

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ELAZIĞ YÖRESİ BAZI SU KAYNAKLARINDAN YAKALANAN
Capoeta umbla'da *Diplostomum*'un TESPİTİ VE MOLEKÜLER
OLARAK İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ
Sibel BARATA

Anabilim Dalı: Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Danışman: Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ
2. Danışman: Dr.Öğretim Üyesi Murad GÜRSES

MAYIS-2018

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELAZIĞ YÖRESİ BAZI SU KAYNAKLARINDAN YAKALANAN *Capoeta umbla*'da
Diplostomum'un TESPİTİ VE MOLEKÜLER OLARAK İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Sibel BARATA

(121128201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27.03.2018

Tezin Savunulduğu Tarih: 17.04.2018

Danışman: Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Metin ÇALTA

Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ

Doç. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK

Dr. Öğr. Üyesi Mikail ÖZCAN

NİSAN-2018

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında bana yol gösteren, araştırmanın planlanmasında, değerlendirilmesinde engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her zaman yol gösteren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ'ye, tezimin planlanması ve proje hazırlanması konusunda yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sayın Murad GÜRSES'e, Tez izleme komitesinde yer alan hocalarım Sayın Prof. Dr. Metin ÇALTA'ya, Sayın Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ'e, laboratuvar malzemesi temini konusunda ve manevi açıdan her zaman desteklerini gördüğüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Naim SAĞLAMA'a ve Sayın Prof. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ'YE, laboratuvar çalışmalarında ve moleküler analizlerimde daima yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen, bir abla şefkatiyle bana yol gösteren, Nevşehir'deki şansım kalbi güzel hocam Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK'a ve yine yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Ümit KUMBIÇAK'a, balıkların yaş tayinini hesaplama noktasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Arş. Gör. Dr. Mücahit EROĞLU'na, laboratuvar malzemelerinin temininden laboratuvar aşamasında her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Önder OTLU'ya, laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yüksek Mühendis Hülya ŞAHİN'e, yine laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, tez çalışmamı 116Y503 Nolu proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin başladığını gören ama mezuniyetimi göremeyen hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini yanımda hissettiğim, yokluğuna bir türlü alışamadığım ama her zaman yanımda hissettiğim canım babama, anneliğin kutsallığını anne olduktan sonra öğrendiğim her zaman yanımda olan, benimle ağlayan benimle gülen canım anneme, babamın yokluğunda bana bir baba sevgisi ve şefkatiyle yaklaşan, her zaman sıcaklığını ve yakınlığını hissettiğim canım abime ve hayatında insanın canından daha kıymetli bir can olabileceğini gösteren, hayattaki annelik gibi en güzel duyguyu bana yaşatan, Allah'ın bana en güzel hediyesi kalbim, nefesim, canım, herşeyim, biricik oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sibel BARATA

Elazığ-2018



Babama ve Oğluma...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
SEMBOLLER LİSTESİ	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ara Konak (Capoeta umbla) ve Parazit (Diplostomum sp.) ile İlgili Genel Bilgiler.....	2
1.1.1. Capoeta umbla.....	2
1.1.2. Diplostomum sp.	3
1.2. Moleküler Yöntemler ile İlgili Genel Bilgiler.....	6
1.3. Mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz Geni (COI)	14
1.4. Kaynak Özetleri.....	15
2. MATERYAL VE METOT	20
2.1. Çalışma Alanı	20
2.2. Balık Materyali.....	21
2.3. Yararlanılan alet ve Ekipmanlar	21
2.4. Genetik Karakterizasyon Çalışmaları.....	24
2.4.1. Total DNA İzolasyonu	24
2.4.1.1. Ön Hazırlık Aşaması	24
2.4.1.2. Uygulama Aşaması.....	25
2.4.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	26
2.4.3. Mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz I Gen Bölgesinin Çoğaltılması.....	26
2.4.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Gen Bölgesinin Dizi Analizi	27
2.4.5. Dizi Analiz Verilerinin Değerlendirilmesi	28
3. BULGULAR	29
3.1. Örnekleme Bölgelerinden Elde Edilen Diplostomum'ların Morfolojik Analizleri	29

3.1.1.	Diplostomum cinsinin sistematik teşhisi ve morfolojisi	29
3.1.2.	Diplostomum spathaceum'un sistematik teşhisi ve morfolojisi.....	29
3.1.3.	İstatistiksel Analizler	31
3.2.	Örnekleme Bölgelerinden Elde Edilen Diplostomum'ların mtCOI Gen Bölgesinin Genetik Analizleri	38
3.2.1.	mtDNA COI Gen Bölgesi Dizilerinin Belirlenmesi ve Dizileme Analizleri ..	39
3.2.2.	mtCOI Gen Bölgesi Genetik Analizi.....	56
3.2.2.1.	Filogenetik ağaçların oluşturulması	57
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	61
	KAYNAKLAR.....	68
	ÖZGEÇMİŞ	76

ÖZET

Bu çalışmada Elazığ ili sınırları içerisinde bulunan Karakaya Baraj Gölü, Keban Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nde doğal yayılım gösteren *Capoeta umbla* balıklarının gözlerinde parazit olarak bulunan *Diplostomum* örneklerinin mitokondriyal DNA'da bulunan sitokrom c oksidaz I (COI) gen bölgesinin dizi analizi verilerine göre tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elde edilen balık örneklerinin boy, yaş, ağırlık ve cinsiyet gibi morfolojik parametreler ışığında değerlendirilmesi yapılmıştır. Buna göre dişi balıklarda parazitlenme daha fazla olurken boy, yaş ve ağırlık artışına bağlı olarak parazit sayısında da artışlar kaydedilmiştir. mtCOI gen bölgesinin dizi analizi kullanılarak toplam 8 haplotip belirlenmiş ve bu haplotiplere göre genetik uzaklık belirlenerek Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ), Minimum Evolution (ME), Maksimum Parsimony (MP) ve Bayes metotları ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda buna göre en düşük genetik uzaklık 0.00209 değerinde bulunurken en yüksek genetik uzaklık ise 0,01264 olarak bulunmuştur. Filogenetik analizlerde ise haplotip 3 ve haplotip 4 arasında daha yakın bir ilişki bulunmuştur. Çalışılan tüm örneklerin *Diplostomum spathaceum*'a ait olduğu ve çalışma bölgeleri arasında parazitin ana konakçılar tarafından yayılmış olabileceği ileri sürülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Capoeta umbla*, *Diplostomum*, filogenetik, COI, PCR

SUMMARY

Identification and molecular investigation of *Diplostomum* in *Capoeta umbla* caught from some water sources in Elazığ region

In this study, identification of the cytochrome c oxidase I (COI) gene region in mitochondrial DNA of the *Diplostomum* specimens, which are parasitic in the eyes of *Capoeta umbla* fish naturally distributed in Karakaya Dam Lake, Keban Dam Lake and Lake Hazar, within the borders of Elazığ province was performed. Moreover morphological parameters such as height, age, weight and sex of the obtained fish samples were evaluated. According to the results, while there is more parasitism in female fishes, the number of parasites increases according to height, age and weight increase. A total of 8 haplotypes were determined using sequence analysis of the mtCOI gene region and phylogenetic trees were constructed by determining the genetic distance according to these haplotypes and determining the Maximum Likelihood ML, Neighbor Joining (NJ), Minimum Evolution (ME), Maximum Parsimony (MP) and Bayes methods. As a result, the lowest genetic distance was 0,00209 and the highest genetic distance was 0,01264. Phylogenetic analysis revealed a closer relationship between haplotype 3 and haplotype 4. It has been suggested that all the samples studied belong to *Diplostomum spathaceum* and that the parasite may have been spread by the main hosts between study sites.

Key Words: *Capoeta umbla*, *Diplostomum*, phylogenetic, COI, PCR

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>C. umbla</i> 'nın genel görünüşü	3
Şekil 1.2. <i>Diplostomum</i> sp.'ye ait genel görünüş a) Mikrofotoğraf b) Kamera görüntüsü çizimi.....	4
Şekil 1.3. <i>Diplostomum</i> sp.'nin hayat döngüsü	5
Şekil 1.4. PCR basamakları.....	8
Şekil 1.5. Mitokondri DNA'sının genel görünüşü	10
Şekil 2.1. Balık örneklerinin alındığı bölgeler	23
Şekil 3.1. <i>Diplostomum spathaceum</i> 'un genel görünüşü (Orijinal)	30
Şekil 3.2. <i>Diplostomum spathaceum</i> 'un genel görünüşü; aç.: ağız çekmeni, f.:farinks, b.:bağırsak, kç.:karın çekmeni	31
Şekil 3.3. Karakaya Baraj Gölünde ağırlığa göre ortalama <i>Diplostomum</i> sayısı	32
Şekil 3.4. Karakaya Baraj Gölünde boy uzunluğuna göre ortalama <i>Diplostomum</i> sayısı... 33	33
Şekil 3.5. Karakaya Baraj Gölü Cinsiyete bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı	33
Şekil 3.6. Karakaya Baraj Gölü Yaşa Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı.....	34
Şekil 3.7. Keban Baraj Gölü Ağırlığa Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı	34
Şekil 3.8. Keban Baraj Gölü Boy Uzunluğuna Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı	35
Şekil 3.9. Keban Baraj Gölü Cinsiyete Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı.....	35
Şekil 3.10. Keban Baraj Gölü Yaşa Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı.....	36
Şekil 3.11. Hazar Gölü Ağırlığa Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı.....	36
Şekil 3.12. Hazar Gölü Boy Uzunluğuna Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı	37
Şekil 3.13. Hazar Gölü Cinsiyete Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı	37
Şekil 3.14. Hazar Gölü Yaşa Bağlı Ortalama <i>Diplostomum</i> Sayısı	38
Şekil 3.15. <i>Diplostomum</i> sp.'ye ait metaserkaria larvalarının mtCOI gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasının agaroz jelde görüntülenmesi (orijinal)	39
Şekil 3.16. DNA dizisine ait kromatogramın bir bölümü	40
Şekil 3.17. Reverse ve forward dizilerinin kontrol edilmesi ve hatalı bölgelerin düzenlenmesi.....	40
Şekil 3.18. Tüm örneklerle ait hizalanmış dizilerin bir bölümü.....	40
Şekil 3.19. COI gen bölgesi için dış gruplu Maximum Likelihood (ML) ağacı	59
Şekil 3.20. COI gen bölgesi için dış gruplu Neighbour Joining (NJ) ağacı	59
Şekil 3.21. COI gen bölgesi için dış gruplu Minimum Evolution (ME) ağacı	60
Şekil 3.22. COI gen bölgesi için dış gruplu Mr Bayes ağacı	60

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan balık örneklerinin toplandığı bölgeler	22
Tablo 2.2. Primer Nükleotid Dizileri	27
Tablo 3.1. mtDNA COI gen bölgesi haplotip bilgileri	56
Tablo 3.2. COI gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi (Haplotip 1, Haplotip 2, Haplotip 3, Haplotip 4, Haplotip 5, Haplotip 6, Haplotip 7, Haplotip 8)	57
Tablo 3.3. Haplotipler için nükleotit kompozisyonu	57



SEMBOLLER LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrad Derece
µM	: Mikromolar
cm	: Santimetre
COI	: Sitokrom Oksidaz c I
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
g	: Gram
ITS	: Internal transcribed spacer
kb	: Kilobaz
km	: Kilometre
m	: Metre
m²	: Metrekare
m³	: Metreküp
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pM	: Pikomolar
pmol	: Pikomol
rRNA	: Ribozomal RNA
sp	: Species
UV	: Ultraviole
Mm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

Sürekli gelişen ve değişen teknolojik yenilikler ve hızla artan dünya nüfusu, insanların ihtiyaçlarını karşılayabilecekleri doğal kaynakların giderek azalmasına yol açmaktadır. Bu da dengeli beslenme problemini beraberinde getirmektedir. İnsanların dengeli beslenebilmeleri için vazgeçilmez olan hayvansal kökenli protein kaynaklarının sınırlı olması, insanları yeni protein kaynaklarını aramaya yöneltmiştir. Bu bağlamda hayvansal kökenli protein kaynaklarından biri olan hayvansal su ürünlerinin, üç tarafı denizlerle çevrili, göl ve akarsular bakımından zengin bir coğrafyaya sahip olan Türkiye’de, gereksinim duyulan protein ihtiyacının karşılanmasında önemli yere sahip olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla balıkçılık sektörü insanların hayvansal protein ihtiyacını karşılamasının yanı sıra, ülke ekonomisine yaptığı katkıyla da önemli bir ihraç kalemini oluşturmaktadır. Ancak balıkçılık sektöründe ürün kaybının en aza indirilmesi için, hastalık yapıcı etkenlerin bilinmesi ve mücadele çalışmalarının yapılması gerekmektedir (Öge, 1999). Bununla beraber tüm dünyada gelişmekte olan kültür balıkçılığı henüz istenilen düzeye ulaşamamıştır. Bunun çeşitli nedenlerinin yanında balıklarda zaman zaman görülen paraziter hastalıklar önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır (Aksoy, 1999). Ekto ve endo parazitlerin balıklarda yaptıkları bozukluklar; soyucu-sömürücü etki, mekanik ve fonksiyonel etkiler, toksik etkiler, konakçının beslenmesi ile ilgili etkiler, parazitlerin balıkların solungaç lamellasına yerleşerek solunumun engellenmesi olarak sıralanabilmektedir (Ekingen, 1983). Balık parazitleri, balık yetiştirilmesini engellemesinin yanı sıra doğal sularda da birçok ölümlere neden olmaktadır (Aksoy, 1999). Bununla birlikte balıklar sulardaki beslenme piramidinin en üstünde yer aldıklarından parazit enfestasyonu ile sürekli karşı karşıya kalmaktadır. Balıkların yaşama ortamını değiştiren herhangi bir sebepte parazit ile konakçısı arasındaki denge bozulur ve bir ya da daha fazla parazit türü epizootik bir hal alır. Çevrenin dengeleme olasılığı bozulmuş olan dengeyi tekrar yenileyebilir fakat bu süre zarfında balıklarda ciddi kayıplar meydana gelir (Ekingen,1983).

Son yıllarda balık parazitlerini tanıma ve kontrolü konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Balık parazitleri onların etkiledikleri balıkların ekonomik önemleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle balıklarda bulunan parazitlerin bulunuşu ve dağılımı konusundaki veriler ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Ancak, günümüzde balık

parazitlerinin dağılımı, biyolojisi ve tanımlanması hakkında yeterli bilgiye henüz ulaşamamıştır (Dörücü vd., 2008). Morfolojik özelliklere dayalı olarak yapılan tanımlamada *Diplostomum* türlerinin tespiti oldukça güçtür. Bu nedenle, birçok çalışmada farklı *Diplostomum* türleri *Diplostomum* sp. adı altında genelleştirilerek verilmekte olup mevcut *Diplostomum* türlerinin doğru olarak tespit edilmesi için daha güvenilir olan moleküler tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada Elazığ ili sınırları içerisinde bulunan Karakaya Baraj Gölü, Keban Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nde doğal yayılış gösteren *Capoeta umbla*'da bulunan *Diplostomum* türlerinin elde edilmesi ve bunların morfolojik verilerle birlikte mitokondriyal DNA'da bulunan sitokrom c oksidaz I (mtCOI) gen bölgesinin dizi analizi verileri ışığında taksonomik tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca, *Diplostomum* türlerinin farklı lokalitelerden toplanan örnekleri arasında genetik bir fark olup olmadığı, çevresel faktörlerin (farklı baraj gölleri veya nehirler veya aynı nehrin farklı bölgeleri) parazitin genetik yapısı üzerinde bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır. Böylece parazitin tür ve alt türlerinin (varsa) belirlenmesi, yaşadığı konağa göre birbirinden ayrılmasına ve parazitle mücadelede parazite karşı uygun ilaç, aşı ve biyolojik maddelerin geliştirilmesine imkân sağlayacaktır.

1.1. Ara Konak (*Capoeta umbla*) ve Parazit (*Diplostomum* sp.) ile İlgili Genel Bilgiler

1.1.1. *Capoeta umbla*

Capoeta umbla (Heckel, 1843) parazit enfestasyonu ile karşı karşıya kalan balık türlerinden biridir. Bu balıklarda vücut yapısı az silindirik yapıda olup, biraz yanlardan basık ve küçük pullar ile kaplıdır. Küt burun yapısına sahip ve ağız büyük ve enine yarık şekillidir. Dudakları sert bir deri ile kaplıdır. Ağızın köşesinde bir çift küçük bıyık mevcuttur. Bıyık uzunluğu göz çapından kısadır. Dorsal yüzgecin serbest kenarı içe doğru eğilidir. Kuyruk yüzgeçleri normal şekilde çatallı ve yüzgeçlerin loplalarının kenarları sivri değildir. Renkleri sırt kısmında koyu esmerimsi, yanlarda sarı kahverengi, karın bölgesi ise genellikle kirli beyaz bir görünümlüdür (Şekil 1.1) (Ekingen ve Ebrucan, 1993; Geldiay ve Balık, 1996).

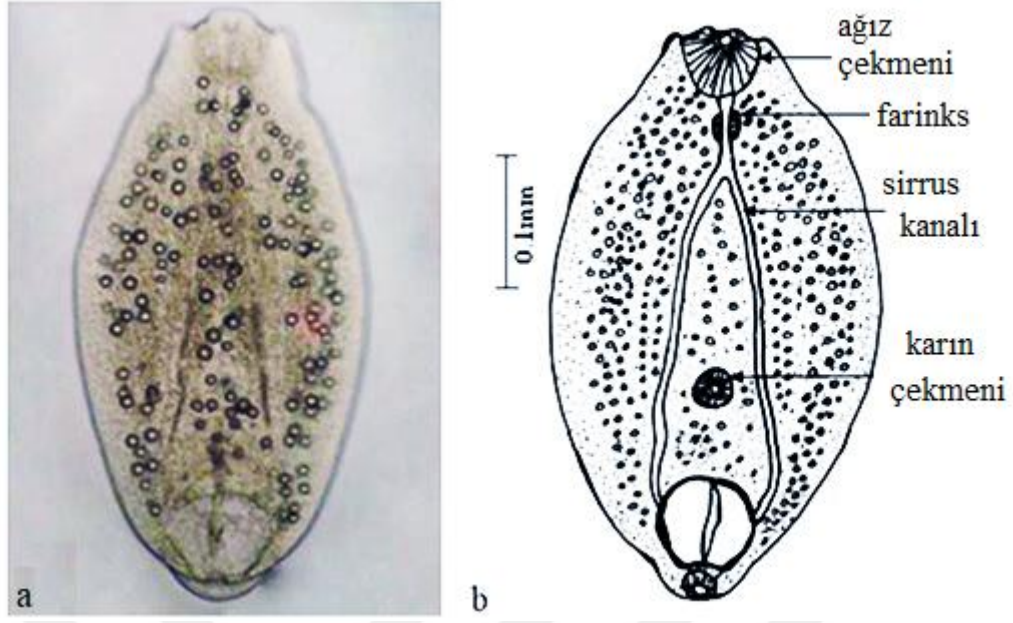


Şekil 1.1. *C. umbla*'nın genel görünüşü (URL-1, 2018)

1.1.2. *Diplostomum* sp.

- Alem** : Animalia
Şube : Platyhelminthes
Sınıf : Trematoda
Takım : Strgeatida
Aile : Diplostomatidae
Cins : *Diplostomum*
Tür : *Diplostomum* sp.

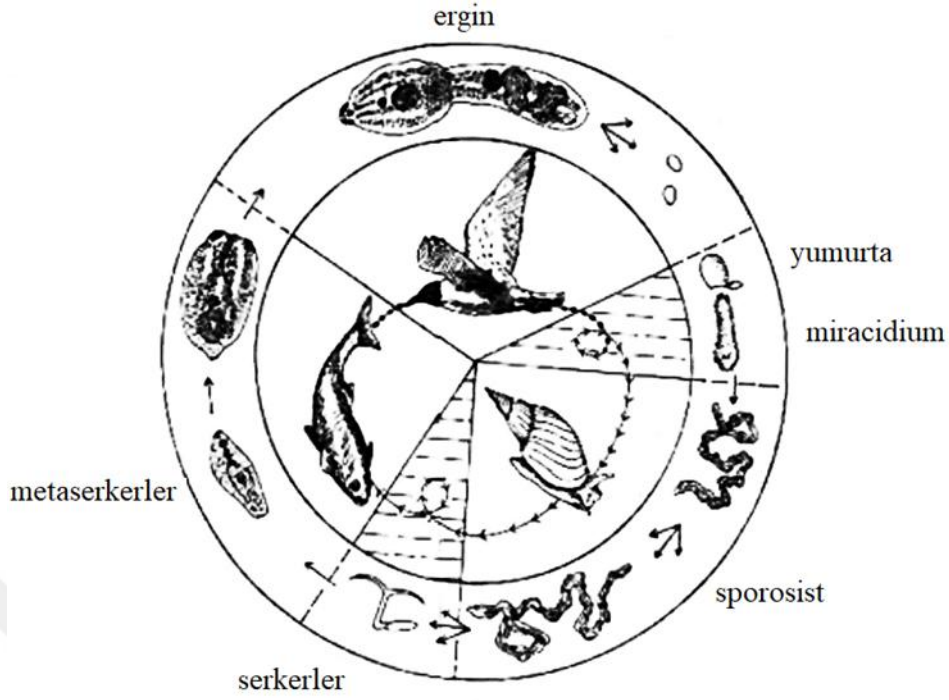
C. umbla'da görülen parazitlerin başında diplostomid trematodlar gelmekte ve bu parazitler digeneaların geniş ve farklı bir grubunu oluşturmaktadır. Diplostomid trematodlara dâhil *Diplostomum* türlerinin uzunluğu 220-300 µm, genişliği 220-280 µm olup oval görünümündedir (Şekil 1.2) (Akıncı, 1999).



Şekil 1.2. *Diplostomum* sp.'ye ait genel görünüş a) Mikrofotoğraf b) Kamera görüntüsü çizimi (Shwani ve Shamall, 2010)

Bu cinse bağlı larval trematodların vücudu yassı olup iki bölüme ayrılmıştır. Vücudun posteriorundaki gelişme daha azdır. Posterior vücut bölümünde, boşaltım tübüllerinden boşaltım ürünlerinin idrar kesesine açıldığı yerde boşaltım deliği vardır (Markevic, 1951; Bykhovskaya, 1964). Karın çekmeni ağız çekmenine göre daha büyüktür. Ağız çekmeninin yanında iki adet lateral çekmen bulunmaktadır. Düz boru şeklinde görülen bağırsakları, özefagusu takiben iki kola ayrılmış olup karın çekmeninin posterior hizasına kadar erişebilmektedir. Salgı bezleri, karın çekmeninin hemen önünde bulunmaktadır (Akıncı, 1999). Metaserkerleri 400 µm kadar büyüklükte olup balık gözünde beyaz nokta şeklinde hareketli yapılar olarak, dıştan bile fark edilebilmektedirler (Tiğın vd., 1992).

