cyt-b mega değerleri Çizelgesi

| Tür ler                         | <i>Luciobarbus xanthopterus</i> |           |           | <i>Luciobarbus kersin</i> |           |           | <i>Luciobarbus Esocinus</i> |           |           |           | <i>Barbus lacerta</i> |           | <i>Arabibarbus Grypus</i> |           |           |           |           | <i>Carasobarbus luteus</i> |           |           |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|---------------------------|-----------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------------|-----------|-----------|
|                                 | 1                               | 2         | 3         | 1                         | 2         | 3         | 1                           | 2         | 3         | 4         | 1                     | 2         | 1                         | 2         | 3         | 4         | 5         | 1                          | 2         | 3         |
| <i>Luciobarbus xanthopterus</i> | 1                               |           |           |                           |           |           |                             |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 2                               | 0,0<br>00 |           |                           |           |           |                             |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 3                               | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |                           |           |           |                             |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
| <i>Luciobarbus kersin</i>       | 1                               | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                 |           |           |                             |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 2                               | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                 | 0,0<br>00 |           |                             |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 3                               | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |                             |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
| <i>Luciobarbus esocinus</i>     | 1                               | 0,0<br>04 | 0,0<br>04 | 0,0<br>04                 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                   |           |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 2                               | 0,0<br>04 | 0,0<br>04 | 0,0<br>04                 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                   | 0,0<br>00 |           |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 3                               | 0,0<br>04 | 0,0<br>04 | 0,0<br>04                 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                   | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |           |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 4                               | 0,0<br>04 | 0,0<br>04 | 0,0<br>04                 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43 | 0,0<br>43                   | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |                       |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
| <i>Barbus lacerta</i>           | 1                               | 0,1<br>21 | 0,1<br>21 | 0,1<br>21                 | 0,1<br>13 | 0,1<br>13 | 0,1<br>13                   | 0,1<br>18 | 0,1<br>18 | 0,1<br>18 | 0,1<br>18             |           |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 2                               | 0,1<br>13 | 0,1<br>13 | 0,1<br>13                 | 0,1<br>05 | 0,1<br>05 | 0,1<br>05                   | 0,1<br>10 | 0,1<br>10 | 0,1<br>10 | 0,1<br>10             | 0,0<br>06 |                           |           |           |           |           |                            |           |           |
| <i>Arabibarbus grypus</i>       | 1                               | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                   | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81             | 0,1<br>98 | 0,1<br>89                 |           |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 2                               | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                   | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81             | 0,1<br>98 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>00 |           |           |           |                            |           |           |
|                                 | 3                               | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                   | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81             | 0,1<br>98 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |           |           |                            |           |           |
|                                 | 4                               | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                   | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81             | 0,1<br>98 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |           |                            |           |           |
|                                 | 5                               | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78 | 0,1<br>78                   | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81             | 0,1<br>98 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |                            |           |           |
| <i>Carasobarbus luteus</i>      | 1                               | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81                 | 0,1<br>86 | 0,1<br>86 | 0,1<br>86                   | 0,1<br>83 | 0,1<br>83 | 0,1<br>83 | 0,1<br>83             | 0,1<br>92 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50                  |           |           |
|                                 | 2                               | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81                 | 0,1<br>86 | 0,1<br>86 | 0,1<br>86                   | 0,1<br>83 | 0,1<br>83 | 0,1<br>83 | 0,1<br>83             | 0,1<br>92 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50                  | 0,0<br>00 |           |
|                                 | 3                               | 0,1<br>81 | 0,1<br>81 | 0,1<br>81                 | 0,1<br>86 | 0,1<br>86 | 0,1<br>86                   | 0,1<br>83 | 0,1<br>83 | 0,1<br>83 | 0,1<br>83             | 0,1<br>92 | 0,1<br>89                 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50 | 0,0<br>50                  | 0,0<br>00 | 0,0<br>00 |

Çizelge 3.5.'te mt Cyt-b geninin mega değerleri verilmiştir. Bu değerlere göre filogenetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz filogenetik analizler K2 parametresi ile Komşu birleştirme ağacı (Neighbor Joining Tree) modeline göre MEGA X programında

gerçekleştirilmiştir. Buna göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaöta nodların (ağaç kollarının) güvenilirliğini test etmek için ise Bootstrap testi (1000 tekrarlı) kullanılmıştır.

### **3.11. mtDNA İstatistik Veri Analizleri**

#### **3.11.1. Komşu birleştirme ağacı (Neighbour Joining Tree) analizi**

Türler arasındaki genetik uzaklıkların belirlenmesi için farklı metodlar kullanılabilmektedir. Bu metodlara göre de canlılar arasındaki yakınlıklar belirlenebilmektedir. Komşu Birleştirme Ağacı (Neighbour Joining Tree) canlılar arasındaki genetik mesafelerin görselleştirilmesi amacıyla çizilmektedir.

#### 4. ARASTIRMA BULGULARI ve TARTISMA

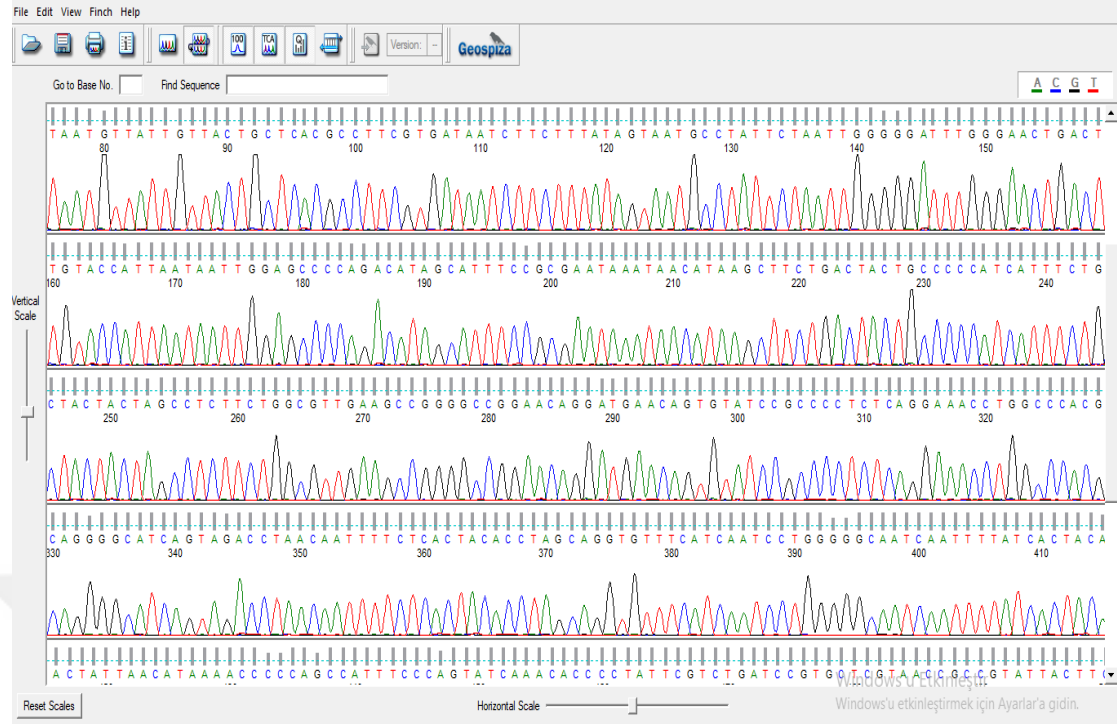
##### 4.1. Mitokondriyal COI Geni İle İlgili Bulgular

