



Türkiye'deki Fırat nehri drenajından *Oxynoemacheilus* (Teleostei: Nemacheilidae) türlerinin COI-barkod bölgesine dayalı genetik tanımlaması ve filogenetik ilişkileri^[*]

Hande RAKICI¹ İsmail AKSU² Yusuf BEKTAŞ^{3*}

¹ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize, Türkiye.

² Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize, Türkiye.

³ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize, Türkiye

Geliş/Received: 02.08.2020

Kabul/Accepted: 14.09.2020

Atf yapmak için: Rakıcı, H., Aksu, İ. & Bektas, Y. (2020). Türkiye'deki Fırat nehri drenajından *Oxynoemacheilus* (Teleostei: Nemacheilidae) türlerinin COI-barkod bölgesine dayalı genetik tanımlaması ve filogenetik ilişkileri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(3), 408-418.

How to cite: Rakıcı, H., Aksu, İ. & Bektas, Y. (2020). Genetic identification and phylogenetic relations of *Oxynoemacheilus* species (Teleostei: Nemacheilidae) from drainage of Euphrates in Turkey based on COI-barcode region. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(3), 408-418.

<https://orcid.org/0000-0003-3124-0173>
 <https://orcid.org/0000-0002-2104-9888>
 <https://orcid.org/0000-0002-8367-9746>

***Sorumlu yazarın:**

Yusuf BEKTAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize, Türkiye.

yusuf.bektas.tr@gmail.com

Cep telefonu : +90 (505) 456 04 23

Telefon : +90 (464) 223 40 93 / 1833

Faks : +90 464 223 40 19

Öz: Bu çalışmada, DNA barkodlama tekniği ile Türkiye'nin Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* türlerini güvenilir bir şekilde tanımlama yeteneği araştırılmıştır. *Oxynoemacheilus* genusunu temsilen 6 türe ait 167 bireyi barkodlamak için mitokondri sitokrom c oksidaz altınite I' in (COI) barkod bölgesi (627 bp) kullanıldı. Kimura 2 parametresine dayalı olarak (K2P), maksimum tür içi ve minimum türlerarası genetik mesafeleri sırasıyla % 0,59 ve % 1,62'dir. En yakın komşu türler arası mesafeler, ortalama tür içi mesafeden 7 kat daha yüksektir ve belirgin bir DNA barkod aralığı fark edilmiştir. Filogeni tabanlı DNA barkodlama başarısı testine göre komşu-birleştirme fenogramları K2P modeli kullanılarak 1000 seç-bağla replikasyonu ile üretildi ve örneklerin tümünün türlerin taksonomik durumları ile uyumlu olarak kümelendiği belirlenmiştir. MP ve ML filogenileri, Doğu ve Batı Anadolu gruplarına karşılık gelen iki klad içeren bir ortak ağaç topolojisi gösterdi. Bu çalışmanın sonuçları, COI geninin yaklaşık % 81 başarı oranıyla *Oxynoemacheilus* türlerinin belirlenmesi ve sınırlandırılması için uygun bir DNA barkod belirleyicisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: COI, DNA barkodlama, endemizm, taş ısran balığı, Türkiye.

Genetic identification and phylogenetic relations of *Oxynoemacheilus* species (Teleostei: Nemacheilidae) from drainage of Euphrates in Turkey based on COI-barcode region

***Corresponding author's:**

Yusuf BEKTAŞ

Molecular Biology, Department of Biology Faculty of Arts and Sciences RTE University 53100 Rize, Turkey

yusuf.bektas.tr@gmail.com

Mobile telephone : +90 (505) 456 04 23

Telephone : +90 (464) 223 40 93/1833

Fax : +90 464 223 40 19

Abstract: The present study investigated the ability of DNA barcoding to reliably identify *Oxynoemacheilus* species in Euphrates River basin of Turkey, known as biodiversity hotspots. The barcode region (627 bp) of the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) were used to barcode 167 individuals belonging to six *Oxynoemacheilus* species. Based on Kimura two-parameter (K2P), the intraspecific diversity and minimum interspecific genetic distance were 0.59% and 1.62% respectively. Nearest neighbor distance was 7-fold higher than maximum intra-specific distance on average and a distinct DNA barcoding gap was observed. According to the phylogeny-based succes test neighbour-joining phenograms were generated with 1000 bootstrap replications using the K2P model and all the specimens clustered in concurrence with the taxonomic status of the species. The MP and ML phylogenies indicated a consensus tree topology containing two clades corresponding to the geographical origins: Western and Eastern Anatolia groups. The results of present study indicated that the COI gene could be a suitable DNA barcode marker for the *Oxynoemacheilus* species identification and delimitation with approximately 81% success rate.

