

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEKİ FIRAT NEHRİ DRENAJINDAN *Oxynoemacheilus*
(Teleostei: Nemacheilidae) TÜRLERİNİN COI-BARKOD
BÖLGESİNE DAYALI GENETİK TANIMLAMASI VE
FİLOGENETİK İLİŞKİLERİ

HANDE RAKICI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YUSUF BEKTAŞ
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. DAVUT TURAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞEBNEM ATASARAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE 2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

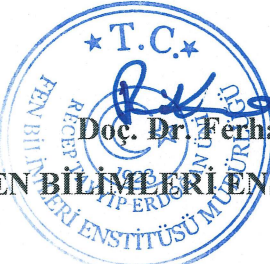
TÜRKİYE'DEKİ FIRAT NEHRİ DRENAJINDAN *Oxynoemachelius* (Teleostei: Nemacheilidae) TÜRLERİNİN COI-BARKOD BÖLGESİNE DAYALI GENETİK TANIMLAMASI VE FİLOGENETİK İLŞKİLERİ

Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ danışmanlığında, Hande RAKICI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/09/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	:Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ
Üye	:Prof. Dr. Davut TURAN
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Şebnem ATASARAL

İmzası

[Handwritten signatures of the jury members]


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışma kapsamında Basra körfezi havzasında yer alan Fırat nehri drenajlarında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* türlerinin mitokondri sitokrom oksidaz alt ünite-I geni (COI) dizilerine dayalı olarak genetik teşhisinin ve filogenetik analizinin yapılması hedeflenmektedir.

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ' a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını gördüğüm, deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Öğr. Gör. İsmail AKSU' ya laboratuvar çalışmalarında ve örneklerin temininde yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Davut TURAN, Arş. Gör. Cüneyt KAYA ve Arş. Gör. Esra BAYÇELEBİ ve tüm Su Ürünleri Fakültesi laboratuvar arkadaşlarıma, akademik personeline ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ilgilerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen başta canım anneme, beni uzaklardan izleyen rahmetli babama, sevgili eşime ve tüm aileme çok teşekkür ederim.

Hande RAKICI

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Türkiye’deki Fırat Nehri Drenajından *Oxynoemacheilus* (Teleostei: Nemacheilidae) türlerinin COI-barkod bölgesine dayalı genetik tanımlanması ve filogenetik ilişkileri” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
19/06/2019


Hande RAKICI

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TÜRKİYE’DEKİ FIRAT NEHRİ DRENAJINDAN *Oxynoemacheilus* (Teleostei: Nemacheilidae) TÜRLERİNİN COI-BARKOD BÖLGESİNE DAYALI GENETİK TANIMLAMASI VE FİLOGENETİK İLŞKİLERİ

Hande RAKICI

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ**

Bu çalışmada, DNA barkodlama tekniği ile Türkiye’nin Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* türlerini güvenilir bir şekilde tanımlama yeteneği araştırılmıştır. *Oxynoemacheilus* genusunu temsilen 6 türe ait 167 bireyi barkodlamak için mitokondri sitokrom c oksidaz altünite I’ in (COI) barkod bölgesi (627 bp) kullanıldı. Kimura 2 parametresine dayalı olarak (K2P), maksimum tür içi ve minimum türlerarası genetik mesafeleri sırasıyla % 0.59 ve % 1.62’dir. En yakın komşu türler ara mesafeler, ortalama intra-spesifik mesafeden 7 kat daha yüksektir ve belirgin bir DNA barkod aralığı fark edilmiştir. Filogeni tabanlı DNA barkodlama başarısı testine göre komşu-birleştirme fenogramları K2P modeli kullanılarak 1000 seç-bağla replikasyonu ile üretildi ve örneklerin tümünün türlerin taksonomik durumları ile uyumlu olarak kümelendiği belirlenmiştir. MP ve ML filogenileri, Doğu ve Batı Anadolu gruplarına karşılık gelen iki klad içeren bir ortak ağaç topolojisi gösterdi. Bu çalışmanın sonuçları, COI geninin yaklaşık % 81 başarı oranıyla *Oxynoemacheilus* türlerinin belirlenmesi ve sınırlandırılması için uygun bir DNA barkod belirleyicisi olabileceğini göstermektedir.

2019, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler: DNA Barkotlama, COI, İhtiyofauna, Endemizm, Türkiye

ABSTRACT

GENETIC IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC RELATIONS OF *Oxynoemacheilus* SPECIES (Teleostei: Nemacheilidae) FROM DRAINAGE OF EUPHRATES IN TURKEY BASED ON COI-BARCODE REGION

Hande RAKICI

Recep Tayyip Erdogan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ

The present study investigated the ability of DNA barcoding to reliably identify *Oxynoemacheilus* species in Euphrates River basin of Turkey, known as biodiversity hotspots. The barcode region (627 bp) of the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) were used to barcode 167 individuals belonging to six *Oxynoemacheilus* species. Based on Kimura two-parameter (K2P), the intraspecific diversity and minimum interspecific genetic distance were % 0.59 and % 1.62 respectively. Nearest neighbor distance was 7-fold higher than maximum intra-specific distance on average and a distinct DNA barcoding gap was observed. According to the phylogeny-based succes test neighbour-joining phenograms were generated with 1000 bootstrap replications using the K2P model and all the specimens clustered in concurrence with the taxonomic status of the species. The MP and ML phylogenies indicated a consensus tree topology containing two clades corresponding to the geographical origins: Western and Eastern Anatolia groups. The results of present study indicated that the COI gene could be a suitable DNA barcode marker for the *Oxynoemacheilus* species identification and delimitation with approximately 81% success rate.

2019, 58 page

Keyword: DNA Barcoding, COI, Freshwater Fish, Endemism, Turkey.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Nemacheilidae Familyasının Genel Özellikleri	2
1.3. <i>Oxynoemacheilus</i> Genusunun Genel Özellikleri	3
1.3.1. <i>Oxynoemacheilus araxensis</i>	4
1.3.2. <i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i>	5
1.3.3. <i>Oxynoemacheilus bergianus</i>	5
1.3.4. <i>Oxynoemacheilus euphraticus</i>	6
1.3.5. <i>Oxynoemacheilus kaynaki</i>	7
1.3.6. <i>Oxynoemacheilus paucilepis</i>	7
1.4. Mitokondri DNA	8
1.5. Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite I (COI) Geni	11
1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	11
1.7. DNA Dizin Analizi	13
1.8. Filogenetik Analizler	14
1.8.1. Mesafe Temelli Yöntemler	14
1.8.1.1. Komşu Birleştirme Metodu “Neighbour Joining“	14
1.8.2. Karakter Temelli Yöntemler	15
1.8.2.1. Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony) Metodu	15
1.8.2.2. Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) Metodu	15
1.9. DNA Barkodlama	17
1.10. Literatür Özeti	18
1.11. Tezin Amacı	22

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	23
2.1.	Materyal	23
2.2.	Yöntem.....	25
2.2.1.	Total DNA Eldesi	25
2.2.2.	Total DNA ve PZR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	25
2.2.3.	PZR Uygulamaları	26
2.2.4.	DNA Dizin Analizi	27
2.2.5.	Barkodlama Aralığı ve Tür Sınırlaması	27
2.2.6.	Dizi Hizalama ve Filogenetik Analiz.....	28
3.	BULGULAR	30
3.1.	Genetik Çeşitlilik	30
3.2.	Barkodlama Aralığı ve Tür Sınırlaması	34
3.3.	Barkodlama Başarısı	35
3.4.	Filogenetik Analizler	38
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	40
4.1.	Genetik Çeşitlilik.....	41
4.2.	Barkodlama Başarısı	42
4.3.	Filogenetik Analizler	44
5.	ÖNERİLER	46
	KAYNAKLAR	47
	ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>Oxynoemacheilus araxensis</i> görünümü	4
Şekil 2.	<i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i> görünümü	5
Şekil 3.	<i>Oxynoemacheilus bergianus</i> görünümü	5
Şekil 4.	<i>Oxynoemacheilus euphraticus</i> görünümü.....	6
Şekil 5.	<i>Oxynoemacheilus kaynaki</i> görünümü.....	7
Şekil 6.	<i>Oxynoemacheilus paucilepis</i> görünümü.....	7
Şekil 7.	Mitokondri DNA'nın şematik yapısı (URL-VI)	10
Şekil 8.	Örnekleme alanını ve lokaliteleri gösteren harita	23
Şekil 9.	<i>Oxynoemacheilus</i> cinsinin intraspesifik (tür içi) ve interspesifik (türler arası) ayrışması için barkod boşluğunu temsil eden mesafelerin histogramları.....	34
Şekil 10.	<i>Oxynoemacheilus</i> türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin NJ metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı	37
Şekil 11.	<i>Oxynoemacheilus</i> türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin MP metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı.....	39
Şekil 12.	<i>Oxynoemacheilus</i> türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin ML metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı.	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Oxynoemacheilus</i> genusunun sistematigi.....	4
Tablo 2. <i>Oxynoemacheilus</i> genusuna ait türlerin toplanıldığı istasyonlar, koordinatları ve örnek sayıları (N).....	24
Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	26
Tablo 4. PZR döngü koşulları	27
Tablo 5. <i>Oxynoemacheilus</i> genusuna ait türlerin örnek sayıları (N), haplotip kodları (H), haplotip sayıları (HS), haplotip çeşitlilik (Hd) ve nükleotit çeşitlilik (Pi) değerleri	31
Tablo 6. <i>Oxynoemacheilus</i> genusuna ait tür içi ve türler arasındaki ikili dizin farklılığı değerleri.....	32
Tablo 7. <i>Oxynoemacheilus</i> genusuna ait altı türün haplotiplerinin ayırımına neden olan nükleotit pozisyonları	33

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AOO	Doluluk Oranı
A	Adenin
AIC	Akaike Bilgi Kriteri
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz Çifti
bp	Barkod Bölgesi
C	Sitozin
CBOL	Yaşam Barkod Konsorsiyumu
cm	Santimetre
COI	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I
COX-1	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I Geni
COX-2	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite II Geni
COX-3	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite III Geni
Cyt b	Sitokrom b
D	Dorsal Yüzgeç Işın Sayısı
ddH ₂ O	İki Kere Distile Su
ddNTP	Dideoksiribonükleozit Trifosfat
dk	Dakika
D-Loop	Kontrol Bölgesi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozit Trifosfat
EOO	Oluşum Kapsamı
G	Guanin
H	Haplotip
HS	Haplotip Sayılar
Hd	Haplotip Çeşitlilik
He	Beklenen
Ho	Gözlenen
HWE	Hardy-Weinberg Dengesi
Kbç	Kilobaz Çifti

K2P	Kimura 2 Parametresi
LL	Ligne Lateral Pul Sayısı
M	Molar
m	Metre
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ML	Maksimum Likelihood
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MP	Maksimum Parsimoni
mtDNA	Mitokondriyal Deoksiribonükleik Asit
N	Tür Örnek Sayısı
nDNA	Nükleer DNA
ng	Nanogram
NJ	Neighbor Joining
OTU	Operasyonel Taksonomik Ünite
P	Pelvik Yüzgeç Işın Sayısı
Pi	Nükleotit Çeşitlilik
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAG 1	Recombination-Activating Protein 1 Geni
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Dakika Başına Dönme Hızı
T	Timin
TAE	Tris-Asetik Asit-Etilendiamintetraasetik Asit
T _m	Primerlerin Erime Sıcaklığı
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
U	Ünite
UPGMA	Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup
V	Pektoral Yüzgeç Işın Sayısı
vd	Ve Diğerleri

16S rRNA	16S Ribozomal Ribonükleik Asit Geni
�C	Santigrad Derece
�l	Mikrolitre



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanoğlunun besin diyetindeki protein, vitaminler ve mineral ihtiyacının karşılanması bakımından önemli bileşenlerden biri olan balıklar, endüstriyel alanda yağı çıkartılarak boya, böcek ilacı, sabun, ilaç vb. ürünlerin üretiminde kullanılabilir. Ekonomik refahın geliştirilmesi, iş ve yatırım alanlarının artırılmasına katkıda bulunan balıkçılık sektöründe ana meta olan balıklar ve işlenmiş gıda ürünlerinin doğru tanımlanması büyük önem arz etmektedir. Öte yandan, balık türlerinin tanımlanması, biyoçeşitliliğin tespiti, takibi ve gerekli ise koruma stratejilerinin geliştirilmesi gibi hayati yaklaşımlara temel oluşturur (Dayrat, 2005).

Balık türlerinin teşhisi temel de morfometrik ve meristik karakterlere dayanır (Strauss ve Bond, 1990). Morfolojik yaklaşımların egemen olduğu tür tayini çalışmaları, genellikle türlerin cinsiyet ve yaşam evrelerine bağımlı olmaları, farklı türler arasındaki yüksek morfolojik benzerlik ve farklı türlerin benzer yaşam koşullarına maruz kaldığında fenotipik benzerlik göstermeleri gibi olası olumsuzluklar ile sınırlıdır. Zira, balıkların %40'ı gibi yüksek oranda tür düzeyinde tanımlanamadığı görülmektedir (Leonart vd., 2006). DNA metodlarının kullanımı böyle problemleri önleyebilir (Hebert ve Gregory, 2005). Bu nedenle, tür tanımlama sürecini hassas, hızlı, evrensel bir zemine oturtmak için özgün DNA dizilerinin kullanıldığı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Hebert vd., 2003a).

Bu moleküler yöntemler arasında tür tanımlamanın hızlı ve etkili bir yolu olan DNA barkodlama, türler arasında karşılaştırma yapmak için dört farklı nükleotidin bir karışımından oluşan kısa bir DNA dizisinin kullanılması üzerine kuruludur. Hayvanlarda, uygun bir barkodun yaklaşık 600-800 bp'den oluştuğu önerilir (Kress vd., 2004). Daha kısa bir sekans, nükleotidler arasında yeterli varyasyona izin verecek kadar veri sağlamayabilir. Bununla birlikte, Herbert vd. (2003a) tarafından önerildiği üzere mitokondri DNA (mtDNA) dizileri, nükleer DNA'ya oranla daha yüksek evrim hızına sahiptir. Tür içinde varyasyon göstermediği halde türler arasında belirgin bir ayrım

sağladığı ve iki yönlü dizilemede tek bir primer çifti ile kolayca üretilebildiği için mtDNA sitokrom c oksidaz 1 (COI) geninin 5' ucundaki yaklaşık 650 bp'lik kısa bir bölge tüm hayvanlar için pratik ve standartlaştırılmış ideal bir DNA barkodu olarak nitelendirilir (Hebert vd., 2003b).

Yeryüzündeki yaşam formlarının geniş kapsamlı dökümü bütün evrimsel ve biyoçeşitlilik çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. Uluslararası “Yaşam Barkodu Konsorsiyumu” (The Consortium for Barcode of Life, CBOL) projesi kısa imza “DNA barkod” dizileri kullanarak tür düzeyinde organizmaları tanımlanması yoluyla dünyadaki biyoçeşitliliği belirlemeye yönelik bir girişimdir. Son yıllarda yapılan CBOL ile ilgili çalışmalarda genellikle uygun bir barkod üreten sitokrom c oksidaz (COI) alt ünite I geninden 650 bp'lik kısa bir DNA dizisinin türlere özgü DNA profillerinin ortaya çıkarılması için kullanılabileceğini göstermiştir (Hebert ve Gregory, 2005). Böylece, tanımlanamayan türlerin DNA dizileri ile DNA barkod veri tabanlarındaki DNA dizilerinin eşleştirilmesi yöntemiyle tanımlanmasını sağlayacak evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır.

“FISH-Barcode of Life” projesi tahmini olarak 30,000 balık türünün teşhisi ve evrensel DNA barkod veritabanını hedefleyerek 2005 yılında başlatılmıştır. Günümüze dek, bu türlerin sadece dörtte biri barkodlanmıştır. Bunların çoğu da Asya ve Avustralya'nın denizel balık türlerine aittir. 2013 yılı itibarıyla Avrupa'daki 2028 türün sadece 440 tanesi barkodlanmıştır (Ward vd., 2005, 2008a,b; Ward ve Holmes, 2007; Zemlak vd., 2009). DNA barkodlama sonuçları gösteriyor ki DNA barkod bölgesi yardımıyla tür teşhisi balıklarda son derece başarılıdır ve genetik teşhis metodları ile denizel veya tatlı su balıklarının sırasıyla %93 ila 98'ini ayırabilmektedir (Ward vd., 2009).

1.2. Nemacheilidae Familyasının Genel Özellikleri

Çöpçü balığı ve taş kesen balığı olarak bilinen Nemacheilidae familyasına ait türler Asya ve adaları, Avrupa ve Kuzeydoğu Afrika'nın tatlı sularında yayılış gösteren küçük balıklardır (URL-1). Bu familyaya ait bireyler akarsuların sığ olan bölgelerinde

yaşarlar, pulları küçük ve genellikle deriye gömülmüş şekildedir. Ağızlarının etrafında bir çift bıyık alt çenede, iki çift bıyık üst çenede olmak üzere toplamda üç çift bıyık bulunmaktadır (Turan vd., 2018). Türkiye'nin neredeyse bütün akarsularında dağılım gösterirler. Bu familya Türkiye de toplam 26 tür ile temsil edilmektedir (Turan vd., 2018).

Nemacheilidae, yaklaşık olarak 48 cins ve 661'den fazla türe sahiptir (Nelson vd., 2016). Bu familyaya ait türler çok dar ekolojik toleransa sahiptirler.

1.3. *Oxynoemacheilus* Genusunun Genel Özellikleri

Oxynoemacheilus, Arnavutluk'tan doğuda Orta İran'a kadar bilinen, Nemacheilidae balıklarının tür bakımından zengin bir cinsidir. Mevcut 58 tür adı vardır ve burada 41 tür geçerli olarak kabul edilir. Avrupa'da *O. bureschi*, *O. merga*, *O. pindus* ve *O. theophilii* olmak üzere dört tür bulunur. Anadolu ve Orta Doğu'da 38 tür bulunur.

