

## The Analysis of mtDNA COI Sequences of Five Fish Species Living Tigris River

Arif Parmaksiz (Corresponding author)

Harran University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, Sanliurfa - 63100, Turkey  
E-mail: aprmksz@gmail.com

Ozlem Seker

Harran University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, Sanliurfa - 63100, Turkey  
E-mail: biyolog63.ozlem@gmail.com

### Abstract

In this study, muscle tissue from 11 specimens of five fish species living in the Tigris River were taken and total DNA was isolated using the commercial kit. The mtDNA COI gene region was subjected to PCR followed by sequence analysis. A total of 198 variable regions were detected in this gene sequence. The average nucleotide variation was calculated to be 0,16494. The genetic distance values of the species range from 0,1157349 to 0,2836891. According to this, *A. mossulensis* and *C. regium* were the lowest values and the closest species, the highest value area and the most distant species were *L. abu* and *G. rufa* have been detected. The sequences of the five species identified in this study were compared using the BLAST method to the GenBank database.

**Key words:** Cyprinidae, Mugilidae, mtDNA COI, Tigris River

## Dicle Nehri'nde Yaşayan Beş Balık Türünün mtDNA COI Dizilerinin Analizi

### Özet

Bu çalışmada, Dicle Nehri'nde yaşayan beş balık türüne ait 11 örnekten kas dokusu alınmış ve ticari Kit kullanılarak total DNA izole edilmiştir. mtDNA COI gen bölgesi PZR uygulandıktan sonra dizi analizi yapılmıştır. Bu gen dizisinde toplam 198 değişken bölge tespit edilmiştir. Ortalama nükleotit çeşitliliği 0,16394 olarak hesaplanmıştır. Türler arasında ait genetik mesafe değerleri 0,1157349 ila 0,2836891 arasında değişmektedir. Buna göre en düşük değeri alan ve birbirine en yakın türlerin *A. mossulensis* ve *C. regium* olduğu, en yüksek değeri alan ve birbirine en uzak türlerin *L. abu* ile *G. rufa* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada belirlenen beş türe ait diziler, BLAST yöntemi ile Gen Bankası (NCBI) veri tabanında taranarak karşılaştırma yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Cyprinidae, Mugilidae, mtDNA COI, Dicle Nehri

### 1.Giriş

Türkiye'nin önemli akarsularından olan Dicle Nehri'ni balık çeşitliliği yönünden önemli doğal kaynaklarımızdandır. Bu nehir sistemi üzerinde kurulan barajların etkisinden dolayı bazı türlerin soyunun tükenme tehlikesi ortaya çıkmıştır. Çünkü baraj gölleri nedeniyle oluşan durgun sular, akıntılı suları tercih eden birçok türün yok olmasına veya popülasyonlarının küçülmesine yol açmaktadır (Kuru, 1986; Ünlü ve Bozkurt, 1997). Bu sistemde yaşayan balıklarla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda Dicle Nehir sisteminde yaklaşık olarak 8 familyaya ait 46 balık türü yaşamaktadır (Kuru, 1975; Kelle, 1978). Tür sayısı bakımından en zengin familyanın ise Sazangiller (Cyprinidae) olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde yaşayan tatlı su balık türlerinin büyük bir kısmı bu familyaya aittir (Çiçek,

2009). Bu türlerin biyolojisi (Ünlü, 1991; Ünlü ve Balcı, 1993; Ünlü ve ark., 1994; Ünlü ve ark., 2000), morfolojik özellikleri (Çiçek, 2009), taksonomik özellikleri (Kuru, 1975; Kelle, 1978; Ünlü ve Bozkurt, 1997; Ünlü, 2002), karyotip özellikleri (Kılıç-Demirok ve ark., 2004; Değer, 2011) ve filogenetik akrabalıkları (Parmaksız, 2016) ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada, Dicle Nehri'nde yaşayan ve daha önce dizi analizi yapılmayan beş balık türünün mtDNA COI 625 gen dizileri belirlenmiştir. Ayrıca BLAST yöntemi ile Gen Bankası (NCBI) veri tabanında taranıp karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.