Diplostomum türlerinin konaktaki yerleşim yeri bağırsak (Martı, Charadriiformes takımındaki kuşlar) olup indirekt bir gelişim gösterirler. Ara konakları *Limnea stagnalis* ve *Fossaria* cinsine bağlı su sümüklüleri (ilk ara konak) ve balık (ikinci ara konak)'lardır. Gelişim evreleri; yumurta, miracidium, sporokist, redi, serker, metaserker, olgun parazit şeklindedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. *Diplostomum* sp.'nin hayat döngüsü (URL-2, 2018)

Diplostomum türleri ovipar olup bunların 0.1 x 0.006 mm ebatındaki yumurtaları, son konak su kuşlarının dışkılarıyla suya geçmektedir. Suda yumurtalardan miracidiumlar çıkmaktadır. Miracidiumların gelişme periyotları yaklaşık üç hafta olup, bu süreden sonra ilk ara konak su sümüklülerine tutunmaktadır (Tokşen vd, 1996; Erer, 2002). Bundan sonraki gelişim ara konak su sümüklüsünün bağırsağında olup, ana sporokistlerden birçok kız sporokist, bunlardan da ara konağın karaciğerinde redi ve 0.205 x 0.085 mm ebatındaki çatal kuyruklu serkerler oluşmaktadır. Su sümüklülerinden çıktıktan sonra, yumurtlamak için kıyıya gelen balıklara geçmektedirler. Balıklar, parazitin biyolojisinde ikinci ara konak olarak yer alırlar. Serkerlerin balıklara geçişi ya stiletleri yardımıyla balığın kaudal bölgesindeki yumuşak deriyi delerek olmakta ya da doğrudan balığın solungaçlarından nüfuz ederek olmaktadır. Serkerler genelde kan dolaşımı yoluyla gözlere ulaşmakta ve burada gelişerek metaserker formuna dönüşmektedir. Metaserkerlere, en yoğun görüldüğü gözler dışında, deri ve solungaçlarda da rastlanmaktadır. Olgun trematoda benzer şekilde ve hareketli olan metaserkerler, kistlenmemişlerdir (Markevic, 1951; Tiğın vd., 1992; Tokşen vd., 1996; Erer, 2002; Öge, 2005; Arda vd., 2005). Metaserkerlerle enfekte balıklar son konak su kuşları tarafından yenildiğinde, bu kuşların bağırsak kanalında *Diplostomum* türleri seksüel olgunluğa ulaşmaktadır (Markevic, 1951; Erer, 2002; Arda vd., 2005).

Seksüel olgunluğa ulaşan bu parazitin 2-3 mm uzunluğunda olduğu bildirilmiştir (Erer, 2002).

Diplostomum türlerinin larvaları, balığın gözünde dejenerasyonlara neden olmakta ve göz kurdu hastalığı olarak bilinen “Larval Göz Diplostomidosisi”ni oluşturmaktadır. Bu hastalığı oluşturan etkenler arasında; *Diplostomum spathaceum*, *D. baeri*, *D. indistintum*, *D. erythrophthalmi*, *D. mergi*, *D. paraspithaceum*, *D. commutatum*, *D. complanatum*, *Tylodelphys clavata*, *T. podicipana*, *Posthodiplostomum brevicaudatum* türleri bulunmaktadır. Tam gelişmiş olan metaserkerler, penetratif ve göç eden serkerlerden ve gelişmekte olan metaserkerlerden daha az zararlı olmaktadır. *Diplostomum* sp. metaserkerleri öncelikle göze sonra diğer vücut bölümlerine (yüzgeçler, deri gibi) yerleşmektedir. Ölü balıklarda metaserkerlere beyinde de rastlamak mümkündür. Balıkların gözünde bulunan bu metaserkerler, sayıca fazla olduklarında deriden giriş sırasında balığı öldürebildikleri gibi göz lekelenmesine, göz merceğinde opaklığa, ön göz kamarasında sulu eksudant toplanmasından dolayı korneanın şişmesine (keratoglobus), göz merceğinin bulanıklığına (parazitik katarakt), intraoküler basınç artışına, ekzoftalmusa, korneada yırtılmaya ve sonuçta balığın kör olmasına neden olabilmektedir. Kataraktlı balıkların lensleri kirli süt rengindedir ve deforme olmuştur. Kör olan balıklar, yemi göremediklerinden dolayı beslenemeyip, zayıflamaya başlamakta, yüzme bozukluğundan dolayı da su kuşlarına kolaylıkla yem olmaktadırlar. *Diplostomum* sp. metaserkerlerinin oluşturduğu enfeksiyonda, balığın başında kanlı odaklar vardır. Özellikle solungaçlar kanla örtülmüş ve kırmızıdır. Bu haldeki 5 cm’den küçük balıklar, 15-30 dakika içinde ölmektedir. Ölümler, bronşiyel damarlardaki dejenerasyonun yol açtığı asfeksi ve perikardiumdaki anjioreksiden dolayı görülmektedir (Markevic, 1951; Bykhovskaya, 1964; Tiğın vd., 1992; Tokşen vd., 1996; Öge, 1999; Erer, 2002; Arda vd., 2005).

1.2. Moleküler Yöntemler ile İlgili Genel Bilgiler

Tatlı su balıklarının gözlerindeki metaserkerler; şiddetli enfeksiyonlarla doğal yaşamda ve kültür çiftliklerinde önemli kayıplar verdiğinden dolayı önemli patojen olarak kabul edilmektedir. Bu durum bir çok ülkede bu parazitin larval safhası üzerine önemli saha ve deneysel çalışmalara neden olmuştur (Chappell vd., 1994; Georgieva vd., 2013). Çünkü henüz tanımlanmamış türler, larval dönemin basit morfolojisi ve farklı yaşam

döngüsünün farklı dönemleri taksonomik olarak ayrı ayrı incelendiği için *Diplostomum* cinsinin taksonomisi hala tartışmalı durumdadır (Georgieva vd., 2013).

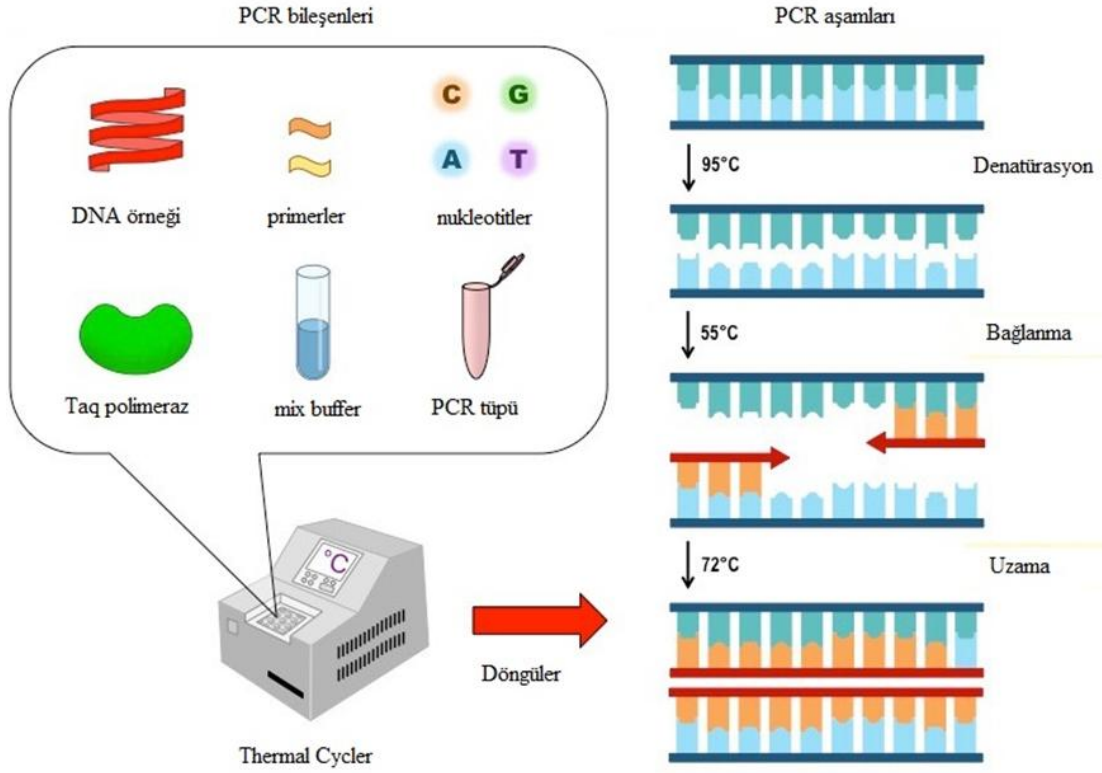
Türleri sınırlayarak kesin tür teşhislerini kolaylaştırmak, sorunlu taksonların teşhisi, henüz tanımlanmamış türlerin keşfi dâhil moleküler verilerden oldukça fazla faydalanılır. DNA temelli yaklaşımlar konakçı-parazit ilişkilerinde ve yaşam döngüsü çalışmalarına hızlı bir ivme kazandırabilir. Bu nedenle karmaşık yaşam döngüleri gösteren trematodlar için erişkin dönemlerin sekansları larval dönemin teşhisinde doğrudan ve etkili bir araç olarak kullanılabilir ve böylece bütün yaşam döngüsü hakkında çıkarım yapılabilir (Georgieva vd., 2013).

Türlerin doğru tanımı, parazitlerle mücadelede de etkin bir stratejinin geliştirilmesine imkân sağlamaktadır. Türlerin tanımlanmasına yönelik çok sayıda yöntem bilinmektedir. DNA temelli yöntemler bunların başında gelmektedir ve en önemli avantajları, DNA molekülünün daha az bozulması ve yumurtadan ergine tüm yaşam evrelerinde elde edilebilir olmasıdır. Ayrıca bu yöntemlerle eş mutasyonlar tespit edilebilir ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak, analizler çok küçük miktarlarda doku örnekleri ile gerçekleştirilebilmektedir. En önemlisi de DNA dizisi verilerinin ve bu verilerin analizlerinin, kolaylıkla farklı laboratuvarlarda tekrarlanabilir bir nitelik taşımasıdır (Keskin, 2013).

DNA temelli çalışmaların ana basamağını PCR yöntemi oluşturmaktadır. PCR bir DNA molekülünün seçilen bir bölgesinin tekrarlanan kopyalaması ile sonuçlanır. PCR deney tüpü reaksiyonudur ve canlı hücrelerin kullanımını içermez; kopyalama hücresel enzimlerle değil *Thermus aquaticus*'dan saflaştırılmış ısıya dayanıklı DNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Bir PCR deneyi gerçekleştirmek için hedef DNA, Taq DNA polimeraz, bir oligonukleotit primer çifti ve nükleotitlerin stoğu ile karıştırılır. Hedef DNA'nın miktarı çok az olabilir, çünkü PCR olağanüstü hassastır ve sadece tek bir başlangıç molekülüyle çalışır. Primerlere, taq polimeraz tarafından gerçekleştirilecek DNA sentez reaksiyonlarının başlaması için ihtiyaç duyulur. Kopyalanacak parçanın her iki ucuna hedef DNA'da bağlanmalıdır; bu sebeple de bu bağlanma bölgelerinin dizisi uygun primer dizilerinin sentezlenebilmesi için bilinmelidir (Brown, 2015).

Reaksiyon, karışımın 94 °C'ye ısıtılmasıyla başlatılır. Bu sıcaklıkta çift sarmalın iki polinukleotidini bir arada tutan hidrojen bağları kırılarak, böylelikle hedef DNA'nın, tek iplikli moleküllere denatüre olması sağlanır. Ardından sıcaklık, tek iplikli hedef DNA'nın tek ipliklerinin bir kısmının birleşmesinin gerçekleştiği 50°C-60°C'ye düşürülür. Bu

noktada artık DNA sentezi başlayabilir bu nedenle sıcaklık Taq polimeraz için optimum olan 72°C'ye yükseltilir. PCR'in bu ilk aşamasında hedef DNA'nın her ipliğinden "uzun" ürünlerin bir dizisi sentezlenir (Şekil 1.4).

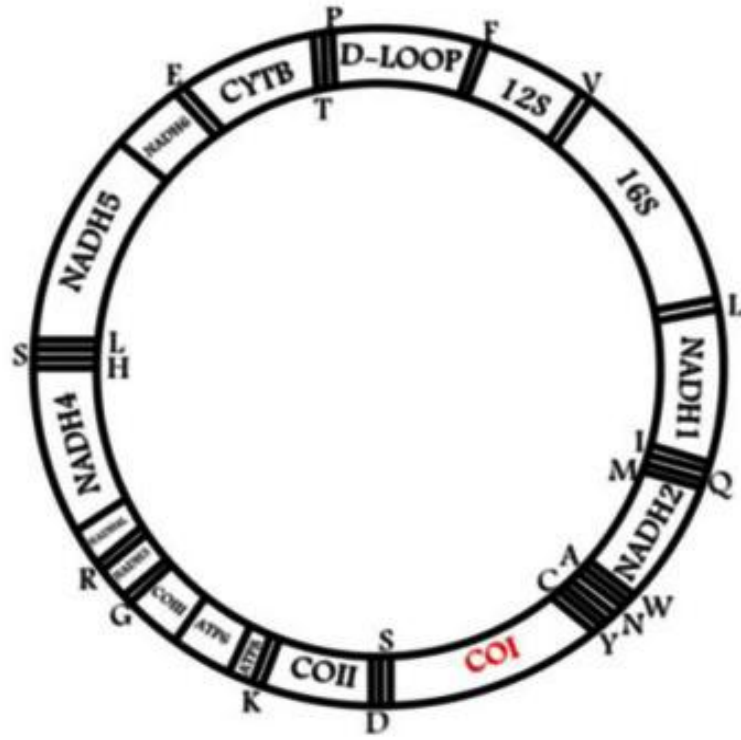


Şekil 1.4. PCR basamakları (URL-3, 2018)

Bu polinukleotitler özdeş 5' uçlara ve şansa bağlı olarak DNA sentezinin sonlandığı pozisyonları gösteren rastgele 3' uçlara sahiptir. Denatürasyon-bağlanma-uzama döngüsü tekrarlandığı zaman 5' ve 3' uçlarının her ikisinin primer bağlanma pozisyonlarınınca belirlendiği kısa ürünler veren uzun ürünler yeni DNA sentezi için kalıp olarak iş görürler. Bu şekilde çok sayıda kopya elde edilen ürünler genellikle agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir ve hedef DNA tek bir bant olarak görülür (Brown, 2015).

PCR çalışmalarında kullanılan başlıca genetik belirteç sistemleri; a) mtDNA (Mitokondriyal DNA) b) PCR-RFLP (Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi) c) RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) d) SSR (Basit Tekrar Dizileri) e) AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm) f) SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) g) ISSR (Basit İç Dizi Tekrarları) h) SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmleri) gibi sistemlerdir.

a) mtDNA (Mitokondriyal DNA): Ökaryotların çoğunda mtDNA çift iplikli, kapalı halkasal yapıda bulunur. Mitokondri DNA'sının %90'ından fazlası kodlama yapan bölgedir yani intron içermez. Büyüklükleri organizmalar arasında farklılık göstermekle beraber hayvan mtDNA'sı 15-29 kb uzunluğunda olup, 22 tRNA, 2 rRNA ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan ve 13 mRNA'yı kodlayan protein olmak üzere toplam 37 genden oluşan bir moleküldür. Protein genleri; sitokrom b, 7 NADH dehidrogenaz altbirimi, 3 sitokrom c oksidaz alt birimi ve 2 ATPaz alt biriminden oluşur (Şekil 1.5). Mitokondriyal DNA haploittir ve maternal kalıtılır. Hayvan mtDNA'sı yüksek derecede korunmuş gen içeriği ve düzenine sahip olup rekombinasyon göstermez ve intron içermez (Boore, 1999). Mitokondriyal DNA'nın etkili bir tamir mekanizmasından yoksun olması, histon gibi koruyucu proteinlerin görülmemesi, iç mitokondriyal membranda meydana gelen oksidatif fosforilasyon ile açığa çıkan ve oldukça yüksek mutajenik etkiye sahip oksijen radikalleriyle fiziksel ilişki içerisinde bulunması (Richter, 1988), ayrıca mevcut mutant mitokondrinin etkisi ile mtDNA mutasyon hızının artması (Lightowers ve ark., 1997) gibi nedenler, mtDNA'da meydana gelen polimorfizmin nükleer DNA'dan daha yüksek oranda görülmesine neden olur. Ayrıca, mtDNA'nın nükleer DNA'ya göre oksijen radikallerine daha fazla maruz kalması ve koruyucu mekanizmalarının bulunmaması nedeniyle mtDNA mutasyonlara daha açıktır. Nükleer DNA'ya göre daha fazla mutasyona uğrayan mtDNA mutasyonlarının hızı 1 milyon yıllık süreçte ortalama % 2-4 oranındadır. Bununla birlikte nükleer genin her yeni nesilde farklı rekombinasyon göstermesi taksonomik ve populasyon çalışmalarında zorluklar oluştururken, mtDNA'nın homoplazmik oluşu kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Seyhan, 2013).



Şekil 1.5. Mitokondri DNA'sının genel görünüşü (Keskin, 2013)

b) PCR-RFLP (Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi): Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi, dizisi bilinen genlerin allelik varyantlarının varlığını tespit etmek için nükleik asitleri incelemek amacıyla en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Gen ürünleri olan proteinler, genin farklı allelik yönlerini yansıttığı için bu türden polimorfizmlerin tespit edilmesi tür içi ya da türler arası varyasyonu moleküler düzeyde tanımlamak açısından önemlidir. Bu polimorfizmler DNA dizisinde restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini ortadan kaldırarak ya da yeni bir kesim bölgesi oluşturarak allelik varyasyonlara sebep olmaktadır. Hedef DNA dizisinin uygun restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucunda ortaya çıkan fragment büyüklükleri varyasyonlar hakkında bilgi vermektedir. RFLP yönteminde fazla miktarda DNA bulundurulması gerekliliği başta olmak üzere birçok dezavantajını ortadan kaldırmak için PCR-RFLP yöntemi geliştirilmiştir. RFLP yöntemiyle PCR işleminin kombine edilmiş halidir. PCR-RFLP yöntemi, DNA üzerinde polimorfik bölgenin önce PCR ile çoğaltılıp sonra RFLP yöntemi ve jel elektroforezi ile ayrılmasıdır (Toparlan, 2015). Bu yöntemde çok miktarda DNA bulundurma zorunluluğu ortadan kaldırılmıştır. Az miktarda DNA'yı PCR ile

çoğaltmak ve restriksiyon enzimleriyle kesmek RFLP yönteminin dezavantajlarının giderilmesine yardımcı olmuştur (Primrose ve Twyman, 2006).

c) RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA): RAPD sentetik primerlerin yardımıyla yapılan rastgele DNA parçası çoğaltımına dayanan bir yöntemdir. RAPD işaretleyicileri genelde 10 baz çifti uzunluğundadır. Kullanılan primerler hem ön hem de ters primer rolünü üstlenmektedir. Çoğaltılan DNA parçacıkları genellikle 0.5-5 kb arasında bir büyüklüğe sahiplerdir (Pareek vd., 2017; Thakar vd., 2017; Aygün, 2017). Elde edilen çoğaltılmış PCR ürünleri standart jel elektroforezinde yürütülür ve PCR ürünlerinin verdikleri bantlar gözlemlenerek ağırlıklarına göre değerlendirilir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar analiz edilir (Williams vd., 1990, Bozari 2012, Topdemir, 2017). Primerlerin bağlanma bölgelerinin çeşitli oluşu ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçacıklarından dolayı polimorfizm ortaya çıkmaktadır (Aygün, 2017). Maliyeti ucuz, birden fazla bant üretebilen, kısa zamanda yapılabilen ve ön bilgi gerektirmeyen bir tekniktir (Topdemir, 2017).

d) SSR (Basit Tekrar Dizileri): DNA dizilerinde tekrar edilen en küçük birimlerdir ve tekrar dizileri 1–6 bç arasında değişmektedir. Mikrosatellitleri çevreleyen bölgelerin dizileri (flanking region) biliniyorsa o bölgelere uygun primerler tasarlanarak genellikle 20–25 bç uzunluğundaki dizilerin PCR ile çoğaltımı gerçekleştirilebilmektedir. DNA replikasyonu sırasında meydana gelen dizi atlama, yanlış baz eşleşmeleri ve eşit olmayan krossing-over olayları mikrosatellit sayılarının farklılığını oluşturmaktadır. Bu farklılıklar ise jel elektroforeziyle belirlenmektedir (Matsuoka vd., 2002). Mikrosatellit belirteçler, az DNA gerektirmesi, kodominant ve kararlı markör sistem olması, genomda bol ve dağınık bulunması, tekrarlanabilir olması, yüksek polimorfizm göstermesi, bilgilendirici bir markör sistemi oluşundan dolayı popülasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında sıklıkla kullanılabilir (Powell vd.,1996). Bu belirteç sisteminin dezavantajı ise mikrosatellit bölgelerinin mutasyon oranlarının yüksek olması nedeniyle primer bağlanma bölgelerinin değişmesine bağlı olarak anlamsız allellerin oluşmasına imkân sağlamaktadır. Bu da genotip ve allel frekanslarının doğru yorumlanmasını sınırlayabileceğinden bazı tartışmalara yol açmaktadır (Freudenreich vd., 1997; Filiz ve Koç, 2011).

e) AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm): AFLP çoklu lokus (multi-locus) DNA parmak izi analizidir. RFLP ve RAPD tekniklerinin birlikte geliştirilip değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. RFLP gibi enzim kesim bölgesindeki indelilere ve baz değişimini, RAPD'de olduğu gibi PCR primer bağlanma bölgesindeki baz

değişimine dayalı olarak polimorfizmi tespit eder. AFLP'nin farklılığı dizisi bilinen adaptörlerin enzim kesimlemesi yapılan toplam genomik DNA'ya bağlanmasıdır. AFLP restriksiyon enzimleri ile kesilen genomik DNA fragmentlerinin seçici PCR amplifikasyonuna dayalı olarak polimorfizm tespiti yapar. AFLP sırasıyla toplam genomik DNA'nın iki enzim karışımı ile kesilmesi, enzimle kesilen DNA fragmentlerine adaptörlerinin bağlanması, ilk seçici PCR'ın yapılması (restriksiyon fragmentlerinin çoğaltılması), işaretli primerler ile seçici PCR'ın iki seçici baz eklenerek yapılması, AFLP fragmentleri agaroz jel, poliakrilamid jel (PAGE) ve otomasyona dayalı (florasan deteksiyon sistemi) ile amplifiye fragmentlerin analizinin yapılması işlemlerini kapsamaktadır (Göl, 2015). Yüksek orandaki tekrarlanabilir özelliği ve polimorfik bant sayısı, DNA kaynağından bağımsız olarak genomun tamamındaki polimorfizmlerin belirlenmesinde hızlı bir yöntem olması, ön dizi bilgisi gerektirmemesi, tür içi ve türler arası akrabalıkların belirlenmesinde, kültürvarlar arası varyasyon veya akrabalık derecelerinin değerlendirilmesinde etkin olmasından dolayı genetik çeşitlilik çalışmalarında önemli sayılmaktadır (Filiz ve Koç, 2011).

f) SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi): SSCP, PCR ürünlerinin denatüre edilmesi ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezine uygulanması esasına dayanır. Bu durumda DNA'nın tek zinciri nükleotid içeriğine bağlı olarak sulu ortamda yeni bir konformasyona sahip olur. Bu konformasyon, esas olarak zincir içi baz çiftleşmelerine bağlı olarak oluşan ikincil yapıdır. Dizideki herhangi bir baz değişikliği bu konformasyonda değişikliğe neden olabilir. Çoğu konformasyonlar, mutant dizi ile aynı yüke sahip olsa bile fiziksel şekil veya büyüklüğü yeterince değiştirirler ve akrilamid gibi bir matriks ile yapılan elektroforezde hareket farklılığına neden olurlar. Elektroforezdeki farklı hareket tek zincirli DNA parçalarının ikincil yapılarında değişiklik şekillerin oluşumuna bağlıdır. SSCP çalışmalarında DNA parçasının uzunluğu, elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, PCR denatürasyon yöntemi, jelin özellikleri (jel matriksi, iyon konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı) ile mutasyonun tipi ve bulunduğu yer gibi faktörler önemli rol oynamaktadır (Özkara, 2003).

g) ISSR (Basit İç Dizi Tekrarları): ISSR ikili, üçlü, dörtlü ve beşli tekrarlanan nükleotitlere sahip primerlerin kullanıldığı ve bu primerlerle iki mikrosatellit arası bölgenin çoğaltılabildiği bir tekniktir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir. Kullanılan primerlerle genomik lokuslar farklı bant büyüklüklerinde çoğaltılmakta, primerler genelde 3' veya 5'

uçlarının sonlarındaki mikrosatellit bölgelerine uzanan 1-4 dejenere nükleotit içermekte ve uzunlukları 15-30 nükleotit arasında değişmektedir. Primerlerdeki GC oranının fazla olması bağlanma sıcaklığının yüksek olmasına yol açarken buna karşılık kararlı bağlanmayı sağlar ve bu nedenle her bir primerin DNA'ya yapışma sıcaklığı içeriğindeki baz kompozisyonuna göre belirlenir. Çoğaltılmış ürünler genelde 200–2000 bp arası uzunluktadır. ISSR, dominant bir belirteçtir ve dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilirliği en önemli avantajıdır. Yüksek polimorfizm ve üretkenlik göstermesi ISSR analizlerini genetik benzerlik, gen haritalama ve taksonomi çalışmalarında uygulanabilirliğini artırmaktadır. Bu belirteç sisteminde de RAPD belirteç sisteminde olduğu gibi tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve benzer büyüklükteki parçacıkların homolog olmaması gibi dezavantajları vardır (Filiz ve Koç 2011).

h) SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmleri): SNP'ler genomda tek bir nükleotid değiştiğinde açığa çıkan DNA dizi varyasyonlarıdır. Bu nokta değişikliklerini tespit eden yöntemler, bir veya birkaç bazlık küçük insersiyon ya da delesyonları da saptayabilir. SNP iki şekilde oluşabilir. Birincisi bir pürin bazın (A,G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazın (C,T) diğer pirimidin bazına değişmesi (tranzisyon), diğeri ise bir pürin bazının bir pirimidin bazına veya pirimidinin purine değişimidir (transversiyon) (Bülbül, 2014). SNP oluşumları genelde kodlama yapmayan DNA bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir. Kodlama yapan bölgelerde meydana gelirse aminoasit dizisinin değişimine neden olabileceği gibi aminoasit dizisinde herhangi bir değişikliği neden olmayabilir ve gen ürününde de değişiklik olmaz. SNP temelli genotip karakterizasyonunda kullanılan DNA çipleri ve allel-spesifik PCR, fazla ürün elde edilmesi ve otomasyona uygunluğu açısından dikkat çekmektedir (Filiz ve Koç 2011).