COI-625 promotor bölgesine ait 620 bp'lik bölge PCR koşullarının optimizyanundan sonra çoğaltılmıştır. PCR sonunda yükseltgenen COI-625 bölgesine ait bant varlığının gözlenmesi amacıyla % 2'lik agaroz jel kolonları hazırlanarak kullanılmıştır. SYBR Green eklediğimiz agaroz jeli, 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) solüsyonu içeren tanka yerleştirerek PCR'da elde ettiğimiz ürünlerimizden 2 µl kuyulara yükledikten sonra 100 V elektrik akımında 30 dakikalık süre yürüterek ultraviyole (UV) ışık veren görüntüleme cihazında görüntüledik.

Şekillerde her türe ait örnekleri PCR sonrasında agaroz jel üzerinde marker ile beraber yürütüp, oluşan ürünlerin ne kadar uzun olduğunu tahmin ettik. Hedef bölge ortalama 600 - 700 bp uzunluğunda olduğundan doğru bölgenin yükseltgenmiş olduğuna karar verdik. Bu işleminden sonra örnekler dizi analizine gönderilmiştir. Gelen sonuçlar Chromas-Pro bilgisayar programı kullanılarak baz cinsinden dizilere dönüştürülerek Bioedit bilgisayar programı yardımıyla bu diziler gen bankasından alınan referans dizilerle karşılaştırılmıştır.

##### 4.1.1. COI sekans görüntüsü

Şekil 4.1.'deki örnekte incelenen bireylerin gen dizilerinin analizinin sonucu Chromas-Pro bilgisayar programında elde edilen görüntüsü gösterilmiştir. Chromas-Pro programı ile elde edilen baz dizilerindeki pikler dikkatli bir şekilde incelenmiştir.

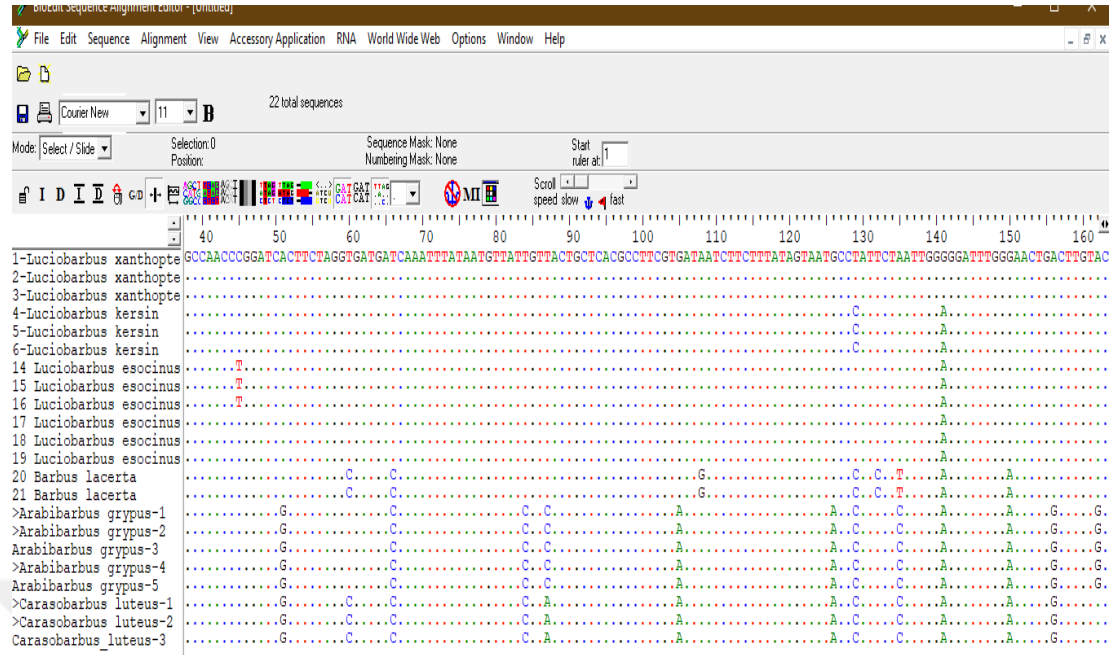


Şekil 4.1. COI sekans görüntüsü

Şekil 4. 1.'de COI bölgesine ait pikler görülmektedir. Bu piklere bakarak sekansların düzgün olup olmadığı kontrol edilerek fasta formatına dönüştürülmektedir.

#### 4.1.2. Bioedit görüntüsü

Şekil 4.2.'de incelenen bireylerin gen dizilerinin analiz sonuçları Bioedit bilgisayar programında görüntülenerek gösterilmiştir. Buna göre oluşan tüm bireylere ait sekanslar sıralanmaktadır. Bireylerin nükleotit benzerlikleri ve farklılıkları belirlenmiştir.



Şekil 4.2. COI geni Bioedit Görüntüsü

Fırat nehrinden alınan 2 Barbus ve 4 Luciobarbus türüne ait 22 örnekte yaklaşık 600-700 bp'lık mtDNA COI bölgesinin dizi analizi yapılmış ve *Luciobarbus xanthopterus* türüne göre 106 değişken bölge tespit edilmiştir. Bu bölgeye ait nükleotit farklılıkları Çizelgede gösterilmektedir.