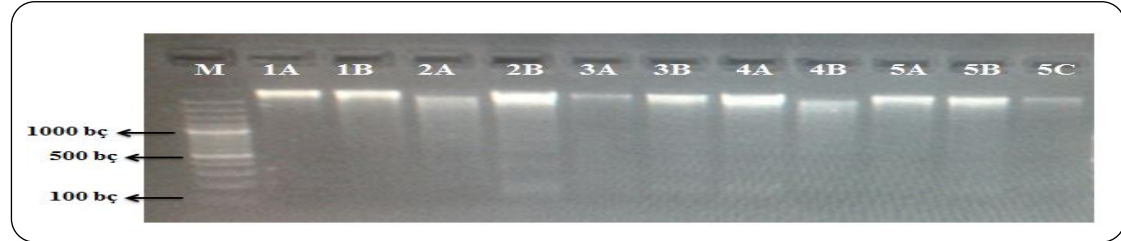
## 2. Materyal ve Metot

Çalışmamızda materyal olarak kullanılan balık örnekleri Dicle Nehri'nden avlama yapmak suretiyle yöre balıkçıları tarafından fanyalı ve iplik ağlar kullanılarak yakalanmıştır. Bu örneklerin pektoral yüzgeçlerin kaidesindeki kas dokusundan 5 gr alınarak % 95'lik etil alkol içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine konulup DNA izolasyonu yapılanaya kadar +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

**Tablo 1.** Bu çalışmada kullanılan balık türleri ve örnek sayıları

Familya	Tür Adı	Lokalite	Kodu	Örnek Sayısı
Cyprinidae	<i>Garra rufa</i>	Bismil	1	2
Cyprinidae	<i>Garra varibialis</i>	Bismil	2	2
Cyprinidae	<i>Alburnus mossulensis</i>	Bismil	3	2
Cyprinidae	<i>Chondrostoma regium</i>	Bismil	4	2
Mugilidae	<i>Liza abu</i>	Bismil	5	3

Tablo 1'de belirtilen 5 türe ait 11 örnekten alınan kas dokularından GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılarak total DNA izole edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinden 3 µl alınarak SYBR Green eklenen % 1'lik agaroz jelde 120 Voltta 30 dakika elektroforezde yürütülerek ultraviyole (UV) ışık veren cihazda görüntülenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Tüm Bireylerin İzole Edilen Total DNA Görüntüsü (M: Marker; bç: Baz Çifti)

Hedef mtDNA COI 625 gen bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması için kullanılan primer Darabi (2014) çalışmasından alınmış olup dizileri aşağıda verilmiştir.

COI-625F:5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'

COI-625R:5'-GACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'

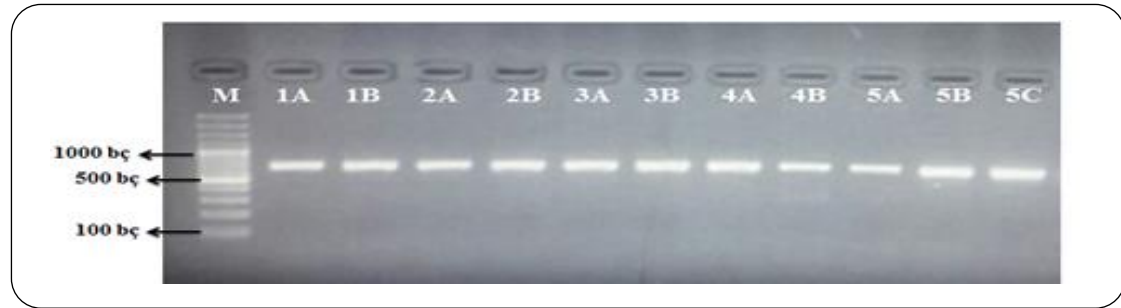
PZR işlemi BIO-RAD T100TM Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR ile çoğaltma (amplifikasyon) reaksiyonlarında kullanılan DNA miktarı, kimyasalların konsantrasyonları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PZR cihazında optimize edilmiştir. PZR koşulları; 95°C'de 3 dakika ilk denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 62°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye uzama olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirilmiş, son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak sonlandırılmıştır. PZR ile çoğaltma (amplifikasyon) reaksiyonlarında kullanılan DNA miktarı, kimyasalların konsantrasyonları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PZR cihazında optimize edilmiştir. Bu bölgenin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı ise; toplamda 25 µl olacak şekilde 16.9 µl dH<sub>2</sub>O, 2.5 µl 1x PCR buffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl dNTPs, 1 µl primer (F+R), 0.1 µl Taq DNA polimeraz ve 2 µl template DNA şeklindedir.