PCR temelli yöntemlerin örnekleri sayıca artırılabilir. Ancak genetik karakterizasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan mitokondriyal DNA, RFLP, SSR ve AFLP gibi yöntemler birbirleriyle karşılaştırılacak olursa; mitokondriyal DNA'nın RFLP yöntemi ile analizindeki en önemli avantaj, incelenen genetik lokuslardaki homozigotluk ve heterozigotluk değerleri ile allel/genotip frekanslarının belirlenebilmesi ve daha geleneksel olan Hardy-Weinberg analizleri ile uyumlu olmasıdır. RAPD, SSR ve AFLP gibi teknikler kullanılarak da çok sayıda hem monomorfik hem de polimorfik olarak oluşturulan genetik belirteçler, tüm genomu kapsayacak kapasiteye ulaşmakta ve çevresel yanıt genleri ile kuvvetli bir bağlantı (linkaj) kurulmasını olanaklı hale getirmektedir. RAPD analizleri göreceli olarak daha ekonomik olup, genomik DNA'nın birkaç yüz ile 1.500 baz çiftini

kapsayan DNA belirteçleri ile sonuç verebilmektedir. Minisatellit ve mikrosatellit SSR belirteçleri, tekrarlanan satellit dizilerinin klonlanması ve dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi için kısa tri, tetra, penta gibi oligonükleotidlerin sentezine ihtiyaç duyduğundan çok fazla zaman isteyen bir yöntem olarak bilinmektedir. AFLP belirteçleri hem dominant hem kodominant olarak bulunur ve RAPD ile SSR'a göre genom başına on kat daha fazla sayıda potansiyel belirteç oluşturma kapasitesine sahiptir. Gerek RAPD gerekse AFLP ampliconları kullanılarak bireylerin populasyon içi-populasyonlar arası genetik karşılaştırmaları ve çevresel yanıt genlerinin kalıtımının tespit edilerek izlenmesi gerçekleştirilebilir (Keskin, 2013).

1.3. Mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz Geni (COI)

Mitokondriler ökaryot hücrelerde metabolik enerjinin üretiminde kritik bir role sahiptir. Lipid ve karbonhidratların yıkımından elde edilen ve oksidatif fosforilasyon işlemiyle ATP'ye dönüştürülen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludurlar. Mitokondri proteinlerinin çoğu serbest sitozolik ribozomlarda sentezlendikten sonra, hedeflenen özel sinyaller aracılığıyla organelle alınırlar. Ayrıca mitokondri, sitoplazmik organeller arasında, tRNA'ları, rRNA'ları ve bazı mitokondriyal proteinleri kodlayan kendine ait bir DNA'ya sahip olmasıyla diğer organellerden ayrılır. Mitokondrilerin yaplanması, nükleer genom tarafından kodlanan ve sitozolden alınan proteinlerle birlikte, kendi genomları tarafından kodlanan ve organel içinde sentezlenen proteinleri de gerektirir (Cooper, 1997).

Her mitokondri birçok mtDNA kopyasına sahiptir ve bir hücrede yüzlerce mtDNA kopyası vardır (poliplasmi). mtDNA yapısındaki enzimlerin replikasyonu, transkripsiyonu, translasyonu ve onarımı için nükleer genlere bağımlıdır. Mitokondri bu organelde meydana gelen metabolik yolda rol alan tüm diğer proteinler için nükleer genoma bağımlıdır. Nükleer DNA molekülünden bağımsız olarak çoğalan mtDNA molekülünün bu özelliği nedeniyle hücre bölünmesi sırasında heteroplazmik bir açılma meydana gelebilmektedir. Heteroplazmi, bir hücrede iki ya da daha fazla kökene ait (normal ve mutant) farklı mtDNA molekülünün aynı anda bulunması olarak ifade edilmektedir. Bunun dışında; nükleotid eksilmesi (deletion), nükleotid ilave edilmesi (insertion), nükleotid dönüşümleri (substitution), belirli gen bölgelerinde DNA parçalarının farklı uzunluklarda olması ve herhangi bir lokustaki nükleotid dizilimlerinde gözlenen çeşitli değişimler mtDNA

molekülünde meydana gelen genetik varyasyonun temel kaynaklarını oluşturmaktadır. mtDNA mutasyonlar, nokta mutasyonları ve yeniden düzenlenmeleri (delesyon ve duplikasyon) içermektedir. Nokta mutasyonları genellikle maternal geçişlidir; delesyon ve duplikasyonlar ise seyrek görülür (Ünal, 2016).

COI gen bölgesinin, metazoan mitokondriyal genomu bakımından tür içerisinde %3'ten küçük, türler arasında ise ortalama %10-25 arasında belirgin bir farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Günümüzde metazoan türler için kullanılan standart barkodun tanımı, COI geninin 5' ucundan 652-658 baz çiftlik bölgesi olarak ifade edilmektedir. Metazoan türler için intronların bulunmaması, rekombinasyona sınırlı şekilde maruz kalması, tüm hücrelerde yüksek kopya sayısı, haploit özellikte olması ve maternal bir kalıtıma sahip olması COI geninin genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanılabilirliğini artırmaktadır. Geçmişte yapılan birçok sistematik analiz çalışmasında kullanılan 12S rRNA ve 16S rRNA genleri, göstermiş oldukları yüksek insersiyon ve delesyon frekansı nedeniyle elde edilen dizilerin hizalanmasında ve karşılaştırılmasında büyük zorluklara neden olmuştur. Metazoan türlerin mitokondriyal genomlarında bulunan 13 protein kodlayan gen genellikle bu insersiyon ve delesyonları içermektedir. Bununla birlikte COI geninin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğü metazoan türler için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesi ve birçok farklı taksonomik seviyede kullanılabilir olmasıdır. COI geninde bulunan kodonların üçüncü pozisyondaki nükleotidleri yüksek oranda substitüsyon göstermekte ve böylece mitokondriyal rRNA genlerine oranla üç kat daha yüksek mutasyon hızına sahip olarak değerlendirilmekteledir. Coğrafik yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek özellikte olması farklı türlerin, türler arası ve tür içi varyasyonların araştırıldığı çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Keskin, 2013).

1.4. Kaynak Özetleri

İnsanların dengeli bir şekilde beslenebilmeleri için yeterli düzeyde hayvansal proteine ihtiyaç vardır. Bu hayvansal protein açığının gelecekte su ürünleri ile karşılanabileceği kabul edilmektedir. Su ürünleri ve özellikle de balık protein bakımından zengin bir gıda olması nedeniyle insanlar için önem taşımaktadır (Ekingen, 1983; Dick ve Choudhury, 1995).

Besin bileşenlerinin incelenmesi ve besin maddelerinin sağlığımız üzerindeki etkisinin bilinmesi ile bugün balık, önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Dünyanın pek çok ülkesinde insanlarda hastalık sonucu ölüm nedenlerinin başında, kalp damar hastalıkları, yüksek tansiyon, şeker ve kolesterol gelmektedir. Bu hastalıkların temelinde kalıtsal faktörlerin dışında, beslenme rejimi de çok önemli yer tutmaktadır. Balık etinin bu hastalıklardaki koruyucu rolü uzun bir süreden beri incelenmekte olup bu konuda olumlu sonuçlar alınmıştır (Turan vd., 2006).

Balıkçılık sektörü insanların hayvansal protein ihtiyacını karşılamasının yanı sıra, ülke ekonomisine yaptığı katkıyla da önemli bir ihraç kalemini oluşturmaktadır. Ancak balıkçılık sektöründe ürün kaybının en aza indirilmesi için, hastalık yapıcı etkenlerin bilinmesi ve mücadele çalışmalarının yapılması gerekmektedir (Öge, 1999).

Parazitler insan sağlığını, hem hastalıklara neden olarak doğrudan hem de insanlar için önemli besin kaynağı olan hayvanlarda verim kayıplarına yol açarak dolaylı olarak etkiler. Moleküler biyolojide ve parazitolojide son 20 yılda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmelerle birlikte, paraziter hastalıkların kontrolü için yeni yaklaşımların ortaya konmasını sağlamıştır (Gasser, 2006; Aktaş ve Dumanlı, 2009; Bişkin vd., 2011). Geleneksel yöntemlerle parazitlerin ayrımı ve tanımlanmaları; genellikle morfolojik yapılarına, konak spesifitelerine, taşınma şekillerine, patolojik etkilerine ve coğrafik orijinlerine göre yapılmaktadır. Ancak bu özellikler, parazitleri tür düzeyinde ayırmada çoğunlukla yetersiz kalmaktadır (Aktaş ve Dumanlı, 2009; Bişkin vd., 2011). Moleküler parazitolojideki gelişmeler, özellikle nükleik asit tabanlı teknikler, özgülüğü ve duyarlılığı artıran güçlü alternatif tanı araçları sunmuştur. Bu teknikler, parazitolojide tanı, tedavi, genetik tiplendirme, sistematik (taksonomi ve filogeni), populasyon genetiği, ekoloji, epidemiyoloji, antiparazitik ilaç ve aşı geliştirilmesi, ilaç direncinin anlaşılması ve parazit genom çalışmaları gibi konularda uygulama alanı bulmuştur (Gasser, 2006; Hodgkinson, 2006; Aktaş ve Dumanlı, 2009; Bişkin vd., 2011).

Tatlı su balıklarının gözlerindeki metaserkeryalar; şiddetli enfeksiyonlarda doğal yaşamda ve kültür çiftliklerinde önemli kayıplar verdiği için önemli patojen olarak kabul edilmektedir. Bu durum Avrupa'da larval dönem üzerine önemli saha ve deneysel çalışmalara neden olmuştur (Chappell vd., 1994; Georgieva vd., 2013). Çünkü henüz tanımlanmamış türler, larval dönemin basit morfolojisi ve farklı yaşam döngüsünün farklı dönemleri taksonomik olarak ayrı ayrı incelendiği için Diplostomum cinsinin taksonomisi hala tartışmalı durumdadır (Georgieva vd., 2013).

Teşhis ve taksonomik problemlerin kombinasyonu balık yiyen kuşlarda tanımlanan ve kaydedilen *Diplostomum* sp. türlerin fazla sayıda olması fakat ara konakçı balık ve salyangozlarda tür farklılığının daha az olması sorununu açığa çıkarmıştır. Bu durum Çek Cumhuriyeti ve Slovakya'dan elde edilen son verilerde balık, kuş ve salyangozlar için 9:3:2 tür oranının elde edilmesine neden olmuştur (Faltinková, 2005; Georgieva vd., 2013).

Hoffman (1967)'in Kuzey Amerika tatlı su balıklarının parazitleri kitabında *Diplostomum*'un bilinen türleri içerisinde *Bolbophorus confusus*, *Diplostomum corti*, *D. baeri eucaliae*, *D. emarginatae*, *D. flexicaudum*, *D. huronense*, *D. ictaluri*, *D. scheuringi*, *D. spathaceum*, *Hysteromorpha triloba* 'ya yer vermiştir. *Diplostomum* cinsi muhtemelen 27 türü kapsamaktadır (Chappell vd., 1994). Shigin'e ithafen Georgieva (2013), özellikle Avrupa'da 41 *Diplostomum* türü olduğunu, bunlardan 25 tanesinin yapılan son taksonomik çalışmalarda mevcut olduğunu bildirmiştir. Désilets ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları *Diplostomum* türleri üzerine olan çalışmalarında 5 farklı tür bulmuşlardır. Blasco-Costa ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları İzlanda'da *Diplostomum*'un henüz bilinmeyen tür çeşitliliği çalışmasında 17 tür bulmuşlardır. Faltinková ve arkadaşları (2014) İzlanda'da yaptıkları çalışmada 6 *Diplostomum* türünü moleküler yöntemler kullanarak teşhisini yapmışlardır. Locke ve arkadaşları (2015) DNA barkodlama yöntemi kullanarak 52 *Diplostomum* türünü bulmuşlardır.

Salyangozlarda kaydedilen düşük tür zenginliği veri eksikliğini yansıtırken balıklardaki *Diplostomum* enfeksiyonuna dair pek çok kayıt *Diplostomum spathaceum* türünün konak ve uzaysal dağılımı tahminlerden fazla olduğu ve tür farklılığının büyük çoğunluğunun teşhis hataları yüzünden olduğunu göstermektedir (*Diplostomum*'un 51 konakçıda teşhis edilmeyen 108 kayıt mevcut). Metaserkerlerin tür teşhisindeki problemler doğası, metaserkerlerin doğal balık popülasyonunda gerçek rollerinin değerlendirilmesinde büyük bir engel oluşturmaktadır. *Diplostomum* sp.'ye ait konak-parazit ilişkilerinin parazit biyolojisi ve evrimsel açıdan bilgilerin ilerlemesine temel bir engel oluşturmaktadır (Georgieva vd., 2013).

Selver (2008)'e göre, *Diplostomum* metaserkerlerinden dolayı *Acerina cernua*'da kitle halinde balık ölümleri kaydedilirken; *O. mykiss*'in gözünde ise %80-100 arasında dejenerasyon belirlenmiş ve bu dejenerasyonun özellikle göz lensinde, nadiren de vitröz humor ve gözün ön odalarında olduğu belirtilmiştir. *D. spathaceum* serkerlerinin neden olduğu Cercarial Diplostomiasis genç balıklar arasında konak türü, yaş ve balık başına serker sayısına göre mortaliteye neden olmaktadır. Serkerlerin göçü sazan türlerinde beyin,

göz fundusu ve kardiyak bölgede kanamaya yol açabilmektedir (Selver, 2008).

Diplostomum cinsi içindeki genotipik ve fenotipik karmaşıklığın daha iyi anlaşılması için kullanılabilir en kullanışlı gen bölgesi mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz I (mtCOI)'dir. mtCOI geni (ilk 650 nükleotit) hayvan taksonlarının geniş dizilerinin teşhisi ve henüz tanımlanmamış tür çeşitliliğinin tanınması için uygunluk sağlar (Georgieva vd., 2013).

mtCOI geninin geniş bir taksonomik aralık boyunca türlerin teşhisi için kullanılabilirliğine dair yeterli kanıtlar mevcuttur. Digenea'lerin ayrılması çalışmalarında mtCOI sekanslarının diğer DNA gen bölgelerinden daha doğru sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Barkodlama yapmanın prensipteki avantajı standart markır kullanımı ile sekans verilerinin çalışmalar arasında kıyaslanabilirliği sağlamasıdır (Moszczyńska vd., 2009).

Locke ve arkadaşlarının (2010) tatlı sularda *Diplostomum* sp.'nin mtCOI gen bölgesi kullanarak yaptıkları tür çeşitliliği çalışmasında elde edilen sonucu rDNA'nın ITS bölgesiyle karşılaştırarak doğrulamışlardır. Ayrıca önemli ve taksonomik olarak zor patojenleri ortaya koymaya yönelik COI sekanslarının yaygın olarak kullanılan ITS markırlarından daha üstün olduğunu öne sürmüşlerdir. Mwita (2011) Viktorya Gölü Clarrid balıklarının konakçı parazit ilişkilerine ve parazit faunaları çalışmasında Cytochrome b ve 18S rDNA fragmentlerini kullanmıştır. Šimková ve arkadaşlarının (2012) çalışmalarında Güney Fransa'da iki Cyprinid türde bulunan parazit kompozisyonu incelenmiş olup, bulunan bütün türler için mitokondriyal sitokrom b geni kullanılıp moleküler teşhis yapılarak karşılaştırmalı olarak parazit yoğunlukları belirlenmiştir. Chibwana ve arkadaşlarının (2013) *Clarias gariepinus*'de beyin parazitleri üzerine yaptıkları çalışmada mtDNA'nın COI ve rRNA'nın ITS1 -5.8S-ITS2 gen bölgelerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *Clarias gariepinus*'de bulunan "*Tylodelphys* ve *Diplostomum*" olmak üzere iki cinsin de tür sınıflandırılmasını yaparak aralarındaki bağlantıyı çözmüşlerdir. Désilets ve arkadaşlarının (2013) *Diplostomum* sp.'nin topluluk yapısının ana belirleyicileri ve potansiyel türler arası etkileşimleri çalışmalarında mtCOI gen bölgesi kullanılmıştır. Yapılmış olan çalışmada beş yıl süre ile 20 balık türü ele alınmış ve beş farklı *Diplostomum* türü teşhis edilmiştir ve bu türlerin mevsimsel yoğunlukları da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Georgieva ve arkadaşlarının (2013) Avrupa'da *Diplostomum*'un tür çeşitliliği için moleküler zenginleştirmenin ilk adresi olarak yaptıkları çalışmalarında mtCOI ve rRNA'nın ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgelerini

kullanmışlardır. Blasco-Costa ve arkadaşlarının (2014) İzlanda'da *Diplostomum* türlerinin moleküler, morfolojik ve ekolojik kanıtı üzerine yaptıkları çalışmada; mtDNA'nın COI ve rRNA'nın ITS sekanslarını yapmışlar ve çalışmanın sonucunda kullandıkları üç farklı balık türünde *Diplostomum*'a ait altı farklı tür bulmuşlardır. Locke ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları DNA Barkodlama çalışmasında Diplostomidae'ye ait 52 türün teşhisini yapmışlar ve tanımlanamayan, adı konamayan türler için en iyi seçimin COI geni olduğunu kanıtlamışlardır.

Diplostomum'un gözlerde çok miktarda bulunan bir parazit türü olduğu Dörücü ve İspir (2001), Dörücü ve ark (2002), Dörücü ve İspir (2005), Dörücü ve ark (2008)'nin yaptıkları çalışmalar ve Barata (2012)'nin yapmış olduğu tez çalışmasıyla ortaya konulmuştur. Diplostomum balıklarda körlüğe ve hatta ölüme yol açabilen bir parazit türü olup, özellikle de kültür balığı yetiştiriciliğinde tehlikeli bir parazit türüdür.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Çalışma Alanı

Karakaya Baraj Gölü, Fırat Nehri üzerinde Keban Barajı'ndan sonra üçüncü büyük baraj (gölalanı bakımından) gölünü oluşturur. Karakaya Barajı, Keban Barajı'nın 166 km mansabında, Diyarbakır ilinin Çüngüş ilçesi yakınlarında Seki bağları mevkiinde inşa edilmiştir. Karakaya Barajı enerji üretimi açısından Atatürk Barajı'ndan sonra ikinci en büyük elektrik üretim tesisidir. Fırat Nehri üzerindeki üçüncü baraj gölü olan Karakaya Barajının gölalanı Keban Barajı'nın mansabına kadar uzanmaktadır (Anul, 1995). Karakaya Barajı, Güneydoğu Anadolu projesi'nin bir parçası olarak elektrik enerjisi üretimi amacıyla 1976-1987 yılları arasında inşa edilmiştir. Karakaya Barajı Fırat Nehri üzerinde Keban Barajı ve HES'in 166 km mansabında, Atatürk Barajı ve HES'in 180 km mansabında yer almaktadır. Diyarbakır'a 150 km uzaklıkta bulunan baraj adını yakınında bulunan Karakaya köyünden almıştır. Beton kemer gövde ağırlık tipi olan barajın gövde hacmi 2.000.000 m³, normal su kotunda göl hacmi 9.580,00 hm³, normal su kotunda gölalanı 268,00 km²'dir. Baraj yılda 102 hm³, içme ve kullanma suyu sağlamaktadır. Karakaya Baraj Gölü'nün Diyarbakır, Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerine kıyısı bulunmaktadır (Küçükylmaz vd., 2010; Barata, 2012).

Keban Barajı, Elazığ ilinin 45 km kuzeybatısında ve Malatya ilinin 65 km kuzeydoğusunda olup, Karasu ile Murat nehirlerinin birleştiği yerden 10 km daha güneybatıda Keban ilçesi civarında inşa edilmiştir. Yüzey alanı bakımından ülkemizin ikinci büyük baraj gölüdür. Baraj gölünün maksimum işletme kotu 845 m minimum işletme kotu ise 813 m' dir. Maksimum işletme kotunda yüzey alanı 687,31 km² ve depolama hacmi 30,6 milyar m³ 'tür. Minimumu işletme kotunda yüzey alanı 379,3 km² ve depolama hacmi 30,6 milyar m³ 'tür. Baraj gölünün en derin yeri baraj gövdesinin bulunduğu nokta olup bu noktada maksimum derinlik 163 m'dir. Baraj gölünün ana akarsuyu olan Fırat Nehri, yılın çeşitli mevsimlerinde çok farklı akım düzeyine sahiptir. Fırat Nehri'nin önemli kollarından olan Murat, Karasu, Peri ve Munzur sularının yıllardır taşıdıkları sedimentlerin çökeliş dipte birleşmesi ile özellikle Murat Nehri tarafında bulunan Gülüşkür Köprüsü, Karasu tarafında bulunan Göktepe bölgesi ve bu bölgenin güney kısımları rezervuar alanı bakımından büyük değişimlere uğramıştır (Doğan, 2014).

