

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KURA-ARAS HAVZASINDA ENDEMİK OLARAK YAYILIŞ
GÖSTEREN *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) TÜRÜNÜN
MİTOKONDRIYAL DNA DİZİ ANALİZİ İLE MOLEKÜLER
FİLOGENİSİ

Duygu TANRIKULU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Ali KIRPIK

II. DANIŞMAN

Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ

EYLÜL - 2017

KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**KURA-ARAS HAVZASINDA ENDEMİK OLARAK YAYILIŞ
GÖSTEREN *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) TÜRÜNÜN
MİTOKONDRIYAL DNA DİZİ ANALİZİ İLE MOLEKÜLER
FİLOGENİSİ**

Duygu TANRIKULU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Ali KIRPIK

II. DANIŞMAN

Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ


EYLÜL - 2017

KARS

Bu tez çalışması Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2016-FM90

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Duygu TANRIKULU'nun Prof. Dr. Mehmet Ali KIRPIK danışmanlığında Doktora tezi olarak hazırladığı “**Kura-Aras Havzasında Endemik Olarak Yayılış Gösteren *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) Türünün Mitokondriyal DNA Dizi Analizi ile Moleküler Filogenisi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

15/09/2017

	Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Mehmet Ali KIRPIK	
Üye	: Doç. Dr. Ecevit EYDURAN	
Üye	: Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ	
Üye	: Yard. Doç. Dr İnan KAYA	
Üye	: Yard. Doç. Dr Evren KOÇ	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun . . / . . / 20. . gün ve / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Özlem GÜRSOY KOL

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Duygu YANRIKULU

15.09.2017

ÖZET

(Doktora Tezi)

KURA-ARAS HAVZASINDA ENDEMİK OLARAK YAYILIŞ GÖSTEREN
Acanthalburnus microlepis (De Filippi, 1863) TÜRÜNÜN MİTOKONDRİYAL DNA
DİZİ ANALİZİ İLE MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

Duygu TANRIKULU

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ali KIRPIK

II. Danışman: Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ

Cyprinidae familyası, dünyanın çok büyük kısmında dağılım gösteren, birey ve tür sayısı bakımından oldukça zengin bir familyadır. Bu çeşitlilikten dolayı familyanın filogenetik ilişkileri iyi anlaşılammıştır. Bu çalışma ile Kura-Aras Havzasında endemik olarak yayılış gösteren ve Cyprinidae familyasına ait olan *Acanthalburnus microlepis* türünün, kendi içindeki filogenetik ilişkisi mtDNA sitokrom c oksidaz alt ünite I (COI) ve sitokrom b (cytb) dizileri kullanılarak araştırılmıştır. Kura-Aras Havzasının Türkiye sınırları içerisinde kalan bölümünde çeşitli lokasyonlardan alınan türlerin yüzgeç ve kas dokularından total DNA elde edilmiştir. Total DNA, mtDNA için kaynak olarak kullanılmıştır. Hedef gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Taksonların birbirleriyle ve diğer taksonlarla olan ilişkileri filogenetik ağaç oluşturularak belirlenmiştir. Sonuç olarak, farklı lokalitelerden alınan türlerin filogenetik olarak benzer olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. *Acanthalburnus microlepis* VIII. soy içerisinde yer almaktadır. Bu cinsin *Acanthobrama*'nın sinonimi olduğu da bu çalışma ile doğrulanmıştır. Ayrıca, bu türe ait COI gen sekansının bir DNA barkodu olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Acanthalburnus microlepis*, mtDNA, COI, cytb, Filogeni

2017, 85 sayfa

ABSTRACT

(Doctorate Thesis)

MOLECULAR PHYLOGENY OF *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863),
SPECIES LOCATED ENDEMICALLY IN THE KURA-ARAS BASIN BY THE
ANALYSES OF THE MITOCHODRIAL DNA SEQUENCES

Duygu TANRIKULU

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Mehmet Ali KIRPIK

Supervisor II: Ass. Prof. Cem ÖZİÇ

Cyprinidae is a very rich family in terms of members and species widely distributed in the world. Due to this diversity the phylogenetic relations of the family are not well understood. In this study, located as endemic in the Kura-Aras Basin, *Acanthalburnus microlepis* was investigated to determine the phylogenetic relationship of the species by using mitochondrial DNA COI and cyt b sequences. Total DNA was obtained from the fin and muscle tissues of species taken from various locations of the Kura-Aras Basin within the borders of Turkey. Total DNA was used as a source for mtDNA. The target gene regions were replicated by PCR. The relationship of taxa with each other and with other taxa was shown on a phylogenetic tree. As a result, it was evaluated that the species taken from different localities were found to be phylogenetically similar but there was no significant difference between them. According to the study, it was found that *Acanthalburnus microlepis* was belonged to Lineage VIII. It was also confirmed that this genus is synonymous with *Acanthobrama*. Furthermore, it was determined that the COI gene sequence of this species would be a DNA barcode.

Key Words: *Acanthalburnus microlepis*, mtDNA, COI, cytb, Phylogeny

2017, page 85

ÖNSÖZ

“Kura-Aras Havzasında Endemik Olarak Yayılış Gösteren *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) Türünün Mitokondriyal DNA Dizi Analizi ile Moleküler Filogenisi” adlı bu çalışmada;

Çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalışma disiplini ve çalışma süreci yönetimini bana öğreten, tez çalışmamın her aşamasının en ideal hale dönüşmesinde katkı sağlayan danışmanlarım Prof. Dr. Mehmet Ali KIRPIK ve Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ’e,

Arazi çalışmamın rotalarını belirleyen, akademik anlamda her zaman destek veren, bana yaptığım işi sevmeyi öğreten ve başarabileceğime inandıran, akademik etik hususunda dikkat etmem gereken noktaları gösteren, beni kendimle yüzleştiren potansiyelimi fark etmemi sağlayan Yard. Doç. Dr. Mucip DEMİR’e,

Doktora sürecimin bir kısmında birlikte yol aldığımız ve bana rehberlik eden değerli hocam Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ’a, bir problemle karşılaştığımda bilgi, deneyim ve zamanını sabırla benimle paylaşan Yard. Doç. Dr. Mustafa Kemal ALTUNOĞLU’na,

Oldukça yorucu geçen bu süreçte tükendiğimi hissettiğim zamanlarda yola devam edebilmem için güç aldığım değerli dostlarıma ve mesai arkadaşlarıma,

Arazi çalışmamın yönetiminde ve örneklerin toplanmasında yanımda olan, en zor anlarımda sonsuz sabır ve şefkat sunan, bana inanan, başarıyı kutsayan ve coşkusuyla beni onurlandıran sevgili yol arkadaşşıma,

Tekâmülümde önemli bir etkiye sahip, gördüğüm rüyanın en değerli karakterleri, sevgili aileme,

Varolma nedenime, dilediğimde sebepleri var eden, ben’i BEN yapan, karşıma çıkardığı her kişi, olay ve vesileler, rehberler için Yaradanıma, Öz’üme,

Hepinize sonsuz teşekkürler ederim.

Duygu TANRIKULU

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
HARİTALAR DİZİNİ.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Filogenetik Sistematikte Moleküler Yöntemlerin Kullanılması.....	3
1.3 Cyprinidae Familyası ile İlgili Bilgiler.....	5
1.4 Moleküler Belirteçler Olarak mtDNA Sekansları (COI ve cytb).....	7
1.5 Filogenetik Bir Çalışmanın Süreçleri.....	12
1.5.1 Verilerin Belirlenmesi ve Örnekleme.....	12
1.5.2 Dizileme ve Hizalama.....	13
1.5.3 Evrimsel Modelin Belirlenmesi.....	13
1.5.4 Filogenetik Analiz ve Ağaç Oluşturma.....	14
1.5.4.1 Uzaklık Temelli Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri.....	15
1.5.4.1.1 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average).....	16
1.5.4.1.2 Fitch-Margoliash Yöntemi.....	16
1.5.4.1.3 Neighbour Joining (Komşu Bağlantı) Yöntemi.....	17
1.5.4.2 Dizi Temelli Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri.....	17
1.5.4.2.1 Maksimum Parsimoni (Tutumluluk) Yöntemi.....	18
1.5.4.2.2 Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık) Yöntemi.....	18
1.5.4.2.3 Bayesian Yöntemi.....	19
1.5.4.3 Filogenetik Ağaçlarda Güvenilirlik Testi ve Seç-Bağla Analizi.....	19
1.6 <i>Acanthalburnus microlepis</i> ile İlgili Bilgiler.....	20
1.7 Çalışma Alanı ve Genel Özellikleri.....	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
2.1 Örneklerin Toplanması ve Çalışma Alanı.....	27

2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	40
2.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	41
2.4 Total DNA Elde Edilmesi	42
2.5 DNA'ların Spektrofotometrik Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini.....	43
2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	43
2.7 Agaroz Jel Analizi ve Jel Görüntüleme İşlemi.....	44
2.8 Dizi Analizi	45
2.9 Filogenetik Analiz	46
3. BULGULAR	47
3.1 Total DNA Elde Edilmesi ve Spektrofotometrik Ölçüm	47
3.2 Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	48
3.3 Dizi Analizi	49
3.4 Filogenetik Analiz	50
4. TARTIŞMA-SONUÇ	51
5. KAYNAKLAR	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Balık Mitokondriyal DNA'sı [26]	8
Şekil 1.2 Filogenetik ağaç diyagramı (Bu ağacı okumaya en alttan başlanarak yukarıya doğru ilerlenir. A ile işaret edilen düğümde yer alan populasyon 1-6. taksonların ortak atası olarak kabul edilir. Gruplardan biri 1. taksona evrilirken, diğeri 1-5. taksonların ortak atası olan B ile işaret edilen düğümdeki populusyona evrilmiştir) [1].....	15
Şekil 1.3 <i>Acanthalburnus microlepis</i> 'in morfolojik teşhisinde faydalanılan kısımlardan bazıları; a. Sol dentary, b. Maksilla c. Kleitrum d. Faringeal dişler e. Solungaç dikenleri f. Supraetmoit kemik [87].....	22
Şekil 1.4 <i>Acanthalburnus microlepis</i>	23
Şekil 1.6 Kura-Aras Nehirleri	26
Şekil 1.7 Kura-Aras Havzası [6].....	26
Şekil 2.1 Örnekleme yapılırken	30
Şekil 2.2 Altaş köyü	30
Şekil 2.3 Sevimliköy	31
Şekil 2.4 Akkiraz köyü	32
Şekil 2.5 Kartalpınar köyü	33
Şekil 2.8 Ağzıpek köyü.....	34
Şekil 2.9 Bağdaşan köyü.....	35
Şekil 2.10 Bölükbaş köyü	36
Şekil 2.11 Çamçavuş köyü.....	36
Şekil 2.12 Büyük Aküzüm köyü.....	37
Şekil 2.13 Meydancık köyü	37
Şekil 2.14 Kekeç suyu	38
Şekil 2.15 Karakurt	39
Şekil 2.16 Halıkışla köprü	39
Şekil 2.17 Aras nehri ana kol.....	40
Şekil 3.1 Bazı <i>Acanthalburnus</i> türlerine ait COI geni için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	49
Şekil 3.2 Bazı <i>Acanthalburnus</i> türlerine ait cytb geni için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	49

Şekil 3.3 *Acanthalburnus microlepis*'in farklı türler ile yapılan fillogenetik ağacı (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır).....50



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kura nehri havzasında yer alan lokasyonlar	28
Çizelge 2.2 Aras nehri havzasında yer alan lokasyonlar	28
Çizelge 2.3 COI ve cytb gen bölgeleri için kullanılan primerlerin nükleotid sekansları	43
Çizelge 2.4 COI ve cytb gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı (karışım her iki gen bölgesi için 55 örnek üzerinden hesaplanarak hazırlanmıştır)	44
Çizelge 2.5 COI ve cytb gen bölgelerinin çoğaltılması için gereken PCR koşulları	44
Çizelge 3.1 Tüm örneklerle ait total DNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	47
Çizelge 3.1 Tüm örneklerle ait total DNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Devamı)	48
Çizelge 4.1 VIII. soy hattı içerisinde yer alan türler	53

HARİTALAR DİZİNİ

Harita 2.1 Kura Nehri Üzerinde Bulunan Lokasyonlar	29
Harita 2.2 Aras Nehri Üzerinde Bulunan Lokasyonlar.....	29



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA : Deoksiribo nükleik asit

mtDNA: Mitokondriyal DNA

COI : Sitokrom oksidaz I

Cytb : Sitokrom b

kb : Kilobaz

TCA : Trikarboksilik asit

tRNA : Taşıyıcı RNA

rRNA : Ribozomal RNA

mRNA: Messenger RNA

μ l : Mikro litre

km : Kilometre

$^{\circ}$ C : Santigrat derece

m^3/sn : Metreküp bölü saniye

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

SDS : Sodyum dodesil sülfat

Tris HCl: Tris hidroklorik asit

NaOAc: Sodyum Asetat

dNTP : Deoksinükleosid trifosfat

NaCl : Sodyum klorür

rpm : Dakikadaki dönüş sayısı

M : Molar

dk : Dakika

nm : Nanometre

dH₂O : Distile su

gr : Gram

ml : Mililitre

UV : Ultraviyole

NCBI : Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

bç : Baz çifti

SOD : Süperoksit dismutaz

CAT : Katalaz

GST : Glutasyon S-transferaz

mg/L : Miligram bölü litre

NaOCl: Sodyum hipoklorit

T_m : Erime sıcaklığı

TAE : Tris-asetat-EDTA

EBI : Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü

ID : Kimlik

dsDNA: Çift sarmallı DNA

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Dünyadaki organizmaların nereden geldiği, neden bu kadar çok canlı çeşidinin var olduğu ve nasıl bu kadar iyi tasarlanmış hale geldiği soruları evrimsel biyolojinin temelinde ortaya çıkan sorular olup, bu sorular evrimsel örüntü ve mekanizmalarla açıklanabilmektedir. Ortak atadan değişim yoluyla türeme sonucu canlılar arasında bir örüntü meydana gelmekte ve bu süreci doğal seçilim mekanizması tetiklemektedir. Evrimi anlamamanın kendimizi anlamaya yardımcı olacağı düşüncesi ve evrimsel biyolojinin tüm yaşam bilimlerini destekleyen bir mefhum olması insanı evrim çalışmaya güdüleyen nedenlerdendir [1].

Bilindiği üzere canlılar birey olarak değil, populasyon olarak evrimleşmektedirler. Ortak bir atasal toplumdaki birkaç alt soy oluşmakta ve farklı değişimlerin ortaya çıkması neticesinde populasyonlar birbirlerinden uzaklaşmaktadır. Böylece populasyonlarda, evrimsel nitelikteki bu değişimler, kalıtsal materyal vasıtasıyla nesiller arasında aktarılarak mikro ya da makro ölçekte evrime yol açmaktadır. Evrimsel değişime yol açan etkenlere bakıldığında ilk olarak doğal seçilim kuramı karşımıza çıkarken, daha sonra ortaya çıkan düşünceler arasında mutasyon ve doğal seçilimin birlikte uyumsal evrime neden olduğu düşüncesi göze çarpmaktadır [1].

Mikro ve makro evrimin anlaşılmasında mutasyon, rekombinasyon, doğal seçilim ve diğer olayların etkisi, evrimsel bileşim kuramını savunan araştırmacılar tarafından dikkate alınmış ve sonraki pek çok araştırma bu kuramın temel ilkelerini incelemiştir. 1950'lerden başlayıp hızlanarak, genetik ve moleküler biyolojideki ilerlemelerle birlikte evrimsel araştırmalarda son derece önemli gelişmeler ortaya çıkmıştır. Bunun ardından, mutasyon, genetik çeşitlilik, tür farklılığı, gelişim ve yaşamın filogenetik tarihi hakkındaki araştırmalar için araçlar sunan moleküler evrim gibi yeni bir araştırma alanı açılmıştır. İleri moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte, moleküler evrim, DNA dizilerindeki evrimin ağırlıklı olarak doğal seçilimden değil, genetik sürüklenmeden kökenlendiğini ileri sürmüştür. Süreçle birlikte daha farklı çalışma alanları da ortaya çıkmıştır. Evrimsel biyoloji, türlerin uyarlanmasını ve çeşitlenmesini kapsamlı bir

şekilde açıklamaktadır. Evrimsel biyolojinin temel görevlerinden biri, değişimin genel kalıplarını açıklayabilmektir [2].

Bu çerçevede, canlılığın nereden köken aldığıının ortaya çıkarılması için gereksinim duyulan bilgiler taksonomi başlığı altında toplanırken, taksonomi ile evrimsel süreç kapsamında gerçekleşen olaylara açıklık getirilir. Filogenetik sistematikte de canlılar atasal akrabalıklarına göre sınıflandırılabilir [3].

Doğa bilimcileri tarafından yeryüzündeki biyoçeşitliliğin anlaşılmaya çalışılmasıyla beraber, organizmalar aralarındaki benzerlik ve farklılıklara göre ortak gruplar içine yerleştirilmiş, böylece ilk sınıflandırma çalışmaları ortaya çıkmıştır. Burada temel amaç, hem objektif hem de sınırlanabilir bir tür kavramını oluşturabilmek ve ortaya çıkarılmak istenen evrimsel ilişkileri doğru şekilde yansıtan bir sınıflandırma oluşturabilmektir [4,5].

Sistematikğin görevleri içinde yer alan filogenetik çözümleme ve taksonomi tarihsel olarak yakından ilişkili iki kavramdır. Filogenetik yöntemlerle birlikte kullanıldığında, canlıları sınıflandırmak suretiyle birtakım özellikleri yönünden yapılan karşılaştırmalar evrimsel geçmişi anlayabilmemiz için vazgeçilmez esaslara dönüşürler ve filogenetik araştırmalar bize taksonlar arasındaki dallanma ilişkisinden çok daha fazlasını sunar. Çoğu sistematikçi, sınıflandırmanın evrimi yansıtmaması gerektiğini savunur. Filogenetik ve sistematik çalışmalar, gen, genom, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler, gelişim ve morfoloji, canlıların geçmişi ve davranışları ile buna bağlı olarak coğrafik dağılımda meydana gelen değişimler, habitat ilişkileri ve farklı türler arasındaki ekolojik ilişkiler gibi pek çok alanda ortaya çıkan değişimleri kavramamızı sağlar [2].

Sınıflandırma kavramının farklı bir boyuta taşınması, Darwin'in farklı canlı formlarının, oluşma sürecinde küçük farklılıklar kazanarak tek bir atadan kökenlenebileceğini ileri sürmesiyle olmuştur. Bu çıkarımda, ortak atanın kendisinin de geçmişte bir atadan farklılaşarak ortaya çıktığı önermesini doğurmuştur. Darwin, bazen atasal bir türün, başlangıçta birbirine çok benzeyen, zamanla da birbirinden farklılaşarak uzaklaşan iki kardeş türe ayrılabilceğini önermiştir. Bu türlerin her biri, birbirinden uzaklaşmış kardeş türler meydana getirebilir ve bu süreç çok uzun bir zaman dilimi içinde defalarca

tekrarlanabilir. Böylece, birbirine uzak akraba türler uzak geçmişteki bir ortak atadan tüerken, çok daha yakın olan türler yeni bir ortak atadan türemiş olur [2].

