

## Türkiye'deki İsparoz (*Diplodus annularis* Linnaeus, 1758) Populasyonlarının mtDNA Cyt *b* Genine Dayalı Genetik Analizi

Yusuf BEKTAŞ\*<sup>1</sup>, İsmail AKSU<sup>1</sup>, Gökhan KALAYCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Zihni Derin Yerleşkesi, Fener Mah., 53100/Rize, Türkiye

### ÖZET

Önemi ve genetik yapısı hakkındaki bilgi eksikliği düşünülerek gerçekleştirilen bu çalışma da Türkiye denizlerindeki isparoz balığının populasyon genetik yapısı ve genetik çeşitliğinin mitokondriyal DNA sitokrom *b* geni (997 bp) kısmi dizisi kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir. İsparoz örneklerinin toplandığı lokaliteler Doğu Akdeniz (Adana), Batı Akdeniz (Antalya), Ege Denizi (İzmir), Marmara Denizi (Çanakkale ve İstanbul), Orta Karadeniz (Sinop) ve Doğu Karadeniz (Rize) şeklindedir. Populasyonların genetik yapısı ikili *Fst*, moleküler varyans analizi (AMOVA) ve filogenetik analizler (NJ, MP, ML ve BI) yoluyla tahmin edilmiştir. Sonuç olarak sitokrom *b* geninin haplotip ve nükleotid çeşitliklerine dayalı olarak populasyonlar arasında düşük bir genetik varyasyon olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, sitokrom *b* haplotiplerinin filogenetik analizi, Ege ve Marmara Denizlerini ayıran Çanakkale Boğazı'nda ki sınırlı göçün varlığını aklı getiren iki olası genetik grup (Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz) olduğunu göstermiştir.

**Anahtar sözcükler:** İsparoz, sitokrom *b*, genetik yapı, Türkiye kıyıl suları.

### ABSTRACT

**Genetic Analysis of Annular Sea Bream (*Diplodus annularis* Linnaeus, 1758) Populations Based on mtDNA Cyt *b* Gene in Turkey:** Considering its importance and lack of information on its genetic structure, in this study, population genetic structure and genetic diversity of the annular seabream *Diplodus annularis* (L.) in the Turkish Seas was determined using the partial sequence of mitochondrial DNA cytochrome *b* gene (997 bp). Localities where annular seabream samples collected were as follows: the eastern Mediterranean Sea (Adana), the western Mediterranean Sea (Antalya), the Aegean Sea (Izmir), the Marmara Sea (Canakkale and Istanbul), Mid-Black Sea (Sinop) and the Eastern Black Sea (Rize). The population genetic structure was estimated through pairwise *Fst*, analysis of molecular variance and phylogenetic analyses (NJ, MP, ML and BI). As a result the genetic variability was low among the population based on haplotype and nucleotide diversities of cytochrome *b* gene. However, phylogenetic analyses of the *cyt b* haplotypes showed up there are two possible genetic groups (the Aegean-Mediterranean and Marmara-Black Sea) suggesting that the presence of restricted migration at the Straits of Dardanelles, separating the Aegean and Marmara Seas.

**Key words:** Annular seabream, cytochrome *b*, genetic structure, Turkish coastal waters.

### GİRİŞ

Ülkemiz üç tarafı farklı fizikokimyasal parametreler gösteren denizlerle çevrili farklı iklimsel özelliklerinin görüldüğü bir bölge oluşu sebebiyle zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Bu habitat içerisinde ekosistem için büyük öneme sahip balık türleri yer almaktadır. Özellikle artan nüfus ile birlikte gereken protein ihtiyacının karşılanması açısından balık türleri, bu açığı kapatması insanlar için artı bir öneme sahiptir. Bu nedenle balık türlerinin devamının sağlanması gerekmektedir. Bu yönde ilerleyen bilimsel çalışmalar öncelikle ekonomik önemi olan türleri ele alarak başlamıştır. Balık neslinin devamının sağlanabilmesi için populasyon yapılarının belirlenmesi ve gen havuzlarının ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Çünkü genetik çeşitliliğin korunması türlerin ve doğal populasyonların korunmasında başlıca öğelerden biridir. Herhangi bir biyolojik kaynağı etkili bir şekilde yönetmek ve sürdürülebilirliğini sağlayabilmek için var olan tür ve populasyonlarının genetik varyasyon düzeyinin mutlaka bilinmesi gerekmektedir (Okumuş ve Çiftçi, 2003).

Moleküler tekniklerin bu problemin çözümüne katkı sunacağı ön görülmüş ve araştırmacılar tarafından yaklaşık olarak son 30 yıldır genetik belirteçler bu amaçla kullanılmaktadır (Utter, 1991). Bu çalışmalar mitokondri ve nükleer DNA odaklı olup, bu genomların üzerindeki belirli gen dizilerinin analizine dayanmaktadır. Mitokondri DNA'nın yüksek mutasyon oranına sahip, haploit kromozom seti taşıyan maternal (anasal) bir DNA kaynağı olması nedeniyle araştırmacılar tarafından nükleer DNA'ya göre daha çok tercih edilmektedir. Mitokondri DNA üzerinden yapılan çalışmalarda tekli, çoklu veya tüm genomun dizi çeşitliliği kullanılabilir. Bu araştırmalarda, sitokrom oksidaz alt ünite I, sitokrom *b*, 16S rRNA

genleri çok popülerdir ve türden aile seviyesine kadar analizlere uygundur (Avice ve ark., 1998; Hebert ve ark., 2004; Kartavtsev ve Lee, 2006).