Oxynoemacheilus cinsi ölçeklendirilmiş veya ölçeksiz yanal çizgi boyunca bant veya şerit oluşturma eğiliminde lekelere sahip bir gövdeye sahiptir ve ön sırt yüzgeci ışınlarının tabanında koyu siyah bir nokta yoktur. Dorsal yüzgeç kökeni, pelvik yüzgeç kökenden gelen dikeyin önünde veya üstündedir ve anüs anal yüzgeç önünde bir göz çapı veya daha küçüktür. Dallanmış ve bazen de birinci ve ikinci dallı, sırt yüzgeci ışınlarının tabanında bulunmayan belirgin siyah nokta yoktur. Mevcut olduğunda, en iyi kuyruk yüzgeci tabanında geliştirilir ve ilerici ışınlarla desteklenir. İki noktadan oluşan loblu *Oxynoemacheilus* cinsi ışın yüzgeçli bir balık türüdür. Değişken şekilde geliştirilen küçük bir pelvik yüzgeç aksiller lob mevcuttur. Kuyruk yüzgeci, derin bir şekilde emarginat veya kesiklik yapmak için çok hafif bir şekilde belirginleşir. Çatalı bir kaudal kanatçık, silindirik gövdeli ve kaudal sapı olan bir türde bulunur. Erkekler yumurtlama mevsiminde şişirilmiş veya kaslı yanaklar geliştirmezler ancak tüberküller başın yanlarında ve pektoral yüzgeçlerinde bulunur. Bir suborbital flep veya oluk erkeklerde buluna bilir bulunmaya da bilir. Burun delikleri yakın aralıklarla veya hafifçe birbirinden ayrılır, ağız yarı dudaklıdır, dudakları bastırmak için neredeyse pürüzsüz olan basit dudaklar ile yarı ay şeklindedir ve bazen ortada değildir. (URL-2)

Tablo 1. *Oxynoemacheilus* genusunun sistematigi

Regnum	Animalia (Hayvanlar)
Subregnum	Metozoa (Çok hücreliler)
Phylum	Chordata (Kordalılar)
Subphylum	Vertebrata (Omurgalılar)
Classis	Osteichthyes (Kemikli balıklar)
Subclassis	Actinopterygii (Işınsal yüzgeçli)
Ordo	Cypriniformes (Sazansılar)
Familia	Nemacheilidae (Nema ya da çöpçü)
Genus	<i>Oxynoemacheilus</i> (Çöpçü balığı)
Species	<i>Oxynoemacheilus araxensis</i> Banareescu ve Nalbant, 1978 <i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i> Heckel, 1847 <i>Oxynoemacheilus bergianus</i> Derjavin, 1934 <i>Oxynoemacheilus euphraticus</i> Banareescu ve Nalbant, 1964 <i>Oxynoemacheilus kaynaki</i> Erk' Akan, Ozeren ve Nalbant 2008 <i>Oxynoemacheilus paucilepis</i> Erk' Akan, Ozeren ve Nalbant 2007

1.3.1. *Oxynoemacheilus araxensis* (Banareescu ve Nalbant, 1978)



Şekil 1. *Oxynoemacheilus araxensis* görünümü

Çakıl dipli ve orta derecede hızlı akan sudaki derelerden kaydedilmiştir. (Şekil 1)
Bu tür doğrudan insanlar tarafından kullanılmaz.(URL-3)

1.3.2. *Oxynoemacheilus argyrogramma* (Heckel, 1847)



Şekil 2. *Oxynoemacheilus argyrogramma* görünümü

İran'ın batısındaki Nemacheilidae familyasına aittir. Nemacheilidae familyasının çoğu nehir lobunda olduğu gibi *Oxynoemacheilus argyrogramma* (Şekil 2) da hızlı akan suda yaşayan, özellikle çakıl veya taşlı alt tabakalarda bulunan küçük bentik türlerdir. (Kottelat ve Freyhof, 2007.) Akarsu nehirleri genellikle nehir sistemlerinde yaşar ve çok az göç alışkanlığına sahiptir. Bu nedenle tatlı su faunası biyocoğrafya çalışması için ideal biyodikatörlerdir. (Sediya vd., 2010)

1.3.3. *Oxynoemacheilus bergianus* (Derjavin, 1934)



Şekil 3. *Oxynoemacheilus bergianus* görünümü

Oxynoemacheilus bergianus (Şekil 3) daha çok nehrin alt kısımlarını seçer, daha düşük derinlik ve genişliğe, daha yüksek hıza, daha ince alt tabakaya, seyrek nehir kenarı bitki örtüsüne, daha az gölgeye ve kaya örtüsüne sahip suları sever (Tabatabaei vd., 2015).

Morfolojik özellik olarak kuyruk sap uzunluğu, kuyruk sap yüksekliğinin 2, 1 - 2, 9 katı olarak ifade edilmiştir. Vücut alçaktır, uzundur ve pulludur. Lateral çizgisi tamdır. Ağızı ventraldir ve kalın dudakları vardır. Üç çift bıyığı bulunur bunlar ikisi üst çene biri alt çenededir. Gözler başın tam ortasında yer alır ve küçüktür. Vücudunda kahverengi hâkimdir, karın bölgesi kirli beyazdır. Sırtta 4-6 tane koyu kahve renkli bantlar bulunur. Dorsal yüzgecin başlangıç hizasına gelmeden 5-8 adet koyu kahve renkte düzensiz leke bulunur. Yüzgeç renkleri açık gri veya kirli beyazdır. Üzerlerinde 2-4 siyah benek bulunur. İlk bulunuş yeri Safid Nehri (İran) dır. (Erk'akan vd., 2007)

1.3.4. *Oxynoemacheilus euphraticus* (Banarescu ve Nalbant, 1964)



Şekil 4. *Oxynoemacheilus euphraticus* görünümü

Yaşam alanı olarak debisi sığ, durgun akarsuları, zemin yapısı taşlık, çakıllı ve temiz suyu seçerler. Bu türün (Şekil 4) vücutları koyu kahverengi, karnı kirli beyaz renklidir. Sırtında 8-9 tane açık renkli bant bulunur. Yüzgeçleri açık gri veya kirli beyazdır ve üzerinde siyah benekler bulunur.

Morfolojik özellik olarak kuyruk sap uzunluğu kuyruk sap yüksekliğinin 1, 6 - 2, 1 katıdır. Vücut yapısı uzun, alçak ve pulludur. Lateral çizgisi boydan boyadır. Ağızı ventraldir ve üç çift bıyık bulunur ikisi üst çene biri alt çenede konumlanmıştır. Gözler küçüktür. Gözler başın tam ortasında ya da burun ucuna daha yakın yer alır. İlk Bulunuş yeri Fırat Nehridir. (Erk'akan vd., 2008).

1.3.5. *Oxynoemacheilus kaynaki* (Erk'Akan, Ozeren ve Nalbant, 2008)



Şekil 5. *Oxynoemacheilus kaynaki* görünümü

Oxynoemacheilus kaynaki (Şekil 5) (Göksu Nehri, Fırat drenajı) diğer *Oxyemacheilus* üyelerinden dallı dorsal, anal ve kaudal yüzgeç ışınları, renk deseni, lateral çizgi, cinsel dimorfizm şekli ile ayırt edilir (URL-3).

Çakıllı orta ile hızlı hızlı akan suda, genellikle çok az akış ve çamurlu substrat ile akarsu sınırlarını yaşar. Bu tür doğrudan insanlar tarafından kullanılmaz (URL-4).

1.3.6. *Oxyemacheilus paucilepis* (Erk'Akan, Ozeren ve Nalbant, 2007)



Şekil 6. *Oxyemacheilus paucilepis* görünümü

Çakıllı ve küçük akarsuların orta derecede hızlı akan sularında yaşarlar. Bu tür (Şekil 6), Türkiye'de Fırat'ın baş sularında üç akıma endemiktir. Mancılık (Muhtemelen Mancılık'teki menzilin bir kısmından tükenmiştir), Çetinkaya ve Kalkam dereleri.

Doluluk alanının (AOO) 50 km² olduğu tahmin edilmektedir (yaklaşık 40 km akıştan fakat yerel alanlardan bilinmektedir) ve oluşumun kapsamı (EOO) 500 km²'den fazla olmayacaktır. Türler, düşük seviyedeki kirlilikten ve köylerden su çekilmesinden etkilenmektedir (üç bölge). Bu nedenle tehlike altında olarak değerlendirilir (URL-5).

1.4. Mitokondri DNA

Mitokondriler, ökaryotik hücrelerde oksijenli solunum reaksiyonlarının gerçekleştiği enerji üretiminden sorumlu organeller olup sadece memeli alyuvarlarında ve prokaryotik hücrelerde bulunmaz (Cooper ve Hausman, 2007). Mitokondri ve serbest yaşayan bakteriler arasındaki ve hatta DNA'larındaki benzerlikler nedeniyle, mitokondrinin muhtemelen bir heterotrofik hücre tarafından fagosite edilmiş serbest yaşayan α -proteobakterilerden geldiğini varsayan “Endosimbiyozis teorisi” Margulis (1993) tarafından ortaya atılmıştır. Bu teori mitokondrinin neden kendi DNA, protein ve kodonlarına sahip olduğunu, neden iki zarları olduğunu, serbest yaşayan bakterilerle aynı boyama desenlerine sahip olduklarını ve hücre döngüsünün geri kalanından ayrı olarak kopyalayabildiklerini açıklar (Kutschera, 2005). Mitokondri DNA (mtDNA)’nın prokaryotik ekstrakromozomal genomlar gibi dairesel bir yapıya sahip oluşu, çok az kodlama yapmayan dizilerin varlığı ve genlerin çakıştığı alanlar gibi sayısız özelliği paylaşımları gibi durumlar bu teoriyi desteklemektedir. Kodlama bölgelerinin baskınlığına rağmen, mitokondri genomunda “D-loop” veya “displacement-loop” adı verilen kodlamayan sekans içeren bir bölge vardır (Anderson, 1981). D-loop, bakterilerin kendi genomlarının replikasyonu için kullandığı başlangıç bölgesine benzemektedir. D-loop hem replikasyonu hem de transkripsiyonu başlatmak için diziler içerir, bu onu mitokondri genomun önemli bir parçası yapar (Turnbull, 2010).

Mitokondriler, haploit kromozom setine sahip olup maternal olarak kalıtılırlar yani n kromozomlu olarak yavruya anneden geçerler, babanın spermelerinin yavruya aktarımının olmadığı "homoplazmi", nadiren de olsa bir canlıda 1'den fazla çeşit mtDNA görülebildiği durumlar "heteroplazmi" söz konusu olabilmektedir (Moritz, 1987, 1991; Bentzen, 1988). Heteroplazmi, sperm hücresindeki mitokondrilerin döllenme sırasında yumurtaya geçişi veya mutasyonel kaynaklı mtDNA'daki değişimler

olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşebilir ki (Moritz, 1987; Bentzen, 1988; Moritz, 1991).Tirsi (Birmingham vd., 1986), Atlantik ringası (Bentzen vd., 1988), hamsi (Magoulas ve Zouros, 1993) ve Mersin (Eroğlu, 2009) türlerinde görülmektedir.

Mitokondri genomu neredeyse tüm ökaryotlarda yaşam için esastır. Balıkların mitokondri genom DNA'sının tamamı, yaklaşık 14 ila 18 kbç arasında değişen ve özerk şekilde çoğalan ve kopyalayan, kompakt, çift sarmallı ve kapalı dairesel bir moleküldür (Şekil 7), (Wolstenholme, 1992; Boore, 1999). Her ne kadar bazı organizmalarda gen düzenlemeleri tanımlanmış olsa da (Miya ve Nishida, 1999; Shao vd., 2001; Yuan ve Zhaoxia, 2009), balıklardaki mitokondri genomunun gen içeriği ve organizasyonu oldukça korunmuştur. Birkaç istisna dışında, tüm hayvan mitokondri genomları, genellikle 13 protein kodlama genini, 22 transfer RNA (tRNA) genini ve iki ribozomal RNA (rRNA) genini ve ayrıca A + T bakımından zengin kodlama yapmayan bir bölgeyi (kontrol bölgesi) içeren 37 geni kodlar (Haring vd., 1999; Moritz vd., 2003). Mitokondri genomu, tek tek genlerden daha fazla bilgi sağlamakla kalmaz, aynı zamanda gen içeriği, gen düzenlemesi, baz kompozisyonu, replikasyon modları ve genom evrimi ve filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında çok güçlü bir araç haline gelen transkripsiyon gibi genom düzeyinde özellikler gösterir (Anderson vd., 1981). Mitokondri içinde 2-12 kopya halinde bulunabilen mt DNA sayısı hücrede ortalama olarak 1000-10.000 arasında değişmektedir (Wiesner vd., 1992).

Mitokondri genomu intron bulundurmadığı dolayısıyla DNA'sının neredeyse tamamı kodlanabildiği halde nükleer DNA ile karşılaştırıldığında 10 kat daha polimorfiktir ve hasara karşı oldukça savunmasızdır (Moritz ve Brown, 2003). Bunun nedeni, mtDNA'nın nDNA'ya oranla çok az sayıda tamir mekanizmasına sahip olması ve nDNA'nın aksine DNA'yı koruyacak histonları olmaması ve ETC'deki oksidoredüksiyon reaksiyonlarının reaktif doğaları nedeniyle DNA'ya zarar verebilen reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği olmasıdır (Turnbull, 2010). Az da olsa mtDNA'daki tamir yollarına rağmen, mtDNA'da hala birçok polimorfizm vardır ve DNA hasarının birikmesi çoğaltma ve transkripsiyonda zorluklara neden olabilir. Bu, özellikle mitokondride bir sorundur çünkü kodlamayan çok az sekans vardır ve mutasyonlar kolayca biyokimyasal kusurlara neden olabilir. MtDNA bu tür bir risk

1.5. Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite I (COI) Geni

Sitokrom c oksidaz kompleks enzimi, bakteri, arkeler ve ökaryot mitokondrilerinde bulunan büyük bir transmembran protein kompleksi olup oksijenin suya indirgenmesini dolayısıyla elektronların sitokrom c'den oksijene transferini katalize eden solunum reaksiyonlarındaki elektron taşıma zincirinin terminal bileşenidir. COX-1, COX-2 ve COX3 katalitik alt birimleri, mitokondri DNA (mtDNA) tarafından kodlanır ve enzim kompleksinin işlevsel çekirdeğini oluşturur. COI, enzimin katalitik alt birimidir (Anderson vd., 1981; Tsukihara vd., 1996; Ingman vd., 2000).

1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) ortaya çıkması, çeşitli organizmaların genomik yapısı üzerinde yapılan çalışmaların ilerlemesini büyük ölçüde hızlandırmıştır ve çok karmaşık olan genomlardaki herhangi bir bölge, komşu nükleotit sekansları ise, teknikle birkaç saat içinde özgün olarak artırılabilir (Saiki vd., 1988). Hemen hemen her DNA dizisi, DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ve ligaz kullanılarak "keserek ve yapıştırarak" manipüle edildiği konvansiyonel rekombinant DNA teknolojisine yerine PCR ile "kopyalanıp yapıştırılarak" da tasarlanabilir (Frohman ve Martin, 1989). Bu nedenle PCR, restriksiyon endonükleazların kesim bölgelerinin sınırlı mevcudiyeti ile ilgili problemlerin üstesinden gelir. PCR, tek bir DNA molekülünden bile başlatılabilir ve sonuç olarak birçok geleneksel analitik fraksiyonlama tekniği şimdi öncekinden çok daha etkilidir (Mullis vd., 1994).

Polimeraz zincir reaksiyonu veya PCR, özel bir DNA bölgesinin milyarlarca kopyasını in vitro yapmak için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. PCR, kopyalanmak istenen hedef bölgeyi içeren kalıp DNA, bir termostabil DNA polimeraz, deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTPs) ve özellikle ilgilenilen DNA bölgesi için tasarlanmış DNA primerlerini gerektirir. Genellikle 20 nükleotit uzunluğunda, kısa zincirli tek iplikli DNA parçaları olan DNA primerlerle kopyalanacak veya büyütülecek DNA bölgesi belirlenir. DNA primerler, kopyalanmak istenen bölgenin her iki ucunda, kalıp DNA'nın zıt ipliklerine tamamlayıcı baz eşleşmeleri ile bağlanmalarını sağlayacak

diziler içerir. Tipik olarak PCR'de kullanılan DNA polimeraz, izole edildiği ısıya toleranslı bakterinin (*Thermus aquaticus*) adına atıfta bulunarak Taq DNA polimeraz olarak adlandırılır. DNA sentezi için bir başlangıç noktası sağlayan kısa bir nükleotit sekansı verildiğinde Taq DNA polimeraz primerin bağlandığı bölgeyi tanıyarak bu noktada kalıp zincirdeki nükleotide karşılık gelen dNTP'leri DNA primere bağlayarak çalışmaya başlar (Reece vd., 2011, 2012).

PCR reaksiyonunun temel bileşenleri, Taq polimeraz, primer, kalıp DNA ve nükleotitlerdir (DNA yapı taşları). Bileşenler, enzim tarafından ihtiyaç duyulan kofaktörlerle birlikte bir tüpe konur ve DNA'nın sentezlenmesini sağlayan tekrar tekrar ısıtma ve soğutma döngülerinden geçirilir.

Isıl döngü cihazında gerçekleştirilen PCR reaksiyonun ana basamakları;

Denatürasyon: DNA iplikçiklerini ayırmak veya denatüre etmek için reaksiyonu karışımı için yaklaşık 95°C'deki ısıtma aşamasıdır. Bu, bir sonraki adım için tek iplikli kalıp sağlar.

Primer bağlanması: Reaksiyon ısını primerlerin nükleotit içeriğine göre hesaplanan primer bağlanma sıcaklığına kadar düşürerek (55-65°C), primerler tek iplikçikli kalıp DNA üzerindeki tamamlayıcı sekanslarına bağlanabilir.

Uzatma: Reaksiyon sıcaklıkları Taq DNA polimeraz'ın çalışabileceği 72°C'ye yükseltilerek, primerlerin önünden itibaren yeni DNA ipliklerini sentezlenir.