Darwin'in ortak atadan tüeme savına göre, hiyerarşik bir sınıflandırma, değişik düzeylerde yakın ya da uzak, doğru soy ilişkilerine sahip canlıları ortaya çıkaran gerçek bir tarihsel süreci yansıtmaktadır. Bununla birlikte türler arası benzerlikler gerçek evrimsel sürecin bir sonucu olarak açıklanabilmektedir. Sistematik kategorilerin paylaşılan ortak özelliklerin az ya da çok olmasına göre şekillenmesi, sınıflandırmanın bir dereceye kadar evrimin gerçek tarihini gösterebileceğini ortaya koymaktadır [2].

Organizmalar, genleri, gelişimleri ve yapıları bakımından olağanüstü derecede birbirlerine benzerler ve bu benzerlikler işlevsel olabilir. Ancak bazı özellikler yapısal olup bunların ortak atadan tüedikleri düşüncesiyle açıklanması daha kolaydır [1].

Türlerin giderek birbirlerinden daha çok ayrıldığı varsayımı doğruysa, benzerlik ve farklılıkların düzeyini ölçerek farklı taksonları ortaya çıkaran çatallanmanın tarihini belirleyebiliriz. Benzerlik düzeyi, ortak atanın yakınlığının güvenilir bir ölçütüdür. Aynı zamanda türlerin filogenisini çıkarabilmemize olanak sağlar [1].

1.2 Filogenetik Sistematikte Moleküler Yöntemlerin Kullanılması

Nehir havzasında yaşayan balık topluluklarının yapısını anlamak balıkçılık yönetimi ve aynı zamanda nehir havzası için önemli bir araç olabilir. Balıklar, bozulmuş sucul ekosistemlerde uzun süre yaşayabilen hayvanlar olmaları, birkaç trofik düzey meydana getirmeleri, aquatik besin zincirinde tepede olmaları, insanlar tarafından tüketilmeleri, toplanma ve tanımlanmalarının kolay olması gibi özelliklerden dolayı çok iyi birer indikatördürler [6].

Türkiye, çeşitlilik ve endemizm açısından çok zengin bir tatlı su faunasına sahip olup, ihtiyofaunası hem Asya hem de Avrupa'ya özgü unsurlarla karakterize edilmiştir. Tanımlanan yeni türler de dahil olmak üzere Türkiye tatlı su sistemlerinde, toplam 369 balık türü bulunmaktadır. Bunlardan 154'ü Türkiye için endemiktir [6].

Ekosistemde önemli bir yere sahip olan bu organizmaların yapısını anlamak, sistematikte doğru kategoriye yerleştirmek, filogenetik ilişkilerini belirlemek son derece

önemlidir. Canlıların çeşitliliğinin nedenlerini ve evrim süreçlerini anlama çabaları, türlerin ilişkileri ve evrimsel geçmişleri hakkında detaylı bilgiye bağlıdır. Hennig'e göre organizmaların evrimsel tarihi, türleşme sırasındaki evrimsel gelişimin sonuçlarıdır. Eğer sonuçlar doğru bir şekilde belirlenebilirse evrimsel gelişim tarihi ortaya çıkarılabilir [3,7].

Genetik verilere dayanan filogenetik çıkarımlar, sistematik üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Morfolojiyi de içeren değerlendirmeler türlerin evrimsel tarihini daha iyi anlamamıza katkı sağlamaktadır [8].

Moleküler veriler, morfolojik olarak korunmuş ya da yüksek değişkenlik gösteren tatlı su balıklarında, taksonomik ilişkileri açıklamada ve tür sınırlarını belirlemede oldukça faydalıdır [9].

Önceki taksonomik çalışmalarda zaman zaman ortaya çıkan belirsizlikleri gidermek için morfoloji, ekoloji, biyocoğrafya ve üreme izolasyonu gibi analizlerle birlikte, gelişen genetik araç ve moleküler filogeniden faydalanılmaktadır. Bununla birlikte morfolojik özellikler, evrimsel tarihi ve tür sınırlarını ortaya çıkarmada kullanılan ilk veriler gibi giderek daha az yaygın hale gelmektedir. Özellikle son zamanlarda yapılan araştırmalarda, benzer morfolojik karakterlere sahip, genetik olarak farklı, aynı nominal türler içerisinde sınıflandırılan ve birçok organizma grubunda yaygın olan kriptik türler üzerine odaklanılması bu savı desteklemektedir [8,10,11].

Filogenetik çalışmalar, yalnızca markır seçimine değil aynı zamanda baz kompozisyonları, yapısal özellikler, parametre tahminleri ve kabul edilen yöntemler gibi moleküler belirteçlerin doğal filogenetik kapsamlarının karşılaştırmalı olarak çalışılmasına dayanmaktadır. Son zamanlarda simülasyon ve deneysel filogeni çalışmaları, filogeniyi değerlendirmede olasılık temelli metotların gelişmesine ve bu da gelişmiş filogenetik çözümlerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bununla birlikte, daha önceki çalışmalar çoğunlukla geniş zaman ölçeklerinde farklılaşan soylar üzerine odaklanırken nispeten yakından ilişkili taksonlar üzerine odaklanmamıştır [12].

DNA dizilerinin moleküler dinamiklerinin daha iyi anlaşılması, örneğin baz kompozisyonları, nükleotid değişim kalıpları ve bölgeler arasındaki varyasyon oranları gibi, DNA sekanslarının filogenetik performansının geliştirilmesine bağlıdır [12].

Moleküler tekniklerin kullanımı, populasyon içinde bireyler arasında, aynı türün populasyonları arasında ve taksonomik seviyede farklı türler arasında genetik varyasyonun tahminini mümkün kılmıştır. Bu kapsamda, DNA esaslı etkin moleküler yöntemlerden biri DNA dizi analizi yöntemi olup, moleküler temelli filogenetik araştırmalarda kullanımı oldukça yaygındır [13, 14, 15].

Moleküler dizi verileri ve DNA barkodlama teknikleri, kriptik türlerden tutun da omurgalılarından, böcek ve bitkiler arasında değişen çeşitli organizmalara uygulanabilmektedir. Coğrafik olarak geniş dağılıma sahip balık türlerinde, evrimsel türlerin sayısını iyice değerlendirebilmek için nükleer belirteçler de dahil olmak üzere ek moleküler verilere ve daha geniş populasyon örneklemesine gereksinim duyulmaktadır [16].

1.3 Cyprinidae Familyası ile İlgili Bilgiler

Cyprinidae familyası, sadece Kuzey Amerika, Avustralya ve Antarktika'da değil dünyanın büyük kısmında dağılım göstermektedir. Avrasya ılıman tatlı su balık faunasının hem birey hem de tür sayısı bakımından çok çeşitliliğe sahip bir familyası olmakla birlikte kültürel ve ekonomik açıdan önemli pek çok türü de içermektedir. Bu nedenle bu familyanın tatlı su ekosistemleri içindeki rolü esastır. Sahip olduğu geniş biyolojik ve ekolojik tolerans bu gruba biyocoğrafik modellerde önemli bir rol vermiştir. Dikkate değer bir morfolojik değişkenliğe sahip olmaları habitatlarının da çok çeşitli olmasıyla ilişkilidir. Bu değişkenlik ve grubun filogenisi arasındaki ilişki, gerçek homolojiler ve yakınsaklıklar arasında ayırım yapmak ve adaptif özelliklerin evrimsel oranının incelenmesi açısından önemlidir [17,18].

Pek çok araştırmacı türlerin evrimini ve onların özelliklerini anlayabilmek için çok büyük çaba sarf etmiştir. En az 210 cins ve 2010'un üzerinde türle temsil edilen bu familya içindeki büyük taksonların filogenetik ilişkileri grubun çeşitliliğinin çok fazla olması nedeniyle iyi anlaşılabilmiştir. Ancak, çeşitli araştırmacılar filogenetik

sistematikğin savunduğu gibi paylaşılan türemiş karakterlerin kullanımını esas alan farklı hipotezler geliştirmişlerdir [18].

Bu familyadaki tür, morfoloji ve ekolojilerdeki muazzam çeşitlilik, çeşitli evrimsel, ekolojik ve biyocoğrafik hipotez, teori ve mekanizmaları, filetik evrim ve türleşme oranlarını anlamayı ve Cyprinidae'nin alternatif filogenetik hipotezlerini test etmeyi amaçlayan araştırmalar için özellikle önemlidir [12].

Son yıllarda bu grubun üyeleri üzerinde, onların ilişkilerini daha iyi anlamak ve filogeniye dayalı daha doğru taksonomik sınıflandırmalar geliştirmek için moleküler çalışmalar yürütölmektedir [19].

Neredeyse dünya çapında yayılım gösteren Cyprinidae'nin ilişkilerini çözümlmek için yapılan araştırmalar, Cyprinid balıklarının çeşitliliği ve evrimi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ancak, bu çalışmalar, familya içindeki genel ilişkilerin çözümünde birtakım sınırlamaları beraberinde getirirken, alt familyaların monofilisini belirleme ve ilişkilerini ortaya çıkarmada birtakım eksikliklere sahiptir. Bu çalışmaların hiç biri Cyprinidae familyası içerisinde tanımlanmış ya da kabul edilmiş alt familyaların tümünden türler içermediği gibi, sınırlı sayıda tür içermektedir. Bazı araştırmacılar, sınırlı sayıda takson örneklenmesi durumunda elde edilen filogenetik sonuçların önemli ölçüde etkilenebileceğini ileri sürmüştür [18].

Tarihsel sürece bakıldığında, bazı araştırmacılar, temel osteolojik karakterleri kullanarak Cyprinidae içindeki ilişkileri araştırmışlardır. İlk çalışmalarda, tanımlanan genel morfolojik karakterlerin olası doğal grupların teşhisinde faydalı olduğu düşünölmüş ancak filogenetik bir bakış açısından yoksun olduğu belirtilmiştir [18].

Geleneksel taksonomistler, faringeal dişlerle bıyıkların sayısı ve mevcudiyetini de içeren morfolojik karakterleri esas alarak, gruplar arası ilişkileri araştırmadan değişken sayıda alt familyayı kabul etmişlerdir. Chen ve Howes morfolojik karakter analizleri yapmış ve filogenetik bir ağaç yayınlamışlardır. Ancak, gruplar sinapomorfiler tarafından tanımlanamamış bu da tüm analizin şüpheli olmasına neden olmuştur. Howes, çeşitli morfolojik karakterlerin kladistik bir analizini gerçekleştirmiştir. Daha önce tanımlanmış birkaç familya ya da soyun monofilisi reddedilmese de şüpheli

görülmüştür. Birçok karakter uyumsuzluğu bulunduğundan morfolojik verilere dayalı sağlam bir filogenetik şema çıkarılamamıştır [17].

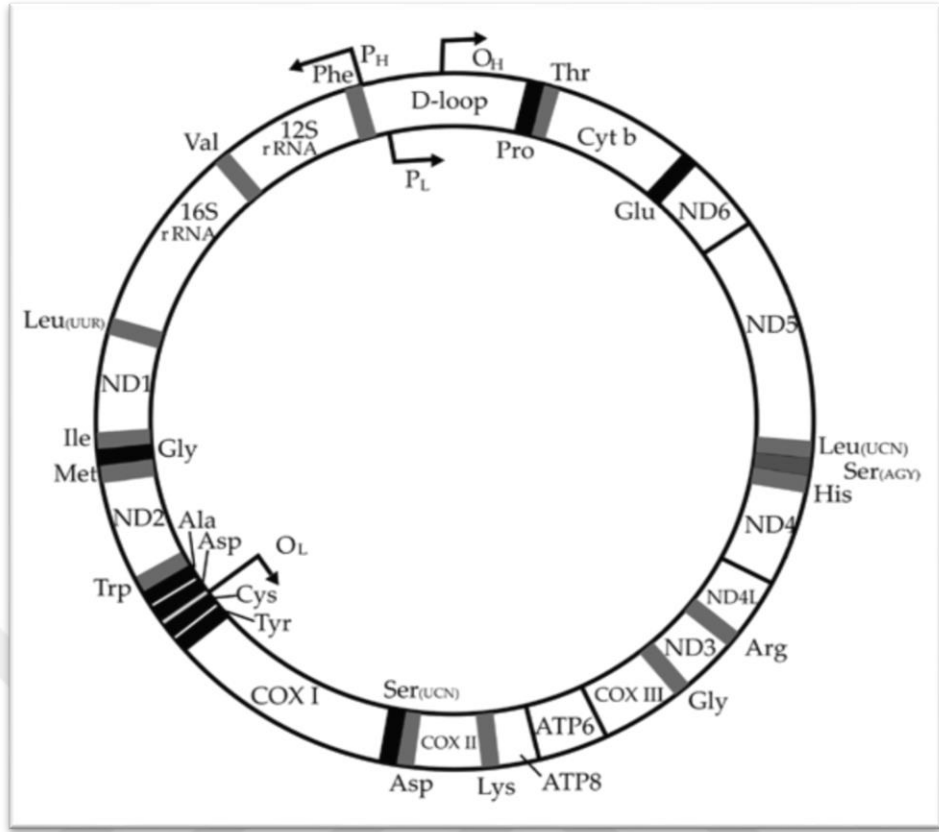
Önceki çalışmalar seçilmiş birkaç türün anatomisi, grupların filogenetik olmayan değerlendirmeleri ve son zamanlarda sınırlı sayıdaki taksanın morfolojik ya da moleküler karakterleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çabalar çok önemli olsa da, filogenetik ilişkilerin ya da familya içindeki grupların monofilisinin çözümünde yeterli olmamıştır [18].

Güncel filogenetik yaklaşımlar ve Cyprinidae'nin sınıflandırılmasına yönelik çalışmalar, bu karmaşık familyanın evrimini araştırmak için, bazen osteolojik verilerle oluşturulan kombinasyonlarla birlikte, moleküler filogenetik analizleri de içermektedir [17,18].

Daha önceki sistematik analizler, morfolojiye ya da son zamanlarda daha çok mtDNA sekanslarına odaklanarak yapılmıştır. mtDNA ya da morfolojiye dayalı revize edici önemli çalışmaların sınırlı sayıda olmasının pek çok nedeni vardır. Bu familyanın günümüzdeki karmaşık durumu tür düzeyindeki yüksek çeşitlilikten ileri gelmektedir. Son zamanlarda, monofiletik grup testleri ve tür ilişkilerinin anlaşılmasında, mtDNA sekansları ve mtDNA ile morfolojik kombinasyonlar birlikte kullanılmaktadır [18].

1.4 Moleküler Belirteçler Olarak mtDNA Sekansları (COI ve cytb)

mtDNA halkasal yapıda, çift zincirli ve küçük bir molekül olup, hücre içi haberleşmeden, hücre için gerekli enerji düzeyinin stabilizasyonu, krebs ve TCA döngüsü, lipid, amino asit, steroid ve kolesterol gibi moleküllerin metabolizmalarına kadar pek çok alanda görev alır. Hayvanlarda toplam uzunluğu 15-20 kb olan mtDNA, 22 tRNA, 2 rRNA, 13 oksidatif fosforilasyon ve elektron taşıma sisteminde görevli proteinleri kodlayan mRNA'lar olmak üzere 37 gen bölgesine sahiptir. Yapısal olan bu genlerin dışında kodlama yapmayan, replikasyon ve transkripsiyonun başlatılması ve düzenlenmesi olaylarında rol alan kontrol bölgesi adı verilen bir kısım daha bulunur [14, 20, 21, 22, 23, 24,25].



Şekil 1.1 Balık Mitokondriyal DNA'sı [26]

mtDNA intron içermeyen, maternal kalıtım gösteren, rekombinasyona uğramayan, evrimsel süreçte değişim hızı DNA'dan daha fazla olan bir moleküldür. mtDNA'nın evrilme hızının çekirdek genomundan daha yüksek olması nedeniyle mitokondri proteini şifreleyen pek çok gen familya, cins, tür ve populasyon gibi sistematik kategorilerin filogenetik ilişkilerini çözümlmek amacıyla kullanılmaktadır. mtDNA'lar, sistematik, filogenetik, evrim ve populasyon biyolojisi çalışmalarında, maternal kalıtım göstermesi ve rekombinasyona uğramamasından dolayı faydalı bir belirteç olarak tercih edilmektedirler. Evrilme hızının yüksek olmasının nedeni bu molekülün koruyucu histonlarının bulunmaması, ortamda bulunan metabolitlerin yoğunluğu, oksijen radikallerine çok maruz kalması, buna karşın koruma ve tamir mekanizmasının olmamasıdır. Mutasyona açık olan mtDNA, kısa süreçlerde bir populasyonun evrimsel tarihi hakkında sinyaller verebilmektedir [14, 20, 23, 27].

Protein şifreleyen genlerin üçüncü kodonlarında meydana gelen yer değiştirme mutasyonlarının fazla olması, bu genlerin tür veya populasyon seviyesindeki filogenetik araştırmalarda tercih edilmelerinin bir nedenidir [3, 4, 29].

Moleküler belirteçler, genetik çeşitlilik, populasyon yapısı, filoğrafya ve tür tanımlanması gibi çalışmalarda ve bunlar üzerinde etkili olan faktörleri değerlendirebilme açısından populasyon çalışmalarında yararlıdırlar. Buna ek olarak mtDNA markırları tatlı su ve deniz türlerinin genetik çeşitliliği ve populasyon yapısını belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Evrimsel tarihe bakıldığında, erken omurgalılarından türeyen türlerin çoğunun balıklar olduğu dikkat çekmektedir. Moleküler belirteçler olarak kullanılan mtDNA sekanslarının, birçok tatlı su balığı grubunda filogenetik ve taksonomik ilişkilerin aydınlatılmasında etkili olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda, moleküler belirteçlerin, belirsiz filogenetik ilişkilerin yanı sıra tür ve suş tanımlamalarını çözümlenmede yararlı olduğu kanıtlanmıştır [2, 9, 24, 30, 31-37].

mtDNA'lar organizmalardaki moleküler değişimleri ortaya çıkararak geniş bir coğrafik bölgedeki Cyprinid'lerde genetik çeşitliliği saptamak için kullanılmıştır. mtDNA polimorfizmlerinin, tatlı su balıklarında ve anadrom balıklarda, filoğrafik modelleri değerlendirmede güçlü bir araç oldukları gösterilmiştir. Maternal kalıtım göstermesi ve rekombinasyon olmaması, mtDNA'yı maternal hattın ve ortak atadan ayrılma zamanının bir moleküler saat varsayımı aracılığıyla belirlenmesinde faydalı kılmaktadır. Moleküler filogeni, modern populasyonların dağılımı ve ayrışmasında tarihsel süreçlerin etkisinin saptanmasına imkân sağlamaktadır. mtDNA dizilerinden elde edilen sonuçlar, aynı zamanda geri melezleme ve bir türün mitogenomunun açığa çıkarılmasına yardımcı olmaktadır. Mitokondrial DNA dizileri, populasyonların karşılaştırılmasında filogenetik ağaçların oluşturulmasına da imkan sağlamaktadır [37, 38, 39].

