

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE İÇ SULARINDAKİ *Phoxinus strandjae* (DRENSKY, 1926)
POPULASYONUNUN GENETİK ANALİZİ

DUYGU ŞİRİN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. YUSUF BEKTAŞ

TEZ JÜRİLERİ

PROF. DR. DAVUT TURAN

DOÇ. DR. YILMAZ ÇİFTÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2017

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE İÇ SULARINDAKİ *Phoxinus strandjae* (DRENSKY, 1926)
POPULASYONUNUN GENETİK ANALİZİ**

Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ danışmanlığında, Duygu ŞİRİN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/11/2017 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Davut TURAN
Üye	: Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ
Üye	: Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ

İmzası

(Signature)

(Signature)

(Signature)


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“Türkiye İç Sularındaki *Phoxinus strandjae* (Drensky, 1926) Populasyonunun Genetik Analizi” adlı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Çalışmam süresince Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde desteğini ve bilgisini benden esirgemeyerek deneyimleri ile bana öncülük eden değerli hocam Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ’a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, öneri ve içten yardımları ile desteğini esirgemeyen, sayın hocam Prof. Dr. Davut TURAN’a ve laboratuvar çalışmalarında deneyimlerinden faydalandığım İsmail AKSU’ya;

Hayatımın her anında ilgilerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim.

Duygu ŞİRİN

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Türkiye İç Sularındaki *Phoxinus strandjae* (Drensky, 1926) Populasyonunun Genetik Analizi” 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.

01 / 11 / 2017



Duygu ŞİRİN

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 İÇ SULARINDAKİ *Phoxinus strandjae* (DRENSKY, 1926) POPULASYONUNUN GENETİK ANALİZİ

Duygu ŞİRİN

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

Phoxinus (Cyprinidae: Teleostei) populasyonlarının genetik teşhisi, demografik hikayesi ve populasyon genetik yapısı, Türkiye'nin Güney Marmara, Karadeniz ve Trakya havzasındaki altı populasyonundan 67 bireyin mitokondri 16S rRNA (167 bp), sitokrom c oksidaz alt ünite I (652 bp) ve sitokrom b (1140 bp) genleri dizilimindeki varyasyon kullanılarak belirlendi. Düşük haplotip sayısı, haplotip ve nükleotit çeşitlilik değerleri, eksik haplotiplerin varlığı işaret eden haplotip ağı ve uzun kollu filogenetik ağaç topolojileri (NJ, MP ve ML) birbirleriyle uyumludur ve kuzey-batı Türkiye'nin *Phoxinus* populasyonlarında yakın tarihli veya devam eden bir darboğazı olayını işaret etmektedir. Diğer taraftan, multimodal uyuşmazlık dağılımı, negatif fakat anlamlı olmayan Tajima'nın D ve Fu'nun Fs değerleri ve uzun kollu filogenetik ağaç topolojileri birbirleriyle uyumlu olup alt populasyonların uzun süredir Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu göstermektedir. Populasyon çiftleri arasındaki genetik mesafeler, haplotip ağı ve filogenetik ağaçlar dört haplogruptan (KLK-HDK/ABT/RZV/SGK-PYL) oluşan bir populasyon genetik yapılanması sergilemiştir. Benzer şekilde, F_{ST} ve AMOVA istatistikleri, önemli genetik farklılaşmanın bu dört grup arasında gözlemlendiğini göstermiştir. Dört coğrafik populasyon grubu arasında önemli genetik farklılaşma ve düşük genetik değişimi gösteren yüksek F_{ST} değerleri ve düşük gen akışı ($F_{ST} > 0.44$, $Nm < 1$) gözlemlenmiştir. Dört populasyon grubu arasında gerçekleştirilen AMOVA analizi oldukça anlamlı genetik farklılıklar gösterdi ($F_{ST} > 0.44$, p-değeri > 0.05). Balıklar için yaygın olarak kullanılan sitokrom b kalibrasyon oranı (% 1.05) dikkate alındığında, Trakya ve Anadolu populasyonları arasındaki farklılaşma seviyeleri, İstanbul ve Çanakkale boğazlarının açılmasından sonra Pliyosen (yaklaşık 2 myö) boyunca birbirlerinden izole olduklarını göstermektedir.

2017, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler: Populasyon yapısı, genetik çeşitlilik, *Phoxinus*, mtDNA, Türkiye.

ABSTRACT

GENETIC ANALYSIS OF *Phoxinus strandjae* (DRENSKY, 1926) POPULATION IN TURKISH INLAND WATER

Duygu ŞİRİN

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

Genetic identification, historical demographics and population genetic structure of *Phoxinus* (Cyprinidae: Teleostei) populations was characterized using the sequence variation in the mitochondrial 16S rRNA (167 bp), cytochrome c oxidase subunit I (652 bp), cytochrome b (1140 bp) gene sequences of 67 individuals from six populations in Thrace, South Marmara and Black Sea River basin, Turkey. Low haplotype number, haplotype and nucleotide diversity values, the haplotype network and phylogenetic tree topologies (NJ, MP and ML) pointing to the existence of the disappearing haplotypes are compatible and suggest to a recent or ongoing bottleneck event in the *Phoxinus* populations of North-western Turkey. However, the multimodal mismatch distribution, the negative and non significant Tajima's D values and Fu's F_s values and long branch lengths on a phylogenetic trees are consistent with each other, indicating that subpopulations are in the long-term Hardy-Weinberg equilibrium. Pairwise genetic distances between populations, the median joining network and the phylogenetic trees exhibited a population genetic structure consisting of four haplogroups (KLL-HDK/ABT/RZV/SGK-PYL). Similarly, F_{ST} and AMOVA statistics have shown that significant genetic variation is observed among these four groups. We observed a high F_{ST} values and low gene flow ($F_{ST} > 0.44$, $N_m < 1$) suggesting low genetic exchange and significant differentiation between the four geographical population groups. The AMOVA performed among the four population groups showed highly significant genetic differentiation ($F_{ST} > 0.44$, p-value > 0.05). Considering the widely used Cytb calibration rate for fish (1.05%), levels of divergence for population of Thrace and Anatolia suggest that they are isolated from each other during Pliocene (about 2 Mya), after the opening of İstanbul and Dardanalles straits.

2017, 63 page

Keyword: Population structure, genetic diversity, *Phoxinus*, mtDNA, Turkey.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Sazansı Ailesinin Genel Özellikleri.....	2
1.2.1. <i>Phoxinus</i> Genusunun Genel Özellikleri	3
1.2.1.1. Habitat, Biyoloji, Dağılımı ve Taksonomik Durumu.....	3
1.3. Sistematikte Kullanılan Genetik Teknikler	5
1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	5
1.3.2. DNA Dizin Analizi.....	6
1.3.2.1. Sanger Zincir Sonlandırma Yöntemi.....	7
1.4. Veri Analizi	8
1.4.1. Genetik Çeşitlilik.....	8
1.4.2. Filogenetik Analizler	8
1.4.2.1. Filogenetik Ağaç Oluşturma.....	8
1.4.2.1.1. Mesafe Temelli Yöntemler.....	9
1.4.2.1.1.1. Aritmetik Ortalama Kullanan Ağırlıksız Gruplama Yöntemi	9
1.4.2.1.1.2. Komşu Birleştirme Yöntemi.....	10
1.4.2.1.2. Karakter Temelli Yöntemler.....	10
1.4.2.1.2.1. Maksimum Tutumluluk Yöntemi	10
1.4.2.2.2. Maksimum Olasılık Yöntemi.....	11
1.4.2.2.3. Bayesian Çıkarsama Yöntemi.....	11
1.4.2.2. Haplotip Ağı Analizi.....	11
1.5. Populasyon Yapı Analizleri.....	12
1.5.1. Populasyon Arasındaki Gen Akışı Miktarının Belirlenmesi	12
1.5.2. Genetik Verilerin Moleküler Varyans Analizi (AMOVA).....	12

1.6.	Tarihsel Demografik Hikaye	13
1.6.1.	Uyumsuzluk Dağılım Analizi	13
1.7.	Mitokondri DNA (mtDNA).....	15
1.7.1	Sitokrom b	16
1.7.2	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I.....	16
1.7.3	16S rRNA	17
1.8.	Literatür Özeti.....	17
1.8.1.	Morfolojik Çalışmalar	17
1.8.2.	Genetik Çalışmalar	19
1.9.	Çalışmanın Amacı	21
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1.	Örnek Temini.....	22
2.2.	Phoxinus Bireylerinden DNA Eldesi.....	22
2.3.	Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Tasarımı ve Sentezi.....	24
2.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulamaları	24
2.4.1.	Hedef Mitokondri Gen Dizilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yardımı İle Artırılması	24
2.4.2.	DNA ve PCR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	26
2.5.	DNA Dizin Analizi.....	26
2.6.	Veri Analizi	26
2.6.1.	Mitokondri DNA Varyasyonu ve Nükleotit Kompozisyonu.....	26
2.6.2.	Populasyon Yapı Analizi	27
2.6.2.1.	Wright'ın F İstatistiği	27
2.6.2.2.	Moleküler Varyans Analizi (AMOVA).....	27
2.6.3.	Tarihsel Demografik Hikaye	28
2.6.3.1.	Uyumsuzluk Dağılım Analizi.....	28
2.6.3.2.	Nötralite Testleri.....	28
2.6.4.	Filogenetik Analizler	28
2.6.5.	Haplotip Bağlantı Analizi.....	29
3.	BULGULAR	30
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	48
4.1.	Coğrafik Dağılım ve Genetik Çeşitlilik.....	48
4.2.	Filogenetik Analiz	50
4.3.	Populasyon Genetik Yapısı	50

4.4.	Demografik Hikaye	51
5.	ÖNERİLER	53
	KAYNAKLAR	54
	ÖZGEÇMİŞ	63



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Mitokondri genomunun genel yapısı	15
Şekil 2.	<i>Phoxinus</i> populasyonlarının örneklendiği istasyonları gösteren harita	22
Şekil 3.	<i>P. strandjae</i> örnekleri için uyumsuzluk dağılımı	36
Şekil 4.	16S rRNA genine dayalı olarak Türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları	39
Şekil 5.	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I genine dayalı olarak türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları.....	40
Şekil 6.	Sitokrom b genine dayalı olarak türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları	40
Şekil 7.	Birleştirilmiş verisetine dayalı olarak türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları	41
Şekil 8.	<i>Phoxinus</i> 16S rRNA geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç	42
Şekil 9.	<i>Phoxinus</i> 16S rRNA geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç	42
Şekil 10.	<i>Phoxinus</i> 16S rRNA geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.....	43
Şekil 11.	<i>Phoxinus</i> COI geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.....	43
Şekil 12.	<i>Phoxinus</i> COI geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.....	43
Şekil 13.	<i>Phoxinus</i> COI geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.....	44
Şekil 14.	<i>Phoxinus</i> Cyt b geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç	44
Şekil 15.	<i>Phoxinus</i> Cyt b geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.....	45
Şekil 16	<i>Phoxinus</i> Cyt b geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.....	45
Şekil 17.	<i>Phoxinus</i> birleştirilmiş veriseti haplotipleri arasındaki ilişkiyi Gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç	46
Şekil 18.	<i>Phoxinus</i> birleştirilmiş veriseti haplotipleri arasındaki ilişkiyi Gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç	46

Şekil 19. *Phoxinus* birleştirilmiş veriseti haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç..... 47



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Phoxinus strandjae</i> Türünün Sistematığı	4
Tablo 2.	<i>Phoxinus</i> örneklerinin toplandığı istasyonlar, koordinatları ve örnek sayıları (N).....	23
Tablo 3.	Sitokrom b, 16S rRNA ve COI genlerinin artırılması ve dizin analizi için kullanılan primerler	24
Tablo 4.	Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar	25
Tablo 5.	PCR Döngü Koşulları.....	26
Tablo 6.	Türkiye iç sularındaki mini inci balığı kombine verisetine ait değişken nükleotit pozisyonları	31
Tablo 7.	Türkiye iç sularındaki mini inci balığı populasyonlarına ait örneklerin 16S rRNA, COI, Cyt b ve birleştirilmiş veriseti haplotiplerinin populasyonlara dağılımı ve frekansları.....	32
Tablo 8.	16S rRNA genine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar	33
Tablo 9.	COI genine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar.....	33
Tablo 10.	Sitokrom b genine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar	33
Tablo 11.	Birleştirilmiş verisetine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar	33
Tablo 12.	Sitokrom b geni verisetine dayalı soy grupları arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar	34
Tablo 13.	Örnekleme lokaliteleri, havzaları, örnek ve haplotip sayıları, genetik çeşitlilik indeksleri, Tajima D ve Fu'nun Fs tarafsızlık testleri	35
Tablo 14.	16S rRNA geni itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal)	36
Tablo 15.	COI geni itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal)	37
Tablo 16.	Sitokrom b geni itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal)	37
Tablo 17.	Birleştirilmiş veriseti itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal).....	37
Tablo 18.	Mitokondri 16S rRNA, COI, Cyt b geni ve kombine dizilerine dayalı olarak mini inci populasyonların amova analizi.....	38

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
16S rRNA	16S ribozomal RNA
COI	Sitokrom oksidaz alt ünite I
Cyt <i>b</i>	Sitokrom <i>b</i>
ddH ₂ O	Distile su
ddNTP	Dideoksiribonükleozit trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
M	Molar
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
mtDNA	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
Myö	Milyon yıl önce
ng	Nanogram
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakika başına dönme hızı
TAE	Tris-Asetik asit-Etilendiamintetraasetik asit
T _m	Primerlerin erime sıcaklığı
U	Ünite
°C	Santigrad derece
µl	Mikrolitre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Küresel insan nüfusunun yedi milyarı aştığı son yıllarda insan kaynaklı faaliyetlerin hem doğrudan hem dolaylı sonuçları, şu anda nesli tükenme tehlikesi altında olan canlı sayısı ile doğrudan ilişkilidir (Primack, 2002). Mevcut biyoçeşitliliğin korunması için en büyük tehdit olmaya devam eden insan kaynaklı çevresel etkiler göz önüne alındığında, Dünya'nın biyolojik çeşitliliğinin sürdürülebilirliği büyük önem taşımaktadır (Pereira et al., 2010). Giderek daha önemli bir araştırma haline gelen koruma biyolojisi kapsamında mevcut biyolojik çeşitliliğinin korunması yalnızca çevrebilimle ilgili hizmetleri noktasında değil, aynı zamanda türleşme vb. evrimsel etkileşimler yoluyla biyolojik çeşitliliğin uzun vadede korunması için de hayati önem taşımaktadır. (Primack, 2002). Yokolma tehlikesi altındaki popülasyonların belirlenmesi, uygun koruma ve yönetim stratejileri ve yaklaşımları geliştirmek için tür biyolojisi, çevrebilim, demografik yaşam öyküsü ve genetik çeşitliliği içeren çok disiplinli bir değerlendirmeyi gerektirmektedir (Frankham, 2002). Bu disiplinlerden genetiğin koruma biyolojisine uygulanması genetik olarak tehdit altındaki popülasyonları tanımlamak için gereklidir çünkü genetik çeşitliliğin kaybı, yakın gelecekteki örneğin olumsuz çevresel olaylar negatif genetik etkilere yol açabilir (Wright ve ark., 2008). Genetik analizlerin uygulanması, iklim değişikliği gibi çevresel değişikliklere evrimsel olarak cevap verebilecek genetik bilginin yok olması gibi tehditlerle karşı karşıya olan tür veya popülasyonlarının izlenmesine olanak sağlayabilir (Frankham, 2002).

Canlıları benzerlik, köken ya da akrabalık ilişkilerine göre sınıflandıran taksonomi bilim dalında bugüne kadar morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler genetiğin gelişmesine bağlı olarak genetik karakterler de kullanılmakta olup bu sayede evrimsel sürece dair çok önemli bilgiler elde edilmesine katkı sağlamıştır (Qi vd., 2007).

Morfolojik ve moleküler taksonomi olarak gruplandırılan çalışmalardan morfolojik taksonomi çalışmalarının iki önemli aşaması bulunmaktadır. Bunların ilki teşhis aşamasıdır. Teşhis aşamasında örnekler daha önceden taksonomide yerleri

belirlenmiş bireylerle mukayese edilir ve taksonomik olarak anlam taşıyan karakterler üzerinden değerlendirme yapılır. Bu karakterler, iki farklı taksona ait bireyleri birbirinden kesin olarak ayırt edebilen karakterlerdir. Morfolojik taksonominin ikinci aşaması ise sınıflandırmadır. Sınıflandırmada cins, tür, aile gibi taksonomik kategoriler çeşitli özellikleri bakımından birbirleriyle karşılaştırılmak suretiyle düzenlenir. Balıklar için yapılan sistematik çalışmalar, diğer birçok canlı türünde de olduğu gibi klasik morfolojik karakterlerden yola çıkılarak yapılmaktadır. Bugüne kadar belirlenen taksonomik sınıflandırmalar göz önüne alındığında genellikle morfolojik karakterlerden yararlanıldığı görülmektedir.

Moleküler genetik alanındaki gelişmelerin sonrasında taksonomi ve genetik alanında çalışan araştırmacılar, türleri tanımlama konusunda her bir türün sahip olduğu farklı genetik yapıdan yararlanma yolunu seçmişlerdir. Farklı türler arasındaki anatomik ve morfolojik farklılıklar, bazı durumlarda canlıların taksonomik pozisyonlarının belirlenebilmesi için yeterli olamamaktadır. Aynı türün farklı habitatlarda yaşamlarını sürdüren bireyleri, ortama uyum sonucu anatomik ve morfolojik yapıları bakımından birbirlerinden farklılık gösterebilirler. Genotipik yapının fenotipik yapıya oranla daha kararlı olması ve sadece morfoloji yoluyla elde edilen bilgilerin yeterli olmaması araştırmacıları taksonomik çalışmalarda genetik karakterlerden faydalanmaya yönlendirmiştir (Klug ve Cummings, 2000).

Bu nedenlerden dolayı günümüzde taksonomi ve filogeni alanında yapılan çalışmalarda DNA'yı, özellikle de mitokondri DNA'yı araç edinen moleküler teknikler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1.2. Sazansı Ailesinin Genel Özellikleri

Sazansı familyası, tüm dünyada yaklaşık 2100 tür ile temsil edildiği bilinen, tatlı su balıkları içerisindeki en büyük familyalardan biridir (Winfield ve Nelson, 1991). Sazansı familyası Madagaskar, Avustralya, Yeni Zelanda ve Güney Amerika haricinde oldukça geniş bir yayılım alanına sahip olmakla birlikte (Kottelat ve Freyhof, 2007) familyaya ait çoğu cinsin dar bir yayılım alanlarına sahip olması zoocoğrafya açısından oldukça önemlidir (Banarescu, 1991).

Sazansı familyası; biyolojik araştırmalar, insan besini ve akvaryum balıkçılığı açısından dünyanın en önemli tatlı su balık türlerini içermektedir. Büyük su bitkileri, plankton, çamur içerisinde bulunan organik maddeler, alg ve küçük hayvanlar bu familyanın besinlerini oluşturmaktadır (Nelson, 1994). Türkiye i sularında bulunan 26 familya, 236 tür ve alttür'den 116'sının Sazansı familyası yesi olduğu bilinmektedir (Kuru, 2004). Çoğu kaynakta Sazansı familyasının 10 alt familyaya ayrıldığı rapor edilmesine rağmen bu familyanın alt familyalarının sınırları hala kesin olarak belirlenememiştir. Bu ayırmda kullanılan genel taksonomik ölçütler ise; dudakların şekli, bıyıklarının dizilimi ve sayısı, yutak kemikleri, yutak dişlerinin yapısı ve dizilimi, birinci solungaç yayındaki solungaç dikenini sayısı ve yapısı, hava kesesi, pullar, yüzgeçlerin konumu ve omur yapıları gibi taksonomik özelliklerdir (Demirsoy, 1997).

1.2.1. *Phoxinus* Genusunun Genel zellikleri

1.2.1.1. Habitat, Biyolojisi, Dağılımı ve Taksonomik Durumu

Phoxinus (Rafinesque, 1820), cinsine ait mini inci balıkları, doğal yayılış alanı boyunca geniş bir coğrafik aralıktaki çeşitli habitatlarda bulunur. Acı suyun yanı sıra sahil bölgelerinden 2000 metre rakıma ulaşan yüksek dağlara kadar uzanan akarsular, nehirler, göletler ve büyük gller gibi farklı tatlı su kaynaklarında bulunabilir. Genusun temsilcilerine eğimli, hızlı akan nehirlerde daha az rastlanırken sığ göllerde, yavaş akan nehirlerde daha bol miktarda bulunur. Soğuk ve oksijen oranı yüksek sularda, kumlu veya taşlı bir zemine sahip olan temiz akarsuları ve nehirlerde yaşamaktadır (Freyhof ve Kottelat, 2007).

Mini inci balıklarının genelde sırtları kahverengimsi yeşil olup, yan tarafta çok sayıda kahverengi ve siyah lekelerine sahip kk, hareketli ve tatlı su balıklarıdır. Oldukça büyük gözleri, kk bir ağzı ve kt burunları vardır (Cihar, 1991; Buczacki, 2002). Erkekler reme döneminde parlak renklidir, yzgelerde beyaz yanıp söner, kırmızı pektoral ve pelvis yüzgeçleri, siyah boğaz, yanlar boyunca yeşil ve kırmızı karın bölgesi vardır. Ayrıca, torpido şeklindeki bir vcoda sahiptir ve yanal çizgi boyunca 80-100 adet kk sikloid pullara sahiptir (Maitland, 2004).

