



Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 6 (2): 01-08, 2013

ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132, www.nobel.gen.tr

## DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama

Emre KESKİN<sup>1,2\*</sup>

Hasan Hüseyin ATAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü

\*Sorumlu Yazar:

E-posta: keskin@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi

: 10 Haziran 2012

Kabul Tarihi

: 24 Temmuz 2012

### Özet

Bu derlemede, günümüzde biyolojik tanımlama amacı ile en çok kullanılan moleküler yöntem olan DNA barkodlama tekniği tüm yönleri ile ele alınmıştır. DNA barkodlamanın diğer yöntemlerden farkı açıklanmış, hedef gen olarak neden sitokrom oksidaz c alt ünite I geninin seçildiği gerekçeleri ile birlikte verilmiş, DNA barkodlama tekniğinin uygulanması ve iş akışı ortaya koyulmuştur. DNA barkodlama ile ilgili bilgiler verilirken, uygulamada karşılaşılan zorluklar da konu kapsamına alınmış ve başlıklar altında incelenmiştir. Son olarak DNA barkodlama ile ilgili en çok tartışılan konu olan, DNA barkodlama çalışmaları ile filogeni ve populasyon genetiği çalışmalarının hangi noktalarda kesiştikleri ve hangi noktalarda ayrıldıkları konusu açıklığa kavuşturulmaya çalışılarak, öneriler ortaya koyulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** COI, DNA barkodlama, DNA kütüphanesi, mitokondriyal DNA, tür tanımlama.

## DNA Barcoding: Molecular Identification Using Mitochondrial COI Gene

### Abstract

In this review, DNA barcoding, which is the most commonly used molecular tool in biological identifications, was discussed in every respect. Difference of DNA barcoding from other molecular tools, the main reasons of using cytochrome oxidase c subunit I was given together with application and work flow of this approach. While explaining DNA barcoding, the difficulties encountered during application was also discussed under several subtitles within the scope of this review. Finally, the most contentious issue of relationship between DNA barcoding, phylogeny and population genetics was tried to be clarified along with suggestions related to subject.

**Keywords:** COI, DNA barcoding, DNA library, mitochondrial DNA, species identification.

## GİRİŞ

DNA barkodlama terimi, literatürde yaygın olarak kullanılmaya başlanan bir ifadedir. Bu yöntem temelde mitokondriyal DNA'nın 600-700 baz çifti uzunluğundaki standart bir bölgesinin hızlı, doğru ve otomatik bir şekilde tür tanımlamada kullanılmasına dayanmaktadır [1]. Fakat DNA barkodlamanın, incelendiğinde çok da yeni bir kavram olmadığı görülmektedir. "DNA barkodu" terimi ilk kez 1993 yılında, bilimsel çevrelerin çok da dikkatini çekmeyen bir çalışmada [2] kullanılmıştır. Hatta moleküler araçlar kullanılarak tür tanımlamalarının gerçekleştirilmesi ifadesi, bundan da eski bir kavram olarak, Sanger dizileme tekniğinden de önce ortaya çıkmıştır. Fakat DNA

barkodlamanın gerçek "altın çağı" 2003 yılında başlamış [3] ve konuyla ilgili yayınların sayısı hızla artarak, günümüzde bu konuda yayınlanmış makale sayısı 1000'iaşmıştır. DNA barkodlamanın potansiyel kullanıcıları sadece taksonomistler değildir. Bu yöntem adli bilimler, biyoteknoloji, gıda endüstrisi, hayvan besleme, genetik çeşitlilik, ve tür ayrımı gibi birçok alanda kullanılabilecek bir araç olarak literatürdeki yerini almıştır.

Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt ünite I (COI) geninin yaklaşık 655 baz çiftlik küçük bir bölümü kullanılarak kuşlar, balıklar ve kelebekler gibi karmaşık gruplara ait

birçok canlı türünde %98-100 seviyelerinde tanımlama başarıyla gerçekleştirilmiştir. Barkodlama yönteminin kullanılmasıyla önceden tek bir tür olarak tanımlanan birçok ayrımı zor türün ortaya çıkarılması mümkün olmuştur. Barkodlama ile hızlı ve güvenilir tür tanımlamanın yanı sıra, farklı gruplar arasındaki filogenetik ilişkiler de daha kolay çözümlenebilir olmaktadır [4].

#### DNA Barkodlama Nedir?

Türlere özgü DNA profillerini ortaya çıkaran DNA barkodlama yöntemi, temelde basit bir önermeye dayanmaktadır. Bu önerme, organizmaların genomlarının küçük parçalarındaki DNA dizisi farklılıklarının herhangi bir canlının tür seviyesinde tanımlanmasını sağlayacak biyolojik barkodlar olarak kullanılabilir. Böylece, tanımlanamayan türlerin DNA dizileri ile DNA barkod veri tabanlarındaki DNA dizilerinin eşleştirilmesi yöntemiyle bu türlerin tanımlanmasını sağlayacak evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır. Kısa DNA dizilerinin kullanılmasının temelinde, dizinin tür içerisindeki farklılık seviyesinin türler arasındaki farklılık seviyesinden daha düşük olduğu varsayımı bulunmaktadır. Yöntem, canlılardan elde edilen doku örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmesi, bu DNA'nın PCR ile hedeflenen bölgenin çoğaltılmasında kullanılması ve çoğaltılan bölgenin DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesi aşamalarından oluşmaktadır. Bu işlemler sonucunda elde edilen DNA dizileri türlerin tanımlanmasında kullanılan barkodlar olarak veri bankalarına kayıt edilmektedir [4].

#### DNA Barkodlamanın Diğer Yöntemlerden Farkı

DNA barkodlamayı diğer yöntemlerden ayıran temel özellik tek bir gen bölgesi kullanılarak tüm hayvan türlerine yönelik evrensel bir biyolojik tanımlama sistemi prensibine sahip olmasıdır [3]. *COI* geninin 5' ucundan 655 baz çiftlik bölgesi, farklı şubelerden birçok canlıya göre tasarlanabilen primerler ile çoğaltılabilmesi nedeniyle DNA barkodlama için en uygun bölge olarak belirlenmiştir [5].