Mitokondriyal genler, birçok filogenetik araştırma için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bazı grupların moleküler filogenetik hipotezlerinin çoğu mtDNA sekanslarına dayanmaktadır. Cyprinidae içerisindeki ilişkileri saptamak için de mtDNA sekansları tercih edilmektedir [14, 18, 40, 41].

Filogenetik çalışmalarda kullanılan çeşitli mitokondriyal genler 12S rDNA, 16S rDNA, Cytb, ND1 ve COI-III gen bölgeleridir. 12S ve 16S rDNA, mitokondriyal genler arasında daha fazla korunmuş olan bölgelerdir. 12S rDNA gen bölgesi şube ya da altşube gibi üst taksonomik seviyelerin filogenetik çalışmalarında kullanılmaktadır. Diğer yandan 16S rDNA 12S rDNA'dan daha fazla değişkenlik göstermektedir. COI, diğer sitokrom oksidaz şifreleyen genlere göre daha fazla korunmuştur. Cytb'nin ND1'den daha fazla, COI'den daha az korunmuş olduğu bilinmektedir [4, 42].

En fazla farklılık gösterenler bazı ND ve ATPaz genleridir. Buna göre COI ve cytb alt birimlerini kodlayan genler en fazla korunan genlerdendir. Bu yavaş evrimleşen protein kodlayan genler balıklar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemede kullanılmaktadırlar [13].

Bununla birlikte, COI standart bir gen bölgesindeki türleri tanımlamak için kullanılan DNA barkodlama yönteminde, hayvanlar için standart bir barkodlama markırıdır. Yaşam çeşitliliği boyunca kabul gören tek bir barkod markırısı yoktur. Ancak COI bazı canlılar üzerinde yaygın olarak kullanılan mitokondriyal bir barkod olup barkodlama için evrensel sistem olarak kullanılmıştır. Bu markır tür düzeyinde nispeten ayrıntılı filogenetik çözümleme göstermektedir [10, 11, 43, 44, 45].

Tek bir hedef gen ile DNA dizi analizi yapılarak teşhis yapılması DNA barkodlama olarak adlandırılır. Bu yöntem, hem evrensel hem de tür tanımlanması açısından pratik bir yöntemdir. Geniş bir uygulama sahasına sahiptir. Koruma biyolojisi ve biyolojik çeşitlilik araştırmalarında oldukça kullanışlı bir araç olmasının yanısıra, yumurta ve larva formlarının tanımlanması, mide içeriği ve dışkı analizlerinde potansiyel bir kullanıma sahiptir. DNA barkodlama yöntemi, büyük taksonomik gruplar için hem hızlı hem de kolay bir tür tanımlama aracı olmasının yanısıra ve küresel bir barkodlama veritabanı gelişimine odaklanmıştır [3, 4, 46, 47].

Canlıların morfolojik karakterlerine bakılarak ayırtılamadığı durumlarda, barkodlama yöntemi kısa DNA dizilerini kullanarak türün tanımlanmasında basit ve hızlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Tür teşhisi yapılamayacak ölçüde küçük olan larva, juvenil balıklar, ısıl işlem görmüş balık ürünleri, mide içeriği gibi örnekler bu yöntemle tanımlanabilmektedir [47, 48, 49].

DNA dizi analizi, evrimsel geçmişi araştıran çalışmalar için yararlı bir araçtır. Yaşamın çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasına ve evrimsel ilişkilerin aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Tek bir genin bütün türler için dizilenmesi, taksonomi açısından büyük ölçekte bir kullanım alanı oluşturacaktır. Birçok araştırmacı DNA analizi ile tür tanımlamasının mümkün olup olmadığını merak etmektedir. Teoride kısa bir DNA dizisi, milyonlarca türü tanımlamada yeterlidir [3, 4].

Şimdiye kadar, farklı coğrafik bölgelerden çeşitli organizmaları içeren pekçok barkodlama projesine barkod kütüphanesinden ulaşılabilmektedir. Kütüphanede, birçok bölgedeki balıklar için DNA barkodu açısından çok veri olmasına karşın, biyolojik çeşitlilik bakımından zengin olan sularımızdan nispeten az veri bulunmaktadır. DNA barkodlama, kritik ölçüde biyoçeşitlilik kaybının yaşandığı bölgelerde biyoçeşitlilik değerlendirmesi açısından etkili olacaktır [46, 47, 50, 51].

Yeryüzünde yaşayan tür sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte pekçok tür tanımlanmayı beklemektedir. Hayvanlar arasında sanıldığından daha yaygın olan kriptik türlerin tanımlanmasına ayrıntılı populasyon analizleri gerekmektedir. Aynı genin veya gen setinin farklı organizmalarda DNA dizilemesi, hayatın çeşitliliğinin kavranmasına ve türleşmenin altında yatan süreçlerin aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır [3, 4].

DNA barkodlama çalışmaları hayvan türlerinin hızlı ve hassas bir şekilde tanımlanabilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmalar sonunda oluşturulmuş veri tabanı sayesinde morfolojik olarak birbirlerine çok yakın olan türler ya da çok farklı karakteristiğe sahip ergin bireyler DNA barkodlarına bakılarak tanımlanabilir. Farklı bölgelerden alınan örneklerin genetik veriler karşılaştırarak populasyonlar arasındaki ilişkiler ve olası doğal bariyerler saptanabilir [47].

Bazı türlerin moleküler kimliğini belirlemek üzere kullanılan mitokondriyal COI gen dizisi bu rol için uygundur. Çünkü mutasyon oranı yakından ilişkili türleri ayırt etmek için yeterince yüksektir. Diğerlerine göre korunmuş olması, amplifikasyon başarısı, filogenetik çözümleme, evrimsel ilişkileri ortaya çıkarma becerisi de COI geninin nükleer gen bölgeleriyle birlikte çalışılmasına olanak vermiştir [10, 30].

Filogenetik analizlerde kullanılan markırlardan biri olan COI geni yüksek evrimsel orana sahiptir. Belirli taksonomik düzeydeki moleküler filogenileri çözmek için kullanılır. COI hızlı gelişen bir belirteç olduğu için, grup içindeki inter ve intraspesifik ilişkilerin çözümünde tercih edilmektedir [8, 52].

Moleküler verilere dayanan filogeniler, çalışılan türlere ve analiz yöntemine bağlı olarak geniş ölçüde çeşitlilik gösterebilir. Bu bağlamda, COI ve cytb gen bölgelerinin balıklarda DNA taksonomisi ve barkodlama için kullanışlı olduğu bilinmektedir. Sitokrom b geni, filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve filogeniye yönelik en güvenilir mitokondriyal belirteçlerden biri olarak düşünülmektedir. Bu gen, çeşitli balık türlerindeki filogenetik ve filocoğrafik sorunları ele almak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Cytb ve COI gen bölgeleri Cyprinid balıklarında faydalı filogenetik sinyaller göstermektedir. Her iki gen bölgesi pekçok araştırmada tercih edilmiştir [17, 53-77].

1.5 Filogenetik Bir Çalışmanın Süreçleri

1.5.1 Verilerin Belirlenmesi ve Örnekleme

Filogenisi yapılacak organizma grubu için genler, gen kombinasyonları ya da DNA bölgeleri filogenetik ağaç tasarlamak için kullanılabilir. Seçilen bölgelerin çok korunmuş ya da çok değişken olması durumu dikkate alınarak farklı gen kombinasyonları ile DNA bölgelerinin tercih edilmesi daha doğrudur [3, 4, 78].

Bir organizma grubunun filogenetik analizini yapabilmek için, her türden grubu temsil edecek birkaç örnek seçmek gerekir. Burada bir familyanın filogenetik analizi için takson örneklenirken dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Taksonlar, organizmaların biyolojik çeşitliliğini en iyi şekilde yansıtmalıdır ve her bir organizmanın gen familyasındaki ortolog ve paralog dizileri çıkartılmalıdır. Filogenetik analiz sonuçları takson sayısına göre değişmektedir. Takson sayısının fazlalığı filogenetik tarihin ortaya çıkarılmasıyla doğru orantılı olarak artış göstermektedir. Yüksek evrimleşme oranı ve karmaşık bir filogeninin söz konusu olduğu bir durumda birbirine yakın çok sayıda taksonla çalışmak faydalı olacaktır. Evrimin yönünü belirleyebilmek için veri setine yakın bir kardeş grubun dış grup olarak eklenmesi,

ağacın çözünürlüğünü düşüren homoplazilerin önüne geçilmesini sağlayacaktır. Bununla birlikte iç dallanmaların çözümlenmesinde köksüz ağaç analizleri çok daha etkindir [3, 4].

1.5.2 Dizileme ve Hizalama

Filogenetik analizlerde, DNA dizilerinden elde edilen ağaçlara bakıldığında dizilerde oluşabilecek herhangi bir hata ağaç topolojisinin de hatalı olmasına yol açabilir. Özellikle karmaşık evrimsel modellerde daha fazla korunmuş DNA dizilerinde yapılan dizileme hataları çok daha fazla etkiye sahip olacağı düşünülmektedir [3]. Clustal X/W gibi programlar sayesinde dizi hizalamaları yapılabilmektedir. Ancak, dizilerin yüksek oranda korunmuş olmaması ya da delesyon içermesi hizalamada büyük ölçüde hatalara neden olur. Bu nedenle çok değişken gen bölgelerinin hizalamaları göz ile kontrol edilmelidir. Hizalanamayan bir bölge varsa herhangi bir hataya düşmemek adına analizden önce bu bölgeler diziden çıkartılmalıdır [3, 4].

1.5.3 Evrimsel Modelin Belirlenmesi

Baz frekansı, yedekleme oranı matrisi, gamma dağılımı, sabit pozisyonların orantısı gibi parametreleri kapsayan DNA dizilerine yönelik evrimsel modeller zamanla oldukça gelişmiştir. Basit bir evrimsel modelde baz frekansları eşit olarak kabul edilmektedir. Baz frekansları her bir nükleotid için farklı veri setlerinde değişim gösterdiğinden, baz frekansları yalnızca veri setinden tahmin edilebilmektedir. Basit evrimsel modellerde, her bir nokta mutasyon için yedekleme oranı eşit olarak kabul edilir. Bu modellerde bir tane yedekleme tipi ayarlanmışken, transversiyon ve transisyon gibi iki yedekleme tipini kullanan evrimsel modeller farklı yedekleme oranlarına sahiptirler. En karmaşık yedekleme oranını bulunduran matrisler her bir nokta mutasyon için farklı altı yedekleme oranından oluşmaktadır [3, 4].

Geri dönüşümsüz modellerde yedekleme oranı matrisleri, on iki farklı yedekleme oranından oluşur. Ancak, çoğu standart moleküler filogeni programı bunu kullanmamaktadır. Gamma dağılımı ve sabit pozisyonların orantısı, ribozomal DNA dizileri gibi az veya çok korunmuş bölgeleri esas almaktadır. Protein kodlayan DNA bölgelerinde kodonların üçüncü pozisyonu, birinci ve ikinci pozisyonlara göre daha

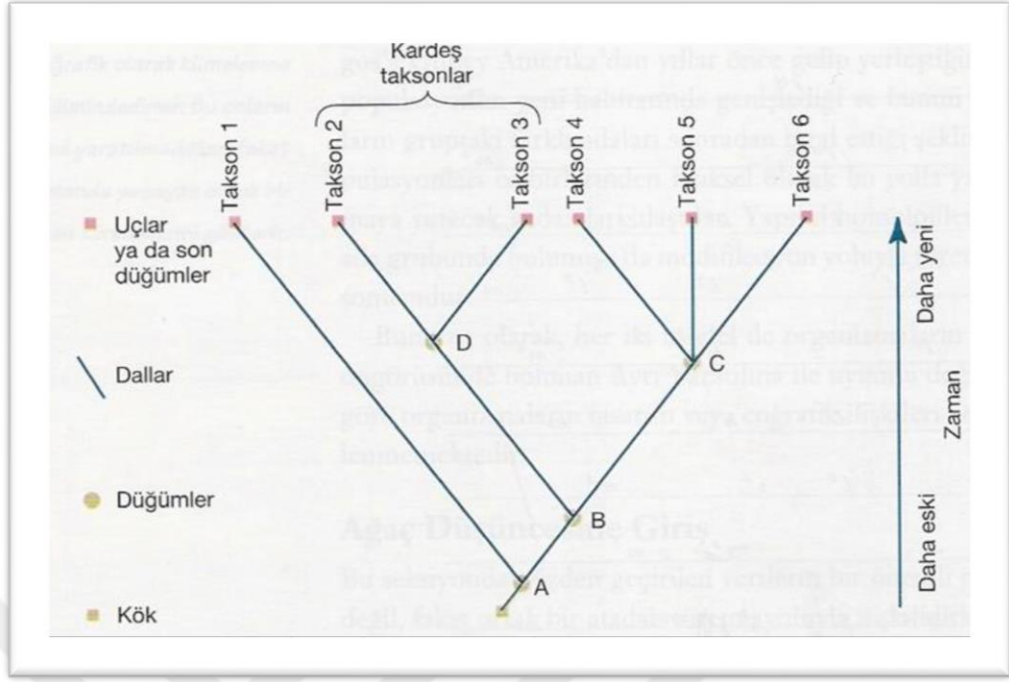
değişkendir. Sabit pozisyonların orantısı, hangi uzunluktaki bir bölgenin hiç evrimleşmediğini ortaya çıkarır. Buna karşın, gamma dağılımı modellerinde yavaş ve hızlı evrimleşen bölgelerin orantıları analiz edilir. PAUP programı sözü geçen evrimsel modellerle birlikte 56 farklı evrimsel modelin kullanılmasına imkan sağlar [3, 4]. PAUP, PHYLIP, MRBAYES en çok kullanılan programlardır.

1.5.4 Filogenetik Analiz ve Ağaç Oluşturma

Filogeni, bir türün ya da daha yüksek gruplanmış organizmaların tarihi ve evrimsel gelişimidir. Evrimsel ilişkilerin anlaşılmasına yönelik çabaların tümü filogenilerin yapılandırılabilmesi içindir. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen filogenetik çalışmaların amacı, DNA ve proteinlerde meydana gelen değişikliklerin hızını ve karakterini belirlemek ve böylece genler ile organizmaların evrimsel tarihini ortaya çıkarmaktır. Filogenetik çıkarımda kullanılan veriler iki şekilde kategorize edilmektedir. Bunlardan birincisi karakter verisi olup takson hakkında bilgi sunar. İkincisi uzaklık veya benzerlik verisi olup bu da taksonlar arasındaki ikili ilişkileri tanımlar [13, 79].

Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koyabilmek için en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin filogenetik ağaçlara dönüştürülmesidir. İlk ciddi filogenetik ağaç oluşturulurken veri olarak aminoasit dizilerini kullanan yöntemlere başvurulmuştur. Daha sonra çok sayıda araştırmacı gen frekansları, aminoasit dizileri ve nükleotid dizileri gibi moleküler verileri kullanan pekçok yöntem geliştirmiştir [3, 79].

Filogenetik bir ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda ise zamanını belirler. Düğüm ve dallardan oluşan ağaç, türleşmenin sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterirken, düğümler bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir [1].



Şekil 1.2 Filogenetik ağaç diyagramı (Bu ağacı okumaya en alttan başlanarak yukarıya doğru ilerlenir. A ile işaret edilen düğümden yer alan populasyon 1-6. taksonların ortak atası olarak kabul edilir. Gruplardan biri 1. taksona evrilirken, diğeri 1-5. taksonların ortak atası olan B ile işaret edilen düğümden populasyona evrilmiştir) [1].

Filogenetik ağaç oluştururken başlıca iki yönteme başvurulur. Bu yöntemler, taksonların aminoasit veya nükleotid dizilimleri kullanarak ağaç oluşturmak ve taksonların birbirlerine olan uzaklıklarının belirtildiği bir uzaklık matrisi kullanarak ağaç oluşturmaktır [3].

1.5.4.1 Uzaklık Temelli Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri

Uzaklık tabanlı bir filogenetik ağaç oluşturulurken tüm taksonların birbirlerine olan uzaklıkları hesaplanır ve uzaklık değerleri simetrik bir matrise yerleştirilir. Uzaklık değerlerinden oluşan bu matrise uzaklık matrisi adı verilir. Taksonlar arasındaki mesafeyi belirleyebilmek için pekçok ölçme yöntemi mevcuttur. Bunlardan en temel olanları UPGMA, Fitch-Margoliash ve Neighbour Joining yöntemleridir [3].

1.5.4.1.1 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average)

Günümüzde sıklıkla tercih edilen ve ilk yöntemlerden biri olan bir UPGMA yöntemi, filogenetik ağaç oluşturmada toplayıcı hiyerarşik kümeleme metodundan yararlanır. Bu yöntem sabit oranda bir evrim olduğunu öne sürer. Öncelikle her takson bir küme olarak kabul edilir ve her adımda simetrik uzaklık matrisindeki en yakın iki küme birleştirilir. Böylece daha büyük kümeler elde edilir ve uzaklık matrisi güncellenmiş olur. Bir takson için uzaklık matrisi değerlendirilirken en küçük uzaklık matrisi esas alınır. Herhangi iki küme arasındaki mesafe kümede bulunan elemanlar arasındaki tüm mesafelerin ortalaması olarak kabul edilir. Sonuç olarak taksonların bir dendrogramı elde edilir. Bu yöntem geniş veri setlerini hızlı bir şekilde analiz edebilmesine karşın karakter analizinde kullanılamamaktadır. Bunun yanı sıra bir atadan meydana gelen iki bireyde aynı oranda değişim ortaya çıktığını yani dalların eşit mesafede olduğunu ileri sürmesi gerçekçi bir yaklaşım gibi görülmemektedir. Sabit bir moleküler saat varsayımına ihtiyaç duyan bu yöntem aksi bir durum söz konusu olduğunda zayıf kalmaktadır. Moleküler saat varsayımı tutarlı olduğunda yöntemin filogenileri yeniden oluşturmada başarılı olduğu ve moleküler saat işlevlerinin çok iyi olduğu durumlarda doğru şekilde uygulanabileceği gözlenmiştir [3, 13, 38, 80].

1.5.4.1.2 Fitch-Margoliash Yöntemi

UPGMA'nın sabit oranda bir evrim varsayımından yola çıkarak ağaç oluşturması bu yöntemin yetersiz kalan bir yanı olarak düşünülmektedir. Fitch ve Margoliash, dal uzunluklarının doğru bir şekilde hesaplanarak filonetik ağaç oluşturmaya amaçlamışlardır. Bu yöntemde, hesaplanan dal uzunluklarının doğruluğunu belirlemek için en küçük kareler yöntemi adı verilen bir yöntem kullanılmaktadır. Öncelikle ağaçtaki tüm dalların uzunlukları hesaplanır ve matriste verilmiş olan gerçek uzaklıklar ile hesaplanan uzaklıklar arasında bir karşılaştırma yapılır. En ideal ağaç gerçek uzaklıklar ile hesaplanmış uzaklıklar arasındaki farkın kareler toplamının en az olduğu ağaçtır [3].