Mercangiller ailesine ait *D. annularis* türü kıyı sularında dağılım göstermekte olup zemini deniz bitkileriyle kaplı, kumlu ve kayalık olan dar bir bölgedeki alanda 0-100 m derinliklerde göç etmeden yaşamaktadır (Russel ve ark., 2014). Bu tür *Sparidae* ailesi içerisinde yer almaktadır ve araştırmacılar tarafından diş, diken ve yumuşak ışın sayısı, pullanma, vücut rengi ve beslenme şekilleri gibi morfolojik ve biyolojik özelliklerine dayanılarak sınıflandırılmıştır (Akazaki, 1962; Bauchot ve Hureau, 1986; Smith ve Smith, 1986; Fiedler, 1991).

Günümüze kadar yapılmış gerek farklı *Diplodus* türlerinin (Bargelloni ve ark., 2005; Domingues ve ark., (2007); Roques ve ark., (2007); Perez ve ark., 2008; González-Wangüemert ve ark., 2011; ) populasyon yapılarını gerekse *Diplodus* genusu kapsayacak şekilde *Sparidae* ailesinin filogenisi aydınlatmayı amaçlayan mitokondri ve nükleer genom temelli çok sayıda moleküler çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak Türkiye'de dağılım gösteren hiçbir *Diplodus* türünün populasyonlarının genetik yapısı henüz aydınlatılmamıştır.

Bu eksiklikten hareket edilerek gerçekleştirilen bu çalışmada türün biyoçeşitlilik ve ekonomik açıdan öneme sahip olması nedeniyle tüm denizlerimizde dağılım gösteren *D. annularis* türünün populasyon yapısının bilimsel geçerliliği kabul edilmiş olan mitokondri DNA sitokrom *b* geni DNA dizi analizine dayalı olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

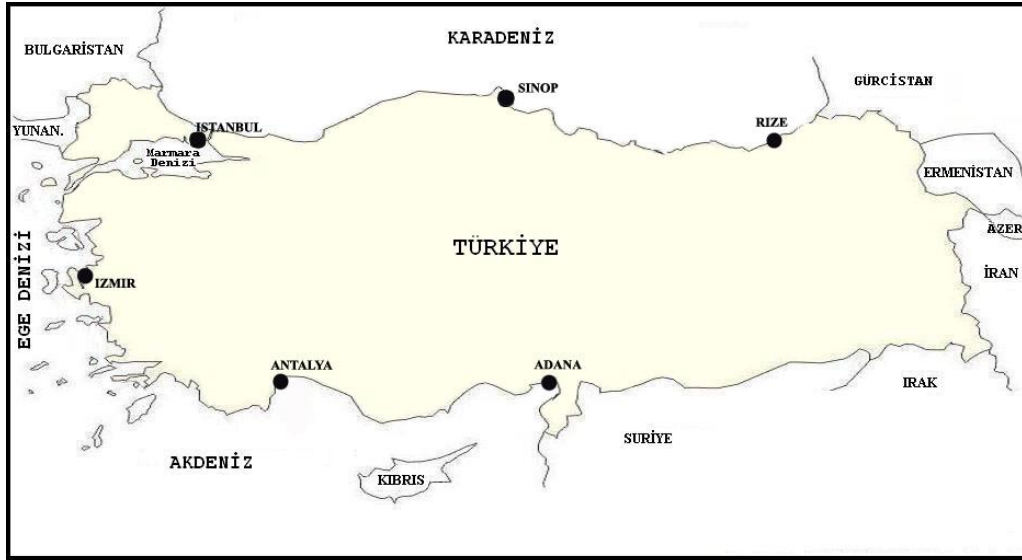
Biyolojik ve ekolojik özelliklerine uygun olarak dağılım gösterdikleri tüm denizlerimizi temsilen belirlenen toplamda 7 lokaliteden (Şekil 1) çalışma için gerekli olan toplamda 105 isparoz bireyi yerli balıkçılar yardımıyla temin edilmiştir. Temin edilen bireylerin 25-50 mg kas veya yüzgeç dokusu diseksiyon yöntemi ile alınarak % 96'lık etil alkolde fikse edildi ve çalışmanın yapılacağı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Genetik laboratuvarına getirildi.

Balık örneklerinin kas veya yüzgeç dokusundan DNA eldesi, Promega Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti (Madison, WI, USA) protokolüne göre yapılmıştır. Elde DNA'dan, tarafımızdan tasarlanmış olan (DplSpCytbF: 5'-CAAGCCTTCGAAARACACACCC-3'; DplSpCytbR: 5'ACYTTRTTTCTAWAG TTGCTGC-3') primerler kullanılarak ısıtılma döngü cihazında gerçekleştirilen PZR yardımı ile mtDNA *cyt b* gen bölgesi çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonlarında kullanılan kimyasallar ve miktarları: 3 µl 20 ng kalıp DNA, 10 µl 5X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 3,5 µl 0,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA Polimeraz, 1 µl 0,25 mM ileri ve geri primerleri, 4 µl 20 mM dNTP şeklinde olup karışım distile ddH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk zincir ayrılması basamağı 95°C'de 3 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü: DNA zincirinin ayrılması için 94°C'de 45 saniye, primerlerin DNA'ya bağlanması için 50°C'de 30 saniye ve yeni sentezlenen DNA zincirinin uzaması için 72°C'de 45 saniye ve 72°C'de 7 dakika son uzama şeklinde gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonlarında primerlerin *Tm* değerleri ve kullanılan kimyasalların konsantrasyonlarının optimum şartları gradient reaksiyonlar ile belirlenmiştir.