Bir gen bölgesinin DNA barkodu kadar kullanışlı olabilmesi için üç özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler:

1. Tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması,
2. Geniş bir taksonomik ölçekten canlılar için uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması,
3. DNA ekstraksiyonu ve PCR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması şeklinde sıralanabilir.

*COI* geni tüm bu özelliklere sahip dolayı hayvanlarda tür seviyesinde ayırım gücüne sahip, standartlaştırılmış barkodlama bölgesi olarak kabul görmüştür [6].

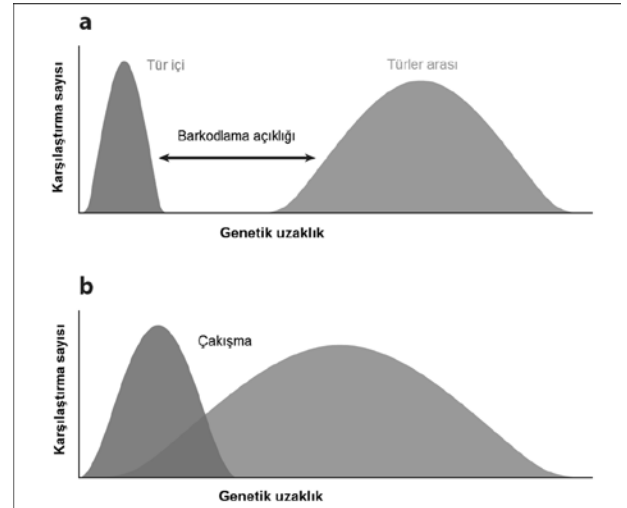
#### Neden Sitokrom C Oksidaz Alt Ünite I (*COI*) Geni?

*COI* barkod bölgesinin, metazoan mitokondriyal genomu bakımından tür içerisinde %3'ten küçük, türler arasında ise ortalama %10 ila %25 arasında belirgin bir farklılık gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuş bir gerçektir [7]. Günümüzde metazoan türler için kullanılan standart barkodun tanımı, *COI* geninin 5' ucundan 652-658 baz çiftlik bölgesi olarak ifade edilmektedir [3]. Metazoan türler için evrensel bir barkod bölgesi arayışında, mitokondriyal genomun nükleer genoma kıyasla birçok

avantajı söz konusudur. Bu avantajlar intronların bulunmaması, rekombinasyona sınırlı şekilde maruz kalması, tüm hücrelerde yüksek kopya sayısı, haploit özellikte olması ve maternal bir kalıtıma sahip olması şeklinde sıralanabilir. Geçmişte yapılan birçok sistematik analiz çalışmasında kullanılan *12S rRNA* ve *16S rRNA* genleri, göstermiş oldukları yüksek insersiyon ve delesyon frekansı nedeniyle elde edilen dizilerin hizalanmasında ve karşılaştırılmasında büyük zorluklara neden olmuştur. Metazoan türlerin mitokondriyal genomlarında bulunan 13 protein kodlayan gen genellikle bu insersiyon ve delesyonları içermektedir. *COI* geninin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğü, metazoan türler için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesi ve birçok farklı taksonomik seviyede kullanılabilir bir filogenetik sinyaline sahip olmasıdır.

*COI* geninde bulunan kodonların üçüncü pozisyonundaki nükleotidleri yüksek oranda substitüsyon göstermekte ve böylece mitokondriyal rRNA genlerine oranla üç kat daha yüksek moleküler evrim hızına sahip olarak değerlendirilmektedirler. Bir başka önemli nokta da *COI* geninde gerçekleşen evrimin, yakın türlerin ayırımına imkan tanıyan ve coğrafik yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek bir hızda gerçekleşmesidir [8].

*COI* geninin standart barkod geni olarak seçilmesindeki asıl neden, birden fazla tür için göstermiş olduğu belirgin ayırım gücü ve tür içi ile türler arasındaki uzaklığın çakışmadığı tipik varyasyon modelidir [7]. Tür içi ve türler arası varyasyonda çakışma meydana gelmemesi "barkodlama açıklığı" olarak adlandırılmış [9] ve barkod dizilerinin isabet ve güvenilirliğinde en önemli nokta olarak kabul edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Tür içi ve türler arası genetik uzaklıkların varsayımsal dağılım frekansları. (a) tür içi varyasyon ve türler arası varyasyonun ayrı dağılımından doğan barkodlama açıklığı, (b) tür içi ve türler arası varyasyonun çakışan dağılımı sonucu barkodlama açıklığının bulunmaması [9].

Tüm bu özelliklerine rağmen *COI* geninin çözümleyemediği bazı canlı grupları da bulunmaktadır. Bunlara örnek, Porifera (süngerler), Ctenophora (taraklılar) ve Anthozoa (mercanlar) olup, bu gruplardaki mitokondriyalDNA evrimsel hızının diğer metazoan gruplara kıyasla 10-20 kat daha az olduğu ileri sürülmektedir [10]. Dahası *COI* barkodlarından elde edilen verilerin bazı canlı gruplarında, yakın ilişkili türlerin güvenilir bir şekilde ayrımlarının gerçekleştirilmesinde yetersiz kaldığı da belirtilmektedir [11].

Bu istisnalar dışında, coğrafik olarak geniş yayılım gösteren farklı türlerin, türler arası ve tür içi genetik varyasyonlarını da içeren birçok çalışma sonucunda elde edilmiş birbirleriyle tutarlı veri setleri, *COI* geninin barkodlama çalışmalarında kullanılan standart belirteç olarak benimsenmesinde büyük rol oynamıştır. *COI* geninin standart belirteç olarak benimsenmesinin sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank ve BOLD (Barcode of Life Data Systems) gibi geniş, halka açık veri tabanlarına da belirgin bir şekilde yansımıştır. Barkodlama geninde gerçekleştirilen standartlaştırma sonrasında GenBank ve BOLD gibi veri tabanlarına *COI* gen dizilerinin girişinde büyük bir artış yaşanmıştır. Bu veri çeşitliliği ve yoğunluğu, *G-C* değişimleri gibi nükleotid kompozisyonundaki evrimsel değişimler de dahil olmak üzere hayvanlar, bitkiler ve mantarlardaki birçok moleküler evrimsel hipotezin incelenmesine olanak sağlamıştır. *COI* barkod bölgesi, nükleotid kompozisyonunun tahmininde özellikle tercih edilen bir dizi olmamasına ve mitokondriyal genomun herhangi bir bölgesinden bu anlamda çok farklı olmamasına rağmen, farklı taksonlardan gerçekleştirilen yoğun örneklemeler sonucunda barkod kütüphanelerinde bu bölgeye ilişkin birçok kayıt oluşmakta ve böylece çok sınırlı sayıda diziyeye sahip mitokondriyal genom veri tabanlarının sunamadığı karşılaştırma yapılacak bir referans DNA kütüphanesi imkanını araştırmacılara sunmaktadır [8].