Mini inci balıkları gruplar halinde yaşar ve bitki artıkları, algler, yumuşakçalar, böcekler ve kabuklular ile beslenir (Davies vd., 2012). Mini inci balıklarının ortalama boyu 6-10 cm ve maksimum boyu ise 14-15 cm'dir. Bu türlere ait bireylerin olgunlaşmasındaki büyüme oranları, yaşı ve büyüklüğü, nüfus yoğunluğu, yükseklik ve enlem vb. çok sayıda çevresel faktör gibi etmenlere bağlı olarak büyük ölçüde değişir (Mills, 1988; Museth vd., 2002). Yumurtlama 10°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda Nisan'dan Haziran'a kadar sürebilir (Freyhof ve Kottelat, 2008). Bu süre zarfında sığ, çakıllı alanlarda yumurtlamak için kısa göç hareketleri gerçekleştirirler (Davies vd., 2012). Balıklar yaklaşık 30 mm standart uzunluktaki cinsel olgunluğa her iki cinsiyet tarafından erişilir. altı yıla kadar yaşarlar.

Phoxinus strandjae türü genellikle *Petroleuciscus borysthenicus*, *Gobio bulgaricus*, *Squalius cephalus*, *Barbus bergi*, *B. cyclolepis* ve *Rhodeus amarus*'la aynı habitatı paylaşır (Saç ve Özuluğ, 2015). Mini inci, kahverengi alabalık (*Salmo trutta fario*) ve birçok su kuşu da dahil olmak üzere daha büyük balıkların diyetinin önemli bir bileşenidir (Magurran, 1986). *Phoxinus* türleri akarsu ve nehirlerin kalitesini ve oksijen içeriğinin iyi bir göstergesidir. Bu nedenle, çevresel kirlilik ve Alabalık stoklarının aşırı büyümesi tehditi altında bu genusun türleri Kırmızı Listenin düşük riskli grubunda değerlendirilmektedir (Freyhof ve Kottelat, 2008). Mini inci balığı, Cyprinidae türlerinin en zengin omurgalı ailesinin bir üyesidir. Doğu Sibirya'dan İspanya'ya ve İngiliz Adalarına, Avrupa ve Kuzey Asya kıtalarının büyük bölümü boyunca dağılım göstermektedir (Borgstrom vd., 1996; Museth vd., 2007). Diğer taraftan, *Phoxinus* genusu bugün bilinen 21 türü içermektedir (Froese ve Pauly, 2015).

Tablo 1. *Phoxinus strandjae* türünün sistematigi.

Alem	Hayvanlar (Animalia)
Şube	Kordalılar (Chordata)
Alt şube	Omurgalılar (Vertebrata)
Sınıf	Işınsal Yüzgeçliler (Actinopterygii)
Takım	Sazansılar (Cypriniformes)
Aile	Sazangiller (Cyprinidae)
Cins	<i>Phoxinus</i>
Tür	<i>Phoxinus strandjae</i> (Drensky, 1926)

1.3. Sistematikte Kullanılan Genetik Teknikler

1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği Mullis tarafından 1985 yılında geliştirilmiş olup laboratuvar ortamında herhangi bir DNA fragmentinin kopyalanmasına ve artırılmasına imkan verir. 1993 yılında Mullis'in bu çalışması Nobel ödülüne layık görülmüştür. Polimeraz zincir reaksiyonu, evrimden, moleküler biyolojiye, insan genetiğinden, gelişim ve adli tıpa kadar birçok konuda uygulama alanı bulmuştur (Klug ve Cummings, 2000).

PCR; DNA molekülü içerisindeki, belirli DNA sekanslarının direkt çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu tekniğin gerçekleştirilebilmesi için nanogram düzeyindeki miktarlarda DNA bile yeterli olmaktadır. PCR ile belirli bir DNA parçasını çoğaltabilmek amacıyla, hedef DNA'nın nükleotit dizilimi hakkında ön bilgi gereklidir. Bu bilgiye, tek zincirli hale getirilen DNA'ya bağlanacak oligonükleotit primerlerin sentezlenmesinde kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak DNA tek zincirindeki kendi ile komplementer olan dizilerle eşleşerek temas sağlar. Yüksek sıcaklığa toleranslı bir DNA polimeraz (*Taq* DNA polimeraz olarak adlandırılır) ilgilenilen DNA'daki hedef bölgenin DNA zincirinin sentezlenmesini sağlar. PCR reaksiyonunun üç temel ana evresi vardır ve kopyalanmış ürünün miktarı söz konusu bu üç evrenin tekrar sayısına bağlı olarak artar.

PCR tekniğinin ilk adımında, ilgili DNA molekülü denatürasyon yolu ile tek zincirli hale getirilir. Bu işlemin gerçekleştirilebilmesi için 90-94°C'de, 4-5 dakikalığına çift zincirli yapıya sahip olan DNA tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Takiben ortam sıcaklığı primerlerin içeriğine bağlı olarak hesaplanan ve primer bağlanma sıcaklığı (T_m) da denilen 45-65°C arasında bir sıcaklık derecesine düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA molekülüne özgün olarak bağlanmasına olanak sağlanır. Bu primerler 15-30 nükleotit uzunluğunda sentetik oligonükleotitler olup çoğaltılacak hedef DNA parçasına komşu bölgelerdeki tamamlayıcı dizileri özgül olarak tanır ve bağlanır. İşte bu özgün primerler, kalıp DNA'dan hedef DNA parçasının sentezlenmesi için, sentez başlama bölgesi olarak rol oynar. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık, bu

polimerizasyonun (zincir uzamasının) gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa çıkarılır. Son basamakta ise PCR solusyonundaki DNA polimeraz enzimi primerlerin arasında kalan bölgeyi 72°C de sentezler. DNA polimeraz, primerlerin bağlanma bölgesinin önünden itibaren nükleotitleri DNA molekülünde 5'→3'yönünde ekleyerek hedef DNA parçasının bir kopyasını oluşturacak uzamayı sağlamış olur ve bu sayede hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturulmuş olur (Klug ve Cummings, 2000). Gerekli olan sıcaklık değişimleri ise ısıl döngüleyici olan thermal cyclers sayesinde gerçekleştirilir. Bu evrede, DNA polimeraz olarak isimlendirilen ve *Thermus aquaticus* isimli bir bakteriden elde edilen yüksek sıcaklıkta aktif *Taq* DNA polimeraz enziminden faydalanılır.

Bu üç aşama ile gerçekleştirilen PCR; çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale getirilmesi, primerlerin uygun sıcaklıkta kalıp DNA'ya bağlanması ve DNA polimeraz enzimi yardımıyla istenilen hedef DNA parçasının uzaması bir PCR döngüsü olarak bilinir. PCR bir zincirleme reaksiyondur, zira yeni DNA molekülü sayısı her döngü sonunda ikiye katlanır ve oluşan yeni zincirler de bir sonraki döngüde kalıp görevi yaparlar. Bir PCR döngüsü 4-5 dakika sürebilir ve bu işlem genellikle ortalama 30-50 döngü arasında tekrarlanabilir.

1.3.2. DNA Dizi Analizi

1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi, nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde ve DNA birincil yapılarının tayininde kullanılan yöntem olup gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında bilgi edinmemize yardımcı olmuştur. 1940'larda DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemlerinin bulunmuş olmasına rağmen DNA'daki nükleotid diziliminin direkt kimyasal analizi 1960'lı yıllarda geliştirildi ve kullanılmaya başlandı. Bu analiz bir DNA dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayalıdır ve bu esnada nükleotitler radyoaktif veya radyoaktif olmayan maddelerle işaretlenmektedir.

DNA dizi analizi ile ilgili deneme de 1965 yılında Robert Holley 74 nükleotid uzunluğunda bir tRNA molekülünün dizi analizini gerçekleştirmiştir. 1977 yılında Allan Maxam- Walter Gilbert ve Frederick Sanger tarafından geliştirilen iki farklı DNA dizi analizi yöntemi 1980 yılında kimya alanında Nobel ödülüne layık görülmüştür.

Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nden Hood ve Smith (1986), DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine geliştirmiştir. 1992 yılında 21. kromozomun DNA dizi analizi tamamlanmıştır. Venter vd. (1995), *Haemophilus influenzae*' ya ait ilk DNA dizisini yayınlamıştır. 1996 yılında ulusal bir kurul tarafından bir ekmek mayası türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'nin DNA dizisi deşifre edilmiştir. 1999 yılında İngiltere, Japonya ve ABD'li bilim insanları tarafından insan 22. kromozomunun DNA dizisini tamamlanmıştır. 2000 yılı İnsan Genom Projesi katılımcıları ve Celera insan gen haritası taslağını tamamladıklarını açıklamıştır. Whitehead Enstitüsünde görevli olan Page vd. (2003) Y kromozomunun dizi analizini tamamlamışlardır (Zülal, 2001).

DNA Dizi Analizinde günümüzde Sanger zincir sonlanma yöntemi (Sanger vd.,1977) en yaygın kullanılan yöntemdir.

1.3.2.1. Sanger Zincir Sonlandırma Yöntemi

Sanger zincir sonlanma yöntemi (Sanger vd., 1977) dideoksi veya zincir sonlandırma reaksiyonları olarak da isimlendirilen enzimatik DNA sentezine dayanır. Bu yöntemde nükleotit dizisi belirlenecek olan DNA zinciri sentezlenecek zincir için kalıp görevi yapar. Yöntem, DNA polimerazın hem dNTP'leri hem de deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu olmayan ddNTP'leri substrat olarak kullanabilme esasına dayanır. Sentezlenmekte olan DNA zincirine DNA polimeraz tarafından herhangi bir ddNTP'nin eklenmesi nedeniyle 3' ucunda OH grubu olmadığı için sentezi durmaktadır. Dizi analizi esnasında 4 farklı reaksiyon karışımı hazırlanır. Karışımların herbiri kalıp DNA zinciri, primer, dört tip dNTP ve özgül zincir sonlanması amacıyla düşük miktarda ddNTP'lerden sadece birini içerir. Reaksiyonların herbirinde eser miktarda değiştirilmiş nükleotit kullanılmasından dolayı yeni zincir sentezi gelişigüzel sonlandırılarak bir sıra DNA parçası meydana gelir (Klug ve Cummings, 2000). Herbir reaksiyon karışımında elde edilen PCR ürünleri elektrik alana maruz bırakılarak agaroz jelde birlikte koşturulur. Uygulanan elektriksel alanda PCR ürünleri büyüklükleriyle ters orantılı olarak göç ederek jelde merdiven basamağı görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre, elde edilen DNA parçacıkları reaksiyon karışımındaki ddNTP'nin çeşidine bağlı olarak jel üzerinde okunur (Klug ve Cummings, 2000). Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayalı otomatik DNA dizi analizinde her bir çeşit nükleotit

için farklı floresan boyalar kullanılmaktadır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları monokromatik ışık ile taranan elektroferik sistemdeki farklı büyüklüklerdeki fragmentlerin ucundaki floresan boyalı nükleotitleri özgün dalga boyundaki ışığı geri yansıtır. Yansıyan ışık demeti detektör yardımıyla kaydedilerek hedef DNA fragmentinin nükleotit sırası belirlenir (Sambrook vd., 1989).

1.4. Veri Analizi

1.4.1. Genetik Çeşitlilik

Bir populasyondaki bireyler arasındaki dizi farklılığı seviyesini gösteren nükleotit çeşitlilik ve farklı allel sayılarının ölçümü olarak ifade edilebilen haplotip çeşitlilik populasyonlardaki genetik çeşitliliğin iki farklı ölçüm yöntemidir (Avise, 2000). Düşük haplotip ($Hd < 0.05$) ve nükleotit çeşitlilik ($\pi < 0.05$) değerleri yakın zamandaki bir populasyon darboğazını veya bir veya birkaç mitokondri soy grubunun kurucu etkisini işaret etmektedir. Düşük haplotip ($Hd < 0.05$) ve yüksek nükleotit çeşitlilik ($\pi > 0.05$) değerleri coğrafi olarak altbölümlere ayrılmış olan populasyonlar arasındaki ayrımı gösterir. Yüksek haplotip ($Hd > 0.05$) ve düşük nükleotit çeşitlilik ($\pi < 0.05$) değerleri populasyon darboğazını takip eden hızlı büyüme ve mutasyon birikimini ifade eder. Yüksek haplotip ($Hd < 0.05$) ve nükleotit çeşitlilik ($\pi < 0.05$) değerleri uzun evrimsel hikâyesi olan büyük ve durağan populasyonları veya farklı soy grupları arasındaki ikinci teması düşündürür (Grant ve Bowen, 1998).

1.4.2. Filogenetik Analizler

1.4.2.1. Filogenetik Ağaç Oluşturma

Filogenetik analizin amacı farklı türler arasında olan ilişkiyi ortaya koymaktır. Moleküler filogeni çalışmalarının amacı ise DNA ve proteinlerdeki değişimlerin hızını ve karakterini belirlemek ve böylece gen ve organizmaların değişimsel tarihini araştırmaktır. Filogenetik incelemelerle ulaşılan verilerin farklı akış şemaları ve istatistiksel analizler yoluyla türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermek için bir ağaca dönüştürülmesi en uygun yaklaşımdır (Saitou ve Imanishi, 1989). Filogenetik ağaçlar,

dallanma olaylarının modelini bazen de zamanını belirler ve ayrıca türlerin ortaya çıkış sırasını ve aralarındaki akrabalık ilişkilerini belirler. Bir filogenetik ağaç, düğümler ve dallar olmak üzere iki kısımdan oluşur. Dallar, türlerin atasal populasyonlarının zamansal durumlarını sergilemekte olup düğümler ise türlerin veya populasyonların ayrıldığı noktaları göstermektedir (Freeman ve Herron, 1999). Ağaçtaki öncülü olmayan tek düğüm olan kök ortak bir atayı işaret eder ve ağacın herhangi bir noktasında olabilir. Türler arasındaki ilişki ortak ata gösterilmeden sadece köksüz ağaçlarda verilir (Mount, 2001). Filogenetik ağaçtaki her bir düğüm evrimsel süreçte farklılaşan taksonomik bir gruba işaret etmektedir. Ağaçta bulunan dıştaki dallar türleri ifade ederken, içteki dallar ve düğümler ise türler arası ilişkiyi yansıtmaktadır. Yakın ilişki içindeki türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer alırken dal uzunlukları genellikle zaman içerisindeki değişikliklerin sayısını ifade eder (Mount, 2001). Filogenetik ağaç oluşturma metodları mesafe temelli ve karakter temelli olmak üzere iki ana kategori içerisinde sınıflandırılabilir.

1.4.2.1.1 Mesafe Temelli Yöntemler

Dizin hizalaması sonucu hesaplanan evrimsel mesafeler, her bir dizi çifti arasındaki mesafeler ilişkisinin oluşturulmasında kullanılabilir. Matristeki çiftli mesafe skorları ile tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulabilir (Felsenstein, 1987). En benzer dizi çiftlerinden başlayan bir mesafe matrisine dayanarak filogenetik ağacı hesap ederler. Mesafe temelli yöntemlerden bazıları; UPGMA ve Komşu Birleştirme (Neighbour joining) yöntemleridir.

1.4.2.1.1.1. Aritmetik Ortalama Kullanan Ağırlıksız Gruplama Yöntemi

UPGMA yöntemi evrimsel kökeni yansıtmama amacı olmayan bir işlemdir. Bu nedenle bu yöntemde hesaplanan mesafeler ile gerçek evrimsel mesafeler arasında uyum görülmemesi bu yöntemin başarılı olmadığını göstermektedir. Yöntem, ağacın dallar boyunca değişim hızının sabit olduğunu farz eder. Bu nedenle hesaplamaları yaparken ağacın kökünü de hesaplar. Bu yöntem günümüzde çok tercih edilen bir yöntem değildir (Michener ve Sokal, 1957).

1.4.2.1.1.2. Komşu Birleştirme Yöntemi

Komşu birleştirme yöntemi kümelenme temelli algoritmaya benzer olarak taksonların kökten eşit uzaklıkta olduğu varsayılmaz. Bu yöntemle oluşturulan tek bir ağaç ile diğer olası ağaç topolojileri test edilemez. Oldukça büyük verisetleri analiz edilebilirken tüm olası topolojiler incelenemez (Saitou ve Nei, 1987).

1.4.2.1.2. Karakter Temelli Yöntemler

Bu yöntemler, atasal ilişkileri belirlemek için bilinen bütün evrimsel bilgiyi kullanır. Bu evrimsel bilgi diziler arasındaki bireysel değişimler olabilir. Dizilerde biriken mutasyonların sayılmasına dayanırlar. Bu yöntem mesafeye dayalı yöntemlere kıyasla daha yavaştır ve daha çok bilgisayar işlemi gerektirir (Li, 2004). Karakter temelli yöntemlerden bazıları; Maksimum parsimoni (MP), Maksimum likelihood (ML) ve Bayesian çıkarsama (BI) metodudur.

1.4.2.1.2.1. Maksimum Tutumluluk Yöntemi

Maksimum tutumluluk yöntemi, filogenetik ilişkilerin tanımlanmasında kullanılan bir metod olup verilerin olabilecek en basit şekilde açıklanması tercih edilmiştir. Ayrıca genetik mesafeler ile uyumlu bir ağaç topolojisi elde edilmesi için gerekli en az mutasyonun saptanmasına dayanan bir yöntemdir. Evrimsel biyolojide tutumluluk, evrimsel süreçte boyunca neler olduğuna dair sonuca varılırken, araştırmacının açığa çıkan evrimsel değişimin miktarını en aza indirgeyen yolu tercih etmesi anlamına gelmektedir (Freeman ve Herron, 1999).

MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır. Çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örnekleme varlığında uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda 'tahmini' yaklaşım uygulanmaktadır. En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir. Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren seç-bağla testi (bootstrapping) olarak adlandırılır (Freeman ve Herron, 1999).

1.4.2.1.2.2. Maksimum Olasılık Yöntemi

1981 yılında Joseph Felsenstein tarafından maksimum parsimoni analizine alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir (Felsenstein, 1987). Bu yöntem sunulan tüm bilginin daha etkin kullanılması ve varolan çok sayıda ağaç içerisinde en iyisinin seçilmesinde istatistik testler kullanma ihtimali yaratmak için tasarlanmıştır. Bu yöntem, nükleotit değişikliklerinin ortaya çıkma ihtimallerini tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir sorusunu sormaktadır. Program herbir ağaç topolojisini değerlendirir ve gözlenen verinin oluşturulma ihtimalini hesaplar. Mukayese edilen ağaç topolojilerinin kabul ya da reddi için ölçüt en yüksek olasılığı olan ağacı seçmektir, en olası ağaç en iyi ağaçtır. Ancak olasılık metodları, hesaplamada yavaştır ve bu yöntemle çok büyük veri setleri, parsimoni yöntemiyle olduğu kadar kapsamlı analiz edilemez (Lewis, 1998).

1.4.2.1.2.3. Bayesian Çıkarsama Yöntemi

Filogenetiğin en popüler metodu olmakla birlikte temel olarak maksimum olasılık metoduna benzemektedir fakat sonraki olasılıkların kullanımı sayesinde bu yöntemden ayrılır. Bu yöntem sadece doğru filogeniyi bulmayı değil, oluşabilecek bütün filogenilerin sonraki olasılık dağılımlarını hesaplamayı amaçlar. Bunun için bazı evrimsel parametrelerin olasılıklarını ve öncül olasılık dağılımlarını kullanır. Çok sayıda oluşabilecek olan ağaçların analizi için Markov zinciri Monte Carlo algoritmasına dayalı metotlar kullanılır (Yang ve Rannala, 1997; Larget ve Simon, 1999).

1.4.2.2. Haplotip Ağı Analizi

Bir türün haplotipleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymanın bir diğer yolu haplotip ağı analizidir. Her ayrı haplotip, ağdaki bir düğümle temsil edilir ve onları birbirinden ayıran mutasyon bölgeleri bağlantı kenarlarında belirtilir. Düğümün boyutu, haplotipi paylaşan bireylerin sayısı ile orantılıdır. Çevrelerin boyutları haplotip frekansı ile orantılıdır.

Haplotip ağları, tür içi soylar arası ilişkileri görselleştirmek ve populasyonların tarihi ve biyocoğrafyası hakkında çıkarım yapmak için nüfus genetik verilerini analizinde kullanılır (Leigh ve Bryant, 2015). Haplotip ağı çok sayıda filogenetik ağı yaklaşımından oluşturulabilir. Bunlardan en çok kullanılan 2 yöntem Medyan Birleştirme Ağı (Median Joining-MJ) ve Minimum kapsayan ağaç (Minimum Spanning Network-MSN) (Bandelt vd., 1999) algoritmalarıdır. Minimum kapsayan ağaç (MSN) algoritması kullanılarak oluşturulan ağlar, haplotipler arasındaki en düşük mutasyonel farklılıklara göre bağlantıların kurulduğu diğer bir deyişle dizilerin mümkün olan en kısa toplam uzunlukta haplotip ilişkilerini içeren bağlantı ağlarıdır. Median ağları ise elde edilen ağın, tüm tutarlı (parsimonik) ağaçları kapsamasını garantileyerek, atasal düğümlerin belirlenmesinde sistematik bir metot sağlamaktadır (Bandelt, 1999).

1.5. Populasyon Yapı Analizleri

1.5.1. Populasyonlar Arasındaki Gen Akışı Miktarının Belirlenmesi

Wright (1951), doğal populasyonlar arasındaki genetik farklılığın düzeyinin göstergesi olan fiksasyon indeksi (F_{ST}) değerlerini takip eden eşitliği kullanarak geliştirmiştir.

$$F_{ST} = 1/(1+4Nm)$$

F_{ST} : Populasyonlar arası genetik farklılık değeri

m : Populasyonlar arası göç miktarı

Ne : Etkili populasyon büyüklüğü

Populasyon içindeki allel frekansının değişiminde etkili olan ve populasyonlar arası allel genlerin hareketliliği olarak ifade edilen gen akışı (Wright, 1951) miktarı F_{ST} değerleri yardımıyla ve Wright (1951)'in $Nm = [(1 / F_{ST}) - 1] / 4$ formülünün kullanımıyla her bir populasyon çifti için hesaplanabilmektedir.