Total DNA ve PZR tekniği ile arttırılan sitokrom *b* geni ürünlerinin kalitesi etidyum bromür (0,5 mg/ml) içeren % 1'lik TAE-agaroz jeli hazırlanarak elektroforezde yanında 100 bp'lik izci DNA (Thermo Fisher Scientific) ile yürütüldü ve jel görüntülenerek incelendi. Ayrıca hem toplam DNA'nın hem de PZR ürünlerinin saflığının ve kalitesinin tayini spektrofotometre kullanılarak belirlendi.

PZR yardımıyla arttırılan mitokondri DNA *cyt b* geninin doğrudan DNA dizin analizi DplSpCytbF ve DplSpCytbR primerleri ile çift yönlü olarak Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda) firmasına yaptırılmıştır.

Dizin analizi ile elde edilen sitokrom *b* geni (997 bp) dizilerini filogenetik ve populasyon genetik analizlerinde kullanılmak üzere uygun hale getirmek için BioEdit 7.0.0 (Hall, 1999) programı içerisinde yer alan Clustal W çoklu hizalama seçeneği kullanılarak hizalandı ve kromatogramlar kontrol edilerek düzenlendi. Elde edilen dizilerin doğruluğunu teyit etmek için GenBank veri tabanındaki BLAST seçeneği kullanılarak veri tabanında kayıtlı dizilerle karşılaştırma yapıldı. Nükleotit kompozisyonu, haplotip çeşitliliği (Nei, 1987) nükleotit çeşitliliği (Nei ve Tajima, 1981) ve haplotiplerin populasyonlara dağılımı DNASP v5 (Librado ve Rozas 2009) programı ile belirlendi. Bireylerden elde edilen mitokondri DNA sitokrom *b* gen dizileri itibarıyla haplotipler, haplotipler arasındaki ilişkiler ve haplotiplerin populasyonlara dağılımı Arlequin (Schneider ve ark., 2000) programı ile belirlendi. *D. annularis* populasyonları arasındaki ve içindeki varyans, hiyerarşik genetik farklılaşma, grupların önemi, populasyon yapısı, haplotiplerin populasyonlara dağılımı Arlequin programı altında çalıştırılan moleküler varyans analizi (AMOVA, Excoffier ve ark., 2005) yaklaşımı ve *F* istatistik (Wright, 1951) seçenekleri kullanılarak test edildi. Filogenetik analizler kapsamında, Kimura two-parameter (K2P) mesafe modeline (Kimura, 1980) göre MEGA 6.0.5 (Tamura ve ark., 2013) programı altında komşu katılım (Neighbour joining, NJ) analizi gerçekleştirildi. Ayrıca PAUP versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) altında maksimum olasılık (Maximum likelihood, ML) ve maksimum tutumluluk (Maximum parsimony, MP), MrBayes versiyon 3.1.2 (Huelsenbeck ve Ronquist 2004) paket programı ile ise Bayesian çıkarım (Bayesian inference, BI) analizi de yapıldı.



Şekil 1. Örnekleme alanını ve seçilen lokaliteleri gösteren harita  
Figure 1. Map showing sampling area and selected localities

Veri setimiz için en uygun evrimsel modelleri Akaike Bilgi Kriteri (AIC) (Akaike 1973) ve Bayesian Akaike Bilgi Kriterleri (BIC) (Swartz, 1978) altında jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) programı kullanılarak seçilmiştir. MP analizi PAUP parsimoni metodunun buluşsal opsiyonu altında 100 rastgele ek kopya ve TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ağaç topolojisindeki dalların güvenilirlik değerleri 1000 tekrar seç-bağla (Bootstrap) testi (Felsenstein, 1985) ile belirlendi. Analizlerde dış grup olarak *D. sargus*, *D. vulgaris*, *D. puntazzo*, *D. cervinus*, *P. acarne* ve *Boops boops* kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Mitokondri DNA'sına ait sitokrom *b* geninin 997 bp'lik kısmi nükleotid dizisi, tüm denizlerimizde dağılım gösteren iki karagöz türünden biri olan isparoz (*D. annularis*) türünü temsilen Akdeniz, Ege Denizi, Marmara Denizi ve Karadeniz'den 7 farklı lokaliteden örneklenen 105 birey için DNA dizin analizine tabi tutuldu. Çalışılan türler nükleotid pozisyonlarının 19'u değişken (% 1,9) ve 16'sının (% 1,6) parsimonik bilgi verici olduğu belirlendi.

Mitokondri DNA sitokrom *b* gen bölgesi kısmi nükleotid dizilerinin analizi sonucu 105 bireyden toplamda 18 adet haplotip'in (Tablo 2) mukayese edilmesi sonucunda ülkemiz denizlerindeki isparoz popülasyonlarının Avrupa'nın Akdeniz kıyıları gibi yakın coğrafik bölgelerde dağılım gösteren popülasyonlardan farklı ve kendine özgün haplotip içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir.

Ayrıca, söz konusu sitokrom *b* geni haplotipleri arasında haplotip 1 referans olarak kullanılarak mukayese yapıldığında Türkiye'deki tüm popülasyonlarda temsil edilen iki istisnai haplotip'in (haplotip 1 ve 6) varlığına rağmen farklı tuzluluk, sıcaklık ve beslenme şartlarına sahip Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz'de yaşamını devam ettiren isparoz popülasyonlarının herhangi bir istisna olmaksızın 60 (A→G transisyonu), 219 (A→G transisyonu) ve 255 (C→T transisyonu) nolu SNP (tek nükleotid polimorfizm)'ler nedeniyle iki farklı haplogrubunun var olduğu ve izole olmalarında bir geçiş bölgesi olarak Çanakkale Boğazı'nın her iki taraf için belirleyici olduğu düşünülmektedir. Zira, Karadeniz'i Akdeniz'den ayıran Çanakkale Boğazı, Avrupa suları boyunca farklı denizel taksonlar için tanımlanan altı büyük filoçografik kırık veya geçiş bölgesinden biri olarak kabul edilmektedir (Magoulas ve ark., 1996; Nikula ve Vainola, 2003).