Hazar Gölü, Elazığ ilinin yaklaşık 25 km güneyinde, denizden yüksekliği 1248 m ve yüz ölçümü 86 km² 'dir. Kabaca dikdörtgen biçimindeki gölün uzunluğu 20 km, genişliği ise ortalama 4,5 km'dir. Hazar Gölü'nün derinliği hakkında değişik araştırmacılar 150-300 m arasında değişen rakamlar vermişlerdir. DSİ tarafından 1995 yılında yapılan bir çalışma ile gölün en derin yerinin doğu kısmında ve 219 m olduğu belirlenmiştir. Hazar Gölü'nün, Doğu Anadolu Fayı'nın sol yönlü yatay fay hareketine bağlı olarak üst Pliyosen'de (yaklaşık üç milyon yıl önce), bir çek-ayır havza şeklinde oluştuğu kabul edilmektedir. Hazar Gölü, batıda Kürk Çayı, güneydoğuda Behremaz Çayı, doğuda Zıkkım Deresi ve kuzeyde Savsak Deresi ile beslenmektedir. Verimliliği bakımından oligotrof göller sınıfına girmektedir. Hazar Gölü'nün suyu hafif tuzlu ve sodalıdır. Ayrıca göl, sert ve pH değeri yüksek bir su özelliğine sahiptir. Bu yüzden göle başka türlerin aşılınmaları çalışmaları şu ana kadar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Hazar Gölü'nde 6 tür balık tespit edilmiştir. Ancak ekonomik olarak değerlendirilen ve bölge halkı tarafından sevilerek tüketilen tek alttür *C. umbla*'dır (Çoban, 2010).

2.2. Balık Materyali

Çalışmada kullanılan balık örnekleri Mayıs-Ağustos 2017 tarihleri arasında Karakaya Baraj Gölü, Keban Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nden yakalanan toplam 150 adet *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) üzerinde yapılmıştır. Ayrıca Karakaya Baraj Gölünden 50, Keban Baraj Gölünden 60 ve Hazar Gölünden 40 birey olacak şekilde dağılım yapılmıştır (Tablo 2.1) (Şekil 2.1).

2.3. Yararlanılan alet ve Ekipmanlar

Toplanan balık örneklerinin gözlerinden parazitlerin çıkarılması Leica EZ4 marka stereo mikroskop kullanılarak yapılmıştır. Fotoğraf çekimleri, BX53 araştırma mikroskobuna bağlı DP26 kamera ataçmanlı görüntüleme sistemi (Olympus) ve CellSens software ile gerçekleştirilmiştir. Diseksiyon aşamasında pens, bistüri, diseksiyon makasları, diseksiyon iğnesi, makas, tartı, cetvel, değişik ebatlarda petri kutuları lam, lamel, numune şişesi, pastör pipet, piset, balık boy ölçüm tahtası kullanılmıştır. DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında ise hassas terazi, otomatik pipet seti, thermal blok cihazı,

santrifuj, vorteks, spektrofotometre, yatay jel elektroforezi, elektroforez güç kaynağı, jel görüntüleme sistemi, mikrodalga fırın kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan balık örneklerinin toplandığı bölgeler

	Bölge	Koordinatlar	Örnek Sayısı
Karakaya Baraj Gölü	1	38°26'29.67"K 39°48'33.27"D	10 Adet
	2	38°27'42.32"K 38°34'40.42"D	10 Adet
	3	38°34'38.09"K 38°22'13.70"D	10 Adet
	4	38°40'32.79"K 38°25'01.56"D	10 Adet
	5	38°41'51.74"K 38°29'01.98"D	10 Adet
Keban Baraj Gölü	6	38°53'04.68"K 38°44'14.72"D	10 Adet
	7	38°52'37.92"K 38°57'34.91"D	10 Adet
	8	38°49'54.84"K 39°16'13.59"D	10 Adet
	9	38°45'32.71"K 39°28'26.84"D	10 Adet
	10	38°36'12.51"K 39°24'20.33"D	10 Adet
	11	38°39'03.96"K 39°36'14.82"D	10 Adet
Hazar Gölü	12	38°31'26.29"K 39°30'09.61"D	10 Adet
	13	38°29'55.67"K 39°30'27.74"D	10 Adet
	14	38°27'09.67"K 39°18'14.67"D	10 Adet
	15	38°28'13.62"K 39°17'49.20"D	10 Adet



Şekil 2.1. Balık örneklerinin alındığı bölgeler (Google Earth)

Balıkların ağırlıkları hassas terazide belirlenmiş; total boyları ölçüm tahtasında ölçülüp kaydedilmiştir. Balıkların yaşları tespit edilerek kaydedilmiştir. Sonra Arda vd., (2005)'te verilen bilgilere göre otopsi yapıldı. Balığın cinsiyeti belirlendi. Bulunan parazitler içerisinde fizyolojik tuzlu su bulunan petri kutularına bırakıldı.

Balıkların gözleri pens ve bistüri yardımıyla kesilip göz merceği çıkarıldı ve fizyolojik tuzlu su (% 0,9) içerisine bırakıldı. Sonra steromikroskop altında *Diplostomum* metaserkerleri toplanarak içerisinde % 96'lık etil alkol hazırlanmış olan ependorf tüplere sayılarak bırakıldı. Ayrıca fotoğraf çekimleri yapıldı. Parazitlerin teşhisleri Bykhovskaya-Pavlouskaya (1964), Hoffman (1967), Kennedy(1974), Ekingen (1983), Williams ve Jones (1994)'e göre yapıldı.

2.4. Genetik Karakterizasyon Çalışmaları

2.4.1. Total DNA İzolasyonu

Bu çalışma Elazığ ili sınırları içerisinde kalan Keban Baraj Gölü, Karakaya Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nün farklı bölgelerinden toplanan toplam 150 adet *Capoeta umbla* türü üzerinde gerçekleştirilmiştir. Balıkların gözünde bulunan *Diplostomum* sp.'ye ait metaserkaria larvaları ependorf tüplere alınarak % 96'lık etanol içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Total DNA izolasyonu, gözünde en az 20 adet mertaserkaria larvası bulunduran balık örnekleri ile yapılmıştır.

Total DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) protokolüne göre uygulanmıştır:

2.4.1.1. Ön Hazırlık Aşaması

Çalışmada kullanılan thermal block cihazı 56°C'de, tüm santrifüj işlemleri oda sıcaklığı (15-25°C) koşullarında, vorteks işlemi 10 saniye olarak yapılmıştır. Buffer ATL ve Buffer AL ısıtılıp çözülerek kullanılmıştır. Ependorf tüpleri (steril ve 1.5ml özellikte) ve spin kolonlar hazır hale getirilmiştir.

2.4.1.2. Uygulama Aşaması

- Etil alkol içerisinde muhafaza edilen ve en az 20 adet metasekaria larvası içeren örnekler 5000 rpm. de 3 dk santrifüj edilerek larvaların dibe çökmesi sağlanmış ve daha sonra etil alkol uzaklaştırılmıştır.
- Ependorf tüpler içerisinde kalan metasekaria larvaları üzerine 150-180 µl lysis buffer (ATL) eklenerek tüpler vortekslenmiştir.
- Daha sonra tüpler içerisine 20 µl Proteinaz K eklenerek tekrar vorteks işlemi uygulanmıştır.
- Tüpler 56 °C'de thermal block cihazında lizis işlemi tamamlanmaya kadar bekletilmiştir.
- Süre sonunda üzerine 200 µl Lysis buffer (AL Buffer) eklenmiş ve vorteks işlemi uygulanmıştır.
- Eşit miktarda % 96'lık etil alkol eklenmiş ve bir kez daha vorteks işlemi uygulanmıştır.
- Tüpteki karışım DNeasy mini spin kolona aktarılarak spin kolonun altına 2 ml toplama tüpü yerleştirilerek 8000 rpm. de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpü içerisinde bulunan karışım atılmıştır.
- DNeasy mini spin kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne konularak üzerine 500 µl AW1 Buffer eklenerek 8000 rpm. de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki karışım atılmıştır.
- DNeasy mini spin kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne konularak üzerine 500 µl AW2 Buffer eklenerek 14000 rpm. de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki karışım atılmıştır.
- DNeasy mini spin kolonu temiz 1.5 ml ependorf tüp içerisine konularak üzerine 200 µl AE Buffer eklenerek 8000 rpm. de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA bir sonraki işlem yapılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiş ancak daha uzun süreli beklemelede tüpler -20 °C'de saklanmıştır.

2.4.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Elde edilen total DNA'nın miktar ve saflık analizleri spektrofotometrede (NanoDrop 2000, ThermoScientific) gerçekleştirilmiştir. 1µl DNA örneği cihaza pipet yardımı ile yerleştirilmiş, DNA konsantrasyonu 260 nm'de 1 OD'nin 50 ng/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu dikkate alınarak hesaplanmıştır. DNA konsantrasyonunun ayarlanmasında spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonları belirlenen örnekler, ana stokların kontamine olmaması ve tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının standardize edilmesi amacıyla DNA konsantrasyonu 200 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

Agaroz jel ve gerekli çözeltilerin hazırlanışı:

a) 5X Trisma Base EDTA (TBE):

54 g Trima Base, 27.5 g Borik Asit ve 20 ml EDTA (5M, pH=8.0) 800-900 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

b) Ethidium Bromide (10mg/ml)

c) DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus)

d) DNA Ladder üzerine 166µl 6X Loading Dye ve 734µl distile su ilave edilerek vorteks yardımı ile yüksek hızda karıştırılmıştır.

e) % 1'lik Agaroz Jel

1 g agaroz üzerine 100 ml 1X Trisma Base EDTA (TBE) eklenerek mikrodalga fırın yardımıyla kaynatılmıştır. Çözelti soğutulduktan sonra, çeker ocak altında, içerisine 5µl ethidium bromide eklenmiş ve yavaşça karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Karışım son olarak trayler'a yavaşça dökülerek, 20-30 dakika oda sıcaklığında donana kadar beklenecaktır.

f) %1'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 2µl DNA 6X loading dye ile karıştırılarak jele yüklenmiştir.

2.4.3. Mitokondriyal DNA Sitokrom C Oksidaz I Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Elde edilen total DNA örnekleri spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR işlemi ile çoğaltılmıştır (Tablo 2.2).

PCR işleminde kullanılan liyofilize primer (Tablo 1), üretici firma tarafından verilen nmol değerlerinin 10 katı kadar distile su ile sulandırılarak 100 pM/µl'lik stok primer elde

edilmiştir. PCR reaksiyonu toplam hacim 25 µl olarak gerçekleştirilmiştir. Bu hacim içerisinde 1X PCR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 pmol forward ve 1.25 pmol reverse primer, 50 µM dNTPs, 0.6 U Taq polimeraz, 50 ng saflaştırılmış DNA örneği ve 15 µl ddH₂O kullanılmıştır.

Tablo 2.2. Primer Nükleotid Dizileri

Primer adı	Primer Sekansı	Ürün Büyüklüğü	Bölge Adı
COX-1F	5'CGTTTRAATTATACGGATCC 3'	500 bp	COI
COX-1R	5'AGCATAGTAATMGCAGCAGC 3'		

PCR koşulları, Thermal cyclers ile 94°C'de 2 dakika ön denatürasyonu takiben 35 siklus boyunca 94°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniye olarak ayarlanmış ve bunları takiben 72°C'de 10 dakika son uzama basamağı uygulanmıştır.

PCR sonrası ürünler etidyum bromür ilave edilmiş % 2'lik agaroz jel içerisinde elektroforez yapılmış ve elektroforez sonrası agaroz jel, UV ışık altında COI geninin 500 bp lik fragmentine ait bantın elde edilmesiyle PCR reaksiyonunun doğru çalıştığı belirlenmiştir.

2.4.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Gen Bölgesinin Dizi Analizi

PCR ürünleri için agaroz jel elektroforezinde tek bant elde edilen gen ürünlerinin saflaştırılması ve dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi yapılacak olan her bir örnek için saflaştırma işlemi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Örneklere ait dizi analizinin yapılması PCR işleminde kullanılan spesifik primerlerin kullanılmasıyla çift yönlü (ileri ve geri) olarak hizmet alımı yoluyla (BM Laboratuvar Sistemleri) gerçekleştirilmiştir.

DNA dizileme işlemi, MacroGen (Hollanda) laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiş (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve sonuç olarak ham DNA dizileri elde edilmiştir.

2.4.5. Dizi Analiz Verilerinin Değerlendirilmesi

Günümüzde DNA dizilerini içeren moleküler veriler türler arası ilişkileri analiz etmek için kullanılır. Genomlarda mutasyonlar birikebilir ve farklı organizmaların genomları arasındaki nükleotid dizisi farkı iki genomun birbirinden ayrılmasını sağlayabilir. Farklı genomları karşılaştırarak taksonlar arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak mümkündür. Taksonlar arasındaki ilişkinin kesinlik kazanması ise genler arası etkileşim, ilaç tasarımları, aşı çalışmalarında patojen strain çeşitliliği, genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıkların epidemiyolojisi, yeni genlerin görevlerinin tespiti, mikrobiyel ekoloji gibi çalışma alanlarında kullanılır (URL-4, 2018).

Çalışmada örneklere ait DNA dizileri hizalanmış, haplotip sayı ve çeşitliliği belirlenmiştir. Haplotipler için genetik uzaklık ve nükleotit kompozisyonu hesaplanmıştır. GenBank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi ile örneklerin karşılaştırması yapılmış ve ident oranı % 100-96 aralığında olan tüm veriler çalışmaya dahil edilmiştir. Nükleotid dizisi kullanan (karakter temelli yöntemler) Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian Inference metotları; uzaklık kullanan (mesafe temelli yöntemler) Neighbor Joining (NJ) metodu ve Bayes metodu kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Örnekleme Bölgelerinden Elde Edilen *Diplostomum*'ların Morfolojik Analizleri

3.1.1. *Diplostomum* cinsinin sistematik teşhisi ve morfolojisi

Vücudu oval görünümlü olup posterior vücut kısmı az gelişmiştir. Karın çekmeni, ağız çekmenine göre daha büyüktür. Ağız çekmeninin yanlarında iki adet lateral çekmen bulunur.

Uzunluğu 220-300 µm, genişliği 220-280 µm olup oval görünümlüdür. Bu cinse bağlı larval trematodların vücudu yassı olup, iki bölüme ayrılmıştır. Vücudun posteriorundaki gelişme daha azdır. Posterior vücut bölümünde, boşaltım tubullerinden boşaltı ürünlerinin idrar kesesine açıldığı yerde boşaltım deliği bulunmaktadır. Karın çekmeni, ağız çekmenine göre daha büyüktür. Ağız çekmeninin yanında iki adet lateral çekmen bulunmaktadır. Düz boru şeklinde görülen bağırsakları, özofagusu takiben iki kola ayrılmış olup, karın çekmeninin posterior hizasına kadar ulaşabilmektedir. Salgı bezleri, karın çekmeninin hemen önünde bulunmaktadır. Brandes organı iyi gelişmiştir. Genellikle serbest hareket etmekte, nadiren de kistlenip hareketsiz kalmaktadırlar. Büyük çoğunluğu gözlerde, daha az miktarda da diğer organlarda bulunmaktadır. Metaserkerleri 400 µm büyüklükte olup balıkgözünde beyaz nokta şeklinde hareketli yapılar olarak, dıştan bile fark edilebilmektedir.

3.1.2. *Diplostomum spathaceum*'un sistematik teşhisi ve morfolojisi

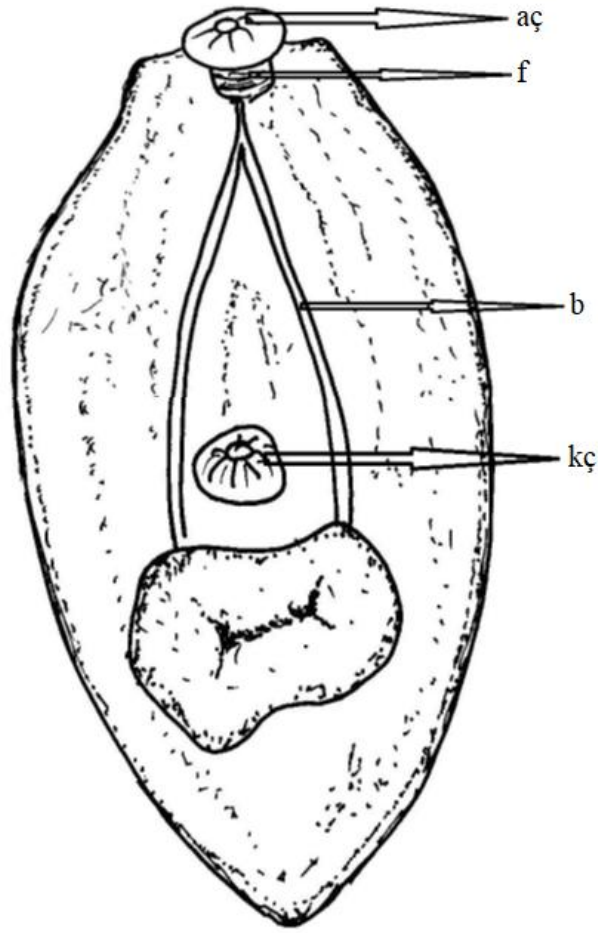
Vücutlarının anterior kısmı yuvarlak olup posterior kısmı çıkıntılıdır Vücudun posterioru anteriorundan daha kısadır. Ventral çekmen, oral çekmenden iki kat daha büyüktür. Eklenti organları da ventral çekmenden daha büyüktür. Farinks küçük, özofagus kısadır. Özofagus dalları iki intestinal hortumun içine kadar uzanır, daha sonra bunlar birleşerek “V” harfi şeklini alır. Lateral vantuz belirgindir. Brandes organı yuvarlak ve transversal konumda uzamış durumdadır.

Diplostomum metaserkerlerinin dorsal yüzeyi konveks, ventral yüzeyi ise konkavdır. Bu metaserkerler yaklaşık 400-500 µm uzunluğunda olup, vücutları geniş, hareketleri

zayıftır. Vücutları bir boğumla iki kısma bölünmüş, vücudun anterior ucu yuvarlak iken posterior ucu ise çıkıntılıdır. Posterior vücut bölümü kısa olup özellikle gelişmiş larvalarda anterior bölümden tamamen ayrılmıştır. Ventral çekmen, oral çekmenden yaklaşık iki kat daha büyüktür. Eklenti organları da ventral çekmenden daha büyüktür. Farinks küçük, özofagus kısa olup bunlar önce oral açıklığa, daha sonra da anterior çekmene açılmaktadır. Özofagus kolları, iki intestinal hortumun içine kadar uzanmaktadır. Daha sonra bunlar birleşerek “V” harfi şeklini almaktadır. Lateral vantuz belirgindir. Brandes organı yuvarlak olup transversal konumda biraz uzamış durumdadır (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



Şekil 3.1. *Diplostomum spathaceum*'un genel görünüşü (Orijinal)



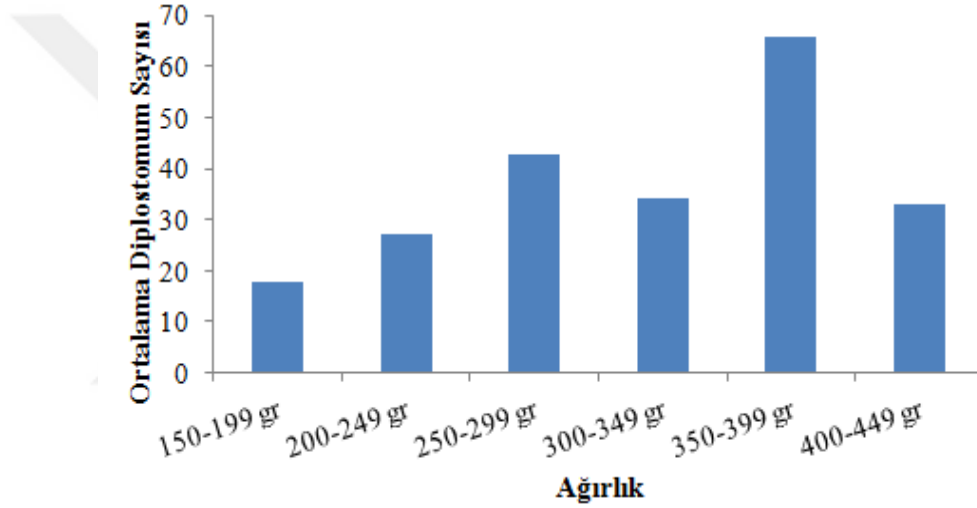
Şekil 3.2. *Diplostomum spathaceum*'un genel görünüşü; aç.: ağız çekmeni, f.:farinks, b.:bağırsak, kç.:karın çekmeni

3.1.3. İstatistiksel Analizler

Parazit ile balık ilişkisinde ağırlık-ortalama *Diplostomum* sayısı, yaş-ortalama *Diplostomum* sayısı, cinsiyet-ortalama *Diplostomum* sayısı, boy-ortalama *Diplostomum* sayısı Minitab programıyla belirlenmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar aşağıda listelenmiştir:

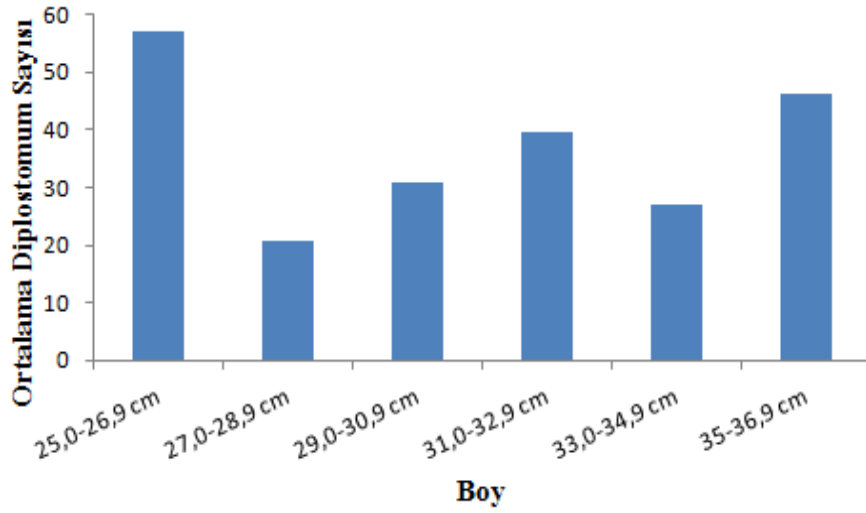
1. Erkek ve dişi balıkların parazit taşıma oranları arasında (yada parazitlenme oranları arasında) istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (Mann-Whitney, $W=658,5$; $p<0.05$). Dişi balıkların erkeklerden daha fazla parazit taşıdığı görülmüştür.