1.5.2. Genetik Verilerin Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)

Populasyonların genetik yapısı Weir ve Cockerham (1984) tarafından geliştirilen varyans bileşenlerinin hiyerarşik dağılımının analizi moleküler varyans analizi (AMOVA) (Excoffier vd., 1992) yoluyla gerçekleştirilebilmektedir. Varyansın

hiyerarşik analizi gruplar veya populasyon arasındaki ve içindeki farklılıklardan dolayı total varyansı kovaryans bileşenlerine bölmekte ve bu varyans bileşenlerinin kullanımıyla fiksasyon indislerini takip eden formüllerle hesaplanmaktadır.

$$F_{CT} = V_a / (V_a + V_b)$$

$$F_{SC} = V_b / (V_b + V_c)$$

$$F_{ST} = V_a + V_b = V_a + V_b + V_c$$

V_a : Gruplar arası varyans bileşeni

V_b : Populasyonlar arası (gruplar içi) varyans bileşeni

V_c : Populasyonlar içi varyans bileşeni

1.6. Tarihsel Demografik Hikaye

1.6.1. Uyumsuzluk Dağılım Analizi

Mismatch (uyumsuzluk) dağılım analizi populasyon içi genetik varyasyonu kullanarak (alleler arasındaki ikili farklılıkların frekanslarına dayalı olarak) populasyonun geçmişteki büyüklüğü hakkında bilgi veren grafiksel bir yöntem olup (Slatkin ve Hudson, 1991) populasyonların geçmişte bir nüfus artışı geçirip geçirmediğinin anlaşılmasına yönelik bir testtir. Demografik dengede olduğu şeklinde ifade edilen sabit büyüklüğe sahip populasyonlar genellikle çoklu modeli (multimodal) işaret ederken, yakın zamandaki hızlı nüfus artışının (Rogers ve Harpending, 1992; Hudson ve Slatkin, 1991) veya komşu yerel populasyonlar arasında yüksek göçün (Ray vd., 2003; Excoffier, 2004) meydana geldiği populasyonlar genellikle tekli model (düzgün çan eğrisi) gösterir (Slatkin ve Hudson, 1991).

Uyumsuzluk dağılımı grafiğinde dağılımların karşılaştırılmasında komşu iki barın tepe noktası arasındaki farkın kareleri toplamı şeklinde ifade edilen raggedness (r) istatistiği kullanılmaktadır (Jobling vd., 2004). Düzgün çan eğrisi dağılımlar, daha yüksek raggedness değeri gösteren multimodal dağılıma oranla genellikle daha düşük r değerlerine sahip olup (DNA dizileri için <0.03) hızlı populasyon genişlemesi geçirildiğini göstermektedir. Populasyon genişlemesinin zamansal dağılımı y eksenine uzaklığına dayalı olarak hesaplanabilmektedir. Genişleme ne kadar eski bir zamanda yaşandıysa dağılımın ortalama y ekseninden o kadar uzak olmaktadır. Sabit büyüklükteki populasyonlarda bireyler arasında paylaşılan allel (mutasyon) sayısı büyüyen populasyonlara oranla daha fazladır ve geçmişte meydana gelen populasyon

genişleme olayları esnasında bireyler daha fazla sayıda mutasyonla birbirlerinden farklılaşmışlardır (Jobling vd., 2004).

Populasyonların hikâyesini ortaya koyabilmek için sadece uyumsuzluk dağılımlarına bakmak yeterli olmayabilir. Gözlenen genetik değişim modeli populasyon genişlemesinin yanısıra pozitif seçilim sinyali ile de ortaya çıkmış olabileceğinden yanlış yorumlanabilir. Bu nedenle, genetik varyasyona bakarak populasyonun hikâyesi açıklamaya çalışırken populasyonun seçilime maruz kalıp kalmadığını belirlemek gerekir. Negatif seçilim yeni kötü varyantların populasyondaki frekanslarını azaltırken pozitif seçilim iyi varyantların frekansını artırır. Bazı koşullarda oluşan yeni mutasyonun pozitif seçilimi sonucu ona bağlı kötü genetik varyantlar da populasyonda artabilir. Bu duruma “genetik otostop” denilmektedir (URL-2). Populasyonların geçmişte seçilime uğrayıp uğramadıklarını belirlemek için Tajima’s D (Tajima, 1989) ve Fu’nun Fs (Fu, 1997) gibi nötralite testleri kullanılabilir.

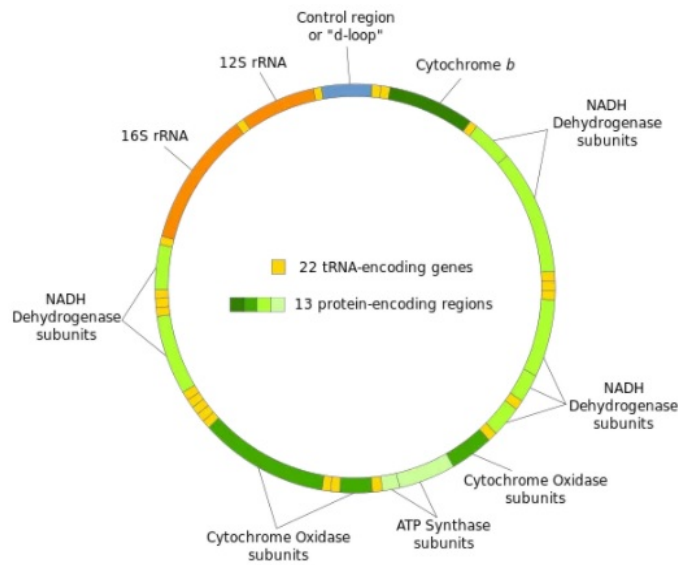
Populasyon büyüklüğündeki tarihsel değişimin varlığı, demografik süreçlerden etkilenen parametreler olan Tajima’s D ve Fu’nun Fs gibi tarafsızlık (neutrality) sınama testleri kullanılarak değerlendirilebilir. Negatif Tajima's D değerleri yeni mutasyonlar yüksek miktarda görüldüğünde ortaya çıkar. Bu durum populasyon genişlemesini akla getirmektedir. Pozitif değerler yeni mutasyonların çok az miktarda görüldüğünde ortaya çıkar ve dengeli seçilim ya da nüfus azalmasına işaret eder. Negatif Fu'nun Fs değerleri yeni ortaya çıkan haplotipler yüksek miktarda görüldüğünde söz konusudur Populasyon genişlemesi ya da “genetik otostop“u akla getirir. Fu’nun Fs ve Tajima D değerleri yüzlerce hatta binlerce kez simüle edilerek istatistiklerin güvenilirliği artırılabilir. Bu indeksler, sabit büyüklükteki bir nüfusta neredeyse sıfır iken belirgin negatif ($-2 \leq$) değerleri nüfus büyüklüğündeki ani bir genişlemeyi, anlamlı pozitif değerler ($2 \geq$) ise nüfusun alt bölümlere ayrılışını veya yakın nüfus tıkanıklığı gibi işlemleri göstermektedir (URL-2).

Uyumsuzluk dağılımı, nötralite testleri gerçekleştirilip populasyonun geçmişi ile ilgili bilgiler çok sayıda gen bölgesi üzerinden değerlendirildiğinde populasyon üzerinde hangi evrimsel mekanizmanın belirleyici olduğuna dair daha sağlam görüşler ortaya konulabilmektedir (URL-1).

1.7. Mitokondri DNA (mtDNA)

Günümüzde, mitokondri DNA'nın moleküler temeli ve genlerinin fonksiyonları ile ilgili çok fazla bilgi bulunmaktadır. Pek çok ökaryotta mtDNA çift zincirli kapalı halkasal yapıdadır, yarı saklı (semikonservatif) olarak kendini eşler ve ökaryotların bir özelliği olan kromozomal proteinlere bağlı değildir. Büyüklüğü bakımından mtDNA organizmadan organizmaya farklılık gösterir. İnsan da dâhil pek çok hayvanda mtDNA, 16.000 ila 18.000 bç (16-18 kb) büyüklüğündedir. Omurgalı canlılarda mitokondri başına 5 ila 10 mtDNA molekülü bulunurken, bitkilerde ise bu sayı 20-40 kopyaya kadar çıkabilir (Klug ve Cummings, 2000). Birkaç istisna dışında gen tekrarı hiç yoktur ya da çok azdır ve replikasyonu çekirdek DNA'sından sentezlenen enzimlere bağlıdır. Mitokondriyal genler, ribozomal RNA'ları, 20'den fazla tRNA'yı (Şekil 1) ve organelin hücresel solunum görevini yapabilmesi için gerekli pek çok proteini kodlamaktadır (Klug ve Cummings, 2000).

Çekirdekteki DNA ile mtDNA'nın farklı evrimsel kökenlerden geldikleri ve mtDNA'nın bakterilerde bulunan halkasal genomlardan türediği düşünülmektedir. Bu özelliği ile prokaryot hücreden ökaryot hücreye geçiş konusuna ışık tutar. Ayrıca evrimsel süreçle ilgili birçok çalışmaya da dayanak olmuştur. Eşeyli üreyen ökaryotlarda döllenme esnasında sadece yumurta hücreindeki mitokondriler zigot içerisinde kalır. Spermatozoidin çoğunlukla tek olan mitokondrisi ise döllenme olduğu



Şekil 1. Mitokondri genomunun genel yapısı (URL-2)

zaman spermle birlikte ölür. Böylece normal diploid hücre DNA'sı hem anne hem de babadan gelen genlerle oluşurken, mitokondri DNA sadece anneden alınmış olur (Meusel vd., 1993). Mitokondri DNA'nın özellikleri şöyle özetlenebilir:

1. Sadece anneden gelen halkasal kod dizisine sahiptir.
2. Kod dizisi hücre DNA'sından çok daha kısa.
3. Sadece mutasyonlarla değişim göstermiş.
4. Mayoz bölünme geçirmemiş.
5. Mutasyonlar takip edilerek filogenetik soy ağacı oluşturmaya imkan tanır.

Bu bilgiler ışığında, incelediğimiz türlerin mtDNA'sında bulunan, yüksek evrimsel stabiliteye sahip ve filogenetik çalışmalarda sıkça kullanılan genlerin, moleküler teknikler ile izolasyonu, bunların jel elektroforezinde görüntülenmesi, polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılıp, dizi analizlerinin yapılması ile elde edilecek verilerden yola çıkarak yapılacak bir filogenetik analiz ile daha doğru bir taksonomik inceleme yapmak mümkün olacaktır.

1.7.1. Sitokrom b

Sitokrom b geni sistematik ve moleküler evrim çalışmalarında en çok tercih edilen ve mtDNA molekülünün ağır zincirindeki en önemli protein olan hücre metabolizmasının solunum zincirinde önemli yeri olan transmembran bir proteini kodlayan genidir. (Farias vd., 2001). Sitokrom b geni muhtemelen balıklardaki en iyi incelenen mitokondri geni olup çok sayıda takson için birçok taksonomik düzeyde filogenetik sinyal içerdiği ispatlanmıştır (Kocher vd., 1989; Meyer vd., 1990; Zhu vd., 1994) ve bu nedenle birçok taksonomik seviyede farklılıkları ortaya koymak için sistematik çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır.

1.7.2. Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I

Son yıllarda yapılan çalışmalarda genellikle uygun bir barkod üreten sitokrom c oksidaz (COI) alt ünite I geninden yaklaşık 652 bç'lik kısa bir DNA dizisinin türlere

özgü DNA profillerinin ortaya çıkarılması için kullanılabileceğini göstermiştir (Hebert ve Gregory, 2005). Farklı balık türlerinde tür içi varyasyon genellikle oldukça düşük iken ortalama türler arası mesafenin nispeten yüksek olduğu COI-DNA barkod dizisinin çoğu tür için yüksek düzeyde taksonomik ayırım gücü (>%95) sağladığı tespit edilmiştir (Ward vd., 2005; Holmes vd., 2009; Keskin ve Atar, 2013; Geiger vd., 2014; Kneibelsberger vd., 2014).

1.7.3. 16S rRNA

Mitokondriyal DNA'nın en iyi korunmuş dolayısıyla en az mutasyon biriktiren bölgelerinden biri olan 16S rRNA (Allard vd., 1992; Brown, 1985; Santos vd., 2003) balık filogenetiği ile ilgili çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca, evrilme hızının protein kodlayıcı genlerin yarısı kadar olması türlerin daha iyi tanımlanması için tercih edilmesinin bir diğer nedenidir (Brown vd., 1982). 16S rRNA mitokondriyal genin ayrıca balık türlerini ayırt etmek için iyi bir belirteç olduğu gösterilmiştir ve Cypriniformes'in çeşitli ailelerindeki tür arası araştırmalarda kullanılmıştır (Simons vd., 2003; Borowski ve Mertz, 2001; Turan vd., 2008).

1.8. Literatür Özeti

1.8.1. Morfolojik Çalışmalar

Phoxinus cinsi Rafinesque 1820 (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) üyeleri, Avrupa ve Kuzey Asya'da dağılım gösteren, soğuğa uyumlu küçük tatlısu balıklarının bir grubudur (Kottelat, 2007; Strange ve Mayden, 2009). Avrupa mini inci balığı, *Phoxinus* Rafinesque 1820 cinsinin çeşitli üyeleri için yaygın bir isim olup, Kuzey Avrasya'daki akarsularda yaşayan ve Avrupa'da tek bir tür olan *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) olarak kabul edilen her yerde küçük sazansı balıklardır. Böyle geniş bir dağılım, *P. phoxinus*'un tek bir türe veya bir grup türe ait olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Dolayısıyla *Phoxinus*'un taksonomisi ve sistematigi hala iyi çözülmüş değildir (Kottelat, 2007).

Benzer geniş dağılımlara sahip *Gobio gobio* veya *Cobitis taenia* gibi diğer taksonlar hakkındaki araştırmalar, yeni veya yeniden kurulmuş eski taksonları ortaya

çıkarmıştır (Perdices vd., 2003; Mendel vd., 2008). Palandacic vd. (2015) bu durumun *P. phoxinus* içinde geçerli olabileceğini düşünmektedir. Morfoloji temelli çalışmalar Doğu Karadeniz havzası için *P. colchicus* Berg 1910'u (Bogutskaya ve Naseka, 2004), Adriyatik havzası için *P. lumaireul* Schinz 1840'ı ve Veleka (Bulgaristan) ve Resowska (Türkiye) drenajlarından *P. strandjae* Drensky 1926'yı (Kottelat, 2007) ortaya çıkartmıştır. Buna ek olarak, Kottelat (2007) Fransa, İspanya ve Yunanistan'da sırasıyla kısıtlı dağılım gösteren üç yeni tür *P. bigerri*, *P. septimaniae* ve *P. strymonicus*'un varlığını önermiştir.

Ayrıca, IUCN taksonomik notlarına göre, Drin ve Skadar drenajlarından *Phoxinus* popülasyonlarının kimliği daha fazla araştırmayı gerektirir. Göllerin drenajı Skadar ve Ohri, yaygın Balkan Yarımadası gibi yüksek seviyede endemiklik nedeniyle biliniyor ve Balkanlar'daki *Phoxinus* çeşitliliğini zaten öngörülenden daha yüksek seviyede tutuyor (Kottelat ve Freyhof, 2007).

Son zamanlarda Bianco ve Bonis (2015), İtalya ve balkanlardaki *Phoxinus* türlerini ele alıp *Phoxinus phoxinus* türünün yeniden tanımlanmasının yanı sıra bu bölgelerden 4 yeni tür tanımlanmıştır. Bu türler *Phoxinus ketmaieri* (Krk adası, zrmanje nehri), *Phoxinus karsticus* (Trebinje nehri, Bosna hersek), *Phoxinus apollanicus* (Maraca-Zeta nehir sistemi, Skadar gölü) ve *Phoxinus likai* (Lika bölgesi)'dir. Diğer tanımlanmış türler ise *Phoxinus brachyurus* (Berg, 1912), *Phoxinus grumi* (Berg, 1907), *Phoxinus issykkulensis* (Berg, 1912), *Phoxinus keumkang* (Chyung, 1977), *Phoxinus oxycephalus* (Sauvage and Dabry de Thiersant, 1874), *Phoxinus oxyrhynchus* (Mori, 1930), *Phoxinus semotilus* (Jordan and Starks, 1905), *Phoxinus tchangii* (Chen, 1988), *Phoxinus ujmonensis* (Kaschenko, 1899), *Phoxinus csikii* (Hankó, 1922) ve *Phoxinus marsilii* (Heckel, 1836)'dir.

Türkiye'de dağılım gösteren *Phoxinus strandjae* ilk olarak Bulgaristan'daki Istranca dağ havzasından Drensky (1926) tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Bulgaristan ve Türkiye'de Yıldız Dağlarından Karadeniz'e akan Veleka ve Rezve drenajlarından bu tür bildirilmiştir (Kottelat, 2007). Önceleri Phoxinat (1997) ve Vassilev ve Pehlivanov (2005), tarafından *Phoxinus phoxinus*'un sinonimi olarak kabul edilen *P. strandjae* daha sonra Kottelat (2007), tarafından geçerli tür olarak verilmiştir. Avrupa tatlısu balıkları Nesli tehdit altında olan türlerin kırmızı Listesi (IUCN)

kıstaslarına göre değerlendirildiğinde, türlerin yalnızca bu iki drenajda olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, tehdit altındaki türler (EN) arasında gösterilmektedir (Kottelat ve Freyhof, 2007; Freyhof ve Brooks, 2011). 2000 ile 2014 yılları arasında Türkiye'de yapılan son saha araştırmaları sırasında, *P. strandjae*, on farklı küçük havzada 17 farklı lokasyonda bulunmuştur.

Avrupa *Phoxinus* türlerinde, genel olarak geleneksel taksonomi tarafından kullanılan morfolojik karakterler, türler arası ilişkilerin çözümlenmesi için sınırlı filogenetik bilgi sunmaktadır ve morfolojik çalışmalar ile cins içindeki kabul edilen türlerin bazılarının geçerliliği konusunda fikir birliğine varılamaz (Kottelat ve Freyhof, 2007; Kottelat, 2007; Bianco, 2014).

Ek olarak, *Phoxinus*'un morfometrik geometri çalışmaları, türlerin sınırlandırılması için önerilen karakterlerin bazıları (örn. Göz çapı, kaudal pedinle derinliği) etkileyen yaşam alanına bağımlı olarak vücut biçiminde esneklik gösterebilmektedir (Colin vd., 2011; Ramler vd., 2016). Diğer taraftan geometrik morfometrik yöntemlerin türleşme süreçlerini tespit etmek için güçlü araçlar olduğu gösterilmiştir (Kerschbaumer vd., 2014; Kerschbaumer vd., 2010; Ramler vd., 2014). Yine de, *Phoxinus* cinsindeki moleküler çalışmalarla ortaya atılan belirgin çeşitliliğin morfolojik karşılığının olmaması (Knebelsberger vd., 2015; Palandacic vd., 2015) cinsdeki kriptik soyların varlığına işaret etmektedir. Şu anda, Kuzeydoğu Atlantik, Kuzey Denizi, Baltık ve Karadeniz havzalarını içeren çok geniş bir dağılım gösteren *P. phoxinus* ile Avrupa drenajı için 11 *Phoxinus* türü önerilmektedir (Kottelat ve Freyhof, 2007). Kottelat (2007) ve Kottelat ve Freyhof (2007), Tuna mini inci balığını, *P. phoxinus*'dan farklı bir soy olarak belirttiler ancak Palandacic vd. (2017), bu ayrıma olanak sağlayan morfolojik özelliklere sahip olmadıklarını iddia etmektedirler.

1.8.2 Genetik Çalışmalar

Simons ve Richard Mayden (1998), Kuzey Amerika'da dağılım gösteren *Phoxinus* türlerinin 12S ve 16S ribozomal gen bölgelerini çalışmıştır. Yapılan bu çalışmada Amerika'nın kuzeyinde dağılım gösteren sazanların taksonomik problem olduğunu ve kıtaların ayrılması ile drenajlar nedeniyle sazan türlerinin belirli coğrafik

kıstaslara sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Amerika'nın batısında dağılım gösteren *Phoxinus* türlerinin %50'sinin monotipik cins özelliği gösterdiği belirtilmektedir.

Uzakdoğuya endemik 7 türün belirsiz olan taksonomik ilişkilerinin irdeleyen Sakai vd. (2006), uzakdoğu *Phoxinus* türlerinin aslında filogenetik olarak Avrupalılarla uzaktan ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.

Imoto vd. (2013), 31 türün kullanıldığı ve tatlı su balık taksonlarının filogenetik ilişkilerini ve biyocoğrafi dağılım modelini ortaya koymaya çalıştıkları çalışmada filogenetik çözümleme yapıldığında uzak doğuda dağılım gösteren *Phoxinin* türlerinin monofiletik olduğu ve Kuzey Amerika'da dağılım gösteren *Phoxinin* türlerinin Leuciscince soyuna yakın olduğu ortaya koyulmuştur.

Mitokondri introgresyonun etkisi nedeniyle çok düşük türler arası farklılık veya haplotip paylaşımı gösteren *Phoxinus*'unda içinde olduğu 8 sazansı genusununa ait türlerin tanımlanması uğraşındaki tutarsızlıkları giderebilmek amacıyla Behrens-Chapuis vd. (2015), tarafından mitokondri COI'nin tutarsızlık gösterdiği taksonlarda rhodopsin geninin barkod olarak eşzamanlı kullanımının avantajları değerlendirilmiştir.

Palandacic vd. (2015), tarafından gerçekleştirilen ve Balkan Yarımadası'ndaki *Phoxinus phoxinus* populasyonlarının 300'den fazla örnek üzerinden moleküler yöntemlerle phylocoğrafik dağılımını değerlendirmeyi amaçlandığı bu çalışmada Batı Balkan Yarımadası için iki tür (Danubian *P. phoxinus* ve Adriatic *P. lumaireul*) önerildi. Mitokondri sitokrom b ve RAG1 genlerinin Bayesian ve ML yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen moleküler analizi sonuçları *Phoxinus* sp.'nin çok yönlü kompleksliğine işaret ettiği rapor edilmiştir.