Sitokrom *b* geni haplotipleri ikili sekans ayırma değerleri % 0,10 ve % 1,02 (ortalama % 0,45) ve Akdeniz-Ege denizi örnekleri için ise % 0,10 ve % 0,51 (ortalama % 0,27)'dir. Diğer taraftan Marmara-Karadeniz grubu için ikili sekans farklılığı değerleri % 0,10 ve % 0,51 (ortalama % 0,33) olarak belirlenmiştir. Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz grupları

arasındaki ortalama genetik mesafenin % 0,58 olarak tespit edilmiştir. Düşük genetik mesafe ile birbirlerinden kısmen de olsa izole olan bu iki ana grup şeklindeki popülasyon yapılanması ve coğrafik düzeyde herhangi bir genetik farklılaşmanın coğrafik mesafe ile ilişkisi Karadeniz, Marmara, Ege ve Akdeniz popülasyonları arasında göçün sınırlı olduğunu göstermektedir. Coğrafik mesafe ile giderek artan oranda bölgeler arasında sıcaklık, tuzluluk, besin durumu ve balıkçılık yoğunluğu gibi çevresel faktörler bakımından dikkate değer farklılıklar olduğu (Die, 2001) gerçeği ile uyum göstermektedir. Diğer taraftan Ege ve Akdeniz arasında coğrafik bir bariyerin bulunmamasıyla daha da olası hale gelen göç bu bölge içindeki daha homojen yapılanmayı açıklayabilir.

Örnekleme yapılan lokaliteler için haplotip çeşitliliği (*h*); en düşük 0,590±0,0802 (İstanbul) ile en yüksek 0,914±0,1156 (Adana) değerleri arasında değişmekte olup ortalama 0,774±0,0120 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Diğer taraftan nükleotid çeşitliliği (*h*); yine haplotip çeşitliliği için belirlenen model'dekine benzer olarak en düşük 0,128±0,0128 (İstanbul) ile en yüksek 0,275±0,0276 (Adana) değerleri arasında değişmekte olup ortalama 0,250±0,0365 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). *D. annularis*'in popülasyonları arasında mitokondri sitokrom *b* geni haplotiplerin paylaşıldığının belirlenmesi aralarında ciddi coğrafik bariyerlerin söz konusu olmaması nedeniyle bu popülasyonlar arasında etkili bir gen akışının varlığının halen devam ettiğini göstermektedir. Bu nedenle popülasyon düzeyinde haplotipler arasında net bir coğrafik yapılanmanın olmadığını ortaya koymaktadır.

**Tablo 1.** *D. annularis* türünün örneklendiği lokaliteler, örnek sayısı, sitokrom *b* geni nükleotid dizilerine dayalı olarak belirlenen haplotip sayısı, haplotip çeşitlilik (*h*) ve nükleotid çeşitlilik ( $\pi$ ) değerleri (Standart sapma değerleri (S.S) parantez içinde verilmiştir).

**Table 1.** Sampling locations of *D. annularis*, sample number, haplotype number, haplotype diversity (*h*) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) values (standard deviation values (SD) are given in parentheses).

Lokaliteler	Örnek sayısı	Haplotip sayısı	<i>h</i> (±S.S.)	$\pi$ (±S.S.)
Adana	15	7	0.914±0.1156	0.00275±0.00276
Antalya	15	5	0.752±0.0932	0.00204±0.00205
İzmir	15	3	0.590±0.0807	0.00128±0.00128
Çanakkale	15	3	0.600±0.0938	0.00241±0.00242
İstanbul	15	3	0.590±0.0802	0.00128±0.00128
Sinop	15	4	0.657±0.0862	0.00134±0.00134
Rize	15	6	0.771±0.0962	0.00222±0.00222
<b>TOPLAM</b>	<b>105</b>	<b>18</b>	<b>0.774±0.0120</b>	<b>0.00250±0.00365</b>

Bununla birlikte Akdeniz'in bir uzantısı kabul edilen Marmara Denizi'nin Karadeniz ile aynı haplotipleri paylaşılmasına ek olarak Çanakkale Boğazı ile ayrılan iki isparoz grubu arasında dikkate değer düzeyde bir farklılaşma sergilemektedir. Benzer şekilde geçiş bölgesi olduğu ileri sürülen Çanakkale boğazının her iki tarafı arasındaki göreceli farklılıklar Turan ve ark., (2009) 'ın *T. mediterraneus*'ün mitokondri 16S rRNA geni analizine dayalı Karadeniz Akdeniz farklılaşması iddiasını destekler niteliktedir.

Çalışmamızda birkaç istisnai duruma rağmen iki ayrı grup olarak değerlendirilen Akdeniz-Ege ve Marmara-Karadeniz popülasyonları arasındaki ayrımın, daha uzak konumlanmış Adana ve Rize gibi lokalitelerin coğrafik olarak birbirinden uzak oluşlarına paralel olarak özgün haplotiplerin sayısının dolayısıyla haplotip çeşitlilik değerlerinin diğerlerine oranla daha yüksek oluşu ile desteklendiği görülmektedir.