Bu döngü, kopyalanmak istenen DNA bölgesinin uzunluğuna bağlı olarak, genellikle 2-4 saat süren tipik bir PCR reaksiyonunda 25-35 kez tekrar edilir. Eğer reaksiyon başarılı olursa hedef bölgenin milyarlarca kopyası yapılabilir. Bunun nedeni, her seferinde kalıp olarak kullanılan sadece orijinal DNA değil. Bunun yerine, bir döngüde yapılan yeni DNA, bir sonraki DNA sentezinde bir kalıp olarak kullanılabilir. Primerlerin birçok kopyası ve reaksiyon tüpünde birçok Taq polimeraz molekülü vardır, bu nedenle DNA moleküllerinin sayısı her döngüde kabaca üstel olarak iki katına çıkar. PCR reaksiyonunun sonuçları olan DNA fragmanları genellikle jel elektroforezi kullanılarak görselleştirilir (Reece vd., 2011, 2012).

1.7. DNA Dizin Analizi

Sanger vd. (1977)'nin geliştirdiği ve bakteriyofaj DNA'sının belirli nükleotit dizilerinin belirlenmesi amacıyla tek iplikçikli DNA  zerindeki özgün bir tamamlayıcı bölgeye hibridize edilen sentetik oligonükleotit primer başlangıç noktası olarak kullanarak 3'-OH ucuna sırayla DNA polimeraz'ın yardımıyla deoksin kleotit (dNTP) ve ³²P ile radyoaktif olarak işaretili dideoksin kleotitler (ddNTP) kullanılmasını içeren zincir sonlanması reaksiyonları olarak da isimlendirilen DNA dizi analizi yöntemidir. Zarar verici kimyasalların kullanılmadığı ve diğer yöntemlere göre daha hızlı sonuç verdiğinden tercih edilir (Sanger vd., 1977).

Bu yöntem için; Tek iplikçi kalıp DNA'ya, dNTP, ddNTP, DNA polimeraz ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. Sanger zincir sonlama yönteminde DNA zinciri nükleotit dizisi belirlemek için yeni sentezlenecek zincir için kalıp olur. DNA sentezini sağlamak için Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır.

Sanger zincir sonlama yöntemi DNA polimerazın deoksiribon kleozit trifosfatı substrat olarak kullanabilmesi temellidir. Sentezlenecek DNA zincirine bir ddNTP' nin katılması sentezi durdurur bunun sebebi 3' pozisyonunda OH grubunun bulunmamasıdır. Dizi analizinin yapımı dört ayrı reaksiyon karışımı ile gerçekleşir. Bu karışımlarda kalıp DNA zinciri, oligosentetik primer, DNA Polimeraz, dört çeşit dNTP ve herbir tüpte özgül zincir sonlanması için sadece bir çeşit ddNTP içerir (Klug ve Cummings, 2000).

Hedef DNA'ların dizi analizinde ddNTP'leri tanımak için floresan boyalar kullanılır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları, bilgisayara elektroforez sistemi ve elektroforezi yöneten programlarla yüklenir. Elektroforetik  nitede lazer ışık kaynağının oluşturduğu monokromatik ışık DNA'nın bulunduğu jel matriksi taranır. Bu süre boyunca DNA kendine bağlanan boya ile taranmış bölgeye ulaşınca uyarılır ve uyarılan boya kendi için özel olan dalga boyundaki ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti kaydedilir (Sambrook vd., 1989). Kromatogram üzerinde farklı bazlar için dört farklı renk konumlanması vardır. Guanin bazı siyah, adenin bazı yeşil, timin bazı kırmızı ve

sitozin bazı mavi renkle ifade edilir. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilir (Sambrook vd., 1989).

PCR reaksiyonların sonucunda elde edilen reaksiyon karışımları yüksek çözünürlüklü poliakrilamid jelde elektriksel alana maruz bırakılarak farklı büyüklükteki DNA parçaları ayrıştırılır. Jel üzerinde DNA parçacıkları büyüklükleriyle ters orantılı olacak şekilde hareket edeceğinden basamak şekli oluştururlar. Herbir tüpteki radyoaktif veya floresan olarak farklı renkte işaretli ddNTP' lerinin görüntüleme sisteminde okunması sayesinde zinciri sonlandıran nükleotitler tespit edilerek hedef DNA parçasının nükleotit dizileri belirlenir (Klug ve Cummings, 2000).

İnsan genom projesi gibi büyük projelerde iş yükünün ve kaybedilecek zamanın fazla olması nedeniyle zamanla otomasyona geçilmiştir. Otomatik DNA dizi analizleri zaman tasarrufu, standart çalışma koşullarında kolaylık ve sonuçların daha anlaşılır olmasında yarar sağlamıştır.

1.8. Filogenetik Analizler

1.8.1. Mesafe Temelli Yöntemler

1.8.1.1. Komşu Birleştirme Metodu “Neighbour Joining“

Saitou ve Nei (1987) tarafından geliştirilen ve Studier ve Keppler (1988) tarafından geliştirilen ve evrimsel genetik mesafelerden mesafeye dayalı filogenetik ağaç oluşturmak için en yaygın kullanılan yöntemdir. Filogenetik ağaçların evrimsel uzaklık verilerinden yapılandırılması için önerilen yöntemlerden biri olan komşu birleştirme yönteminin prensibi, yıldız benzeri bir ağaçla başlayan operasyonel taksonomik ünite çiftlerinin (OTU) kümelenmesinin her aşamasında toplam dal uzunluğunu en aza indiren komşuları hızlı bir şekilde bulmaktır (Saitou ve Nei, 1987). Genetik olarak birbirlerine en yakın operasyonel taksonomik üniteleri bir araya toplayarak başlangıç analizleri için hızlı ve kolayca köksüz ve dal uzunlukları farklı ağaçlar oluşturur (Saitou ve Nei, 1987).

Srivathsan ve Meier (2012), DNA-barkodlama çalışmalarında Kimura-2-parametresi (K2P; Kimura 1980) modelinin kullanımının doğrulandığına dair kanıtlar sunmuştur. K2P'nin, yakından ilgili COI sekansları için uygun bir model olarak onaylandığını gösterilmiştir. Ayrıca, düzeltilmemiş mesafelerin kullanımının, komşu birleştirme ağaçları ve mesafeye dayalı tanımlama teknikleri için daha yüksek veya benzer tanımlama başarı oranları verdiğini göstermektedir. K2P ayrıca yakından ilgili sekanslar için barkod boşluğunu genişletmediği değerlendirmiştir (Srivathsan ve Meier, 2012).

1.8.2. Karakter Temelli Yöntemler

1.8.2.1. Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony) Metodu

Maksimum tutumluluk, yapraklara atanan belirli bir veri setini açıklamak için gereken toplam evrimsel adım sayısını en aza indirerek filogenetik bir ağaç oluşturan karakter tabanlı bir yaklaşımdır (Kannan ve Wheeler, 2012).

Tutumluluk ilkesi, en fazla sayıda gözlemi açıklayan en basit açıklamanın daha karmaşık açıklamalara tercih edildiğini belirtir. Çoğu filogenetik uzmanı, soy ağacının izahının tutumluluk ilkesine dayandığını, yani gözlenen karakterlerin benzerliği ile ilgili hipotez gereksinimlerini en aza indirecek şekilde evrimsel ağaçları seçtiğini kabul etmektedir (Faris, 1983). Diğer bir deyişle filogeni çıkarımında maksimum tutumluluk prensibi, gözlenen farklılıkları açıklamak için en az değişiklik gerektiren bir ağaç topolojisinin tanımlanmasını içerir. Bunlara giden en kısa yol en iyi ağaç olarak seçilir. Maksimum parazit analizinde kullanılan ağaçlar genel olarak köksüz ağaçlardır (Steel ve Penny, 2000).

1.8.2.2. Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) Metodu

Sekans verilerinden filogenilerin çıkarımı için maksimum olabilirlik yaklaşımı Felsenstein (1981) tarafından tanımlanmıştır. Felsenstein (1981) yöntemi, soylar arasında evrimsel oranın sabitliği konusunda herhangi bir kısıtlama getirmemektedir. Mutasyon olaylarına yalnızca saymak yerine nicel olasılıklarını tayin eder. Bu yöntem,

muhtemel filogenetik ağaçları, gözlemlenen verileri tahmin etme yeteneklerine dayanarak karşılaştırır. Gözlenen dizileri üretme olasılığının en yüksek olduğu ağaç tercih edilir. Maksimum tutumluluğa benzer şekilde, maksimum olasılık ele alınan her bir ağacın tüm düğümlerindeki ataları yeniden yapılandırır, ancak aynı zamanda mutasyonların olasılığına dayanarak dal uzunlukları atar. Her olası ağaç topolojisi için varsayılan baz değişim oranları, gözlenen dizilerin üretilme olasılığını en yüksek veren parametreleri bulmak için değiştirilir.

Pek çok açıdan bakıldığında, maksimum ihtimal fillogeni tahmin etmenin çekici bir yolu gibi görünmektedir (Whelan vd., 2001). Verilerle uyumlu olan tüm olası mutasyonel yollar göz önünde bulundurulur. Olabilirlik fonksiyonlarının istatistiksel çıkarım için tutarlı ve güçlü bir temel olduğu bilinmektedir (Edwards, 1972). Bu yöntem, diziler arasındaki evrimsel ilişkileri iyi temsil eder. Evrimsel sürecin geçişlere karşı dönüşüm olasılıkları veya evrim hızının siteler arasında farklılık gösterme derecesi gibi çeşitli parametrelerini dikkate alır. Biyoloğun bu parametrelerin doğru değerlerini bilmesi gerekmez; ağaç değerlendirme sürecinde tahmin edilmektedir (Makarenkov vd., 2004).

Maksimum olasılığın yaygın bir şekilde kullanılmasının önündeki en önemli engel hesaplama süresidir. Maksimum olabilirlik puanını bulan algoritmalar, çok boyutlu bir parametre alanında arama yapmalıdır. Bu, büyük ölçekli sorunların çözümünü (> 100 dizi) son derece zaman alıcı hale getirir. Maksimum olabilirlik tahmini sistematik hatalara maruz kalabilir. Bu, verilen ağaçların olasılığını değerlendirmek için kullanılan evrim modelinin gerçek evrimsel süreçleri yansıtmaması durumunda gerçekleşir (Makarenkov vd., 2004).

1.9. DNA Barkodlama

DNA barkodlama türlerin tanımlanmasında genetik bir yaklaşım olup ökaryot canlılarla her hücrenin mitokondrisinde bulunabilen belirli bir gen - sitokrom c oksidaz 1 (COI) bölgesini dizilemeyi içerir. COI kullanmanın avantajı, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz bir şekilde dizilenecek kadar kısa, ancak her tür için benzersiz bir “barkod” sağlayacak kadar uzun olmasıdır. Ayrıca, organizmanın hemen hemen her yerinden küçük doku örnekleriyle tanımlama yapılabilir. DNA barkodunun amacı, tüm ökaryotlar için türe özgü bir sekans kütüphanesi geliştirmektir. Hayvan gruplarındaki tür düzeyinde tanımlama için sitokrom c oksidaz 1 (COI) geninin yaklaşık 650 bp’lik bir parçası başarıyla kullanılmıştır (Meusnier vd., 2008).

Tür tanımlamanın hızlı ve etkili bir yolu olan DNA barkodlama, türler arasında karşılaştırma yapmak için dört farklı nükleotidin bir karışımından oluşan kısa bir DNA dizisinin kullanılması üzerine kuruludur. Tür içinde varyasyon göstermediği halde türler arasında belirgin bir ayrım sağladığı ve iki yönlü dizilemede tek bir primer çifti ile kolayca üretilebildiği için mtDNA sitokrom c oksidaz 1 (COI) geninin 5' ucundaki yaklaşık 650 bp’lik kısa bir bölge tüm hayvanlar için pratik ve standartlaştırılmış ideal bir DNA barkodu olarak nitelendirilir (Hebert vd., 2003b). Daha kısa bir sekans, nükleotidler arasında yeterli varyasyona izin verecek kadar veri sağlamayabilir.

Barkodlama önceliği, türler arasındaki farklılık düzeyinin tür içindekinden çok daha büyük olduğunu ve bu gerçeğin, önemsiz bir hata oranına sahip bireylerin açık bir şekilde tanımlanmasını sağlayacak bir barkodlama aralığına neden olduğunu iddia etmektedir (Hebert vd, 2003b; Hebert vd., 2004). DNA barkodlamanın tür tanımlama için uygun bir araç olması için en yakın türler arasındaki genetik mesafe ile en yüksek tür için genetik mesafe arasında "barkod aralığı" olarak adlandırılan bir eşik tanımlanmış ve türler arasında dizi farklılığının türler içinde olduğundan çok daha büyük olup olmadığını incelemek için uygulanmıştır. Eğer türlerarası farklılık tür içi varyasyondan açık şekilde büyükse barkod aralığının varlığı rapor edilmiştir (Hebert vd., 2003b). Tür içi ve türlerarası farklılık daha fazla çakıştığı diğer bir deyişle en iyi

olasılıkla çok küçük bir barkod aralığının tanımlandığı durumlarda DNA barkodlama daha az etkili bir araç haline gelir (Meyer ve Paulay, 2005).

DNA barkodlama gözden geçirilen çalışmalarda incelenen çoğu tür için yüksek düzeyde taksonomik ayırım gücü (>%95) sağlamıştır. (Hebert vd., 2003b), 13320 farklı cinse ait tür çiftlerini kapsayan bir çalışmada tür içi varyasyon genellikle %1'den nadiren %2'den az iken ortalama türler arası ayrılma %11.3 civarına bulunmuştur. COI'deki tür içi ve türler arasında bu fark balıklarda da gözlenmiştir (Ward vd., 2005; Smith vd., 2008; Ward vd., 2008a, b; Steinke vd., 2009; April vd., 2011; Costa vd., 2012; Keskin ve Atar, 2013; Geiger vd., 2014; Knebelsberger vd., 2014). Üstelik, balıklarda kriptik çeşitliliğin delillerini veren tür içi varyasyonun ortaya çıkartılmasında da kullanılmıştır (Ward vd., 2008b; Zemlak vd., 2009; Hubert vd., 2010; Puckridge vd., 2013; Geiger vd., 2014).

DNA barkodu, morfolojik karakterlere dayanarak tanımlanması zor olan türlerin tanımlanması için bir araç olarak kullanılabilir veya sorunlu türlerin sınırlandırılması ve tanımlanmasında destekleyici bir taksonomik araç olarak kullanılabilir (Hebert vd., 2003a). Ayrıca, mükemmel referans veritabanları olarak hizmet edebilen ve çoğu koleksiyonda bulunan tanımlanmamış birçok örneği tanımlamanın yanı sıra yeni koleksiyonları belirlemeye yardımcı olabilecek, balık müzelerindeki koleksiyonlara DNA barkodlama uygulaması için büyük bir potansiyel vardır. Bu nedenle DNA barkodu, çok sayıda balık türüne, uzman taksonomistlerin yetersizliğine rağmen koruma ve biyolojik çeşitlilik değerlendirmeleri için önemli bir destek aracı olma potansiyeline sahiptir.

1.10. Literatür Özeti

Šedivá vd., 2008 yapmış oldukları çalışmada, *Oxynoemacheilus bureschi* 'nin (Drensky, 1928) diğer Avrupalı türler ile filogenetik ilişkileri kadar dağılım gösterdiği üç drenajın sistemindeki (Struma, Mesta ve Vardar) genetik farklılaşması mitokondri sitokrom b geni kullanılarak değerlendirmişlerdir. Filogenetik rekonstrüksiyon, yüksek seç bağla değerlerine sahip Avrupa barbatula içinde iki ayrı klad olduğu ortaya konulmuştur. İncelenen *O. bureschi* populasyonları arasında ve içinde çok düşük

genetik çeşitlilik bulunmuştur. Demografik modellere göre, *O. bureschi* nin dağılım alanı yakın geçmişte genişlemiştir. Güney Balkanlardaki balıklar için alışılmadık bir durum olan varyasyon eksikliğini, Pleyistosen sırasında nehrin yakalanması, birleşme olayları ve deniz kıyısı gerilemesine bağlı olarak *O. bureschi* 'nin dağılımın kolaylaştırılmasına atfetmişlerdir.

Šedivá vd. (2010) yapmış oldukları çalışmada, *Oxynoemacheilus bureschi* 'nin (Drensky, 1928) dağılım gösterdiği Struma, Mesta, Vardar ve Tuna nehirlerinden örneklerin genetik analizi bir mitokondri bir nükleer belirteç kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu populasyonlar arasında genetik farklılaşma genel olarak düşüktü ve uzak bölgeler ve farklı nehir sistemleri arasında bile paylaşılan haplotipler yaygındı. Sonuçlar, bu populasyonlar arasında yüksek derecede bir gen akışına işaret eder ki Tuna Nehri'nde de olduğu gibi Vardar Nehri'ndeki nüfusun son zamanlarda ortaya çıktığını ve insan kaynaklı bir girişimin dışlanamayacağını göstermektedir.

Kolangi-Miandare ve Askari, 2014 yapmış oldukları çalışmada, İran'ın batısındaki Sepidbarg, Gamasiab ve Ghaleji nehirlerinden toplanan *Oxynoemacheilus argyrogramma* 'nın genetik çeşitliliği ve populasyon yapısını araştırmışlardır. Üç mikrosatellit lokusunun analizi, populasyondaki ortalama allel sayısının tatlısu balık türleri için rapor edilenlerin oldukça yüksek olarak 12 olduğunu belirttiler. Beklenen (H_e) ve gözlenen (H_o) heterozigotluğun sırasıyla 0.865 ve 0.576 olduğu ve hemen hemen tüm lokuslar Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) sapma gösterdiğini bildirdiler. Sonuçlar, *Oxynoemacheilus argyrogramma* 'nın araştırılan bölgelerde dikkate değer düzeyde genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermişlerdir.