2. Balık ağırlığı ile taşıdıkları parazit sayıları arasında pozitif yönde önemli bir ilişki olduğu görülmüştür (Person Korelasyon Analizi; $r=0.409$). Yani balık ağırlığı arttıkça, balık büyüdükçe parazitlenme oranı artmaktadır.
3. Balık Boyu ile parazit sayıları arasında zayıf da olsa pozitif yönde bir korelasyon olduğu (Person Korelasyon Analizi; $r=0.257$), bu da balık büyüdükçe parazitlenme oranının arttığı anlamını taşımaktadır.
4. Balık yaşı ile parazit sayısı arasında korelasyona baktığımızda; yine çok zayıf da olsa pozitif yönde bir ilişkinin olduğu görülmekte (Person Korelasyon Analizi; $r=0.192$); yani balık yaşı arttıkça parazit sayısı artmaktadır.



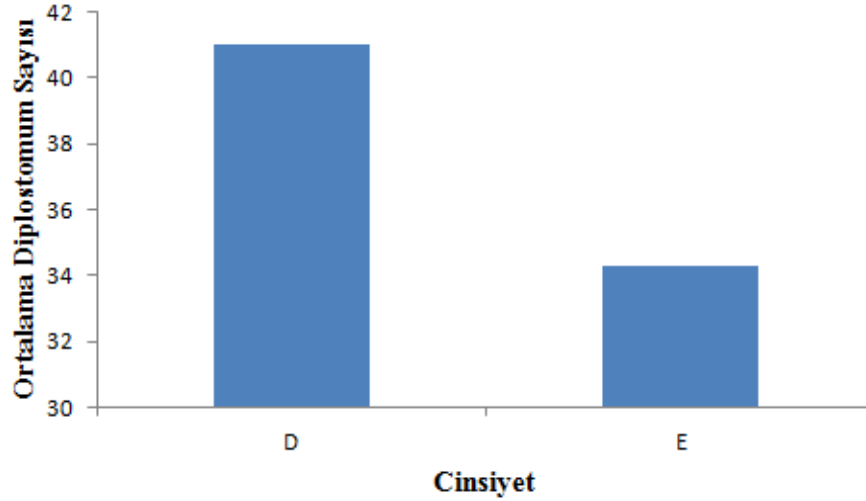
Şekil 3.3. Karakaya Baraj Gölünde ağırlığa göre ortalama *Diplostomum* sayısı

Karakaya Baraj Gölünde ağırlığa göre ortalama *Diplostomum* sayısında (Şekil 3.3), ağırlık arttıkça parazit sayısında arttığı gözlenmiştir. Yine balık ağırlığı ile parazit sayısı arasında pozitif yönde kuvvetli bir ilişki olduğu görülmüştür (Person Correlation Analysis, $r = 0.652$)



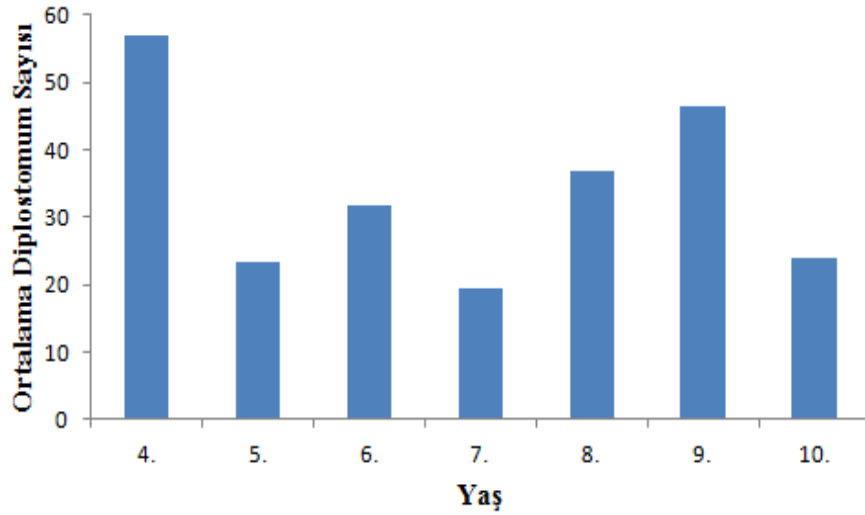
Şekil 3.4. Karakaya Baraj Gölünde boy uzunluğuna göre ortalama *Diplostomum* sayısı

Balık Boy grupları ile ortalama parazit sayısı arasında (Şekil 3.4) düzensiz bir dağılım görülse de, Korelasyon analizi sonucunda balık boyu ile parazit sayısı arasında zayıf da olsa pozitif yönde bir korelasyon olduğu (Person Korelasyon Analizi; $r=0.257$) belirlenmiştir. Bu da balık büyüdükçe parazitlenme oranının arttığı anlamını taşımaktadır.



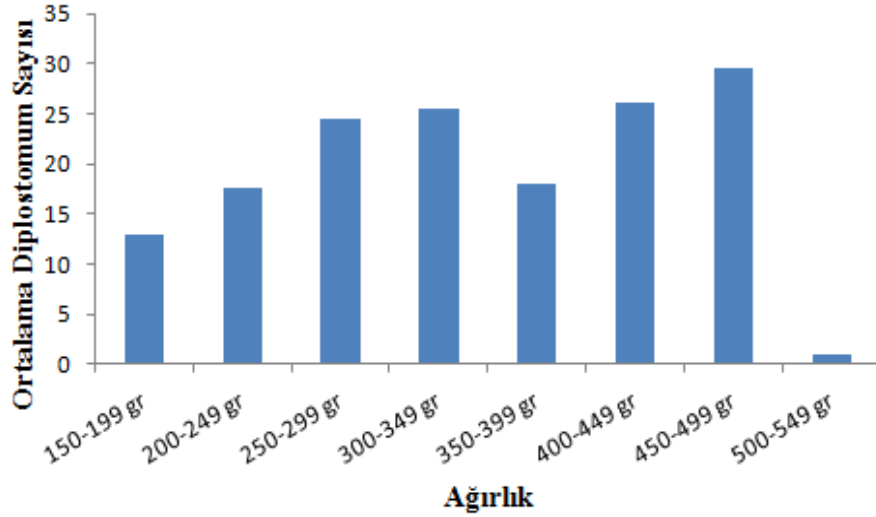
Şekil 3.5. Karakaya Baraj Gölü Cinsiyete bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Erkek ve dişi balıkların parazit taşıma oranları arasında (Şekil 3.5) istatistiksel olarak önemli fark olduğu (Mann-Whitney, $W=670$; $p<0.05$), Dişi balıkların erkeklerden daha fazla parazit taşıdığı görülmüştür.



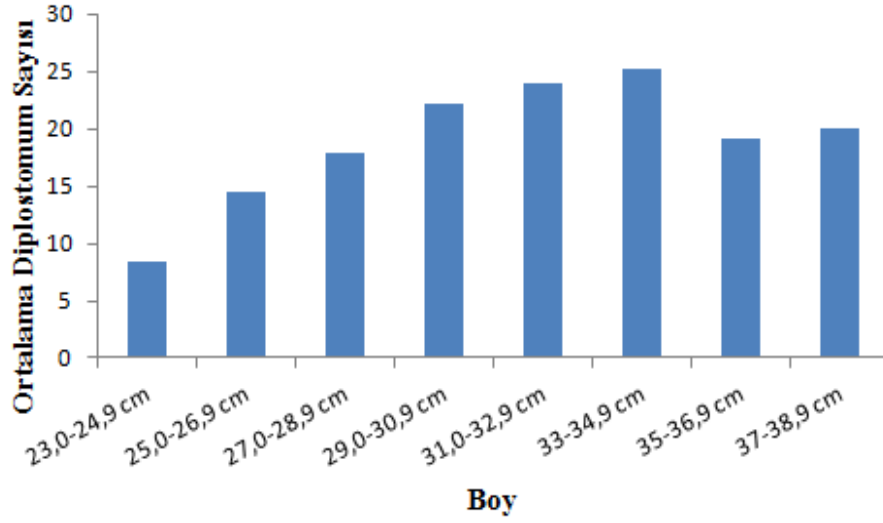
Şekil 3.6. Karakaya Baraj Gölü Yaşa Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Balık yaşı ile parazit sayısı arasında (Şekil 3.6) ilişkiye bakıldığında; her ne kadar 4 yaşındaki balıklarda fazla parazit görülse de, yaş ile parazit sayısı arasında pozitif yönde bir corelasyon olduğu belirlenmiştir (Person Korelasyon Analizi; $r=0.192$). Yani balık yaşı arttıkça parazit sayısı artmaktadır.



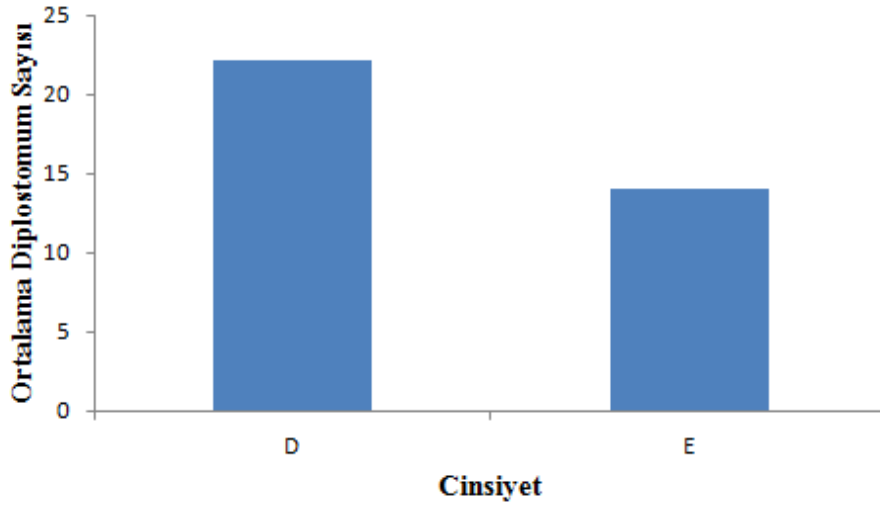
Şekil 3.7. Keban Baraj Gölü Ağırlığa Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Keban Baraj Gölü Ağırlığa Bağlı Ortalama Diplostomum Sayısı (Şekil 3.7), ağırlığı fazla olan balıklarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Balık ağırlığı ile parazit sayısı arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğu görülmüştür (Person Correlation Analysis, $r=0.215$).



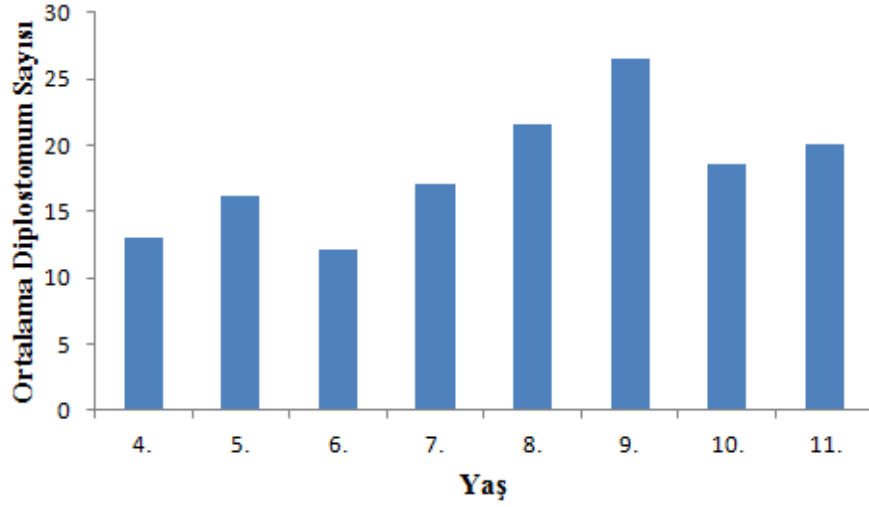
Şekil 3.8. Keban Baraj Gölü Boy Uzunluğuna Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Balık boyu arttıkça parazit sayısının arttığı (Şekil 3.8) görülmektedir. Korelasyon analizi sonucunda balık boyu ile parazit sayısı arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğu (Person Korelasyon Analizi; $r=0.524$) belirlenmiş olup, bu da balık büyüdükçe parazitlenme oranının arttığı anlamını taşımaktadır.



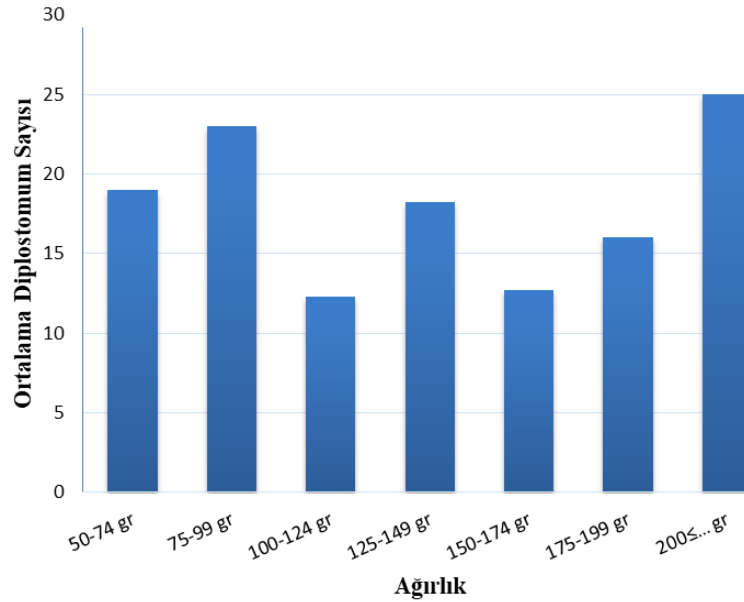
Şekil 3.9. Keban Baraj Gölü Cinsiyete Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Erkek ve dişi balıkların parazit taşıma oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğu (Mann-Whitney, $W = 515$; $p < 0.05$) görülmüş olup (Şekil 3.9), dişi balıkların erkeklerden daha fazla parazit taşıdığı belirlenmiştir.



Şekil 3.10. Keban Baraj Gölü Yaşa Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

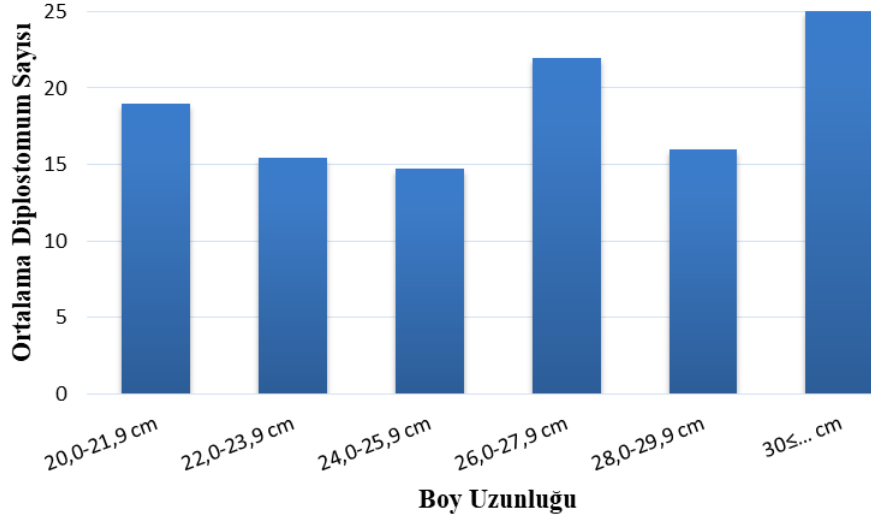
Balıkların yaş grupları ile taşıdıkları parazit sayısı arasında pozitif yönde kuvvetli bir ilişkinin olduğu görülmüştür (Şekil 3.10). Yani balık yaşı arttıkça parazitlenme oranı da artmaktadır (Person Korelasyon Analizi; $r=0.624$).



Şekil 3.11. Hazar Gölü Ağırlığa Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

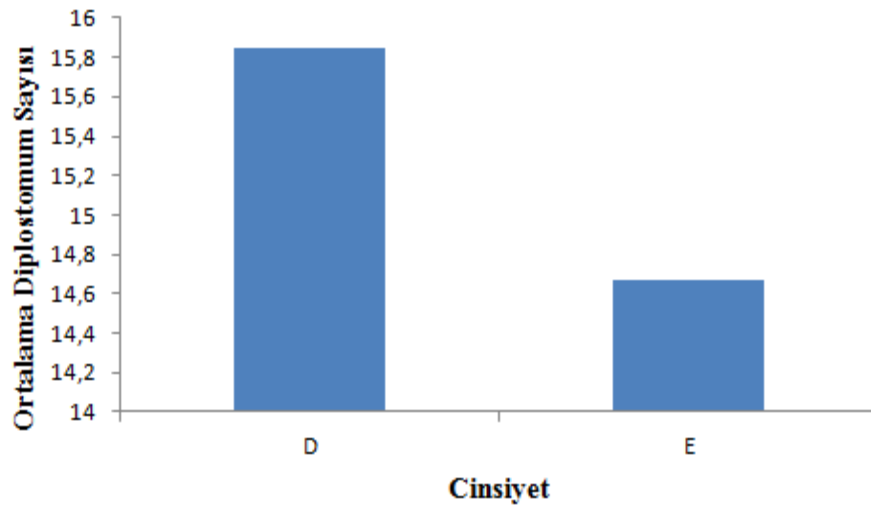
Balık ağırlık grupları ile ortalama parazit sayısı arasında inişli çıkışlı bir durum görülse de, balık ağırlığı ile taşıdıkları parazit sayıları arasında pozitif yönde önemli bir

ilişki olduğu görülmüştür (Şekil 3.11) (Person Korelasyon Analizi; $r=0.409$). Bu da gösteriyor ki balık ağırlığı arttıkça yani balık büyüdükçe parazitlenme oranı artmaktadır.



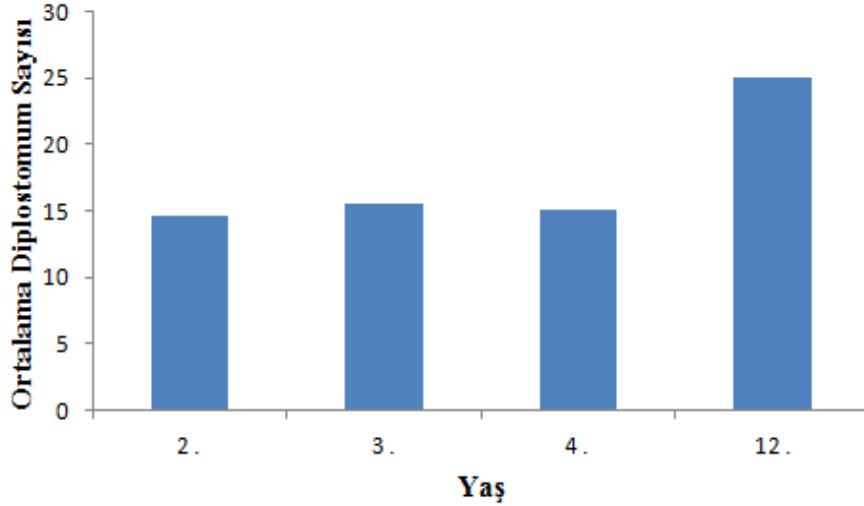
Şekil 3.12. Hazar Gölü Boy Uzunluğuna Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Balık Boy grupları ile ortalama parazit sayısı arasında düzensiz bir dağılım görülmüş olsa da büyük balıklarda daha fazla parazit bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12). Korelasyon analizi sonucunda balık boyu ile parazit sayısı arasında zayıf da olsa pozitif yönde bir korelasyon olduğu (Person Korelasyon Analizi; $r=0.257$), bu da balık büyüdükçe parazitlenme oranının arttığı anlamını taşımaktadır.



Şekil 3.13. Hazar Gölü Cinsiyete Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Erkek ve dişi balıkların parazit taşıma oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (Şekil 3.13) (Mann-Whitney, $W=658,5$; $p<0.05$). Dişi balıkların erkeklerden daha fazla parazit taşıdığı gözlenmiştir.



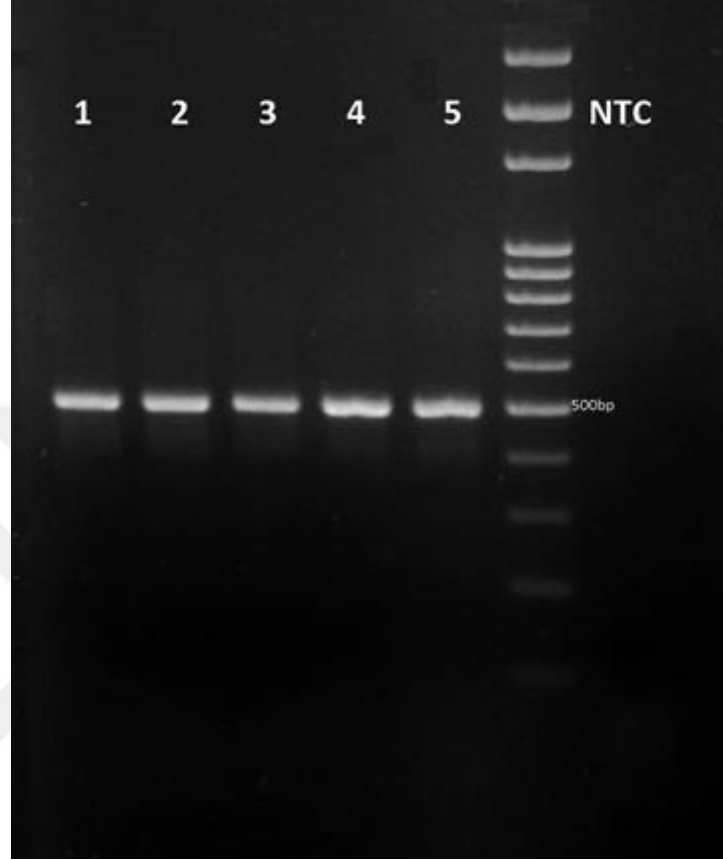
Şekil 3.14. Hazar Gölü Yaşa Bağlı Ortalama *Diplostomum* Sayısı

Balık yaşı ile parazit sayısı arasında çok zayıf da olsa pozitif yönde bir ilişkinin olduğu belirlenmiş olup (Şekil 3.14) (Person Korelasyon Analizi; $r=0.192$).; yani balık yaşı arttıkça parazit sayısı artmaktadır.