Keywords: COI, DNA Barcoding, endemism, Spined loach, Turkey.

[*] ,Bu çalışma, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis.

GİRİŞ

Nemacheilidae familyasına ait çöpçü veya taş kesen balığı olarak bilinen türler Asya ve adaları, Avrupa ve Kuzeydoğu Afrika'nın tatlı sularında yayılış gösteren küçük balıklardır. Nemacheilidae, yaklaşık olarak 48 genus ve 661'den fazla türe sahiptir (Nelson vd., 2016). Bu familyaya ait türler çok dar ekolojik toleransa sahiptirler. Türkiye'nin neredeyse bütün akarsularında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* generusu 26'sı bölgeye endemik toplam 42 tür ile büyük bir çeşitlilik sergilemektedir (Freyhof vd., 2019; Sungur vd., 2020; Turan vd., 2019)

İnsanoğlunun besin diyetindeki protein, vitamin ve mineral ihtiyacının karşılanması bakımından önemli bileşenlerden biri olan balık türlerinin tanımlanması, biyoçeşitliliğin tespiti, takibi ve gerekli ise koruma stratejilerinin geliştirilmesi gibi hayati yaklaşımlara temel oluşturur (Dayrat, 2005). Balık türlerinin teşhisi temel de morfometrik ve meristik karakterlere dayanır (Strauss & Bond, 1990). Morfolojik yaklaşımların egemen olduğu tür tayini çalışmaları, genellikle türlerin cinsiyet ve yaşam evrelerine bağlı olmaları, farklı türler arasındaki yüksek morfolojik benzerlik ve farklı türlerin benzer yaşam koşullarına maruz kaldığında fenotipik benzerlik göstermeleri gibi olası olumsuzluklar ile sınırlıdır. Zira, balıkların %40'ı gibi yüksek oranda tür düzeyinde tanımlanamadığı tahmin edilmektedir (Leonart vd., 2006). DNA metodlarının kullanımı böyle problemleri önleyebilir (Hebert & Gregory, 2005). Bu nedenle, tür tanımlama sürecini hassas, hızlı, evrensel bir zemine oturtmak için özgün DNA dizilerinin kullanıldığı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Hebert vd., 2003a). Bu moleküler yöntemler arasında tür tanımlamanın hızlı ve etkili bir yolu olan DNA barkodlama tekniğine (Kress vd., 2005) konu olan mtDNA sitokrom c oksidaz 1 (COI) geninin 5' ucundaki yaklaşık 650 bp'lik kısa bir bölge tür içinde varyasyon göstermediği halde türler arasında belirgin bir ayrım sağladığı ve iki yönlü dizilemede tek bir primer çifti ile kolayca üretilebildiği için tüm hayvanlar için pratik ve standartlaştırılmış ideal bir DNA barkodu olarak nitelendirilir (Hebert vd., 2003b; Hebert & Gregory, 2005). "FISH-Barcode of Life" projesi tahmini olarak 30,000 balık türünün teşhisi ve evrensel DNA barkod veritabanını hedefleyerek 2005 yılında başlatılmıştır. Günümüze dek, bu türlerin sadece dörtte biri barkodlanmıştır. DNA barkodlama sonuçları gösteriyor ki DNA barkod bölgesi yardımıyla tür teşhisi balıklarda son derece başarılıdır ve genetik teşhis metodları ile denizel veya tatlı su balıklarının sırasıyla %93 ila %98'ini ayırabilmektedir (Ward vd., 2009). Öyleki barkod bölgesi kullanılarak dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki büyük nehir sistemleri (Ardura vd., 2010) ve birçok gölün balık faunası (Aquilino vd., 2011; Triantafyllidis vd., 2011) özel olarak çalışılmıştır.