1.5.4.1.3 Neighbour Joining (Komşu Bağntı) Yöntemi

Bu yöntemde, filogenetik ağaç oluşturmak için en küçük kol uzunluğu kullanılır. Bu yöntem yoğun hesaplamalarla bilinse de tüm ağaçlar içinden en kısa kol uzunluğuna sahip ağacı bulmayı amaçlar. Operasyonel taksonomik ünitelerin sayısına bağlı olarak ağaç sayıları da artış göstermektedir. Bu durum hızlı bir hesaplamayı zorlaştırmaktadır. Bu yöntemde çatallanan bir tane ağaç oluşturularak geniş veri kümelerinin analizi yapılabilmektedir. Fakat olası tüm ağaç topolojileri değerlendirilememektedir. Ağacın uzunluğu minimize edilerek ağacın kararlı olması sağlanmaktadır. Sabit olmayan uzaklıklar kullanıldığı sürece uygulama işe yaramaktadır. Yöntem, eşit olmayan oranlarda moleküler değişimlere izin vermektedir [13, 38, 80].

1.5.4.2 Dizi Temelli Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri

Dizi temelli filogenetik ağaç oluşturma yönteminde doğrudan aminoasit ya da nükleotid dizileri kullanılmaktadır. Filogenetik ağaç oluşturmada, dizi verileri uzaklık verilerine oranla daha bilgi vericidirler. Uzaklık temelli yöntemlerde dizi verileri tek bir uzaklık değerine indirgenir ve bütün diziye ait bilgi kullanılmaz [3].

Dizi temelli filogenetik analizlerde genellikle kes-bağla ve heuristic ağaç algoritmaları kullanılmaktadır. Kes-bağla ağaç oluşturma algoritmasında daima en ideal ağaç hafızaya alınır ve en uygun kritere göre eşik değeri olarak belirlenir. Bu eşik değerini aşmayan tüm ağaçlar daha oluşturulurken yanlış kabul edilir ve ardından başka bir ağaca geçilir. Yeni oluşturulan ağaç daha iyi ise bu ağaç referans olarak alınır ve yeni eşik değeri tanımlanır. Bu algoritma, ağaç oluşturma sürecini hızlandırmasına karşın geniş veri setlerinde çok fazla zamana gereksinim duyar. Heuristic ağaç algoritması, başlangıç için bir ağaç seçer ve bu ağacın topolojisini yeniden düzenler. En iyi ağacı bulmayı amaçlar fakat bunu garanti etmez. Tepe tırmanma algoritması olarak da adlandırılır [3, 4].

1.5.4.2.1 Maksimum Parsimoni (Tutumluluk) Yöntemi

Nükleotid ya da aminoasit dizilerini esas alarak filogenetik ağaç oluşturmada parsimoni yöntemi yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Parsimoni, bir gözlemin en az karmaşık hali olarak tanımlanabilmektedir. Başlangıçta aminoasit dizileri için kullanılan bu yöntem nükleotid dizileri için de kullanılmaktadır [1, 3, 13].

Parsimoni yöntemi değişimin olanaksız olduğu varsayımından yola çıkar. Evrimsel olayların miktarı ortaya çıkarılır, evrimsel süreç boyunca en az miktarda değişim gösteren ağaçlar karşılaştırılır ve en basit muhtemel ağaç seçilir. Bu yöntemeye göre en iyi ağaç, tüm karakterler için en az karakter durum değişimini ifade eden ağaçtır. Bunun anlamı tercih edilecek ağacın çok sayıda homolog paylaşılan karakter ile az sayıda homoplazi içeren ağaç olması gerektiğidir. Böyle bir ağacın evrimsel süreci en iyi ifade ettiğini savunur. Parsimoninin kelime anlamı tutumluluktur ve evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca karmaşık yerine basit açıklamaları seçerek ulaşır. Bunun için çok sayıda farklı ağaç topolojileri incelenir. Bütün nükleotidler her pozisyonda eşit mutasyon oranına sahiptirler. Değişim miktarı ne kadar az ise parsimoni yöntemi o kadar doğru sonuç verir [1, 3, 13, 79, 81].

Olası ağaçlar içerisinde, belirlenmiş optimal kritere göre en iyi ağacı bulan bu yöntem ancak taksa sayısının az olduğu durumlarda kullanılabilir. Bu durum hem zaman hem de bilgisayar sınırlamalarını da beraberinde getirmektedir [3].

1.5.4.2.2 Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık) Yöntemi

Verilerin çoğunda büyük değişimlerin olması Parsimoni yönteminden çok daha doğru sonuç veren başka yöntemlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Dizi verileri, evrimsel olasılık modellerini formülleştirmek suretiyle istatistiksel yöntemlere başvurarak ağaç oluşturan yöntemler tarafından etkin bir şekilde kullanılmıştır. Neyman ve Holmquist DNA evriminin olasılık modellerini ortaya çıkarmışlardır ve Neyman istatistiksel tahminleme yöntemlerini dizi verileri üzerinde kullanmıştır. Felsenstein, bilgiyi etkin bir şekilde kullanmak ve muhtemel pek çok ağaç içerisinde en ideal ağacı belirlemede istatistiksel testler kullanma imkânını yaratmak için, maksimum olasılık yöntemi olarak adlandırılan yeni ve güçlü bir yaklaşım sunmuştur. Olasılık yöntemleri, hesaplama

yaparken oldukça zaman alırlar ve çok büyük veri setlerini kapsamlı analiz edemezler. [1, 3].

Bu yöntem, muhtemel filogenetik ağaçların dağılım olasılıklarını belirlemede standart istatistiksel araçlar kullanır. Varsayımlardan yola çıkarak taksonlar arası ilişki için en iyi olasılığı belirlemeyi amaçlar. Olası tüm ağaç topolojileri ve değişkenler arasından olasılığı en yüksek olan ağacı seçer. Maksimum olasılık yöntemi, evrimsel değişimin açık ihtimal modellerini oluşturmaya çalışır. Bu yöntem genelde mevcut yöntemler arasında en tutarlı olanıdır. Karakter ve oran analizlerinde, hipotetik ataların sekanslarını belirlemede kullanılabilir. Nükleotidler, aminoasitler ve diğer verilerin sekanslarına uygulanabilir [4,13, 38, 80, 82].

1.5.4.2.3 Bayesian Yöntemi

Bayesian yöntemi, pekçok alanda oldukça yaygın olarak kullanılan ve temelde maksimum olasılık metoduna benzeyen popüler bir yöntemdir. Bir filogeniyi doğru bir şekilde inşa etmede karakter temelli yöntemler arasında en etkili yöntem olduğunu deneysel olarak kanıtlamıştır [83, 84, 85]. Öncül olasılık kullanımı ve mevcut gözlemleri esas alarak gözlenmeyen bir durum hakkında sonuç çıkarma ilkesine dayanır. Bu yöntemde, önceki olası ağaç dağılımlarından biri temel alınır. Bu bize analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılığı ifade eder. Önceki dağılımın seçimi, bu yöntemi kullananların seçimlerindeki farklı noktaları teşkil eder. Analiz rastgele dal uzunluğuna sahip rastgele ağaç topolojisi ve baz frekansları, yedekleme oranı, gamma dağılımı, değişken olmayan pozisyonların orantısı, kovarion gibi rastgele olasılık parametreleri ile başlar. Markov zinciri simülasyonu kullanılarak yapılan döngüler neticesinde ağaçlar elde edilir. Ağaçlar posterior olasılığına göre seçilir ve son olarak posterior prensibiyle ölçeklendirilmiş uyumluluk ağacı oluşturulur [3, 4, 13, 38, 80].

1.5.4.3 Filogenetik Ağaçlarda Güvenilirlik Testi ve Seç-Bağla Analizi

Filogenetik bir ağacın güvenilirlik derecesini istatistiksel olarak değerlendirmek mümkündür ve buna yönelik yaklaşımlardan biri seç-bağla testi olarak bilinmektedir. Seç-bağla testi belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi

desteklendiğini değerlendiren bir tekniktir. Seç-bağla testinde, program test edilecek veri setindeki dizilerden rasgele parçalar almak suretiyle alt örnekleme oluşturur ve mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur [3, 4, 79, 86].

Bu yeni veri seti filogeneniği hesaplamak için kullanılır ve her bir dalın desteklenme yüzdesini gösteren uyumluluk ağacı oluşturulur. Dalların açığa çıkma yüzdesi bir dalın gerçekte varolduğu durumuna olan güveni de artırır. Analiz sonucunda, %95 ya da daha fazla aynı dal bulunuyorsa, bu soy hattının önemli bir şekilde desteklendiği anlamına gelmektedir. Bir dal için seç-bağla desteğinin çok daha az olması durumunda genellikle ağacın bu kısmındaki dallanma modelinin belirlenemediği kanısına varılır ve ağaçta bu dal tek düğümünden çok çatallı olarak adlandırılır [1, 3, 4, 79].

1.6 *Acanthalburnus microlepis* ile İlgili Bilgiler

Cyprinidae familyasının taksonomisi, taksonomistler arasında her zaman tartışma konusu olmuştur. Morfolojik karakterlere dayanılarak familya, çeşitli araştırmacılara göre 2-12 altfamilyaya ayrılmıştır. Bunlardan biri olan Leuciscinae alt familyasının, Türkiye'de 17 cinse ait 54 tür tarafından temsil edildiği bilinmektedir [87].

Bir Leuciscinae cinsi olan *Acanthalburnus*, Berg tarafından, dorsal yüzgecin sonuncu basit ışınının kemikleşmiş olması ile ayrılmış, *Alburnoides*'e yakın bir monotipik cins olarak karakterize edilmiştir. Bu cins için karakteristik olan morfolojik özellikler şunlardır; ağız eğik ya da subterminal konumlu, kavdal yüzgeç uzun ve derin çentikli, yanal çizgi tam ve üzerinde 68-82 delikli pul vardır. Lateral çizgi ile dorsal yüzgeç arasında 13-15 ve lateral çizgi ile pelvik yüzgeç arasında 6-8 pul vardır. Dorsal yüzgeç 8½ dallı ışın, anal yüzgeç 13-17½ dallı ışına sahip, dorsal yüzgecin sonuncu basit ışını kemikleşmiştir. Solungaç dikenleri kısa ve kalın, ilk solungaç yayı üzerinde 10 tane solungaç dikenini yer alır. Farinks dişleri 2.5-5.2 veya 2.5-4.2, tırtıklı değil, en büyüğü belirgin şekilde tırtıklı olabilir. Gözlerden başlayıp kuyruk yüzgeci kaidesine kadar lateral orta hat boyunca uzanan koyu renkli ve geniş bir bant bulunur. Dorsal ve kavdal yüzgeçlerin uçları siyahtır [87].

Türün dağılımı, Kura'nın alt sınırları hariç, Urmia gölü ve Aras'ın kolları da dahil olmak üzere, Kura drenajı ile sınırlıdır. Kura havzasının tek endemik cinsi olduğu belirtilmiştir. *Acanthalburnus* cinsi morfolojik olarak birbirine oldukça benzeyen fakat coğrafik olarak birbirinden ayrılmış *Acanthalburnus microlepis* ve *Acanthalburnus urmianus* olmak üzere iki türe ayrılmaktadır [87].

Berg'e göre cins yalnızca *Acanthalburnus microlepis* türü ile temsil edilmektedir. Morfolojik ve osteolojik özellikleri ise şöyledir; dorsal yüzgeçten önce görülen çıkıntılı bir omurga ile birlikte yanlardan belirgin şekilde basık ve koyudur. Ağız küçük, eğik ya da subterminal konumludur. Predorsal bölge, başın arka kısmına doğru eğimlidir, burun yuvarlaktır. Pullar, düzenli bir şekilde vücut üzerine yerleşmiştir [87].

Pelvik yüzgeç ve anüs arasında, anterior kısımda derinliği azalan pulsuz, etli ve derin bir omurga bulunur. Pelvik yüzgeç uzundur. Açık bir şekilde dorsal yüzgecin başlangıcının önünden başlar. Pelvik aksiller uzundur. Dorsal ve anal yüzgeçlerin dış kenarları konkav, uçları siyah bantlıdır. Kavdal yüzgeç çok derin çatallı ve lobların ucu sivridir [87].

Lateral line, 70 (1), 75 (2), 76 (2), 77 (5), 78 (5), 81 (2) ve 83 (1)+1-3 delikli pul ve 70 (1), 73 (2), 74 (2), 75 (4), 76 (2), 77 (3), 78 (1), 79 (1), 80 (2) ve 83 (1)+1-3 lateral serideki pullarla tamamlanmıştır. Dorsal yüzgeç 3 basit ve 8½ dallı ışın, anal yüzgeç 3 basit ve 14 (1), 15 (12), 16 (7) ½ dallı ışın, pektoral yüzgeç 13 (1), 14 (18) ve 15 (1) ve pelvik yüzgeç 7 (2), 8 (18) dallı ışına sahiptir. Solungaç dikenleri 10 (3), 11 (17), ilk brankiyal yayın üzerinde, kalın, kesik ve geniş aralıklıdır [87].

Beşinci seratrobranşiyal yay, ince, hilal gibi ve öne doğru bükülmüştür. Faringeal dişler 2.5-5.2 veya 1.5-5.2, ince, belirgin kıvrık uçlu ve tırtıksızdır. Periton, koyu gri ve beneklidir. Premaksilla ince, yükselen çıkıntısı uzun ve posterior ucu sivridir. Maksiller dar, kısa, yükselen çıkıntı eğiktir. Dentary, dar ve uzun, ön tarafa doğru içbükey, çıkıntısı dikey ve orta bölümde konumlanmıştır. Kleitrum neredeyse dik ve öne doğru genişlemiştir. Supraetmoid kemik kısa ve dar olup, öne doğru v şeklinde bir yarık ya da çentiklidir. Hiyomandibul geniş, seratrobranşiyal kemer ince ve orak şeklindedir. Vertebral formül 44-45: 22-23+22'dir. Abdominal omurga oranı %50-51, predorsal omurga oranı %31-32'dir [87].



Şekil 1.3 *Acanthalburnus microlepis*'in morfolojik teşhisinde faydalanılan kısımlardan bazıları; a. Sol dentary, b. Maksilla c. Kleitrum d. Faringeal dişler e. Solungaç dikenleri f. Supraetmoit kemik [87].

Canlıyken vücut gümüş renkli, dorsalde gri veya mavimsi olup, ventralde gümüş renkli pullarla örtülüdür. Dorsalde kavdal pedinkülün üst tabanı ve operkulum arasında yaklaşık 3 sıra büyük pul ve parlak gri renkli bir bant yer alır. Tüm yüzgeçler gri ve şeffaf, dorsal ve kavdal yüzgecin dış kenarları siyah bantlıdır. Pektoral yüzgecin tabanı ve dış kenarı siyah bantlıdır. Pelvik ve anal yüzgeçler kırmızı turuncu renktedir [87].



Şekil 1.4 *Acanthalburnus microlepis*

Erkeklerde baş, ense ve dorsal kısımda büyük üreme tüberkülleri bulunur. Pektoral ve pelvik yüzgeçlerin dallı ışınlarında ve düzenli bir şekilde sıralanmış pulların serbest uçları üzerinde de iki sıra halinde mevcuttur. Bu yapılar dişi bireylerin başlarında da bulunabilir ancak erkeklerdeki gibi çok iyi gelişmemiştir [87]. Tür ile mevcut çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Güven ve ark., 2008 yılında yaptıkları çalışmada, *Alburnus filippii* ve *Acanthalburnus microlepis*'in iskelet kaslarındaki çeşitli oksidatif stres göstergelerinin normal seviyelerini araştırmış ve antioksidan aktivite yönünden SOD ve GST enzimleri her iki türde de benzer sonuçlar verirken genel olarak antioksidan aktivitenin *Alburnus filippii*'de daha yüksek düzeyde görüldüğünü ortaya koymuşlardır. *Acanthalburnus microlepis*'in iskelet kası CAT aktivitesi *A. filippii*'den önemli oranda ($p < 0.001$) daha yüksek tespit edilmiştir. Bu bulgularla balıkların iskelet kasında antioksidan aktivite yönünden özellikle CAT enzimi bakımından *A. microlepis* iskelet kasının çok daha etkili olduğu, diğer oksidatif stres göstergelerinin ise *A. filippii*'de daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır [88].

Vasilyan ve ark., 2008'de Ermenistan tatlı sularından aldıkları Cypriniformes takımına ait 6 türün karyotip analizini yapmış ve *Acanthalburnus microlepis*'in kromozom sayısını $2n=50\ 10M + 28SM + 12STA$, $NF= 88$ olarak tespit etmişlerdir [89].

Ayaz M. ve Baysal A., "Kars Çayı Balıklarının Taksonomik Yönden Araştırılması" başlıklı çalışmalarında 4 familyaya ait (Cyprinidae, Siluridae, Cobitidae, Balitoridae) içlerinde *Acanthalburnus microlepis*'in de yer aldığı 9 tür ve 6 alttür tespit etmişlerdir [90].

Alagöz ve ark., Seyhan Baraj Gölünde yaptıkları çalışmada Salmonidae familyasına ait 1, Cyprinidae familyasına ait 12 (*Acanthalburnus microlepis* çok düşük oranla bu türler arasında yer almaktadır), Cobitidae familyasına ait 1 ve Cyprinodontidae familyasına ait 3 tür olmak üzere toplamda 17 türü ilk kez kayıt altına almışlardır. Yalnız bu tür kompozisyonu üzerinde, gölde kişiler ve kuruluşlar tarafından yapılan balıklandırma çalışmaları ve kafes balıkçılığı nedeniyle kafeslerden kaçan balıkların oldukça etkili olduğu kanısına varmışlardır [91].

Türkmen ve ark., *Acanthalburnus microlepis* türünün büyüme ve üreme özelliklerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada aylık olarak yakalanan 1105 türü incelemişlerdir. 1-7 yaşları arasında dağılım gösteren türlerin %51.49' u erkek, %48.51'i dişilerden oluşmaktadır. Dişiler, erkeklerden daha büyük boy ve yaşlara ulaşmış olup, Von Bertalanffy büyüme parametreleri $L_{\infty}= 29.87$ cm, $K= 0.1049$, $t_0= -1.92$ olarak hesaplanmıştır. Boy-ağırlık ilişkileri erkek ve dişiler için sırasıyla; $W=0.0099 L^{3.098}$ ve $W=0.0118 L^{3.052}$ olarak hesaplanmıştır. Her iki cinsiyette de 2 yaşında cinsi olgunluğa ulaşan bireylerde üreme Mayısın ilk haftasında başlayıp, Temmuzun sonuna kadar devam etmiştir. Fekondite 2830-9705 adet/dişi arasında değişmiş olup, balığın boyu, yaşı, gonad ve toplam ağırlığı ile birlikte artmıştır [92].