*COI* gen bölgesinin tür seviyesinde tanımlamalarda etkin bir şekilde kullanılabilirliği günümüzde birçok omurgalı ve omurgasız hayvan grubu için kabul edilmiştir [12]. Barkodlama ayrıca hayvan hücre hatlarının tanımlanmasında da kullanılabilirlikte [13] ve biyoçeşitlilik veri tabanlarındaki materyallerin karakterizasyonunda önerilen bir uygulama olarak da karşımıza çıkmaktadır [14]. Bunlarla birlikte, *COI* geninin aynı bölgesi kırmızı makro alglerin tür tanımlanmasında [15], tek hücreli protistlerde ve bazı mantarlarda [16] da kullanılmaktadır. Bu kadar geniş ölçekte uygulama alanına sahip bu bölgenin ayırım gücünün temelinde nükleotid dizilerinde aynı anda meydana gelen değişikliklerdeki sıklık yer almaktadır.

Moleküler biyoloji yöntemleri hızla gelişmekte olduğundan günümüzde ekonomik olarak görülmeyen mikroarray ve hibridizasyon problemleri kullanılarak tek bir prob ile çok sayıda türün moleküler tür tayini uygulanabilir olacaktır. *COI* geni moleküler tür tayini özelinde değerlendirildiğinde, bugüne kadar yapılan çalışmalarında sürekli hata veren bir taksona rastlanmamış ve yukarıda bahsedilen nedenlerden ötürü en uygun moleküler belirteç olarak değerlendirilmektedir. Fakat filogenetik çalışmalarda ve populasyon çalışmalarında *COI* geni ile birlikte nükleer genlerden de en az bir belirteç kullanılması, sadece mitokondriyal bir gen ile çalışmanın doğurabileceği olası

hataları en aza indirmek bakımından göz önünde bulundurulması gereken bir başka noktadır.

#### DNA Barkodlamanın Uygulanması

Geniş veri dijitalleştirme projeleri sayesinde, tüm dünyada biyoçeşitlilik çalışan araştırmacılar taksonomik literatüre rahatlıkla ulaşabilmektedir. İnternet erişimi tabanlı veri bankaları ile geçerli taksonomik isimlendirmeler ve sinonimlerinin de takip edilmesi kolaylaşmış durumdadır. Tüm bunlar çevrimiçi tür tayin anahtarları ve yüksek çözünürlükte dijital görüntüler ile birlikte değerlendirildiğinde taksonomik bilgi hiç olmadığı kadar kolay ulaşılabilir hale gelmektedir. Tüm bu gelişmelere rağmen morfolojik analizler halen ayırımı zor türlerin, larvaların, yavruların ve vücut parçalarının tür seviyesinde tanımlanmasına yetecek kadar olanak sağlamamaktadır. Türlerin daha iyi karakterize edilmesi ve tanımlanmasında, morfolojik tanımlanması gerçekleştirilmiş örneklerden elde edilen standart, referans DNA dizilerinden yararlanılabilir. Çok geniş taksonomik ölçekteki örnekler arasında elde edilen belirli standartta DNA dizileri herkesin ulaşabileceği ortak bir veri tabanı altında toplanabilir. Bilinmeyen türlerin tanımlanması için bu şekilde bir veri tabanının oluşturulması ve kullanılması zorunludur. Önceki çalışmalar incelediğinde, GenBank veri tabanında omurgalılara ilişkin DNA dizisi kayıtlarının büyük çoğunluğunu *sitokrom b* dizileri oluşturmaktaydı. Bunun nedeni *sitokrom b* genini çoğaltmak için kullanılan birçok primer çiftinin bulunmasıydı [17]. Günümüzde ise bu denge *COI* dizileri yönünde değişmiştir. Örneğin, DNA barkodlamanın en çok kullanıldığı balıklarda ve diğer sucul canlılarda *sitokrom b* dizisine ilişkin yaklaşık 3.000 türden 15.000 örneğe ilişkin kayıt bulunurken bugün *COI* dizilerinden oluşan yaklaşık 8.500 türle ilişkin 70.000'in üzerinde kayıt bulunmaktadır ve *sitokrom b* kayıtlarındaki heterojenliğin aksine tüm *COI* kayıtları genin standart bir bölgesine aittir. Ayrıca BOLD veri tabanında kayıtlı bu diziler "barkod" olarak kabul edilebilmeleri açısından belirli standartlara sahip olmaları gerektiğinden, bilinmeyen türlerin tanımlanmasında güvenilir bir temel oluşturmaktadırlar [18].

#### DNA Barkodlama İş Akışı

Barkodlama yolu ile tür tanımlanması genel olarak, incelenen örnekten elde edilen genomun standart bir kısmından elde edilmiş ve DNA barkodu adı verilen kısa DNA dizisinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Bilinmeyen tür örneklerinden elde edilen bu barkod dizileri, tanımlanması gerçekleştirilmiş ve veri tabanına kaydedilmiş barkodlar ile karşılaştırılır. Veri tabanında kayıtlı barkodlardan biri ile eşleşirse tür tanımlaması gerçekleşir. Eşleşme gerçekleşmediği takdirde, benzerlik oranlarına göre, kayıtlı türlere ilişkin yeni bir barkod kaydı olarak (haplotip veya coğrafik varyete) veya potansiyel yeni bir tür olarak değerlendirilir.