3.2. Örnekleme Bölgelerinden Elde Edilen *Diplostomum*'ların mtCOI Gen Bölgesinin Genetik Analizleri

Bu çalışmada Elazığ ili sınırları içerisinde kalan Keban Baraj Gölü, Karakaya Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nde doğal olarak yayılış gösteren *Capoeta umbla* türünde enfeksiyona neden olan *Diplostomum* sp.'nin mtCOI gen bölgesinin dizi analizi verileri ışığında tanımlanması ve kimliklendirilmesinin gerçekleştirilmiştir. Toplanan 150 adet balık örneğinin gözlerinde *Diplostomum* sp. parazitleri taranmış ve en az 20 adet metaserkaria içeren balıklar çalışmaya dahil edilmiştir. Çünkü DNA izolasyonu en az 20 metaserkaria larvalarının birlikte santrifüj edilmesi sonucunda elde edilmiştir. DNA izolasyonu toplam 53 adet balık örneğinden izole edilen metaserkaria larvalarından elde edilmiş, PCR işlemleriyle ise toplam 49 örneğin gen bölgesi çoğaltılmıştır (Şekil 3.15). PCR

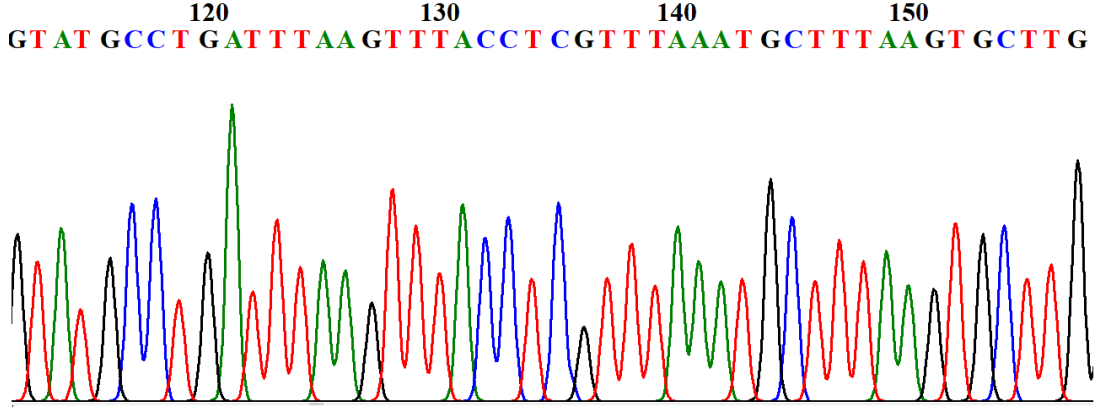
örneklerinden saflaştırma işlemi ve çift yönlü dizi analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.15. *Diplostomum* sp.'ye ait metaserkaria larvalarının mtCOI gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasının agaroz jelde görüntülenmesi (orijinal)

3.2.1. mtDNA COI Gen Bölgesi Dizilerinin Belirlenmesi ve Dizileme Analizleri

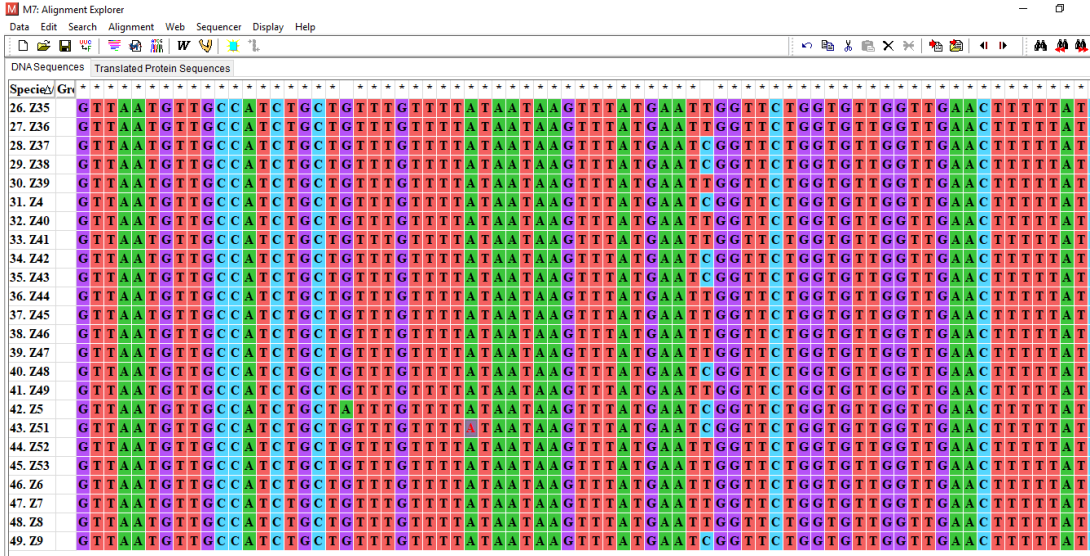
Çift yönlü (Reverse ve Forward) primerler ile elde edilen DNA dizilerine ait kromatogramlar (Şekil 3.16) düzeltme uygulanarak tek bir dizi haline getirilmiştir (Şekil 3.17). Elde edilen tüm diziler MEGA7 programında (Clustal W) biraraya getirilerek hizalanmıştır. Hizalama işlemi yapılırken kromatogramlar tek tek değerlendirilerek mtCOI gen bölgesi için ortak diziler belirlenmiştir (Şekil 3.18). Bu dizilerin başlangıç ve bitiş noktasındaki fazlalıklar kesilerek atılmıştır. Böylece gen bölgesi tüm örnekler için aynı uzunluğa getirilmiştir.



Şekil 3.16. DNA dizisine ait kromatogramın bir bölümü



Şekil 3.17. Reverse ve forward dizilerinin kontrol edilmesi ve hatalı bölgelerin düzenlenmesi



Şekil 3.18. Tüm örnekler için hizalanmış dizilerin bir bölümü

Çalışmada elde edilen mtCOI gen bölgesinin dizileri aşağıda listelenmiştir:

>Z1

ATTATATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGT
TCTGATAGGCGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGAT
TTAAGTTTACCTCGTTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTG
TTTGTTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCC
ACCTTTATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCT
TTGCATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTA
TTTTTTCTTCTATTTTTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCT
TATTTGTTTACCTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCAC
CTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z2

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCTA

>Z3

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z4

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTA
GTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTT
TGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGT
TTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAA
GTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATT
TCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGT
TTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTTT
TTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTA
TTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z5

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTACAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTATTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z6

CGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTAG
TCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTTT
GGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGTT
TAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAAG
TTTATGAATTGGTTCGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATTT
CCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGTT
TATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTTTT
TATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTAT
TCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z7

GTTTAAATTTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATT
ATATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCT
GATAGGCGGTTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTA

AGTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTT
GTTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACC
TTTATCGAGATTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTG
CATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTT
TTTCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTAT
TTGTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTA

>Z8

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTACAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z9

ATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGA
TAGGCGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAAAG
TTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGT
TTTATAATAAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTT
TATCGAGATTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCA
TTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTT
CTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTG
TTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z10

AATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTA
TCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGG
CGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAAAGTTTA
CCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTA
TAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATC
GAGATTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTA
GCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTC

TATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTA
CTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCT
>Z11

CGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTAG
TCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTTT
GGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGTT
TAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAAG
TTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATTT
CCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGTT
TATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTTTT
TATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTAT
TCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCTA

>Z12

TTTAAATTTTACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTAT
ATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGA
TAGGCGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAG
TTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGT
TTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTT
TATCGAGATTTTCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCA
TTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTT
CTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTG
TTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTAT
GC

>Z13

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTACAATTATATTACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTG

>Z14

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTA
GTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTT
TGGAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGT
TTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAA
GTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATT
TCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGT
TTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTTT
TTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTA
TTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCTA

>Z15

TTACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCAC
TAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGT
TTTGGAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTC
GTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAAT
AAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAG
ATTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCT
GGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTAT
TTTTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTT
CTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z16

GTTTAAATTTTACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTA
TATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTG
ATAGGCGGTTTTTGGAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAA
GTTTACCTCGTTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTG
TTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCT
TTATCGAGATTTTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGC
ATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTT
TCTTCTATTTTTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTT
GTTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACT
ATG

>Z17

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATAACCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z18

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATAACCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTAT

>Z19

AATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTA
TCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGG
CGGTTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTA
CCTCGTTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTA
TAATAAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATC
GAGATTTCCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTA
GCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTC
TATTTTTTATTTTATTAATAACCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTA
CTTCTATTCTTGTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCT

>Z20

GGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTAGT
CATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTTTG
GAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGTTT

AAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAAGT
TTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTATCGAGATTTC
CTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGTTT
ATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTTTT
ATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTAT

>Z21

CAGCGTTTAAATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTAT
AATTATATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAG
TTCTGATAGGCGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGA
TTTAAGTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCT
GTTTGTTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATC
CACCTTATCGAGATTTCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTC
TTTGCATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACT
ATTTTTCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGC
TTATTGTTTACTTCTATTCTTGTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTA

>Z22

TTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGAT
AGGCGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGT
TTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGT
TTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTT
ATCGAGATTTCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCAT
TTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTC
TTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTGT
TTA

>Z24

TACGGATCCTTATTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTACTACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTATCGAGAT
TTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT

TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCT

>Z25

CGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTAG
TCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTTT
GGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGTT
TAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAAG
TTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATTT
CCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGTT
TATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTTTT
TATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTAT
TCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCT

>Z27

GGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTAGT
CATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTTTG
GAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGTTT
AAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAAGT
TTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATTTT
CTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGTTT
ATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTTTTT
ATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTATT
CTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z28

CGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTAG
TCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTTT
GGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGTT
TAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAAG
TTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATTT
CCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGTT
TATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTC

>Z29

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT

TTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTAAAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTG

>Z30

TACGGATCCTTATTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTACAATTATATTACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGT
TTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTAAAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTAATTACTATGCTA

>Z31

AATTATACGGATCCTTATTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTA
TCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGG
CGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAAAGTTA
CCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTAAA
TAATAAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATC
GAGATTTCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTA
GCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTC
TATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTA
CTTCTATTCTTGTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTAT

>Z33

GTTTAAATTATACGGATCCTTATTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTA
TATTACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTG
ATAGGCGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTAA
GTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTG
TTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCT

TTATCGAGATTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGC
ATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTT
TCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTT
GTTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACT
ATG

>Z34

AATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTA
TCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGG
CGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTA
CCTCGTTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTA
TAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATC
GAGATTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTA
GCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTC
TATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTA
CTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z35

TATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCA
CTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGG
TTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCT
CGTTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAA
TAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAG
ATTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCT
GGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTAT
TTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTT
CTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCT

>Z36

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTACAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT

TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTC

>Z37

TTTAAATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTAT
ATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTTGATGCCAGTTCTGA
TAGGCGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAG
TTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGT
TTTATAATAAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTATCCACCTT
TATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCA
TTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTT
CTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTG
TTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTAT
GCT

>Z38

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTA

>Z39

GTTTAAATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTA
TATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTTGATGCCAGTTCTG
ATAGGCGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAA
GTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTG
TTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTCTGGTGTGGTTGAACTTTTATCCACCT
TTATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGC
ATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTT
TCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTC

>Z40

TACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGGTTTGGCTGCTGCGATTACTATGCTA

>Z41

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTA
GTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTT
TGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGT
TTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAA
GTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATT
TCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGT
TTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTTT
TTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTA
TTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTA

>Z42

TATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCA
CTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGG
TTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCT
CGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAA
TAAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAG
ATTTTCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCT
GGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTAT
TTTTTATTTTATTAATAACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTT
CTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCTAT

>Z43

TTACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCAC
TAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGT
TTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTC

GTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAAT
AAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAG
ATTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCT
GGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTAT
TTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTT
CTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z44

TACGGATCCTTATTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTACT
AGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTT
TTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCG
TTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATA
AGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGAT
TTCCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGG
TTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTT
TTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCT
ATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTG

>Z45

TTAAATTATAAGGATCCTTATTATAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTAT
ATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGA
TAGGCGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAG
TTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGT
TTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTT
TATCGAGATTTCTTATAACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCA
TTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTT
CTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTG
TTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTAT
GCTA

>Z46

ACGGATCCTTATTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTACTACTA
GTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTT
TGGAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGT
TTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAA
GTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATT

TCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGT
TTATCTAGTGTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTCTTCTATTTT
TTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTA
TTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACTATGCTA

>Z47

TTTAAATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTAT
ATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTTTGA
TAGGCGGTTTTGGAAATTTTTGTTGCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAG
TTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGT
TTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTT
TATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCA
TTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTTT
CTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTG
TTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCGATTACTA
TGCTA

>Z48

GTTTAAATTTTACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTA
TATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTG
ATAGGCGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAA
GTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTG
TTTTATAATAAGTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCT
TTATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGC
ATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTTAAATTTTATTACTACTATTTTT
TCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTT
GTTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTACT
ATGCTAAA

>Z49

GTTTAAATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTACAATT
ATATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCT
GATAGGCGGTTTTGGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTA
AGTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTT
GTTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACC
TTTATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTG

CATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTT
TTTCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTAT
TTGTTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTAT

>Z51

ACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCACTA
GTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCTGATAGGCGGTTT
TGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCTCGT
TTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAATAA
GTTTATGAATCGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAGATT
TCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCTGGT
TTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTATTTT
TTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTTCTA
TTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGC

>Z52

CGTTTAAATTATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATT
ATATTATCACTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTCT
GATAGGCGGTTTTTGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTA
AGTTTACCTCGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTT
GTTTTATAATAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACC
TTTATCGAGATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTG
CATTTAGCTGGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTT
TTTCTTCTATTTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTAT
TTGTTTACTTCTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTATTAC
TATGCTA

>Z53

TATACGGATCCTTATTTTAATTTAATTGCTCCGGAGGTTTATAATTATATTATCA
CTAGTCATGGTTTGGCTATGATTTTTTTCTTTTTGATGCCAGTTTTGATAGGCGG
TTTTTGAAATTTTTTGTTCCTTTATTGCTAGGTATGCCTGATTTAAGTTTACCT
CGTTTAAATGCTTTAAGTGCTTGGTTAATGTTGCCATCTGCTGTTTGTTTTATAA
TAAGTTTATGAATTGGTTCTGGTGTGGTTGAACTTTTTATCCACCTTTATCGAG
ATTTCCCTTATACCGGTATAGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTGCATTTAGCT
GGTTTATCTAGTGTTTTTGGTTCGTAAATTTTATTACTACTATTTTTTCTTCTAT

TTTTTATTTTATTAATACCCGTGTTTCTATTATTGTTTGGGCTTATTTGTTTACTT
CTATTCTCTTGTTATCTTCATTGCCAGTTTTGGCTGCTGCTA

3.2.2. mtCOI Gen Bölgesi Genetik Analizi

Dizileri hizalanan *Diplostomum* sp. örnekleri DnaSP Version 5.10 programı ile haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği belirlenmiştir. Buna göre 479 baz çifti ile oluşturulmuş hizalama sonuçlarına göre sekiz çeşit haplotip tespit edilmiştir (Tablo 3.1). ayrıca haplotip çeşitliliği (Hd) 0,6692 olarak elde edilmiştir.

Çalışmada belirlenen her bir haplotip dizisi GenBank BLAST analizi ile karşılaştırılmış ve çalışma örneklerinin % 100 ident oranı ile *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) ile uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. mtDNA COI gen bölgesi haplotip bilgileri

Haplotipler	DNA dizisi belirlenen örnekler	Tür adı
Haplotip 1	[Z1]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 2	[Z2, Z3, Z6, Z7, Z10, Z11, Z12, Z14, Z15, Z16, Z17, Z18, Z20, Z21, Z22, Z24, Z29, Z33, Z34, Z35, Z39, Z41, Z44, Z46, Z52]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 3	[Z4, Z9, Z19, Z25, Z27, Z28, Z31, Z37, Z38, Z42, Z43, Z48, Z51]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 4	[Z5]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 5	[Z8, Z13, Z30, Z36, Z49]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 6	[Z40]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 7	[Z45]	<i>Diplostomum spathaceum</i>
Haplotip 8	[Z47, Z53]	<i>Diplostomum spathaceum</i>

Bu haplotipler kullanılarak tür içi genetik uzaklık değeri Kimura-2-Parametre (K2P) ve baz değişim modeline dayanarak MEGA7 programı ile hesaplanmıştır (Tablo 3.2).

Buna göre en düşük genetik uzaklık 0.00209 değerinde Haplotip 2 ile Haplotip 1, Haplotip 3, Haplotip 5 ve Haplotip 6 arasında bulunmuştur. En yüksek genetik uzaklık ise 0,01264 değerinde Haplotip 7 ile Haplotip 4 arasında bulunmuştur.

Tablo 3.2. COI gen bölgesi pairwise uzaklık ilişkisi (Haplotip 1, Haplotip 2, Haplotip 3, Haplotip 4, Haplotip 5, Haplotip 6, Haplotip 7, Haplotip 8)

	Haplotip 1	Haplotip 2	Haplotip 3	Haplotip 4	Haplotip 5	Haplotip 6	Haplotip 7	Haplotip 8
Haplotip 1	0							
Haplotip 2	0,00209	0						
Haplotip 3	0,00419	0,00209	0					
Haplotip 4	0,00842	0,00630	0,00419	0				
Haplotip 5	0,00419	0,00209	0,00419	0,00419	0			
Haplotip 6	0,00419	0,00209	0,00419	0,00841	0,00419	0		
Haplotip 7	0,00840	0,00629	0,00840	0,01264	0,00840	0,00840	0	
Haplotip 8	0,00419	0,00209	0,00419	0,00842	0,00419	0,00419	0,00840	0

Dizi analizi sonucunda elde edilen tüm haplotipler için Bioedit programı ile nükleotit kompozisyonu hazırlanmıştır (Tablo 3.2). Buna göre analiz edilen tüm haplotiplerde T baz oranının en yüksek değerde olduğu belirlenmiştir. A ve G bazlarının ise oranları birbirine çok yakın değerde elde edilmiştir. En az orana ise C bazı sahiptir. Böylece tüm haplotiplerde A+T oranı % 68'in üzerinde bulunmuştur.

Tablo 3.3. Haplotipler için nükleotit kompozisyonu

	A	T	G	C	G+C (%)	A+T (%)	Toplam
Haplotip 1	18,37	50,10	17,75	13,78	31,52	68,48	479
Haplotip 2	18,37	50,31	17,75	13,57	31,32	68,68	479
Haplotip 3	18,37	50,10	17,75	13,78	31,52	68,48	479
Haplotip 4	18,58	49,90	17,54	13,99	31,52	68,48	479
Haplotip 5	18,37	50,10	17,75	13,78	31,52	68,48	479
Haplotip 6	18,37	50,10	17,95	13,57	31,52	68,48	479
Haplotip 7	18,79	50,10	17,95	13,15	31,11	68,89	479
Haplotip 8	18,37	50,52	17,75	13,36	31,11	68,89	479

3.2.2.1. Filogenetik ağaçların oluşturulması

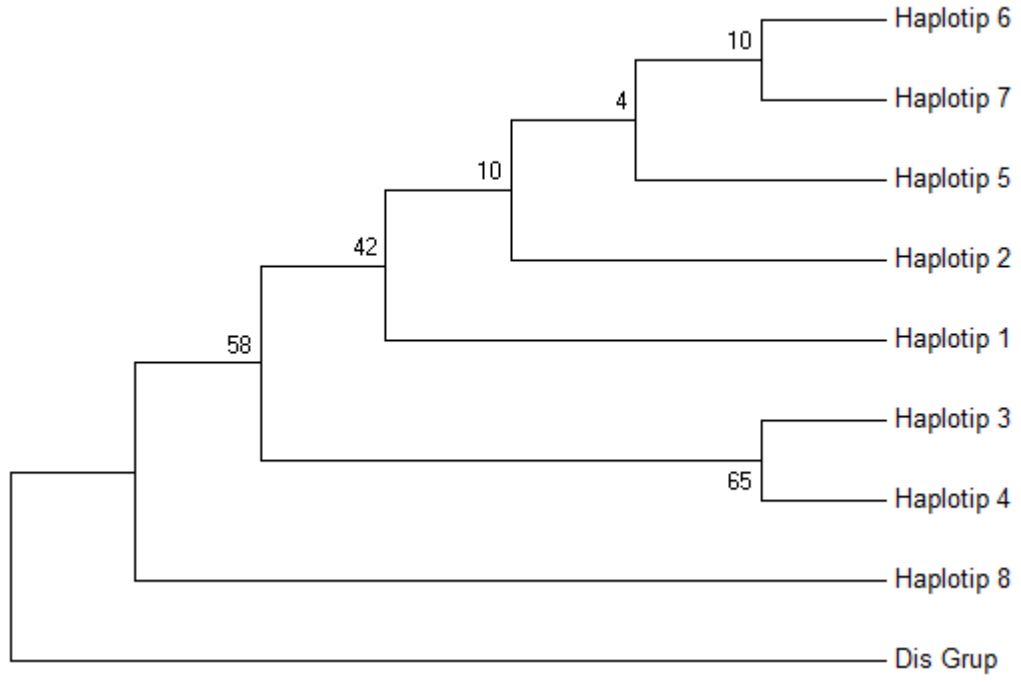
Çalışmada 8 haplotipe göre tür içi moleküler filogenetik ilişkiyi göstermek amacıyla Maximum Likelihood (ML), Neighbor Joining (NJ), Minimum Evolution (ME), Maksimum Parsimony (MP) ve Bayes metodları kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

MEGA7 programı kullanılarak oluşturulacak ağaçlarda en uygun model belirlenmiştir. Buna göre Tamura-Nei (TN93) modeline dayanan Maksimum Likelihood metodu oluşturulmuştur (Şekil 3.19). En yüksek ihtimale sahip olan ağaç (-739.9283) ile gösterilmiştir. İlk ağaç, Maksimum Composite Likelihood (MCL) yaklaşımı kullanılarak tahmin edilen mesafelerin bir matrisine Neighbour Join ve BioNJ algoritmaları uygulayarak ve daha sonra üstün olasılık değeri ile topolojiyi seçerek otomatik olarak elde edilmiştir. Oran farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gamma dağılımı kullanılmıştır (5 kategori (+ G, parametre=33.7881)). Buna ilaveten oran değişim modeli ([+ I],0.0010%) olarak değerlendirilmiştir. Analiz 9 nükleotid sekansını (8 haplotip+1 dış grup) ve 400 baz çiftini içermektedir.

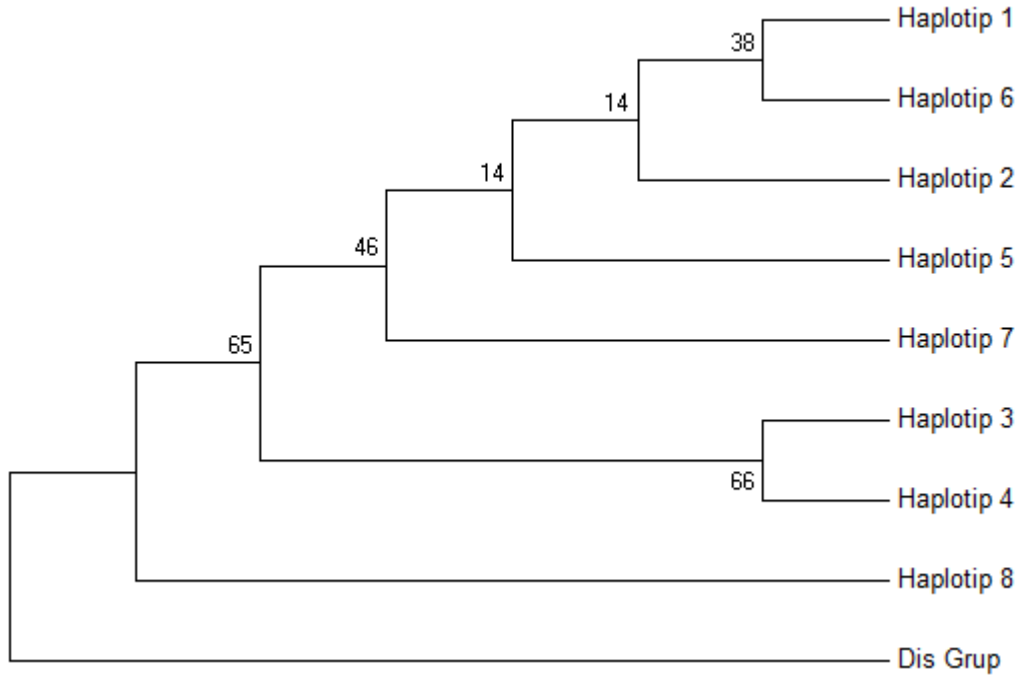
Neighbour Joining ağacı Şekil 3.20.'de verilmiştir. Buna göre en uygun ağaç toplam dal uzunluğu=0.20291874 ile gösterilmiştir. Ayrıca ilişkilendirilmiş taksonların bootstrap testinde bir araya getirildiği replikasyon yüzdesi (10000) dalların yanında belirtilmiştir. Mesafeler Tamura-Nei modeline göre hesaplanmış ve baz substitusyonlarının sayısal ifadeleri verilmiştir. Analiz 9 nükleotid sekansını (8 haplotip+1 dış grup) ve 400 baz çiftini içermektedir.