#### 4.1.3. Mega fotoğrafı

Barbus ve Luciobarbus cinslerine ait 6 türe ait 22 farklı bireyden elde edilen COI genine ait Mega fotoğrafı Şekil 4.3.'te verilmiştir.

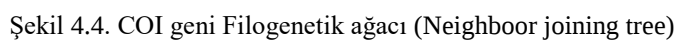
| Species/Abbrev                 | Sequence                                                                                             |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 1-Lucioibarbus_xanthopterus | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 2. 2-Lucioibarbus_xanthopterus | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 3. 3-Lucioibarbus_xanthopterus | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 4. 4-Lucioibarbus_kersin       | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 5. 5-Lucioibarbus_kersin       | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 6. 6-Lucioibarbus_kersin       | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 7. 14_Lucioibarbus_esocinus    | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 8. 15_Lucioibarbus_esocinus    | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 9. 16_Lucioibarbus_esocinus    | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 10. 17_Lucioibarbus_esocinus   | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 11. 18_Lucioibarbus_esocinus   | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 12. 19_Lucioibarbus_esocinus   | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 13. 20_Barbus_lacerta          | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 14. 21_Barbus_lacerta          | CCATTTCGTCGATCCGGT-CCTGTAACCGCGGTATTACTTCTCCATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT   |
| 15. A.grypus-1                 | TTTATTTGTCGATCCGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT  |
| 16. A.grypus-2                 | TTTATTTGTCGATCCGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT  |
| 17. A.grypus-3                 | TTTATTTGTCGATCCGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT  |
| 18. A.grypus-4                 | TTTATTTGTCGATCCGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT  |
| 19. A.grypus-5                 | TTTATTTGTCGATCCGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT  |
| 20. C.luteus-1                 | TTTATTTGTTTGATCTGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT |
| 21. C.luteus-2                 | TTTATTTGTTTGATCTGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT |
| 22. C.luteus-3                 | TTTATTTGTTTGATCTGTA-CCTGTAACCGCGGTACTGCTACTTCTATCACTACCGGTCTTAGCCGCCGGAATTACAATACCTCTAACAGACCGAAACCT |

Şekil 4.3. COI geni Mega programı fotoğrafı

Şekil 4.3.'te bütün FASTA formatındaki datalar MEGA programına aktarılmış ve MEGA programında filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.4. Filogenetik ağaç (Neighbourjoining tree)

Barbus ve Lucioibarbus cinslerine ait örneklerden elde edilen COI genine ait filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmış ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. 6 türe ait 22 farklı birey için filogenetik ağaç Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Filogenetik ağaç iki ana dala ayrılmaktadır. Barbus cinsine ait olan *Arabibarbus grypus* ve *Carasobarbus luteus*'un Lucioibarbus cinsindeki türlerden ayrıldığı görülmektedir. Lucioibarbus cinsine ait dalda ise *Barbus lacerta*'nın diğer Lucioibarbus türlerinden ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca *Lucioibarbus kersin* türünde *Lucioibarbus esocinus* ve *Lucioibarbus xanthopterus*'tan ayrıldığı belirgin bir şekilde görülmektedir.



MEGA formatında yaptığımız FASTA formatıyla filogenetik analizler komşu birleştirme ağacı şekil 4.4.'te görülmektedir. Bu ağaca göre; öncelikle türler iki kola ayrılmıştır. Bir kol üzerinde Luciobarbus ve Barbus cinsine ait türler, diğer dalda ise Carasobarbus ve Arabibarbus türleri ayrılmaktadır daha sonra ise Barbus ve Luciobarbuslar yine iki kol üzerinde ayrılmıştır. Buna göre Luciobarbus ve Barbus cinsleri birbirine daha yakın, diğerleri daha uzak akrabadır.

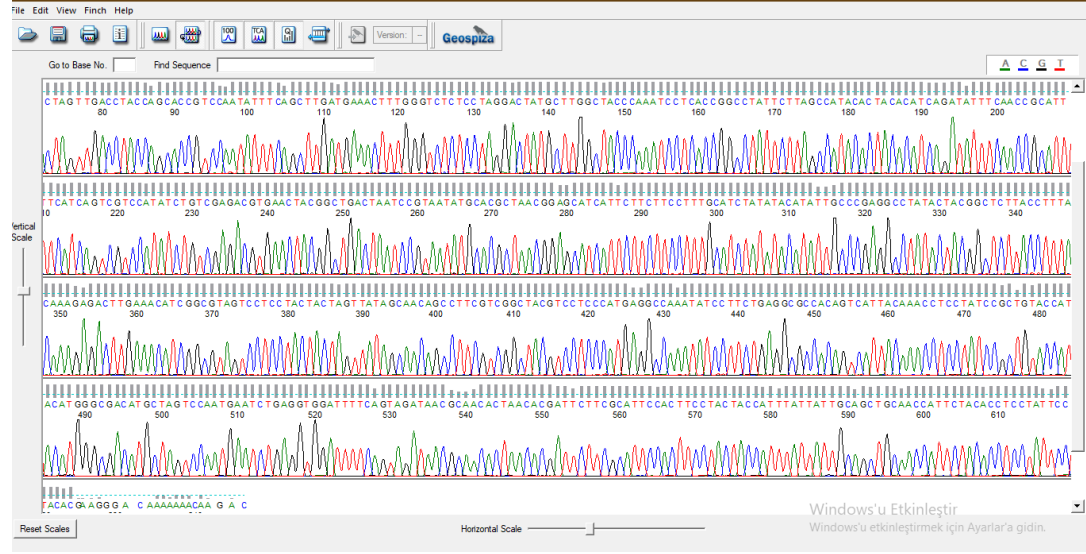
#### 4.2. Mitokondriyal Cyt b Geni İle Oluşan Sonuçlar

Cyt b gen bölgesine ait bölge PCR koşullarının optimizyanundan sonra çoğaltılmıştır. PCR sonunda yükseltgenen Cyt b gen bölgesine ait bant varlığının gözlenmesi amacıyla % 2'lik agaroz jel kolonları hazırlanarak kullanılmıştır. SYBR Green eklediğimiz agaroz jeli, 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) solüsyonu içeren tanka yerleştirerek PCR'da elde ettiğimiz ürünlerimizden 2 µl kuyulara yükledikten sonra 100 V elektrik akımında 30 dakikalık süre yürüterek ultraviyole (UV) ışık veren görüntüleme cihazında görüntüledik.