Tür seviyesinde biyosistemantik tanımlamalarda birçok gen bölgesi kullanılmış fakat DNA barkodlama için evrensel bir standart oluşturulması fikri sonucunda daha öncede belirtildiği üzere, hayvanlar için *COI* geninin 5 ucundan 655 baz çiftlik bölgesi kabul görmüştür. Bu boyda bir dizi seçilerek konvansiyonel dizileme platformlarında tek seferde güvenle okunabilecek bir barkod oluşturulmuştur. DNA'da oluşan degradasyon sonucu 655 baz çiftlik

bölgenin çoğaltılamayacağı durumlarda COI geninin daha kısa bölgeleri de (mini barkodlar) tür tanımlamada kullanılabilir [19].

Bazı araştırmacılar, türlerin tanımlanmasında alternatif lokuslardan yararlanılabileceğini savunmaktadır. Örnek olarak, toprak nematodları ve benzer gruptaki canlıların tanımlanmasında *18S rDNA* dizilerinin kullanıldığı ve "DNA taksonomisi" adı verilen bir yöntem geliştirilmiştir [20]. Fakat bu yaklaşımda, DNA barkodlamada olduğu gibi dizi analizi ile elde edilen genetik özelliğin Linnaeus taksonomisindeki türler ile eşleştirilmesi gibi bir amaç yoktur. Bu durumda da DNA taksonomisi yaklaşımı yalnızca detaylı taksonomik düzene sahip olmayan canlı gruplarında kullanılabilir olmaktadır. *COI* dizilerinin yeterli sayıda bulunmadığı durumlarda tür içerisinde ayrım yapabildiği tespit edilen veya ayrımı zor bir türün ortaya çıkarılmasında moleküler kanıt olarak kullanılabilen alternatif belirteçler de [21] kullanılmıştır. Ayrıca bitkiler gibi bazı gruplarda *COI* tür seviyesinde ayrım yapabilecek hızda evrimleşmediğinden dolayı alternatif belirteçler kullanılmaktadır [22]. DNA barkodlamasının farklı hayvan gruplarındaki etkinliğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [3, 7, 19, 21, 23]. Bu çalışmalar ile DNA barkodlaması gerçekleştirilen türlerin %95'inden fazlası için özgün bir *COI* barkod dizisi elde edilmiş ve tür seviyesinde tanımlamalar düzenli bir şekilde yürütülmüştür. İlk gerçekleştirilen barkodlama çalışmaları örneklemelerin kısıtlı bir taksonomik ve coğrafik kapsamda gerçekleştirilmesi nedeniyle eleştirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda tropikal ortamlarda bulunan türleşme bakımından zengin taksonlar [19] ve belirli taksonomik gruplardaki türlerin tamamı hedef alınarak [9] detaylı analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalardaki asıl hızlanma, araştırma kuruluşları tarafından oluşturulan uluslararası bir birlik olan ve DNA barkodlamasının tür tanımlanmasında uluslararası bir standart olmasını destekleyen CBOL (Consortium for the Barcode of Life)'un kurulması ve DNA barkodları için küresel, çevrimiçi bir veri yönetim sistemi olan BOLD'un geliştirilmesi ile mümkün olmuştur [24].

Barkodlama çalışmaları genel olarak belirli taksonomik gruplardan örneklerin elde edilmesi (mümkünse morfolojik karakterler gibi klasik taksonomik yöntemler kullanılarak tanımlanması), DNA barkod dizilerinin (*COI* geninin 655 baz çiftlik kısmı) elde edilmesi ve diğer bilgiler ile bir araya getirilerek kataloglanması şeklinde yapılmaktadır. DNA barkod verilerinin analiz aşaması ise elde edilen nükleotid dizilerinin hizalanması ile başlar. Hizalanan diziler, kontrol amacı ile kodon analizinden geçirilir ve herhangi bir delesyon, insersiyon veya stop kodon oluşumu olup olmadığı tespit edilir. Ardından Kimura 2-parameter (K2P) modeline göre genetik uzaklık matrisi oluşturulur ve karşılaştırılan diğer türler ile ilişkisi neighbor-joining (NJ) yöntemine göre çizilen ağaçlar ile gösterilerek tür içi ve türler arası sonuçları değerlendirilebilmektedir [25].

### Uygulamada Karşılaşılan Zorluklar

#### Heteroplazmi

Bilinen şekli ile mitokondriyal DNA'daki maternal kalıtım; homoplazmi (tüm hücre veya bireylerde tek tip mtDNA) ile sonuçlanır. Fakat nükleer psödogenlerin farklı çoğalmaları [26], paternal aktarımlar [27], somatik mutasyonlar [28] ve tür çaprazlamaları [29] heteroplazmiye

(tüm hücre veya bireylerde birden fazla mitokondriyal DNA'nın karışımının bulunması) neden olabilmektedir. Bilinen mitokondriyal DNA kalıtımına istisna bir örnek olarak *Mytilus edulis* türü midyeler gösterilebilir. Bu midye türlerinde heteroplazmik mitokondriyal DNA yapısına sahip homoplazmik bireyler saptanmıştır [30]. Bu saptamalar *Mytilus* türlerinde biparental kalıtımın meydana gelebilmesi hipotezi ile açıklanmaktadır [31]. *Mytilus* türlerinin barkodlarının ve diğer mitokondriyal genlerin analizinde karşılaşılan zorluğun, türler arasındaki hibridizasyon sonrasında başlayan rekombinasyondan kaynaklandığı ileri sürülmektedir [32].

#### Psödogenler

Nükleusta bulunan mitokondriyal psödogenlerin (numt; nonfunctional copies of mtDNA in the nucleus) birçok önemli ökaryotik organizma grubunda tespit edildiği bilinmektedir. Bu psödogenler korunmuş evrensel primerler kullanıldığı zaman kolaylıkla mitokondriyal DNA ile birlikte amplifiye olabilmektedirler. Bu durum, nükleusta meydana gelen nükleotid substitüsyonlarının mitokondriyal genomdakiler kadar hızlı gerçekleşmemesi nedeniyle [33] özellikle DNA barkodlama açısından sorun yaratmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda barkodlama sonuçlarının psödogenler nedeniyle yanlış değerlendirilmesinin önüne geçen analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ifade edilmektedir [34].

