

## Fırat ve Dicle Nehri'nde Yaşayan *Barbus grypus* (Heckel, 1843) Populasyonlarında Genetik Çeşitliliğin mtDNA COI Gen Dizileri Kullanılarak Belirlenmesi

Arif PARMAKSIZ\*, Özlem ŞEKER, Nevin ASLAN, Ahmet OYMAK

Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

\*Sorumlu Yazar Tel.: +90 414 318 35 62  
E-posta: aprmksz@gmail.com

Geliş Tarihi: 31.10.2016  
Kabul Tarihi: 02.01.2017

### Öz

*Barbus grypus* (Heckel, 1843) Fırat ve Dicle nehir sistemlerinde yaşayan ve ekonomik önemi olan endemik balık türlerinden biridir. Bu çalışmada, *B. grypus* populasyonlarında mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz alt ünite I (mtDNA COI) gen bölgesinin dizi analizlerine dayalı genetik çeşitlilik belirlenmiştir. İki populasyondan toplam 36 örnek alınıp iki değişken bölge ve üç haplotip tespit edilmiştir. Ortalama haplotip (h) ve nükleotit çeşitliliği ( $\pi$ ) sırasıyla 0,246 ve 0,00045 olarak hesaplanmıştır. Nötralite testleri sonucunda tüm değerler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0.10$ ). Yapılan bu çalışmadaki sonuçlar *B. grypus* türü için ilk kez elde edilmiş verilerdir. mtDNA COI gen bölgesi için belirlenen haplotipler literatür açısından yeni sonuçlar olup, bu türün genetik çeşitliliği açısından önemli bir veri seti oluşturmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Barbus grypus*, Genetik Çeşitlilik, mtDNA, Fırat Nehri, Dicle Nehri.

### Abstract

#### Determination of Genetic Diversity in *Barbus grypus* (Heckel, 1843) Populations by mtDNA COI Gene Sequences Living Euphrates and Tigris River

*Barbus grypus* (Heckel, 1843) living Euphrates and Tigris river system, is one of the endemic fish species and has economic importance. In this study, genetic diversity of *B. grypus* populations was detected based on mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (mtDNA COI) gene sequences. Three haplotypes and two polymorphic sites were detected in totally 36 individuals sampled from two populations. The average haplotype diversity (h) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were calculated 0,246 and 0,00045 respectively. The result of Neutrality tests as statistically was insignificant ( $p>0.10$ ). The results obtained by this study performed firstly for *Barbus grypus* species. Determined haplotypes for mtDNA COI gene region are new results for literature, in terms of genetic diversity of this species is an important data set.

**Keywords:** *Barbusgrypus*, Geneticdiversity, mtDNA, Euphrates River, Tigris River.

### Giriş

Cyprinidae familyasına ait olan *Barbus grypus* (Heckel, 1843) Fırat ve Dicle nehir sistemlerinde yaşayan endemik bir balık türüdür. Bu balığın vücudu yanlardan yassılaştırmış, büyük pullarla örtülü olup ağız yanlarında iki

çift bıyık bulunmaktadır. Halk tarafından eti sevilerek tüketilen balıklardan biri olduğu için Güneydoğu Anadolu Bölgesinde iç su balıkları yetiştiriciliğinde sazan veya alabalığa seçenек olarak düşünülmektedir (Gökçınar, 2010).

Ekonomik değeri yüksek olan bu balık, Şabut veya Sore olarak adlandırılmaktadır. Bu tür ile ilgili yapılan bazı çalışmalar; Oymak vd. (2008) Türkiye'deki Fırat Nehri'nde *Barbus grypus* (şabut) balığının yaş, büyüme ve üreme özelliklerini, Olgunoğlu vd. (2010) *Barbus grypus* (şabut)'un et verimini ve biyokimyasal bileşimde mevsimsel olarak değişimlerini, Olgunoğlu ve Olgunoğlu (2011) ticari açıdan önem taşıyan iki tatlı su balığının (*Barbus grypus* ve *Silurus triostegus*) kas dokusunda eser elementlerinin mevsimsel değişimini, Doğu vd. (2014) üreme döneminde Şabut balığının spermatolojik ve hematolojik özelliklerinin belirlenmesini, Düşükcan vd. (2015) Keban Baraj Gölü'nde yaşayan örneklerde sagittal otolit büyüklüğü ile balık boyu arasındaki ilişkilerini çalışmışlardır.