Palandacic vd. (2017), kriptik türleşme ve hakkındaki taksonomik tartışmalar nedeniyle Avrupa *P. phoxinus* tür kompleksinin revizyonu morfolojiye dayalı tür hipotezleri tip örnekleri ve tarihsel müze materyali de dâhil olmak üzere moleküler verilerle değerlendirilmiştir. Bu revizyon çalışmasının sonuçları göre 14 birincil hipotezin 3'ü (*P. ketmaieri*, *P. likai* ve *P. apollonicus*) reddedilirken *P. bigerri* ve *P. colchicus* türlerinin varlığı desteklenmiştir. *P. strandjae*, *P. strymonicus* ve *P. morella*

türleri için sağlıklı bir karar verilebilmesi için daha fazla örnek daha derinlemesine çalışılması gerektiğine karar verilmiştir. Son olarak, morfolojik türlerin altısı (*P. phoxinus*, *P. lumaireul*, *P. karsticus*, *P. septimanae*, *P. marsilii* ve *P. csikii*) mitokondri tarafından iyi ancak nükleer veri analizi ile sınırlı bir şekilde desteklenmiştir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Son morfolojik (Kottelat, 2007; Kottelat and Freyhof, 2007) ve moleküler çalışmalar (Geiger vd., 2014; Knebelsberger vd., 2015; Palandacic vd., 2015) *P. phoxinus*'un bir tür kompleksi olduğunu belirtmektedir. Avrupa'daki *Phoxinus* cinsi daha geniş filogenetik çalışmalar (örneğin Zardoya ve Doadrio, 1999) kapsamında yüzeysel olarak konu edilmesine rağmen bu eksiklik Palandacic vd. (2017), tarafından gerçekleştirilen geniş çaplı revizyon çalışmasıyla giderilmiştir. Bununla birlikte, Kottelat (2007), tarafından da dile getirildiği üzere Anadolu bölgesindeki *Phoxinus* popülasyonların incelenmesi için daha fazla taksonomik çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlamak amacıyla türlerin morfolojik olarak incelenmesine destek olarak Anadolu'daki popülasyonlarının genetik olarak tanımlanmasına ve karşılaştırılmasına olanak sağlayacak bir yöntem olan mitokondri gen dizilerinin analizi tercih edilmiştir. Ancak, tek gen yaklaşımları, taksonomik çıkarım için bazı hatalara neden olabileceğinden mevcut ve olası yeni türlerin genetik teşhisi ve aralarındaki ilişkilerin değerlendirilmesi sitokrom b, 16S rRNA ve sitokrom oksidaz I gibi çoklu mitokondri DNA belirteçleri birlikte kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Örnek Temini

Çalışma materyali olan Cyprinidae familyasına ait *Phoxinus* cinsine ait balık örneklemeleri dağılım gösterdikleri Güney Marmara, Trakya ve Batı Karadeniz bölgesinde 2015-16 yıllarında gerçekleştirilmiştir. Etkili bir örnekleme için Güney Marmara, Trakya ve Batı Karadeniz bölgesini temsil edecek sayıda ve coğrafik pozisyonda seçilen lokaliteler Şekil 2’te verilmiştir.



Şekil 2. *Phoxinus* populasyonlarının örneklendiği istasyonları gösteren harita.

Arazi çalışmaları esnasında örneklenen toplam 67 *Phoxinus* bireyinin lokalitelere dağılımı ve ait oldukları lokaliteler Tablo 2’de listelenmiştir. Örneklenen bireylerden yaklaşık 40 mg beyaz kas dokusu alınarak % 96’lik alkolde fikse edilerek laboratuvar çalışmasının yürütüleceği Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Genetik Laboratuvarına transfer edilmiştir.

2.2. *Phoxinus* Bireylerinden DNA Eldesi

DNA eldesi işlemine kadar -20°C’de saklanan kas dokularından 10-20 mg kadar alınıp 1,5 ml’lik eppendorf tüplere konulmuştur. Bu aşamadan itibaren balık beyaz kas dokusundan DNA eldesi, Promega Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti (Madison,

Tablo 2. *Phoxinus* örneklemesinin yapıldığı istasyonlar, koordinat ve örnek sayısı (N).

Lokaliteler	Koordinatlar	Rakım	N
1 Uludere, Hendek, Kocaeli	40°49.251'K/30°46.030'D	300	15
2 Kocaçay, Kalkım, Çanakkale	39°49.616'K/27°08.816'D	253	12
3 Abant Gölü, Bolu	40°36.584'K/31°16.605'D	1329	10
4 Soğucak Deresi, Vize, Kırklareli	41°38.612'K/27°39.387'D	291	8
5 Poyralı Deresi, Pınarhisar, Kırklareli	41°37.489'K/27°35.530'D	244	12
6 Rezve Deresi, Demirköy, Kırklareli	41°53.392'K/27°33.612'D	290	10

WI, USA) protokolüne göre yürütülmüştür. Örnek başına 500 µl Nuclei Lizis çözeltisi ve 120 µl 0,5 M EDTA (pH 8) çözeltisi içeren karışım buzda donma noktasına gelinceye dek yaklaşık 5 dakika bekletildi. 600 µl nuclei Lizis ve EDTA karışımı herbirinde ayrı örnekler için dokuların bulunduğu eppendorf tüplere konuldu. Daha sonra herbir tüpe 20 mg/ml 20 µl Proteinaz K eklendi. Isıtmalı çalkalayıcı cihazında 55°C’ de ve 1000 rpm’de doku tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 3 saat inkübe edildi. 3 µl RNase solusyonu eklenip tüpteki içeriğin iyice karışması için yeterli tekrarlar ters düz edilerek 30 dakika 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışımın sıcaklığının oda sıcaklığına düşmesi için 5 dakika bekletildi ve oda sıcaklığındaki örneğe 200 µl protein çöktürme çözeltisi eklenip yüksek hızda 20 saniye vortekslendikten sonra 5 dakika buzda bekletildi. Karışım 4 dakika 16000 rpm’de santrifüj edildikten sonra çökelen protein küçük beyaz bir pellet halinde belirmiştir. DNA içeren üst sıvı (süpernatant) dikkatli bir şekilde alınarak 600 µl izopropanol içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve içerik DNA zincirleri ipliksi yapıda gözle görününceye dek yavaşça ters düz etmek suretiyle karıştırıldı. Bu aşamadan daha sonra 16000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek çökelen DNA pellet süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 600 µl etanol ile iki defa yıkanmıştır. Takiben 16000 rpm’de 1 dakika santrifügasyondan sonra etanol mikropipet yardımıyla dikkatlice alınmıştır. DNA örneklerindeki kalan etanolü ortamdan tamamen uzaklaştırabilmek için 37°C deki etüvde 10-20 dakika bekletildi. Etanol tamamen uzaklaştıktan sonra üzerine 100 µl DNA rehidrasyon çözeltisi eklenip 65 °C’de 1 saat süreyle inkübe edildi.

İzole edilen DNA daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere 2-8 °C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.3. Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Tasarımı ve Sentezi

Çalışmanın hedefine ulaşması için gerekli olan sitokrom *b* (*cyt b*), 16S rRNA, genlerinin artırılması için gerekli olan ve daha önce Genbank veri tabanına girilmiş olan sazansı ailesine ait yakın taksonların ilgili gen dizileri BioEdit (Thompson vd., 1997) programı altında çalıştırılan ClustalW çoklu mukayese opsiyonu kullanılarak çakıştırıldı. Kullanılması düşünülen bu gen dizilerinin komşu veya uç kısımlarında belirlenen korunmuş bölgelere uygun primer çiftleri FastPCR (Kalendar vd., 2009) programı yardımıyla tasarlanarak ticari bir firmaya (Macrogen, Hollanda) sentez ettirilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Sitokrom *b*, 16S rRNA ve COI genlerinin artırılması ve dizin analizi için kullanılan primerler.

	Primer	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Tm (°C)	Kaynak
Cyt <i>b</i>	PHCytF	CAACTACAAGAACATGGCAAGCC	62.9	Bu çalışma
	PHCytR	CTTCGGATTACAAGACCGATGC	62.1	Bu çalışma
16SrRNA	PH16SF	CGTAACATGGTAAGTGTACCGG	62.1	Bu çalışma
	PH16SR	GCAATTWACCATGCTCTGCCACCCC	69.1	Bu çalışma
COI	FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	66.3	Ward et al., 2005
	FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	66.3	Ward et al., 2005

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulamaları

2.4.1. Hedef Mitokondri Gen Dizilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yardımı İle Artırılması

Örneklerden elde edilen total DNA'lardan *cyt b*, 16S rRNA ve COI genlerinin artırılması için polimeraz zincir reaksiyon karışımında olması gereken kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 4'de verilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonunu gerçekleştirmek için BIORAD T100TM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) model gradient özellikli ısı döngü cihazı kullanılmıştır.

Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklıkları (Tm) ve PZR için gerekli olan bileşenlerin miktarlarının ayarlanabilmesi için optimizasyon reaksiyonları gerçekleştirildi. Sitokrom *b* geninin artırılması için Tablo 3'teki PHCytbF ve PFCytbR primerlerinin erime sıcaklıkları (Tm) dikkate alınarak gradient (55-63°C) bir reaksiyon

oluşturuldu ve en uygun sıcaklığın 58°C olduğu belirlendi. Aynı şekilde 16S rRNA geni içinde Tablo 3'teki PH16SF ve PH16SR primerlerinin erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak 10 olasılıklı (63-70 °C) bir reaksiyon oluşturuldu ve en uygun tutunma sıcaklığının 59.0 °C olduğu belirlendi. Son olarak sitokrom c oksidaz geni için verilen Tablo 3'teki PHCOIF ve PHCOIR primerlerinin erime sıcaklıkları (T_m) dikkate alınarak 10 olasılıklı (63-70 °C) bir reaksiyon oluşturuldu ve en uygun erime sıcaklığının 61.0 °C olduğu belirlendi.

Herbir primer çifti için uygun bağlanma sıcaklıkları belirlendikten sonra Tablo 4'te verilen yoğunluklardaki kimyasallar ile Tablo 5'teki döngü koşulları kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR uygulamalarında oluşabilecek DNA kirliliğini tespit edebilmek amacıyla her reaksiyonda genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır.

Tablo 4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Konsantrasyon	Cyt <i>b</i>	16S rRNA	COI
5X PZR tamponu		10µl	10µl	10µl
dNTP karışımı	10 mM	5µl	6µl	4µl
MgCl ₂	25 mM	3µl	5µl	3.5µl
Primerler*	10 pmol	1µl +1µl	1µl +1µl	1µl +1µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	0,2µl	0.2µl	0.2µl
Total DNA	50 (ng/ml)	6µl	7µl	3µl
ddH ₂ O		23.8µl	19.8µl	27.3µl
Toplam		50µl	50µl	50µl

*İleri ve geri primerler

PCR ürünlerinin varlık ve büyüklük kontrolünü gerçekleştirmek için genomik DNA'nın kalitesinin belirlenmesinde yapılan işlemler % 1'lik agaroz jel hazırlanarak tekrarlandı. PCR ürünleri 100 bç'lik DNA Leader (Promega) ile koşturularak büyüklükleri belirlendi. Bu kontrol işlemleri tamamlandıktan sonra arzu edilen yoğunluk ve büyüklüğe sahip olduğu değerlendirilen PCR ürünleri DNA dizin analizi işleminde kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Tablo 5. PCR döngü koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	94	3	1
Ayrılma	94	1	
Yapışma	58.0 ^a /59.0 ^b /61.0 ^c	1	35
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	7	1
	4	∞	

Not: a. Sitokrom *b* primerleri için tutunma sıcaklığı (T_m)

b. 16S primerleri için erime sıcaklığı (T_m)

c. COI primerleri için erime sıcaklığı (T_m)

2.4.2. DNA ve PCR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Genomik DNA eldesi ve PCR ürünlerinin varlığı ve büyüklüğünün tespiti için örnekler 1X TAE ve agaroz karışımı kaynatılıp soğutulurken etidyum bromür ile boyanan % 0.8 ve 1.2'lik agaroz jele yüklendi, 1X TAE tamponunu içeren elektroforez küvetinde 90 voltta 20 dakika elektrik akımına maruz bırakıldı. Örneklerin yürütüldüğü agaroz jelin görüntülenmesi işlemi Quantum-Capt ST4 sistem (Vilber Lourmat, France)'deki ultraviyole transillüminatörde gerçekleştirildi. Total DNA ve PZR ürünlerinin yoğunluğu, saflığını ve kalitesi Nanodrop 2000C model spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak belirlendi.

2.5. DNA Dizin Analizi

Çift zincirli PCR ürünleri temizlendi ve DNA dizin analizleri çift yönlü olarak BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) kullanılarak ABI PRISM 3730x1 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) ile çift zincir için Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'de gerçekleştirildi.

2.6. Veri Analizi

2.6.1. Mitokondri DNA Varyasyonu ve Nükleotit Kompozisyonu

DNA Dizin analizi ile rapor edilen 67 mtDNA Cyt *b*, 16S rRNA ve COI gen dizileri filogenetik analizlerde kullanılacak hale getirebilmek için Bioedit v7.0 (Hall,

1999), programı yardımıyla hizalandı. Nükleotidlerin kompozisyonu, haplotip sayısı (H), haplotip frekanları, haplotip çeşitliliği (Hd) ve nükleotid çeşitliliği (π) gibi genetik çeşitlilik indeksleri DnaSP v5.10.1 (Rozas, 2009) programı yardımıyla belirlenmiştir.

Mitokondri 16S rRNA, sitokrom b, COI genleri ve kombine verisetleri için populasyon çiftleri arasındaki genetik mesafeler MEGA versiyon 7.0 (Kumar vd., 2016) programı kullanılarak belirlendi. Ek olarak, sitokrom b geni verisetine dayalı olarak tespit edilen haplogruplar arasındaki genetik mesafeler de hesaplandı.

2.6.2. Populasyon Yapı Analizi

2.6.2.1. Wright'ın F istatistiği

Wright (1951), tarafından geliştirilen ve tür içindeki popülasyonlar arası farklılaşma düzeyini belirlememizde bize yardımcı olan F_{ST} istatistiğinin hesaplanması Arlequin versiyon 3.5.2.2 yazılım paketinde (Excoffier and Lischer, 2010) gerçekleştirilmiştir. İkili fiksasyon indeksi (F_{ST}) 0-1 aralığında bir değer alır. Şayet F_{ST} değeri 0 ise iki populasyonlar arasında genetik farklılaşma yoktur ve populasyonlar arasında üretken birey geçişi olmaktadır. F_{ST} değeri 1 ise büyük bir genetik farklılaşmanın olduğu diğer bir deyişle her bir populasyonun tamamen farklı allellere sahip oldukları söylenebilir (Helfman vd., 2009). Herbir populasyon çifti arasındaki olası gen akışı, belirlenen F_{ST} değerleri kullanılarak Wright (1951)'in $Nm=[(1/F_{ST})-1]/4$ formülünün kullanımıyla hesaplanmaktadır.

2.6.2.2. Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)

Tüm populasyon çiftleri arasındaki genetik farklılaşma katsayısını tahmin etmek için ikili F_{ST} değerini hesaplanmıştır. İstatistiki önemi gösteren P değerini hesaplamak için 10000 permutasyon kullanılmıştır. Populasyon farklılaşmasının varlığının analizinde olası grupların belirlenmesinde coğrafik dağılım ve F_{ST} değerlerinden yararlanılmıştır. Verisetimiz üzerinden DnaSP programında oluşturulan tahmini gruplar (arp. formatında) kaydedildikten sonra Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010) programı altında çalıştırılan moleküler varyans analizi (AMOVA, Excoffier vd., 1992)

opsiyonu ile toplam moleküler varyansın ne kadarının gruplar arasında, grup içi popülasyonlar arasında ve popülasyon içindeki bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı hesaplanmıştır.

2.6.3. Tarihsel Demografik Hikaye

2.6.3.1. Uyumsuzluk Dağılım Analizi

Popülasyonların nüfus artışına maruz kalıp kalmadığı diğer bir deyişle dengede olup olmadığı DnaSP v5.10.1 (Rozas, 2009) programı altında elde edilen ikili grup farklılıkları ortalamalarını içerecek şekilde gerçekleştirilen uyumsuzluk dağılım analizleri (Slatkin and Hudson, 1991) yardımıyla belirlenmiştir.

2.6.3.2. Nötralite Testleri

Nötralite teoriden sapmanın sınanması diğer bir deyişle *P. strandjae*'nin demografik öyküsünü incelemek ve popülasyon genişleme sürecini tahmin etmek amacıyla Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı altında çalıştırılan hem Tajima'nın D (Tajima, 1989) hem de Fu'nun Fs (Fu, 1997) testleri 1000 tekrarlı simülasyon yoluyla gerçekleştirilmiştir.

2.6.4. Filogenetik İlişkiler

Phoxinus türleri ve haplotipler arasındaki ilişkiler, MEGA versiyon 7.0 (Kumar vd., 2016) programı altında çalıştırılan komşu katılım (NJ: Neighbour-Joining), maksimum tutumluluk (MP: Maximum Parsimony) ve maksimum olasılık (ML: Maximum Likelihood) analizleri yardımıyla tahmin edilmiştir. *Phoxinus phoxinus* (GenBank erişim numarası NC_020358), *Phoxinus steindachneri* (GenBank no: NC_015357) ve *Phoxinus semotilus* (GenBank no: NC_029341) filogenetik analizler için dış grup olarak kullanılmıştır. Maksimum olasılık analizi için en uygun baz değişim modeli, Posada (2008)'ya göre Akaike Bilgi Kriteri (AIC)'ini kullanarak jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008), programı kullanılarak belirlenmiştir. NJ ve MP analizleri, 10000 rasgtele ilave tekrarlar oluşturmak ve TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi

kullanmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Ağaç topolojisindeki dallar arasındaki destek değerleri 1000 tekrar Seç-bağla (Bootstrap) testi (Felsenstein, 1985) ile belirlenmiştir. Model seçiminden sonra jModelTest ile belirlenen en uygun baz değişim modeli dikkate alınarak maksimum olasılık analizi 10 rasgele ilave kopya, TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi ve 500 tekrarlı seç-bağla testi ile gerçekleştirilmiştir.

2.6.5. Haplotip Bağlantı Analizi

Haplotiplerin ağ çıkarımına dayanan intraspesifik ilişkiler, PopART v1 (Leigh ve Bryant, 2015) altında çalıştırılan medyan birleştirme (Median-joining-MJ) ağı (Bandelt vd., 1999) ile oluşturulmuştur.

3. BULGULAR

Mini inci balığı bireylerine ait mitokondri DNA sitokrom *b* (1141 bç), 16S rRNA geni kısmi dizisi nükleotid dizisi (1641 bç) ve sitokrom oksidaz alt ünite I geni (652 bç), ülkemiz iç sularımızda dağılım gösteren mini inci balığını temsilen toplam 5 farklı lokaliteden örneklenen 67 birey için DNA dizin analizine tabi tutuldu (Tablo 2). Çalışılan mini inci balığı örnekleri için sitokrom *b* geni için 45'i (% 3,9) parsimonik bilgi verici 65 değişken (% 5,6), 16S rRNA kısmi geni için 22'si parsimonik bilgi verici (% 1,3) ve 32 (% 1,9) değişken, COI için ise 6'sı parsimonik bilgi verici (% 0,9) ve 13 (% 2,0) değişken, nükleotid pozisyonu belirlendi (Tablo 6). Hendek 1 nolu bireye ait her 3 mitokondri bölgesi nükleotid dizileri referanslığında mitokondri DNA sitokrom *b* geni için 6 adet, 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizilerinin analizi sonucunda toplamda 8 adet, kısmi COI geni için 11 adet, kombine veri seti (16SrRNA+COI+Cytb) için 13 adet haplotip (Tablo 7) belirlenmiştir. Haplotip dağılım ve frekans analizleri, haplotiplerin 1'den fazla populasyon tarafından paylaşılmadığı ve mini inci balığı bireylerinin populasyon içinde baskın haplotipler altında kümelendikleri tespit edilmiştir (Tablo 7).

Mini inci balığı populasyonları arasındaki ikili dizi farklılığı değerleri 16S rRNA için %1.29 (Hendek-Poyralı) - %0.06 (Poyralı-Soğurcak) (Tablo 8), COI için %1.39 (Hendek-Poyralı) - %0.3 (Poyralı-Soğurcak/Hendek-Kalkım) (Tablo 9) sitokrom *b* için %3.29 (Hendek-Poyralı) - %0.07 (Hendek-Kalkım) (Tablo 10) ve kombine veri seti için %1.83 (Hendek-Poyralı) - %0.33 (Poyralı-Soğurcak) (Tablo 11) aralığındadır.

Sitokrom *b* geni verisetlerine dayalı olarak belirlenen soy grupları arasında %2.06-3.44'lük bir genetik varyasyon belirlenmiştir (Tablo 12). Dowling vd. (2002)'nin fosil verilerine ve *cyt b* dizi karşılaştırmalarına dayalı tahmin ettiği ve sonraki sızansı filogenisi çalışmalarında (Doadrio ve Carmona, 2004; Durand vd., 2003) kabul gören milyon yıl başına % 1.05'lik bir ayrılma oranını kullanılmıştır. Bu ölçümleme ve haplogruplar arasındaki genetik mesafeler esas alındığında *P. strandjae* populasyonları arasındaki ayrılma zamanlarının 2.16 ile 3.5 milyon yıl önce (Tablo 12) aralığında olduğu tahmin edilmiştir. Dolayısıyla bu zaman aralığındaki genetik farklılaşmaya neden olabilecek olaylar incelenmiştir.

Tablo 7. Türkiye iç sularındaki mini inci balığı populasyonlarına ait örneklerin 16S rRNA, COI, Cyt b ve kombine veriseti haplotiplerinin populasyonlara dağılımı ve frekansları.