Diğer taraftan tüm istasyonlarda dağılım gösteren haplotip 1 ve Akdeniz-Ege grubuyla sadece İstanbul lokalitesi arasında paylaşılan

haplotip 6 istisnaları hariç Çanakkale Boğazı ile ayrılan iki coğrafik grup arasında haplotiplerin paylaşılmaması kıyıya bağlı yaşayan belirli lokalitelere sadık kalan karagöz balıklarının yaşadıkları ortama uyum noktasında gen havuzlarında farklı tercihlere sahip olmaya eğilimli olduklarını işaret etmektedir.

Genel itibarıyla Akdeniz-Ege ve Marmara-Karadeniz grupları arasında haplotiplerin paylaşılmamasına ek olarak bahsi geçen coğrafik olarak kısmen bariyerle ayrılmış olan popülasyonlar arasındaki *FST* ve AMOVA karşılaştırmalarının her ikisi ile de belirlenmiştir. Mitokondri sitokrom *b* belirtecinin AMOVA analizi sonuçları değerlendirildiğinde toplam moleküler varyasyonun nispeten küçük bir kısmının (% 14,34) iki coğrafik grup (Akdeniz-Ege ve Marmara-Karadeniz) arasındaki farklılıktan, % 16,91'inin bu gruplar içerisindeki popülasyon farklılaşmasından ve geri kalan % 68,75'lik büyük kısmının ise popülasyonlar içindeki bireysel farklılıktan kaynaklandığını göstermiştir (Tablo 3).

**Tablo 2.** Türkiye kıyı sularından örneklenen isparoz türüne ait balıkların sitokrom *b* haplotiplerinin nükleotid varyasyonu ve frekansları. Pozisyon numaraları değişken bölgeleri ve noktalar referans sekansla aynı nükleotitleri gösterir.**Table 2.** Nucleotide variation and frequencies of cytochrome *b* haplotypes of belonging to the species sampled from Turkish coastal waters. The position numbers indicate variable regions and the dots indicate the same nucleotides in the reference sequence.

Haplotip	Değişken nükleotid pozisyonları	Akdeniz		Ege Denizi	Marmara Denizi	Karadeniz		
		ADN	ANT	IZM	CNK	IST	SNP	RIZE
	2224456666678889 3671550751134414684 6069582704562572155							
<i>DipAnn_Hap 1</i>	CAAACCAGATATATGGGCT	3	6	9	9	4	7	7
<i>DipAnn_Hap 2</i>	.....A..	2	1					
<i>DipAnn_Hap 3</i>	.....G....C....A..	2						
<i>DipAnn_Hap 4</i>	..G...G....C....A..	2						
<i>DipAnn_Hap 5</i>	..G...G.T.G....A..	2						
<i>DipAnn_Hap 6</i>	..G...G....A..	2	5	4		9		
<i>DipAnn_Hap 7</i>	.....G.....A..	2	1					
<i>DipAnn_Hap 8</i>	.....AA..		2					
<i>DipAnn_Hap 9</i>	..G..G....C..A..			2				
<i>DipAnn_Hap 10</i>	.G.GT.G.....A..				3			
<i>DipAnn_Hap 11</i>	.G.GT.GA.....AT.				3		6	
<i>DipAnn_Hap 12</i>	TG.GT.G.....A..					2		
<i>DipAnn_Hap 13</i>	.G.GTTGA.....AT.						1	2
<i>DipAnn_Hap 14</i>	.G.GT.G..C.....A..						1	
<i>DipAnn_Hap 15</i>	.G.GT.GA.....AAT.							2
<i>DipAnn_Hap 16</i>	.G.GTTGA....C...AT.							2
<i>DipAnn_Hap 17</i>	.G.GT.G.....A..A..							1
<i>DipAnn_Hap 18</i>	.G.GT.G.....A..C							1
		<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

İkili *F<sub>ST</sub>* değerleri mukayesesi, *D. annularis* populasyonlarının iki ana gruba ayrıldığı (*F<sub>ST</sub>* = % 0,31251, *P* < 0,05) (Tablo 4) göstermektedir ve grup içinde populasyon çiftleri arasındaki *F<sub>ST</sub>* değerleri (Tablo 4) kullanılarak elde edilen populasyonlar arası gen akışı miktarlarının (Tablo 4) yüksek değerlere tekabül ettiği belirlenmiştir. *F*-istatistik ve AMOVA analizi sonuçları, *D. annularis* populasyonlarının genetik olarak zayıfta olsa bölgesel eğilim gösterdiği ve *D. annularis*'in Akdeniz-Ege ve Marmara-Karadeniz gruplarının seçilen populasyonlar itibarıyla elde edilen mitokondri sitokrom *b* haplotiplerine dayalı olarak birbirlerinden dikkate değer düzeyde farklı olduğu görülmektedir. Dolayısıyla Çanakkale Boğazı'nın her iki tarafında yer alan denizler arasında çeşitli bariyerler nedeniyle gen akışının yakın zaman diliminde azaldığı (Tablo 4) ve bundan dolayı Türkiye kıyısız sularında dağılım gösteren isparoz balığının iki ayrı grup altında değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