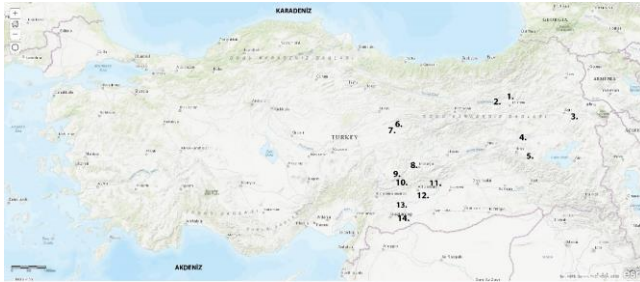
Jouladeh-Roudbar vd., (2016) yapmış oldukları çalışmada, yeni bir *Nemacheilidae* türü olan *Oxynoemacheilus freyhofii* tanımladılar ve COI'ye dayalı K2P ile % 4,5 ile *O. argyrogramma*'dan ve % 12,9 ile *O. bergianus*'dan ayrıldığını gösterdiler. Sayyadzadeh vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada, İran Sirvan Nehri drenajı yan kollarından yeni tür *Oxynoemacheilus parvinae*'nin en yakın türlerden (*O. bergianus* ve *O. longipinnis*) mtDNA COI barkod bölgesindeki iki yerleşik nükleotit baz değişimi ve en yakın komşusu *O. longipinnis* ile % 1,4'lük ile K2P mesafesi ile teşhis edilmiştir. COI barkod bölgesine dayalı olarak yeniden yapılandırılmış maksimum olasılık ve Bayesian filogenisi, dizilenmiş Nemacheilid balıkları % 1,4 (*O. parvinae* - *O. longipinnis*) ile % 16,3 (*O. longipinnis* - *O. merga*) arasında K2P dizisi ayrışması sergileyen monofiletik bir klada yerleştirmiştir. Freyhof ve Geiger (2017) yapmış oldukları çalışmada, Dicle Nehri'nin bir kolu olan Küçük Zab Nehri drenajından yeni bir tür olarak *Oxynoemacheilus zarzianus* tanımladılar. Fırat ve Dicle drenajındaki *Oxynoemacheilus* tür çeşitliliği olağanüstü yüksek olduğu ve günümüzde tüm Fırat ve Dicle drenajlarından 22, sadece Dicle drenajından 15 tür bilindiğini rapor ettiler. Turan, vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada, bir moleküler marker (COI), 25 morfometrik ve dört meristik karakterin analizi ile Karadeniz havzasındaki diğer türler olan *O. banarescui*, *O. samanticus* ve *O. angorae* 'den ayrılan Doğu Karadeniz havzasındaki Çoruh Drenajından yeni bir tür olarak *Oxynoemacheilus cemali* 'yi tanımladılar. *Oxynoemacheilus cemali*, Karadeniz havzasının dışında da dağılım gösteren yakın ilişkili diğer türler *O. araxensis* ve *O. cyri* 'den COI barkod bölgesindeki sırasıyla 15 ve 31 tanısal nükleotit baz farklılığı ile ayırt edilebildiğini bildirmiştir. Moleküler veriler, *Oxynoemacheilus cilicicus*'un mtDNA COI barkod bölgesinde *O. panthera*'dan 22 değişken nükleotid değişimi ve minimum % 4.09'lik K2P mesafesi ile ayrıldığını göstermektedir (Kaya vd., 2020).

Fırat drenajındaki *Oxynoemacheilus*'un tür çeşitliliği sadece Erk'akan vd. (2007), Erk'akan vd. (2008) ve Fırat drenajından sekiz türü tanımlayan Freyhof ve Özuluğ (2017) (*O. araxensis*, *O. argyrogramma*, *O. bergianus*, *O. erdali*, *O. euphraticus*, *O. kaynakı*, *O. paucilepis* ve *O. samanticus*) tarafından çalışılmıştır. Bu türlerden ikisi (*O. bergianus* ve *O. euphraticus*) Dicle faunası ile paylaşılmaktadır. COI sekanslarına dayalı olarak Fırat nehrinde bulunan *Oxynoemacheilus* generusu geniş dağılıma sahip az sayıda tür ile temsil edildiğini, Fırat türlerinin monofilik bir grup oluşturmadığını belirlediler ve Fırat nehir havzasındaki Muş (*Oxynoemacheilus arsaniasus*) ve Murat nehirlerinden (*Oxynoemacheilus mueftii*) iki yeni tür tanımladılar. Fırat'a endemik olan *O.*

kaynaki; Van Gölü havzasına endemik olan *O. ercisianus* ve Hazar Gölü için endemik olan *O. hazarensis*'in yanısıra Fırat drenajından ilk defa *O. tigris*'i bildirdiler. Fırat nehriindeki *Oxynoemacheilus* populasyonları üzerine yapılmış olan eş zamanlı moleküler teşhis ve taksonomi çalışmasına rağmen hala bazı *Oxynoemacheilus* populasyonları tanımlanmamıştır. Bu çalışma ile Türkiye'nin Fırat nehir havzasındaki çalışılmayan *Oxynoemacheilus* populasyonlarının genetik teşhisi, mitokondri DNA COI dizilerine dayalı olarak DNA barkodlarının oluşturulması ve *Oxynoemacheilus* türlerinin filogenetik ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Örnekleme: *Oxynoemacheilus* genusundan altı türe ait örnekler, ülkemizde Fırat nehri ve kollarından biyolojik ve ekolojik özellikleri dikkate alınarak her bir türü temsil edecek sayıda olacak şekilde yeterli sayıda *Oxynoemacheilus* bireyi elektroşoker cihazı kullanılarak Anadolu'nun doğusunda yer alan Erzurum, Ağrı, Malatya, Muş, Sivas, Gaziantep ve Adıyaman illerini kapsayacak şekilde toplamda 14 farklı lokasyondan toplandı (Şekil 1).