16S rRNA							COI						Cyt b						Kombine Veriseti						
	HDK	KLK	ABT	RZV	SGK	PYL	HDK	KLK	ABT	RZV	SGK	PYL	HDK	KLK	ABT	RZV	SGK	PYL	HDK	KLK	ABT	RZV	SGK	PYL	
H1	15						H1	15					H1	10					H1	10					
H2		12					H2		12				H2	4					H2	4					
H3			1				H3			10			H3	1					H3	1					
H4			8				H4			10			H4		12				H4		12				
H5			1				H5				8		H5		10				H5			1			
H6				10			H6					12	H6			1			H6			8			
H7					8		H7						H7			9			H7			1			
H8						12	H8						H8				8		H8				1		
													H9					7	H9			9			
													H10					4	H10				8		
													H11					1	H11						7
													H12						H12						4
													H13						H13						1
	15	12	10	10	8	12	15	12	10	10	8	12	15	12	10	10	8	12	15	12	10	10	8	12	

Tablo 8. 16S rRNA genine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar.

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK	0,00000					
2 KLK	0,00367	0,00000				
3 ABT	0,01107	0,00859	0,00024			
4 RZV	0,00860	0,00736	0,00859	0,00000		
5 SGK	0,01223	0,0984	0,00909	0,00985	0,00000	
6 PYL	<u>0,01296</u>	0,01046	0,00971	0,01047	<u>0,00061</u>	0,00000

Tablo 9. COI genine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar.

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK	0,00000					
2 KLK	<u>0,00307</u>	0,00000				
3 ABT	0,00617	0,00617	0,00000			
4 RZV	0,00617	0,00616	0,00617	0,00000		
5 SGK	0,01084	0,01083	0,00772	0,01083	0,00000	
6 PYL	<u>0,01396</u>	0,01395	0,01083	0,01395	<u>0,00307</u>	0,00000

Tablo 10. Sitokrom b genine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar.

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK	0,00048					
2 KLK	<u>0,00724</u>	0,00000				
3 ABT	0,02815	0,02969	0,00000			
4 RZV	0,01913	0,02248	0,03442	0,00018		
5 SGK	0,02449	0,02602	0,02506	0,02246	0,00000	
6 PYL	0,02864	0,03127	<u>0,03292</u>	0,02844	0,00751	0,00061

Tablo 11. Birleştirilmiş verisetine dayalı populasyonlar arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar.

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK	0,00016					
2 KLK	0,00474	0,00000				
3 ABT	0,01578	0,01508	0,00007			
4 RZV	0,01161	0,01210	0,01661	0,00006		
5 SGK	0,01606	0,01535	0,01411	0,01419	0,00000	
6 PYL	<u>0,01831</u>	0,01795	0,01755	0,01704	<u>0,00336</u>	0,00020

Tablo 12. Sitokrom b geni verisetine dayalı soy grupları arasındaki (alt diyagonal) ve içindeki (diyagonal) genetik farklılıklar. haplogruplar arası ayrılma zamanları (myö) (üst diyagonal).

	Grup1	Grup2	Grup3	Grup4
Grup1	0,00386±0,00128	3,02	2,16	2,93
Grup 2	0,02884±0,00480	0,00000±0,00000	3,61	3,12
Grup 3	0,02062±0,00396	0,03442±0,00527	0,00018±0,00017	2,73
Grup 4	0,02795±0,00482	0,02978±0,00487	0,02605±0,00448	0,00400±0,00137

Not: Grup1: Hendek-Kalkım, Grup2: Abant, Grup3: Rezve, Grup4: Soğucak-Poyralı

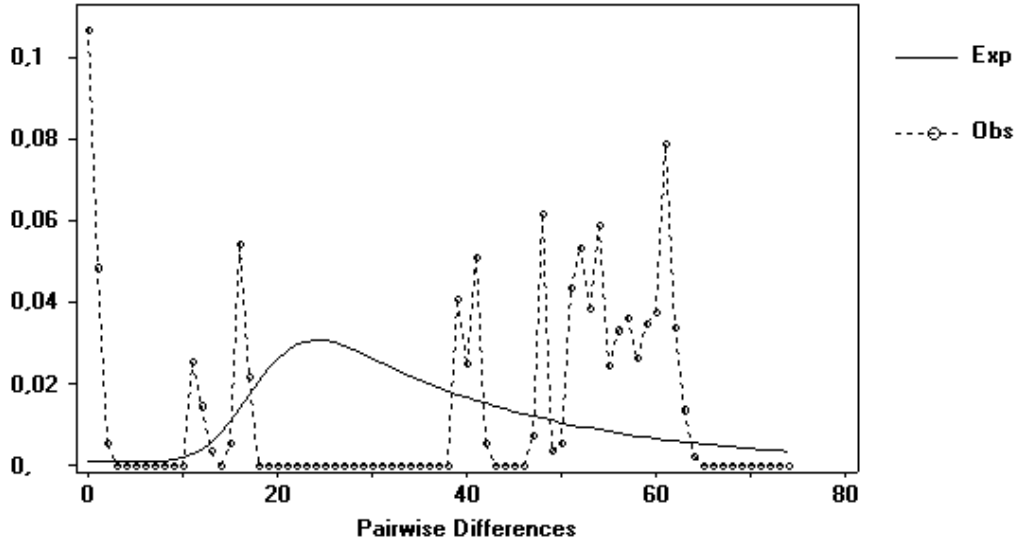
Mini inci balığı populasyonları için 16S rRNA geni [Hd= 0.0000-0.3778 (ortalama 0.8471) ve $\pi=0.0000-0.0000$ (ortalama 0.0074)], sitokrom oksidaz alt ünite I [Hd=0.0000-0.0000 (ortalama 0.8394) ve $\pi=0.0000-0.0000$ (ortalama 0.0072)], sitokrom b geni [Hd= 0.0000-0.5909 (ortalama 0.8932) ve $\pi=0.0000-0.0107$ (ortalama 0.0115)] ve kombine veri seti (Hd=0.0000-0.5909 (ortalama 0.8932) ve $\pi=0.0000-0.0063$ (ortalama 0.0115)] nükleotit dizilerine dayalı olarak yüksek haplotip çeşitlilik ve nükleotit çeşitlilik değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 13).

Anadolu mini inci balığı populasyonları için olası demografik değişimlerinin (tikanıklıklar veya genişlemeler) izlerini ve nötr bir evrim modeli için beklenen polimorfizm modelinden sapmaları tespit etmek için kullanılan Fu'nun Fs ve Tajima'nın nötralite testlerinin sonuçları Tablo 13'de sunulmuştur. Türkiye'deki mini inci balığı populasyonlarından bireyler için mitokondri 16S rRNA, sitokrom c oksidaz I, sitokrom b genleri ve kombine veriseti üzerinden gerçekleştirilen Fu'nun Fs ve Tajima D tarafsızlık testi sonuçları Tajima D: -0.2334 ve 0.0153, Fu'nun Fs: -1.1639 ve -0.0130 değerleri aralığında olduğu belirlenmiştir (Tablo 13).

Phoxinus. strandjae populasyonları için yaptığımız uyumsuzluk dağılımı analizi sonucu, Ray vd. (2003), tarafından önerildiği üzere nüfus artışı ve sonrasında darboğaza maruz kalan populasyon farklılaşmasına atfedilen multimodal karakter benzeri bir yapı belirlenmiştir (Şekil 3).

Tablo 13. Örnekleme lokaliteleri, havzaları, örnek ve haplotip sayıları, genetik çeşitlilik indeksleri, Tajima D ve Fu'nun Fs tarafsızlık testleri.

16S rRNA						
	N	N_H	Hd	π	Tajima D	Fu's Fs
HDK	15	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
KLK	12	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ABT	10	3	0,3778	0,0125	-1,4008	-1.1639
RZV	10	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
SGK	8	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PYL	12	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	67	8	0,8471	0,0074	-0,2334	-0,1939
Sitokrom b						
	N	N_H	Hd	π	Tajima D	Fu's Fs
HDK	15	3	0,5143	0,0084	-0,2682	-0,2475
KLK	12	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ABT	10	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
RZV	10	2	0,2000	0,0030	-1,1117	-0,3393
SGK	8	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PYL	12	3	0,5909	0,0107	0,1530	-0,0130
	67	11	0,8932	0,0115	-0,2044	-0,0999
COI						
	N	N_H	Hd	π	Tajima D	Fu's Fs
HDK	15	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
KLK	12	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ABT	10	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
RZV	10	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
SGK	8	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PYL	12	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	67	6	0,8394	0,0072	0,0000	0,0000
Kombine						
	N	N_H	Hd	π	Tajima D	Fu's Fs
HDK	15	3	0,5143	0,0050	-0,2682	-0,2475
KLK	12	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ABT	10	3	0,3778	0,0036	-1,4008	-1,1639
RZV	10	2	0,2000	0,0018	-1,1117	-0,3393
SGK	8	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PYL	12	3	0,5909	0,0063	0,1530	-0,0130
	67	13	0,8932	0,0115	-0,4379	-0,2939



Şekil 3. *P. strandjae* örnekleri için uyumsuzluk dağılımı. Diziler arasındaki nükleotit farklarının sayısı yatay eksen boyunca gösterilirken frekansları dikey eksen boyunca gösterilmiştir. Kesintisiz çizgi, logaritmik nüfus artışı modeli altında ikili farklılıkların dağılımını temsil etmektedir. Noktalı çizgiler ise haplotipler arasındaki nükleotid farklılıkların gerçek dağılımını temsil eder.

Farklı mitokondri nükleotit dizilerine dayalı olarak populasyon çiftleri arasındaki F_{ST} değerleri Arlequin sürüm 3.5 programının (Excoffier ve Lischner, 2010) kullanımıyla hesaplanmıştır. Populasyon çiftlerine ait F_{ST} değerleri 16S rRNA geni haplotipleri için 0.79183-1.00000 (Tablo 14), COI haplotipleri için 1.00000 (Tablo 15), sitokrom *b* geni haplotipleri için 0.44984-1.00000 (Tablo 16) ve kombine veri seti için 0.44984-1.00000 (Tablo 17) arasında değişim göstermiştir. Gen akışının hesaplanmasında mitokondri F_{ST} değerlerini kullanarak Wright'ın $Nm=[(1/F_{ST})-1]/4$ formülü yardımıyla mini inci balığı populasyon çiftleri arasındaki gen akışı miktarının oldukça düşük olduğu (0.000-0.305 aralığında) belirlenmiştir (Tablo 14-17).

Tablo 14. 16S rRNA geni itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal).

Lokaliteler		1	2	3	4	5	6
1	HDK		0,000	0,000	0,000	0,000	0,045
2	KLK	1,0000		0,000	0,000	0,000	0,052
3	RZV	1,0000	1,0000		0,003	0,002	0,058
4	SGK	1,0000	1,0000	0,9848		0,000	0,052
5	PYL	1,0000	1,0000	0,9886	1,0000		0,065
6	ABT	0,8468	0,8273	0,8111	0,8273	0,7913	

$P > 0.05$

Tablo 15. COI geni itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal).

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2 KLK	1,0000		0,000	0,000	0,000	0,000
3 ABT	1,0000	1,0000		0,000	0,000	0,000
4 RZV	1,0000	1,0000	1,0000		0,000	0,000
5 SGK	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,000
6 PYL	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

P>0.05

Tablo 16. Sitokrom b geni itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal).

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK		0,097	0,153	0,305	0,117	0,106
2 KLK	0,7194		0,024	0,104	0,000	0,000
3 RZV	0,6196	0,9092		0,172	0,031	0,027
4 PYL	0,4498	0,7045	0,5915		0,130	0,116
5 SGK	0,6795	1,0000	0,8886	0,6569		0,000
6 ABT	0,7010	1,0000	0,9000	0,6827	1,0000	

P>0.05

Tablo 17. Birleştirilmiş veriseti itibarıyla populasyonlar arası fiksasyon indeksi (alt diyagonal) ve gen akışı miktarı (üst diyagonal).

Lokaliteler	1	2	3	4	5	6
1 HDK		0,097	0,153	0,305	0,117	0,208
2 KLK	0,7194		0,024	0,104	0,000	0,052
3 RZV	0,6196	0,9092		0,172	0,031	0,101
4 PYL	0,4498	0,7045	0,5915		0,130	0,240
5 SGK	0,6795	1,0000	0,8886	0,6569		0,006
6 ABT	0,5448	0,8273	0,7111	0,5093	0,7913	

P>0.05

Mini inci balığı populasyonlarının moleküler varyans analizi (AMOVA) sonucu tespit edilen toplam moleküler varyansın % 67.98 ile 75.90'lık kısmının Grup 1: Hendek ve Kalkım; Grup 2: Rezve; Grup 3: Poyralı ve Sogucak; ve Grup 4: Abant grupları arasında, %23.74 ile 32.02 kadarının grup içi populasyonlar arasında ve %0.00 ile 0.93 kadarının populasyon içindeki bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı belirlenmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. Mitokondri 16S rRNA, COI, Cyt b geni ve kombine dizilerine dayalı olarak mini inci populasyonların amova analizi.

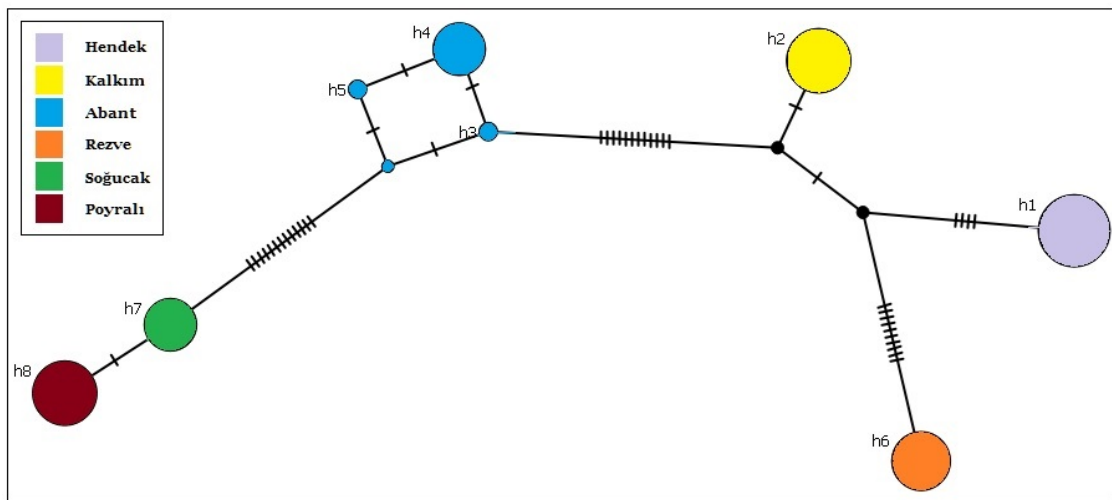
Varyasyonun kaynağı	S.S.	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyasyonun yüzde oranı
16S rRNA				
Gruplar arasında	3	357,549	6,23599 Va	75,90
Grup içi populasyonlar arasında	2	44,800	1,95091 Vb	23,74
Populasyonlar içinde	61	1,800	0,02951 Vc	0,36
Toplam	66	404,149	8,21641	
$F_{SC}: 0,98510, F_{ST}: 0,99641, F_{CT}: 0,75897$				
COI				
Gruplar arasında	3	132,589	2,12278 Va	67,98
Grup içi populasyonlar arasında	2	22,933	1,00000 Vb	32,02
Populasyonlar içinde	61	0,000	0,00000 Vc	0,00
Toplam	66	155,522	3,12278	
$F_{SC}: 1,00000, F_{ST}: 1,00000, F_{CT}: 0,67977$				
Cyt b				
Gruplar arasında	3	650,051	11,01401 Va	72,63
Grup içi populasyonlar arasında	2	92,215	4,00870 Vb	26,44
Populasyonlar içinde	61	8,600	0,14098 Vc	0,93
Toplam	66	750,866	15,16370	
$F_{SC}: 0,96603, F_{ST}: 0,99070, F_{CT}: 0,72634$				
Birleştirilmiş veriseti				
Gruplar arasında	3	1140,189	19,37278 Va	73,10
Grup içi populasyonlar arasında	2	159,948	6,95961 Vb	26,26
Populasyonlar içinde	61	10,400	0,17049 Vc	0,64
Toplam	66	1310,537	26,50289	
$F_{SC}: 0,97609, F_{ST}: 0,99357, F_{CT}: 0,73097$				

16S rRNA geni haplotip bağlantı analizi *P. strandjae* türüne ait populasyonlardan elde edilen haplotiplerin en az 1 mutasyonal adım (Soğucak ve Poyralı) ile birbirlerinden ayrıldıklarını göstermiştir. Hendek örnekleri sadece 1 haplotip ile temsil edilmekte olup 5 mutasyonal adım ile en yakın Kalkım haplotipinden ayrılmaktadır. Rezve örnekleri kendine en yakın populasyon olan Kalkım örneklerinden en az 12 mutasyon fark göstermektedir. Kapalı bir havza olan Abant gölünden edilen haplotipler en az 12 mutasyonal adım ile Kalkım, Soğucak ve Poyralı haplotiplerinden ayrılmaktadır (Şekil 4).

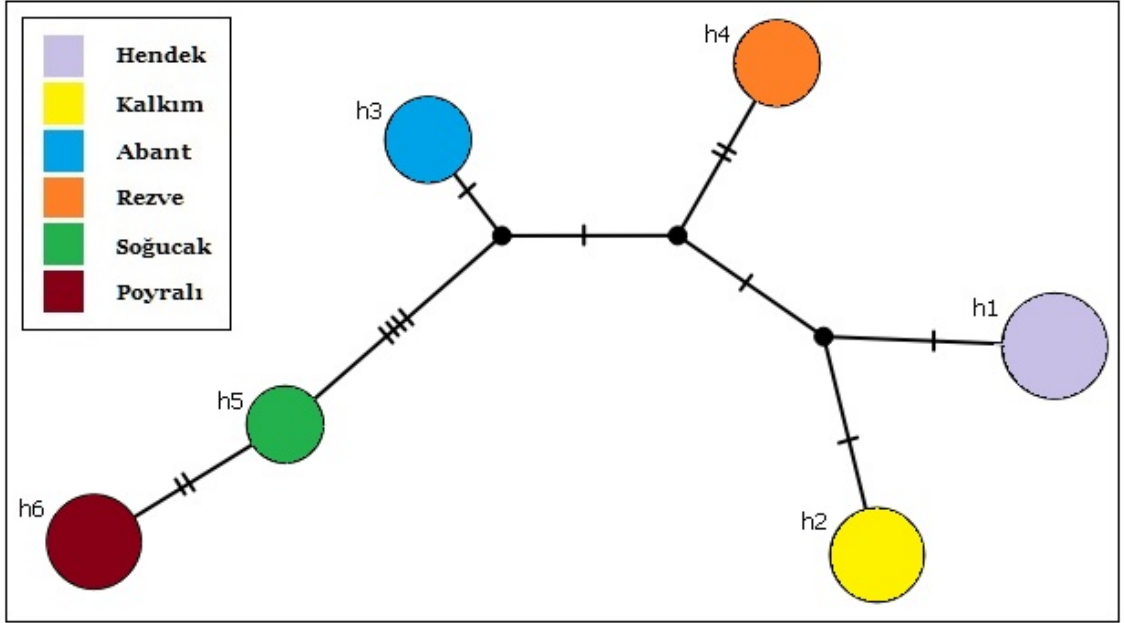
COI geni haplotip bağlantı analizi *P. strandjae* haplotiplerinin en az 2 mutasyonal adım ile birbirlerinden ayrıldıklarını göstermiştir. Hendek örnekleri sadece 1 haplotip ile temsil edilmekte olup 2 mutasyonal adım ile en yakın Kalkım haplotipinden ayrılmaktadır. Rezve örnekleri kendine en yakın populasyonlar olan Kalkım, Abant, Hendek örneklerinden 4 mutasyon fark göstermektedir. Kapalı bir havza olan Abant gölünden edilen h3, birbirlerinden 2 mutasyonla ayrılan Soğucak ve Poyralı haplotiplerinden 3 mutasyonal adım ile ayrılmaktadır (Şekil 5).

P. strandjae sitokrom b geni haplotip bağlantı analizi haplotiplerin en az 7 mutasyonal adım (Soğucak-Poyralı ve Hendek-kalkım populasyonları) ile birbirlerinden ayrıldıklarını göstermiştir. Haplotip ağı en az 21 mutasyonal adımla ayrılan 4 belirgin haplogrubun (Hendek-Kalkım/Abant/Rezve/Soğucak-Poyralı) gözlemlendiği bir topoloji ve ilişki örüntüsü sergilemektedir (Şekil 6).