Türkiye karasularında dağılım gösteren isparoz populasyonlarına ait mitokondriyal sitokrom *b* haplotiplerinin filogenetik analizleri için dış grup olarak aynı cins içindeki ve denizlerimizde dağılım gösteren kardeş türlerden *D. vulgaris*, *D. puntazzo*, *D. sargus*, *D. cervinus* grup içi dış grup, karagöz ailesi ile aynı ailede yer alan türlerden *P. acarne* ve *Boops boops* ise grup dışı dış grup olarak kullanılmıştır. Komşu katılım (NJ), maksimum tutumluluk (MP), maksimum olasılık (ML) ve Bayesian çıkarsama (BI) metodları kullanılarak gerçekleştirilen analizlerin her birinden elde edilen filogenetik ağaç topolojileri hemen hemen aynıdır ve sitokrom *b* haplogrupları arasındaki ilişki yüksek seç-bağla değerleri ile desteklenmektedir (Şekil 2). Haplotiplerin filogenetik analizleri yüksek güvenilirliğe sahip (NJ:90, MP:82, ML:73, BI:90) iki ana alt grubu (Akdeniz-Ege ve Marmara-Karadeniz) içeren monofiletik bir grubun varlığını ortaya koymuştur. Bu ağaç topolojisinin tüm populasyonlarda temsil edilen *DipAnn\_Hap1* ve Akdeniz-Ege ile birlikte sadece İstanbul lokalitesinde temsil edilen *DipAnn\_Hap6* istisnası dışında oldukça tutarlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

**Tablo 3.** Mitokondri sitokrom *b* geni dizilerine dayalı olarak *D. annularis* populasyonlarının AMOVA analizi.**Table 3.** AMOVA analysis of *D. annularis* populations based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences.

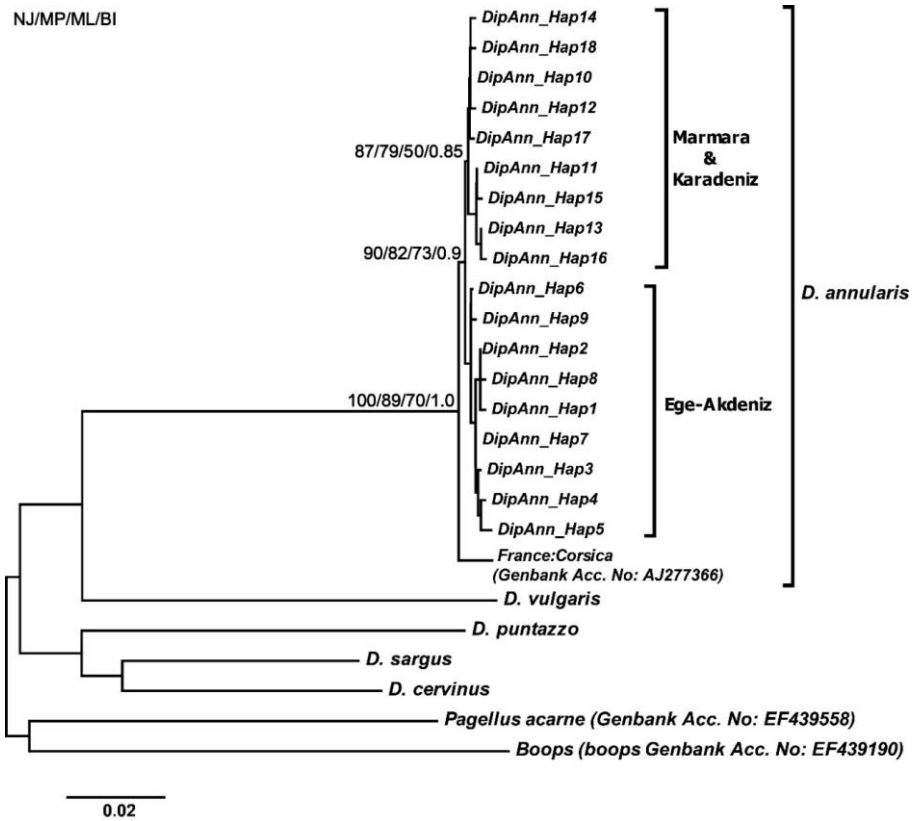
Varyasyonun kaynağı	S.D.	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyasyonun yüzde oranı
Gruplar arasında	1	14.618	0.19776 Va	14.34
Grup içi populasyonlar arasında	5	22.239	0.23330 Vb	16.91
Populasyonlar içinde	98	92.933	0.94830 Vc	68.75
<b>Toplam</b>	<b>104</b>	<b>129.790</b>	<b>1.37936</b>	

*F<sub>ST</sub>*: 0.31251

**Tablo 4.** Populasyonlar arasındaki gen akışı (üst diyagonal) ve ikili  $F_{ST}$  (alt diyagonal) değerleri.  
**Table 4.** The gene flow (upper diagonal) and pairwise  $F_{ST}$  (lower diagonal) values between populations.

Lokalite	ADN	ANT	IZM	CNK	IST	SNP	RIZE
ADN		4.2590	1.1907	1.2032	1.6640	0.4572	0.5652
ANT	0.1050		7.1311	3.5303	22.894	0.7137	0.9590
IZM	0.2957	0.0655		5.2445	20.937	0.9383	1.3260
CNK	0.2935	0.1240	0.0870		2.2133	4.1176	4.7637
IST	0.2310	0.0213	0.0233	0.1842		0.5956	0.8243
SNP	0.5223	0.4119	0.3476	0.1082	0.4563		∞
RIZE	0.4693	0.3427	0.2738	0.0949	0.3775	-0.0116	

$F_{ST}$ 'nin önemlilik değeri ( $P < 0,05$ ).



**Şekil 2.** Sitokrom *b* dizilerinden elde edilen 18 *D. annularis* haplotip'inin filogenetik ağaçları. *D. vulgaris*, *D. puntazzo*, *D. sargus*, *D. cervinus*, *P. acarne* ve *B. boops* dış grup olarak kullanılarak komşu katılım, maksimum tutumluluk, maksimum olasılık ve Bayesian çıkarsama metodları yardımıyla oluşturulmuştur. Seç-bağla değerleri % 50' den yüksek olanlar verilmiştir.