PZR işleminden sonra ürünlerin varlığını kontrol etmek için 3 µl PZR ürünleri, SYBR Green eklenen % 2 agaroz jeldeki kuyulara yüklenmiş ve 120V elektrik akımında 30 dakika boyunca yürütülerek UV ışık veren görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Yeterli miktarda PZR ürünleri oluşturanlar ticari bir firmaya gönderilmiş ve 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) cihazında dizi analizi yaptırılmıştır.

Ticari firmadan gönderilen mtDNA dizilerine ait ham veriler ChromasPro v 2.0.1 programı kullanılarak değerlendirilip FASTA formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen FASTA formatındaki diziler BioEdit software version 7.2.5 programı kullanılarak tüm bireylerin dizileri hizalanmıştır. Türler için polimorfik bölge sayısı ve nükleotid çeşitliliği, DnaSP 5.10.01 (Rozas ve ark., 2003) programı kullanılarak belirlenmiştir. Türler arasındaki filogenetik analizler K2 parametresi kullanılarak Komşu birleştirme ağacı (Neighbor joining tree) modeline göre MEGA 7 programında gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Kumar ve ark., 2016). Ağaç kolları (Nodların) güvenilirliğinin test edilmesinde Bootstrap testi (1000 tekrarlı) kullanılmıştır.

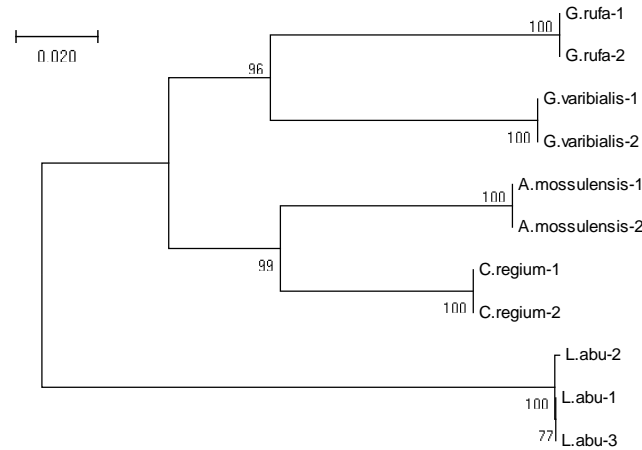
### 3. Araştırma Sonuçları

Bu çalışmada Dicle Nehir'inden avlanan Cyprinidae (sazangiller) familyasından 4 türe ait 8 birey, Mugilidae familyasına ait 1 türden ise 3 bireyden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup, mtDNA COI 625 primeri kullanılarak PZR uygulanmıştır. PZR sonucunda çoğaltılan hedef bölgeler Şekil 2'de görülmekte olup bu bantların gözlenmesi için SYBR Green eklenen % 2'lik agaroz jeldeki kuyulara 4 µl PZR ürünü ve 4 µl 3x boya (Loading Dye) yüklenerek 120 Voltta 30 dakika elektroforezde yürütülerek ultraviyole ışık veren cihazda görüntülenmiştir.



Şekil 2. Her Bireyde PZR Ürünlerinin Görüntüsü (M: Marker; bç: Baz Çifti)

Dicle Nehir'nden 5 tür ve 11 bireyde ortalama 630 bç'lik mtDNA COI bölgesi dizi analizi yapılarak, 198 değişken bölge tespit edilmiş olup, ortalama nükleotid çeşitliliği ise 0,16394 olarak hesaplanmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen veriler, MEGA 7 programı kullanılarak hem filogenetik ağaç oluşturulmuş hem de türler arasındaki genetik mesafeler hesaplanarak türlerin birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulmuştur.