Aksu ve ark., *Acanthalburnus microlepis*' in periferik eritrositleri üzerine NaOCl (sodyum hipoklorit)' nin genotoksik etkisini araştırmak üzere mikronükleus testinden faydalanmışlardır. Farklı dozlarda sodyum hipoklorite maruz bırakılan türlerin 96 saatlik LC50 değerini 0,6343 mg/L olarak bulmuşlardır. 36 saat sonunda negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında mikronükleuslu eritrositlerin frekanslarında artış olduğunu saptamışlardır [93].

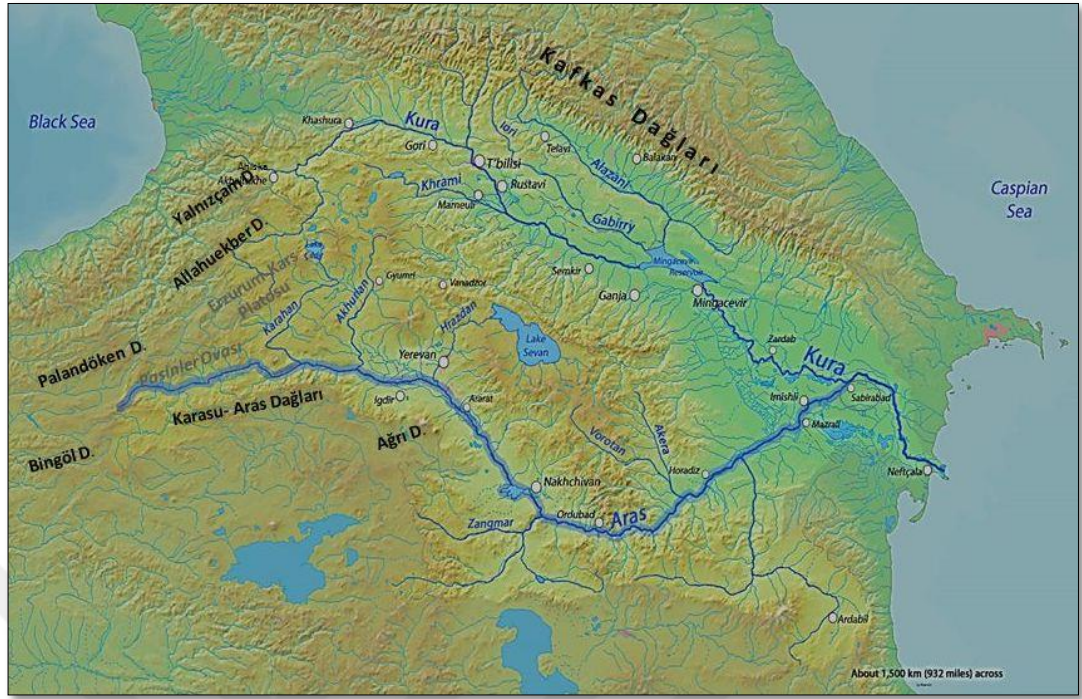
1.7 Çalışma Alanı ve Genel Özellikleri

Kura ve Aras nehirleri, Türkiye'den doğan Kafkasya'nın en büyük nehirleri olup, Gürcistan, Ermenistan, Azerbaycan ve İran'da akış göstererek Hazar Denizi'ne dökülürler. Türkiye'de 25 esas nehir havzası bulunmakla birlikte, trans sınır havzası olma özelliğiyle Kura-Aras havzası ülkemizin doğusunda yer almaktadır [6].

Kura 1.364 km'lik bir uzunluğa sahiptir ve Gürcistan ve Azerbaycan'dan geçerek Hazar Denizi'ne dökülür. Aras nehri ise Erzurum'un güneyindeki Bingöl dağlarından kaynaklanarak, doğuya doğru akar ve Digor'un güneydoğusundaki Arpaçay'la birleşerek Türkiye-Ermenistan sınırını oluşturur. Aras nehri 1.264 km uzunluğa sahip, olup kuzeyde Türkiye-Ermenistan, Türkiye-Azerbaycan (Nahçıvan) güneyde Türkiye-İran sınırını oluşturur. Ardından kuzeye doğru akar ve Hazar denizine dökülmeden kısa bir süre önce Kura'ya katılır. Kura ile kısa bir süre birlikte akmaya devam ettikten sonra Hazar denizine dökülürler. Her iki nehir, hidroelektrik ve sulama için kullanılan ve nehir akışını düzenlemeye katkı sağlayan barajlar tarafından regüle edilmektedir [6, 94].

Aras nehrinin Kağızman civarında, yıllık ortalama debisi $53 \text{ m}^3/\text{sn}$ civarındadır. Aras nehrinin en yüksek akım değerlerine kar erimeleri ve artan yağışa bağlı olarak yaklaşık $200 \text{ m}^3/\text{sn}$ ile Mayıs ayında ulaşılırken, en düşük akım değerlerine ise yaklaşık $1 \text{ m}^3/\text{sn}$ ile yağışların da azaldığı Eylül ayında ulaşılmaktadır. Çevresinden akarsuya $1 \text{ m}^3/\text{sn}$ akıma bile sahip olmayan sürekli ve süreksiz birçok akarsu dâhil olmaktadır [95].

Aras nehrinin Türkiye'deki büyük kısmı Kars ve Iğdır illeri dâhilinde yer almaktadır. Nehrin Kars ili, Sarıkamış ve Kağızman ilçelerinde bulunan ve batı doğu yönünde uzanan vadisinin irtifası 1300 metreden başlayarak 1000 metre civarına düşmektedir. Etrafı eğimli yamaçlarla çevrili ve irtifası 3000 metreyi bulan dağlarla sınırlı olan vadi ve çevresi kaplanmış olduğu yaklaşık 2000 km^2 'lik alanıyla kabaca il topraklarının % 20'sini oluşturmaktadır. Mevcut irtifa ve morfolojik koşulların etkisiyle iklimik, bağlı olarak edafik ve diğer koşulların ilin geri kalanına göre oldukça farklılaştığı bu alanda yıllık ortalama sıcaklık 10°C civarını bulmaktadır [96].



Şekil 1.6 Kura-Aras Nehirleri



Şekil 1.7 Kura-Aras Havzası [6]

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Örneklerin Toplanması ve Çalışma Alanı

Acanthalburnus microlepis türüne ait örnekler, daha önce bu tür ile ilgili yapılan çalışmalar ve literatür esas alınarak, Kura-Aras Havzasının Türkiye sınırları içerisinde kalan bölümünde çeşitli lokasyonlardan örneklenmiştir (Çizelge 2.1; Çizelge 2.2). Lokasyonlar belirlenirken, Kura ve Aras nehirlerinin ana ve yan kollarından farklı noktaların seçilmesine dikkat edilmiştir. Bu nehirlerin Türkiye sınırları dahilindeki örnekleme lokasyonlarını gösteren haritalar oluşturularak, bu alanların fotoğrafları çekilmiştir (Harita 2.1, Harita 2.2).

Türe ait balık örnekleri, mitokondriyal DNA COI ve cytb gen bölgeleri aracılığıyla, kendi içindeki filogenetik ilişkisi araştırılmak üzere, belirlenen lokasyonlardan elektroşoker ile yakalanmıştır.

Laboratuara getirilen balıklardan steril ve tek kullanımlık binstüriler aracılığıyla yüzgeç ve kas dokularına ait örnekler alınmış, bu örnekler -80°C'de muhafaza edilmiştir. Her lokasyondan deneysel aşamada karşılaşılabilecek aksaklıklar göz önünde bulundurularak yeterli sayıda örnek alınmasına özen gösterilmiş ve doku örnekleri ayrı tüplere konmuştur. Tüpler lokasyon adı, tür adı, doku türü, tarih gibi bilgilerin yer aldığı bir etiketle etiketlenmiştir. Ayrıca bu bilgilere koordinat bilgileri de eklenerek bir arazi defteri oluşturulmuştur

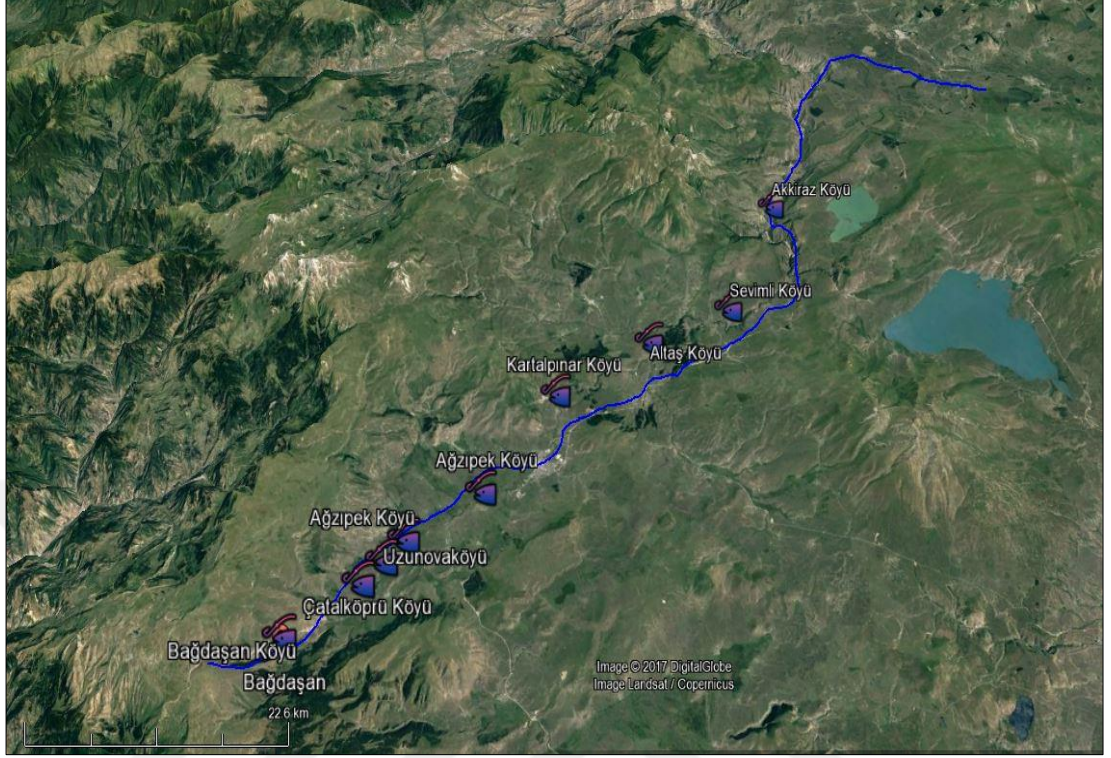
Çizelge 2.1 Kura nehri havzasında yer alan lokasyonlar

Lokalite	Koordinatlar	Tarih
Altaş köyü	41.1598-42.8674	15.10.16
Sevimliköy	41.1600-42.9857	15.10.16
Akkiraz köyü	41.2430-43.1182	15.10.16
Kartalpınar köyü	41.1461-42.7482	15.10.16
Çatalköprü	41.0696-42.4835	21.10.16
Uzunova köyü	41.0940-42.5087	21.10.16
Ağzipek köyü	41.0964-42.6263	21.10.16
Bağdaşan köyü	41.0560-42.3981	21.10.16

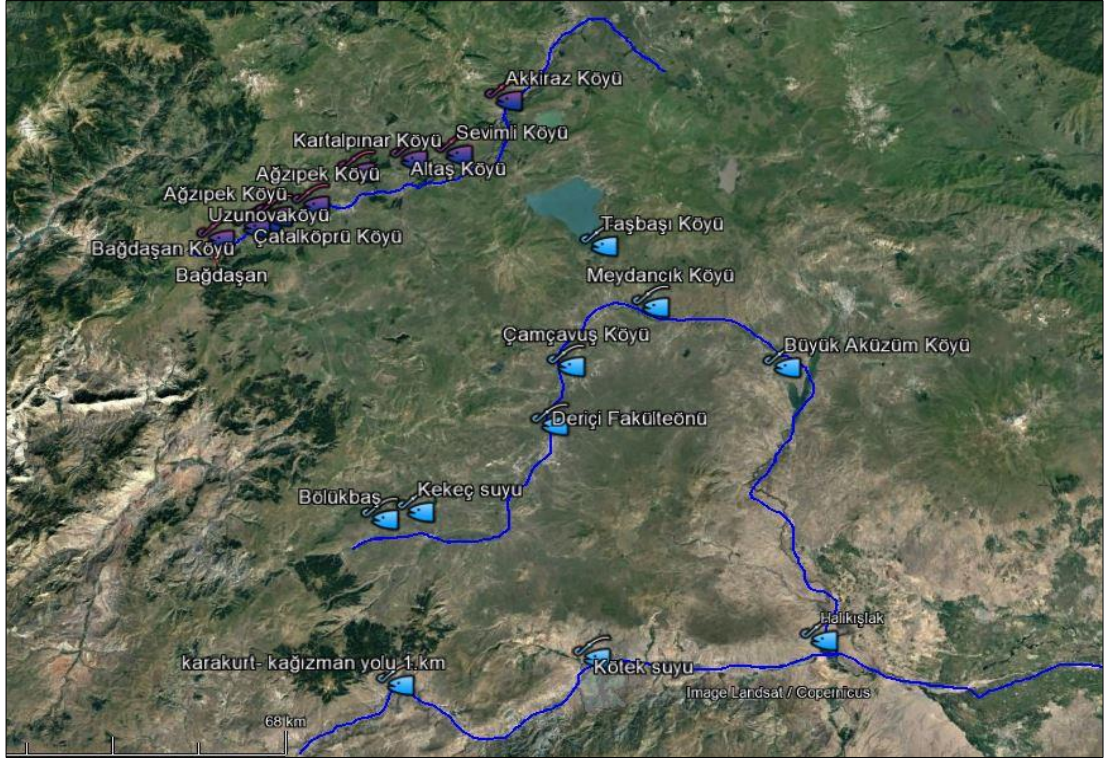
Çizelge 2.2 Aras nehri havzasında yer alan lokasyonlar

Lokalite	Koordinatlar	Tarih
Bölükbaş köyü	40.4843-42.6873	04.10.16
Çamçavuş köyü	40.71.96-43,1479	08.10.16
Büyük Aküzüm köyü	40.6635-43.6637	08.10.16
Meydancık köyü	40.8118-43.3871	08.10.16
Taşbaşı köyü	40.9339-43.2927	08.10.16
Kekeç suyu	40.4812-42.7870	09.10.16
Karakurt	40.1596-42.6137	22.10.16
Halıkışla köprü	40.1268-43.6337	22.10.16
Aras nehri	40.1811-43.1462	22.10.16
Kağızman	40.1710-43.0924	22.10.16

Harita 2.1 Kura Nehri Üzerinde Bulunan Lokasyonlar



Harita 2.2 Aras Nehri Üzerinde Bulunan Lokasyonlar





Şekil 2.1 Örnekleme yapılırken



Şekil 2.2 Altaş köyü



Şekil 2.3 Sevimliköy

Kura Havzası üzerinde işaretlenen, Sevimliköy çevresinde inşa edilen barajlar nedeniyle suların çok fazla yükselmesi ve arazi koşullarının son derece elverişsiz olması bu lokasyondan örnekleme yapılmasını engellemiştir.



Şekil 2.4 Akkiraz köyü

Akkiraz köyü çevresinden geçen Kura nehrinin farklı noktalarından yapılan örnekleme sonucunda türe ait herhangi bir örneğe rastlanmamıştır. Suyun akış hızının oldukça yüksek, çok berrak ve temiz, içerisinde alabalık örneklerinin olduğu gözlemlenmiştir. *A. microlepis* örneklediğimiz sular dikkate alındığında, çok hızlı akan, temiz sularda bu türe rastlanmaması dikkat çekmektedir.



Şekil 2.5 Kartalpınar köyü



Şekil 2.6 Çatalköprü



Şekil 2.7 Uzunova köyü



Şekil 2.8 Ağzıpek köyü



Şekil 2.9 Bağdaşan köyü

Bağdaşan köyü içerinden geçen suda, evsel atıklardan kaynaklı çöp birikintilerine ve aşırı kirlenmeye rastlanıldı. Suyun akış hızının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Farklı noktalardan tekrarlanan örnekleme denemeleri sonucunda su içerisinde herhangi bir balık türüne rastlanmadı.



Şekil 2.10 Bölükbaş köyü



Şekil 2.11 Çamçavuş köyü



Şekil 2.12 Büyük Aküzüm köyü



Şekil 2.13 Meydancık köyü

Meydancık köyü civarında bulunan barajın kapaklarının açılması hem arazi çalışmasını olumsuz yönde etkilemiş, hem de su yatağı ve debisinin değişmesine neden olmuştur.

Çıldır gölüne bağlı Taşbaşı köyüne ait sudan yapılan çalışmada ağırlıklı olarak *Alburnus* türlerine ve diğer balık türlerine rastlanmıştır. Bu suyun önü baraj çalışması nedeniyle kesilmiş olduğundan, su derinliği oldukça yüksek ve su debisi derinliğe bağlı olarak son derece azdır.



Şekil 2.14 Kekeç suyu



Şekil 2.15 Karakurt



Şekil 2.16 Halıkışla köprü



Şekil 2.17 Aras nehri ana kol

Aras nehri üzerinde yer alan son lokasyonlar Kağızman yol ayrımı civarında bulunan ana kol ve yine Kağızman'a bağlı Kötek köyünden geçen Kötek çayıdır. Birkaç lokalitede olduğu gibi ana kol üzerinde farklı noktalarda gerçekleştirilen baraj çalışmaları, hem su seviyesini hem de yatağın geniş olmasından kaynaklı olarak su akış hızını oldukça yükseltmiş, bu da farklı noktalardan denenmiş olmasına rağmen örnekleme yapılabilmesini imkansız hale getirmiştir. Su akış hızının son derece yüksek olduğu Kötek çayında yapılan çalışmalarda türe ait örneklere rastlanılmamıştır.

Arazi çalışmalarını genel bir açıdan değerlendirecek olursak, *A. microlepis* türlerinin su akıntılı bile olsa kenarda bulunan yosun ve taşların daha yoğun olduğu, suyun akışının yavaşladığı kısımlarda örnekleyebildiğimizi söyleyebiliriz. Çok temiz, akış hızı yüksek sulara ise türe rastlanılmamıştır.