Endemik ve ekonomik önemi olan türlerin yönetilmesi ve korunması için o türün genetik çeşitliliği ve populasyon yapısının bilinmesi gerekmektedir (Ward, 2000; Ortega-Villaizan Romo vd., 2006). Buna rağmen Fırat ve Dicle nehir sistemlerinde yaşayan *B. grypus* türüne ait genetik çeşitlilik ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; Fırat ve Dicle nehirlerindeki *B. grypus* populasyonlarında mtDNA COI gen bölgesinin dizi analizleri ile hem genetik çeşitliliğin belirlenmesi hem de atasal popülasyon hakkında bilgi verilmesidir. Genetik çalışmalarda mevcut gen havuzu potansiyelinin saptanabilmesi mtDNA ile yakından ilgilidir. Çünkü mtDNA atasal kalıtım ve hızlı mutasyon oranından dolayı genellikle populasyon genetiği araştırmaları için ideal bir belirteçtir (Avisé vd., 1987). mtDNA COI gen bölgesi ise birbirine yakın türlerin ayırımında kullanılmasının yanında aynı türün populasyonları arasındaki farklılığın belirlenmesinde de en çok kullanılan moleküler

belirteçlerdendir (Croos ve Palsson, 2010; Keskin ve Atar, 2012).

### Materyal ve Metot

Balık Örneklerinin Toplanması; Balık örneklerini almak için yöre balıkçıları tarafından fanyalı ve iplik ağlar kullanılmıştır. Fırat Nehri'nden (21 birey) ve Dicle Nehri'nden (15 birey) toplam 36 birey canlı olarak içinde buz parçaları bulunan koruyucu kaplara konularak laboratuvara getirilmiştir. Yakalanan örneklerden pektoral veya dorsal yüzgeçlerin kaidesindeki kas dokusundan 5 gr alınarak % 95'lik etil alkol içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine konulup DNA izolasyonu yapılana kadar +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

DNA İzolasyonu; Bu çalışmada total DNA izolasyonu kas dokusundan GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır. Bu kittede yer alan protokol uygulanarak total DNA elde edilmiştir. DNA varlığını kontrol etmek amacıyla her bireye ait DNA örneklerinden 2 µl alınarak 2 µl boya (3x Loading Dye) ile birlikte SYBR Green eklenen % 0.8'lik agaroz jel, 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) solüsyonunun bulunduğu tank içerisine yerleştirilip 120 Volt, 30 dakika elektroforezde yürütülerek ultraviole (UV) ışık veren cihazda görüntülenmiştir.

Hedef mtDNA Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması; mtDNA COI gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primer Darabi vd. (2014) çalışmasından alınmış olup dizileri aşağıda verilmiştir.

COI-625F: 5'-TCAACCAACCACAA-AGACATTGGCAC-3'

COI-625R: 5'-GACTTCTGGGTGGC-CAAAGAATCA-3'

PZR işlemi BIO-RAD T100™ Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları; 95°C'de 3 dakika ilk denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 62°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye uzama olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirilmiş, son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak sonlandırılmıştır. PZR ile çoğaltma (amplifikasyon) reaksiyonlarında kullanılan DNA miktarı, kimyasalların konsantrasyonları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PZR cihazında optimize edilmiştir. Bu bölgenin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı ise; toplamda 25 µl olacak şekilde 13.9 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. PZR işleminden sonra oluşan ürünleri kontrol etmek amacıyla % 2 agaroz jel kullanılmıştır. SYBR Green eklenen agaroz jel, 0.5x TBE solüsyonunun bulunduğu tank içerisine yerleştirilip 2 µl PZR ürünleri ve 2 µl boya ile birlikte kuyulara yüklendikten sonra 100V elektrik akımında 30 dakika boyunca yürütülerek UV ışık veren görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

Elde edilen PZR ürünleri ticari bir firmaya gönderilerek 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) cihazında dizi analizi yaptırılmıştır.

mtDNA COI Dizilerinin Analizi; Ticari firmadan tarafımıza gönderilen mtDNA dizilerine ait ham veriler Chromas Pro v 2.0.1 (Tech-

nelysium Pty Ltd) programı kullanılarak değerlendirilip FASTA formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen FASTA formatındaki diziler Bio Edit software version 7.2.5 programı kullanılarak tüm bireylerin dizileri hizalanmıştır.

Populasyonlar için polimorfik bölge sayısı, haplotip sayısı, haplotip ve nükleotid çeşitliliği, Tajima D ve Fu's istatistikleri, DnaSP 5.10.01 (Rozas vd., 2003) programı kullanılarak belirlenmiştir. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişki ise Network version 5.0 programı ile belirlenmiştir.