#### Formalin

DNA barkodlamada en sık karşılaşılan problemlerin başında doku örneklerinin pH'sı iyi ayarlanmamış formalin çözeltilerinde saklanması gelmektedir. pH dengesi ayarlanmamış formalinin hızlı asidifikasyonunun arşivlenmiş örneklerden zaten zor olan DNA ekstraksiyonunu bir kat daha zorlaştırdığı belirtilmektedir [35]. Bilinen aksine, dokuların pH dengesi ayarlanmış formalin içerisinde uzun zaman saklanması moleküler analizde kullanılmalarına bir engel oluşturmamaktadır. Formalin içerisinde saklanmış dokulardan DNA ekstraksiyonuna yönelik birçok protokol bulunmakta, dahası formalin içerisinde saklanmış zooplankton [36] ve balık [37] örneklerinden elde edilmiş DNA barkodlarına da literatürde rastlanmaktadır. Mevcut sorunun aşılmasına yönelik yeni protokoller geliştirilmekle beraber, moleküler analizde kullanılacak dokuların saklanmasında yine de en uygun yöntem olarak etanol içerisinde veya dondurularak saklanması gösterilmektedir [35].

#### Hatalı diziler

Canlıların *COI* dizilerine ilişkin kayıtların NCBI GenBank veri tabanında hızla artması sayesinde bu canlıların karşılaştırmalı tanımlanmasında kaynak oluşturacak kullanışlı ve detaylı bir kütüphane meydana gelmiş ve bu kütüphane gün geçtikçe de büyümektedir. Fakat dikkatli bir şekilde incelendiğinde GenBank veri tabanında taksonomik tanımlamanın yanlış yapıldığı, DNA dizisinin uygun bir şekilde kontrol edilmediği (dizinin yanlış hizalanması, stop kodonların oluşması, okuma çerçevesindeki insersiyon ve delesyonlar), bilinmeyen psödogenler içeren ve mikrobiyal kontaminasyonlara maruz kalmış birçok hatalı diziyeye de rastlandığı da ifade edilmektedir [8]. Bu hatalı dizilerin ancak belirli taksonların

karşılaştırmalı olarak incelenmesi ile tespit edilebildiği vurgulanmaktadır [38].

#### **Hibridizasyon**

Türler arası hibridizasyon kuşkusuz barkodlama çalışmalarında önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bilindiği gibi barkod geni olan *COI*, mitokondriyal bir gen dir ve genellikle maternal olarak aktarılır. Bu sebepten ötürü hibrit bir canlı kaçınılmaz bir şekilde ve hatalı olarak maternal türle aynı tür olarak tanımlanacaktır. Eğer tanımlaması yapılacak türün hibritleşebilen türler arasında olduğu biliniyorsa ve doğru bir tanımlama yapmak isteniyorsa mutlaka DNA barkodlama ile birlikte bilinen türe özgü nükleer DNA allelleri de analiz edilmesi önerilmektedir. Eğer örnek gerçekten hibrit ise barkodlama sonucunda maternal tür belirlenecek, nükleer DNA dizisi yardımıyla da paternal tür ortaya çıkarılacaktır. Örneğin, çok sayıda kemikli iç su balığı ve deniz balığında hibridizasyon tespit edilirken, kıkırdaklı balıklarda bugüne kadar tespit edilmiş bir hibridizasyon bulunmadığı bilinmektedir. Bunun en önemli nedeni kemikli balıklarda görülen dış dölleme yerine, kıkırdaklı balıklarda iç döllemenin gerçekleşmesidir. Buna rağmen kemikli balıklar içerisinde bile hibridizasyon, türlerin yalnızca %1'inde görülmektedir [18]. Bu duruma örnek olarak iç su balıklarından *Carassius gibelio* türünün bazı popülasyonlarında tespit edilen ginogenetik üreme gösterilebilir. Bu üreme tipinde dişiler, erkeğin spermine yumurta gelişiminin başlayabilmesi için ihtiyaç duyar fakat embriyo oluşumuna herhangi bir katkısı olmaz [39].

#### **DNA Barkodlamının Taksonomi, Filogeni ve Populasyon Genetiği ile İlişkisi**

##### **DNA barkodlama-taksonomi ilişkisi**

Taksonomik çalışmalarla birlikte yürütülen DNA barkodlamının, örneklerin tür seviyesinde tanımlanmalarında sağladığı faydalar ne kadar büyük olsa da, barkodlama hiçbir zaman kapsamlı taksonomik analizini yerini alacak bir uygulama olarak görülmemelidir. Bilinmeyen bir örnek barkod veri tabanından bir tür ile eşleşme sağlamaz ise, bu bilinmeyen örneğe ait barkod dizisi onun yeni bir tür olarak değerlendirilmesini sağlamaz. Aksine bu örnekler kapsamlı bir taksonomik analize tabi tutulurlar. Bu tanımlanamayan örneklerin klasik taksonomik yöntemler çerçevesinde değerlendirilmesi, barkodlama analizinden çok daha uzun sürse de yeni bir türün ortaya çıkarılmasında daha yüksek bir potansiyele sahiptir [19]. Detaylı olarak çalışılmamış taksonomik gruplarda gerçekleştirilen çalışmalarda, klasik taksonomik çalışma öncesinde gerçekleştirilecek DNA barkodlama çalışması ile örneklerin hızla genetik olarak farklı gruplara ayrılması sağlanabilir ve taksonomik çalışmanın iş yükü azaltılabilir. Yeni türlerin teşhisi ve tanımlanması en nihayetinde kapsamlı bir taksonomik çalışma ile gerçekleştirilse de, DNA barkodlama bu süreci belirgin bir biçimde hızlandırmakta ve kolaylaştırmaktadır. Genellikle morfolojik ve ekolojik verilerin toplanmasını da gerektiren klasik taksonomik çalışma yöntemleri, farklı taksonomik gruplara göre değişkenlik gösterirken (örneğin kuşlarla balıkların taksonomik tanımlanması farklı yöntem ve tecrübe gerektirir), barkodlama analizi çok geniş canlı

grupları için (örneğin tüm hayvan taksonları) hemen hemen standart hale getirilmiştir [40].