Freyhof, vd., 2016 yapmış oldukları çalışmada, *Ilamnemacheilus longipinnis* incelenmiş ve *Ilamnemacheilus* ile *Oxynoemacheilus* arasında bir fark bulunamamıştır. Bu nedenle, *Ilamnemacheilus*, *Oxynoemacheilus*'un eş anlamlısı olarak kabul edilmiştir. Orta doğu ve batı Hindistan'da meydana gelen tüm Nemacheilid cinslerinden elde edilen COI barkod dizileri ilk kez ortak olarak analiz edilmiştir.

Jouladeh-Roudbar vd., 2016 yapmış oldukları çalışmada, yeni bir Nemacheilidae türü olan *Oxynoemacheilus freyhofi* sp. 'yi Kasım Bakhtiyari Nehri, Karoun Nehri drenajı, İran'ın bir kolu olan Roudbar Nehri'nde tarif etmişlerdir. Türler, türdeşlerinden farklıdır. 10½ dallı ışınları olan sırt yüzgeci; eşit boyutta loblara sahip çatallı kuyruk yüzgeci; ince ve sıkıştırılmış kaudal sapı ve tam yanal çizgi; üst dudağa çok küçük veya eksik median insizyonu; erkeklerde suborbital oluşunun olmaması, *Oxynoemacheilus freyhofi*, türdeşlerinden K2P ile % 4.5 arasında *O. argyrogramma* ile % 12.9 ile *O. bergianus* arasında ayırım yapmışlardır.

Sayyadzadeh vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada, İran Sirvan Nehri drenajı yan kollarından yeni tür *Oxynoemacheilus parvinae*'nin erkeklerinde suborbital oluğa ve uzun gövdeye sahip bir *Oxynoemacheilus* grubuna ait olduğunu ifade etmişlerdir. Dicle Nehri drenajındaki bu grubun diğer türlerinden bir seri metrik ve meristik karakterlerin bir araya gelmesiyle ayırt edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca en yakın türlerden (*O. bergianus* ve *O. longipinnis*) mtDNA COI barkod bölgesindeki iki yerleşik nükleotit baz değişimi ve en yakın komşusu *O. longipinnis* ile % 1,4'luk ile K2P mesafesi ile teşhis edilmiştir. COI barkod bölgesine dayalı olarak yeniden yapılandırılmış maksimum olasılık ve Bayesian filogenisi, dizilenmiş nemacheilid balıkları % 1.4 (*O. parvinae* - *O. longipinnis*) ile % 16.3 (*O. longipinnis* - *O. merga*) arasında K2P dizisi ayrışması sergileyen monofiletik bir klada yerleştirmiştir.

Freyhof ve Geiger (2017) yapmış oldukları çalışmada, daha düşük Dicle Nehri'nin bir kolu olan Küçük Zab Nehri drenajından yeni bir tür olarak *Oxynoemacheilus zarzianus* tanımlanmıştır. Fırat ve Dicle drenajındaki *Oxynoemacheilus* tür çeşitliliği olağanüstü yüksek olduğu ve günümüzde tüm Fırat ve Dicle drenajlarından 22, sadece Dicle drenajından 15 tür bilindiği rapor edilmiştir.

Jalili vd., 2017 yapmış oldukları çalışmada, İran iç sularındaki *Oxynoemacheilus bergianus* un filogenetik ilişkileri, Hazar Denizi, Namak ve Urmiye Gölü havzalarında osteolojik karakterleri kullanılarak incelemişlerdir. 21 osteolojik karakter kullanılmış ve *Garra rufa* dış gruba alınmıştır. Tanımlanan karakterlere dayanan bir filogenetik analiz, en çok eşzamanlı dört cladograma yol açmıştır (36 adım, CI = 0.69, RI = 0.5). Kesin bir

fikir birliği ağacı, *O. bergianus* 'un popülasyonlarının monofiletik bir grup olduğunu göstermiştir. Qareh-chai, Qezel-ozan ve Sefid nehirlerinin popülasyonlarının, incelenen diğer *O. bergianus* popülasyonları için bir kardeş grup oluşturduğu doğrulanmıştır.

Perdices vd., 2018 yapmış oldukları çalışmada, Batı Palearctic özellikle de Türkiye'deki Cobitis türlerinin mitokondri (cyt b) ve nükleer (RAG1) dizilerine dayanan filogenisine odaklandıkları çalışmalarında analizlerden elde edilen sonuçlar, Türkiye'nin Akdeniz'deki en yüksek Cobitis çeşitliliğinin olduğu bölge olarak ortaya koymaktadır

Sayyadzadeh vd., 2018 yapmış oldukları çalışmada, *Paraschistura delvarii* Mousavi-Sabet ve Eagderi, 2015, aslen Pers Körfezi havzasının Mond Nehri drenajından toplanan altı örneğe dayanarak tanımlanmışlardır. Ancak, türlerin ve yeni toplanan materyallerin incelenmesine dayanarak, *P. delvarii* 'nin yanlış tanımlandığı anlaşılmıştır. Burada, doğru morfolojik karakterlere ve moleküler veri setine dayanarak *P. delvarii* 'yi yeniden tanımlamışlar ve ayırt edici karakterlerini sempatik loblar, *P. naumanni*, *P. nielsenii* ve *Oxynoemacheilus persa* ile birlikte sağlamışlardır.

Turan, vd., 2019 yapmış oldukları çalışmada, bir moleküler marker (COI), 25 morfometrik ve dört meristik karakterin analizi ile Karadeniz havzasındaki diğer türler olan *O. banossui*, *O. samanticus* ve *O. angorae* 'den ayrılan Doğu Karadeniz havzasındaki Çoruh Drenajından yeni bir tür olarak *Oxynoemacheilus cemali* 'yi tanımladılar. *Oxynoemacheilus cemali*, Karadeniz havzasının dışında da dağılım gösteren yakından ilişkili türler *O. araxensis* ve *O. cyri* 'den COI barkod bölgesindeki sırasıyla 15 ve 31 tanısal nükleotit baz değişimi ile ayırt edildiğini bildirmiştir.

şimdiye kadar mitokondri DNA, popülasyon genetiği (Avisé vd., 1984; Lee vd., 2010; Ma vd., 2011), türlerin tanımlanması (Rubinoff vd., 2006; Gvoždík vd., 2010) ve filogenetik ilişkiler (Rasmussen ve Arnason, 1999; Miya ve Nishida, 2000) üzerine yapılan araştırmalarda geniş çapta uygulanmıştır, Mitokondri DNA'nın kendi içinde evrim hızının farklı bölgelere sahip olması, birkaç balık grubunun sınıflandırılması

yapılırken uygulanan genetik çalışmaları için güzel bir yoldur (Kocher ve Stepien, 1997).

Barkod bölgesi, tür içinde düşük düzeyde çeşitlilik gösterecek şekilde korunmuş ancak birçok farklı tür arasında ayrılmaya izin verecek düzeyde farklılık gösterdiği için balıklarda (Ward vd., 2005; Hubert vd., 2008; Bhattacharjee vd., 2012; ve Laskar vd., 2013) güçlü bir şekilde tür düzeyinde çözünürlük sağladığı için başarılı bir şekilde barkod olarak hizmet etmiştir. Ayrıca, bu bölge kullanılarak dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki büyük nehir sistemleri (Ardura vd., 2010) ve birçok gölün balık faunası (Aquilino vd., 2011; Triantafyllidis vd., 2011 gibi) özel olarak çalışılmıştır.

1.11. Tezin Amacı

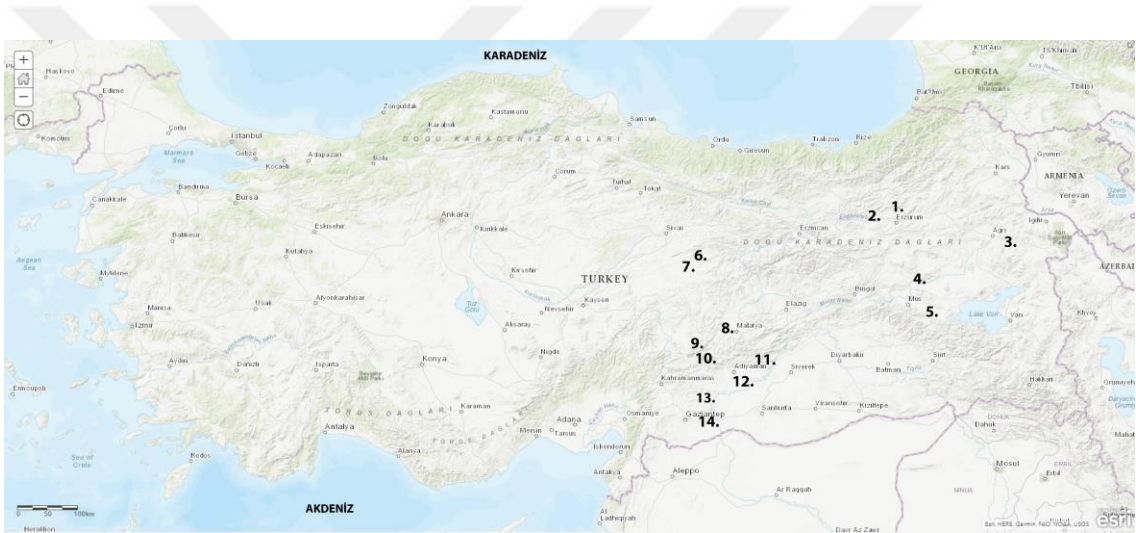
Türkiye tatlısu faunası üzerine yapılmış olan dikkate değer düzeyde moleküler taksonomi çalışması olmasına rağmen bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmaların büyük çoğunluğunda çeşitli mitokondri genleri (Durand vd., 2000; Hrbek vd., 2002; Kotlik vd., 2004; Susnik vd., 2005; Bardakcı vd., 2006; Turan, 2008; Perea vd., 2010; Bektaş vd., 2011, 2013; Levin vd., 2012) analiz edilmiştir. Hâlbuki genetik barkodlama çalışmaları kapsamında mitokondri DNA'sındaki sitokrom c oksidaz I (COI) geninin incelenmesi evrensel bir standart olarak kabul edilmektedir. NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasında, Keskin ve Atar (2013) tarafından girilmiş “DNA Barkod” bölgesi olarak COI ile ilgili Türkiye tatlısu balık faunasına ait sadece 9 ekonomik değeri olan türe (*Alburnus alburnus*, *Alburnus tarichi*, *Clarias gariepinus*, *Cyprinus carpio*, *Salmo trutta*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Silurus glanis*, *Tinca tinca* ve *Vimba vimba*) ait veri vardır.

Bu tez çalışması ile Türkiye'nin Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* populasyonlarının genetik teşhisi, mitokondri DNA COI dizilerine dayalı olarak DNA barkodlarının oluşturulması ve *Oxynoemacheilus* türlerinin filogenetik ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Oxynoemacheilus genusunun ait altı türe ait örnekler, ülkemizde Fırat nehri ve kollarından biyolojik ve ekolojik özellikleri dikkate alınarak her bir türü temsil edecek sayıda olacak şekilde yeterli sayıda *Oxynoemacheilus* bireyi elektroşoker cihazı kullanılarak Anadolu'nun doğusunda yer alan Erzurum, Ağrı, Malatya, Muş, Sivas, Gaziantep ve Adıyaman illerini kapsayacak şekilde toplamda 14 farklı lokasyondan toplandı (Şekil 8).



Şekil 8. Örneklem alanını ve lokaliteleri gösteren harita

Arazi çalışmaları kapsamında toplamda 167 örnek elektroşoker yardımıyla toplandı. Her bir *Oxynoemacheilus* türünün örnek sayıları, lokasyonların isimleri ve koordinatları Tablo 2 'de verilmiştir. Örneklenen bireyler tür tayin anahtarına göre teşhis edilerek fotoğrafları çekilip etiketlendi. Her bir *Oxynoemacheilus* bireyinden 25-50 mg yüzgeç dokusu alınarak % 96'lık etil alkolde fiksle edildi ve çalışmanın yapılacağı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Genetik Laboratuvarına transfer edildi.

Tablo 2. *Oxynoemacheilus* genusuna ait türlerin toplandığı istasyonlar, koordinatları ve örnek sayıları (N).

	Türler ve Lokasyonlar	Koordinatlar	N
<i>Oxynoemacheilus araxensis</i>			
1	Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	39°55'28.7"K 41°07'17.1"D	10
2	Baş Çayı, Çay Köy, Aşkale, Erzurum	39°56'45.0"K 40°48'03.0"D	10
<i>Oxynoemacheilus bergianus</i>			
1	Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	39°55'28.7"K 41°07'17.1"D	4
2	Baş Çayı, Çay Köy, Aşkale, Erzurum	39°56'45.0"K 40°48'03.0"D	4
3	Murat Nehri, Ballıbostan Köyü, Ağrı	39°40'46.8"K 43°11'34.2"D	5
6	Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	39°16'02.0"K 37°28'29.3"D	5
9	Söğütlüçay Deresi, Malatya	38°45'58.8"K 38°28'32.9"D	5
10	Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	37°50'21.4"K 37°40'35.8"D	11
<i>Oxynoemacheilus euphraticus</i>			
4	Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	39°04'26.9"K 41°31'10.5"D	5
5	Karasu Çayı, Hasköy, Muş	38°41'34.1"K 41°42'51.3"D	5
6	Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	39°16'02.0"K 37°28'29.3"D	7
8	Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	38°20'49.9"K 38°04'25.5"D	5
10	Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	37°50'21.4"K 37°40'35.8"D	5
11	Kahta Çayı, Kocahisar Köyü, Adıyaman	37°57'48.9"K 38°39'44.7"D	5
<i>Oxynoemacheilus paucilepis</i>			
7	Balıklıtohma Çayı, Kocakurt Köyü, Sivas	39°08'39.8"K 37°15'27.2"D	20
<i>Oxynoemacheilus kaynaki</i>			
4	Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	39°04'26.9"K 41°31'10.5"D	15
6	Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	39°16'02.0"K 37°28'29.3"D	6
8	Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	38°20'49.9"K 38°04'25.5"D	8
10	Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	37°50'21.4"K 37°40'35.8"D	14
<i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i>			
12	Karasu Çayı, Araban, Gaziantep	37°24'23.6"K 37°41'12.9"D	8
13	Merziman deresi, Yavuzeli, Gaziantep	37°19'40.5"K 37°40'04.2"D	5
14	Nizip Çayı, Kaleköy, Gaziantep	36°56'56.9"K 37°50'22.2"D	5
Toplam			167

2.2. Yöntem

2.2.1. Total DNA Eldesi

Oxynoemacheilus örneklerinin yüzgeç dokusundan total DNA eldesi, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) protokolüne göre yapıldı. 10-25 mg yüzgeç dokusu alınıp 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne konuldu. Örnek başına 180 µl Buffer ATL ve 20 µl proteinaz K çözeltileri tüpün içerisine ilave edilip ısıtmalı çalkalayıcı cihazında 55°C' de ve 1000 rpm'de doku tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 3 saat inkübe edildi. 3 µl RNase solusyonu eklenip tüpün iyice karışması için birkaç defa ters düz edilip 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışımın içerisine 200 µl Buffer AL çözeltisi eklenip yüksek hızda 20 saniye vortekslendikten sonra 10 dakika 80 °C'de bekletildi. Karışımın tamamı bir pipet yardımıyla filtreli tüpe aktarıldı ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Bu aşamada DNA filtrede tutunurken diğer hücre materyalleri filtreden geçerek tüpün alt kısmında toplandı. Akabinde 500 µl Buffer AW1 çözeltisi eklenip 5 dakika beklendikten sonra 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlemin ardından 500 µl Buffer AW2 çözeltisi eklenip 5 dakika beklendikten sonra 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi ve bu işlemler sonucunda DNA kalan safsızlıklardan temizlenmiş olmaktadır. En son aşamada ise 200 µl Buffer AE ilave edilerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve filtrede tutunan DNA'nın alt kısımda bulunan 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarılması sağlanmış oldu. İzole edilen DNA kısa süreli muhafaza için 2-8 0C'de, uzun süreli muhafaza için ise -20 °C'de saklandı.

2.2.2. Total DNA ve PZR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Total DNA ve PZR ürünlerinin varlığı ve büyüklüğünün tespiti için % 0.8 ve 1.2'lik etidyum bromür ile boyanmış 1X TAE-Agaroz karışımı hazırlandı. 1X TAE tamponunu içeren elektroforez küvetinde 100 voltta 15 dakika elektrik alana maruz bırakıldı. Örneklerin yürütüldüğü agaroz jelin görüntülenmesi işlemi Quantum-Capt ST4 sistem (Vilber Lourmat, France)'deki ultraviyole transillüminatör cihazında gerçekleştirildi. Total DNA ve PZR ürünlerinin konsantrasyonunu, saflığı ve kalitesi

Nanodrop 2000C model spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) cihazında belirlendi.

2.2.3. PZR Uygulamaları

Örneklerin izolasyonundan elde edilen total DNA'lardan mitokondriyal DNA'ya ait sitokrom oksidaz alt ünite I geninin barkod (mtDNA COI-Barkod) bölgesinin kopyalanması için Polimeraz Zincir Reaksiyonunda gerekli kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 3 'te verilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonunu gerçekleştirmek için T100TM PCR Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA) model PZR cihazı kullanıldı.

Tablo 3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Konsantrasyon	COI-Barkod
10X PZR tamponu		5µl
dNTP karışımı	10 mM	6µl
MgCl ₂	25 mM	5µl
Primerler*	10 pmol	1µl +1µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.2µl
Total DNA	50 (ng/ml)	3µl
ddH ₂ O		28.8µl
Toplam		50µl

*İleri ve geri primerler

Primerlerin erime sıcaklığının (T_m) ve PZR için gerekli olan bileşenlerin miktarlarının optimizasyonu için gradient reaksiyonlar oluşturuldu. MtDNA COI-Barkod geni için FishF1: 5-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3 ve FishR1: 5- TAGACTTC TGGGTGGCCAAAGAATCA-3 (Ward vd., 2005) erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak her iki çift primer için oluşturulan gradient reaksiyonlarda 61.0 °C değerinin uygun olduğu belirlendi. Reaksiyon için uygun erime sıcaklığı belirlendikten sonra Tablo 3'te verilen konsantrasyonlardaki kimyasallar ile Tablo 4 'teki döngü koşulları kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR uygulamalarında olası bir kirlenme olup olmadığını anlayabilmek amacıyla her uygulamada, total DNA içermeyen negatif kontroller kullanıldı.