Şekillerde her türe ait örnekleri PCR sonrasında agaroz jel üzerinde marker ile beraber yürütüp, oluşan ürünlerin ne kadar uzun olduğunu tahmin ettik. Hedef bölge ortalama 200-300 bp uzunluğunda olduğundan doğru bölgenin yükseltgenmiş olduğuna karar verdik. Bu işlemten sonra örnekler dizi analizine gönderilmiştir. Gelen sonuçlar Chromas-Pro bilgisayar programı kullanılarak baz cinsinden dizilere dönüştürülerek Bioedit bilgisayar programı yardımıyla bu diziler gen bankasından alınan referans dizilerle karşılaştırılmıştır.

##### 4.2.1. Cyt b sekans görüntüsü

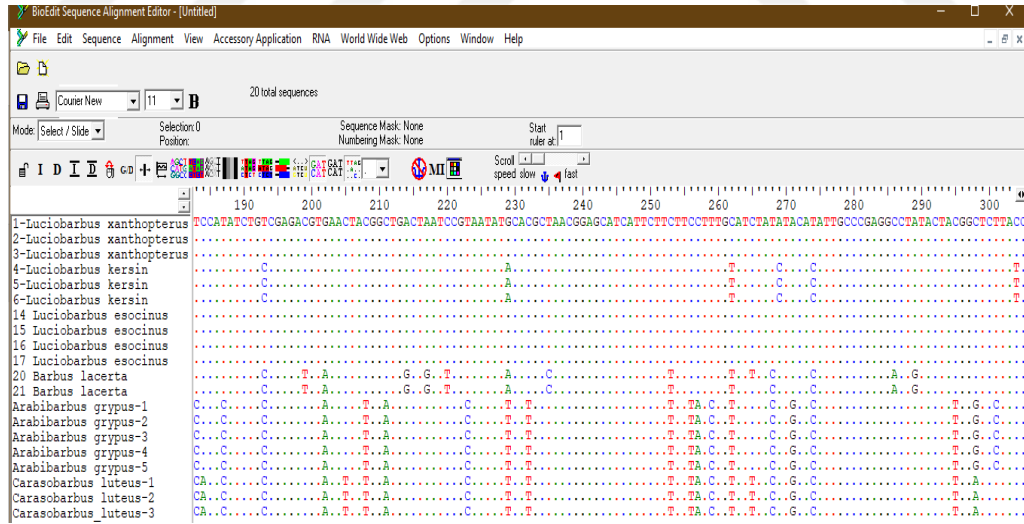
Şekil 4.5. 'te örnekte incelenen bireylerin gen dizilerinin analizinin sonucu Chromas-Pro bilgisayar programında elde edilen görüntüsü gösterilmiştir. Chromas-Pro programı ile elde edilen baz dizilerindeki pikler dikkatli bir şekilde incelenmiştir.



Şekil 4.5. Cyt b sekans görüntüsü

#### 4.2.2. Bioedit görüntüsü

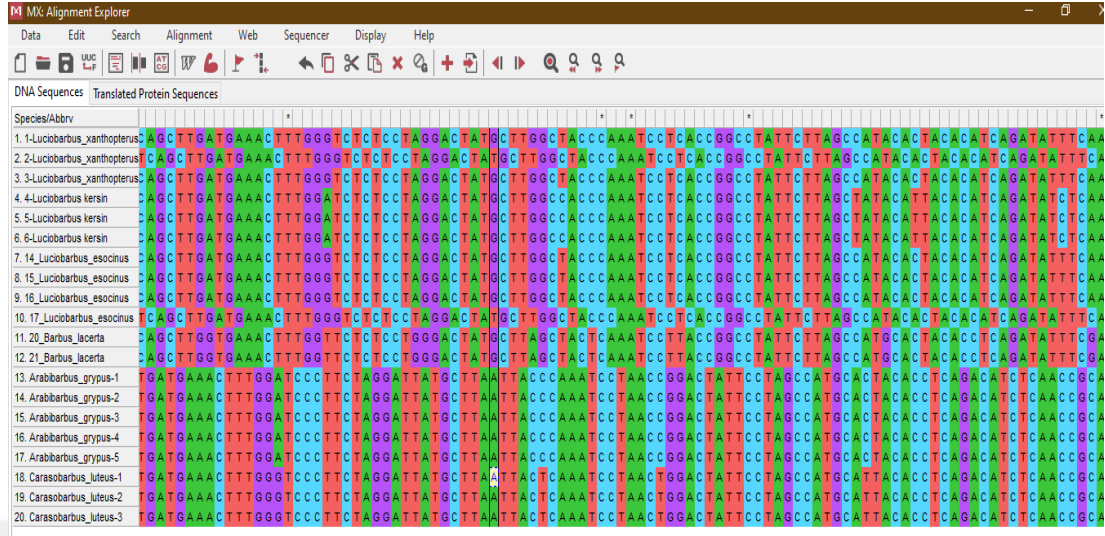
Barbus ve Lucibarbus cinslerine ait 6 türe ait 22 farklı bireyden elde edilen Cyt b genine ait Bioedit görüntüsü Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Cyt b Bioedit fotoğrafı