##### **DNA barkodlama - filogeni ilişkisi**

DNA dizisi verilerinin ışını içine girmesiyle filogenetik çalışmalarda son yirmi yılda çok önemli bir gelişme yaşanmış ve farklı canlı gruplarına yönelik geniş ölçekli projelerin sayısında artış görülmüştür. Moleküler filogeni temelli bir projede öncelikle analiz edilecek hedef grubun ölçeğinin (örneğin familya) belirlenmesi, hedef grubu temsil edecek taksonların belirlenmesi, DNA dizisi bilgilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulmasında en uygun yöntemin belirlenmesi (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian analizi vb.) gerekmektedir. Bu işlemler detaylı olarak farklı çalışmalarda anlatılmakla beraber güçlü bir şekilde desteklenebilen filogenetik ağaçların oluşturulmasında lokusların ve hedef grubu temsil edecek taksonların seçimi çok önemlidir. Kısa bir zaman öncesine kadar hedef gen seçiminde dizi analizinde sıkıntı yaratmayan özellikte dizilere sahip olan ve evrensel primerler ile çoğaltılabilen ribozomal genler tercih edilmekteydi. Fakat günümüzde, mevcut teknolojik gelişmeler ışığında daha stratejik gen seçimleri mümkün hale gelmiştir. Dolayısıyla, son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda filogenetik analizlerde farklı genomik kısımlardan (örneğin nükleus, mitokondri veya kloroplast), birden fazla lokustan, toplamda birkaç kilobaz uzunluğunda DNA dizileri elde edilmektedir. Böylece farklı taksonomik seviyelerden elde edilen filogenetik çözünürlüğün artırılması sağlanmakta [19] ve tek bir gene spesifik hataların önüne geçilebilmektedir.

Bir başka gözden kaçırılan nokta ise takson örneklemelerine, lokus seçimine gösterildiği kadar özen gösterilmemesidir. Fakat takson örneklemelerinin artırılması dal uzunluklarının kısılmasını ve homoplasi sayısının azalmasını sağlayarak doğru filogenetik ağacın oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. Aksi takdirde dal uzunlukları ve homoplaside görülecek artış, yanlış bir filogeni oluşturulması ile sonuçlanabilir [41]. Birçok araştırmacı filogeninin çözünürlüğünü artırmak için daha fazla gen eklemektense daha fazla takson eklemenin çok daha faydalı olduğunu savunmaktadır [42]. Veri setine daha fazla takson eklemek analize yardımcı olmakla beraber analizler sırasında hesaplamaya ilişkin faktörler nedeniyle analiz edilebilecek takson sayısı sınırlı olduğundan eklenecek taksonların seçimi iyice önem kazanmaktadır. Bu sınırlayıcı nedenlerden ötürü araştırmacılar, yüksek sayıda takson içeren filogenetik veri setleriyle (örneğin yüzlerce tür) çalışırken daha bulgusal ve basit analitik yöntemlerden yararlanmaktadırlar [43].

Her ne kadar barkod kütüphaneleri ile moleküler filogenetik veri setleri benzerlikler gösterebilir de (her ikisi de canlı gruplarına ilişkin DNA dizi bilgisi içermektedir), DNA barkodları genellikle evrimsel ilişkileri derinlemesine çözümleyebilecek yeterlilikte filogenetik sinyale sahip değildirler [23]. DNA barkodlama çalışmaları, filogeni oluşturma çalışmalarına takson seçiminde yardımcı olarak katkıda bulunabilmektedir. DNA barkodları hem tür tanımlamada hem de ayrımı zor veya yeni türlerin ortaya çıkarılması noktasında etkili olduğundan, kapsamlı filogenetik analiz gerektiren taksonların belirlenmesinde kullanılabilecek bir moleküler araçtır.

### DNA barkodlama - populasyon genetiği ilişkisi

Biyolojik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılan araçlar ve uygulamalar biyolojinin iki önemli dalı tarafından geliştirilmiştir. Bunlar moleküler filogenetik ve populasyon genetiğidir. Bu bilim dalları canlılar arasındaki ilişkilerin farklı seviyelerine odaklanmıştır. Moleküler filogenetik çalışmalarda genellikle canlı grupları arasındaki daha derin evrimsel ilişkiler üzerine yoğunlaşılırken, populasyon genetiği çalışmalarında tek bir türün kendi içindeki ve farklı populasyonları arasındaki varyasyon hedef alınmaktadır [43]. Bu bağlamda, DNA barkodlama türler bakımından kapsamlı bir içeriğe sahipken, birbirleriyle ilişkilerinden çok tanımlanmalarına odaklanarak iki disiplinin ortasında bir yerde kendine yer bulmaktadır.

Bilinenin aksine, DNA barkodlama tür içi genetik farklılıkların ortaya çıkarıldığı populasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta ve tür içi genetik varyasyonu tespit etmekte çok başarılı bir genetik belirteç olarak kabul edilmektedir. Özellikle balık türleri üzerinde yoğunlaşan çalışmalarda DNA barkodlamanın populasyon genetiği çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabilmesi elde edilen sonuçlar ile ortaya koyulmuştur.

Avustralya'dan toplamda 207 balık türünün COI geninin DNA dizisini analiz eden araştırmacılar [23] ortalama tür içi K2P uzaklığını %0,39 olarak hesaplamışlardır. Araştırmacılar, bu çalışmadan elde edilen sonuçların COI geninin barkodlanmasının balıklarda türlerin ve tür içi farklı populasyonların tanımlanmasında kullanılabilmesini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada [44], araştırmacılar DNA barkodlamanın etkinliğini göstermek için Kanada faunasında bulunan ve salmonlar ile mersin balıkları gibi yüksek ekonomik öneme sahip balık türlerinin de içeren yaklaşık 200 tatlı su balığında, türler arasındaki ortalama genetik uzaklığı tür içerisindeki ortalama genetik uzaklığın 27 katı olarak hesaplamış ve türler arasındaki ortalama K2P uzaklığı %8,3, tür içerisinde ise %0,3 olarak bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda DNA barkodlamanın tatlı su balık türlerinin populasyon içi genetik uzaklıklarının hesaplanmasında etkin bir biçimde kullanılabilmesini savunan araştırmacılar, oluşturulan COI kütüphanesinin populasyon genetiği, ekoloji ve sistematik alanında gerçekleştirilecek sonraki çalışmalarda kullanılabilmesini belirtmişlerdir.