PZR ürünlerinin kontrolünü gerçekleştirmek için total DNA'nın kalitesinin belirlenmesinde yapılan işlemler % 1,2'lik agaroz jel hazırlanarak tekrarlandı. PZR ürünleri 100 bç'lik DNA Leader (Promega) ile yürütülerek büyüklükleri belirlendi. Bütün işlemler tamamlandıktan sonra istenilen konsantrasyon ve büyüklükte olduğu tespit edilen PZR ürünleri DNA dizin analizi işlemine kadar -20 °C de muhafaza edildi.

Tablo 4. PZR döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	94	3 dk	1
Ayrılma	94	30 sn	
Yapışma	61	30 sn	35
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	5 dk	1
	12	∞	

2.2.4. DNA Dizin Analizi

Oxynoemacheilus türlerine ait mtDNA COI-Barkod geninden kopyalanan PZR ürünlerinin dizin analizleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) kullanarak ABI PRISM 3730x1 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) ile Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'de gerçekleştirildi.

2.2.5. Barkodlama Aralığı ve Tür Sınırlaması

Bu çalışmada, COI veri setine dayalı olarak Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* türlerinin doğru tanımlanması yani COI'nin barkodlama etkinliliğini test etmek için mesafeye dayalı yöntemlerden R (R Development Core Team 2012) programı altında DNA barkodlama paketi Spider v. 1.1-5 (Brown vd., 2012)'a özgü "threshID" işlevi kullanılmıştır.

Dizin benzerliği yöntemi, TaxonDNA/Species Identifier 1.8 programı ile barkod bölgesinin tür tanımlama potansiyeli " En İyi Eşleşme" (BCM) testleri (Meier vd., 2006) ile belirlenen doğru kimliklerin yüzdesi hesaplanarak değerlendirildi. En uygun eşik değerini seçmek için bir eşik değeri aralığı (% 0.1'lik artışlarla % 0.1–4) için

yanlış-pozitif ve yanlış-negatif hataları en aza indiren eşik optimizasyon prosedürünü kullanılmıştır.

Filogeni tabanlı DNA barkodlama ve tür sınırlandırılması için, COI barkod bölgesinin NJ ağaçları Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi MEGA X'de morfolojik olarak da ayırt edilebilen 6 *Oxynoemacheilus* türü için genetik mesafeler kullanılarak oluşturuldu. NJ filogramında, tür monofilisi testi monofiletik türlerin doğru tanımlandığı kabul edilmesi şeklinde gerçekleştirildi.

Hebert vd. (2004) “barkod boşluğunu” ortalama intraspesifik genetik mesafeden en az 10 kat daha büyük ortalama özel bir mesafenin varlığı olarak tanımlamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada barkod aralığı analizinde K2P modelleri türleri sınırlandırmak için ayrıca kullanılmıştır.

2.2.6. Dizi Hizalama ve Filogenetik Analiz

MtDNA COI-Barkod geni dizin analizi sonucunda elde edilen ham verileri filogenetik analizlerde kullanılmak üzere uygun hale getirmek için Bioedit versiyon 7.0.0 (Hall, 1999) programı kullanıldı. Haplotiplerin sayısı, haplotip çeşitlilik ve nükleotit çeşitlilik değerlerinin belirlenmesi işlemleri DnaSP v5 (Librado ve Rozas, 2009) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişkiler, tür içi ve türler arası genetik varyasyon ve polimorfizmin tüm ölçümleri MEGA versiyon X (Kumar vd., 2018) tarafından hesaplandı.

Kimura-2 parametresi modeli, genetik mesafenin hesaplanması için Yaşam Barkodu Konsorsiyumu tarafından (CBOL) tarafından önerilmektedir (Kimura, 1980; Shen vd., 2016). Bu nedenle, bu çalışmada *Oxynoemacheilus* türleri içindeki ve türler arasındaki genetik mesafe Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeli kullanılarak göre hesaplandı.

En uygun evrimsel metodun tespitinin yapılabilmesi için Akaike Bilgi Kriteri (AIC) jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) programı yardımıyla belirlendi. Program tarafından seçilen en uygun baz değişim modeli (TIM1+G) ile maksimum olasılık (ML: Maximum Likelihood) metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçlar 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi ile analizlenmiştir. Komşu katılım (NJ: Neighbour-Joining) metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçlar Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi ile analizlenmiştir. Maksimum tutumluluk (MP: Maximum Parsimony) analizleri buluşsal metoda göre 10 rasgele ilave kopya, TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi ve 100 tekrarlı seç-bağla testi ile analizlenmiştir. Tüm filogenetik analizler için *Seminemacheilus lendlii* (GenBank erişim numarası: KP163989) ve *Barbatula barbatula* (GenBank erişim numarası: MF172074) dış grup olarak kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Genetik Çeşitlilik

Oxynoemacheilus türlerine ait mtDNA COI-Barkod geninin 627 bç'lik dizin analizi, Anadolu'da Fırat nehrinde dağılım gösteren ve toplam 14 farklı lokasyondan örneklenen 167 birey için gerçekleştirildi (Tablo 2). Barkod bölgesindeki nükleotitlerin yüzde frekanslarının T (29.4), C (27.9), A (21.9) ve G (20.8) olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan türler için COI-Barkod nükleotit dizisinin 495'inin korunmuş (% 78,9), 132'sinin değişken (% 21,1) ve 96'sının (% 15,3) parsimonik bilgi vericidir ve polimorfik nükleotit pozisyonları için transisyon/transversiyon oranı 3,96 olarak belirlenmiştir.

Mitokondri COI-Barkod geni dizinleri arasında yapılan haplotip analizi sonucu *O. euphraticus* için 1, *O. argyrogramma* için 2, *O. kaynaki* için 4, *O. araxensis* için 1, *O. paucilepis* için 1 ve *O. bergianus* için 3 olmak üzere toplamda 12 adet haplotip (Tablo 5) belirlenmiştir. *Oxynoemacheilus* genusunun Fırat nehrinde dağılım gösteren türleriyle genetik çeşitlilik yönünden yapılan analizlerde *O. euphraticus*, *O. araxensis* ve *O. paucilepis* düşük haplotip ve nükleotit çeşitlilik göstermiştir ($H_d = 0.000$ ve $P_i = 0.000$; Tablo 5). En yüksek haplotip çeşitlilik *O. kaynaki* ($H_d = 0,735$)'de görülürken, nükleotit çeşitliliğin en yüksek *O. bergianus* ($P_i = 0,005$) türünde olduğu belirlenmiştir (Tablo 5).

Fırat nehrinde dağılım gösteren altı *Oxynoemacheilus* türü arasındaki COI-Barkod geni haplotipleri ikili dizin ayrımına bakıldığında türler arası genetik mesafenin en düşük %3.7 ile *O. euphraticus* ve *O. argyrogramma* arasında ve en yüksek ise % 13.1 ile *O. argyrogramma* ve *O. bergianus* arasında olmak üzere geniş bir değer aralığında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 6). Diğer bir taraftan *Oxynoemacheilus* genusuna ait tür içi ikili dizin farklılığı değerleri ise en düşük % 0,0 (*O. euphraticus*, *O. araxensis* ve *O. paucilepis*) ile en yüksek % 0,5 (*O. bergianus*) değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 5. *Oxynoemacheilus* genusuna ait türlerin örnek sayıları (N), haplotip kodları (H), haplotip sayıları (HS), haplotip çeşitlilik (Hd) ve nükleotit çeşitlilik (Pi) değerleri

Türler ve Lokasyonlar	N	H	HS	Hd	Pi
<i>Oxynoemacheilus euphraticus</i>					
Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	7	H1			
Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	5	H1			
Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	5	H1			
Karasu Çayı, Hasköy, Muş	5	H1			
Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	5	H1			
Kahta Çayı, Kocahisar Köyü, Adıyaman	5	H1			
	32		1	0,000	0,000
<i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i>					
Merzimen deresi, Yavuzeli, Gaziantep	5	H2			
Nizip Çayı, Kaleköy, Gaziantep	5	H3			
Karasu Çayı, Araban, Gaziantep	8	H3			
	18		2	0,425	0,001
<i>Oxynoemacheilus kaynaki</i>					
Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	8	H4			
Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	6	H5			
Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	14	H6			
Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	15	H7			
	43		4	0,735	0,004
<i>Oxynoemacheilus araxensis</i>					
Baş Çayı, Çay Köy, Aşkale, Erzurum	10	H8			
Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	10	H8			
	20		1	0,000	0,000
<i>Oxynoemacheilus paucilepis</i>					
Balıklıtöhma Çayı, Kocakurt Köyü, Sivas	20	H9	1	0,000	0,000
<i>Oxynoemacheilus bergianus</i>					
Baş Çayı, Çay Köy, Aşkale, Erzurum	4	H10			
Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	4	H10			
Murat Nehri, Ballıbostan Köyü, Ağrı	5	H11			
Söğütlüçay Deresi, Malatya	5	H11			
Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	11	H12			
Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	5	H12			
	34		3	0,656	0,005

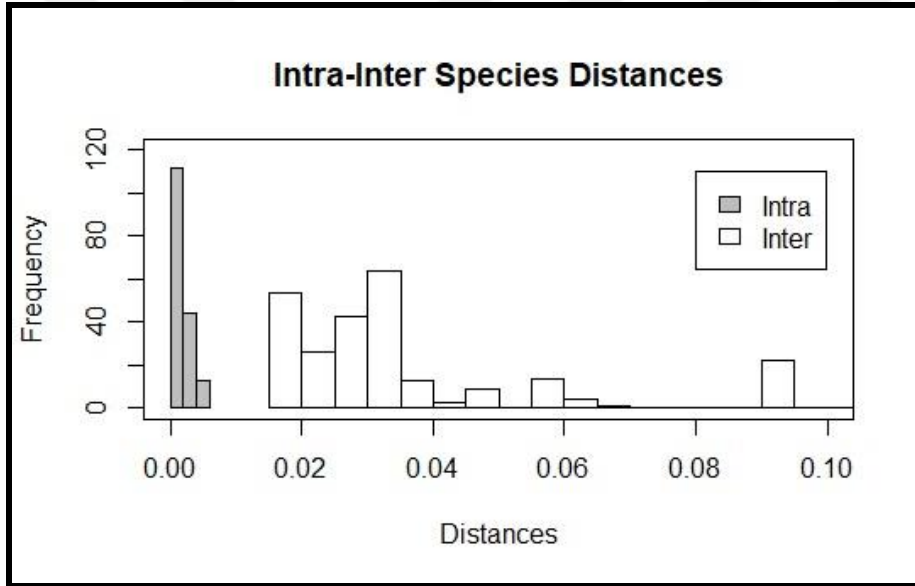
Mitokondri DNA COI-Barkod genine ait ayırt edici türe özgü nükleotit pozisyonlarının sayısı *O. euphraticus* için 1, *O. argyrogramma* için 6, *O. kaynaki* için 10, *O. araxensis* için 3, *O. paucilepis* için 2 ve *O. bergianus* için 21 tane olarak belirlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 1. *Oxynoemacheilus* genusuna ait tür içi ve türler arasındaki ikili dizin farklılığı değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 <i>O. euphraticus</i>	0,000																								
2 <i>O. kentrutensis</i>	0,032	0,000																							
3 <i>O. argyrogramma</i>	0,037	0,045	0,000																						
4 <i>O. araxensis</i>	0,067	0,071	0,081	0,000																					
5 <i>O. hazarensis</i>	0,068	0,070	0,072	0,082	0,001																				
6 <i>O. cyri</i>	0,071	0,082	0,082	0,044	0,090	0,000																			
7 <i>O. kaynaki</i>	0,071	0,077	0,072	0,092	0,049	0,084	0,004																		
8 <i>O. cemali</i>	0,074	0,075	0,080	0,030	0,087	0,055	0,086	0,001																	
9 <i>O. ceyhanensis</i>	0,078	0,097	0,099	0,086	0,077	0,095	0,076	0,091	0,000																
10 <i>O. ercisanus</i>	0,078	0,086	0,083	0,101	0,059	0,091	0,020	0,094	0,088	0,001															
11 <i>O. seyhanensis</i>	0,096	0,105	0,110	0,087	0,110	0,082	0,116	0,096	0,117	0,120	0,001														
12 <i>O. cinicus</i>	0,097	0,103	0,105	0,089	0,102	0,091	0,096	0,098	0,107	0,102	0,071	0,003													
13 <i>O. anaticus</i>	0,097	0,095	0,109	0,084	0,110	0,090	0,100	0,097	0,111	0,106	0,060	0,018	0,001												
14 <i>O. mediterraneus</i>	0,098	0,104	0,102	0,091	0,109	0,097	0,098	0,104	0,120	0,106	0,064	0,033	0,035	0,000											
15 <i>O. paucilepis</i>	0,101	0,093	0,103	0,091	0,112	0,102	0,109	0,092	0,108	0,116	0,103	0,114	0,107	0,106	0,000										
16 <i>O. evreni</i>	0,104	0,113	0,100	0,094	0,106	0,093	0,101	0,083	0,109	0,114	0,075	0,087	0,085	0,088	0,103	0,001									
17 <i>O. eregliensis</i>	0,107	0,103	0,106	0,092	0,107	0,100	0,116	0,092	0,128	0,127	0,088	0,085	0,077	0,085	0,125	0,086	0,000								
18 <i>O. atili</i>	0,107	0,108	0,102	0,098	0,114	0,104	0,118	0,102	0,137	0,133	0,081	0,089	0,077	0,082	0,123	0,086	0,016	-							
19 <i>O. hamwii</i>	0,110	0,117	0,122	0,105	0,117	0,102	0,119	0,110	0,131	0,123	0,078	0,093	0,087	0,087	0,127	0,057	0,107	0,092	0,002						
20 <i>O. simavicus</i>	0,112	0,114	0,121	0,106	0,118	0,089	0,119	0,115	0,115	0,123	0,059	0,082	0,080	0,083	0,118	0,094	0,100	0,110	0,100	0,000					
21 <i>O. phoxinoides</i>	0,116	0,115	0,108	0,093	0,113	0,093	0,108	0,102	0,111	0,116	0,065	0,040	0,044	0,034	0,117	0,085	0,078	0,077	0,084	0,089	0,005				
22 <i>O. samanticus</i>	0,118	0,118	0,119	0,108	0,116	0,091	0,119	0,117	0,123	0,120	0,056	0,083	0,076	0,075	0,112	0,077	0,097	0,099	0,093	0,034	0,075	0,000			
23 <i>O. seyhanicola</i>	0,119	0,127	0,123	0,102	0,125	0,098	0,118	0,106	0,126	0,123	0,075	0,101	0,099	0,086	0,117	0,049	0,104	0,097	0,060	0,101	0,087	0,086	0,004		
24 <i>O. banarescui</i>	0,119	0,119	0,119	0,113	0,117	0,099	0,118	0,120	0,112	0,126	0,058	0,084	0,077	0,076	0,117	0,080	0,097	0,103	0,097	0,031	0,075	0,025	0,092	0,001	
25 <i>O. bergianus</i>	0,128	0,124	0,130	0,116	0,126	0,104	0,127	0,128	0,125	0,131	0,066	0,094	0,088	0,087	0,111	0,088	0,108	0,111	0,098	0,043	0,082	0,024	0,091	0,032	0,005

3.2. Barkodlama Aralığı ve Tür Sınırlaması

Mitokondri COI veri setine dayalı olarak Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* türlerinin doğru tanımlanması amacıyla R (R Development Core Team 2012) programı altında DNA barkodlama paketi Spider v. 1.1-5 (Brown vd., 2012)'a özgü "threshID" işlevi kullanılarak mitokondri kısmi COI geni dizisine dayalı olarak gerçekleştirilen barkod aralığı analizinde, en yüksek tür içi genetik varyasyon değeri (%0.59: *O. phoxinoides*) ile en düşük türlerarası genetik mesafe (%1.62: *O. atili* ve *O. eregliensis*) arasında bir barkodlama boşluğu bulunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, tür içi ve türlerarası mesafeler arasında örtüşme yoktur (Şekil 10).



Şekil 9. *Oxynoemacheilus* cinsinin intraspesifik (tür içi) ve interspesifik (türler arası) ayrışması için barkod boşluğunu temsil eden mesafelerin histogramları

Çalışma kapsamında örneklenen bireylerden elde edilen COI dizileri ayrıca GenBank'taki Anadolu'dan verilmiş olan dizilerle karşılaştırıldı (Şekil 11-12). Bu karşılaştırmalar Fırat havzasındaki 5 tür için yakın bir eşleşme göstermiştir ve morfolojik çalışmalar yoluyla ayırt etmenin zor olduğu bu bireyler genetik olarak taksonlarını tam olarak atanmıştır.

Dizin benzerliği yöntemi, TaxonDNA/Species Identifier 1.8 programı ile COI-barkod bölgesinin tür tanımlama potansiyeli "En İyi Eşleşme" (BCM) testlerine (Meier

vd., 2006) dayalı olarak türlerin doğru tanımlanma oranının oldukça yüksek olduğu (BCM: %100) belirlenmiştir.

Monofili tabanlı tür sınırlama metodu kullanan COI barkod bölgesinin komşu birleştirme ağaçları Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla testi MEGA X'de morfolojik olarak da ayırt edilebilen 6 *Oxynoemacheilus* türü için düzeltilmemiş genetik mesafeler kullanılarak oluşturuldu. NJ filogramında, tür monofilisi testi monofiletik türlerin doğru tanımlanmış olarak kabul edilmesi şeklinde gerçekleştirildi.

Yirmi altı *Oxynoemacheilus* türünün veri setine dayalı olarak türlerarası ortalama genetik mesafe (%3.6) ile tür içi ortalama genetik varyasyon (%0.45) arasında yaklaşık 7 katlık bir sekans farklılığı belirlenmiştir.