**Figure 2.** Phylogenetic trees of 18 *D. annularis* haplotypes based on cytochrome *b* sequences. Trees were created by neighbor joining, maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference methods using as outgroup *D. vulgaris*, *D. puntazzo*, *D. sargus*, *D. cervinus*, *P. acarne* and *B. boops*. Value below 50 % are not shown.

Turan ark., 2009 yılında mitokondri DNA 16S rRNA geninin restriksiyon parça uzunluk polimorfizm'ine (RFLP) benzer olarak çalışmamızda sitokrom *b* geni kısmi dizilerinin analizi sonucunda Çanakkale Boğazı'nın geçiş bölgesinin her iki tarafının dikkate alınabilecek düzeyde genetik farklılaşmanın var olduğu belirlenmiştir. İstisnai olarak

DipAnn\_Hap1 ve DipAnn\_Hap6 haplotipleri farklılaşmaya başladığı öngörülen gruplar arasında paylaşılmaktadır. Bu paylaşım, *D. annularis* populasyonlarının yakın bir zaman diliminde birbirlerinden ayrılmaya başladıkları ve geçen bu küçük zaman diliminde halen baskın yani tüm populasyonlarda temsil edilen haplotiplerin varlığı ile desteklenmektedir.

## SONUÇLAR

Mercangiller ailesinin *Diplodus* genusuna ait isparoz taksonunun tüm Türkiye denizlerinde dağılım gösteren iki türünden biri olan *D. annularis*'in mitokondri sitokrom *b* gen haplotiplerinin komşu katılım, maksimum tutumluluk, maksimum olasılık ve bayesian çıkarsama metodlarına dayalı olarak gerçekleştirilen filogenetik analizler ile elde edilen yüksek güvenilirlik değerlerine sahip filogenetik ağaç topolojilerinde diğer karagöz türleri ile birlikte monofiletik bir yapılanma göstermiştir.

FST ve AMOVA analizleri yoluyla isparoz'un Türkiye popülasyonlarının genetik yapılanmasına dair elde edilen genetik bulgular daha önce farklı balık türleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları ile uyum göstermektedir. Bununla birlikte, çok sayıda çalışmada yakın denizel ortamdaki filocoğrafik geçiş noktalarından biri olarak kabul edilen Çanakkale Boğazı içinde önemli bir geçiş noktası olduğunu işaret eden *D. annularis* türüne ait her iki taraftaki Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz popülasyonları arasındaki genetik farklılaşmanın varlığı dikkate değerdir.

Diğer taraftan Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz gruplarının kendi içinde paylaştıkları haplotip sayılarının görece bolluğuna rağmen anlamlı bir coğrafik yapılanma göstermemeleri (genetik homojenlik) iki bölgedeki popülasyonlar arasında coğrafik bariyerlerin yokluğunda devam eden gen akışına bağlanabilir.

Günümüzde *D. annularis* Türkiye kıyısı sularında tek bir stok olarak ele alınmaktadır. Ancak yönetsel bir bakış açısından bakıldığında bu çalışmadan elde edilen genetik sonuçlar gösteriyor ki Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz denizleri arasında az da olsa popülasyon farklılaşması vardır. Tekrarlı analizlerden elde edilen bu iki grup arasındaki tutarlı farklılıklar geçici ve mekânsal sağlamlığı gösteriyor ki bu süreklilik iki farklı stoğun varlığını garanti altına almaktadır. Türkiye kıyısı sularında dağılıma sahip isparoz gibi yüksek düzeyde gen akışına sahip denizel türlerin popülasyon yapılarını aydınlatılabilmek ve olası birden fazla stoğun daha da güvenilir bir şekilde tanımlanabilmesi için sonraki çalışmalarda popülasyonlar arası karışmaları gösterebilecek ve yönetsel açıdan önemli popülasyonların tespiti noktasında oldukça hassas sonuçlar üretebilen mikrosatellit bölgeleri gibi daha farklı DNA belirteçleri kullanılabilir.

Sonuç olarak, hakkında ülkemizde moleküler tekniklerle yapılan bir çalışma olmayan *D. annularis* popülasyonların mitokondri genomu temelli yapısal analizi Ege-Akdeniz ve Marmara-Karadeniz eksenli gittikçe belirgin hale gelen bir popülasyon farklılaşması olabileceğini göstermektedir. İki olası stoğun varlığını işaret eden bu sonuçlar ekonomik değeri yüksek olan bu türe ait kaynakların kısa, orta ve uzun vadede korunması ve stoklarının sürdürülebilir yönetimi için önemli bir referans olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından 2012.103.01.3 nolu projesiyle desteklenmiş ve RTEÜ Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun 22 Mart 2012 tarihli 21 nolu kararı ile gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akazaki M., (1962).** Studies on the perciform fishes anatomy, phylogeny, ecology, and taxonomy, Osaka Japan, 8 Kosugi Co. Ltd., 368p.
- Avice JC., Walker D. And Johns GC., (1998).** Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. Proc. R. Soc. Lond. B. vol. 265 no., 1407, 1707-1712.
- Bargelloni L., Alarcon JA. Alvarez MC., Penzo E., Magoulas A. and Palma J., (2005).** The Atlantic Mediterranean transition: Discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). Molecular Phylogenetics and Evolution, 36, 523-35.
- Bauchot ML. and Hureau JC., (1986).** *Sparidae*. 883-907 s. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (ed), Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean, 1986, UNESCO, ISBN: 9230022152, 1473p.
- DIE., (2001).** "Devlet İstatistik Enstitüsü, Balıkçılık İstatistikleri, Ankara, Türkiye, 158s.