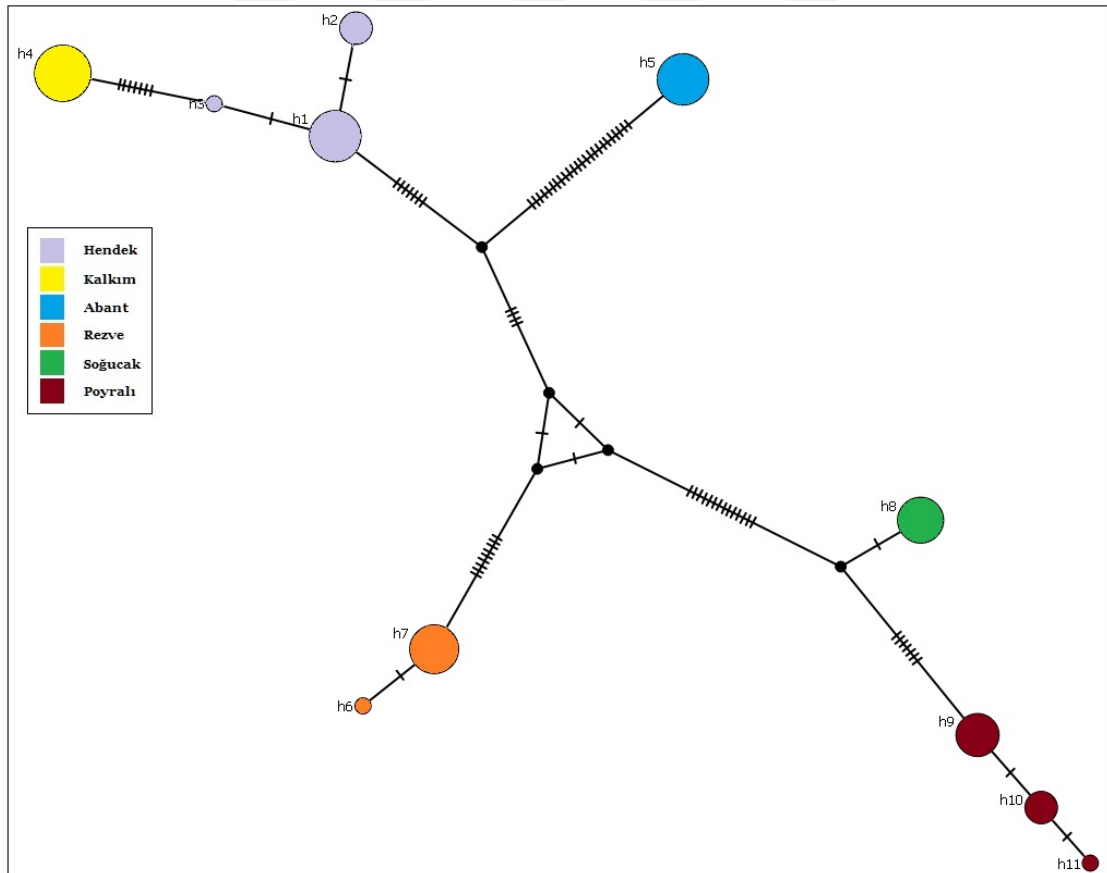
Birleştirilmiş verisetine dayalı haplotip ağı analizi de sitokrom b genine dayalı analizine benzer haplotipik ilişkiler ortaya koymuştur. Şöyle ki Abant, Hendek-Kalkım, Rezve ve Soğucak-Poyralı populasyonlarından elde edilen haplotiplerin oluşturduğu ve en az 39 mutasyonal adımla ayrılan 4 haplogrup belirlenmiştir. Populasyonların çoğu baskın haplotiplerle temsil edilmekte olup populasyon başına en fazla 3'er haplotip belirlenmiştir (Şekil 7).



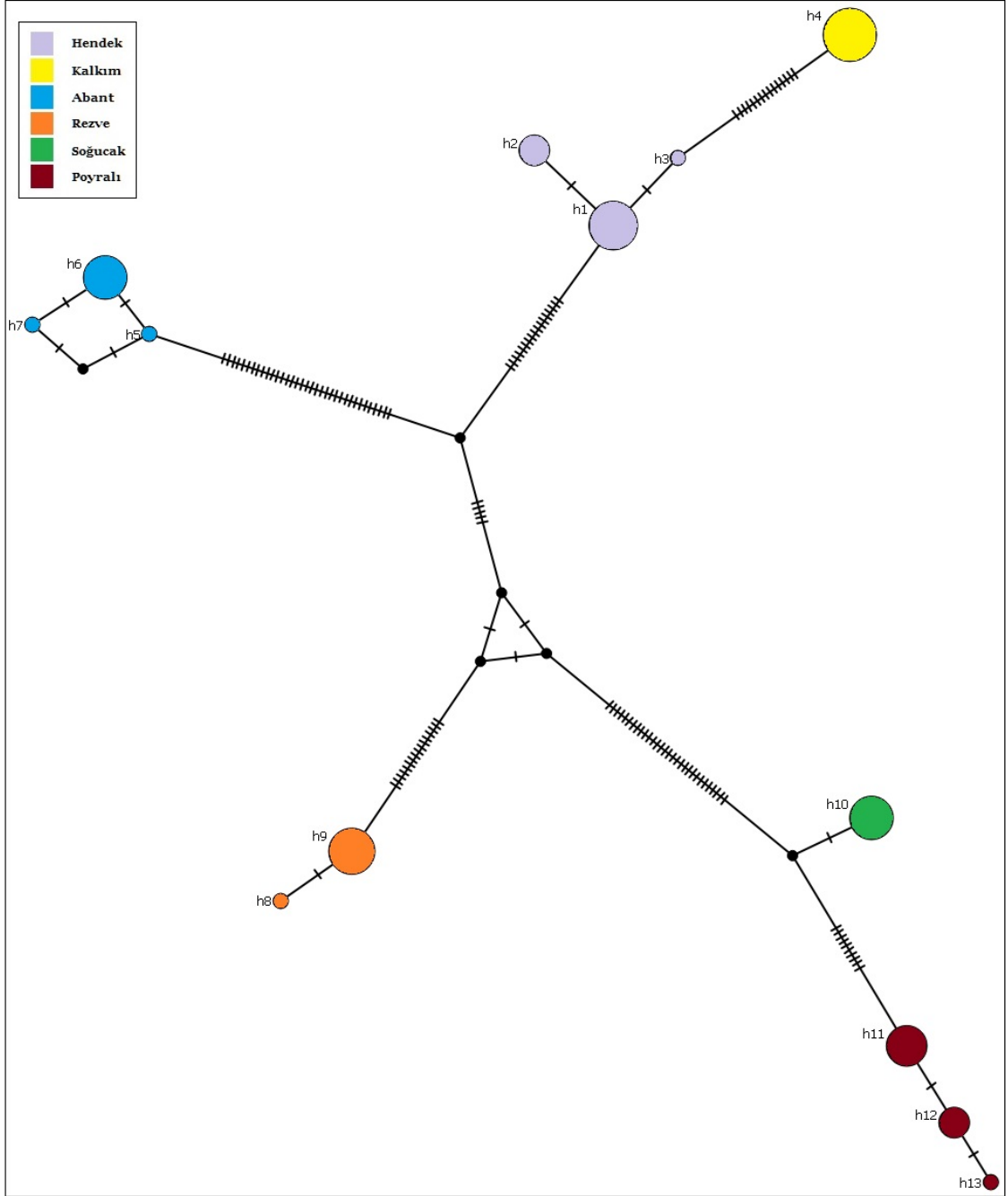
Şekil 4. 16S rRNA genine dayalı olarak Türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları.



Şekil 5. Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I genine dayalı olarak türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları.

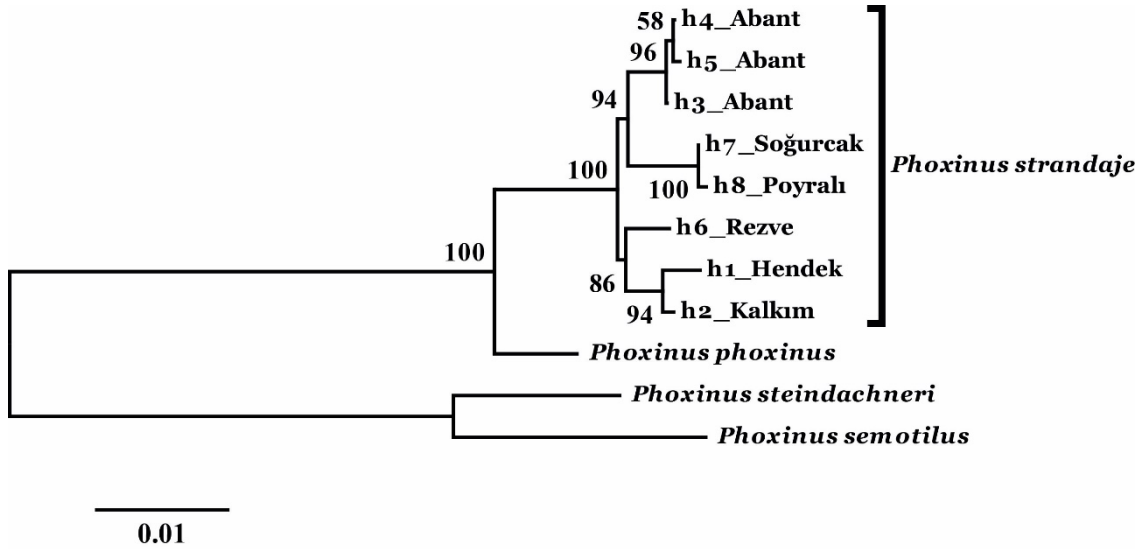


Şekil 6. Sitokrom b genine dayalı olarak türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları.

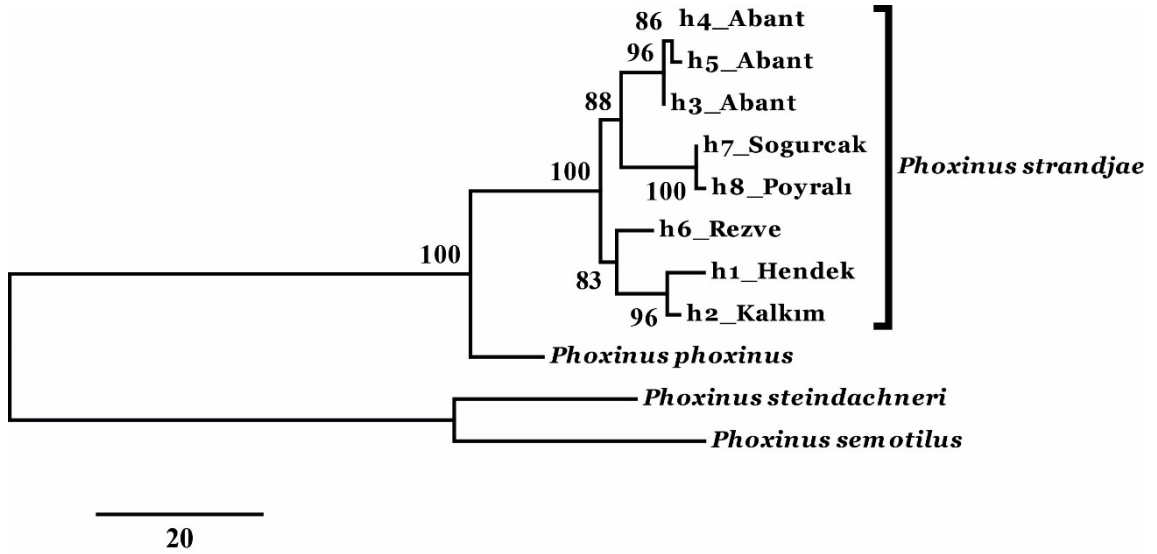


Şekil 7. Birleştirilmiş verisetine dayalı olarak Türkiye tatlı sularında dağılım gösteren mini inci balığı populasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren köksüz haplotip ağları.

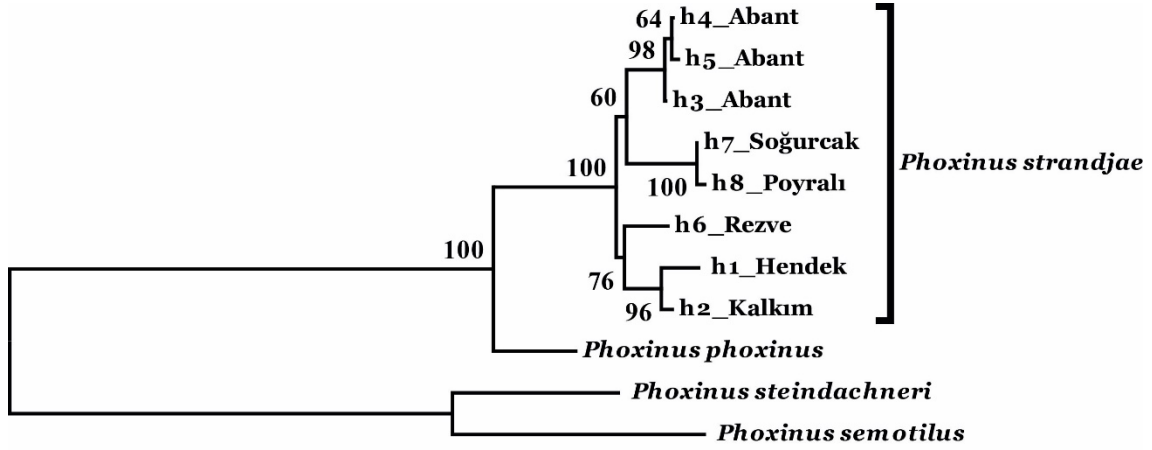
Batı Karadeniz, Güney Marmara ve Trakya bölgelerindeki akarsularda dağılım gösteren *P. strandaje* popülasyonları arasındaki genetik ilişkiler 16S rRNA, COI, sitokrom *b* ve kombine verisetine dayalı haplotiplerinin komşu katılım (NJ), maksimum tutumluluk (MP) ve maksimum olasılık (ML) metotları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analizlerin her birinden elde edilen filogenetik ağaç topolojileri hemen hemen birbirinin aynı olup *P. strandaje* türü içinde kalan yüksek güvenilirlik değerlerine (60-100) sahip 4 haplogrubun varlığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 8-19).



Şekil 8. *Phoxinus* 16S rRNA geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.

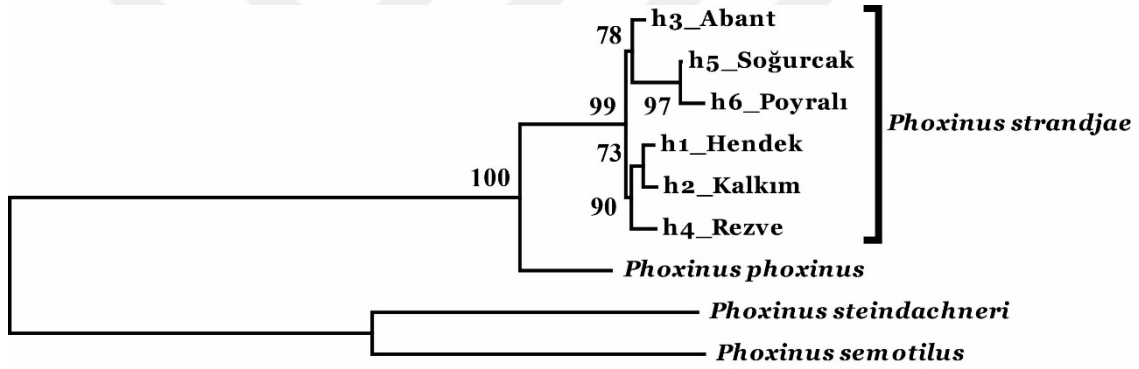


Şekil 9. *Phoxinus* 16S rRNA geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



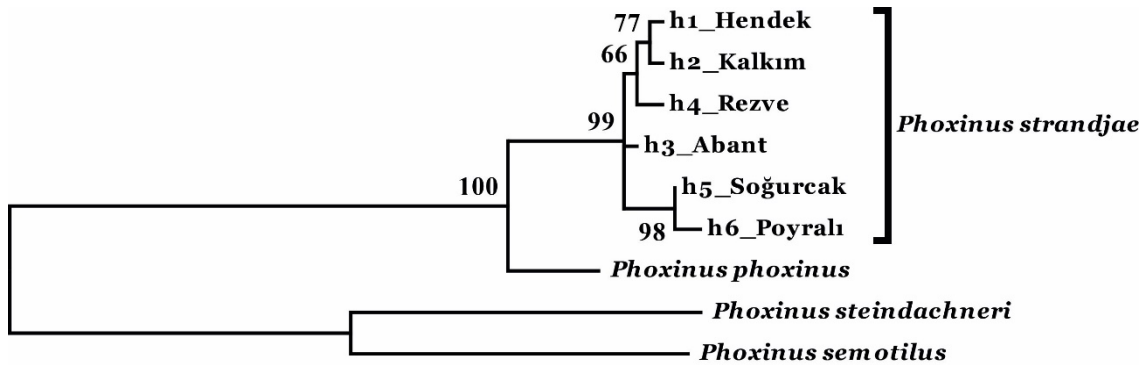
0.01

Şekil 10. *Phoxinus* 16S rDNA geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



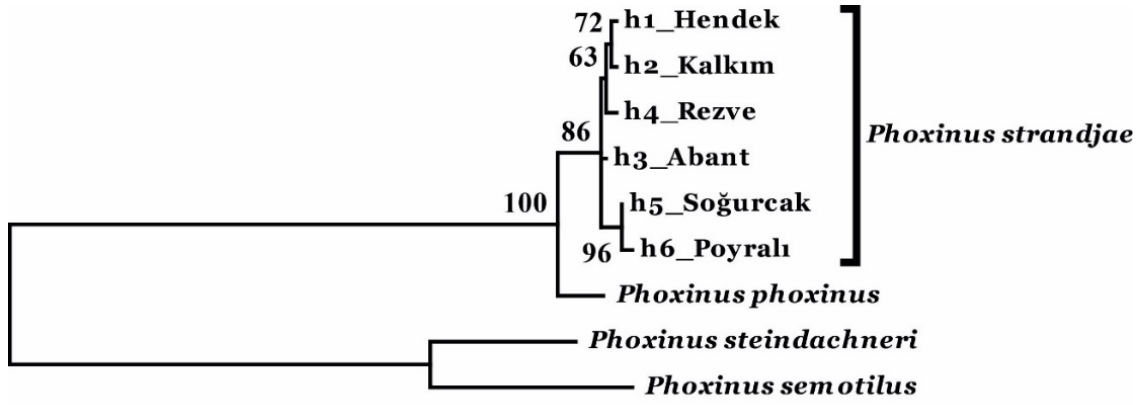
0.01

Şekil 11. *Phoxinus* COI geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.

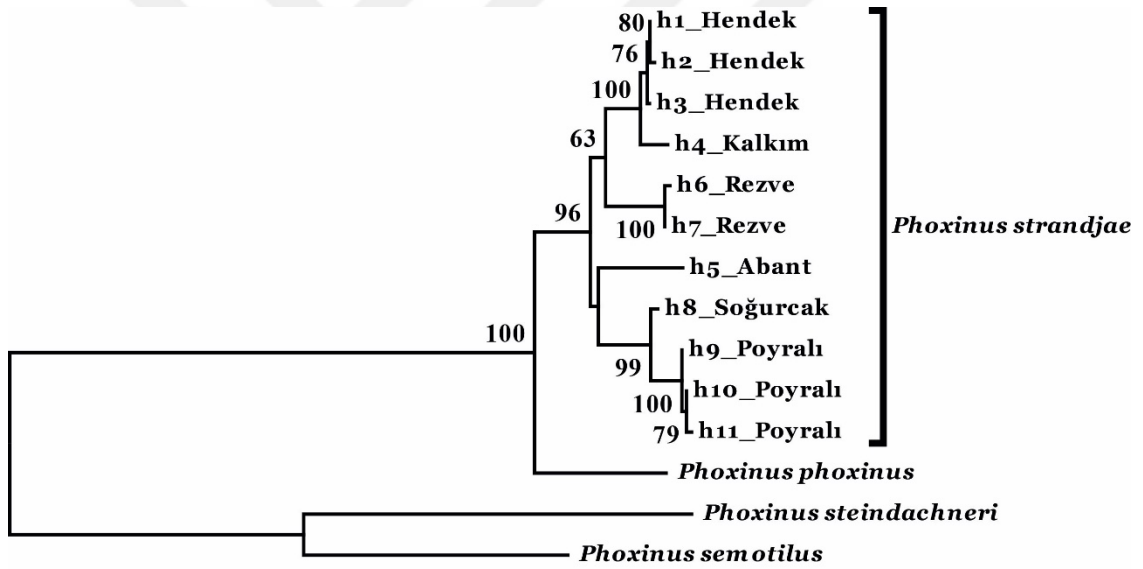


10

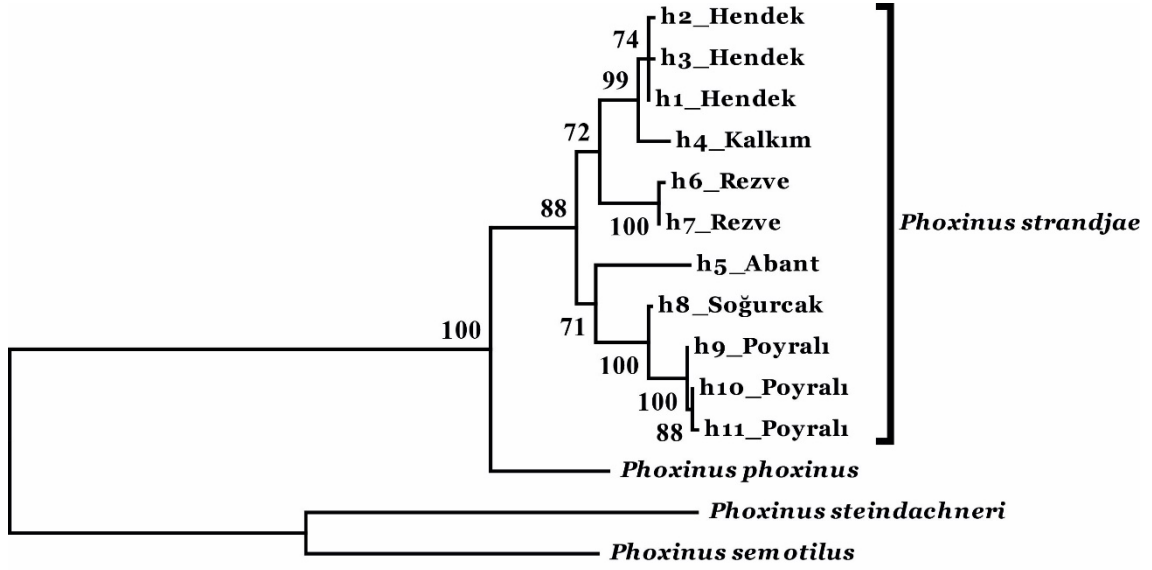
Şekil 12. *Phoxinus* COI geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