#### 4.2.3. Mega fotoğrafı

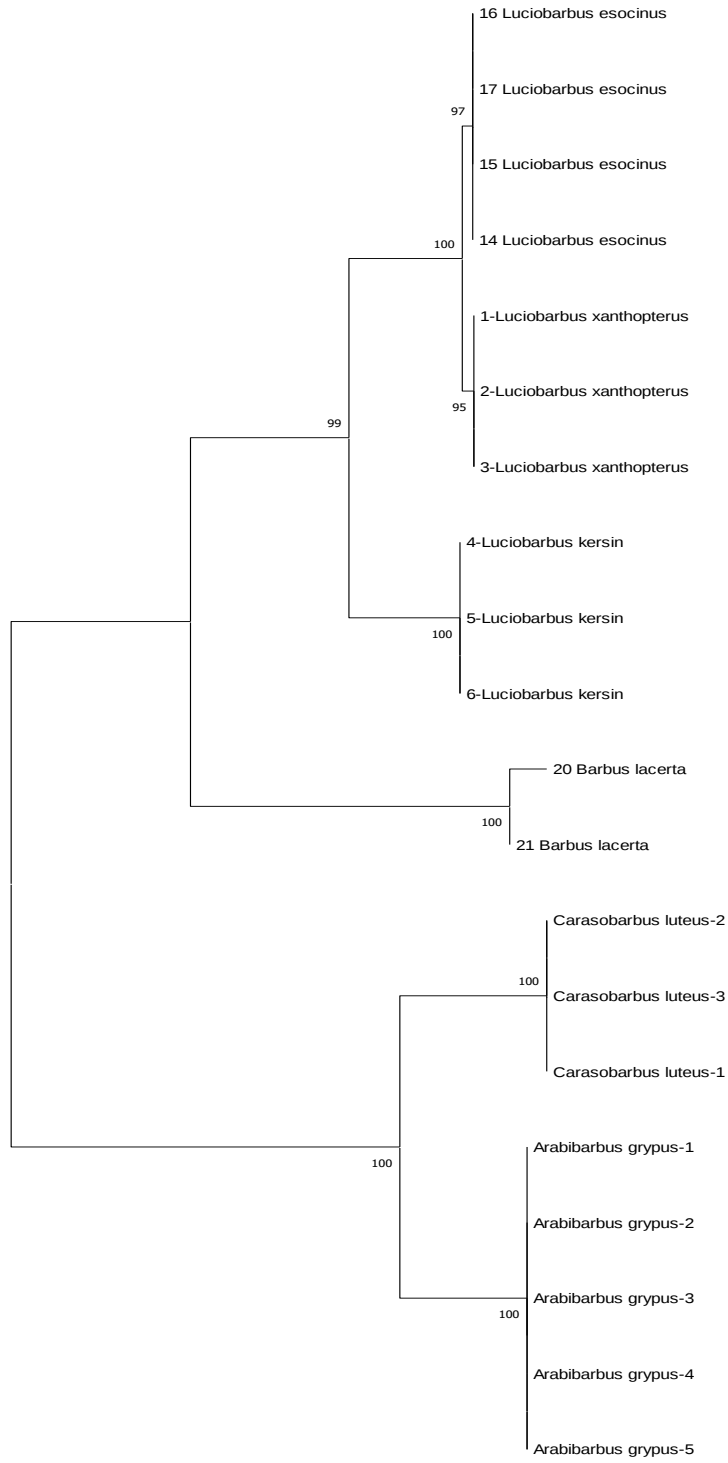
Barbus ve Lucibarbus cinslerine ait 6 türe ait 22 farklı bireyden elde edilen Cyt b genine ait Mega fotoğrafı Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Cyt b Mega fotoğrafı

#### 4.2.4. Neighbor joining

Barbus ve Luciobarbus cinslerine ait örneklerden elde edilen Cyt b genine ait filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmış ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. 6 türe ait 22 farklı birey için filogenetik ağaç Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Filogenetik ağaç iki ana dala ayrılmaktadır. Barbus cinsine ait olan *Arabibarbus grypus* ve *Carasobarbus luteus*'un Luciobarbus cinsindeki türlerden ayrıldığı görülmektedir. Luciobarbus cinsine ait dalda ise *Barbus lacerta*'nın diğer Luciobarbus türlerinden ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca *Luciobarbus kersin* türünde *Luciobarbus esocinus* ve *Luciobarbus xanthopterus*'tan ayrıldığı belirgin bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.8. Cyt b geni Filogenetik ağacı (Neighbor joining tree)

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada kullandığımız gen bölgelerini seçerken literatür taramalarında oldukça fazla karşılaşılan genlerden oluşması göz önünde bulundurulmuştur.

Populasyonlar arasındaki genetik mesafeler için COI bölgesine göre *Luciobarbus xanthopterus*, *Luciobarbus kersin*, *Arabibarbus grypus* ve *Carasobarbus luteus* türlerine ait populasyonlarda genetik farklılığa rastlanmamıştır. *Lucibarbus esocinus* ve *Barbus lacerta* türlerine ait populasyonlarda ise genetik farklılığın olduğu tespit edilmiştir. Cyt b bölgesine göre *Luciobarbus xanthopterus*, *Luciobarbus kersin*, *Arabibarbus grypus*, *Lucibarbus esocinus* ve *Carasobarbus luteus* türlerine ait populasyonlarda genetik farklılığa rastlanmamıştır. *Barbus lacerta* türlerine ait populasyonlarda ise genetik farklılığın olduğu tespit edilmiştir.

Barbus ve Luciobarbus cinslerine ait örneklerden elde edilen COI geni ve Cyt b genine ait filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmış ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. 6 türe ait 22 farklı birey için Filogenetik ağaç iki ana dala ayrılmaktadır. Barbus cinsine ait olan *Arabibarbus grypus* ve *Carasobarbus luteus*'un Luciobarbus cinsindeki türlerden ayrıldığı görülmektedir. Luciobarbus cinsine ait dalda ise *Barbus lacerta*'nın diğer Luciobarbus türlerinden ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca *Luciobarbus kersin* türünde *Luciobarbus esocinus* ve *Luciobarbus xanthopterus*'tan ayrıldığı belirgin bir şekilde görülmektedir.

### 5.1. Sonuçlar

Barbus ve Luciobarbus cinslerinde MtDNA dizi analizi yapılarak bu belirtecin kullanımı öğrenilmiştir. Barbus ve Luciobarbus cinslerine ait örneklerden elde edilen COI geni ve Cyt b genine ait filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmış ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

Elde edilen sekans verilerinin istatistiksel analizlerinin yapılması becerisi kazanılmıştır.

Bazı türlerin gen bölgesine ait diziler ilk defa tarafımızdan veri tabanına kaydedilmiştir.

## 5.2. Öneriler

Ülkemizde biyoçeşitliliğimiz ve gen kaynaklarımızın ortaya konulmasına yönelik çalışmalar geç kalınmış olmakla birlikte gittikçe artan bir hızla gerçekleştirilmektedir. Günümüzde, bu biyoçeşitliliğin önemli bir kısmını oluşturan, ekonomik ve/veya ekolojik anlamda büyük önem arz edebilen ihtiyofaunal çeşitliliğin ortaya konulmasına katkı sağlayan araştırmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada 4 Luciobarbus ve 2 Barbus türüne ait örnekler incelenmiştir. İlerki çalışmalarda tüm türler üzerinde çalışılması önerilmektedir.