3.3. Barkodlama Başarısı

Özellikle balık türlerinin tanımlanmasında etiket olarak COI genini kullanan DNA barkodlama son zamanlarda dikkat çekmektedir (McCusker vd., 2013; Knebelsberger vd., 2014). Barkod geni olarak COI'nin seçilmesinin ana nedenlerinden biri, tür içi ve türlerarası genetik mesafeler arasındaki örtüşmeme/belirgin bir farklılıkla ifade edilen ve sayısız tür için gözlemlenen tipik bir çeşitlilik modeli olmasıdır (Hebert vd., 2003a, b). K2P'ye dayanan tür içi genetik mesafeler genellikle düşüktür (% 1'in altındadır) ve balıklar dahil (Ward, 2012) geniş bir taksona boyunca nadiren % 2'den fazladır (Hebert vd., 2003a, b). Gerçekleştirilen bu çalışmada incelenen 6 türde de K2P tür içi genetik mesafenin % 0.59'i aşmadığını dolayısıyla 1'den fazla lokaliteden örneklenen *Oxynoemacheilus euphraticus*, *Oxynoemacheilus argyrogramma*, *Oxynoemacheilus kaynaki*, *Oxynoemacheilus araxensis* ve *Oxynoemacheilus bergianus*'un tek bir lokaliteden örneklenen *Oxynoemacheilus paucilepis*'dekine oranla genetik değişkenliklerinde önemli bir artış olmadığını gösterildi.

Barkodlama çalışmalarında ortalama intraspesifik varyasyon ve ortalama interspesifik genetik mesafelerin karşılaştırılması genellikle türleri sınırlandırmak için kullanılır. *Oxynoemacheilus* türünün veri setine dayalı olarak türlerarası ortalama

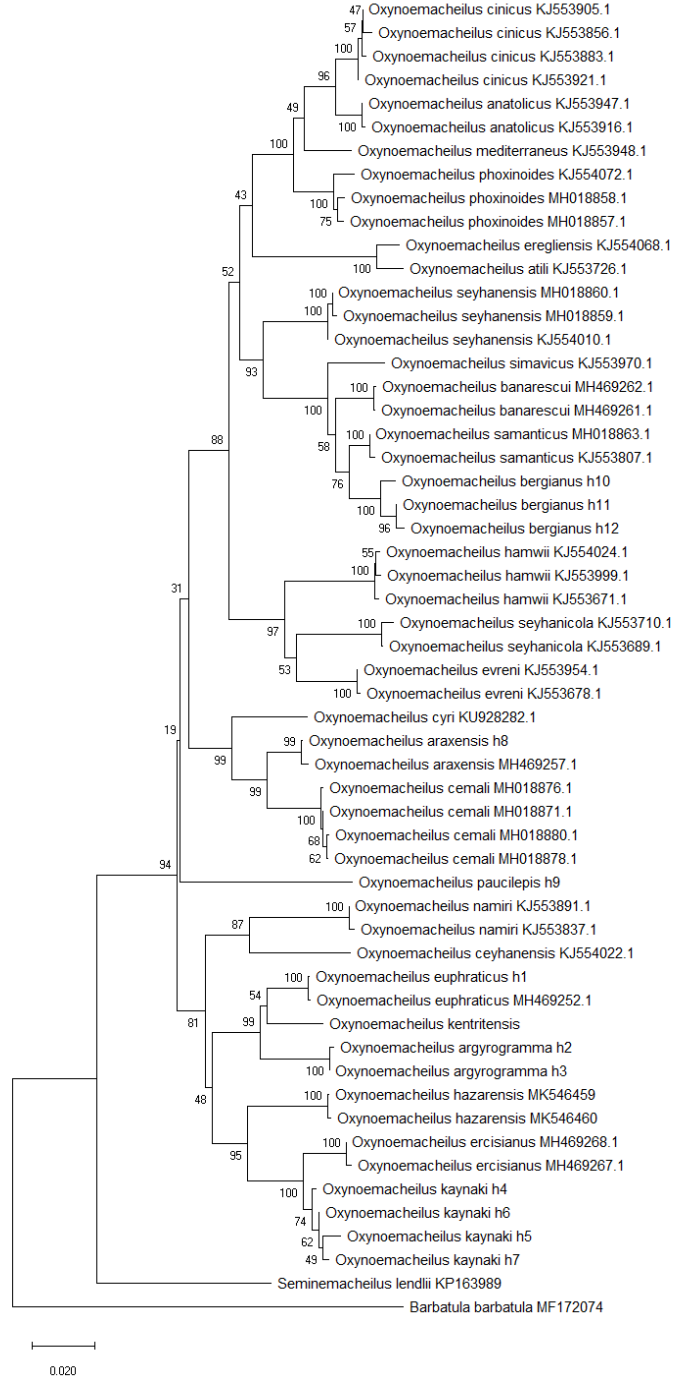
genetik mesafe (%3.6) ile tür içi ortalama genetik varyasyon (%0.45) arasında yaklaşık 7 katlık bir sekans farklılığı, Hebert ve arkadaşları (2004) tarafından önerilen ortalama türlerarası ve tür içi ayrılma arasındaki en az 10 katlık farklılık eşik değerden daha düşük olsa bile bu çalışmada elde edilen mtDNA COI sekansları itibarıyla türlerarası genetik mesafe ve tür içi genetik varyasyon aralığının üst üste binmediği görülmüştür (Şekil 9). Ancak, en büyük tür içi genetik çeşitlilik değeri ve en küçük türler arası genetik mesafelerin kullanılmasının yerine ortalama çeşitlilik ve mesafe değerlerin kullanılması "barkod boşluğu" boyutunu arttırmakta ve yanlış tanımlamaya da yol açabilmektedir (Meier vd., 2008).

Bundan dolayı, barkodlama aralığını doğru saptamak için en iyi yaklaşım, en yüksek tür içi genetik mesafeler ve en düşük türler arası mesafe arasında örtüşmeyi tespit etmektir (Meier vd., 2008). Bu çalışmada, 6 *Oxyoemacheilus* türünün hiçbirinde böyle bir örtüşme saptamadığımız gibi K2P için %0,59 (*O. phoxinoides*) ile 1,62 (*O. atili* ve *O. eregliensis*) arasında belirgin bir barkod boşluğu olduğu tespit edilmiştir.

Anadolu nehir havzasındaki *Oxyoemacheilus* genusu için en yakın eşleşme (BCM) analizine göre mtDNA COI veri setinin tür sınırlaması için % 1.62'lik bir en iyi eşik değeri belirlenmiştir. Varsayımsal eşişge dayalı BCM yöntemleri, bu veri setinde % 90.4 yüksek başarı oranı sağlayan 250 bireyden 226'sı doğru tanımlanmasını sağladı ve tüm dizilerin % 9.6'sını (24 birey) yanlış tanımladı. BCM testine göre, *Oxyoemacheilus* genusuna ait yedi türde örtüşme bulundu (*O. cinicus*-*O. mesudae*-*O. germencicus*, *O. seyhanensis*-*O. kosswigi* ve *O. phoxinoides*-*O. angorae*). Bu nedenle, *Oxyoemacheilus* veri kümesi BCM testinin sonuçlarına dayanarak yirmi altı gruba indirgenmiştir (Şekil 12-13).

Filogenetik tabanlı barkodlama başarısı analizinde ise Fırat Nehri havzasındaki 6 balık türünden oluşan dizi kütüphanemizde, aynı türün tüm dizi haplotipleri üç komşu birleştirme analizi ile oluşturulan ağaçta da yüksek güvenilirlik destekli ağaç topolojileri oluşturdu (Şekil 11-12-13). Dolayısıyla, veri setimizdeki DNA barkodunun tür tanımlama da %90 başarılı olması diğer bir deyişle yüksek ayırım gücü, Fırat Nehri'ndeki *Oxyoemacheilus*'un doğal kaynaklarının tespitini ve korunmasını garanti edecek tüm gelişim aşamalarında ekonomik veya ekolojik açıdan önemli türler üzerinde

balıkçılık araştırmaları için oldukça değerli ve güvenilir bir tanımlama aracı olduğu görüşü desteklenmiştir.

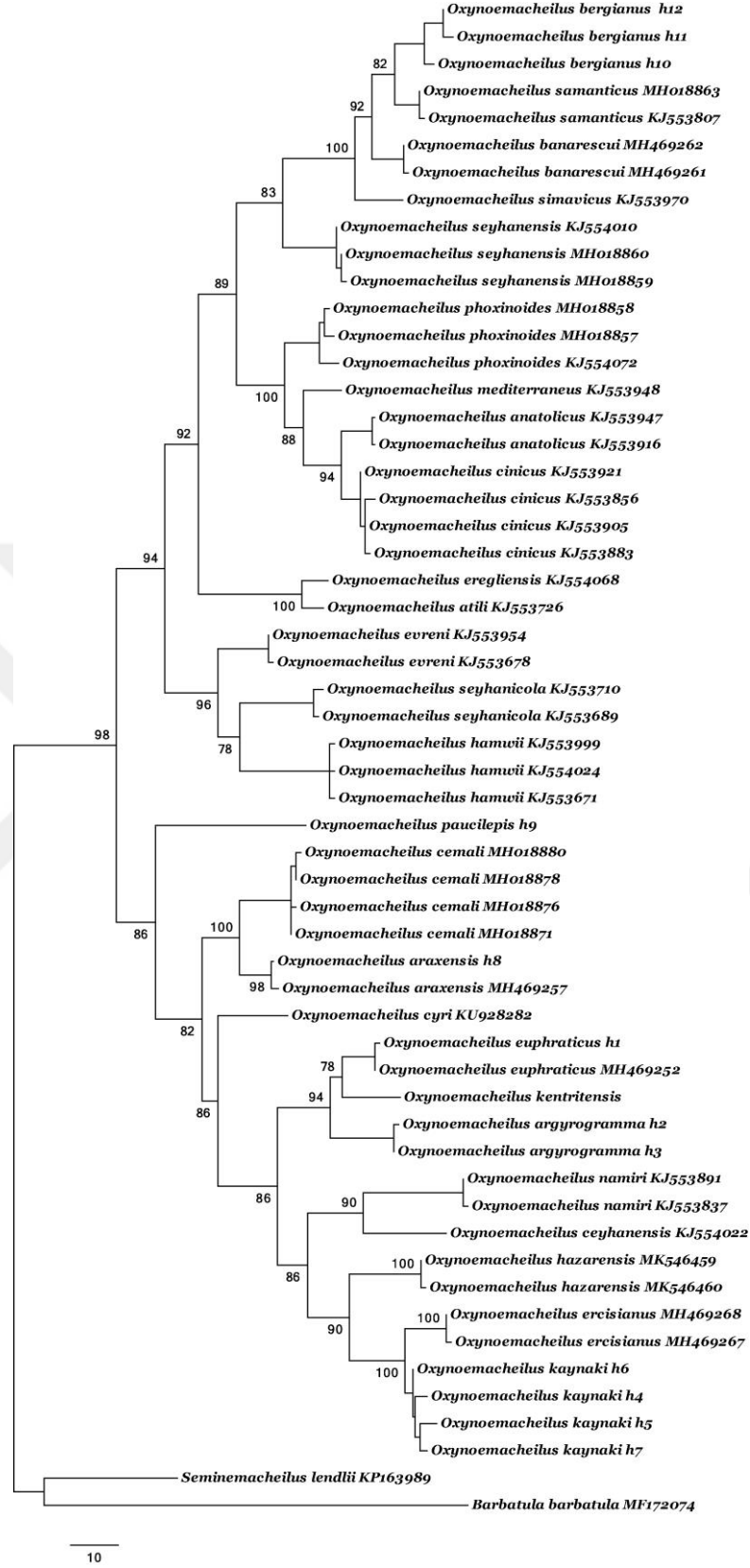


Şekil 10. *Oxynoemacheilus* türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin NJ metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı.

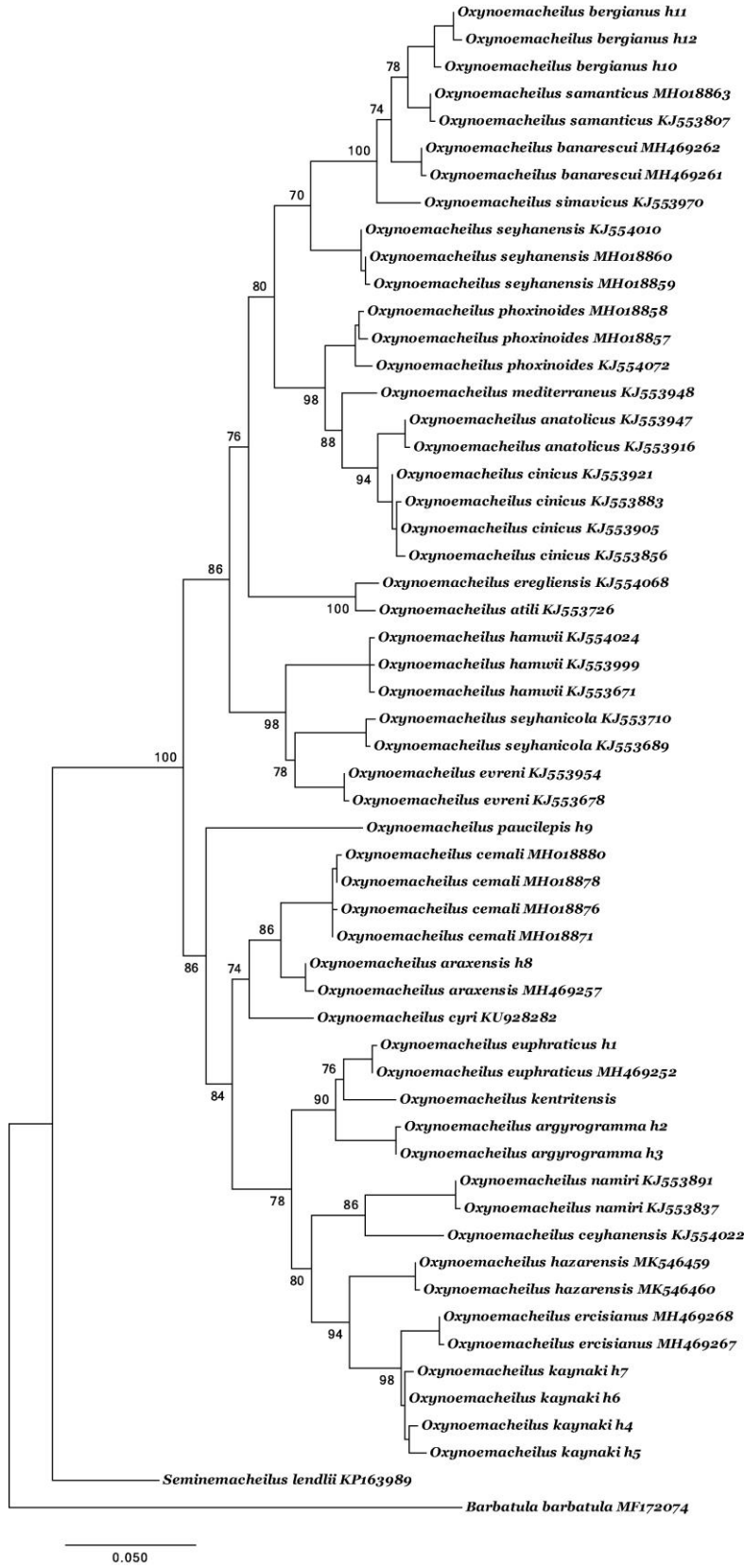
3.4. Filogenetik Analizler

Anadolu’da dağılım gösteren türlerden Genbank veritabanında COI verileri bulunanlara ait haplotipler ile birlikte Anadolu’da Fırat nehrinde dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* populasyonlarına ait mtDNA COI-Barkod haplotiplerinin maksimum tutumluluk (MP) ve maksimum olasılık (ML) metotları kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizlerinden elde edilen filogenetik ağaç topolojileri hemen hemen birbirinin aynı olup önceden tanımlanmış *Oxynoemacheilus* türlerine karşılık gelen 26 grubun varlığını gösterecek şekilde yüksek güvenilirlik değerleri (MP:78-100, ML:70-100; Şekil 12-13) ile desteklenmiştir.





Şekil 11. *Oxynoemacheilus* türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin MP metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı



Şekil 12. *Oxynoemacheilus* türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin ML metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

4.1. Genetik Çeşitlilik

Fırat havzasındaki nehir sistemlerinden örneklenen *Oxynoemacheilus* bireylerinin tümü, 627 bp'lik mitokondri COI barkod dizisine dayalı analizler ile morfolojik olarak gruplandırıldıkları taksonlar içinde tanımlanmıştır. Belirlenen 12 adet haplotip'in herbirinin sadece 1 *Oxynoemacheilus* türünde temsil edildiği belirlenmiştir ki bu durum nehir sisteminde henüz yeni dağılım gösterdiklerine işaret etmektedir (Tablo 5).

Oxynoemacheilus paucilepis, *Oxynoemacheilus araxensis*, *Oxynoemacheilus euphraticus* ve *Oxynoemacheilus argyrogramma* türleri için belirlenen haplotip sayısının az oluşu (1 veya 2), genellikle düşük- düzey haplotip ($h=0.000-0.425$; Tablo 5) ve düşük nükleotit sayıları ($\pi=0.000-0.005$; Tablo 5) gösterirken hemen hemen aynı *Oxynoemacheilus bergianus*'un nispeten daha yüksek haplotip ($h=$ lokalitelerde dağılım gösteren *Oxynoemacheilus kaynakı* ve $0.656-0.735$; Tablo 5) ve fakat düşük nükleotit sayılarına ($\pi=0.004-0.005$; Tablo 5) sahip olması bu türlerin kendilerine özgü daha yüksek sayıda mutasyon biriktirecek kadar daha uzun bir zamandır bu bölgede olduklarını akla getirmektedir. Zira, balıklarda düşük haplotip ve nükleotit sayılarının yakın zamandaki populasyon darboğazını veya tek başına veya birkaç mtDNA soyu ile kurucu etkisi (Grant ve Bowen, 1998), yüksek haplotip ve nükleotit sayılarının ise populasyon darboğazını takiben hızlı nüfus artışı ve mutasyonların birikmesi (Avice vd., 1984; Rogers ve Harpending 1987; Grant ve Bowen, 1998) fenomenini işaret ettiği ileri sürmüşlerdir. Bu bilgilere dayanarak *Oxynoemacheilus kaynakı* ve *Oxynoemacheilus bergianus* türlerinin bölgeye öncelikli girişlerini takiben hızlı bir nüfus artışı ve buna bağlı mutasyon birikimine henüz yeni başlamış olduğu söylenebilir.