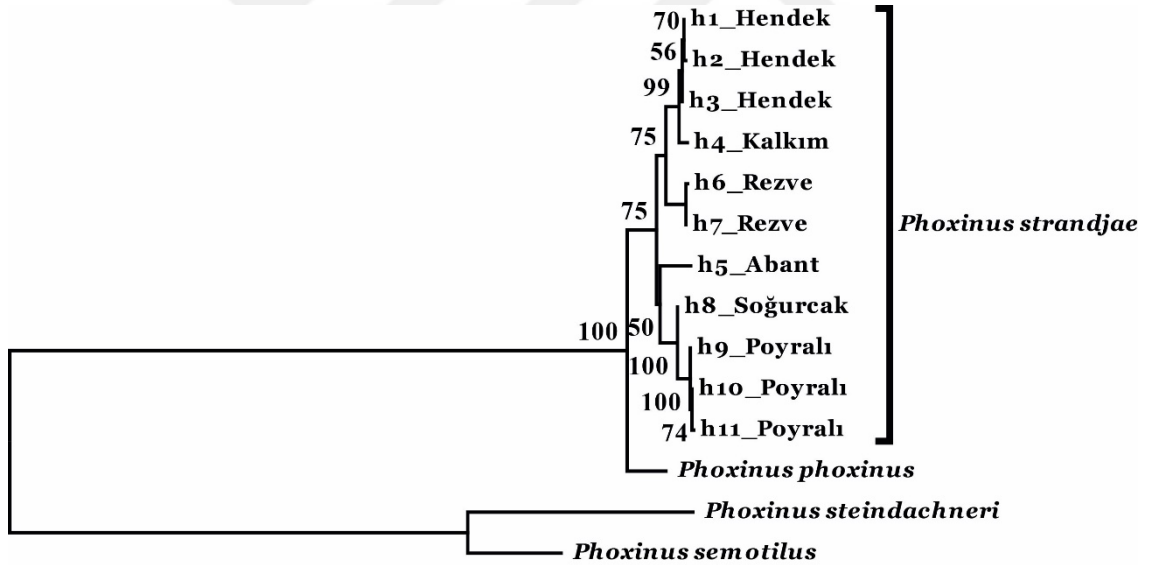
Şekil 13. *Phoxinus* COI geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



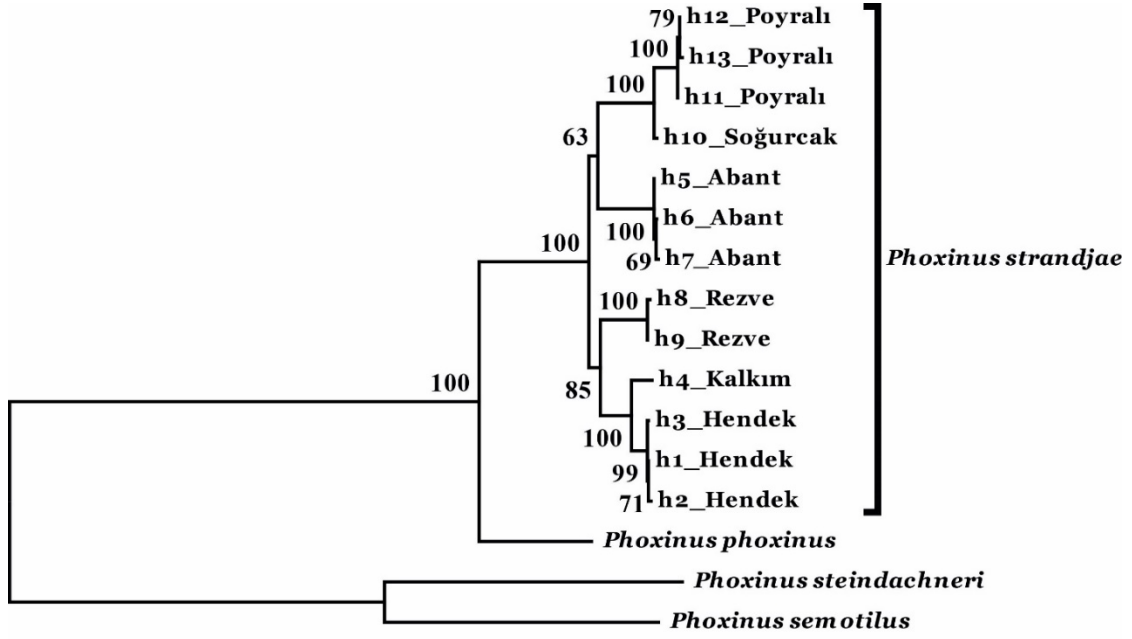
Şekil 14. *Phoxinus* Cyt b geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



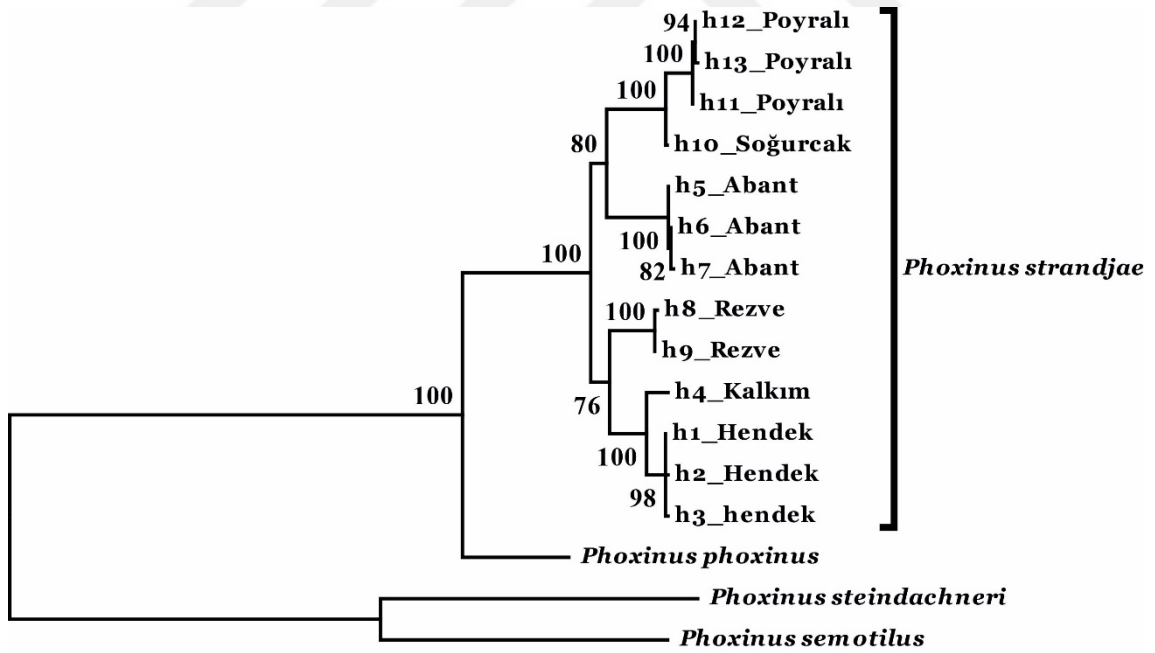
20
Şekil 15. *Phoxinus* Cyt b geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



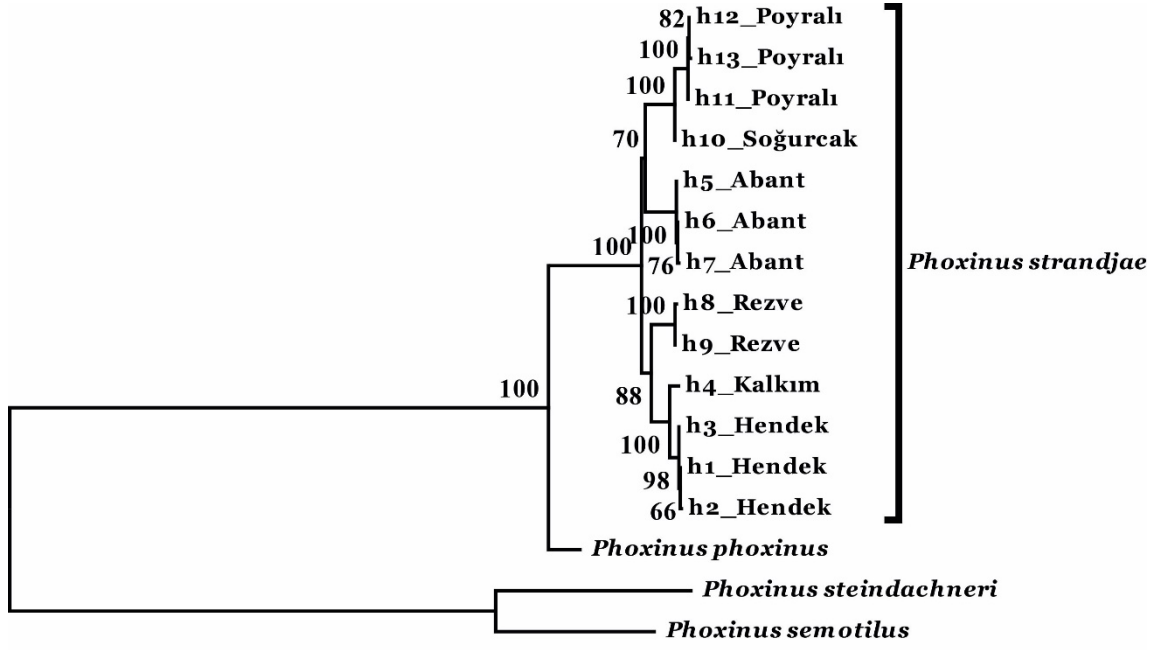
0,05
Şekil 16. *Phoxinus* Cyt b geni haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



Şekil 17. *Phoxinus* birleştirilmiş veriseti haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren NJ yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



Şekil 18. *Phoxinus* birleştirilmiş veriseti haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren MP yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.



Şekil 19. *Phoxinus* birleştirilmiş veriseti haplotipleri arasındaki ilişkiyi gösteren ML yöntemine dayalı oluşturulan filogenetik ağaç.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

4.1. Coğrafi Dağılım ve Genetik Çeşitlilik

Phoxinus phoxinus'un bir tür kompleksi olduğunu gösteren son yıllardaki morfolojik (Kottelat, 2007; Kottelat ve Freyhof, 2007) ve moleküler çalışmalar (Geiger vd., 2014; Knebelsberger vd., 2015; Palandacic vd., 2015) öncesinde ilk kez 1926 yılında Drensky tarafından tanımlanan *P. strandjae*'nin tip lokalitesi Bulgaristan'daki Istranca dağı havzası olup tür daha sonra Kottelat (2007), tarafından Türkiye'de ilk olarak Yıldız dağlarından Karadeniz'e dökülen Rezve drenajından rapor edilmiştir. Bu tarihten sonra Trakya ve Anadolu'daki doğal göllerde ve nehirlerde dağılım gösteren mini inci balığının dağılımı, stok ve tehdit durumu konusunda yapılan tek çalışmada Saç ve Özuluğ (2012), tarafından *P. strandjae* populasyonları Trakya ve Anadolu'daki çok sayıda drenajda tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bugüne kadar *P. strandjae*'un genetik çeşitliliği ve genetik yapısı hakkında hiçbir bilgi mevcut değildir. Oysaki, genetik çeşitlilik ile ilgili veriler sadece populasyonun genetik yapısını ve evrimsel tarihini anlamamıza yardımcı olmaz aynı zamanda biyoçeşitlilik ve türlerin evrimi için temel sağlar (Gu vd., 2015). Bu nedenle bütün bu çalışmalara ek olarak *Phoxinus* populasyonlarının genetik teşhisi ve populasyon genetik yapısı ilk kez bu çalışmada yeterli sayıda lokalite ve örnek sayısı ile detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

Türkiye iç sularında sadece kuzey-batı Anadolu havzası ile sınırlı bir bölgede dağılım gösteren mini inci balığı populasyonlarından belirlediğimiz mitokondri 16S rRNA, COI ve Cyt b haplotiplerinin populasyonlara dağılımlarına ve frekanslarına bakıldığında haplotiplerin 1'den fazla populasyon tarafından paylaşılmamış olması diğer bir deyişle populasyona özgü oluşu ve populasyon içinde çok az sayıda (1-4) baskın haplotipler tarafından temsil ediliyor olmaları (Tablo 7) Türkiye'deki mini inci balığı örnekleri arasındaki haplotip dağılımında genel olarak oldukça yüksek bir heterojenite olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanısıra *P. strandjae* populasyonları için belirlenen düşük haplotip ve nükleotit çeşitlilik değerleri de (Tablo 13) Grant ve Bowen (1998), tarafından balık türleri için ileri sürüldüğü üzere çok az sayıda bireyin yeni bir populasyon oluşturması şeklinde tanımlayabileceğimiz kurucu etkisini işaret etmektedir.

P. strandjae, bu çalışmada Marmara ve Batı Karadeniz'deki nehirlerden toplanan 67 bireyin örneklendiği populasyonlar arasındaki genetik mesafelerin mitokondri sitokrom b geni için gösterdiği genetik yapıdaki 4 haplogrup (Hendek-Kalkım, Abant, Rezve ve Soğurcak-Poyralı) arasındaki genetik mesafeler (%2,06-3,44) Batı Balkan yarımadasındaki *Phoxinus* kladları arasında belirlenen %4-11'lik genetik mesafe (Palandacic vd., 2015) ile mukayesesi Türkiye'deki popülasyonların önemli düzeyde farklılaşmadığı işaret etmektedir. Dolayısıyla bu moleküler analiz, Anadolu'nun batısındaki *Phoxinus* cinsinin tek bir tür tarafından temsil edildiğini gösteren morfolojik araştırmaların (Saç ve Özuluğ, 2012) sonuçlarını doğrular niteliktedir. Ancak, Gilles vd. (2010), Schönhuth vd. (2012) ve Tsoumani vd. (2014) gibi araştırmacılar tür veya evrimsel önemli birimleri sınırlandırmaya çalışırken % 2 ile % 11 aralığında sitokrom b geni dizin farklılıkları belirtmektedir. Benzer olarak, sazansı türlerinin mtCOI 'ye dayalı barkod aralığının tespitini amaçlayan Behrens-Chapuis vd. (2015), tarafından gerçekleştirilen çalışmada *P. strandjae* türü için maksimum tür içi mesafe (%) minimum türlerarası mesafeden (%) çıkarılarak belirlendiği barkod aralığı (%0.13-1.36) ile karşılaştırıldığında *P. strandjae* alt populasyonlarından Poyralı ve Kalkım-Hendek arasındaki genetik farklılığın (%1,39) (Tablo 12) daha yüksek oluşu çalışılan Anadolu, Güney Marmara ve Trakya *Phoxinus* populasyonlarının taksonomik durumunun yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Avrupa sazansılarında sınırlı dağılım gösteren türlerin populasyonları içerisinde ve arasında düşük bir çeşitliliğe sahip olma eğiliminde oldukları ileri sürülmüştür (Mesquita vd., 2001). Ayrıca, Grant ve Bowen (1998) hem düşük haplotip hem de nükleotid çeşitliliğine sahip populasyonların, yakın zamanda (son birkaç bin yıldır) uzun süreli veya ciddi populasyon darboğazları yaşamış olabileceği ve kurucu etkisinin görüşünü ileri sürmüşlerdir. Bütün bu görüşler ışığında araştırmamızda elde edilen mitokondri DNA 16S rRNA, COI ve sitokrom b geni dizileri itibarıyla haplotipik çeşitlilik ve nükleotit çeşitlilik değerleri (Tablo 13) Kuzey-batı Türkiye'deki *Phoxinus* populasyonlarının yakın bir dönemde böyle bir darboğazı deneyimledikleri hatta hala darboğazda olabileceklerini düşündürmektedir. Zira, benzer olarak, Doğu Anadolu'dan *Chondrostoma* (Daştan vd., 2012), Tayvan'dan *Acrossocheilus paradoxus* (Wang vd., 2000), Fumin, Çin'den *Sinocyclocheilus graham* (Chen vd., 2009) ve Güneydoğu Meksika'dan *Poecilia orri* ve *Gambusia yucatana* (Poeciliidae) (Vasquez-Dominguez

vd., 2009) gibi genetik darboğaz geçiren tatlısu balık populasyonlarının hem haplotip hem de nükleotid çeşitliliği bakımından düşük değerler sergilediği rapor edilmiştir.

4.2. Filogenetik Analiz

Haplotip ağ analizi (Şekil 4-7), düşük haplotip sayısı, her bir populasyonun çoğunlukla sadece baskın bir haplotip ile temsil ediliyor olması, haplotiplerin çoğunun ağsı evrim diyagramlarının dış düğümlerinde dağıldığını ve aralarında çok sayıda mutasyonel adım olduğunu göstermektedir. Olası eksik haplotiplerin varlığını akla getiren bu haplotip dağılım modelinin muhtemel nedeni çok sayıda haplotipi yok eden nüfus tıkanıklığı olabilir. Populasyon içerisindeki çeşitliliğin son derece düşük olması ve populasyonlar arasındaki farklılığın nispeten yüksek olması bu ithimali desteklemektedir.

Haplotiplerin NJ, MP, ve ML filogenetik ağaçları, haplotip ağ analizi sonuçlarını desteklemektedir ve Türkiye tatlısularında dağılım gösteren *P. strandjae*'nin 4 farklı coğrafik populasyon grubunu işaret eden incelenmeye değer düzeyde yüksek bootstrap destekli (<60%, Şekil 8-19) filogeni ile coğrafi dağılım arasında doğrudan bir korelasyon göstermektedir. Haplotip ağındaki olası eksik haplotiplerin varlığı ve uzun kollu filogenetik ağaç topolojisi birlikte değerlendirildiğinde uzun süreli populasyon dengesi ve yakın zamanda belli miktarda evrimsel farklılaşmayı ifade eder. Son zamanlar meydana gelen bu genetik farklılaşma, düşük haplotip sayısı ve genetik çeşitlilik düzeyi ile kombine edildiğinde iklim değişiklikleri, jeolojik faaliyetler ve insan faaliyetlerinin gibi çevresel faktörler nedeniyle yakın tarihte meydana gelmiş muhtemelen populasyon darboğazının mevcut genetik olarak farklılaşmış populasyonları oluşturduğunu düşündürmektedir.

4.3. Populasyon Genetik Yapısı

Populasyonlar arasındaki önemli bir genetik farklılaşma belirteci olan F_{ST} değerleri belli bir seviyenin ($F_{ST}>0.25$) üstünde olduğunda, ilgili populasyonlar arasında çok büyük seviyede genetik farklılaşma olduğu bilinirken (Wright, 1978) çalışmamızda farklı gruplara ait populasyonlar arasında yüksek düzeyde farklılaşma olduğunu

gösteren çok yüksek F_{ST} değerleri ($F_{ST} = 0.44984-1.00000$, Tablo 14-17) bulundu. Benzer şekilde, düşük gen akışı seviyeleri ($Nm < 1$), çalışmamızdaki dört populasyon grubu arasında genetik farklılaşmanın var olduğunu gösterdi ki coğrafik mesafe populasyon farklılaşmasının başlıca nedeni olabilir.

Populasyon çifti farklılıkları (Tablo 8-12), haplotip ağ (Şekil 4-7) ve filogenetik ağaç (Şekil 8-19) topolojilerine göre belirlenen dört populasyon (Hendek ve Kalkım/Rezve/Poyralı ve Sogucak/Abant) grubunu dikkate alarak gerçekleştirilen AMOVA analizinin sonuçlarına (Tablo 18) göre toplam moleküler varyasyonun büyük kısmı (% 67.98-75.90) söz konusu gruplar arasında meydana geldiğinden işaret eden arasında meydana geldiğini işaret etmektedir. Geri kalan varyasyonun hemen hemen tamamı (%23.74-32.02) grup içi populasyonlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır ki bu farklılığın kaynağı aynı grupta yer almalarına karşın coğrafik mesafeleriyle orantılı olarak hatırı sayılır düzeyde nispeten daha yüksek genetik farklılık içeren Hendek ve Kalkım populasyonlarından kaynaklanmaktadır.

4.4. Demografik Hikâye

Tarihsel demografik genişlemelerin DNA dizileri arasındaki ikili populasyon farklarının frekans dağılımlarının kullanılması yoluyla değerlendirildiği bu çalışmada *S. strandjae*'nin tüm populasyonlar için gerçekleştirdiğimiz uyumsuzluk dağılım analizi multimodal ve düzensiz bir yapı ortaya koymuştur (Şekil 3). Dengedeki *Phoxinus* populasyonları, soylar arasında derin farklılıklar birikmesi (%2.06-3.48) nedeniyle "pürüzlü" bir multimodal dağılım göstermektedirler. Bu uyumsuzluk dağılım modeli uzun süreli demografik dengenin veya istikrarlı bir populasyonun işareti olup (Harpending et al., 1993), belirlenen düşük haplotip ve nükleotid çeşitliliği değerleri (Tablo 13) ile birlikte yakın tarihli bir populasyon darboğazı nedeniyle haplotiplerinin büyük bir kısmını kaybetmiş (Ray vd., 2003) yaygın bir soy olabileceklerini (Excoffier vd, 1992; Rogers ve Harpending, 1992; Rogers vd., 1995) ortaya koymaktadır.

Nötralite F_u 'nun F_s ve Tajima D testi değerlerinin önemli düzeyde sıfırdan farklı olmaması ($-2 \leq$ ile $2 \geq$) diğer bir deyişle istatistiksel olarak anlamlı olmaması sabit büyüklükteki (sürüklenme-mutasyon dengesindeki) bir populasyonu işaret ettiğinden

(Maruyama ve Fuerst, 1984; 1985) Mitokondri 16S rRNA, COI, cyt b genleri ve kombine verisetleri itibarıyla Türkiye'deki mini inci balığı populasyonları için elde edilen tarafsızlık değerleri (Tajima D: -0.2682 – 0.1530 ve Fu'nun Fs: -0.3393 - - 0.0130) sıfır veya önemsiz düzeyde sıfırdan sapmalar gösterdiği için çalıştığımız populasyonların genellikle demografik dengede olduğunu işaret etmektedir.