Türkiyedeki diğer lokalitelerin alınıp birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir.

Sonraki çalışmalarda daha çok lokalite ve birey sayısı bakımından daha fazla bireyle çalışılmalıdır.

Bu çalışmada, balıklarda filogenetik durum ve populasyon yapısının ortaya konulmasında kullanışlılığı bilimsel olarak kanıtlanmış olan mitokondri sitokrom b ve COI genlerinin nükleotit dizilerinin analizi yoluyla Fırat nehir sisteminde Luciobarbus ve Barbus türlerinin varlığı, coğrafik dağılımı, genetik teşhisi, genetik çeşitliliği, filocoğrafyası ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir.

Türkiye'deki tüm nehir sistemlerinde dağılım gösteren Lucibarbus ve Barbus türlerine ait populasyonların tespit edilerek geçerli ve olası yeni türlerin tespiti, türlerin coğrafik dağılım haritasının çıkartılması, sınırlarımız içindeki tüm

taksonların katılımıyla genusun filocoğrafyası ve filogenetik ilişkileri aydınlatılabilir. Daha ayrıntılı ve geniş ölçekte bir arazi çalışması yapılarak bölgedeki Lucibarbus ve Barbus türlerinin dağılım hatitası çıkartılarak bölgenin jeolojik veriler ışığı altında biyocoğrafik hikâyesini yansıtan bir dağılım modelleme çalışması yapılabilir.

Lucibarbus ve Barbus genuslarındaki tür ve genetik motif mevcudiyetinin belirlenmesi ve mevcut genetik çeşitliliğin korunmasına yönelik koruma alanlarının belirlenmesi gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- ABBASI D. A., HASHEMZADEH S. A., POURIA, M., ve KHAJEH, P., 2018. *Luciobarbus esocinus*, *Luciobarbus xanthopterus*, *Tor grypus* ve *Mezopotamichthys sharpeyi* türlerinin sınıflandırma konumunun araştırılması. Balıkçılık (İran'ın Doğal Kaynakları), 71 (2), 159-166.
- AGAMOHAMMAD, P. P., MABUDI, H., and JAVADZADEH, N., 2019. The Effects of Salinity Stress on Growth Rate, Hematological Parameters and Survivability in Shirbot Fingerlings (*Arabibarbus grypus*). Journal Of Animal Physiology And Development (Quarterly Journal Of Biological Sciences) Volume 12, Number 2 (45) ; s. 13-27.
- AKTÜRK, B., ŞEKER, E., ve AYŞEGÜL, P., 2020. Keban Baraj Gölü Çemişgezek Bölgesinde (4. Bölge) Avcılığı Yapılan Balıklarda Endohelminthlerin Araştırılması. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 7(4), 1133-1138.
- AL-JUBOURI, M. O. A., and MOHAMED, A. R. M., 2019. Some Biological Aspects of Al-Shabbat *Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843) in Al-Diwanyia River, Middle of Iraq. Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, 27(2), 306-316.
- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., DE BRUIJN, M.H., COULSON, A. R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J., STADEN, R., and YOUNG, I.G., 1981. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. Nature, 90(5806): 457-465.
- AVISE, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA. 279 pp.
- AYATA, M. K., ÜNAL, S., ve GAFFAROĞLU, M., 2017. Karyotypes of *Capoeta antalyensis* (Battalgil, 1944) and *Capoeta baliki* Turan, Kottelat, Ekmekçi & İmamoğlu, 2006 (Actinopterygii, Cyprinidae). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17(2), 269-273.
- BARATA, S., ŞAHİN, H., ve KÖPRÜCÜ, S., 2017. Determination of Oxidative Stress, Vitamin A, E, C and  $\beta$ -Carotene Levels in the Tissues of *Luciobarbus esocinus* (Heckel, 1843). Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6 (2), 476-482. DOI: 10.17100/nevbittek.358601.
- BAŞARAN, A., 2004. Tıbbi biyoloji ders kitabı. Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri, 7. Baskı. Bursa. 622s.
- BEKTAŞ, Y., ÇİFTÇİ, Y., EROĞLU, O., ve BELDÜZ, A. O., 2011. Genetic discrimination of two *Capoeta* species in northeastern Anatolia, using mitochondrial 16S rRNA gene: (Osteichthyes: Cyprinidae). Zoology in the Middle East, 53(1), 61-70.
- BERREBI, P., 1995. Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics. *Biological conservation*, 72(2), 237-249.
- BİRECİKLİGİL, S., 2016. Seyhan, Ceyhan, Aşağı Fırat Ve Asi Nehir Havzalarındaki *Alburnus Rafinesque*, 1820 (Teleostei: Cyprinidae) Türlerinin Morfolojik Ve Filogenetik Analizi. Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Gaziantep, 85 s.
- BRIOLAY, J., GALTIER, N., BRITO, R. M., and BOUVET, Y. (1998). Molecular phylogeny of cyprinidae inferred from cytochrome b DNA Sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(1), 100-108.
- BRITO, R. M., BRIOLAY, J., GALTIER, N., BOUVET, Y., and COELHO, M. M. (1997). Phylogenetic Relationships within Genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in