Şekil 3. Türlerinin mtDNA COI Bölgesi Dizilerine Dayalı Olarak Çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı

Şekil 3'teki dendrogram incelendiğinde Cyprinidae ve Mugilidae türleri öncelikle iki dala ayrılarak küme oluşturmuşlardır. Cyprinidae türleri de kendi arasında *Garra* cinsine ait 2 tür bir dal üzerinde, *Alburnus* ve *Chondrostoma* türleri ise diğer bir dal üzerinde konumlanmışlardır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. G.rufa-1											
2. G.rufa-2	-0.0000000										
3. G.varibialis-1	0.1516080	0.1516080									
4. G.varibialis-2	0.1516080	0.1516080	-0.0000000								
5. L.abu-1	0.2836891	0.2836891	0.2724985	0.2724985							
6. L.abu-2	0.2834827	0.2834827	0.2748087	0.2748087	0.0016522						
7. L.abu-3	0.2836891	0.2836891	0.2724985	0.2724985	-0.0000000	0.0016522					
8. A.mossulensis-1	0.2072748	0.2072748	0.1916560	0.1916560	0.2628756	0.2651581	0.2628756				
9. A.mossulensis-2	0.2072748	0.2072748	0.1916560	0.1916560	0.2628756	0.2651581	0.2628756	-0.0000000			
10. C.regium-1	0.1783928	0.1783928	0.1898080	0.1898080	0.2628756	0.2626580	0.2628756	0.1157349	0.1157349		
11. C.regium-2	0.1783928	0.1783928	0.1898080	0.1898080	0.2628756	0.2626580	0.2628756	0.1157349	0.1157349	-0.0000000	

Şekil 4. Türlerinin mtDNA COI Bölgesi Dizilerine Dayalı Olarak Hesaplanan Genetik Mesafeler

Şekil 4'te türler arasındaki genetik mesafe değerlerinin 0,1157349 ile 0,2836891 arasında olduğu görülmektedir. Buna göre en düşük değeri alan ve birbirine en yakın türlerin *A. mossulensis* ve *C. regium* olduğu, en yüksek değeri alan ve birbirine en uzak türlerin *L. abu* ile *G. rufa* olduğu tespit edilmiştir.

#### 4. Tartışma

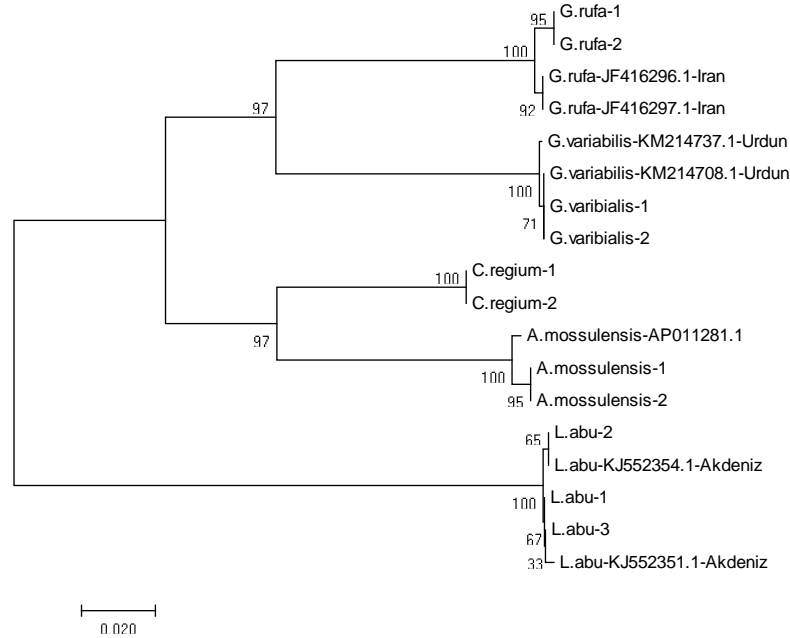
Bu çalışmada Dicle Nehri'nden avlanan 2 familyaya ait 5 tür olmak üzere toplam 11 birey materyal olarak kullanılıp, mtDNA COI 625 primeri kullanılarak PZR uygulandıktan sonra dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi yapılan ortalama 630 bç'lik kısımda, değişken bölge sayısı 198 ve ortalama nükleotit çeşitliliği değeri ise 0,16394 olarak hesaplanmıştır. Parmaksız (2016) çalışmasında Dicle Nehri'nde yaşayan farklı türlerde aynı primeri ile kullanarak yaptığı çalışmada değişken bölge sayısını 146 olarak ve ortalama nükleotit çeşitliliği değerini 0,09757 olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada tespit edilen değişken bölge sayısı ve nükleotit çeşitliliği değerinin daha yüksek çıkması iki familyaya ait türler kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik uzaklıklar kullanılarak oluşturulan komşu birleştirme ağacında (Neighbor joining tree) türler arasındaki bağlantılar görsel olarak ortaya çıkarılmış olup, türlerin birbirine göre konumları ve kümelenmeleri incelenerek akrabalık durumları belirlenmiştir. Buna göre birbirine en yakın türlerin *A. mossulensis* ve *C. regium* olduğu, en birbirine en uzak türlerin *L. abu* ile *G. rufa* olduğu tespit edilmiştir. Bu primer yardımıyla hem farklı familyaların ayrımı, hem de aynı cinsine ait türlerin ayrılması mümkün olmuştur.