2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- EDTA
- SDS
- Proteinaz K

- Tris HCl
- TE-Tris ve EDTA
- NaCl
- Fenolkloroform
- NaOAc
- Absolüt etanol
- TAE buffer
- Agaroz
- Etidyum bromür
- Jel boyası
- Taq polimeraz
- 10X PCR buffer
- MgCl₂
- dNTP

2.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- Santrifüj
- Otoklav
- PCR cihazı
- Agaroz jel elektroforezi
- UV Jel Görüntüleme
- pH metre
- Vorteks
- Su banyosu
- Isı bloğu
- Nanodrop spektrofotometre
- Terazî

2.4 Total DNA Elde Edilmesi

Örneklere ait kas ve yüzgeç dokuları cam tüpler içerisine alınarak üzerine Tris HCl eklenmiş ve homojenizatörde iyice parçalanmıştır. Homojenizatlar ependorf tüplerine aktarılmış ve her örnek için genomik DNA izolasyonu protokolü uygulanmıştır. Bu protokolün işlem basamakları sırasıyla şu şekildedir:

1. Her doku homojenatının üzerine;
200 µl dH₂O
50 µl 0,5 M EDTA
10 µl %20 SDS-sarkosyl
10 µl proteinaz K (10 mg/ml)
10 µl 1M Tris-HCl (pH:8)
5 µl 5 M NaCl, eklendi ve karışım 5 dakika boyunca vortekslendi.
2. 30 dk 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletildi. Bu süreçte her 10 dakikada bir vortekslendi.
3. Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi ve yavaşça ters düz edildi.
4. 5 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.
6. Fenol:kloroform:izoamil alkol işlemi 3 defa yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı, her adımda santrifüj sonunda üst sıvı alındı ve temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı.
7. Yeni ependorflardaki üst sıvıya hacminin 1/10'u kadar 3 M NaAc ve hacminin 2 katı kadar absolüt etanol eklenip -20°C'de 1 gece bekletildi.
8. Süre sonunda örnek 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet kurutuldu.
10. Peletin üzerine 200 µl dH₂O eklenip pelet çözüldü.
11. Çözülen peletin üzerine 1/10 hacminde 0,3 M NaOAc ve 440 µl absolüt etanol eklenip, -20°C'de 1 gece bekletildi.
12. Süre sonunda 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet kurumaya bırakıldı.
14. Pelet üzerine 100 µl dH₂O eklenerek çözüldü.

15. Elde edilen genomik DNA, spektrofotometrik ölçüm ve % 0.8'lik agaroz jel görüntüsüne göre, kalite açısından kontrol edildi [3].

2.5 DNA'ların Spektrofotometrik Ölçümü, Miktar ve Kalite Tayini

DNA örneklerinin nanodropta, 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlerde kör olarak, DNA örneklerine ait peletlerin çözüldüğü tampon kullanılmıştır [3].

2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR işlemi, Taq polimerazlı standart teknik kullanılarak 25 µl reaksiyon hacminde ve 57°C primer bağlanma sıcaklığında yapılmıştır. COI ve cytb için kullanılan evrensel primerlerin sekansları ve uygulanan PCR karışımı sırasıyla Tablo 2.3 ve 2.4'te verilmiştir. Tablo 2.5'te ise gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli olan PCR koşulları yer almaktadır.

Çizelge 2.3 COI ve cytb gen bölgeleri için kullanılan primerlerin nükleotid sekansları

Primer		
COI	Primer dizisi	Tm °C
Forward	TCTCAACCAACCACAAAGACATTGG	62
Reverse	TAAACTTCGGGGTGACCGAAGAATCA	66
Cytb		
Forward	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	63
Reverse	CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	65

Çizelge 2.4 COI ve cytb gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı (karışım her iki gen bölgesi için 55 örnek üzerinden hesaplanarak hazırlanmıştır)

Reaksiyon karışımı	1 Reaksiyon için	Tüm reaksiyon için
Taq polimeraz	0,5 µl	27,5 µl
10X PCR buffer	2,5 µl	137,5 µl
MgCl ₂	2 µl	110 µl
dNTP	1,5 µl	82,5 µl
Primer f	2 µl	110 µl
Primer r	2 µl	110 µl
Total DNA	1 µl	50 µl
dH ₂ O	13,5 µl	742,5 µl

Her tüpe 10,5 µl Taq polimeraz, 10X PCR buffer, MgCl₂, dNTP, Primer f ve Primer r'den oluşan karışımla birlikte, 13,5 µl dH₂O ve 1 µl total DNA eklenerek toplam PCR karışımının 25 µl olması sağlanmıştır. PCR işleminden sonra her iki gen bölgesi için nanodropta ölçümler yapılarak, hangi saflıkta ve miktarda istenilen gen bölgelerinin elde edildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 2.5 COI ve cytb gen bölgelerinin çoğaltılması için gereken PCR koşulları

PCR koşulları	
Başlangıç denatürasyon	94°C, 3'
Döngü sayısı	40
Denatürasyon	94°C, 1'
Primer bağlanması	57°C, 1'
Uzama	72°C, 1'
Son uzama	72°C, 5'
Son bekleme sıcaklığı	4°C

2.7 Agaroz Jel Analizi ve Jel Görüntüleme İşlemi

Tüm DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezinde, % 0.8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jelde yürütülen DNA parçaları UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dökümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir. Agaroz jel için TAE Buffer kullanılmış, ana TAE'den 220 ml alınarak üzerine 2,2 gr toz

agaroz eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda ısıtılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra Etidyum bromür eklenerek karışım jel tankına boşaltılmış, taraklar yerleştirildikten sonra donmaya bırakılmıştır. Jel tamamen donduktan sonra taraklar çıkartılmış, jel tankı cihaza oturtulmuştur.

Daha sonra kuyucuklara yüklenecek markır ve DNA numuneleri hazırlanmıştır. Markır için, 2 µl jel boyası, 4 µl distile su ve 1 µl markır kullanılarak toplam 7 µl'lik bir karışım hazırlanmıştır. Kuyucukların ilk sırasına markırlar yüklenmiştir. Diğer kuyucuklara ise, 2 µl boya ve 10 µl DNA'dan oluşan toplam 12 µl'lik karışım yüklenmiştir. Son aşamada cihaz 90 voltta, 50 dk olacak şekilde çalıştırılmış, numunelerin jelde yürütülmesi sağlanmıştır. PCR ürünlerinin büyüklüğü ve kalitesini kontrol etmek amacıyla yapılan jelde yürütme işleminden sonra, jel UV altında görüntülenmiştir.

2.8 Dizi Analizi

COI ve cytb gen bölgelerinin, dizi verilerinin geçerliliğini kontrol etmek amacıyla her iki yönde dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla PCR ürünleri bir sekans firmasına gönderilmiştir. COI ve cytb dizilerinden birer örnek NCBI veritabanında bulunan BLAST opsiyonu aracılığıyla benzer dizinler için Genbankta ve farklı biyoinformatik programlarla (GeneTool, PepTool ve İnterproscan) birlikte analiz edilmiştir.

Daha sonra *A. microlepis* COI ve cytb genlerinin evrimsel analizi yapılmıştır. Bunun için Kura Aras Havzasının Türkiye sınırları dahilinde lokalize olan *A. microlepis* türlerinden elde edilen dizi analizi sonuçları kullanılarak, NCBI veri tabanından hangi türlere benzerlik gösterdiği incelenmiştir. Dizi analiz sonuçları elde edilen dizilerle filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu türün kendi içinde farklı lokalitelerden alınma kriteri göz önüne alınarak, bunlar arasındaki benzerliği belirlemek için nükleotid dizileri EBI veri tabanındaki dbcluster ile dikey hizalanmıştır.

2.9 Filogenetik Analiz

Dikey hizalama ve ağaç analizlerinin oluşturulabilmesi için ClustalW (1.83) veri hazırlanmasında kullanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmak için Neighbor-joining yöntemi ile MEGA programı kullanılmıştır.



3. BULGULAR

Mitokondriyal DNA dizi analizleri için gerekli olan total DNA, *A. microlepis* örneklerine ait dokulardan elde edilmiştir. Hedef gen bölgeleri COI ve cytb'nin çoğaltılması için PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.1 Total DNA Elde Edilmesi ve Spektrofotometrik Ölçüm

A. microlepis türlerine ait doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu protokolü uygulanarak DNA elde edilmiştir. İzolasyonu yapılan DNA'ların kalite ve saflığını belirlemek için nanodropta spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Tüm örneklere ait total DNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları

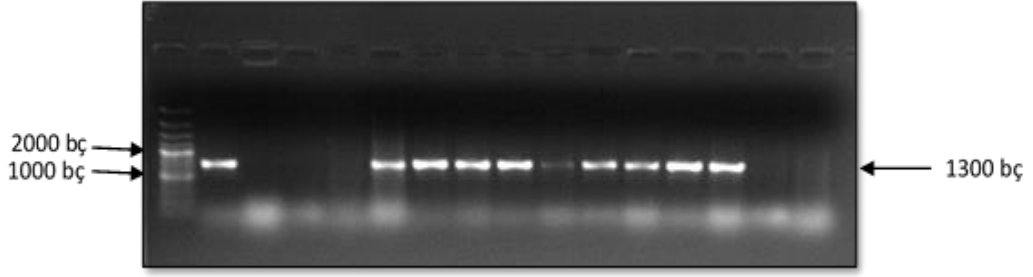
Sample ID	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	Concentration(ng/ul)	Sample Type
Bölükbaş 1	4.548	2.601	4.463	1,75	1,02	227,3	dsDNA
Bölükbaş 2	0,637	0,391	1.394	1,63	0,46	31,8	dsDNA
Bölükbaş 3	8.768	5.114	10.982	1,71	0,8	438,3	dsDNA
Bölükbaş 4	3.039	1.676	2.471	1,81	1,23	151,9	dsDNA
Halıkışla 1	38.788	30.529	78.455	1,27	0,49	1939,4	dsDNA
Halıkışla 2	36,09	21.416	45.637	1,69	0,79	1804,5	dsDNA
Halıkışla 3	7.591	4,07	5.263	1,87	1,44	379,5	dsDNA
Halıkışla 4	6.611	3.616	4.858	1,83	1,36	330,5	dsDNA
Halıkışla 5	13,34	7,21	7.589	1,85	1,76	667	dsDNA
Karakurt 1	10.063	5,27	7.054	1,91	1,43	503,1	dsDNA
Karakurt 2	9.878	7,44	10.263	1,33	0,96	493,9	dsDNA
Karakurt 3	4.223	2.308	3.142	1,83	1,34	211,1	dsDNA
Karakurt 4	4.653	2.447	2.829	1,9	1,64	232,6	dsDNA
Karakurt 5	4.687	2,58	3.057	1,82	1,53	234,3	dsDNA
Karakurt 6	7.991	5.618	6.035	1,42	1,32	399,5	dsDNA
Ağzıpek 1	9.643	6.503	9,72	1,48	0,99	482,1	dsDNA
Ağzıpek 2	3.071	2.091	3.135	1,47	0,98	153,5	dsDNA
Ağzıpek 3	4.791	2.917	5.266	1,64	0,91	239,5	dsDNA
Ağzıpek 4	2.975	1.944	3.513	1,53	0,85	148,7	dsDNA
Ağzıpek 5	10.717	6,92	9,7	1,55	1,1	535,8	dsDNA
Altaş 1	5.075	2,62	3.448	1,94	1,47	253,7	dsDNA
Altaş 2	2.367	1.211	2.015	1,95	1,17	118,3	dsDNA

Altaş 3	9,41	5,06	8.418	1,86	1,12	470,4	dsDNA
Altaş 4	6.837	4.011	6.274	1,7	1,09	341,8	dsDNA
Altaş 5	3.411	1.865	1.644	1,83	2,07	170,5	dsDNA
Çamçavuş 1	12,4	7.619	8.952	1,63	1,39	620	dsDNA
Çamçavuş 2	9.649	5.711	7.675	1,69	1,26	482,4	dsDNA
Çamçavuş 3	25.898	21.822	76.333	1,19	0,34	1294,9	dsDNA
Çamçavuş 4	5.983	3.751	7.232	1,6	0,83	299,1	dsDNA
Çamçavuş 5	1.707	1.099	1.635	1,55	1,04	85,3	dsDNA
Çatalköprü 3	2.994	2.118	4.984	1,41	0,6	149,6	dsDNA
Çatalköprü 8	10.391	6.168	9.935	1,68	1,05	519,5	dsDNA
Çatalköprü 9	9.805	6.855	15.597	1,43	0,63	490,2	dsDNA
Kartalpınar 1	5.634	3,31	5.951	1,7	0,95	281,7	dsDNA
Kartalpınar 2	9.589	6.426	7,25	1,49	1,32	479,5	dsDNA
Uzunova *4*	3.037	1.997	3.733	1,52	0,81	151,8	dsDNA
Uzunova 4	52.211	42.475	77.434	1,23	0,67	2610,5	dsDNA
Uzunova 7	8.386	6.229	10.174	1,35	0,82	419,3	dsDNA
Uzunova 11	9.261	7.453	20.166	1,24	0,46	463	dsDNA
Kekeç 1	33.966	18.774	23,15	1,81	1,47	1698,3	dsDNA
Kekeç 2	16.917	9,54	11.085	1,77	1,53	845,9	dsDNA
Kekeç 3	12.006	6.817	7.311	1,76	1,64	600,3	dsDNA
Kekeç 4	2.611	1.595	1.981	1,64	1,32	130,5	dsDNA
Meydancık 1	6.924	4.056	6.243	1,71	1,11	346,1	dsDNA
Meydancık 2	1.145	0,796	0,544	1,44	2,1	57,2	dsDNA
Meydancık 3	16,71	9,05	8.146	1,85	2,05	835,5	dsDNA
B. Aküzüm 1	6.233	3.918	3.903	1,59	1,6	311,6	dsDNA
B. Aküzüm 2	9.041	7.041	10.578	1,28	0,85	452,1	dsDNA
B. Aküzüm 3	14,6	8.491	8.844	1,72	1,65	730	dsDNA

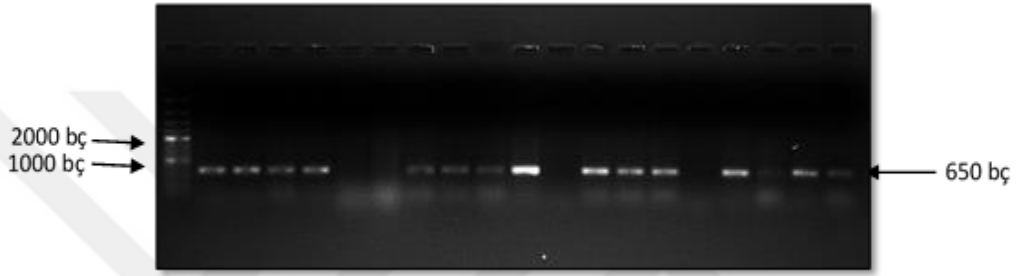
Çizelge 3.1 Tüm örneklere ait total DNA spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Devamı)

3.2 Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

Hedef gen bölgeleri, COI ve cytb, evrensel primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri kalite ve büyüklük açısından kontrol edilmek üzere agaroz jelde yürütülerek jel fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3.1 Bazı *Acanthalburnus* türlerine ait COI geni için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.2 Bazı *Acanthalburnus* türlerine ait cytb geni için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

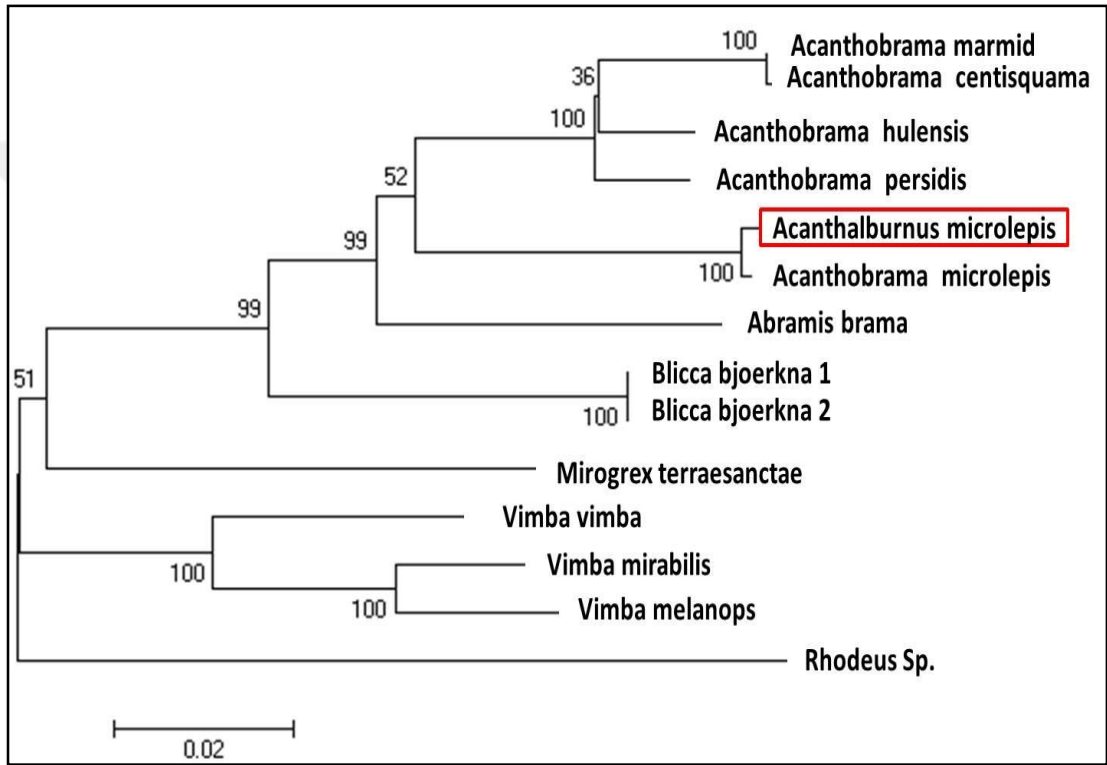
3.3 Dizi Analizi

PCR sonucu elde edilen ürünler jelden saflaştırılmış ve beklenen büyüklükte ürünler elde edilmiştir. Saflaştırılan ürünler hizmet alımı ile dizi analizine tabi tutulmuştur. Nükleotid dizisi belirlenen PCR ürünleri NCBI veritabanında analiz edilmiştir. Daha sonra *Acanthalburnus microlepis* COI ve cytb genlerinin evrimsel analizi yapılmıştır. Bunun için Kura Aras Havzasının Türkiye sınırları dahilinde lokalize olan *A. microlepis* türlerinden elde edilen dizi analizi sonuçları kullanılarak, NCBI veri tabanından hangi türlere benzerlik gösterdiği incelenmiştir. Dizi analiz sonuçları elde edilen diziler ve yapılan filogenetik ağaç sonucu, örneklerin genel olarak Cyprinidae familyasına ait diğer türlerle benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Bu türün kendi içinde farklı lokalitelerden alınma kriteri göz önüne alınarak, bunlar arasındaki benzerliği belirlemek için nükleotid dizileri EBI veri tabanındaki dbcluster ile dikey hizalanmıştır. Dikey hizalama sonuçları kullanılarak elde edilen filogenetik ağaç incelendiğinde ise farklı lokalitelerden alınan türler kendi içlerinde anlamlı bir fark göstermemiştir. Bölgeden

alınan örneklerin benzer dizilişe sahip olduğu belirlenmiş ve hepsinin aynı aile içerisinde olduğu görülmüştür.

3.4 Filogenetik Analiz

Dikey hizalama ve ağaç analizlerinin oluşturulabilmesi için ClustalW veri hazırlanmasında kullanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmak için MEGA programı kullanılmıştır.



Şekil 3.3 *Acanthalburnus microlepis*'in farklı türler ile yapılan filogenetik ağacı (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır).