Kuzey (Atlantik ve Akdeniz) ve Güney (Avustralya ve Asya) yarım küredeki denizlerden toplanan 15 balık türüne ait toplam 149 örneğin kullanıldığı bir başka çalışmada [45] örneklenen türlerden ikisinin kuzey ve güney populasyonları arasında büyük bir farklılık (FST değerleri 0,84 ve 0,86) olduğu tespit edilmiştir. Bu türlerden biri *Lepidopus caudatus* olarak bildirilmiş ve kuzey ile güney populasyonları arasında %2,75'lik bir genetik uzaklık tespit edilmiştir. İkinci tür ise *Zeus faber* olarak bildirilmiş ve kuzey ile güney populasyonları arasında %7,44'lük bir genetik uzaklık olduğu belirtilmiş ve bu iki türe ait tüm örneklerin doğru populasyonlar altında kümelendiği vurgulanmıştır.

Hint Okyanusu'nun karşı yönlerinden, hem kıyı hem açık deniz yaşamlarını temsil edecek şekilde seçilmiş 35 balık türünün populasyonları arasındaki farkı DNA barkodlama ile inceleyen araştırmacılar [46], Güney Afrika ve

Avustralya denizlerinden örneklenen kıyı balığı türlerinin önemli bir kısmında (ortalama %5,10) populasyonlar arasında derin bir farklılık olduğu tespit etmişlerdir. Çalışmada, benzer bir yapının birkaç kıyı türünde de gözlemlendiği (ortalama %0,84) fakat açık deniz türlerinde gözlemlenmediği (%0,26) belirtilmiştir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

DNA barkodlama çalışmaları günümüzde hızla artarak biyoçeşitliliğe yönelik bugüne kadar gerçekleştirilen en geniş kapsamlı genomik girişim halini almıştır. Türkiye'de ise sucul canlılar üzerinde gerçekleştirilen DNA barkodlama çalışmaları [47-52] dışında henüz bu konuda yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. COI gen bölgesi kullanılarak gerçekleştirilen birçok çalışma olmasına rağmen bu çalışmalarda standart DNA barkod bölgesi kullanılmamış veya uygun protokollere göre bir yöntem izlenilmemiş, Sadece mitokondriyal gen seçiminde belirteç olarak COI geninin herhangi bir parçası kullanılmıştır. Burada unutulmaması gereken en önemli nokta COI genine ilişkin diziler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların "DNA Barkodlama" çalışması özelliği taşıması için çalışmanın evrensel olarak belirlenen protokollere uygun şekilde yürütülmesi gerektiğidir. Ülkemizde bu alandaki çalışmaların sayısının az olmasının başlıca nedeni ise, tüm dünyada devlet ve özel sektör tarafından maddi destek sağlanan DNA barkodlama çalışmalarının ülkemizde aynı desteği bulamaması olarak görülmektedir.

Oluşturulacak COI barkod kütüphaneleri ile ileride gerçekleştirilecek biyoçeşitlilik takip ve etiketleme çalışmaları hızlı ve güvenilir bir şekilde uygulanabilecektir. Böylece, bu moleküler araç kullanılarak aşırı avcılığı yapılan veya başka tür adı altında avlanan veya satılan, tehlike altındaki türler kesin bir şekilde tanımlanarak biyoçeşitlilik yönetim çalışmaları daha etkin hale getirilebilecektir. Bir türün tehlike altında olup olmadığını tespit etmenin ilk adımının, o türün doğru olarak tanımlanması olduğu unutulmamalıdır. DNA barkodlama yaklaşımı ile canlıların yalnızca yumurtaları, larvaları, doku örnekleri ve işlenmiş parçaları kullanılarak bile tür tanımlamaları gerçekleştirilebilir, canlıların korunmasına yönelik genetik çalışmalar ortaya koyulabilir. Sistematik bir bakış açısıyla değerlendirildiğinde, COI barkodları kullanılarak belirli tanımlayıcı karakterlere sahip türlerin hızlı bir şekilde ayrımları gerçekleştirilebilir. DNA barkodlama sonrasında yapılacak ve farklı karakterlerin kullanılacağı bir taksonomik analiz ile biyoçeşitliliğin kayıt altına alınması çok daha kolay gerçekleşecektir.

Türkiye'de bulunan türlere yönelik oluşturulacak bir ulusal DNA barkod veri tabanı ile morfolojik tanımlamalarında zorluk yaşanan örnekler veya farklı yaşam evrelerindeki örnekler, çok kısa sürede ve etkin bir şekilde tür seviyesinde tanımlanabilir. Gerçekleştirilecek DNA barkodlama çalışmaları sonrasında BOLD ve GenBank veri tabanlarına kayıtları yapılacak türlerin tamamı Türkiye'den bildirilen COI barkodlarını oluşturarak bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda referans diziler olarak kullanılabilir. Ülkemizin bulunduğu coğrafya göz önüne alındığında, özellikle endemik türlerimize yönelik başlatılacak DNA barkodlama çalışmaları ile mevcut

biyoçeşitliliğimizin evrensel standartlarda kayıt altına alınması büyük önem taşımaktadır. Bu sayede mevcut biyoçeşitliliğimizin korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir referans oluşturulması sağlanabilecektir.

İnsan davranışları belirgin biçimde değişmediği takdirde 2050 yılı itibarıyla biyoçeşitlilik ve ekosistemlerde önemli değişimlerin meydana geleceği tahmin edilmektedir [53]. DNA barkodlama tekniği kullanılarak daha güvenilir biyoçeşitlilik kayıtları tutulabilir, tehlike altında olan türlerin tükenme durumları takip edilebilir ve satışa sunulan ürünlerin kontrolleri gerçekleştirilerek, biyoçeşitlilik kaynaklarının korunmasına katkıda bulunulabilir.

## KAYNAKLAR

[1] Hebert PDN, Gregory TR. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5):852-859.