Minimum Evolution ağacı Şekil 3.21'de gösterilmiştir. Buna göre en uygun ağaç toplam dal uzunluğu=0.20291874 ile gösterilmiş olup ilişkilendirilmiş taksonların bootstrap testinde bir araya getirildiği replikasyon yüzdesi (10000) dalların yanında belirtilmiştir. Mesafeler Tamura-Nei modeline göre hesaplanmış ve baz substitusyonlarının sayısal ifadeleri verilmiştir. Minimum Evolution ağacı, Yakın Komşu Değişim (Close-Neighbor-Interchange, CNI) algoritması kullanılarak aranmıştır. Analiz 9 nükleotid sekansını (8 haplotip+1 dış grup) ve 400 baz çiftini içermektedir.

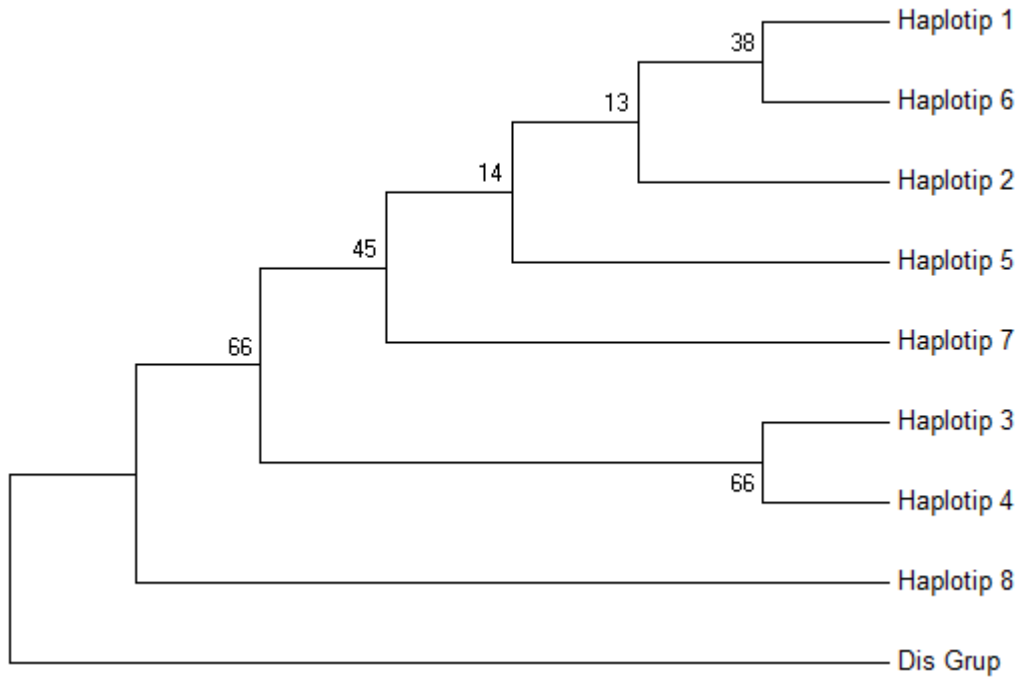
Çalışmada MrBayes v. 3.2.1x64 (Ronquist and Huelsenbeck 2003; Ronquist et al. 2011) programı kullanıldı. MrBayes programında analiz edilecek gen dizilimleri Nexus formatına Clustal-Omega'da EMBOSS tarafından hazırlandı. Hazırlanan nexus formatındaki Haplotype very kümesi; lset nst=6 rates=invgamma ve mcmc ngen=500000 samplefreq=100 printfreq=100 diagnfreq=1000 model ayarlarını kullanarak analiz edildi. 500.000 iterasyon sonucunda olasılıkların değerlendirilmesi için toplam 7.502 ağaç oluşturuldu. Bu ağaçlardan bir tane consensus ağacı oluşturuldu. Konsensus ağacındaki revizyon ve görüntüleme işlemi FigTree v1.4.3 programında hazırlandı (Şekil 3.22).



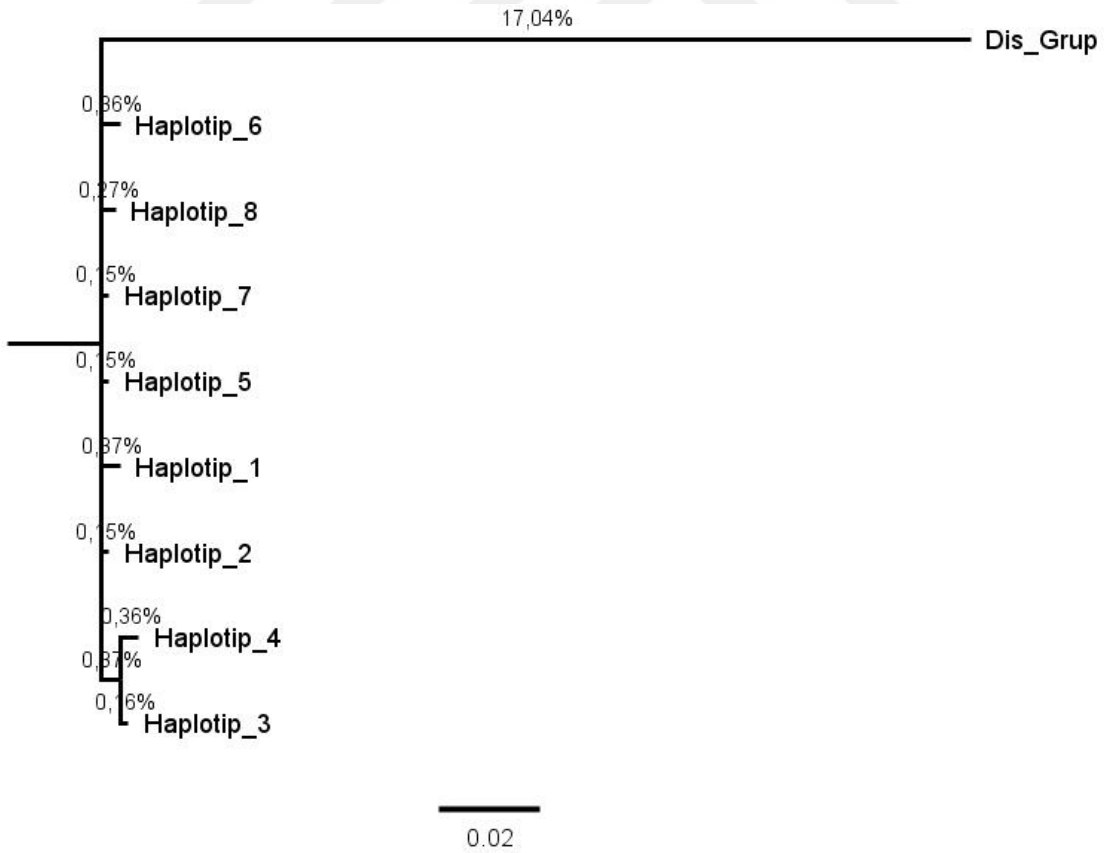
Şekil 3.19. COI gen bölgesi için dış gruplu Maximum Likelihood (ML) ağacı



Şekil 3.20. COI gen bölgesi için dış gruplu Neighbour Joining (NJ) ağacı



Şekil 3.21. COI gen bölgesi için dış gruplu Minimum Evolution (ME) ağacı



Şekil 3.22. COI gen bölgesi için dış gruplu Mr Bayes ağacı

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Elazığ ili sınırları içerisinde yer alan Keban Baraj Gölü, Karakaya Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nde doğal yayılım gösteren *Capoeta umbla* türünün gözlerinde bulunan *Diplostomum* sp.'ye ait genetik karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. *Diplostomum* sp.'ye ait morfolojik verilerle birlikte mitokondriyal sitokrom oksidaz I gen bölgesinin dizi analizi verileri birlikte değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan balık örnekleri Karakaya Baraj Gölü'nden 5 bölge, Keban Baraj Gölü'nden 6 bölge ve Hazar Gölü'nden 4 bölge olacak şekilde belirlenmiş ve toplam 150 birey kullanılmıştır. Balıkların morfolojik özellikleri kapsamında her üç göl için ağırlık, boy, yaş cinsiyet gibi parametreler değerlendirilmiş ve bu parametrelere göre balıkların taşıdıkları parazit sayıları ilişkilendirilmiştir. Buna göre Karakaya Baraj Gölü örnekleri için dişi balıkların erkek balıklara göre daha fazla parazit taşıdığı, balık boyu ve yaşı arttıkça parazit sayısının arttığı görülmüştür.

Keban Baraj Gölü örnekleri için ağırlık, boy ve yaş arttıkça parazit sayısında artış bulunmuş; cinsiyetlere göre değerlendirildiğinde de dişi balıkların daha fazla parazit taşıdığı elde edilmiştir.

Hazar Gölü'nden toplanan balıklarda ise balık ağırlığı ile parazit sayısı arasında pozitif ilişki bulunmuş; benzer şekilde boy ve yaş parametrelerinde de artışa paralel parazit sayısında artışlar kaydedilmiştir. Yine dişi balıkların erkek balıklardan daha fazla parazit taşıdığı da bulunmuştur.

Çalışma bölgelerinin hepsi birlikte değerlendirildiğinde dişi balıkların erkek balıklara göre daha fazla parazit taşıması; ağırlık, boy ve yaşı artmasıyla parazit sayısında da artışların görülmesi; çalışma sonuçlarının her üç bölgede uyumlu olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Ağırlık, boy ve yaşı artışına bağlı olarak görülen parazit sayısındaki artış ise ağırlığın, boyun ve yaşı artması için geçen süre artacağından balığın parazitlerle karşılaşma olasılığını artıracığından beklenen bir sonuçtur.

Cinsiyet faktörü ele alındığında ise dişi bireylerin erkek bireylere göre daha fazla sayıda parazit taşıması, dişi bireylerin üreme dönemlerinde daha fazla besine ihtiyaç duydukları ve besin olarak tükettikleri *Diplostomum*'un ara konakçısı salyangozlardan daha fazla faydalandıkları düşünülecek olursa dişi bireylerin daha fazla besine ihtiyaç duyduklarından dolayı, parazitlerle karşılaşma olasılığını da orantılı olarak artırmaktadır.

Ayrıca *Capoeta umbla* için popülasyonda dişi bireylerin sayısı daha fazla olması da yüksek parazitlenmeyi açıklayabilir.

Dörücü ve arkadaşlarının (2002) Keban Baraj Gölü'nde bulunan *Acanthobrama marmid*'in gözlerinde *Diplostomum* sp. enfeksiyonunun bulunuşu ve etkileri çalışmasında balığın ağırlık ve yaş faktörlerine göre parazitin yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu çalışma sonuçlarımız ile uyumlu bulunmuştur.

Barata (2012) tarafından yapılan Karakaya Baraj Gölü Kömürhan Bölgesinden yakalanabilen bazı balıklarda tespit edilen *Diplostomum* türlerinin yaygınlık, bolluk, yoğunluk ve enfeksiyon oranlarına bakılmış olup; dominant bir parazit türü olduğu belirtilmiştir. Ancak tür teşhisi morfolojik verilere dayandırılarak yapılamamıştır.

Kavak (2016) yaptığı çalışmada Keban Baraj Gölü Pertek Bölgesinde avcılığı yapılan bazı balık türlerini toplamış ve parazitlenme durumunu elde etmiştir. Buna göre iki önemli parazit türü bulmuş olup bunlardan biri de *Diplostomum* sp. olarak verilmiştir. Yine bu çalışmada *Diplostomum* tanımlanması yapılamamıştır.

Altan ve Soylu (2018) tarafından Sakarya Büyük Akgöl'den tahta balığının parazit kominitesi üzerine yaptığı çalışmada tüm konak balıklarda en az bir parazit türü tespit edilmiş olup, bu parazitler *Trichodina* sp., *Epystylis* sp., *Myxobolus* sp., *Dactylogyrus* sp., *Caryophyllaeus* sp., *Diplostomum* sp., *Tylodelphys* sp. ve *Postodiplostomum* sp. gibi parazitleri tespit etmiştir. Ancak bu çalışmada da yine *Diplostomum* sp.'nin tür tanımlanması morfolojik veriler ışığında gerçekleştirilememiştir.

Işıklı kaynağından (Çivril-Denizli) ağ kafeslerinde yetiştiriciliği yapılan Gökkuşığı Alabalığının parazit faunasının araştırıldığı çalışmada 4 parazit türü kaydedilmiş olup, bunlar *Trichodina* sp., *Diplostomum* sp., *Ichthyophthirius* sp. ve *Pomphorhynchus* sp. olarak verilmiştir. (Sözeren, 2015)

Ömerli Baraj Gölü balıkların Metazoan parazitleri Kırcalar (2013) tarafından araştırılmış olup *Dactylogyrus* cinsine ait 4 tür ve *Gyrodactylogyrus* sp. ile *Diplostomum* sp. parazitleri bulunmuştur. Bu çalışmada da *Gyrodactylogyrus* ve *Diplostomum* tür teşhisleri kesinleştirilmemiştir (Kırcalar, 2013).

Parazit toplulukları, coğrafi, ekolojik, filogenetik ve gelişimsel olarak birbirinden uzaktaki konakta farklı olmama eğilimi gösterirler. Ortak yön benzerliğinin bozulması ve buna bağlı olarak parazit çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmaları günümüzde hızla artmaktadır. Bu çalışmalarda bireysel konakçılar, konak popülasyonları ve konakçı

türlerdeki parazit topluluklarının benzerliği, konukçuların filogenezi, ekolojisi, mekânsal yakınlığı ve büyüklüğü değerlendirilmektedir.

Moszczyńska vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada Platyhelminthes'ler için COI geninin barkod bölgesi için primerler belirlemişlerdir. Ayrıca çoğu numunenin küçük olması ve numunelerdeki DNA'nın kalitesini ve miktarını değerlendirmek için ribozomal RNA (rRNA) geninin bir bölümünü çoğalttıklarını belirtmişlerdir. Plathelminthesler insan sağlığı, hayvancılık, su ürünleri yetiştiriciliği ve yaban hayatı yönetimi üzerinde ciddi etkilere neden olan parazitleri içeren çeşitli yassı solucanlar grubunu oluşturduğunu belirterek, rRNA genlerinin, tamamen bilinmeyen taksonominin örneklerini taramak için kullanılabileceği ve daha sonra, belirli COI primerlerinin tür düzeyinde tanımlamalar elde etmek için kullanılabileceği önerisinde bulunmuşlardır.

Locke vd. (2010)'nin Kanada'nın Lawrence Nehri'nde toplanan balıklardan elde ettikleri *Diplostomum* metaserkeryalarının türlerini teşhis etmek için yaptıkları çalışmada; tatlı su balıklarını dünya çapında parazitize eden bu parazitin morfolojik yönüne bağlı olarak türlerin tanımlanamadığını ve COI barkod bölgesi sekanslarını kullanarak 47 tür tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca COI sekansları tarafından desteklenen çoğu türlerin konakçı ve doku spesifiklerinin, rDNA'nın ITS sekansları tarafından desteklendiğini ortaya koymuşlardır.

Cavaleiro vd. (2012) tarafından *Diplostomum* türünün morfoloji, ultrastrüktür yapısı, genetik ve morfometrisi, Portekiz'in kuzeybatı sahilinden yakalanan Avrupa pisi balıklarından elde edilerek açıklanmıştır. Metacercarial evre, göz merceği kapsülünde kistleşmemiş olarak bulunmuş ve ışık mikroskobu gözlemleri ise tür içerisinde şekil ve boyut bakımından bazı değişkenliklerin olduğunu göstermiştir. Yuvarlak ve uzun olarak iki farklı morfotipi belirlenmiştir. Hem oral hem de ventral çekmenler, çok belirgin ultrastrüktürel özellikler sunan ve ventral emici durumunda göze çarpan, bir dizi papilla ile sağlanmıştır. Saptanan iki morfotipin, 18S ve 5.8S rDNA, ITS1 gen bölgesinde % 100 genetik uygunluğa sahip olduğu bulunmuştur. Bu metacercariaya ait genetik veriler GenBank'da bulunan *Diplostomum* türlerinden farklı olduğundan, yeni bir genotipe (erişim numarası GQ370809) ilişkin bir veri girişi sağlanmıştır. Pisi balığından elde edilen *Diplostomum* metaserkeryalarına ait moleküler filogenetik analizler, ana bileşenler ve morfometrik verilere dayanan küme analizleri ile bağlantılı olarak karşılaştırıldığında *Diplostomum spathaceum*'un *Diplostomum mergi*, *Diplostomum pseudospathaceum* ve

Diplostomum paracaudum ile farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu türlerin ikincisi, mevcut materyal ile en benzer şekilde bulunmuştur.

Georgieva vd. (2013)'nın Avrupa'daki *Diplostomum* türlerinin çeşitliliği için moleküler araştırmaya yönelik yapılan ilk çalışmada, COI gen bölgesi ve ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 barkod bölgelerindeki bağlayıcı sekans verilerini, Avrupa'da salyangoz, balık ve su kuşlarının larval ve olgun parazitlerinden elde ettiklerini belirtmişlerdir. COI ile salyangoz ve balık popülasyonlarında incelenen genetik olarak farklı altı *Diplostomum* soylarının varlığını ortaya koyarak, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 sekanslarının da COI tarafından saptanan sonuçları desteklediğini saptamışlardır. Orta Avrupa'da *Diplostomum spathaceum* ve *Diplostomum pseudospathaceum*'un yaşam döngülerinin moleküler açıdan aydınlatılması, tüm yaşam döngüsü aşamalarının morfolojisine dayanılarak salyangoz, balık ve kuşlarda doğal enfeksiyonlardan izolatların eşleştirilmesi ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu analizlerin, moleküler, morfolojik ve deneysel yaklaşımlar, moleküler uygulamaların değerlendirilmesine ihtiyaç duyan, genetik açıdan farklı soyların üç kompleksi, yani '*Diplostomum mergi*', '*Diplostomum baeri*' ve '*Diplostomum huronense*' olmak üzere 20 moleküler özellikli tür ve soyu tasvir ettiğini belirtmişlerdir.

Chibwana vd. (2013) Diplostomid trematodların, larval basamaklarının, doğal ve kültür balıklarında ciddi parazitik patojen etkilerine neden olabilecek olan, geniş ve çeşitli bir digenea grubundan oluştuğunu açıklayarak, özellikle tropik bölgelerde bu çalışmaların eksikliğini gözler önüne sermişlerdir. Çalışmada Afrika'da yayın balığı (*Clarias gariepinus*)'dan elde edilen parazitlerin COI barkod bölgesi ve ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 gen kümesi dizileri kullanılmıştır. Bu filogenetik analizlere dayanarak, *Diplostomum mashonense* Beverley-Burton (1963) yeni bir kombinasyon olarak değerlendirilmiş ve *Tylodelphys* cinsine dahil edilmiştir.

Tatlısu balıklarındaki parazit toplulukları, yıllık ve mevsimsel olarak değişiklik gösterebilmekte ve konakçıların uzunluğu, yaşı, cinsiyeti ve filogenezisinden ve parazit türleri arasındaki ilişkilerden etkilenebilmektedir. Desilets vd. (2013) tarafından yaz dönemi periyotlarında, beş yıllık aralıklarla toplanan 20 farklı balık türünde, bu faktörlerin *Diplostomum* çeşitliliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bazı *Diplostomum spp* arasında güçlü negatif ilişkiler bulunmuştur. Bu durum rekabetçi etkileşimler olduğunu düşündürmüştür. Bununla birlikte, en güçlü ilişki iki *Diplostomum spp.* (örn., vitreus mizahı ve mercek) arasında bulunmuş ve doğrudan rekabette başka

çevresel faktörlerin de etkili olabileceği açıklanmıştır. 2006 yılında enfeksiyon yoğunlukları yüksek iken 2010 ve 2011'de çarpıcı bir şekilde azalmıştır.

Diplostomum türlerine ait metacercariae larvaları, küresel olarak su ürünleri yetiştiriciliği uygulamaları için ciddi ekonomik tehdit oluşturan trematod parazitleridir. Metacercariae aşamasında *Diplostomum* belirlenmesindeki güçlükler, balık popülasyonlarında bu türlerin aktif rolünün aydınlatılmasında önemlidir. Nil tilapinin gözlerinden elde edilen diplostomoid metaserkariler 18S rDNA ve ITS (ITS1, ITS2) genleri kullanılarak karakterize edilmiştir (Ndeda 2013). Metacercariae'deki ITS rDNA gen veri kümesinin filogenetik analizleri *Diplostomum mashonense* ve *Diplostomum baeri* ile yakın ilişki olduğunu ortaya koymuştur. 18S rDNA sekanslarını kullanarak moleküler tanımlama *Diplostomum compactum*, *Diplostomum phoxini* ve *Diplostomum spathaceum* ile yakın ilişki ortaya koymuştur. Bu çalışmada *Diplostomum* cinsinin ribozom belirteçleri kullanılarak farklılaştırılması, 18S rDNA ve ITS genlerinin, türler arası filogenetik analiz için etkili genetik belirteçler olduğunu ve ileride diplostomoidi tanımlaması için kullanılmasını gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.

Kopenhag'ın Fures Gölü'ndeki üç bölgeden gelen tatlısu pulmoneri salyangozları, furkoserkarinin enfeksiyonu (laboratuarda dökülüp atılmak suretiyle) için taranmış ve elde edilen parazit larva moleküler yöntemlerle teşhis edilmiştir (ITS gen bölgesinin çoğaltılmasına göre). Salyangozlarda enfeksiyonun genel prevalansı % 2 olarak bulunmuştur. *Lymnaea stagnalis*'ten elde edilen cercariaelerin *Diplostomum pseudospathaceum* (prevalansı % 4) ve *Radix balthica*'tan *Diplostomum mergi* (prevalans % 2) olarak elde edilmiştir. Patojensiz gökkuşuğu alabalığı daha sonra izole serkaryalara maruz bırakılmış ve bu balıklarda da metaserkarinin enfeksiyon başarısı ve yeri tespit edilmiştir. Enfeksiyon deneyleri, her iki türün de, metaserarial evre için enfeksiyon yeri olarak göz merceği ile gökkuşuğu alabalığına bulaşabileceğini doğrulamıştır (Haarder, 2013).