- Portuguese Fresh Waters, Based on Mitochondrial DNA Cytochrome b Sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 8(3), 435-442.
- BROWN, W. M., 1985. The mitochondrial genome of animals. In *Molecular Evolutionary Genetics*, MacIntyre RJ, ed Plenum Press: New York, 95-130.
- BRUFORD, M. W., BRADLEY, D. G., and LUIKART, G., 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Review Genetics*, Columbia University Press, 4: 900-910.
- BUCKLIN, A., STEINKE, D., and BLANCO-BERCIAL L., 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Reviews of Marine Science*. 3:471-508.
- CARVALHO, G. R., PITCHER, T. J., 1995. *Molecular genetics in fisheries*. First edition. Chapman and Hall, London, 141s.
- CROSS, D. M., and PALSSON, S., 2010. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of white Shrimp *Fenneropenacus indicus* along the coastal belt of Sri Lanka. *Aquat Living Resour.* 23:31-532.
- ÇİÇEK, E., and SUNGUR, S., 2016. Ichthyofauna of the Turkish parts of Kura-Aras River Basin. *FishTaxa*, 1(1), 14-26.
- ÇİÇEK, E., SUNGUR, S., and FRICKE, R., 2020. Freshwater lampreys and fishes of Turkey; a revised and updated annotated checklist 2020. *Zootaxa*, 4809(2), 241-270.
- ÇOBAN, M. Z., TÜRKGÜLÜ, İ., YÜKSEL, F., CELAYİR, Y., Y, SONGÜL., EROĞLU, M., and Ş, DURSUN., 2012. Keban Baraj Gölünde Yaşayan *Luciobarbus esocinus* (Heckel, 1843)'ün Bazı Biyolojik Özellikleri. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(1), 73-80.
- DARTAY, M., 2019. Karakaya Baraj Gölü (Malatya-Türkiye) Balıkçılığının Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma. *Ecological Life Sciences*, 14(4), 93-100.
- DOADRIO, I., (1990). Phylogenetic relationships and classification of western palaearctic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Aquatic Living Resources*, 3(4), 265-282.
- DOADRIO, I., CASAL-LÓPEZ, M., and PEREA, S., 2016. Taxonomic remarks on *Barbus moulouyensis* Pellegrin, 1924 (Actinopterygii, Cyprinidae) with the description of a new species of *Luciobarbus* (Heckel, 1843) from Morocco. *Graellsia*, 72 (2): 1-24.
- DOĞAN, N., 2007. Atatürk Baraj Gölü'nde yaşayan *Tor grypous* (Heckel, 1843)'ün büyüme ve üreme özellikleri. *Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa*, 78s.
- DÖRTBUDAK, M. Y., 2010. Atatürk Baraj Gölü'nde yaşayan Bıyıklı balığın (*Luciobarbus mystaceus* (Pallas, 1814)) bazı biyolojik özellikleri/ Some biological properties of *Luciobarbus mystaceus* (Pallas, 1814) in the Atatürk Dam Lake (Doctoral dissertation). *Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa*, 93s.
- DURAND, J. D., TSIGENOPOULOS, C. S., ÜNLÜ, E., and BERREBI, P., 2002. Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA-evolutionary significance of this region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(1), 91-100.
- DÜŞÜKCAN, M., CANPOLAT, Ö., EROĞLU, M., 2017. Some heavy metals in *Luciobarbus esocinus* for public consumption and consumer protection. *Cell Mol Biology*; 63: 24-28.
- DÜŞÜKCAN, M., EROĞLU, M., CANPOLAT, O., ÇOBAN, M. Z., ÇALTA, M., GEN, D., et al., 2014. Distribution of some heavy metals in muscle tissues of *Luciobarbus xanthopterus*. *Turk J SciTechno*; 9: 37-46.

- ENGSTROM, T.N., EDWARDS, T., OSENTOSKI, M.F., MYERS, E.M., 2007. A Compendium of PCR Primers for mtDNA, Microsatellite, and Other Nuclear Loci for Freshwater Turtles and Tortoises. Chelonian Research Monograph, 4: 124-141.
- ERGÜDEN, S. A., 2020. Length-Weight and Length-Length Relationships of the Levantine Barbel *Luciobarbus pectoralis* (Heckel, 1843) in Asi River, Turkey. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 5(4), 454-459.
- EROĞLU, O., 2008. Karadeniz'in Türkiye Kıyılarında Dağılım Gösteren Mersin Balığı Türlerinin (Acipenser stellatus PALLAS, 1771, Acipenser gueldenstaedtii BRANDT, 1833, Huso huso LINNAEUS, 1758) Mitokondrial DNA Sekans Analizi Yöntemiyle Tanımlanması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 150s.
- FADDAGH, M. S., 2016. Genetic Diversity of Kattan *Luciobarbus xanthopterus* Heckel, 1843 (Pisces: Cyprinidae) in Four Mesopotamian Inland Waters, Iraq. Basrah J. Agric. Sci, 29(1), 25-33.
- FROESE, R., and PAULY, D., 2021. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2021). (Erişim Tarihi 24.12.2021).
- GANDLIN, A. A., MUSTAFAEV, N. D., YAKIMOV, A. V., and LEVIN, B. A., 2017. Updating the geographical range of Terek barbel *Barbus ciscaucasicus* (Kessler, 1877) (Cyprinidae) using the cytochrome b molecular marker. Inland water biology, 10(1), 115-119.
- GANTE, H. F., ALVES, M. J., ve DOWLING, T. E., 2008. Development of cytochrome b primers for mitotyping of barbels (*Barbus* spp.). Molecular ecology resources, 8(4), 786-789.
- GILLES, A., LECOINTRE, G., MIQUELIS, A., LOERSTCHER, M., CHAPPAZ, R., and BRUN, G., 2001. Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using the mitochondrial control region. Molecular Phylogenetics and Evolution, 19(1), 22-33.
- GRAY, M. W., BURGER, G., LANG, B. F., 1999. Mitochondrial evolution. Nature. 283:1476-1481.
- HEDAYATI, S. A., FARSANI, H. G., GERAMI, M. H., and FRICKE, R., 2018. Morphometric variations among three populations of *Alburnus zagrosensis* (Coad, 2009) in the Zagros Mountain Basin, Iran. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 88(3), 859-866.
- KARLIDAĞ, Y., ve DUMAN, E., 2018. Keban Baraj Gölü Kemaliye Bölgesinde Avlanan Balıklar ve Verimlilikleri. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 30(1), 1-6.
- KESKİN, E., ve ATAR, H. H., 2012. Türkiye'nin Akdeniz Kıyısındaki Mavi Yengeç (*Callinectes sapidus*) Populasyonları Arasındaki Genetik Farklılığın COI Gen Dizileri Kullanılarak Değerlendirilmesi. Journal of Fisheries Sciences.com., 6(2): 125-131.
- KESKİN, E., ve ATAR, H. H., 2013. DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6 (2): 01-08.
- KHAEFI, R., VATANDOUST, S., and ESMAEILI, H. R., 2017. Re-description of *Barbus miliaris* De Filippi, 1863 (Teleostei: Cyprinidae) from the endorheic Namak Lake basin of Iran. FishTaxa, 2(1), 33-42.
- KLUG, W. S., CUMMINGS, M. R., and SPENCER, C.A., 2009. Genetik Kavramlar. (8. Baskıdan çeviri). ÖNER, C., SÜMER, S., ÖNER, R., ÖĞÜŞ, A., AÇIK, L., (eds.) Palme Yayıncılık, Ankara, 2009.677 s.