Şekil 1. Örnekleme alanını ve konumları gösteren harita.
Figure 1. Map showing sampling area and locations.

Arazi çalışmaları kapsamında toplamda 167 birey örneklendi. Her bir *Oxynoemacheilus* türüne ait birey sayıları, lokasyonların isimleri ve koordinatları Tablo 1 'de verilmiştir. Örneklenen bireyler tür tayin anahtarına göre teşhis edilerek fotoğrafları çekilip etiketlendi. Her bir *Oxynoemacheilus* bireyinden 25-50 mg yüzgeç dokusu alınarak % 96'lık etil alkolde fikse edildi ve çalışmanın yapılacağı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Genetik Laboratuvarına transfer edildi.

Total DNA Eldesi, PZR ve DNA Dizini Analizi:

Oxynoemacheilus örneklerinin 25 mg yüzgeç dokusundan total DNA eldesi, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) protokolüne göre yapıldı. İzole edilen DNA kısa süreli muhafaza için 2-8 °C'de, uzun süreli muhafaza için ise -20 °C'de saklandı. Elde DNA'lardan mitokondriyal DNA'ya ait sitokrom oksidaz alt ünite I geninin barkod (mtDNA COI-Barkod) bölgesinin kopyalanması için Polimeraz Zincir Reaksiyonunda gerekli kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 2 'de

verilmiştir. MtDNA COI-Barkod geni için FishF1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' ve FishR1: 5'-TAGACTTC TGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward vd., 2005) primerlerinin kullanılarak T100™ PCR Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA) cihazında Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR döngüsü ilk zincir ayrılması için 94 °C'de 4 dakika, 35 döngü şeklinde zincir ayrılması 94 °C'de 30 saniye, primer bağlanması için 61 °C'de 30 saniye, zincir uzaması için 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü ve 72'de 1 dakika son zincir uzaması şeklinde gerçekleştirildi.

Tablo 1. *Oxynoemacheilus* genusuna ait türlerin toplandığı istasyonlar, koordinatları ve örnek sayıları (N).

Table 1. Locations, coordinates and sample numbers (N) for sampling of species belonging to the genus *Oxynoemacheilus*.

	Türler ve Lokasyonlar	Koordinatlar	N
<i>Oxynoemacheilus araxensis</i>			
1	Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	39°55'28,7"K 41°07'17,1"D	10
2	Baş Çayı, Çay Köyü, Aşkale, Erzurum	39°56'45,0"K 40°48'03,0"D	10
<i>Oxynoemacheilus bergianus</i>			
1	Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	39°55'28,7"K 41°07'17,1"D	4
2	Baş Çayı, Çay Köyü, Aşkale, Erzurum	39°56'45,0"K 40°48'03,0"D	4
3	Murat Nehri, Ballıbostan Köyü, Ağrı	39°40'46,8"K 43°11'34,2"D	5
6	Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	39°16'02,0"K 37°28'29,3"D	5
9	Söğütlüçay Deresi, Malatya	38°45'58,8"K 38°28'32,9"D	5
10	Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	37°50'21,4"K 37°40'35,8"D	11
<i>Oxynoemacheilus euphraticus</i>			
4	Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	39°04'26,9"K 41°31'10,5"D	5
5	Karasu Çayı, Hasköy, Muş	38°41'34,1"K 41°42'51,3"D	5
6	Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	39°16'02,0"K 37°28'29,3"D	7
8	Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	38°20'49,9"K 38°04'25,5"D	5
10	Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	37°50'21,4"K 37°40'35,8"D	5
11	Kahta Çayı, Kocahisar Köyü, Adıyaman	37°57'48,9"K 38°39'44,7"D	5
<i>Oxynoemacheilus paucilepis</i>			
7	Bahklitohma Çayı, Kocakurt Köyü, Sivas	39°08'39,8"K 37°15'27,2"D	20
<i>Oxynoemacheilus kaynakı</i>			
4	Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	39°04'26,9"K 41°31'10,5"D	15
6	Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	39°16'02,0"K 37°28'29,3"D	6
8	Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	38°20'49,9"K 38°04'25,5"D	8
10	Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	37°50'21,4"K 37°40'35,8"D	14
<i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i>			
12	Karasu Çayı, Araban, Gaziantep	37°24'23,6"K 37°41'12,9"D	8
13	Merziman deresi, Yavuzeli, Gaziantep	37°19'40,5"K 37°40'04,2"D	5
14	Nizip Çayı, Kaleköy, Gaziantep	36°56'56,9"K 37°50'22,2"D	5
Toplam			167