## Bulgular

Genetik Varyasyon; Toplam 36 *B. grypus* örneğinde ortalama 610 bç'lik mtDNA COI bölgesi dizi analizi yapılarak (Gen Bank: KM590450) 2 değişken bölge ve 3 haplotip tespit edilmiştir. H1 haplotipi 31 bireyde, H2 haplotipi 4 bireyde ve H3 haplotipi ise 1 bireyde görülmüş olup, H1 ve H2 her iki nehir sisteminde ortak görülmesine rağmen H3 sadece 1 bireyle Dicle populasyonunda görülmüştür. Her populasyon için haplotip çeşitliliği (h), nükleotid çeşitliliği (π) ve nötralite testleri Tablo 1'de verilmiştir.

Ortalama haplotip çeşitliliği (h) 0,246 ve ortalama nükleotid çeşitliliği ise (π) 0,00045 olarak hesaplanmıştır. Fırat populasyonu hem haplotip çeşitliliği (h=0,385) hem de nükleotid çeşitliliği (π=0,00066) bakımından Dicle populasyonundan daha yüksek değer almıştır.

**Tablo 1.** *B. grypus* populasyonlarının genetik çeşitliliği ve nötralite testleri (n: Birey sayısı, Nh: haplotip sayısı, h: haplotip çeşitliliği, π: nükleotid çeşitliliği)

Lokalite	n	Nh	h	π	Tajima's D	Fu'sFs
Fırat Nehri	21	2	0,385	0,00066	-1.17758	-0.550
Dicle Nehri	15	2	0,133	0,00024	-1.15945	-0.649
Toplam	36	3	0,246	0,00045	-0.91306	-1.098

Analiz edilen 36 *B. grypus* örneği için oluşturulan Median-Joining Network haplotip ağında, toplam 3 haplotip belirlenmiş olup, elde edilen network evrimsel bir bağı gösteren merkezi bir haplotip (H1) varlığını göstermektedir.

Her iki lokalitede de bu haplotipin en fazla haplotip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca diğer iki haplotipin de H1 haplotipi ile bağlantılı olduğunu da söylemek mümkündür (Şekil 1).



**Şekil 1.** *B. grypus* haplotiplerinin ağ modeli.

Nötralite testleri ; Populasyonda bir alel için seçilim olup olmadığını gösteren nötralite testlerine ait olan Tajima's D (Tajima, 1996 ) ve Fu'Fs (Fu, 1997) istatistikleri hesaplama sonucunun negatif ya da pozitif olmasına göre değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, Tajima's D değeri ve Fu'Fs değerleri her iki populasyonda negatif değerler almıştır. Toplamda ise yine negatif değerler olarak istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p>0.10$ ). (Tablo 1).

## Tartışma

Bu çalışmada, ortalama haplotip çeşitliliği ve nükleotit çeşitliliği sırasıyla ( $h$ ) 0,246; ( $\pi$ ) 0,00045 olarak tespit edilmiştir. Fırat populasyonu hem haplotip çeşitliliği hem de nükleotid çeşitliliği bakımından Dicle populasyonundan daha yüksek değer almıştır. Aynı primerle iki çalışma yapmış olan Darabi vd., 2014 yılındaki çalışmasında, *Barbus sharpeyi* türünde 3 farklı populasyonda nükleotit çeşitliliğini

sırasıyla 0,0286; 0,0785 ve 0,0072 olarak, 2015 çalışmasında ise *Barbus xanthopterus* türünde 4 farklı populasyonda nükleotit çeşitliliğini sırasıyla 0,003947; 0,006354; 0,003515 ve 0,009737 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızdaki değerler, bu değerlere oranla daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebi *B. grypus* (Şabut) türünün eti lezzetli olduğundan dolayı bölgede aşırı avlama yapılmakta ve birey sayısı gittikçe azalmaktadır. Nükleotit çeşitliliği populasyonların genetik analizinde kullanılan hassas bir yöntem olup (Nei ve Li, 1979) populasyonların yaşam tarihine, karakterine, çevresel koşullara ve populasyon büyüklüğünden etkilenebilmektedir (Nei, 1987; Avise, 2000).

Medyan birleştirme ağı (Medianjoining network) analizinde, H1 haplotipinin ağın merkezinde ve dominant olduğunu ayrıca diğer iki haplotipinde H1 haplotipinden oluştuğunu görmekteyiz (Şekil 1).

Böylece H1 haplotipinin atasal haplotip olduğu ortaya çıkmaktadır. Populasyonlardaki Tajima's D ve Fu's değerleri, her iki populasyonda da negatif değer almış ve istatistiksel olarak önemsizdir ( $p>0.10$ ). Bu negatif değerler, bir populasyonun geçmişte ani büyüme olduğunu ya da belirli bir allelin seçilime uğradığını göstermektedir (Fu, 1997).