- Domingues V., Santos R., Brito A., Alexandrou M. and Almada V., (2007).** Mitochondrial and nuclear markers reveal isolation by distance and effects of Pleistocene glaciations in the northeastern Atlantic and Mediterranean populations of the white seabream (*Diplodus sargus*, L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 346,102-13.
- Excoffier L., Laval G. and Schneider S., (2005).** Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1, 47-50.
- Felsenstein J., (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791.
- Fiedler K., (1991).** Familie *Sparidae*. In: Starck D (ed) Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Teil 2: Fische. Gustav Fischer Verlag, Jena, 354-355p.
- Gonzalez-Wanguemert M., Froufe E., Perez-Ruzafa A. and Alexandrino P., (2011).** Phylogeographical history of the white seabream *Diplodus sargus* (*Sparidae*): Implications for insularity. Marine Biology Research, 7, 250-260.
- Gonzalez-Wanguemert M. and Perez-Ruzafa A., (2011).** In two waters: contemporary evolution of lagoonal and marine white seabream (*Diplodus sargus*) populations. Marine Ecology, 33, 337-349.
- Hall TA., (1999).** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium, 41, 95-98.
- Hanel R. and Sturmbauer C., (2000).** Multiple Recurrent Evolution of Trophic Types in Northeastern Atlantic and Mediterranean Seabreams (*Sparidae*, *Percoidei*). J. Mol. Evol., 50, 276-283.
- Hebert PD., Stoeckle MY., Zemlak TS. and Francis CM., (2004).** Identification of birds through DNA barcodes PLoS Biol., 2, 312.
- Huelsenbeck JP. and Ronquist FR., (2004).** MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. -Bioinformatics, 17, 754-755.
- Kalendar R., Lee D. and Schulman AH., (2009).** FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. Genes, Genomes and Genomics, 3(1), 1-14.
- Kartavtsev YP. and Lee S., (2006).** Analysis of nucleotide diversity at genes *Cyt-b* and *Co-1* on population, species, and genera levels. Applicability of DNA and allozyme data in genetics of speciation Russ. J. Genet., 42, 341-362.
- Kimura M., (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.
- Librado P. and Rozas J., (2009).** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25(11), 1451-1452.
- Magoulas A., Tsimenides N. and Zouros E., (1996).** Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the populations history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). Molecular Biology and Evolution, 13, 178-190.
- Nei M., (1987).** Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nei M. and Tajima F., (1981).** DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics, 97, 145-163.
- Nikula R. and Vainola R., (2003).** Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (*Bivalvia: Cardiidae*) across Europe: a major break in the Eastern Mediterranean. Mar Biol., 143, 339-350.
- Okumuş İ. and Ciftci Y., (2003).** Fish Population Genetics and Molecular Markers: II Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3 (1), 51-79.
- Orrell TM., Carpenter KE., Musick JA. and Graves JE., (2002).** A phylogenetic and biogeographic analysis of the *Sparidae* (Perciformes: Percoidei) based on cytochrome *b* sequences. Copeia, 3, 618-631.
- Orrell TM. and Carpenter KE., (2004).** A phylogeny of the fish family *Sparidae* (porgies) inferred from mitochondrial sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 32, 425-434.
- Perez L., Infante C., Ponce M., Crespo A., Zuasti E., Funes V., Catanese G. and Machado M., (2008).** Characterization of eight microsatellite markers in the white sea bream, *Diplodus sargus* (Teleostei, *Sparidae*). Mol. Ecol. Resour., 8(6),1291-3.
- Posada D. and Crandall KA., (1998).** Modeltest: testing the model of DNA substitution. -Bioinformatics, 14 (9), 817-818.
- Posada D. and Buckley TR., (2004).** Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Systems Biology, 53, 793-808.

- Roques S., Galarza JA., Macpherson E., Turner GF. and Rico C., (2007).** Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in the two-banded sea bream (*Diplodus vulgaris*) and cross-species amplification in the white sea bream (*Diplodus sargus*) and the saddled bream (*Oblada melanura*). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 661-663.
- Russell, B., Carpenter, K.E. & Pollard, D. 2014.** *Diplodus annularis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T170260A1303905.
- Schneider S., Roessli D. and Excoffier L., (2000).** Arlequin: a software for population genetics data analysis (v. 3.01). Geneva, Switzerland: University of Geneva, Department of Anthropology.
- Smith JLB. and Smith MM., (1986).** Family No. 183: *Sparidae*. 580-594 s. M.M. Smith and P.C. Heemstra (Ed), *Smith's Sea Fishes*, 1986, Springer, 1050p.
- Summerer M., Hanel R. and Sturmbauer C., (2001).** Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of sea bream of the genus *Diplodus* (*Sparidae*). *J. Fish Biol.*, **59**, 1639-1652.
- Swofford DL., (2003).** PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S., (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- Thompson JD., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins DG., (1997).** The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4876-4882.
- Turan C., Ozturk B., Gurlek M. and Yaglioglu D., (2009).** Genetic differentiation of mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR Analysis. *Journal of Applied Ichthyology*, **25(2)**, 142-147.
- Utter FM., (1991).** Biochemical Genetics and Fishery Management: An Historical Perspective. *Journal of Fish Biology*, **39 A**, 1-20.
- Wright S., (1951).** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.

**Geliş tarihi:** 15.10.2016 / **Kabul tarihi:** 08.11.2016

**\* Başlıca Yazar Yazışma Adresi:**

Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi,

Temel Bilimler Ana Bilim Dalı, Zihni Derin Yerleşkesi, Rize, Türkiye.

**E-mail:** yusuf.bektas.tr@gmail.com