Elde ettiğimiz diziler, Gen Bankası (NCBI) veri tabanında taranmış olup maximum benzerlik gösteren türlere ait bilgiler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmamızda elde edilen dizilerle Genbankasında maximum benzerlik gösteren türlere ait bilgiler

Tür	Accession No	Ident %
<i>Garra rufa</i>	JF416296.1	99
<i>Garra rufa</i>	JF416297.1	99
<i>Garra variabilis</i>	KM214708.1	100
<i>Garra variabilis</i>	KM214737.1	99
<i>Alburnus mossulensis</i>	AP011281.1	99
<i>Chondrostoma regium</i>	-	-
<i>Liza abu</i>	KJ552354.1	99
<i>Liza abu</i>	KJ552351.1	99

Bu çalışmada, *Garra rufa* türüne ait veriler Segherloo (2012) çalışmasındaki (JF416296.1 ve JF416297.1) İran örnekleriyle % 99, *Garra variabilis* türüne ait verilerimiz Hamidan (2014) çalışmasındaki Ürdün örnekleriyle sırasıyla (KM214708.1 ve KM214737.1) %100 ve % 99, *Alburnus mossulensis* türüne ait verilerimiz Miya (yayınlanmamış bilgi) çalışmasıyla (AP011281.1) %99, *Liza abu* türüne ait verilerimiz Geiger (2014) çalışmasındaki Akdeniz örnekleriyle (KJ552354.1 ve KJ552351.1) %99 benzerlik göstermektedir. *Chondrostoma regium* türüne ait verilerimiz Gen bankasında aynı türe ait bir dizi olmadığından karşılaştırma yapılmamıştır. Tüm diziler birlikte değerlendirilip filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 5).



Şekil 5. Gen bankası ve çalışmamızda elde edilen mtDNA COI Bölgesi Dizilerine Dayalı Olarak Çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı

Şekil 5'te İran'daki *G. rufa* örnekleri bu çalışmadaki örneklerden ayrı bir haplotipte, Ürdün'deki *G. variabilis* örneklerinin KM214708.1 örneği bu çalışmadaki örneklerle aynı haplotipte olmasına rağmen KM214737.1 örneği farklı haplotiptedir. Akdeniz'deki KJ552354.1 örneği *L. abu* 2 örnek ile aynı haplotipte, KJ552351.1 örneği ise farklı haplotipte olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak tatlı suda yaşayan Cyprinidae ve Mullidae familyalarına ait türler için mtDNA COI 625 primerinin kullanılması hem filogenetik analizlerde hem de aynı türe ait farklı lokalitelerdeki bireylerin göç yolları hakkında bilgi verebileceği düşünülmektedir.

#### Kaynaklar

Çiçek T, (2009). Dicle ve Fırat su sistemlerinde yaşayan Cyprinidae familyasına ait bazı türlerde görülen morfometrik ve meristik varyasyonların incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Darabi AR, Kashan N, Fayazi J, Aminafshar M, Chamani M, (2014). Investigation of Phylogenetic Relationship

Among two Barbus species (Cyprinidae) Populations with Mitochondrial DNA Using Pcr-Sequencing. *IJBPA*, 4(2): 302-311.