Yapılan bu çalışma ile elde edilen sonuçların tamamı *B. grypus* türü için ilk kez elde edilmiş verilerdir. mtDNA COI 625 gen bölgesi için belirlenen haplotipler literatür açısından yeni sonuçlar olup, bu türün genetik çeşitliliği açısından önemli bir veri seti oluşturmuştur. Daha sonra yapılacak çalışmalarda daha çok populasyonda ve farklı genetik belirteçler kullanarak çalışmaların yapılması bu türün populasyon genetiği için daha da açıklayıcı olacaktır.



## Teşekkür

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından 16200 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. ve Saunders, N. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst.*, 18: 489-522.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography*. London: Harvard University Press.
- Croos, D. M. ve Palsson, S. 2010. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of white Shrimp *Fenneropenaeus indicus* along the coastal belt of Sri Lanka. *Aquat Living Resour.*, 23:315-32.
- Darabi, A. R., Kashan, N., Fayazi, J., Aminafshar, M. Ve Chamani, M. 2014. Phylogenetic relationships of sub-populations of *Barbus sharpeyi* fish in southwest of Iran using mitochondrial DNA with PCR-sequencing method. *International Journal of Biosciences*, 5(2): 41-46.
- Darabi, A. R., Kashan, N., Fayazi, J., Aminafshar, M. Ve Chamani, M. 2015. Investigation of Phylogenetic Relationship Among two *Barbus* species (Cyprinidae) Populations with Mitochondrial DNA Using Pcr-Sequencing. *IJBPAS*, 4 (2): 302-311.
- Doğu, Z., Aral, F. ve Şahinöz, E. 2014. Atatürk Baraj Gölü'ndeki (Şanlıurfa) Şabot Balığının Bazı Spermatolojik ve Hematolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Journal of Fisheries Sciences.com.*, 8 (4) 265-277.
- Düşükcan, M., Çalta, M. ve Eroğlu, M. 2015. Keban Baraj Gölü'nde yaşayan *B. Grypus* Heckel, 1843'de otolit Biyometrisi-Balık Boyu İlişkisi (Elazığ, Türkiye). *Yunus Araştırma Bülteni*, 2015 (3): 21-29.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Gökçınar, N. C. 2010. Şabot (Bıyıklı Balık) (*Tor grypus* H. 1843) Balığı Yavru Yemlerine Balık Unu Yerine Farklı Oranlarda *Azolla* (*Azolla* Sp.) İlaresinin büyüme Parametrelerine Etkisi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Keskin, E. ve Atar, H. H. 2012. Türkiye'nin Akdeniz Kıyısındaki Mavi Yengeç (*Callinectes sapidus*) Populasyonları Arasındaki Genetik Farklılığın COI Gen Dizleri Kullanılarak Değerlendirilmesi. *Journal of Fisheries Sciences.com.*, 6(2): 125-131.
- Nei, M. ve Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci.*, 76: 5269-5273.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.,
- Oymak, S. A., Doğan, N. ve Uysal, E. 2008. Age, growth and reproduction of the Shabut *Barbus grypus* (Cyprinidae) in Atatürk Dam Lake (Euphrates River), Turkey. *Cybiu*, 32(2): 145-152.
- Olgunoğlu, İ. A., Olgunoğlu, M. P. ve Artar, E. 2010. Seasonal changes in biochemical composition and meat yield of Shabut (*Barbus grypus*, Heckel 1843). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10 (1) 181-187.
- Olgunoğlu, M. P. Ve Olgunoğlu, İ. A. 2011. Seasonal variation of trace elements in muscle tissues of two commercially valuable fresh water fish species (*Silurus triostegus* and *Barbus grypus* Heckel, 1843) from Atatürk Dam Lake (Turkey) *African Journal of Biotechnology*, 10(34), pp. 6628-6632.
- Ortega-Villaizán Romo, M., Suzuki, S., Nakajima, M. Ve Taniguchi, N. 2006. Genetic evolution of inter individual relatedness for brood stock management of the rare species barfin flounder *Verasper moseri* using microsatellite DNA markers. *Fisheries Sci.*, 72:3339.
- Rozas, J., Sanchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X. Ve Rozas, R. 2003. DnaSP DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19 pp. 2496-2497.
- Tajima, F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143:1457-1465.
- Ward, R.D. 2000. *Genetics in fisheries management*. *Hydrobiologia*, 420:191-201.