Total DNA ve PZR ürünlerinin varlığı ve büyüklüğünün tespiti için % 0,8 ve 1,2'lik etidyum bromür ile boyanmış 1X TAE-Agaroz karışımı hazırlandı. 1X TAE tamponunu içeren elektroforez kuvvetinde 100 voltta 15

dakika elektrik alana maruz bırakıldı. Örneklerin yürütüldüğü agaroz jelin görüntülenmesi işlemi Quantum-Capt ST4 sistem (Vilber Lourmat, France)'deki ultraviyole transillüminatör cihazında gerçekleştirildi. Total DNA ve PZR ürünlerinin konsantrasyonu, saflığı ve kalitesi Nanodrop 2000C model spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) cihazında belirlendi. Bütün işlemler tamamlandıktan sonra istenilen konsantrasyon ve büyüklükte olduğu tespit edilen PZR ürünleri DNA dizin analizi işlemine kadar -20 °C de muhafaza edildi. *Oxynoemacheilus* türlerine ait mtDNA COI-Barkod geninden kopyalanan PZR ürünlerinin dizin analizleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) kullanarak ABI PRISM 3730x1 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) ile MacroGen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'de gerçekleştirildi.

Tablo 2. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Table 2. Chemicals used in polymerase chain reaction (PCR) and their quantities.

Kimyasallar	Konsantrasyon	COI-Barkod
10X PZR tamponu		5µl
dNTP karışımı	10 mM	6µl
MgCl ₂	25 mM	5µl
Primerler*	10 pmol	1µl+1µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.2µl
Total DNA	50 (ng/ml)	3µl
ddH ₂ O		28,8µl
Toplam		50µl

Barkodlama Aralığı ve Tür Sınırlaması: Bu çalışmada, COI veri setine dayalı olarak Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* türlerinin doğru tanımlanması yani COI'nin barkodlama etkinliğini test etmek için mesafeye dayalı yöntemlerden R (R Development Core Team 2012) programı altında DNA barkodlama paketi Spider v. 1.1-5 (Brown vd., 2012)'a özgü "threshID" işlevi kullanılmıştır. Dizin benzerliği yöntemi, TaxonDNA/Species Identifier 1.8 programı ile barkod bölgesinin tür tanımlama potansiyeli "En İyi Eşleşme" (BCM) testleri (Meier vd., 2006) ile belirlenen doğru kimliklerin yüzdesi hesaplanarak değerlendirildi. En uygun eşik değerini seçmek için bir eşik değeri aralığı (% 0,1'lik artışlarla %0,1-4) için yanlış-pozitif ve yanlış-negatif hataları en aza indiren eşik optimizasyon prosedürü kullanılmıştır. Filogeni tabanlı DNA barkodlama ve tür sınırlandırılması için, COI barkod bölgesinin NJ ağaçları Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi MEGA X'de morfolojik olarak da ayırt edilebilen 6 *Oxynoemacheilus* türü için genetik mesafeler kullanılarak oluşturuldu. NJ filogramında, tür monofilisi testi monofiletik türlerin doğru tanımlandığı kabul edilmesi şeklinde gerçekleştirildi. Hebert vd., (2004) "barkod boşluğunu" ortalama intraspesifik genetik mesafeden en az 10 kat daha büyük ortalama özel bir mesafenin varlığı olarak tanımlamıştır. Bu nedenle, bu

çalışmada barkod aralığı analizinde K2P modelleri türleri sınırlandırmak için de kullanılmıştır.