Perez vd (2014) yapmış oldukları çalışmada, Orta ve Kuzey Avrupa'daki *Diplostomum* çeşitliliğini ortaya çıkararak çeşitli moleküler çalışmalar yapıldığını belirterek arakonaklardan salyangoz (*Lymnaea stagnalis* ve *Radix spp.*) için yapılmış olan çalışmaların sınırlı olduğunu bildirmişler ve bu çalışmayla morfolojik ve moleküler kanıtlar kullanarak boşluğu doldurmayı hedeflediklerini belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmada COI barkod bölgesi ve 5.8S rDNA, ITS1, ITS2 gen kümesinin komple dizileri kullanılmıştır.

Locke vd. (2015)'nin Diplostomidae türlerini bulmaya yönelik yaptıkları çalışmada balıkgözlerinde yaşayan metasekeryaların morfolojiye göre tanımlanmasının zor olduğu, bu yüzden DNA barkodlama tekniği kullanılarak Kuzey Amerika, Avrupa ve Afrika'daki diplostomidlerin çeşitlilik ve yaşam döngülerini açıklamaya çalıştıkları bildirilmiştir. 2000'in üzerindeki diplostomidler için sitokrom c oksidaz 1 (COI) barkodlarının ve bazı örneklerde ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 gen bölgelerine ait sekansların mesafeye dayalı analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 52 türün örnekleme yoğunluğu arttıkça, sitokrom c oksidaz I'deki varyasyonların türler arasında azaldığını ve artarken türlerin örneklendiği mekânsal ölçekte hiç etkilenme olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca *Tylodelphys jenynsiae*, *Tylodelphys immer* ve *Diplostomum ardeae*'nin de dahil olduğu çeşitli türlerde yeni yaşam döngüsü bağlantılarını, coğrafi ve ana kayıtları ve genetik verileri kaydedilmiştir. Sonuç olarak, lens içinde yaşayan *Diplostomum* türlerinin, konakçıya özgü ve diğer dokuları enfekte edenlerden daha az sayıda olduğu, lensteki bağışıklık aktivitesinin azalmasının türleşme oranlarını etkilediği fikrini ileri sürmüşlerdir.

Choudhary (2016) yapmış olduğu çalışmada iki siluroid balık konakçılarından *Opisthorchis* (*O. pedicellata* sp.1 ve *O. pedicellata* sp.2)'in izolatlarının arasındaki üç nükleer DNA'yı (18S, ITS1 ve ITS2) değerlendirmiştir. Moleküler analizler düşük benzerlikler göstermiş olup ITS1 için % 1.9 ve ITS2 için % 2.6 ve 18S için % 1.6'lık benzerlik göstermiştir. ITS2 bölgesinin ikincil yapısı, 1 ve 4 nolu sarmalların nispeten kısa, heliks 2'de U-U uyumsuzluğu ve 2 UGGG motifinin bulunduğu en uzun helezon (3) ile kayda değer bir fourhelix modeli sergilemiştir. MEGA 6'nın komşu birleştirme (NJ) ve maksimum ayırıştırma (MP) yöntemlerini kullanan filogenetik analizler, her iki izolatın da önemli destek (% 100) ile yakın bir grup oluşturduğunu göstermiştir.

2012-2014 yılları arasında Abşeron Yarımadası'nın Orta ve Güney sınırı kıyısında yer alan Hazar Bölgesi'ndeki 156 cyprinid balık türlerinden dört tanesi araştırılmış ve bu balık türlerinde 32 farklı parazit bulunmuştur. Bunlardan 14'ü cyprinidlere özgüdür. Monogeneanların 7 türü hariç, cyprinidlerin tüm parazitleri konakları değiştirerek gelişmektedir. Çoğu, bentik omurgasız hayvanları yediğinde balığa bulaşmaktadır. Çalışma sonucunda dört balık türünün parazit faunası arasında çok yüksek benzerlik (% 26.1-54.6) görülmüştür. Çünkü her balık türünün kendi parazit çeşitliliğine sahip olduğu görülmüştür. Çeşitli balık türlerinin parazit faunasındaki farklılıklar esas olarak hayat tarzı ve besin kompozisyonlarının özellikleriyle bağlantılı olarak açıklanmıştır (Mamedova ve Veliyeva, 2017).

Son yıllarda su ürünleri kültürü çok hızlı bir şekilde gelişmiştir. Bununla birlikte paraziter hastalıklarda da artışlar görülmüştür. Balık parazitlerini teşhis etmek için kullanılan birçok yöntem vardır. Van (2008) tarafından yapılan çalışmada, parazitlerin teşhisi için 2005 yılında Danimarka'nın Kopenhag kentinde bulunan Arreso Gölü'nden üç balık türüne ait 50 yabancı balık; roach (*Rutilus rutilus*), levrek (*Perca fluviatilis*) ve çipura (*Blicca bjoerkna*) toplanmıştır. Parazitolojik inceleme, normal gözlem, sıkıştırma, sindirim ve PCR yöntemleriyle parazitlerin teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları, vahşi balıklarda göz akısı metacercaria'nın (*Diplostomum* sp. tarafından enfekte edilmiş *Blicca bjoerkna*'nın % 100'ünde) yüksek bir prevalansı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda Elazığ ili sınırları içerisinde yer alan Karakaya Baraj Gölü, Keban Baraj Gölü ve Hazar Gölü'nde bulunan Capoeta umbla balıklarının gözünde enfeksiyona neden olan *Diplostomum* türlerinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler analizler COI gen dizisi verilerine göre değerlendirilmiş olup tüm örneklerin *Diplostomum spatchaeum* olduğu belirlenmiştir. Filogenetik analizler Haplotip 3 ile Haplotip 4 arasında yakınlığın olduğunu işaret etmektedir. Haplotip 3 ve Haplotip 4'ü oluşturan örnekler ise her üç çalışma bölgesindeki örnekleri kapsamaktadır. Hazar Gölü kapalı bir alan oluşturduğu için diğer iki bölge ile bağlantısı bulunmamaktadır. Ancak buna rağmen her üç bölgeden elde edilen *Diplostomum* örneklerinin yakın benzerlik göstermesi bölgeler arasında parazite ait ana konakçılar tarafından bulaştırılmış olabileceği fikrini doğurmuştur. Özellikle kuş türleri ile her üç bölge arasında parazitin taşınmasına aracılık etmiş olabilir. Bununla birlikte COI dizisi elde edilen tüm örneklerin *Diplostomum spatchaeum* olması, bu parazitin araştırma bölgelerinde prevalansının % 100 olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, Ş.**, 1999. Parazitlerin Fizyolojisi ve Konakçıyla Olan İlişkisi, *Doktora Semineri*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Akıncı, A.G.**, 1999. Apolyont Gölü Tahta Balıkları (*Blicca bjoerkna* L. 1758, Cyprinidae)'nda Plathelminth Parazitlerin Tesbitine Yönelik Araştırmalar, *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Aktaş, M. ve Dumanlı, N.**, 2009. Moleküler Parazitolojinin Veteriner Hekimlikte Uygulama Alanları, *Moleküler Parazitoloji*,s. 239-254, Ed. Özcel, M.A., Tanyüksel, M.
- Altan, A. ve Soylu, E.**, 2018. Sakarya Büyük Akgöl'den Tahta balığı *Blicca bjoerkna*'da parazit komünitenin kompozisyon ve yapısı, *Sakarya Su Ürünleri Dergisi*, 35(2)1-1.
- Anul, N.**, 1995. Karakaya Baraj Gölü Limnoloji Raporu, T.C. Bayındırlık ve İskan Bakanlığı D.S.İ. G. M. IX Bölge Müdürlüğü Su Ürünleri Başmühendisliği, Keban, 53s.
- Arda, M., Seçer, S. ve Sarıeyyüpoğlu, M.**, 2005. Balık Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Aygün M.G.** 2017. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kadmiyum (Cd) elementinin *Ludwigia glandulosa walter* ve *Alternanthera reineckii* Briq. bitkilerindeki genotoksik etkilerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Barata, S.**, 2012. Karakaya Baraj Gölü Kömürhan Bölgesinden yakalanan bazı balıklarda endohelminthlerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Beverley-Burton, M.**, 1963. Some digenetic trematodes from amphibians and reptiles in Southern Rhodesia including two new species and a new genus: *Sarumitrema hystatorchis* n.gen., n.sp. (Plagiorchiidae) and *Halipegus rhodesiensis* n.sp. (Halipegidae), *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 30 (1) 49-59.
- Bişkin, Z., Yıldırım, A., İnci, A. ve Düzlü, Ö.**, 2011. Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler, *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8 (1) 43-51.

- Blasco-Costa, I., Falty'nkova, A., Georgieva, S., Skirnisson, K., Scholz, T. ve Kostadinova, A.,** 2014. Fish pathogens near the Arctic Circle: molecular, morphological and ecological evidence for unexpected diversity of Diplostomum (Digenea: diplostomidae) in Iceland, International Journal for Parasitology, 44, 703–715.
- Bykhouskaya-Poulovskaya, I.E.,** 1964. Key to parasites of freshwater fishes of the USSR I-II-III Israel program for scientific translation, Jerusalem.
- Boore, J.L.,** 1999. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acid Research, 27: 1767-1780.
- Brown T.A.,** 2015. Genomlar, Nobel akademik Yayıncılık, Çeviri Editorleri: Bardakçı F. ve Ülger C. Ankara
- Bozari S.,** 2012. Lamiaceae Familyasına Ait Farklı Türlerden Elde Edilen Allelopatik Potansiyele Sahip Esansiyel Yağların Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bülbül, Ö.,** 2014. Fenotip ve Soya Ait Bilgi Veren SNP Noktalarının (markırlarının) Belirlenmesi ve Multipleks Kit Geliştirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul.
- Cavaleiro, F.I., Pina, S., Russell-Pinto, F., Rodrigues, P., Formigo, N.E., Gibson, D.I. and Santos, M.J.,** 2012. Morphology, ultrastructure, genetics, and morphometrics of Diplostomum sp. (Digenea: Diplostomidae) metacercariae infecting the European flounder, Platichthys flesus (L.) (Teleostei: Pleuronectidae), off the northwest coast of Portugal, Parasitol Res. 110:81–93.
- Chappell, L.H., Hardie, L.J. ve Secombes, C.J.,** 1994. Diplostomiasis: the disease and host-parasite interactions (eds. Pike, A.W. ve Lewis, J.W.) Parasitic Diseases. Samara Publishing Ltd, London.
- Chibwana, F.D., Blasco-Costa, I., Georgieva, S., Hosea K. M., Nkwengulila, G., Scholz, T. ve Kostadinova, A.,** 2013. A first insight into the barcodes for African diplostomids (Digenea: Diplostomidae): Brain parasites in Clarias gariepinus (Siluriformes: Clariidae), Infection, Genetics and Evolution, 17, 62–70.
- Choudhary, K. and Agrawal, N.,** 2016. Ribosomal DNA analysis of isolates of the liver fluke Opisthorchis pedicellata (Verma, 1927) from two siluroid fish species in India, Journal of Helminthology, page 1 of 10.

- Cooper, G.M.** 1997. *The Cell: A Molecular Approach*. The American Society for Microbiology, 1325 Massachuestts Avenue NW, Washington, USA, 673 p.
- Désilets, H.D., Locke, S.A., McLaughlin, J.D. ve Marcogliese, D.J.**, 2013. Community structure of *Diplostomum* spp. (Digenea: Diplostomidae) in eyes of fish: Main determinants and potential interspecific interactions, *International Journal for Parasitology* ,43, 929–939.
- Çoban, M.Z.**, 2010. *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843)'nın Elazığ Hazar Gölü ve Keban Baraj Gölü Populasyonlarının kanda glikoz ile kas ve karaciğerde glikojen seviyelerinin karşılaştırılması, Doktora Tezi, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Dick, T.A. ve Choudhury, A.**, 1995, Cestodea (Phylum: Plathelminthes), In *Fish and Disorders Vol. I Protozoan and Metazoan Infections*, CAB International CUP, Ed. Woo, P.K.
- Doğan, Y.**, 2014. Keban Baraj Gölü'nde Yaşayan *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) Otolit Biyometrisi, Yüksek Lisans Tezi, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Dörücü, M. ve İspir, Ü.**, 2001. Seasonal Variation of *Diplostomum* sp. Infection in Eyes of *Acanthobrama marmid* Heckel, 1843 in Keban Dam Lake, Elazığ, Turkey, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 18, (3-4): 301 – 305.
- Dörücü, M., Dilsiz, N. ve Grabbe, M.C.J.**, 2002. Occurrence and Effects of *Diplostomum* sp. Infection in Eyes of *Acanthobrama marmid* in Keban Dam Lake, *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 239-243.
- Dörücü, M. ve İspir, Ü.**, 2005. Keban Baraj Gölü'nden Avlanabilen Balık Türlerinde İç Paraziter Hastalıkların İncelenmesi, *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (2), 400-404.
- Dörücü, M., Kan, N.İ. ve Öztekin, Z.**, 2008, Keban Baraj Gölü'nden avlanan bazı balık türlerinde iç parazitlerin incelenmesi *Journal of Fisheries Sciences*, 2 (3) 484-488.
- Ekingen, G.**, 1983. Tatlı Su Balık Parazitleri, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Yüksek Okulu F.Ü. Basımevi, Elazığ.
- Ekingen, G., Erbuca, S.**, 1993. Elazığ Yöresi Balıkları Tanı Anahtarı, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 3, 1-18.
- Erer H.**, 2002. Balık Hastalıkları, 2. baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, sayfa 126-136, 169-176.
- Faltinková, A.**, 2005. Larval trematodes (Digenea) in molluscs from small water bodies near Šeské Budšjovice, Czech Republic. *Acta Parasitologica*. 50(1), 49–55.

- Filiz E. ve Koç, İ.**, 2011. Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2), 207-214207
- Freudenreich,C.H., J.B Stavenhagen., V.A. Zakian**, 1997. Stability of a CTG:CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. Mol. Cell Biol.,4,2090–2098.
- Gasser, R.B.**, 2006. Molecular tools advances, opportunities and prospects, Vet Parasitol, 136, 69-89.
- Geldiay, R. ve Balık, S.**, 1996. Türkiye Tatlısu Balıkları (Ders Kitabı), IV. Baskı, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:46 Ders Kitabı Dizini No: 16, Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Basımevi, Bornova/ İzmir, 532 s.
- Georgieva, S., Soldanova, M., Perez-del-Olmo, A., Dangel, D.R., c, Jilji Sitko, J., Bernd Sures, B. ve Kostadinova, A.**, 2013. Molecular prospecting for European Diplostomum (Digenea: Diplostomidae) reveals cryptic diversity, International Journal for Parasitology, 43, 57–72.
- Göl D.**, 2015. Mercimek genomunda rekombinant kendilenmiş hatları kullanarak AFLP and SNP markırlarının haritalanması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Haarder, S., Jorgensen, K., Kania, P.W., Skovgaard, A. and Buchmann,K.**, 2013. Occurrence of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 and *D. mergi* Dubois, 1932 (Digenea: Diplostomidae) in Danish freshwater snails: ecological and molecular data, Folia Parasitologica 60 (2): 177–180.
- Hodgkinson, J.E.**, 2006. Molecular diagnosis and equine parasitology, Vet Parasitol, 136, 109-16.
- Hoffman, G.L.**, 1967. Parasites of North American Freshwater Fishes, University of California Press, Berkely and Los Angeles.
- Kavak M.**, 2016. Keban Baraj Gölü Pertek bölgesinde (5.bölge) avcılığı yapılan balıklarda endohelminthlerin araştırılması, Tunceli Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Su Mühendisliği Bilim Dalı, Yüksel Lisans Tezi
- Kennedy, C.R.**, 1974. A checklist of British and Irish freshwater fish parasites with notes on their distribution, *Journal of Fish Biology*, 6, 613-644.

- Keskin E.**, 2013. Türkiye'deki ekonomik öneme sahip su ürünlerinin DNA barkodlarının çıkarılması Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi
- Kırcalar, F.**, 2013. Ömerli Baraj Gölü Balıklarının Metazoan Parazitleri, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Küçükyılmaz, M., Uslu, G., Birici, N., Örnekçi, N.G., Yıldız, N. ve Şeker, T.**, 2010. Karakaya Baraj Gölü Su Kalitesinin İncelenmesi. *International Sustainable Water and Wastewater Management Symposium*, (26 – 28 October), Konya.
- Lightowers, R.N., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., Howell, N.**, 1997. Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. *TIG* (13): 450-455.
- Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Dayanandan, S. ve Marcogliese, D. J.**, 2010. Diversity and specificity in Diplostomum spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by cytochrome c oxidase I and internal transcribed spacer sequences, *International Journal for Parasitology*, (40) 333–343.
- Locke, S.A., Al-Nasiri, F.S., Caffara, M., Drago, F., Kalbe, M., Lapierre, A.R., McLaughlin, J.D., Nie, P., Overstreet, R.M., Geza Souza, T.R., Takemoto, R.M. ve Marcogliese, D.J.**, 2015. Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes, *International Journal for Parasitology*, *International Journal for Parasitology* (45) 841–855.
- Markevic, A.P.**, 1951. Parasitic fauna of freshwater fish of the Ukrainian SSR, Israel program for scientific translations, Jerusalem, 95-255s.
- Mamedova, S.N. and Veliyeva, G.A.**, 2017. Parasite fauna of the Caspian Sea cyprinid fish (Cyprinidae) in near-shore area of the Absheron Peninsula, *International Journal of Zoology Studies*, 2(1), 14-16.
- Matsuoka, Y.**, 2002. S.E. Mitchell, S. Kresovich, M. Goodman, J. Doebley, Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 436-450.
- Moszczyńska, A., Locke, S.A., McLaughlin, J.D., Marcogliese, D.J. ve Crease, T.J.**, 2009. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths, *Molecular Ecology Resources*, 9 (1) 75–82.

- Mwita, C.J.**, 2011. Host-Parasites Relationship for Lake Victoria Clariid Fishes and Their Parasite Fauna, *Tanz. J. Sci. Short Comm.*,**37**, 179-185.
- Ndeda, V.M., Owiti, D.O., Aketch, B.O., Onyango, D.M.**, 2013. Genetic Relatedness of *Diplostomum* Species (Digenea: Diplostomidae) Infesting Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) in Western Kenya, *Open Journal of Applied Sciences*, (3) 441-448.
- Öge, H.**, 1999. Balık Tüketiminde Ekonomik ve Sağlık Yönünden Önemli Parazitler. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 23 (4) 440-445.
- Öge, S.**, 2005. Balıkların parazitler hastalıklarında tedavi. Editörler: Burgu, A. ve Karaer, Z. Veteriner Hekimliğinde parazit hastalıklarında tedavi, *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 19, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir*, 287-306s.
- Özkara H.A.** 2003. Mutasyon Tarama Yöntemleri *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2003; 1: (47-53)
- Pareek, N., Jakhar, M. L., & Malik, C. P.** (2017). Analysis of genetic diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 206-215.
- Perez-del-Olmo, A., Georgieva, S., Pula, H. and Kostadinova, A.**, 2014. Molecular and morphological evidence for threespecies of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae), parasites of fishes and fish-eating birds in Spain, *Parasites & Vectors*, 7:502
- Powell, W., G.C. Machray, veJ. Provan**, 1996. Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215-221
- Primrose, S. B., Twyman, R. M.**, 2006. *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, 7th Ed., Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Richter, C.**, 1988. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging. *FEBS lett*, 241:1-5.
- Selver, M.M.**, 2008. Kocadere Deresi'nden Yakalanan Bazı Balık Türlerindeki Helmint Faunası, , Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Seyhan D.**, 2013. Türkiye denizlerinde bulunan Scombridae familyasına ait türlerin moleküler filogenetiği, Mustafa Kemal Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Shwani, A. ve Shamall M.A.A.** 2010. Endoparasites of the asian catfish *silurus triostegus* (Heckel, 1843) From Greater Zab River- Kurdistan region- Iraq j. *Duhok Univ. Vol.13, No.1, Pp 172-179, 2010 University of Duhok 4-6 May, 2010.*

- Šimková, A., Navrátilová, P., Dávidová, M., Ondračková, M., Sinama, M., Chappaz, R., Gilles, A., and Costedoat, C.,** 2012. Does invasive *Chondrostoma nasus* shift the parasite community structure of endemic *Parachondrostoma toxostoma* in sympatric zones?, *Parasites & Vectors*, 5: 200.
- Sözeren, D.,** 2015. Işıklı Kaynağında (Çivril-Denizli) Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Gökkuşluğu Alabalığı *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)'nin Parazit Faunası, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Thakar, P., Chauhan, R. M., & Joshi, P.** (2017). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Released Varieties and Hybrids of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] of Gujarat. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(1), 674-678.
- Tiğın, Y., Burgu, A., Doğanay, A., Öge, H. ve Öge, S.,** 1992. Balık parazitleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 16(1): 103-119.
- Tokşen, E., Çağırğan, H. ve Tanrıku, T.T.,** 1996. Balıklarda görülen metazoa parazitler hastalıkları. *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, Balık Hastalıkları Özel Sayı*, 20 (34): 71-103.
- Toparlan E.** 2015. Kızılırmak deltasında yetiştirilen Anadolu mandalırının PRL, CSN3 ve PIT-1 genleri bakımından genotiplerinin PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Topdemir S.,** 2017. Bitlis ilindeki Lamiaceae familyasına ait bazı taksonların RAPD-PCR tekniği ile filogenetik analizi, Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Turan, H., Kaya, Y. ve Sönmez, G.,** 2006. Balık Etinin Besin Değeri ve İnsan Sağlığındaki Yeri, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23, (1/3): 505-508
- Ünal G.,** 2016. Trakya bölgesindeki bal arılarında (*Apis mellifera* L.) mtDNA sitokrom c oksidaz altbirim I (COI) geni analizi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Van, K.V. and Thuy, D.T.,** 2008. Comparison of Diagnostic Methods for the Detection of Parasites in Fish, *Journal of Science and Development* 136-144.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski AJ, Tingey SV,** 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6531-6535.

Williams, H. and Jones, A., 1994. Parasitic Worms of Fish, Taylor & Francis Ltd., London. p. 593.

URL 1 https://www.google.com.tr/search?q=capoeta+umbla&rlz=1C1NHXLtrTR753TR754&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi6tabDguraAhWFchQKHYYFcALYQ_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=175asgISAzLNLM: 10.01.2018

URL2 https://www.researchgate.net/figure/Life-cycle-of-Diplostomum_spathaceum_283077225. 05.01.2018

URL 3 <https://www.thermofisher.com/fr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>. 17.02.2018

URL 4 http://www.turkhaygen.gov.tr/doc/Populasyon_Genomigi_Calistayi_II.pdf. 22.01.2018

ÖZGEÇMİŞ

Elazığ'da 1983 yılında doğdum. İlkokulu Bahçelievler, ortaokulu Orgeneral Bedrettin Demirel İlköğretim okulunda, liseyi Balakgazi Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi ve Özel Harput Kolejinde okudum. 2004 yılında Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği'nde lisans eğitimime başladım ve 2008 yılında mezun oldum. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı, Balık Hastalıkları Bilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü Balık Hastalıkları Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaya başladım. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı, Balık Hastalıkları Bilim Dalında yüksek lisansımı tamamladım. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı, Balık Hastalıkları Bilim Dalında doktora programına başladım. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.