Araştırma alanında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* türleri arasındaki genetik mesafe aralığına bakıldığında (%3.7-13.1; Tablo 6), Sayyazadeh vd., 2016 tarafından gerçekleştirilen çalışmada Orta Doğu'daki Nemacheilid balıklarda *Oxynoemacheilus* genusu için belirlenen türler arası genetik mesafeler aralığı (%1.4-16.3) ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Türlerin tanımlanması, DNA dizisindeki türe özgü genetik polimorfizmlerin tespitine dayandırıldığı (Liu ve Cordes, 2004) için mitokondri DNA COI-Barkod genine ait ayırt edici türe özgü nükleotit pozisyonlarının sayısının *O. euphraticus*, *O. argyrogramma*, *O. kaynaki*, *O. araxensis*, *O. paucilepis* ve *O. bergianus* (Şekil 9) için tür düzeyinde genetik tanımlama için yeterli olduğu söylenebilir.

4.2. Barkodlama Başarısı

Özellikle balık türlerinin tanımlanmasında etiket olarak COI genini kullanan DNA barkodlama son zamanlarda dikkat çekmektedir (McCusker vd., 2013; Knebelsberger vd., 2014). Barkod geni olarak COI'nin seçilmesinin ana nedenlerinden biri, tür içi ve türlerarası genetik mesafeler arasındaki örtüşmeme/belirgin bir farklılıkla ifade edilen ve sayısız tür için gözlemlenen tipik bir çeşitlilik modeli olmasıdır (Hebert vd., 2003a, b). K2P'ye dayanan tür içi genetik mesafeler genellikle düşüktür (% 1'in altındadır) ve balıklar dahil (Ward, 2012) geniş bir taksona boyunca nadiren % 2'den fazladır (Hebert vd., 2003a, b). Gerçekleştirilen bu çalışmada belirlenen ve incelenen 6 türde de K2P tür için genetik mesafenin % 0.59'i aşmadığını dolayısıyla 1'den fazla lokaliteden örneklenen *Oxynoemacheilus euphraticus*, *Oxynoemacheilus argyrogramma*, *Oxynoemacheilus kaynaki*, *Oxynoemacheilus araxensis* ve *Oxynoemacheilus bergianus*'un tek bir lokaliteden örneklenen *Oxynoemacheilus paucilepis*'dekine oranla genetik değişkenliklerinde önemli bir artış olmadığını gösterildi. Freyhof ve Özuluğ (2017), Fırat nehir drenajındaki 8 tür (*O. araxensis*, *O. argyrogramma*, *O. bergianus*, *O. erdali*, *O. euphraticus*, *O. kaynaki*, *O. paucilepis* ve *O. samanticus*) tanımlamış olmasına rağmen Freyhof vd. (2019) *O. erdali* *O. bergianus*'in sinonimizasyonu olarak kabul edilirken *O. samanticus* Fırat ve Kızılırmak nehirlerinin sınırına çok yakın bir bölgede tespit edilmiştir. Bu çalışmada *O. erdali*'nin sinonimizasyonunu desteklemektedir ve fakat *O. samanticus* örneklenemediğinden verisetimize eklenememiştir.

Barkodlama çalışmalarında ortalama intraspesifik varyasyon ve ortalama interspesifik genetik mesafelerin karşılaştırılması genellikle türleri sınırlandırmak için kullanılır. *Oxynoemacheilus* türünün veri setine dayalı olarak türlerarası ortalama genetik mesafe (%3.6) ile tür içi ortalama genetik varyasyon (%0.45) arasında yaklaşık

7 katlık bir sekans farklılığı, Hebert vd. (2004) tarafından önerilen ortalama türlerarası ve tür içi ayrılma arasındaki en az 10 katlık farklılık eşik değerden daha düşük olsa bile bu çalışmada elde edilen mtDNA COI sekansları itibarıyla türlerarası genetik mesafe ve tür içi genetik varyasyon aralığının üst üste binmediği görülmüştür (Şekil 10). Ancak, en büyük tür içi genetik çeşitlilik değeri ve en küçük türler arası genetik mesafelerin kullanılmasının yerine ortalama çeşitlilik ve mesafe değerlerin kullanılması "barkod boşluğu" boyutunu arttırmakta ve yanlış tanımlamaya da yol açabilmektedir (Meier vd., 2008).

Bundan dolayı, barkodlama aralığını doğru saptamak için en iyi yaklaşım, en yüksek tür içi genetik mesafeler ve en düşük türler arası mesafe arasında örtüşmeyi tespit etmektir (Meier vd., 2008). Bu çalışmada, 6 *Oxynoemacheilus* türünün hiçbirinde böyle bir örtüşme saptamadığımız gibi K2P için %0,59 (*O. phoxinoides*) ile 1.59 (*O. atili* ve *O. eregliensis*) arasında belirgin bir barkod boşluğu olduğu tespit edilmiştir.

Fırat nehir havzasında dağılıma sahip olan *Oxynoemacheilus* genusu için en yakın eşleşme (BCM) analizine göre oldukça yüksek (%100) olan türleri doğru tanımlama oranı da belirgin bir barkod boşluğunun varlığını destekleyerek COI tabanlı DNA barkod bölgesinin morfolojik olarak tanımlamanın gerçekten zor olduğu *Oxynoemacheilus* genusuna ait türlerinin tanımlanmasında kullanışlı olduğunu da göstermiştir.

BCM testine dayalı olarak Anadolu *Oxynoemacheilus* türleri için elde edilen barkodlama başarı oranı (% 90), Kanada tatlı su balıkları (% 93, Hubert vd., 2008) ve Kuzey Amerika tatlı su balıkları (% 90; April vd., 2011) için rapor edilenlerle benzerlik göstermektedir. Veri setimizdeki COI bazlı DNA barkodlarının yüksek ayırt edici gücü, bazı Anadolu *Oxynoemacheilus* türlerinin, 2-4 milyon yıl Kuvaterner dönemindeki jeolojik ve iklimsel olaylarla özelleştiği düşünülen (Levin vd., 2012; Bektaş vd., 2017) genç evrim grupları olduğu gerçeğiyle açıklanabilir (Zareian vd., 2016).

Filogenetik tabanlı barkodlama başarısı analizinde ise Fırat Nehri havzasındaki 6 balık türünden oluşan dizi kütüphanemizde, aynı türün tüm dizi haplotipleri üç komşu birleştirme analizi ile oluşturulan ağaçta da yüksek güvenirlilik destekli ağaç topolojileri

oluşturdu (Şekil 11). Bu çalışmadan türetilen NJ ağacı (Şekil 11) *Oxynoemacheilus* türlerinin NJ barkodunda monofiletik birimler halinde kümelendiği göstermektedir. Bu da DNA barkodunun tür tanımlamasında yüksek verime sahip olduğunu göstermektedir. Oysaki, morfolojik yanlış tanımlama NJ ağacının sonucunu değiştirebilir (Bingpeng vd., 2018). Dolayısıyla, veri setimizdeki DNA barkodunun tür tanımlama da %100 başarılı olması diğer bir deyişle yüksek ayırım gücü, Fırat Nehri'ndeki *Oxynoemacheilus*'un doğal kaynaklarının tespitini ve korunmasını garanti edecek tüm gelişim aşamalarında ekonomik veya ekolojik açıdan önemli türler üzerinde balıkçılık araştırmaları için oldukça değerli ve güvenilir bir tanımlama aracı olduğu görüşünü desteklemektedir.

4.3. Filogenetik Analizler

Batı Palearktiğin önemli biyoçeşitlilik merkezlerinden biri olan Anadolu'dan daha önce Genbank veri tabanında rapor edilmiş *Oxynoemacheilus*'un COI haplotipleri, Fırat nehri havzasında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* populasyonlarına ait haplotiplerle birlikte farklı temellere dayalı olarak çalışan maksimum tutumluluk (MP), maksimum olasılık (ML) ve Bayesian çıkarsama metotları ile gerçekleştirilen filogenetik analizlerinden elde edilen filogenetik ağaç topolojileri hemen hemen birbirinin aynı olup önceden Fırat nehri havzasında önceden morfolojik olarak tanımlanmış olan *Oxynoemacheilus* türlerine (Erk'akan vd., 2007; Bănărescu ve Nalbant 1978; Erk'akan vd., 2008; Freyhof vd., 2011; Freyhof ve Özuluğ, 2017) karşılık gelen 6 grubun varlığını gösterecek şekilde yüksek güvenirlilik değerleri (MP:78-100, ML:70-100; Şekil 11- 12) ile desteklendiği belirlenmiştir.

Taksonomik durumları hala karmaşık olan *Oxynoemacheilus* genusunu (Prokofiev 2009, 2010; Sayyadzadeh vd., 2016, 2017) kapsayan Akdeniz'de tatlı su balıklarının mekansal heterojenliği üzerine yeni bir çalışma (Geiger vd., 2014) bu cinsin bazı populasyonlarının genetik olarak tanımlanmadığını ortaya koymuştur. Bu ihtiyaçtan hareket ile taranan Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* populasyonlarının ait mitokondri COI lokusuna dayalı olarak belirlenen 12 adet haplotip ile gerçekleştirilen barkod analizi sonucu % 1.62'lık barkod eşik değerine dayalı olarak daha önce morfolojik olarak tanımlanmış olan 6 türün genetik olarak tür teyidi yapılmıştır.

Daha önce Jouladeh-Roudbar vd. (2016) tarafından kısmen de olsa araştırma kapsamında alınan Anadolu *Oxynoemacheilus* türlerinin ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç topolojilerinde türler genellikle coğrafik dağılımları ile uyumlu olarak konumlanmış olmasına rağmen iki önemli istisna mevcuttur. Bunların ilki Fırat havzasından örneklenen *O. bergianus*'un Karadeniz (*O. samanticus* ve *O. banarescui*) ve Ege havzasında (*O. simavicus*) dağılım gösteren türlerle gruplanmasıdır.

İkinci istisnai durum ise Ceyhan nehrinde dağılım gösteren *O. ceyhanensis* 'in Fırat nehrinde dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* türleri ile birlikte kümelenmiş olmasıdır (Tablo 6; Şekil 12-13). Fırat nehir yatağının geç Miyosen-erken Pliyosen dönemi boyunca evrimini kaydeden geç senozoik nehir çöküntü teraslarına bakılarak yaklaşık 4 milyon yıl önce doğuya yönelmeden önce modern Ceyhan nehri boyunca güneybatı yönünde Akdeniz'e doğru aktığı (Westaway, 2004; Seyrek vd., 2007) tahmini bu iki nehir sisteminin temasını dolayısıyla faunal ilişkisine fırsat vermiş olma ihtimalleri Ceyhan nehrinde bulunan *O. ceyhanensis*'in ağaç topolojisindeki eğilimi açıklayabilir.

5. ÖNERİLER

Günümüze kadar biyoçeşitliliğin belirlenmesine yönelik en güncel genomik girişim olan DNA barkodlama çalışmalarının Türkiye'deki iç su balıkları üzerine uygulamaları henüz yeterli düzeyde değildir. Taksonomik bakış açısıyla değerlendirildiğinde, COI'ye dayalı DNA barkodlama yaklaşımı kullanılarak belirli tanımlayıcı karakterlere sahip türlerin hızlı bir şekilde ayrımları gerçekleştirilebilir. DNA barkodlama sonrasında yapılacak ve farklı karakterlerin kullanılacağı bir taksonomik analiz ile biyoçeşitliliğin kayıt altına alınması çok daha kolay gerçekleştirilebilir. Türkiye'nin iç sularında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* türlerine yönelik oluşturulacak DNA barkod veriseti ile morfolojik tanımlamalarında zorluk yaşanan örnekler veya farklı yaşam evrelerindeki örnekler, çok kısa sürede ve etkin bir şekilde tür seviyesinde tanımlanabilecektir. Gerçekleştirilecek benzeri DNA barkodlama çalışmaları sonrasında BOLD ve GenBank veri tabanlarına kayıtları yapılacak türlerin tamamı Türkiye'den bildirilen COI barkodlarını oluşturarak bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda referans diziler olarak kullanılabilir. Ülkemizin bulunduğu coğrafya göz önüne alındığında, özellikle endemik türlerimize yönelik başlatılacak DNA barkodlama çalışmaları ile mevcut biyoçeşitliliğimizin evrensel standartlarda kayıt altına alınması büyük önem taşımaktadır. Bu sayede mevcut biyoçeşitliliğimizin korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir referans oluşturulması sağlanabilecektir.

Anadolu tatlısularındaki *Oxynoemacheilus* türlerine göre yerleştirilmiş olsa da coğrafik olarak küçük bir bölgedeki örneklere dayalı barkodlama çalışmaları, balıklarda DNA barkodlamanın evrensel kullanımı için temel oluşturduğundan bundan sonraki benzer çalışmalar için önem arz etmektedir.

DNA barkodlarının morfolojik tanımları ne olursa olsun örneklerin tür tanımlamasında etkili olduğunu göstererek, morfolojik ve moleküler evrimin bağımsız modellerini desteklemektedir. Ayrıca DNA barkodlarının balık türlerini coğrafi ölçekler üzerinde tanımlamak için etkili bir araç olduğu ve varyasyonların faydalı biyocoğrafik bilgiler içerdiğinden benzer çalışmaların sayısı artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Anderson, S., Bankier, A., Barrell, B., de Bruijn, M., Coulson, A., Drouin, J., Eperon, I., Nierlich, D., Roe, B., Sanger, F. and et al., 1981.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-65.
- April, J., Mayden, R.L., Hanner, R.H. and Bernatchez, L., 2011.** Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 10602–10607.
- Aquilino, S.V.L., Tango, J.M., Fontanilla, I.K.C., Pagulayan, R.C., Basiao, Z.U., Perry, S.O. and Quilang, J.P., 2011.** DNA barcoding of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. *Molecular Ecology Resource*, 11, 612–619.
- Ardura, A., Linde, A. R., Moreira, J.C. and Garcia-Vazquez E., 2010.** DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143, 1438-1443.
- Avise J.C., Neigel, J.E. and Arnold J., 1984.** Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20, 99–105.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. and Saunders, N.C., 1987.** Intraspecific phylogeography, the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 18, 489–522.
- Avise, J.C., 1994.** *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, 511 s.
- Bardakçı, F., Değerli, N., Özdemir, Ö. and Başibüyük, H., 2006.** Molecular phylogeny of the Turkish brown trout (*Salmo trutta* L.), Mitochondrial DNA PCR-RFLP variation. *Journal of Fish Biology*, 68, 36–55.
- Bektaş, Y., Çiftçi, Y., Eroğlu, O. and Beldüz, A. O., 2011.** Genetic Discrimination of Two *Capoeta* Species in North-Eastern Anatolia, Using Mitochondrial 16S rRNA Gene (Osteichthyes: Cyprinidae), *Zoology in the Middle East*, 53, 61-70.
- Bektaş, Y., Beldüz, A. O. and Turan, D., 2013.** The Phylogenetic Position of Turkish Populations Within The European Bitterling, *Rhodeus amarus* (Osteichthyes: Cyprinidae) , *Zoology in the Middle East*, 59, 39-50.
- Bektaş, Y., Turan, D., Aksu, İ., Çiftçi, Y., Eroglu, O., Kalayci, G. and Beldüz, A.O., 2017.** Molecular phylogeny of the genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia, Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 80-94

- Bentzen, P., Legget, W.C. and Brown, G.G., 1988.** Length and Restriction Site Heteroplasmy in The Mitochondrial DNA of American Shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics*, 118, 509-518.
- Bermingham, E., Lamb, T. and Avise, J.C., 1986.** Size Polymorphism and Heteroplasmy in The Mitochondrial DNA of Lower Vertebrates. *Journal of Heredity*, 77, 249-252.
- Bhattacharjee, M.J., Laskar, B.A., Dhar, B. and Ghosh, S.K., 2012.** Identification and reevaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. *Plos ONE* 7, 49950.
- Bingpeng, X., Heshan, L., Zhilan, Z., Chunguang, W., Yanguo, W. and Jianjun, W., 2018.** DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *Plos One*. 13, 0198109.
- Boore JL., 1999.** Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27, 1767-1780.
- Cooper, G.M. and Hausman, R.E., 2007.** *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press and Sunderland (Massachusetts). Sinauer Associates, 4 edition. 745 p.
- Costa, F.O., Landi, M. and Martins, R., 2012.** A ranking system for reference libraries of DNA barcodes, application to marine fish species from Portugal. *Plos One*, 7, 35858.
- Dayrat, B., 2005.** Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407–415.
- Durand, J., Unlu, E., Doadrio, I., Pipoyan, S. and Templeton, R., 2000.** Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub *Leuciscus cephalus*. *Proceedings of the Royal Society, Series*, 267, 1687–1697.
- Edwards, J.H., 1972.** A marker algebra. *Clin Genet*. 1972, 371–380.
- Erk'akan, F., Nalbant and T.T. and Özeren, S. C., 2007.** Seven new species of *Barbatula*, three new species of *Schistura* and a new species of *Seminemacheilus* (Ostariophsi: Balitoridae: Nemachilinae) from Turkey. *Journal of Fisheries International* 2, 69-85.
- Erk'akan, F., Özeren and S. C. and Nalbant, T.T., 2008.** Two new species of stone loaches from Turkey (Teleostei: Nemacheilidae), 3, 115-119.
- Eroğlu, O., 2009.** Karadeniz'in Türkiye Kıyılarında Dağılım Gösteren Mersin Balığı Türlerinin Mitokondrial DNA Sekans Analizi Yöntemiyle Tanımlanması. *Sürmene Yunus Araştırma Bülteni*, 9, 1-3.
- Farris, J. S., 1983.** *The logical basis of phylogenetic analysis*. Vol. 2. Bronx, New York, New York Botanical Garden, 7–36.