Dizi Hizalama ve Filogenetik Analiz: MtDNA COI-Barkod geni dizin analizi sonucunda elde edilen ham verileri filogenetik analizlerde kullanılmak üzere uygun hale getirmek için Bioedit versiyon 7.0.0 (Hall, 1999) programı kullanıldı. Haplotiplerin sayısı, haplotip çeşitlilik ve nükleotit çeşitlilik değerlerinin belirlenmesi işlemleri DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişkiler, tür içi ve türler arası genetik varyasyon ve polimorfizmin tüm ölçümleri MEGA versiyon X (Kumar vd., 2018) tarafından hesaplandı. Yaşam Barkodu Konsorsiyumu (CBOL) tarafından genetik mesafenin hesaplanması için önerilen Kimura-2 parametresi modeli (Kimura, 1980; Shen vd., 2016) kullanılarak *Oxynoemacheilus* türleri içindeki ve türler arasındaki genetik mesafe hesaplandı. En uygun evrimsel metodun tespitinin yapılabilmesi için Akaike Bilgi Kriteri (AIC) jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) programı yardımıyla belirlendi. Program tarafından seçilen en uygun baz değişim modeli (TIM1+G) ile maksimum olasılık (ML: Maximum Likelihood) metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçlar 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi ile analizlenmiştir. Komşu katılım (NJ: Neighbour-Joining) metoduna göre inşa edilen filogenetik ağaçlar Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla (Bootstrap) testi ile analizlenmiştir. Maksimum tutumluluk (MP: Maximum Parsimony) analizleri buluşsal metoda göre 10 rasgele ilave kopya, TBR (Tree-bisection-reconnection) yöntemi ve 100 tekrarlı seç-bağla testi ile analizlenmiştir. Tüm filogenetik analizler için *Seminemacheilus lendlii* (GenBank erişim numarası: KP163989) ve *Barbatula barbatula* (GenBank erişim numarası: MF172074) dış grup olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Genetik Çeşitlilik: *Oxynoemacheilus* türlerine ait mtDNA COI-Barkod geninin 627 bc'lik dizin analizi, Anadolu'da Fırat nehrinde dağılım gösteren ve toplam 14 farklı lokasyondan örneklenen 167 birey için gerçekleştirildi (Tablo 1). Barkod bölgesindeki nükleotitlerin yüzde frekanslarının T (29,4), C (27,9), A (21,9) ve G (20,8) olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan türler için COI-Barkod nükleotit dizisinin 495'inin korunmuş (% 78,9), 132'sinin değişken (% 21,1) ve 96'sının (% 15,3) parsimonik bilgi verici olduğu ve polimorfik nükleotit pozisyonları için transisyon/transversiyon oranınının 3,96 olduğu belirlenmiştir. Mitokondri COI-Barkod geni dizinleri arasında yapılan haplotip analizi sonucu *O. euphraticus* için 1, *O. argyrogramma* için 2, *O. kaynakı* için 4, *O. araxensis* için 1, *O. paucilepis* için 1 ve *O.*

bergianus için 3 olmak üzere toplamda 12 adet haplotip (Tablo 3) belirlenmiştir. *Oxynoemacheilus* genusunun Fırat nehrinde dağılım gösteren türleriyle genetik çeşitlilik yönünden yapılan analizlerde *O. euphraticus*, *O. araxensis* ve *O. paucilepis* düşük haplotip ve nükleotid çeşitlilik göstermiştir (Hd= 0,000 ve Pi= 0,000; Tablo 3). En yüksek haplotip çeşitlilik *O. kaynakı* (Hd= 0,735)'de görülürken, nükleotid çeşitliliğin en yüksek *O. bergianus* (Pi= 0,005) türünde olduğu belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. *Oxynoemacheilus* genusuna ait türlerin örnek sayıları (N), haplotip kodları (H), haplotip sayıları (Hs), haplotip çeşitlilik (Hd) ve nükleotid çeşitlilik (Pi) değerleri.

Türler ve Lokasyonlar	N	H	Hs	Hd	Pi
<i>Oxynoemacheilus euphraticus</i>					
Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	7	H1			
Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	5	H1			
Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	5	H1			
Karasu Çayı, Hasköy, Muş	5	H1			
Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	5	H1			
Kahta Çayı, Kocahisar Köyü, Adıyaman	5	H1			
	32		1	0,000	0,000
<i>Oxynoemacheilus argyrogramma</i>					
Merzimen deresi, Yavuzeli, Gaziantep	5	H2			
Nizip Çayı, Kaleköy, Gaziantep	5	H3			
Karasu Çayı, Araban, Gaziantep	8	H3			
	18		2	0,425	0,001
<i>Oxynoemacheilus kaynakı</i>					
Sultansuyu Çayı, Kuşdoğan Köyü, Malatya	8	H4			
Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	6	H5			
Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	14	H6			
Murat Nehri, Akkonak Köyü, Varto, Muş	15	H7			
	43		4	0,735	0,004
<i>Oxynoemacheilus araxensis</i>					
Baş Çayı, Çay Köyü, Aşkale, Erzurum	10	H8			
Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	10	H8			
	20		1	0,000	0,000
<i>Oxynoemacheilus paucilepis</i>					
Bahkilitohma Çayı, Kocakurt Köyü, Sivas	20	H9	1	0,000	0,000
<i>Oxynoemacheilus bergianus</i>					
Baş Çayı, Çay Köyü, Aşkale, Erzurum	4	H10			
Ağarcık Çayı, Ilıca, Erzurum	4	H10			
Murat Nehri, Ballıbostan Köyü, Ağrı	5	H11			
Söğütluçay Deresi, Malatya	5	H11			
Göksu Çayı, Aktoprak Köyü, Adıyaman	11	H12			
Kangal Çayı, Mürsel Köyü, Sivas	5	H12			
	34		3	0,656	0,005

Tablo 4. *Oxynoemacheilus* genusuna ait tür içi ve türler arasındaki ikili dizin farklılığı değerleri.