4. TARTIŞMA-SONUÇ

Son zamanlarda, karşılaştırmalı filogenetik yaklaşımlar sayesinde evrimsel gelişimin altında yatan süreç ve genleri anlamada önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Organizmalar, çeşitli araştırmalarla moleküler, hücresel ve morfolojik esaslara dayanarak, aralarında meydana gelen farklılık ve benzerlikler yönünden karşılaştırılmışlardır.

Farklı habitatlarda bulunan organizmalar birbirlerinden farklı değişimler gösterebilmektedir. Aynı türe ait bireyler bile farklı morfolojik ve anatomik özelliklere sahip olabilmektedir. Bu morfolojik değişiklikler genetik çeşitliliğin ancak bir kısmını oluşturur ve genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı morfolojide görülmez. Morfolojik karakterler sadece birkaç gen tarafından kontrol edilir. Bu durum göz önüne alındığında balıklarda moleküler tekniklerin kullanılması ile belirgin ya da güvenilir morfolojik farklılıkları olmayan türler ayırt edilebilmektedir [3].

Morfoloji temelli çalışmalar bazen moleküler tekniklerle uyumsuzluk gösterse de tek başına morfolojik verilerin yetersiz kaldığı sistematik sorunların çözümünde moleküler verilerin desteği gerekmektedir. Özellikle de morfolojik karakterlerin homoloji eğilimi gösterdiği durumlarda moleküler veriler oldukça çözümleyici bir etkiye sahiptir.

Acanthalburnus microlepis türünün sistematikteki yeri ve morfolojik tanımlamaları dikkate alındığında, moleküler ve morfoloji temelli çalışmaların az sayıda olması ve türün endemik olarak yayılış göstermesinden dolayı çalışma için bu organizma tercih edilmiştir. Ayrıca, türün Kura-Aras Havzasının Türkiye içinde yer alan bölümünde farklı lokalitelerde varyasyon gösterip göstermediği de bilinmemektedir.

Bu çalışma ile *A. microlepis*'in Kura-Aras Havzası içindeki sistematik durumu ile birlikte çalışma neticesinde elde edilen verilerin mevcut çalışmalarını destekleyip desteklemeyeceği araştırılmıştır. Bu amaçla da mtDNA COI ve cytb gen dizileri kullanılmıştır.

Farklı lokalitelerden örneklenen türlerin genel morfolojilerine bakıldığında *A. microlepis* türünün ilk olarak yanlardan yassılaştırmış, parlak görünümlü ve yan tarafında

koyu bir bant bulunan bir vücuda sahip olduğu gözlenmiştir. Dorsal ve kaval yüzgeçlerin uçları siyah renkliken, diğer yüzgeçlerin uçları kırmızıdır.

Berg tarafından, *Acanthalburnus*'un *Acanthobrama*'nın sinonimi olduğu ve *Acanthalburnus* cinsinin tek bir türle yani *A. microlepis* ile temsil edildiği belirtilmiştir. Küçük ve ark., yapmış oldukları araştırmada *A. microlepis* ile ilgili ayrıntılı bir morfolojik analize yer vermişlerdir. Bu analiz sonuçlarına göre, *Acanthalburnus* cinsinin *Acanthobrama* cinsi ile oldukça benzer morfolojik karakterlere sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Durand ve ark., cytb verilerine göre Abramis kladı içerisinde yerleştirirken, Perea ve ark., mitokondriyal ve nükleer verileri esas alarak yaptıkları Leuciscinae alt familyasının filogenetik ilişkilerini ortaya çıkardıkları çalışmalarında yine bu iki cinsin sinonimizasyonun savunmuşlardır. Son olarak Eschmeyer'in *Acanthalburnus*'u *Acanthobrama*'ya dahil etmesi ile bu iki cinsin sinonimizasyonu morfolojik karakterlerle desteklenmiştir [87, 97, 98-101, 102].

Kura-Aras Havzasında endemik olarak yayılış gösteren *A. microlepis* türü ile ilgili ilgili tür içi filogenetik ilişkiyi araştırmaya yönelik yapmış olduğumuz bu çalışmada, elde ettiğimiz mtDNA verilerine göre oluşturduğumuz filogenetik ağaç ile Perea ve Eschmeyer'in moleküler, Küçük ve arkadaşlarının morfoloji temelli araştırma sonuçları örtüşmektedir. Buna göre, *Acanthalburnus* cinsi *Acanthobrama* cinsinin sinonimidir. Yine elde ettiğimiz filogenetik ağaç esas alındığında, Durand ve arkadaşlarının çalışmalarında öne sürmüş olduğu gibi *Acanthalburnus*, *Abramis* kladı içerisinde değil bir düğümden dallanmış iki ayrı cins olarak düşünülmektedir.

Bu çalışma ile *Acanthalburnus* türlerinden COI ve cytb gen bölgelerinin dizi bilgileri elde edilerek, biyoinformatik karakterizasyonu yapılmıştır. Türün Kura–Aras Havzası içerisindeki durumuna bakılarak, filogenetik ilişkisi araştırılmıştır. Mevcut çalışmalar esas alınarak *A. microlepis*'in sistematikteki yeri ile ilgili evrimsel kronometreler olarak kullanılan ve filogenetik sistematikte önemli bir yeri olan mtDNA gen bölgeleri seçilmiştir.

Bu genlerden cytb geninin, Cyprinidler de dahil olmak üzere bazı balık gruplarında filogenetik çözümlemede başarılı olduğu, bununla birlikte COI geninin de balık türlerinin teşhisinde faydalı bir araç olduğu kanıtlanmıştır [97, 101, 103-116].

Elde edilen sonuçlara göre, örneklerin *A. microlepis* olduğu ve Cyprinidae familyası içerisindeki diğer türlerle benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca lokaliteler kendi içerisinde karşılaştırıldığında hepsinin filogenetik olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. Filogenetik ağaç incelendiğinde lokaliteler arasında anlamlı bir fark olmadığı ve bölgeden alınan örneklerin benzer dizilişe sahip olduğu tespit edilmiştir. Çünkü örnekleme yapılan Kura ve Aras nehirleri ile kolları arasında da çevresel olarak bu türün genetik yapısında farklılaşma oluşturacak su bileşimi, jeolojik yapı ve besin maddeleri yönünden anlamlı bir farklılık bulunmadığı anlaşılmıştır.

Cyprinidae familyası 11 farklı soy hattına ayrılmaktadır. Örnekler incelendiğinde ise *A. microlepis*'in VIII. soy hattı içerisinde yer aldığı görülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 VIII. soy hattı içerisinde yer alan türler

Lineage VIII
<i>Abramis brama</i>
<i>Acanthobrama Lissneri, Acanthobrama marmid</i>
<i>Acanthalburnus microlepis</i>
<i>Petroleuciscus; Ac. Persidis</i>
<i>Ballerus Ballerus, Ballerus sapa</i>
<i>Blicca bjoerkna</i>
<i>Mirogrex terrasanctae</i>
<i>Vimba melanops, Vimba vimba</i>

Bu çalışmada elde edilen COI geninin *Acanthalburnus* türleri için DNA barkodlama sisteminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Çünkü elde edilen COI dizileri karşılaştırıldığında *Acanthalburnus* türleri için spesifik bir dizinin olduğu belirlenmiş ve bu dizinin *Acanthalburnus* türleri için DNA barkodu olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen tüm sonuçlar, sistematik çalışmalarda morfoloji temelli çalışmalarla birlikte genetik temelli çalışmalara da yer verilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bazı durumlarda morfolojik tanımlamalar yeterli olsa da, çoğu kez dizi temelli bir sınıflandırma çok daha doğru sonuçların elde edilmesine imkân sağlamaktadır.

Üzerinde durulması gereken bir diğ er unsur da Kura-Aras Havzasında sulama ve hidroelektrik santral amaçlı yapılan barajların havzanın doğal yapısını nasıl olumsuz etkilemiş olduğudur. Baraj civarındaki sularda debi ve akış hızının olağan dışında değişmesi, arazi çalışmalarını ve bu alanlarda örnekleme yapabilmeyi imkânsız hale getirmiştir. Normalde örneklenmesi beklenen türlere rastlanılmadığı gibi barajların farklı mevsimlerde su hacmini de ciddi ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, kendilerine özgü habitatları olan farklı balık türlerinin böyle büyük çevresel değişimlere nasıl adaptasyon sağlayacağı üzerine düşünölmelidir.

Çalışılan alanlar üzerine kurulmuş olan barajlar, balıkların geçişini ve onların habitatlarını etkilediği için populasyon yoğunluğu, tür içi varyasyon ve biyolojik çeşitlilik de olumsuz yönde etkilenmektedir. Çalışma alanında örnekleme lokasyonlarının bazılarında örnek alınamamasının nedenlerinden biri HES'lerdir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Freeman, S. and Herron, C. J., (2009). *Evolutionary Analysis*. Palme Yayıncılık, 838
- [2] Futuyma, J. D., (2008). *Evolution*, Palme Yayıncılık, 611
- [3] Öziç, C., (2012). Bazı Orthrias (Çöpçü Balığı) Türlerinin Biyoinformatik ve Deneysel Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [4] Budak, M., (2007). Türkiye Calameuta (Cephalidae: Hymenoptera) Türlerinin Morfolojik ve Moleküler Yönden İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [5] Korkmaz, M. E., (2006). İç Anadolu Cephus (Cephalidae, Hymenoptera: Insecta) Türlerinin Morfolojik Ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [6] Çiçek, E. and Birecikligil, S. S., (2016). Ichthyofauna of The Turkish Parts of Kura-Aras River Basin. *FishTaxa*, 1(1): 14-26
- [7] Lavler, J. A., (2017). Molecular and Morphometric Data Suggest The Presence of a Neglected Species in The Marine Gastropod Family Conidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 421-429
- [8] Liu, Y., Fend, V. S., Martinsson, S., Luo, X., Ohtaka, A. and Erseus, C.,(2017). Multi-Locus Phylogenetic Analysis of The Genus *Limnodrilus* (Annelida: Clitellata: Naididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1055-7903 (16) 30456-0
- [9] Nguyen, T. T. T., Na-Nakorn, U., Sukmanomon, S. and ZiMing, C., (2008). A Study on Phylogeny and Biogeography of Mahseer Species (Pisces: Cyprinidae) Using Sequences of Three Mitochondrial DNA Gene Regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 1223–1231

- [10] Weber, A. X., Edgar, J. G., Banks, C. S., Waters, M.J. and Fraser, I. C., (2017). A Morphological and Phylogenetic Investigation into Divergence Among Sympatric Australian Southern Bull Kelps (*Durvillaea Potatorum* and *D. Amatheiae* sp. Nov.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 630–643
- [11] Svante Martinsson, S. and Erseus, C., (2017). Cryptic Speciation and Limited Hybridization within *Lumbricus* Earthworms (Clitellata: Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 106, 18–27
- [12] Li, J., Wang, X., Kong, X., Zhao, K., He, S. and Mayden, L. R., (2008). Variation Patterns of the Mitochondrial 16S rRNA Gene with Secondary Structure Constraints and Their Application to Phylogeny of Cyprinine Fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 472–487
- [13] Erođlu, O., (2008). Karadeniz'in Türkiye Kıyılarında Dağılım Gösteren Mersin Balığı Türlerinin (*Acipenser stellatus* PALLAS, 1771, *Acipenser gueldenstaedtii* BRANDT, 1833, *Huso huso* LINNAEUS, 1758) Mitokondrial DNA Sekans Analizi Yöntemiyle Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- [14] İbiş, O., (2013). Türkiye'de Yayılış Gösteren Mustelidae (Mammalia: Carnivora) Türlerinin Nüklear ve Mitokondriyal DNA Dizi Analizi ile Moleküler Filogenisi. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [15] Bardeleben, C., Moore, R. L. and Wayne, K., (2005). A Molecular Phylogeny of the Canidae Based on Six Nuclear Loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 815-831
- [16] Pramuk, B. J., Grose, J. M., Clarke, L. A., Greenbaum, E., Bonaccorso, E., Guayasamin, M. J., Smith-Pardo, H. A., Benz, W. B., Harris, R. B., Siegfried, E., Reid, R. Y., Holcroft-Benson, N. and Wiley, O. E., (2007). Phylogeny of Wnescale Shiners of the Genus *Lythrurus* (Cypriniformes: Cyprinidae) Inferred from Four Mitochondrial Genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42, 287–297

- [17] Briolay, J., Galtier, N., Brito, M. R. and Bouvet, Y., (1998). Molecular Phylogeny of Cyprinidae Inferred from cytochrome b DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9:1, 100–108
- [18] He, S., Mayden, L. R., Wang, X., Wang, W., Tang, L. K., Chen, W. J. and Chen, Y., (2008). Molecular Phylogenetics of the Family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as Evidenced by Sequence Variation in The First Intron of S7 Ribosomal Protein-Coding Gene: Further Evidence from a Nuclear Gene of The Systematic Chaos in The Family. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46, 818–829
- [19] Yang, L., Arunachalam, M., Sado, T., Levin, A. B., Golubtsov, S. A., Freyhof, J., Friel, P. J., Chen, J. W., Hirt, V. M., Manickam, R., Agnew, K. M., Simons, M. A., Saitoh, K., Miya, M., Mayden, L. M. and He, S., (2012). Molecular Phylogeny of the Cyprinid Tribe Labeonini (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65, 362–379
- [20] Kolbaşı-Özgen, G., (2012). Mitokondriyal DNA Mutasyonları. Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
- [21] İborra, F. J., Kimura, H. and Cook, P. R., (2004). The Functional Organization of Mitochondrial Genomes in Human Cells. *BMC Biology*, 2-9
- [22] Ergüden, D., (2007). Türkiye Denizlerindeki Tirsilerin (*Alosa* spp.) Moleküler Sistematiği. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [23] Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S. and Hurst, G. D. D., (2009). Mitochondrial DNA as a Marker of Molecular Diversity: A Reappraisal. *Molecular Ecology*, 18, 4541–4550
- [24] Khan, F. M., Khan Khattak, N. M., He, D., Rehman, A. and Chen, Y., (2017). Mitochondrial Genome Sequence and Gene Organization of Kunar Snow Trout (*Schizothorax labiatus*) with Phylogenetic Consideration. *Gene Reports*, 7, 64–73

- [25] Khan, F., M., Khan, M., N., He, D., Liang, Y., Li, C., Dawar, U., F. and Chen, Y., (2016). The Complete Mitochondrial Genome Organization of *Schizothorax plagiostomus* (Teleostei: Cyprinidae) from Northern Pakistan. *Mitochondrial DNA, Part A*, 27:5, 3630–3632
- [26] Meyer, A., (1993). Evolution of Mitochondrial DNA of Fishes. In: Hochachka, P.W., Mommsen, P. (Eds.), *Molecular Biology Frontiers, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier Press, Amsterdam, 1-38
- [27] Zhang, J., Chen, Z., Zhou, C. and Kong, X., (2016). Molecular Phylogeny of the Subfamily Schizothoracinae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae) Inferred from Complete Mitochondrial Genomes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64, 6-13
- [28] He, S., Gu, X., Mayden, R.L., Chen, W., Conway, K.W. and Chen, Y., (2008). Phylogenetic Position of the Enigmatic Genus *Psilorhynchus* (Ostariophysi: Cypriniformes): Evidence from the Mitochondrial Genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 419–425
- [29] Navajas M, Guterrez J, Lagnel J., (1996). Mitochondrial Cytochrome Oxidase I in Tetranychid Mites: A Comparison Between Molecular Phylogeny and Changes of Morphological and Life History Traits. *Bulletin of Entomological Research*, 86, 407–417
- [30] Divya, R. P., Mohitha, C., Rahul, K. G., Shanis, R. P. C., Basheer, S. V. and Gopalakrishnan, A., (2017). Molecular Based Phylogenetic Species Recognition in the Genus *Pampus* (Perciformes: Stromateidae) Reveals Hidden Diversity in The Indian Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 240–245
- [31] Engelbrecht, C.C., Freyhof, J., Nolte, A., Rassmann, K. and Schliewen, U., D, T., (2000). Phylogeography of the Bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) Suggests a Prepleistocene Origin of the Major Central European Populations. *Mol. Ecol.* 9, 709–722

- [32] Whitehead, A., Anderson, S.L., Kuivila, K.M., Roach, J.L. and May, B., (2003). Genetic Variation Among Interconnected Populations of *Catostomus occidentalis*: Implications for Distinguishing Impacts of Contaminants from Biogeographical Structuring. *Molecular Ecology*, 12, 2817–2833
- [33] Domingues, V.S., Faria, C., Stefanni, S., Santos, R.S., Brito, A. and Almada, V.C., (2007). Genetic Divergence in the Atlantic–Mediterranean Montagu's Blenny, *Coryphoblennius galerita* (Linnaeus 1758) Revealed by Molecular and Morphological Characters. *Molecular Ecology*, 16 (17), 3592–3605
- [33] Keskin, E. and Can, A., (2009). Phylogenetic Relationships Among four Species and a Sub-Species of Mullidae (Actinopterygii; Perciformes) based on Mitochondrial cytochrome B, 12S rRNA and cytochrome oxidase II Genes. *Biochem. Syst. Ecol*, 37 (5), 653–661
- [34] Xu, J., Chan, T.-Y., Tsang, L.M. and Chu, K.H., (2009). Phylogeography of the Mitten Crab *Eriocheir sensu stricto* in East Asia: Pleistocene Isolation, Population Expansion and Secondary Contact. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52 (1), 45–56
- [35] Gvozdík, V., Moravec, J., Klütsch, C. and Kotlík, P., (2010). Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as Inferred from Nuclear and Mitochondrial DNA Variation, with a Description of a New Species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55 (3), 1146–1166
- [36] Feng, Y., Li, Q., Kong, L. and Zheng, X., (2011). DNA Barcoding and Phylogenetic Analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) Based on Mitochondrial COI and 16S rRNA Genes. *Mol. Biol. Rep.*, 38 (1), 291–299
- [37] Durna, S., Bardakçı, F., and Değerli, N., (2010). Genetic Diversity of *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 83–92