Sonuç olarak, *P. strandjae* populasyonları için belirlenen düşük haplotip ve nükleotit çeşitliliği değerleri (Tablo 13), negatif ama önemli olmayan Tajima'nın D ve Fu'nun Fs nötralite indisleri (Tablo 13), multimodal uyumsuzluk dağılımı (Şekil 3) birlikte tutarlı olup yakın tarihli bir darboğaz etkisini işaret etmektedir.

Diğer taraftan, Türkiye iç sularındaki *P. strandjae* popülasyonları arasındaki tahmini ayrılma zamanları (2.16 ile 3.5 milyon yıl önce), *Phoxinus* populasyonları arasındaki mevcut varyasyonun sazası balıklarının türleşmesinde etkili olduğu düşünülen Messinian tuzluluk krizi ve Lago Mare dağılımından (Doadrio ve Carmona, 2003; Durand vd., 2002, 2003) daha çok Geç Pliosen de (2 milyon yıl önce) Batı Anadolu ve Trakya arasındaki İstanbul ve Çanakkale boğazlarının açılması (Bacescu 1985; Tortonese 1985; Çağatay vd., 2000; Yalıtırak vd., 2000) sonucu bazı memeli türlerinde de görüldüğüne (Thanou vd., 2012; Tiğit vd., 2012) benzer şekilde nehirler arasındaki gen akışının kesilmesinden kaynaklandığı tahmin edilmiştir.

5. ÖNERİLER

Biyoçeşitliliğimizin ortaya konulmasına yönelik uğraşlara katkı sağlanması kapsamında daha önce morfolojiye dayalı olarak incelenen bazı populasyonları evrimsel ve filogenetik yaklaşımlar kullanarak tanımladığımız genetik yaklaşımı esas alan bu çalışma, Anadolu'daki *Phoxinus* cinsinin genel bir değerlendirilmesinin yanı sıra daha ileri çalışmalar için sağlam bir temel oluşturabilir.

Phoxinus strandjae içindeki tür içi varyasyonun bazı Avrupalı akrabalarına nazaran nispeten daha yüksek oluşu çalışılan Anadolu ve Trakya populasyonlarının taksonomik durumunun yeniden gözden geçirilebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, gelecekteki araştırmalarda *Phoxinus* cinsindeki taksonomik sorunların çözümlenmesine katkıda bulunabilecek bulguları rapor edilmektedir.

Phoxinus strandjae türünün dağılım gösterdiği diğer havzalardaki populasyonları da kapsayacak şekilde daha büyük bir örneklem grubu ile mitokondri genomunun yanısıra nükleer genomdan etkili olduğu bilinen DNA dizilerinin de moleküler analize dahil edilmesi populasyonun genetik yapısı hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlayacaktır. Ayrıca mtDNA'nın yanında nükleer DNA'nın da çalışılması bundan sonra yapılacak çalışmalar arasında olmalıdır.

Diğer taraftan, elde ettiğimiz sonuçlar bundan sonraki çalışmalarda morfolojik ve osteolojik verilerle karşılaştırılmalı olarak değerlendirilebilir. Dahası iç sularımızdaki populasyonların genus içindeki yeri ve daha geniş anlamda biyocoğrafik hikayesinin tahmin edilebilmesi için uluslararası işbirliği ve veri paylaşımı ile sınır ötesi coğrafyalardaki populasyonlar ile birlikte analizi yapılabilir.

Aynı zamanda verilerin incelenmesi sonucunda evrimsel olarak önemli populasyonların ve genetik motiflerin belirlenmiş olması grubun türleşmesi, dağılım alanının coğrafik evrimi ile ilişkilendirilmesi günümüzde ve gelecekteki koruma stratejilerini belirleme anlamında kritik yapmamıza olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Allard, M.W., Miyamoto, M.M., Jarecki, L. and Kraus, F., 1992.** DNA systematics and evolution of the artiodactyl family Bovidae. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89,3972-3976.
- Avise, J.C., 2000.** Phylogeography: The History and Formation of Species. Harward University Press, Cambridge, MA.(447 pp.)
- Bacescu, M., 1985.** The effects of the geological and physicochemical factors on the distribution of marine plants and animals in the Mediterranean. Mediterranean Marine Ecosystems NATO Conference Series 8, 195–212. DOI: 10.1080/24750263.2017.1317041
- Bandelt, H., Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1), 37–48.
- Banarescu, P., 1991.** Zoogeography of Fresh Waters, Volume 2: Distribution and Dispersal of Fresh Water Animals in North America and Eurasia. Aula-Verlag, 1091, Wiesbaden.
- Behrens-Chapuis, S., Herder, F., Esmaeili, H.R., Freyhof, J., Hamidan, N.A., Özuluğ, M., Sanda, R. and Geiger, M.F., 2015.** Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies—can this marker help to explain conflicts in cyprinids? DNA Barcodes, 3(1), 187–199. DOI: 10.1186/s12862-017-1032-x
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. and Wilson, A.C., 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. Journal of Molecular Evolution, 18, 225–239.
- Brown, W.M., 1985.** The mitochondrial genome of animals: molecular evolutionary genetics. In: MacIntyre RJ (ed) Molecular evolutionary genetics. Plenum Press, New York. pp 95–130. DOI: 10.1590/S1415-47572008000200024.
- Bianco, P.G., 2014.** An update on the status of native and exotic freshwater fishes of Italy Journal of Applied Ichthyology, 30(1), 62–77. DOI: 10.1186/s12862-017-1032-x
- Bianco, P.G. and De Bonis, S., 2015.** A taxonomic study on the genus *Phoxinus* (Actinopterygii, Cyprinidae) from Italy and western Balkans with description of four new species: *P. ketmaieri*, *P. karsticus*, *P. apollonicus* and *P. likai*. Research Wildlife Conservation, 4, 1-17.
- Bogutskaya, N.G. and Naseka, A.M., 2004.** Catalogue of Agnathans and Fishes of Fresh and Brackish Waters of Russia with Comments on Nomenclature and Taxonomy. KMK Scientific Press Ltd., Moscow, 389 pp. (in Russian).

- Borgstrom, R., Brittain, J.E., Hasle, K., Skjolaas, S. and Dokk, J.G., 1996.** Reduced recruitment in brown trout *Salmo trutta*, the role of interactions with the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Nordic Journal of Freshwater Research* 72, 30-38.
- Buczacki, S., 2002.** *Fauna Britannica*. Hamlyn, London.
- Çağatay, M.N., Görür, N., Algan, O., Eastoe, C., Tchapylyga, A., Ongan, D., Kuhn, T. and Kuşçu, I., 2000.** Late Glacial-Holocene palaeoceanography of the Sea of Marmara: Timing of connections with the Mediterranean and the Black Seas. *Marine Geology*, 167:191–206.
- Chen, S.Y., Zhang, R.D., Feng, J.G., Xiao, H., Li, W.X., Zan, R.G. and Zhang, Y.P., 2009.** Exploring factors shaping population genetic structure of the freshwater fish *Sinocyclocheilus grahami* (Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Fish Biology*, 4(8), 1774-86. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2009.02204.x
- Cihar, J., 1991.** *A field guide in colour to freshwater fish*. Silverdale Books, Leicester.
- Collin H. and Fumagalli, L., 2011.** Evidence for morphological and adaptive genetic divergence between lake and stream habitats in European minnows (*Phoxinus phoxinus*, Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 20(21), 4490–502. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05284.x.
- Daştan, S.D., Bardakçı, F. and Degerli, N., 2012.** Genetic Diversity of Cyprinion macrostomus Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 651-659. DOI: 10.4194/1303-2712-v12_3_13
- Davies, N.B. Krebs, J.R. and West, S.A., 2012.** *An Introduction to Behavioral Ecology*, 147–151.
- Demirsoy, A., 1997.** Yaşamın Temel Kuralları Omurgalılar/Anamniyota. Cilt III Kısım I, III. Baskı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 684, Ankara.
- Doadrio, I. and Carmona, J.A., 2003.** A new species of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1832 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Iberian peninsula. *Graellsia*, 59(1), 29–36.
- Doadrio, I. and Carmona, J.A., 2004.** Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 802–815. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.07.008
- Dowling, T.E., Tibbets, C.A., Minckley, W.L. and Smith, G.R., 2002.** Evolutionary relationships of the plagopterins (Teleostei: Cyprinidae) from cytochrome b sequences. *Copeia*, 665–678.
- Durand J.D., Tsigonopoulos, C.S., Unlü, E. and Berrebi, P., 2002.** Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA – Evolutionary significance of this region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22: 91-100. DOI: 10.1006/mpev.2001.1040

- Durand, J.D., Bianco, P.G., Laroche, J. and Gilles, A., 2003.** Insight into the origin of endemic Mediterranean ichthyofauna—Phylogeography of *Chondrostoma* genus (Teleostei, Cyprinidae). *Journal of Heredity*, 94, 315–328.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Farias, I.P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H. and Meyer, A., 2001.** The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among Cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53, 89–103. DOI:10.1007/s002390010197
- Felsenstein, J., 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791. DOI:10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
- Felsenstein, J., 1987.** Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*, 26, 123-154. DOI: 10.1007/BF02111286.
- Frankham, R., Briscoe, D.A. and Ballou, J.D., 2002.** Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, New York, USA
- Freyhof, J. and Kottelat, M., 2008.** *Phoxinus phoxinus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. International Union for Conservation of Nature. Retrieved 12 May 2012.
- Froese, R. and Pauly, D., 2015.** Species of *Phoxinus* in FishBase. October 2015 version.
- Fu, Y.X., 1996.** New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, 143, 557-570.
- Fu, Y.X., 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Freeman, S. and Herron, J.C. 1999.** Evrimsel Analiz. Çıplak, B., Başıbüyük, H. H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ. (eds), Palme Yayıncılık, Ankara, 708 s.
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Karst, H., Kottelat, M., Kovacic, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marcic, Z., Ozulug, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Sanda, R., Schneider, M., Slechtova, V., Stoumboudi, M., Walter, S., Freyhof, J., 2014.** Spatial heterogeneity in the mediterranean biodiversity hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1210-1221.

- Gilles, A., Costedoat, C., Barascud, B., Voisin, A., Banarescu, P., Bianco, P.G., Economidis, P.S., Maric', D. and Chappaz, R., 2010.** Speciation pattern of *Telestes souffia* complex (Teleostei, Cyprinidae) in Europe using morphological and molecular markers. *Zoologica Scripta*, 39, 225–242. DOI:10.1111/j.1463-6409.2010.00417.x
- Gu, X., Zhu, J.Y., Jian, K.L., Wang, B.J., Peng, X.R., Yang, G.Y., Wang, T., Zhong, Z.J. and Peng, K.Y., 2016.** Absence of population genetic structure in *Heterakis gallinarum* of chicken from Sichuan, inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(5), 3612-3617. DOI: 10.3109/19401736.2015.1079825
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 41, 95-98.
- Hartl, D.L. and Clark, A.G., 1997.** Principles of population genetics. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Helfman, G., Collette, B.B., Facey, D.E. and Bowen, B.W., 2009.** The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology. 2nd. Boston: Wiley-Blackwell; p. 736.
- Holmes, B.H., Steinke, D. and Ward, R.D., 2009.** Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95, 280–288.
- Imoto, J.M., Saitoh, K., Sasaki, T., Yonezawa, T., Adachi, J., Kartavtsev, Y.P., Miya, M., Nishida, M. and Hanzawa, N., 2013.** Phylogeny and biogeography of highly diverged freshwater fish species (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) inferred from mitochondrial genome analysis. *Gene*, 514(2), 112-124. DOI: 10.1016/j.gene.2012.10.019
- Kalendar, R., Lee, D. and Schulman, A.H., 2009.** FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3, 1–14.
- Keskin, E. and Atar, H.H., 2013.** DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. *Molecular Ecology Resources*, 13, 788–797. DOI: 10.1111/1755-0998.12120
- Klug, W.S. and Cummings, M.R., 2000.** Concepts of genetics. 6th ed. Prentice Hall, NJ.
- 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* 15, 562-572. Knebelsberger T, Thiel R, 2014, Identification of gobies (Teleostei: Perciformes: Gobiidae) from the North and Baltic Seas combining morphological analysis and DNA barcoding, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172, 831-45.

- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S.F., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C., 1989.** Dynamics of mtDNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6196-6200.
- Kottelat, M., 2007.** Three new species of *Phoxinus* from Greece and southern France (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 18 (2), 145-162.
- Kottelat, M. and Freyhof, J., 2007.** Handbook of European Freshwater Fishes. Steven Simpson Books. Cornol & Freyhof, Berlin, xii+660 pp.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016.** MEGA7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- Kuru, M., 2004.** Türkiye içsu balıklarının son sistematik durumu. *G. Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24(3), 1-21.
- Larget, B. and Simon, D., 1999.** Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 750-759. DOI: 10.1214 /105051600000000538
- Leigh, J.W. and Bryant, D., 2015.** POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116. DOI: 10.1111/2041-210X.12410
- Lewis, P.O., 1998.** A genetic algorithm for maximum-likelihood phylogeny inference using nucleotide sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 15(3), 277-283.
- Li, Y., 2004.** How to Build a Phylogenetic Tree Phycs498BIO Assignment2. Mary Ann Liebert, Inc., 195-212. DOI: 10.3133/of2007-1047.srp003.
- Magurran, A.E., 1986.** The development of shoaling behaviour in the European minnow. 29: 159–169. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1986.tb05007.x
- Maruyama, T. and Fuerst, P.A., 1984.** Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. I. Allele numbers when populations evolve from zero variability. *Genetics*, 108, 745–763.
- Maruyama, T. and Fuerst, P.A., 1985.** Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 111, 675–689.
- Maitland, P.S., 2004.** Keys to the freshwater fish of Britain and Ireland, with notes on their distribution and ecology. Freshwater Biological Association Scientific Publication, 62, 1-248.

- Mendel, J., Lusk, S., Vasileva, E., Vasilev, V.P., Luskova, V., Ekmekci, F.G., Erkakan, F., Ruchin, A., Kosco, J., Vetesnik, L., Halacka, K., Sanda, R., Pashkov, A.N. and Reshetnikovet, S.I., 2008.** Molecular phylogeny of the genus *Gobio* Cuvier, 1816 (Teleostei: Cyprinidae) and its contribution to taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(3), 1061-75.
- Mesquita, N., Carvalho, G., Shaw, P., Crespo, E. and Coelho, M.M., 2001.** River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Heredity*, 86, 253–264. DOI: 10.1046/j.1365-2540.2001.00776.x
- Meusel, M.S. and Moritz, R.F., 1993.** Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*, 24, 539-543.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki, P. and Wilson, A.C., 1990.** Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347, 550-553. DOI: 10.1038/347550a0
- Michener, C.D. and Sokal, R.R., 1957.** A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*, 11: 490–499.
- Moum, T. and Bakke, I., 2001.** Mitochondrial control region structure and single site heteroplasmy in the razorbill (*Alca torda*; Aves). *Current Genetics*, 39, 198-203. DOI: 10.1007/s002940100197.
- Museth, J., Hesthagen, T., Sandlund, O.T., Thorstad, E.B. and Ugedal, O., 2007.** The history of the minnow *Phoxinus phoxinus* (L.) in Norway: from harmless species to pest. *Journal of Fish Biology*, 71, 184-195.
- Nelson, J.S., 1994.** *Fishes of the World*. Third Edition. John Wiley & Sons Inc., 600, New York.
- Palandacic, A., Bravnicar, J., Zupancic, P., Sanda, R. and Snoj A., 2015.** Molecular data suggest a multispecies complex of *Phoxinus* (Cyprinidae) in the western Balkan peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2, 118–23.
- Palandacic, A., Naseka, A., Ramler, D. and Ahnelt, H., 2017.** Contrasting morphology with molecular data: an approach to revision of species complexes based on the example of European *Phoxinus* (Cyprinidae). *BMC Evolutionary Biology*, 17.184.
- Perdices, A., Doadrio, I., Economidis, P.S., Bohlen, J. and Banareescu, P., 2003.** Pleistocene effects on the European freshwater fish fauna: double origin of the cobitid genus *Sabanejewia* in the Danube basin (Osteichthyes: Cobitidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26 (2), 289-299.
- Primack, R.B., 2002.** *Essentials of Conservation Biology*, Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 698 pages.

- Qi, D., Guo, S., Tang, J., Zhao, X. and Liu, J., 2007.** Mitochondrial DNA phylogeny of two morphologically enigmatic fishes in the subfamily Schizothoracinae (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Journal of Fish Biology*, 70, 60–74.
- Ramler, D., Palandacic, A., Delmastro, G.B., Wanzenböck, J. and Ahnelt, H., 2016.** Morphological divergence of lake and stream *Phoxinus* of northern Italy and the Danube basin based on geometric morphometric analysis. *Ecological Evolution*, 1–13. DOI: 10.1002/ece3.2648
- Ray, N., Currat, M. and Excoffier, L., 2003.** Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 76–86.
- Rozas, J., 2009.** DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537*. Humana Press, NJ, USA.
- Saç, G. and Özuluğ, M., 2015.** New data on the distribution and conservation status of *Phoxinus strandjae* (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration Of Freshwaters*, 25, 381-383.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press, yayın no: 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.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–25.
- Saitou N. and Imanishi, T., 1989.** Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution*, 6, 514-525.
- Sakai, H., Ito, Y., Shedko, S.V., Safronov, S.N., Frolov, S.V., Chereshev, I.A., Jeon, S.R. and Goto, A., 2006.** Phylogenetic and taxonomic relationships of northern Far Eastern phoxinin minnows, *Phoxinus* and *Rhynchocypris* (Pisces, Cyprinidae), as inferred from allozyme and mitochondrial 16S rRNA sequence analyses. *Zoologica Scripta*, 23, 323–331. DOI: 10.2108/zsj.23.323
- Schönhuth, S., Hillis, D.M., Neely, D.A., Lozano-Vilano, L., Perdices, A. and Mayden, R.L., 2012.** Phylogeny, diversity, and species delimitation of the North American round-nosed minnows (Teleostei: Dionda), as inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62 (1), 427–446. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.10.011

- Simons, A.M. and Mayden, R.L., 1998.** Phylogenetic relationships of the western North American phoxinins (Actinopterygii: Cyprinidae) as inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9, 308–29. DOI: 10.1006/mpev.1997.0467
- Simons, A.M., Berendzen, P.B. and Mayden, R.L., 2003.** Molecular systematics of North American phoxinin genera (Actinopterygii: Cyprinidae) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA sequences, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 139, 63–80. DOI: 10.1046/j.1096-3642.2003.00076.x
- Thanou, E., Tryfonopoulos, G., Chondropoulos, B. and Fraguedakis-Tsolis, S., 2012.** Comparative phylogeography of the five Greek vole species infers the existence of multiple South Balkan subrefugia. *Italian Journal of Zoology*, 79, 363–376. DOI: 10.1080/11250003.2011.651163.
- Tortonese, E., 1985.** Distribution and ecology of endemic elements in the Mediterranean fauna (fishes and echinoderms). *Mediterranean Marine Ecosystems NATO Conference Series*, 8, 57–83.
- Tsoumani, M., Georgiadis, A., Giantsis, A.I., Leonardos, I. and Apostolidis, A.P., 2014.** Phylogenetic relationships among Southern Balkan *Rutilus* species inferred from cytochrome b sequence analysis: micro-geographic resolution and taxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54, 172–178.
- Turan, C., 2008.** Molecular systematics of the Capoeta (Cypriniformes: Cyprinidae) species complex inferred from mitochondrial 16S rDNA sequence data. *Acta Zoologica Cracoviensia*. 51: 1-14. DOI: 10.3409/azc.51a_1-2.1-14
- URL-1, 2017.** http://www.turkhaygen.gov.tr/doc/Populasyon_Genomigi_Calistayi_II.pdf. (14 Ekim 2017).
- URL-2, 2017.** https://i1.wp.com/upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3e/Mitochondrial_DNA_en.svg/594px-Mitochondrial_DNA_en.svg.png. (14 Ekim 2017).
- Vázquez-Domínguez, E., Castaeda-Rico, S., Garrido-Garduo, T. and Gutiérrez-García, T.A., 2009.** Methodological advances for the combined study of genetic, genealogical and geographical information in evolutionary and distributional analyses. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277–297.
- Wang, J.P., Hsu, K.C. and Chiang, T.Y., 2000.** Mitochondrial DNA phylogeography of *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, 9, 1483–1494.
- 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. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716

- Wright, S., 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(4), 323-54.
- Wright, S., 1978.** *Evolution and the Genetics of Populations: A Treatise in Four Volumes. Vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations.* Chicago: University of Chicago Press.
- Yaltırak, C., Sakinç, M. and Oktay, F.Y., 2000.** Westward propagation of North Anatolian fault into the northern Aegean: Timing and kinematics. Comment and Reply. *Geology*, 28, 187–188.
- Yang, Z. and Rannala, B., 1997.** Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 717-724.
- Yiğit, N., Markov, G., Çolak, E., Kocheva, M., Saygılı, F., Yüce, D. and Çam, P., 2012.** Phenotypic features of the ‘Guentheri’ Group Vole (Mammalia: Rodentia) in Turkey and Southeast Bulgaria: Evidence for its taxonomic detachment. *Acta Zoologica Bulgarica*, 64, 23–32.
- Zardoya, R. and Doadrio, I., 1999.** Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, 49, 227–237.
- Zhu, D., Jamieson, B.G.M., Hugall, A. and Moritz, C., 1994.** Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Molecular Biology and Evolution*, 11, 672-683.
- Zülal, A., 2001.** İnsan Genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, Tübitak Yayınları, Mart, 5-11.

ÖZGEÇMİŞ

Duygu ŞİRİN 29.06.1990 tarihinde Balıkesir’de doğdu. İlköğretimini 2004. yılında 24 Kasım. İlköğretim Okulu’nda ve Ortaöğretimini 2007 yılında Güzeltepe Fevzi Çakmak Lisesi’nde tamamladı. 2009 yılında başladığı lisans eğitimini 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde tamamladı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir.