Table 4. Pairwise genetic distances values for intra-inter species of the *Oxynoemacheilus* genus.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1 <i>O. euphraticus</i>	0,000																									
2 <i>O. kentrutensis</i>	0,032	0,000																								
3 <i>O. argyrogramma</i>	0,037	0,045	0,000																							
4 <i>O. araxensis</i>	0,067	0,071	0,081	0,000																						
5 <i>O. hazarensis</i>	0,068	0,070	0,072	0,082	0,001																					
6 <i>O. cyri</i>	0,071	0,082	0,082	0,044	0,090	0,000																				
7 <i>O. kaynakı</i>	0,071	0,077	0,072	0,092	0,049	0,084	0,004																			
8 <i>O. cemali</i>	0,074	0,075	0,080	0,030	0,087	0,055	0,086	0,001																		
9 <i>O. ceyhanensis</i>	0,078	0,097	0,099	0,086	0,077	0,095	0,076	0,091	0,000																	
10 <i>O. ercisiensis</i>	0,078	0,086	0,083	0,101	0,059	0,091	0,020	0,094	0,088	0,001																
11 <i>O. seyhanensis</i>	0,096	0,105	0,110	0,087	0,110	0,082	0,116	0,096	0,117	0,120	0,001															
12 <i>O. cinicus</i>	0,097	0,103	0,105	0,089	0,102	0,091	0,096	0,098	0,107	0,102	0,071	0,003														
13 <i>O. anaticus</i>	0,097	0,095	0,109	0,084	0,110	0,090	0,100	0,097	0,111	0,106	0,060	0,018	0,001													
14 <i>O. mediterraneus</i>	0,098	0,104	0,102	0,091	0,109	0,097	0,098	0,104	0,120	0,106	0,064	0,033	0,035	0,000												
15 <i>O. paucilepis</i>	0,101	0,093	0,103	0,091	0,112	0,102	0,109	0,092	0,108	0,116	0,103	0,114	0,107	0,106	0,000											
16 <i>O. evreni</i>	0,104	0,113	0,100	0,094	0,106	0,093	0,101	0,083	0,109	0,114	0,075	0,087	0,085	0,088	0,103	0,001										
17 <i>O. eregliensis</i>	0,107	0,103	0,106	0,092	0,107	0,100	0,116	0,092	0,128	0,127	0,088	0,085	0,077	0,085	0,125	0,086	0,000									
18 <i>O. atili</i>	0,107	0,108	0,102	0,098	0,114	0,104	0,118	0,102	0,137	0,133	0,081	0,089	0,077	0,082	0,123	0,086	0,016	0,000								
19 <i>O. hamvii</i>	0,110	0,117	0,122	0,105	0,117	0,102	0,119	0,110	0,131	0,123	0,078	0,093	0,087	0,087	0,127	0,057	0,107	0,092	0,002							
20 <i>O. simavicus</i>	0,112	0,114	0,121	0,106	0,118	0,089	0,119	0,115	0,115	0,123	0,059	0,082	0,080	0,083	0,118	0,094	0,100	0,110	0,100	0,000						
21 <i>O. phoxinoides</i>	0,116	0,115	0,108	0,093	0,113	0,093	0,108	0,102	0,111	0,116	0,065	0,040	0,044	0,034	0,117	0,085	0,078	0,077	0,084	0,089	0,005					
22 <i>O. samanticus</i>	0,118	0,118	0,119	0,108	0,116	0,091	0,119	0,117	0,123	0,120	0,056	0,083	0,076	0,075	0,112	0,077	0,097	0,099	0,093	0,034	0,075	0,000				
23 <i>O. seyhanicola</i>	0,119	0,127	0,123	0,102	0,125	0,098	0,118	0,106	0,126	0,123	0,075	0,101	0,099	0,086	0,117	0,049	0,104	0,097	0,060	0,101	0,087	0,086	0,004			
24 <i>O. banarescui</i>	0,119	0,119	0,119	0,113	0,117	0,099	0,118	0,120	0,112	0,126	0,058	0,084	0,077	0,076	0,117	0,080	0,097	0,103	0,097	0,031	0,075	0,025	0,092	0,001		
25 <i>O. bergianus</i>	0,128	0,124	0,130	0,116	0,126	0,104	0,127	0,128	0,125	0,131	0,066	0,094	0,088	0,087	0,111	0,088	0,108	0,111	0,098	0,043	0,082	0,024	0,091	0,032	0,005	