- KORKMAZ, M., 2017. Türkiye’de Yayılış Gösteren *Barbus* (Pisces: Cyprinidae) Türlerinin Coğrafik Varyasyonlarının Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 107s.
- KOTLÍK, P., BOGUTSKAYA, N. G., ve EKMEKÇİ, F. G., 2004. Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology*, 13(1), 87-95.
- KUZGUN, N. K., 2017. *Luciobarbus esocinus* (Heckel 1843)’den Elde edilen balık cipslerinin besin kompozisyonu ve duyu özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 13(2), 153-162.
- LAWLER, A. J., and DUDA J. R., 2017. Molecular and morphometric data suggest the presence of a neglected species in the marine gastropod family Conidae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 109, 421-429.
- LAZAROVA, S.S., MALLOCH, G., OLIVEIRA, C. M. G., HUBSCHEN, J., and NEILSON, R., 2006. Ribosomal and mitochondrial DNA analyses of *Xiphinema americanum* group populations. *Journal of Nematology*, 38: 404-410.
- LEVIN, B. A., FREYHOF, J., LAJBNER, Z., PEREA, S., ABDOLI, A., GAFFAROĞLU, M., ... and DOADRIO, I., 2012. Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(1), 542-549.
- LEVIN, B. A., SIMONOV, E. P., ERMAKOV, O. A., LEVINA, M. A., INTERESOVA, E. A., KOVALCHUK, O. M., ... and VEKHOV, D. A., 2017. Phylogeny and phylogeography of the roaches, genus *Rutilus* (Cyprinidae), at the Eastern part of its range as inferred from mtDNA analysis. *Hydrobiologia*, 788(1), 33-46.
- MOTAMEDİ, M., MADJDZADEH, S. M., TEİMORİ, A., ESMAEİLİ, H. R., and MOHSENZADEH, S., 2014. Morphological and molecular perspective on geographical differentiation of *Barbus* populations (Actinopterygii; Cyprinidae) within Iranian freshwater drainages. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(2), 339-351.
- ÖZDEMİR, F., 2013. Türkiye'deki *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) cinsine ait tür ve alttürlerin klasik ve moleküler sistematik yöntemler kullanılarak revizyonu. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 156s.
- ÖZDEMİR, F., 2015. Principle Components Analysis of Two Pairs of Barbels Species of the Genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) in Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(3). 753-762.
- PALALI, A., 2019. Fırat nehrinde yaşayan *Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843) ve *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) türünde amino asit profilinin araştırılması / Investigation of the aminoacide profile in *Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843) and *Cyprinus carpio* (Linnaues, 1758) living in the Fırat river. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, 37s.
- PARMAKSIZ, A., ŞEKER, Ö., ASLAN, N., ve OYMAK, A., 2017. Determination of Genetic Diversity in *Barbus grypus* (Heckel, 1843) Populations by mtDNA COI Gene Sequences. *Aquaculture Studies*, 17(1), 103-107.
- PARMAKSIZ, A., ve ALTUNDAĞ, A., 2018. Fırat ve Dicle Nehri’nde Yaşayan *Achantobrama marmid* (Heckel, 1843) Popülasyonlarında Genetik Çeşitliliğin mtDNAcyt b Gen Dizileri Kullanılarak Belirlenmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7(1), 74-78.

- PARMAKSIZ, A., ve ŞEKER, Ö., 2018. Genetic diversity of the endemic species shabbout (*Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843)) based on partial cytochrome b sequences of mitochondrial DNA. *Aquatic Research*, 1(3), 103-109.
- REN, Q., ve MAYDEN, R. L., 2016. Molecular phylogeny and biogeography of African diploid barbs, 'Barbus', and allies in Africa and Asia (Teleostei: Cypriniformes). *Zoologica Scripta*, 45(6), 642-649.
- ROKAS, A., LADOUKAKIS, E., and ZOUROS, E., 2003. Animal mitochondrial recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (8): 411-417.
- SOLEIMANIAN, S., CHERMAHINI, M., EAGDERI, S., and SAVARI, A., 2021. Body shape changes of Shirbot, *Arabibarbus grypus* (Heckel, 1843) during early development using geometric morphometric method. *Aquaculture Sciences*, 8(2), 58-64.
- TSIGENOPOULOS, C. S., DURAND, J. D., ÜNLÜ, E., and BERREBI, P., 2003. Rapid radiation of the Mediterranean *Luciobarbus* species (Cyprinidae) after the Messinian salinity crisis of the Mediterranean Sea, inferred from mitochondrial phylogenetic analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(2), 207-222.
- TURAN, C., 2004. Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. *ICES Journal of Marine Science*, 61(5), 774-781.
- TURAN, C., KARCIOĞLU, M., HAZAR, D., ve SEVENLER, S., 2005. Asi Nehri (Hatay)'nde yaşayan *Barbus* (Cyprinidae) türlerinin sitogenetik analizi. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3(4), 579-584.
- TURAN, C., 2008. Molecular systematics of the Capoeta (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16S rDNA sequence data. *Acta Zoologica Cracoviensia-Series A: Vertebrata*, 51(1-2), 1-14.
- TURAN, D., KOTTELAT, M., and EKMEKÇİ, F. G., 2009. *Barbus niluferensis*, a new species of barbel (Teleostei: Cyprinidae) from Nilüfer River, Turkey, with re-description of *B. oligolepis*. *Zootaxa*, 1981(1), 15-28.
- UZMAY, A., 2019. Karagöz Balığı (*Diplodus vulgaris*, Geoffroy Santhilaria, 1817) Genetik Çeşitliliğinin Mikrosatellit Markörlerle İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 66s.
- VEREP, B., TURAN, D., ve KOVA, V., 2006. Preliminary results on Morphometry of Barbel (*Barbus tauricus* Kessler, 1877) in the Streams of Rize and Artvin (Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6(1), 17-21.
- ZARDOYA, R., and DOADRIO, I., 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of molecular evolution*, 49(2), 227-237.
- [https://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/61848/10.1038\\_nrg1606-f1b\\_full.jpg](https://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/61848/10.1038_nrg1606-f1b_full.jpg). erişim tarihi 30.12.2021