- [38] Seyhan, D., (2013). Türkiye Denizlerinde Bulunan Scombridae Familyasına Ait Türlerin Moleküler Filogenetiği. Yüksek Lisans Tezi, , Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Antakya-Hatay.
- [39] Portnoy, S. D., Willis, C. S., Hunt, E., Swift, G. D., Gold, R. J. and Conway, W. K., (2017). Molecular Phylogenetics of New World Searobins (Triglidae; Prionotinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 382–387
- [40] Koju, P. N., He, K., Chalise, K. M., Ray, C., Chen, Z., Zhang, B., Wana, T., Chen, S. and Jiang, X., (2017). Multilocus Approaches Reveal Underestimated Species Diversity and Inter-Specific Gene Flow in Pikas (*Ochotona*) from Southwestern China. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 239–245
- [41] Bufalino, P. A. and Mayden L. R., (2010). Molecular Phylogenetics of North American Phoxinins (Actinopterygii: Cypriniformes: Leuciscidae) Based on RAG1 and S7 Nuclear DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 274–283
- [42] Hwang, U.W., H.I. Ree, and W. Kim, (1999). General Properties and Phylogenetic Utilities of Nuclear Ribosomal DNA and Mitochondrial DNA Commonly Used in Molecular Systematics, *Korean J. Parasitol*, 37(4), 215–228
- [43] Cornils, A., Wend-Heckmann, B. and Held, C., (2017). Global Phylogeography of *Oithona similis* s.l. (Crustacea, Copepoda, Oithonidae) A Cosmopolitan Plankton Species or A Complex of Cryptic Lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 473–485
- [44] Galal-Khallaf, A., Mohammed-Gebaa, K., Osman, A., G., M., AbouelFadl, Y. K., Yaisel J. Borrell, J., Y. and Garcia-Vazquez, E., (2017). SNP-Based PCR-RFLP, T-RFLP and FINS Methodologies for the Identification of Commercial Fish Species in Egypt. *Fisheries Research*, 185, 34–42
- [45] Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S. and Casiraghi, M., (2013). DNA barcoding as a New Tool for Food Traceability. *Food. Res. Int.*, 50, 55–63

- [46] Ratnasingham S. and Hebert P., D., N., (2007). The Barcode of Life Data System. *Mol Ecol Notes*, 7, 355–364
- [47] Önel, C., (2014). Türkiye Denizlerinde Yaşayan Scombridae Türlerinin Dna Barkodlaması, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- [48] Sass C., Little D.P., Stevenson D., Wm. and Specht, D., (2007). DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *PLOS One*, 2 (11), 1154
- [49] Paine, M. A., McDowell, J., R. and Graves, J., E., (2007). Specific Identification of Western Atlantic Ocean Scombrids Using Mitochondrial DNA Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) Gene Region Sequences. *Bulletin of Marine Science*, 80(2), 353–367
- [50] Lohman D., J., Bruyn, de, M., Page, T., Rintelen, von, K., Hall, R., Peter K., L., Ng., Shih, H., T., Carvalho, G., R. and Rintelen, von, T., (2011). Biogeography of the Indo Australian Archipelago. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 42, 205–226
- [51] www.barcodinglife.com
- [52] Gonzalez, C. B., Martínez, A., Borda, E., Iliffe, M. T., Fontaneto, D. and Worsaae, K., (2017). Genetic Spatial Structure of an Anchialine Cave Annelid Indicates Connectivity within - but not between - Islands of the Great Bahama Bank. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 259–270
- [53] Bertram, R. M., Hamer, A. S., Hartup, K. B., Snowden F. K., Medeiros, C. M., Outlaw, C. D. and Hamer, L. G., (2017). A Novel Haemosporida Clade at the Rank of Genus in North American Cranes (Aves: Gruiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 73–79
- [54] Lucentini, L., Puletti, E. M., Ricciolini, C., Gigliarelli, L., Fontaneto, D., Lanfaloni, L., Bilo, F., Natali, M. and Panara, F., (2011). Molecular and Phenotypic Evidence of a New Species of Genus *Esox* (Esocidae, Esociformes, Actinopterygii): The Southern Pike, *Esox flaviae*. *PLOS One*, 6, 12

- [55] Tang, L. K., Agnew, K. M., Hirt, V. M., Sado, T., Schneider, M. L., Freyhof, J., Sulaiman, Z., Swartz, E., Vidthayanon, C., Miya, M., Saitoh, K., Simons, M. A., Wood, M. R. and Mayden, L. R., (2010). Systematics of the Subfamily Danioninae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 189–214
- [56] Graaf, M., Megens, J. H., Samallo, J. and Sibbing, F., (2010). Preliminary Insight into the Age and Origin of the Labeobarbus Fish Species Flock From Lake Tana (Ethiopia) Using the mtDNA Cytochrome b Gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 336–343
- [57] Ardura, A., Pola, I., G., Ginuino, I., Gomes, V. and Garcia-Vazquez, E., (2010). Application of Barcoding to Amazonian Commercial Fish Labelling. *Food Res Int*, 43, 1549–1552
- [58] Steinke, D., Zemlak, T., S. and Hebert, P., D., N., (2009). Barcoding Nemo: DNA-based Identifications for the Ornamental Fish Trade. *PLOS One*, 4(7), 6300
- [59] Ward, R., D., Zemlak, T., S., Innes, B., H., Last, P., R. and Hebert P., D., N., (2005). DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philos T Roy Soc B*, 360,1847–1857
- [60] Logan, J., A., (1999). Extraction, Polymerase Chain Reaction, and Sequencing of a 440 Base Pair Region of the Mitochondria Cytochrome oxidase I gene from two Species of Acetone-Preserved Damselflies (Odonata: Coenagrionidae, Agrionidae). *Environ Entomol*, 28, 143–147
- [61] Sevilla, R., G., Diez, A., Noren, M., Mouchel, Jerome, M., et al. (2007). Primers and Polymerase Chain Reaction Conditions for DNA Barcoding Teleost Fish Based on the Mitochondrial Cytochrome b and Nuclear Rhodopsin Genes. *Mol Ecol Notes*, 7, 730–734
- [62] Chen, W., J., Bonillo, C. and Lecointre, G., (2003). Repeatability of Clades as a Criterion of Reliability: a Case Study for Molecular Phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with Larger Number of Taxa. *Mol Phylogenet Evol*, 26, 262–288

- [63] Dettai, A. and Lecointre, G., (2005). Further Support for the Clades Obtained by Multiple Molecular Phylogenies in the Acanthomorph Bush. *Compt Rend Biol*, 328, 674–689
- [64] Kyle, C., J. and Wilson, C., C., (2007). Mitochondrial DNA Identification of Game and Harvested Freshwater Fish Species. *Forensic Sci Int*, 166, 68–76
- [65] Pengzhi, Q., Baoying, G., Congxin, X., Changwen, W., Shimin, L., Youjian, D. and Xianjun, Z., (2013). Assessing the genetic diversity and population structure of *Culter alburnus* in China based on mitochondrial 16S rRNA and COI Gene Sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 390–396
- [66] Norfatimah, M., Y., Tehc, L., K., Sallehc, M., Z., Mat Isa M., N. and SitiAzizah, M., N., (2014). Complete Mitochondrial Genome of Malaysian Mahseer (*Tor tambroides*). *Gene*, 548, 263–269
- [67] Duong, T., Y., Scribner, K., T., Kanefsky, J. and Na-Nakorn, U., (2017). Lack of Introgressive Hybridization by North African Catfish (*Clarias gariepinus*) in Native Vietnamese Bighead Catfish (*Clarias macrocephalus*) Populations as Revealed by Novel Nuclear and Mitochondrial Markers. *Aquaculture*, 473, 468–477
- [68] Kusuma, W., E., Ratmuangkhwang, S. and Kumazawa, Y., (2016). Molecular Phylogeny and Historical Biogeography of the Indonesian Freshwater fish *Rasbora lateristriata* Species Complex (Actinopterygii: Cyprinidae): Cryptic Species and West-to-east Divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 212–223
- [69] Lan-Ping, Z., Jun-Xing, Y. and Xiao-Yong, C., (2016). Molecular Phylogeny and Systematics of the Barbinae (Teleostei: Cyprinidae) in China Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 250-259
- [70] Bektas, Y., Turan, D., Aksu, I., Ciftci, Y., Eroglu, O., Kalayci, G. and Belduz, A., O., (2017). Molecular Phylogeny of the Genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. Turkey *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 80-94

- [71] Zhang, J., Chen, Z., Zhou, C. and Kong, X., (2016). Molecular Phylogeny of the Subfamily Schizothoracinae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae) Inferred from Complete Mitochondrial Genomes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64, 6-13
- [72] Sungani, H., Ngatunga, B., P., Koblmüller, S., Makinen, T., Skelton, P., H. and Genner, M., J., Multiple Colonisations of the Lake Malawi Catchment by the Genus *Opsaridium* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 256–265
- [73] Tsoumani, M., Georgiadis, A., Giantsis, I., A., Leonardos, I. and Apostolidis, A., P., (2014). Phylogenetic Relationships Among Southern Balkan *Rutilus* Species Inferred from Cytochrome b sequence analysis: Micro-geographic resolution and Taxonomic Implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54, 172–178
- [74] Liu, S-Q., Mayden, R., L., Zhang, J-B., Yu, D., Tang, Q-Y., Deng, X. and Liu, H., (2012). Phylogenetic Relationships of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) Inferred from Mitochondrial and Nuclear Genes with Analyses of Gene Evolution. *Gene*, 508, 60–72
- [75] Xu, J., Chan, T-Y., Tsang, L., M. and Chu, K., H., (2009). Phylogeography of the Mitten Crab *Eriocheir sensu stricto* in East Asia: Pleistocene Isolation, Population Expansion and Secondary Contact Molecular. *Phylogenetics and Evolution*, 52, 45–56
- [76] Chen, C-H., Hsieh, C-H. and Hwang, D-F., (2012). Species Identification of Cyprinidae fish in Taiwan by FINS and PCR-RFLP. *Analysis Food Control*, 28, 240-245
- [77] Guangfu, H., Guiwei, Z., Xiangjiang, L., Hongwei, L., Zhong, L. and Shaona, H., (2014). The Carp–Goldfish Nucleocytoplasmic Hybrid has Mitochondria from the Carp as the Nuclear Donor Species, *Gene*, 536, 265–271
- [78] Baptiste, E., Brinkmann, H., Lee, J., A., Moore, D., V., Sensen, C.,W., Gordon, P., Durufle, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Muller, M. and Philippe, H., (2002), The Analysis of 100 Genes Supports the Grouping of Three Highly Divergent Amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *ProcNatl Acad Sci* 5, 99(3), 1414–9

- [79] Keskin, E., (2007). Türkiye İhtiyofaunasındaki Mullidae Ailesindeki Türlerin Filogenetik Yakınlıklarının Morfolojik ve Genetik Farklarla Korelasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- [80] Şahin, N., (2011). Türkiye’de Yetişen *Serratula L.* (Asteraceae) Cinsine ait Taksonların ITS nrDNA ve TRNL-F cpDNA Dizileriyle Moleküler Sistematik Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- [81] Klug, W., S. and Cummings, R., M., (2003). Genetik. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, Ankara
- [82] Bektaş, Y., (2008). Türkiye Kıyı Sularındaki İstavrit (*Trachurus mediterraneus* Steindachner, 1868, *Trachurus trachurus* Linnaeus, 1758 ve *Trachurus picturatus* Bowdich, 1825) Populasyonlarının Genetik ve Morfolojik Analizi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- [83] Rannala, B. and Yang, Z., (1986). Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: a New Method of Phylogenetic Inference. *J Mol Evol*, 43, 304-31
- [84] Yang, Z., and Rannala, B., (1997). Bayesian Phylogenetic Inference Using DNA Sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Mol Biol Evol*, 14, 717-724
- [85] Simmons, M., P. and Miya, M., (2004). Efficiently Resolving the Basal Clades of a Phylogenetic Tree Using Bayesian and Parsimony Approaches: a Case Study Using Mitogenomic Data from 100 Higher Teleost Fishes. *Mol Phylogenet Evol*, 31(1), 351-362
- [86] Bremer, K., (1994). Branch support and tree stability. *Cladistics* 10, 295-304
- [87] Küçük, F., Bektaş, Y., Güçlü, S. S. and Kaya, C., (2014). The Systematic Position of *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) and Contributions to the Genus *Acanthobrama* (Cyprinidae: Leuciscinae) in Turkey. *Iran. J. Ichthyology*, 1:2, 96–105
- [88] Ewing, A., (2003). Water Quality and Public Health Monitoring of Surface Waters in the Kura-Araks River Basin of Armenia, Azerbaijan, and Georgia. Water Resources Program. The University of New Mexico, Publication No. WRP-8, New Mexico, 55

- [89] Demir, M., (2014). Kars İlinin Arıcılık Potansiyeli ve Değerlendirme Durumu. Doğu Coğrafya Dergisi, 19(32), 209-230
- [90] Demir, M., (2016). Kars İlinde Büyük ve Küçükbaş Hayvancılık. Eastern Geographical Review, 20-35
- [91] Durand, J., D., Tsigenopoulos, C., S., Ünlü, E. and Berrebi, P., (2002). Phylogeny and Biogeography of the Family Cyprinidae in the Middle East Inferred From Cytochrome b DNA-Evolutionary Significance of This Region. Molecular Phylogenetics and Evolution, 22 (1), 91-100
- [92] Perea, S., Böhme, M., Zupancic, P., Freyhof, J., Sanda, R., Özuluğ, M., Abdoli, A. and Doadrio, I., (2010). Phylogenetic Relationships and Biogeographical Patterns in Circum-Mediterranean Subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) Inferred from both Mitochondrial and Nuclear Data. BMC Evolutionary Biology, 10,265
- [93] Gilles, A., Lecointre, G., Miquelis, A., Loerstcher, M., Chappaz, R. and Brun, G., (2001). Partial Combination Applied to Phylogeny of European Cyprinids Using the Mitochondrial Control Region. Mol Phylogenet Evol, 19, 22-23
- [94] Rüber, L., Kottelat, M., Tan, H., H., Ng, P., K., L. and Britz, R., (2007) Evolution of Miniaturization and the Phylogenetic Position of Paedocypris, Comprising the World's Smallest Vertebrate. BMC Evol Biol, 7, 38
- [95] Berg, L., S., (1949). Freshwater Fishes of the U.S.S.R. and Adjacent Countries. Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, 1-2-3
- [96] Eschmeyer, W., N., (2014). Catalog of Fishes: Genera, Species, References. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- [97] Güven, A., Gül, S., Kaya, İ., Nur G., Deveci H.A., Kaya, T.Ö., (2008). Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in *Alburnus filippii* (Kessler, 1877) and *Acanthalburnus microlepis* (Filippii, 1863): A Comparative Study. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 14 (1), 13-18

- [98] Vasilyan, D., Z., Stepanyan, I., E. and Pipoyan, S., Kh., (2009). Karyotypes of Some Cypriniform Fishes from the Water Bodies of Armenia. *Journal of Ichthyology*, 49:8, 627–634
- [99] Ayaz, M. and Baysal, A., (2004). Kars Çayı Balıklarının Taksonomik Yönden Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- [100] Alagöz, S., (2005). Seyhan Baraj Gölü (Adana) Balık Faunasının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [101] Türkmen, M., Erdoğan, O., Haliloğlu, H., İ., and Yıldırım, A., (2001). Age, Growth and Reproduction of *Acanthalburnus microlepis*, Filippi 1863 from the Yağınan Region of the Aras River, Turkey. *Turk J Zool*, 25, 127-133
- [102] Aksu, P., Gül, S., Özkan, O., Nur, G. and Kaya, T.Ö., (2008). Evaluation of The Acute Toxicity and Genotoxicity of NaOCl on Blackbrow Bleak (*Acanthalburnus microlepis* De Filippi, 1863). *Fresenius Environmental Bulletin*, 17 –3
- [103] Zardoya R. and Doadrio, I., (1998). Phylogenetic Relationships of Iberian Cyprinids: Systematics and Biogeographical Implications. *Proc R Soc Lond B*, 265, 1365-1372
- [104] Zardoya R. and Doadrio, I., (1999). Molecular Evidence of the Evolutionary and Biogeographical Patterns of European Cyprinids. *J Mol Evol*, 49, 227-237
- [105] Durand, J., D., Bianco, P., G., Laroche, J. and Gilles, A., (2003). Insight into the Origin of Endemic Mediterranean Ichthyofauna: Phylogeography of *Chondrostoma* Genus (Teleostei, Cyprinidae). *J Hered*, 94(4), 315-328
- [106] Durand, J. D., Templeton, A., R., Guinand, B., Imsiridou, A. and Bouvet, Y., (1999). Nested Clade and Phylogeographic Analyses of The Chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: Implications for Balkan Peninsula Biogeography. *Mol Phylogenet Evol*, 13(3), 566-580

- [107] Briolay, J., Galtier, N., Brito, R., M. and Bouvet, Y., (1998). Molecular Phylogeny of Cyprinidae Inferred from Cytochrome b DNA Sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 9, 100-108
- [108] Cunha, C., Mesquita, N., Dowling, T. E., Gilles, A. and Coelho, M., M., (2002). Phylogenetic Relationships of Eurasian and American Cyprinids Using Cytochrome b Sequences. *J Fish Biol*, 61, 929-944
- [109] Doadrio, I. and Carmona, J., A., (2003). Testing Freshwater Lago Mare Dispersal Theory on the Phylogeny Relationships of Iberian Cyprinids Genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia*, 59 (2-3), 457-473
- [110] Doadrio, I. and Carmona, J., A., (2004). Phylogenetic Relationships and Biogeography of the Genus *Chondrostoma* Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 33, 802-815
- [111] Durand, J., D., Ünlü, E., Doadrio, I., Pipoyan, S. and Templeton, A. R., (2000). Origin, Radiation, Dispersion and Allopatric Hybridisation in the Chub, *Leuciscus cephalus*. *Proc R Soc Lond B*, 267, 1687-1697
- [112] Kotlik, P., Bogutskaya, N., G. and Ekmekçi F., G., (2004). Circum Black Sea Phylogeography of *Barbus* Freshwater Fishes: Divergence in the Pontic Glacial Refugium. *Mol Ecol*, 13(1), 87-95
- [113] Zardoya, R. and Meyer, A., (1996). Phylogenetic Performance of Mitochondrial Protein Coding Genes in Resolving Relationships Among Vertebrates. *Mol Biol Evol*, 13, 933-942
- [114] Brito, R., M., Briolay, J., Galtier, N., Bouvet, Y. and Coelho, M., M., (1997). Phylogenetic Relationships within the Genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese Freshwaters, Based on Mitochondrial Cytochrome b Sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 8, 435-442
- [115] Hebert, P., D., N., Cywinska, A., Ball, S., L. and de Waard, J., R., (2003). Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proc R Soc Lond B*, 270, 313-321

[116] Ward, R., D., Zemlak, T., S., Innes, B., H., Last, P., R. and Hebert P., D., N., (2005). DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philos Trans Roy Soc Lond B*, 360, 1847-1857



ÖZGEÇMİŞ

Bilgiler

Adı ve Soyadı: Duygu TANRIKULU

Doğum Yeri: Selim-KARS

Doğum Tarihi: 26.04.1982

Akademik Ünvanı: Araştırma Görevlisi

İş Adresi: Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü KARS

Eğitim Durumu

Doktora (Üniversite-Enstitü, Yılı, Tez Adı):

Kafkas Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı

Tez adı: Kura-Aras Havzasında Endemik Olarak Yayılış Gösteren *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) Türünün Mitokondriyal DNA Dizi Analizi ile Moleküler Filogenisi

Yüksek Lisans (Üniversite-Enstitü, Yılı, Tez Adı):

Kafkas Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı (2006-2008)

Tez adı: Kura-Aras Havzası'nda Bulunan Çöpçü Balığı'nda (*Orthrias panthera*, Heckel 1843) Karyotip Analizi

Lisans (Üniversite, Fakülte, Bölüm):

Atatürk Üniversitesi- Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Uzmanlık Alanı: Hidrobiyoloji