[2] Arnot DE, Roper C, Bayoumi RA. 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 61:15-24.

[3] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*. 270:313-321.

[4] Aravind K, Ravikanth G, Shaanker RU, Chandrashekar K, Kumar ARV, Ganeshaiyah KN. 2007. DNA barcoding: An exercise in futility or utility? *Current Science*. 92(9):1213-1216.

[5] Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology And Biotechnology*. 3(5):294-299.

[6] Kress WJ, Erickson DL. 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*. 105(8):2761-2762.

[7] Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*. 270:96-99.

[8] Bucklin A, Steinke D, Blanco-Bercial L. 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Reviews of Marine Science*. 3:471-508.

[9] Meyer CP, Paulay G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*. 3(12):2229-2238.

[10] Shearer TL, Oppen MJ, Romano SL, Wörheide G. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*. 11:475-87.

[11] Huang D, Meier R, Todd PA, Chou LM. 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*. 66:167-174.

[12] Waugh J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays*. 29:188-197.

[13] Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R, Ikononi P. 2007. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 43:344-351.

[14] Hanner R, Gregory TR. 2007. Genomic diversity research and the role of biorepositories. *Cell Preservation Technology*. 5:93-103.

[15] Saunders GW. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1879-1888.

[16] Seifert KA, Samson RA, deWaard JR, Houbraken J, Levesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G, Hebert PDN. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 104:3901-3906.

[17] Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:6196-6200.

[18] Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal Of Fish Biology*. 74:329-356.

[19] Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN. 2006. A Minimalist Barcode Can Identify A Specimen Whose DNA Is Degraded. *Molecular Ecology Notes*. 6:959-964.

[20] Blaxter ML. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*. 359:669-679.

[21] Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN. 2006. DNA barcoding reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera, Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 103:3657-3662.

[22] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 102:8369-8374.

[23] Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1847-1857.

[24] Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*. 7:355-364.

[25] Hajibabaei M, Dewaard JR, Ivanova NV., Ratnasingham S, Dooh RT, Kirk SL, Mackie PM, Hebert PDN. 2005a. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1959-1967.

[26] Bensasson D, Zhang D, Hartl D, Hewitt G. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*. 16:314-321.

[27] Kvist L, Martens J, Nazarenko AA, Orell M. 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit

- (*Parus major*). Molecular Biology and Evolution. 20:243-247.
- [28] Moum T, Bakke I. 2001. Mitochondrial control region structure and single site heteroplasmy in the razorbill (*Alca torda*: Aves). Current Genetics. 39:198-203.
- [29] Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology. 16(18):3759-3767.
- [30] Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM. 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. Science, 251:1488-1490.
- [31] Śmietanka B, Burzyński A, Wenne R. 2009. Molecular population genetics of male and female mitochondrial genomes in European mussels *Mytilus*. Marine Biology, 156:913-925.
- [32] Riginos C, Henzler C. 2008. Patterns of mtDNA diversity in North Atlantic populations of the mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology. 155:399-412.
- [33] Brown WM, George M, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76:1967-1971.
- [34] Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proceedings Of The National Academy Of Sciences. 105(36):13486-13491.
- [35] Tang EPY. 2006. Path to Effective Recovering of DNA from Formalin-Fixed Biological Samples in Natural History Collections: Workshop Summary. National Academies Press, 70 p. Washington, United States of America.
- [36] Kirby RR, Lindley JA. 2005. Molecular analysis of Continuous Plankton Recorder samples, an examination of echinoderm larvae in the North Sea. Journal of The Marine Biological Association of the United Kingdom. 85:451-459.
- [37] Zhang J. 2010. Exploiting formalin-preserved fish specimens for resources of DNA barcoding. Molecular Ecology Resources. 10(6):935-41.
- [38] Buhay JE. 2009. "COI-like" Sequences are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. Journal of Crustacean Biology. 29(1):96-110.
- [39] Saat T. 1990. Morphology and chronology of maturation in oocytes of diploid and triploid forms of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch *in vitro*. Soviet Journal of Developmental Biology. 20:267-276.
- [40] Hajibabaei M, Singer GAC, Clare EL, Hebert PDN. 2007b. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. BMC Biology. 5:24.
- [41] Kolaczowski B, Thornton JW. 2004. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. Nature. 431:980-984.
- [42] Zwickl DJ, Hillis DM. 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. Systematic Biology. 51:588-598.
- [43] Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA. 2007a. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends In Genetics. 23(4):167-172.
- [44] Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burrige M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L. 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. PLoS ONE. 3(6):2490.
- [45] Ward RD, Costa FO, Holmes BH, Steinke D. 2008. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. Aquatic Biology. 3:71-78.
- [46] Zemlak TS, Ward RD, Connell AD, Holmes BH, Hebert PDN. 2009. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. Molecular Ecology Resources. 9(1):237-242.
- [47] Keskin E, Atar HH. 2011a. Genetic divergence of *Octopus vulgaris* species in the eastern Mediterranean. Biochemical Systematics and Ecology. 39:277-282.
- [48] Keskin E, Atar HH. 2011b. İşlenmiş Kalamar Ürünlerinde Sitokrom Oksidaz I Gen Dizileri Kullanılarak Tür Tayini. GIDA. 36(6):343-348.
- [49] Keskin E, Atar HH. 2011c. DNA barcoding approach in diversification of species from genus *Loligo*. Current Opinion in Biotechnology. 22(S1):52.
- [50] Keskin E, Atar HH. 2012. Molecular Identification of Fish Species from Surimi Based Products Labeled as Alaska Pollock. Journal of Applied Ichthyology. 28:811-814.
- [51] Keskin E, Atar HH. 2012. Genetic Structuring of European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) Populations through Mitochondrial DNA Sequences. GDNA Mitochondrial DNA. 23(2):62-69.
- [52] Keskin E, Atar HH. 2012. Türkiye'nin Akdeniz Kıyısındaki Mavi Yengeç (*Callinectes sapidus*) Populasyonları Arasındaki Genetik Farklılığın COI Gen Dizileri Kullanılarak Değerlendirilmesi. Journal of Fisheries Sciences. 6(2):125-131.
- [53] Jenkins M. 2003. Prospects for biodiversity. Science. 302:1175-1177.