Değer D, (2011). Dicle ve Fırat Su Sistemlerinde Yaşayan Bazı Cobitoidea Türleri Üzerine Karyolojik Araştırmalar. Doktora Tezi, Dicle üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Diyarbakır.

- Geiger MF, Herder F, Monaghan MT, Almada V, Barbieri R, Bariche M, Berrebi P, Bohlen J, Casal-Lopez M, Delmastro GB, Denys GPJ, Dettai A, Doadrio I, Kalogianni E, Karst H, Kottelat M, Kovacı M, Laporte M, Lorenzoni M, Marci ZC, Ozuluğ M, Perdices A, Perea S, Persat H, Porcelotti S, Puzzi C, Robalo J, Sanda R, Schneider M, Slechtova V, Stoumboudi M, Walter S, Freyho JFZ, (2014). Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources* 14, 1210–1221.
- Hamidan NA, Geiger MF, Freyhof J, (2014). *Garra jordanica*, a new species from the Dead Sea basin with remarks on the relationship of *G. ghorensis*, *G. tibanica* and *G. rufa* (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol. 25, No. 3, pp. 223-236.
- Kelle A, 1978: Dicle Nehri kollarında yaşayan balıklar üzerinde taksonomik ve ekolojik araştırmalar. Dicle Üniversitesi, Doktora Tezi, Diyarbakır.
- Kılıç-Demirok N, Ünlü E, (2004). Karyotype of the cyprinid fish *Alburnoides bipunctatus* (Cyprinidae) from the Tigris River. *Folia Biol.*, 52(1-2): 57-59.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, (2016). Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 (MEGA 7) for bigger datasets. *Mol Biol Evol.*, 28:2731–2739.
- Kuru M, (1986). Dicle ve Fırat Nehirleri üzerinde kurulacak barajlarla soyu tehlikeye girecek balık türleri. VIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-5 Eylül 1986, İzmir. Cilt II Hidrobiyoloji Sektörünü, 589-597.
- Kuru M, (1975). Fırat ve Dicle sistemlerinde yaşayan balıklar (Pisces) üzerine sistematik araştırmalar, TÜBİTAK V. Bilim Kongresi.
- Miya, M. (yayınlanmamış veri): Whole mitochondrial genome sequences in Cypriniformes.
- Parmaksız A, (2016) Phylogenetic analysis of some carp species living in Tigris River based on mtDNA COI gene sequences. International Engineering, Science and Education Conference, December 2016, Diyarbakır.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R, (2003). DnaSP DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19 pp. 2496–2497.
- Segherloo IH, Bernatchez L, Golzarianpour K, Abdoli A, Primmer CR, Bakhtiary M, (2012). Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb *Iranocypris typhlops*. *Journal of Fish Biology* 81, 1747–1753.
- Ünlü E, (1991). Dicle Nehri'nde yaşayan *C. trutta* (Heckel, 1843)'nın biyolojik özellikleri üzerinde çalışmalar. *Doğa Turk. Zool. Derg.*, 15: 22-38.
- Ünlü E, Balcı K, 1993: Observation on there production of *Leuciscus cephalus orientalis* (Cyprinidae) in Savur Stream (Turkey). *Cybium*, 17(3): 241-250.

- Ünlü E, Balcı K, Akbayın H, 1994: Some biological characteristics of the *Acanthobrama marmid* Heckel, 1843 in the Tigris River (Turkey) *Turk. J. of Zool.*, 18: 131-139.
- Ünlü E, Özbay C, Kılıç A, Coşkun Y, Şeşen R, (1997). GAP'ın Faunaya Etkileri. Türkiye Çevre Vakfı Yayını. 79-12.
- Ünlü E, Bozkurt R, (1997). Az Bilinen Bir Balık Türü; *Barilius mesopotamicus*'un taksonomisi üzerine bir çalışma. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu. 17-19 Eylül 1997, Eğirdir-Isparta.
- Ünlü E, Balcı K, Meriç N, (2000). Aspects of Biology of *Liza abu* (Mugilidae) in the Tigris River (Turkey). *Cybium*, 24(1): 27-43.
- Ünlü E, (2002). *Silurus triostegus* Heckel, 1843 ve *Silurus glanis* L., 1758 (Siluridae) türlerinin morfolojik ve anatomik özelliklerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi. XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi. 4-7 Eylül 2002.