- Felsenstein, J., 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences, a maximum likelihood approach. *Molecular Evolution*, 17, 368–376.
- Freyhof, J., Geiger, M.F., Golzarianpour, K. and Patimar, R., 2016.** *Sasanidus*, a new generic name for *Noemacheilus kermanshahensis* Bănărescu and Nalbant, with discussion of *Ilamnemacheilus* and *Schistura* (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa*, 4107, 065–080.
- Freyhof, J. and Geiger, M., 2017.** *Oxynoemacheilus zarzianus*, a new loach from the Lesser Zab River drainage in Iraqi Kurdistan (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa*, 4273, 258–270.
- Frohman, M.A. and Martin, G.R., 1989.** Cut, paste and save: New approaches to altering specific genes in mice. *Journals and Books, Cell* 56, 145–147.
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P. and et al., 2014.** Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 14, 1210–1221.
- Grant, W.A.S. and Bowen, B.W., 1998.** Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes, Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. 89, 415–426.
- Gvozdik, V., Moravec, J., Klütsch, C. and Kotlík, P., 2010.** Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 1146–1166.
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Haring, E., Riesing, M.J., Pinsker, W. and Gamauf, A., 1999.** Evolution of a pseudo control region in the mitochondrial genome of Palearctic buzzards (genus *Buteo*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 37, 185–194.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Waard, J.R., 2003a.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R., 2003b.** Barcoding animal life, cytochrome c oxidase 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society London*. 270, S596–S599.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J. M., Janzen, D.H. and Hallwachs, W., 2004.** Ten species in one, DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 14812–14817.

- Hebert, P.D.N. and Gregory, T.R., 2005.** The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 852-859.
- Hrbek, T., Küçük, F., Frickey, T., Stölting, K.N., Wildekamp, R. and Meyer, A., 2002.** Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia. Turkey, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 125-137.
- Hubert, N., Hanner, R. and Holm, E., 2008.** Identifying Canadian freshwaterfishes through DNA barcodes. *Plos One*, 3, 2490.
- Hubert, N., Delrieu-Trottin, E., Irisson J-O., Meyer, C. and Planes, S., 2010.** Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding, a test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 1195–1203.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Paabo, S. and Gyllensten, U., 2000.** Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. 408, 708-13.
- Jalili, P., Eagderi, S., Poorbagher1, H. and Seçer, B., 2017.** Phylogeny of *Oxynoemacheilus bergianus* (Derzhavin, 1934) (Nemacheilidae: Cypriniformes) in Iran using osteological characteristics. *FishTaxa*, 2, 201-209.
- Jouladeh-Roudbar, A., Eagderi, S. and Hosseinpour, T., 2016.** *Oxynoemacheilus freyhofi*, a new nemacheilid species (Teleostei, Nemacheilidae) from the Tigris basin, Iran. *Fish Taxa*, 1, 94-107.
- Kannan, L. and Wheeler, W.C., 2012.** Maximum parsimony on phylogenetic networks. *Algorithms Molecular Biology*, 7, 9.
- Keskin, E. and Atar, H.H., 2013.** DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. *Molecular Ecology Resources*, 13, 788–797.
- Kimura, M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R., 2000.** Concepts of genetics. 6th ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Knebelsberger, T., Dunz, A.R., Neumann, D. and Geiger, M.F., 2014.** Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* *Molecular Ecology Resources*, 15, 562-572.
- Kocher, T.D. and Stepien, C.A., 1997.** Overview of the Classification and Phylogeny of Fishes. 29-30 s. T.D. Kocher and, C.A. Stepien (ed), *Molecular Systematics of Fishes*, 1997, Academic Press, ISBN: 9780080536910, 314 s.

- Kolangi-Miandare1, H. and Askari, G., 2014.** Genetic population structure and differentiation of Western Iranian *Oxynoemacheilus argyrogramma* (Heckel, 1847). *Molecular Biology Research Communications*, 3, 197-204.
- Kotlik, P., Bogutskaya, G. and Ekmekci, F.G., 2004.** Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes, divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology*, 13, 87–95.
- Kottelat, M. and Freyhof, J., 2007.** Handbook of European Freshwater Fishes. Cornol, Publications Kottelat. Article in *Ichthyological Research*, 55, 1, 99-99. DOI: 10.1007/s10228-007-0012-3
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt L.A. and Janzen, D.H., 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 8369–8374.
- Kumar, S., Stecher, G.Li.M., Knyaz, C. and Tamura, K., 2018.** MEGA X, Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology*, 35, 1547–1549.
- Kutschera, U. and Niklas, K., 2005.** Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci*, 124, 1-24
- Laskar, B.A., Bhattacharjee, M.J., Dhar, B., Mahadani, P., Kundu, S. and Ghosh, S.K., 2013.** Species Dilemma of Northeast Indian Mahseer(*Actinopterygii*: *Cyprinidae*), DNA barcoding in clarifying the riddle. *Plos ONE*, 8, 53704.
- Lee K.E., Seddon J.M., Corley, S.W., Ellis, W.A.H., Johnston, S.D., De Villiers, D.L., Preece, H.J. and Carrick, F.N., 2010.** Genetic variation and structuring in the threatened koala populations of Southeast Queensland. *Conservation Genetics*, 11, 2091-2103.
- Levin, B.A., Freyhof, J., Lajbner, Z., Perea, S., Abdoli, A., Gaffaroğlu, M., Özuluğ, M., Rubenyan, H.R., Salnikov, V.B. and Doadrio, I., 2012.** Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: *Cyprinidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 542–549.
- Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Liu, Z.J. and Cordes, J.F., (2004).** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1–37.
- Lleonart, J., Taconet, M. and Lamboeuf, M., 2006.** Integrating information on marine species identification for fishery purposes. *Marine Ecology Progress Series*, 316, 231–238.

- Ma, H., Ma, C. and Ma, L., 2011.** Population genetic diversity of mud crab (*Scylla paramamosain*) in Hainan Island of China based on mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 434-440.
- Magoulas, A. and Zouros, E., 1993.** Restriction site Heteroplasmy in Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Indicates Incidental Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA *Molecular Biology*, 10, 319-325.
- Makarenekov, V., Kevorkov, D.G. and Legendre, P., 2004.** Phylogenetic Network Construction Approaches. *Applied Mycology and Biotechnology*, 6, 61-97.
- Margulis, L., 1993.** Symbiosis in Cell Evolution. *Microbial Communities in the Archean and Proterozoic second*. New York, Freeman and Co.
- McCusker, M.R., Denti, D., Van Guelpen, L., Kenchington, E. and Bentzen, P., 2013.** Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 13, 177–188.
- Meier, R., Zhang, G.Y. and Ali, F., 2008.** The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the ‘Barcoding Gap’ and leads to misidentification, *Biochemical Systematics*, 57, 809–813.
- Meusnier, I., Singer, G.A.C., Landry, J.F., Hickey, D.A., Hebert, P.D.N. and et al., 2008.** A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9, 214.
- Meyer, C.P. and Paulay, G., 2005.** DNA Barcoding, Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Plos Biology*, 3, 2229–2238.
- Miya, M. and Nishida, M., 1999.** Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes), first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Marine Biotechnology*, 1, 416-426.
- Miya, M. and Nishida, M., 2000.** Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics, a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17, 437–455.
- Moritz, C., Dowling, T.E. and Brown, W.M., 1987.** Evolution of Animal Mitochondrial DNA, Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18, 269-292. DOI: 10.1146/18.110187.001413.
- Moritz, C., 1991.** Evolutionary Dynamics of Mitochondrial DNA Duplications in Parthenogenetic Geckos. *Heteronotia binoei*. *Genetics*, 129, 221-230.
- Moritz, C., Downing, T.E. and Brown, W.M., 2003.** Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 269-292.

- Mullis, K.B., Ferré, F. and Gibbs, R.A., 1994.** The Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser, Boston, MA.
- Nelson, J.S., Grande, T.C. and Wilson, M.V.H., 2016.** Fishes of the World. Fifth Edition. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, 1-707.
- Perdices, A., Ozeren, C.S., Erkakan, F. and Freyhof, J., 2018.** Diversity of spined loaches from Asia Minor in a phylogenetic context (Teleostei: Cobitidae). Plos ONE, 13, 0205678.
- Perea, S., Böhme, M., Zupancic, P., Freyhof, J., Sanda, R., Ozulug, M., Abdoli, A. and Doadrio, I., 2010.** Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data, BMC Evolutionary Biology, 10, 265.
- Posada, D., 2008.** jModelTest, phylogenetic model averaging. Molecular Biology, 25, 1253–1256.
- Prokofiev, A.M., 2009.** Problems of the classification and phylogeny of Nemacheiline loaches of the group lacking the preethmoid I (Cypriniformes: Balitoridae: Nemacheilinae). Journal of Ichthyology, 49, 874- 898.
- Prokofiev, A.M., 2010.** Morphological classification of loaches (Nemacheilinae). Journal of Ichthyology, 50, 827-913.
- Puckridge, M., Andreakis, N., Appleyard, S. and Ward, R.D., 2013.** Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA barcoding. Molecular Ecology Resources, 13, 32–42.
- Rasmussen, A.S. and Arnason, U., 1999.** Phylogenetic studies of complete mitochondrial DNA molecules place cartilaginous fishes within the tree of bony fishes. Journal of Molecular Evolution, 48, 118-123.
- Reece, J.B., Taylor, M.R., Simon, E.J. and Dickey, J.L., 2012.** DNA profiling. In Campbell biology, Concepts and connections.
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. and Jackson, R.B., 2011.** Amplifying DNA, The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning, 414-416, San Francisco, Pearson.
- Rogers, A.R. and Harpending, H., 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology Evolution, 9, 552–569.
- Rubioff, D., Cameron, S. and Will, K., 2006.** A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for, barcoding identification. Journal of Heredity, 97, 581-594.

- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H. and Erlich, H.A., 1989.** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 6230–6234.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Saitoh, T.P., Miya, M., Mabuchi, K. and Nishida, M., 2016.** Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC Genomics*, 17, 719.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, 1, 3. ISBN: 0879693096, 626 s.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463–5470.
- Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. and Esmaeili, H.R., 2016.** A new loach of the genus *Oxynoemacheilus* from the Tigris River drainage and its phylogenetic relationships among the nemacheilid fishes (Teleostei: Nemacheilidae) in the Middle East based on mtDNA COI sequences. *Iran, Journal of Ichthyology*, 3, 236–250. DOI: 10.7508/iji.2016.
- Sayyadzadeh, G., Esmaeili, H.R. and Eagderi, S., 2018.** Re-description and molecular systematics of *Paraschistura delvarii* (Teleostei: Nemacheilidae). *Biharean Biologist*, 12, 40–47.
- Seyrek, A., Demir, T., Pringle, M.S., Yurtmen, S., Westaway, R., Beck, A. and Rowbotham, G., 2007.** Kinematics of the Amanos Fault, southern Turkey, from Ar/Ar dating of offset Pleistocene basalt flows: Transpression between the African and Arabian plates. *Geological Society, Special Publications*, 290, London, 255–284.
- Sediva, A., Apostolou A., Janko K., Kohout, J., Kostov V. and Sanda R., 2008.** Genetic structure and distribution of *Oxynoemacheilus bureschi* (Balitoridae, Teleostei), and its phylogenetic relationships with other European stone loaches, *Folia Zool*, 57, 111–119
- Sediva, A., Apostolou, A., Kohout, J. and Bohlen. J., 2010.** Molecular phylogeographic analyses of the loach *Oxynoemacheilus bureschi* reveal post-glacial range extensions across the Balkans, *Journal of Fish Biology*, 76, 357–368. DOI:10.1111/j.1095-8649.2009.02492.
- Sediva, A., Apostolou, A., Kohout, J. and Bohlen, J., 2010.** Molecular phylogeographic analyses of the loach *Oxynoemacheilus bureschi* reveal post-glacial range extensions across the Balkans. *Fish Biology*, 76, 357–368.

- Shao, R., Campbell, N.J. and Barker, S.C., 2001.** Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the wallaby louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Molecular Biology and Evolution*, 18, 858-865.
- Shen, Y.J., Guan, L.H., Wang, D.Q. and Gan, X.N., 2016.** DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River. *Ecology and Evolution*, 6, 2702-13.
- Smith, P.J., McVeagh, S.M. and Steinke, D., 2008.** DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Fish Biology*, 72, 464–471.
- Srivathsan, A. and Meier, R., 2012.** On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28, 190-194.
- Steinke, D., Zemlak, T.S., Boutillier, J. and Hebert, P.D.N., 2009.** DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Marine Biology*, 156, 2641–2647.
- Steel, M. and Penny, D., 2000.** Parsimony, likelihood and the role of models in molecular phylogenetics, *Molecular Biology*, 17, 839-850.
- Strauss, R.E. and Bond, C.E., 1990.** Taxonomic methods, morphology, Schreck CB, Moyle PB (eds) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Maryland, 109–140.
- Studier, J.A. and Keppler, K.J., 1998.** A note on the neighbor-joining method of Saitou and Nei. *Molecular Biology*, 5, 729–31.
- Susnik, S., Schöffmann, J. and Weiss, S., 2005.** Genetic verification of native brown trout from the Persian Gulf (Catak Cay River, Tigris basin). *Journal Fish Biology*, 67, 879–884.
- Tabatabaei, S.N., Hashemzadeh Segherloo, I., Eagderi, S. and Zamani Faradonbeh, M., 2015.** Habitat use of two nemacheilid fish species, *Oxynoemacheilus bergianus* and *Paracobitis* sp. in the Kordan River, Iran. *Hydrobiologia*, 762, 183-193.
- Triantafyllidis, A., Bobori, D., Koliimitra, C., Gbandi, E., Mpanti, M., Petriki, O. and Karaiskou, N., 2011.** DNA barcoding analysis of fish species diversity in four north Greek lakes. *Mitochondrial DNA*, 22, 37–42.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa S., 1996.** The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8, A. *Science*, 272, 1136-1144.
- Turan, C., 2008.** Molecular systematics of the Capoeta (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16S rDNA sequence data. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 51A, 1-14.

- Turan, D., Kaya, C., Kalayci, G., Bayçelebi, E. and Aksu, İ., 2019.** *Oxynoemacheilus cemali*, a new species of stone loach (Teleostei: Nemacheilidae) from the Çoruh River drainage, Turkey. *Journal of Fish Biology*, 94, 458-468.
- Turnbull, H., Lax, N., Diodato, D., Ansorge, O. and Turnbull, D., 2010.** The mitochondrial brain, From mitochondrial genome to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 111- 21.
- URL-1, 2014.** <http://www.briancoad.com/Species%20Accounts/Contents%20new.htm> (20 September 2019)
- URL-2, 2017.** <http://www.briancoad.com/species%20accounts/Cobitidae%20to%20Cyprinodontidae.htm> (04 March 2017)
- URL-3, 2013.** <https://www.iucnredlist.org/species/19384642/> (09 January 2013)
- URL-4, 2008.** <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=jfish.2008.115.119> (28 September 2019)
- URL-5, 2014.** <https://www.iucnredlist.org/species/19428361/> (29 September 2019)
- URL-6, 2014.** <https://www.iucnredlist.org/species/19429681/> (29 September 2019)
- URL-7, 2017.** <https://courses.washington.edu/fish340/Lab%20Project.htm> (01 Autumn 2012)
- Ward, R., 2012.** A case study for DNA barcodes Pp. 423–439 in Kress W. J., editör, Erickson D. L., editor. *DNA barcodes, methods and protocols, methods in molecular biology*. Springer Science Business Media, LLC, New York, FISH-BOL. 858.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. and Hebert, P.D.N., 2005.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 360, 1847–1857.
- Ward, R.D. and Holmes, B.H., 2007.** An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7, 899–907.
- Ward, R.D., Bronwyn, H.H., William, T.W. and Last, P.R., 2008a.** DNA barcoding Australasian chondrichthyans, results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research*, 59, 57–71.
- Ward, R.D., Costa, F., Holmes, B. and Steinke, D., 2008b.** DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia, minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. *Aquatic Biology*, 3, 71–78.

- Ward, R.D., Hanner, R. and Hebert, P.D.N., 2009.** The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329–356.
- Westaway, R., 2004.** Kinematic consistency between the dead Sea Fault Zone and the Neogene and Quaternary, left-lateral faulting in Turkey. Article in *Tectonophysics*, 391, 203–237.
- Whelan, S., Lio, P. and Goldman, N., 2001.** Molecular phylogenetics, state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends Genetics*, 17, 262-272.
- Wiesner, R.J., Ruegg, J.C. and Morano, I., 1992.** Counting Target Molecules by Exponential Polymerase Chain Reaction, Copy Number of Mitochondrial DNA in Rat Tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 183,553-9.
- Wolstenholme, D.R., 1992.** Animal mitochondrial DNA, structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141,173–216.
- Yuan, L. and Zhaoxia, C., 2009.** Complete mitochondrial genome of the Asian paddle crab *Charybdis japonica* (Crustacea: Decapoda: Portunidae), gene rearrangement of the marine brachyurans and phylogenetic considerations of the decapods. *Molecular Biology Reports*, 37, 2559-2569.
- Zareian, H., Esmaeili, H.R., Heidari, A., Khoshkholgh, M.R. and Mousavi-Saber, H., 2016.** Contribution to the molecular systematics of the genus *Capoeta* from the south Caspian Sea basin using mitochondrial cytochrome b sequences (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Biology Research Communications*, 5, 65-75.
- Zemlak, T.S., Ward, R.D., Connell, A.D., Holmes, B.H. and Hebert, P.D.N., 2009.** DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 237–242.
- Zink, R.M. and Barrowclough, G.F., 2008.** Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17,2107–21. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03737.

ÖZGEÇMİŞ

Hande RAKICI 10.03.1986 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğretimini 2000 yılında Rize Kurtuluş İlköğretim Okulunda, ortaöğretimini 2004 yılında Rize Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında başladığı lisans eğitimini 2012 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimine tez aşamasında devam etmektedir.