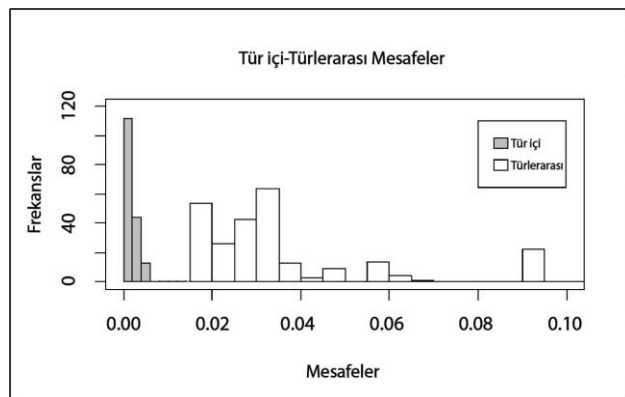
Çalışma kapsamında örneklenen bireylerden elde edilen COI dizileri ayrıca GenBank'taki Anadolu'dan verilmiş olan dizilerle karşılaştırıldı (Şekil 3-5). Bu karşılaştırmalar Fırat havzasındaki 6 tür için yakın bir eşleşme göstermiştir ve morfolojik çalışmalar yoluyla ayırt etmenin zor olduğu bu bireyler genetik açıdan tam olarak tanımlanmıştır. Dizin benzerliği yöntemi, TaxonDNA/Species Identifier 1.8 programı ile COI-barkod bölgesinin tür tanımlama potansiyeli " En İyi Eşleşme" (BCM) testlerine (Meier vd., 2006) dayalı olarak türlerin doğru tanımlanma oranının oldukça yüksek olduğu (BCM: %100) belirlenmiştir. Monofili tabanlı tür sınırlama

metodu kullanan COI barkod bölgesinin komşu birleştirme ağaçları Kimura 2-parameter (K2P) mesafe modeline göre 1000 Seç-bağla testi MEGA X'de morfolojik olarak da ayırt edilebilen 6 *Oxyoemacheilus* türü için düzeltilmemiş genetik mesafeler kullanılarak oluşturuldu. NJ filogramında, tür monofilisi testi monofiletik türlerin doğru tanımlanmış olarak kabul edilmesi şeklinde gerçekleştirildi. Yirmi altı *Oxyoemacheilus* türünün veri setine dayalı olarak türlerarası ortalama genetik mesafe (%3,6) ile tür içi ortalama genetik varyasyon (%0,45) arasında yaklaşık 7 katlık bir sekans farklılığı belirlenmiştir.

Table 5. *Oxyoemacheilus* genusuna ait 6 türün ayırma neden olan polimorfik nükleotid pozisyonları.

Table 5. Polymorphic nucleotide sites leading to differentiation of 6 species belonging to the *Oxyoemacheilus* genus

Türler	3	7	7	8	8	9	9	1	2	3	3	6	6	6	7	7	8	8	9	9	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3													
<i>O. euphraticus</i> H1	G	A	G	C	A	C	G	G	T	A	A	T	G	A	C	T	C	A	G	A	A	C	A	A	C	G	A	T	A	T	C	A	T	T	T	G	A	A	C	G	C	C	A	G	A	A	T										
<i>O. argyrogramma</i> H2	T	A	C	A	.	G	C	.	.	G	.	.	A	G	C							
<i>O. argyrogramma</i> H3	T	A	C	A	.	G	T	G	C							
<i>O. kaynaki</i> H4	A	T	C	T	G	T	.	.	G	T	G	T	.	.	C	G	.	T	.	A	.	.	A	T							
<i>O. kaynaki</i> H5	A	A	.	.	.	G	T	C	T	.	.	G	T	G	T	.	.	C	G	.	.	T	.	A	.	.	A							
<i>O. kaynaki</i> H6	A	G	T	C	T	.	.	G	T	G	T	.	.	C	G	.	.	T	.	A	.	.	A						
<i>O. kaynaki</i> H7	A	G	T	C	T	.	.	G	T	G	T	.	.	C	G	.	.	T	.	A	.	.	A						
<i>O. araxensis</i> H8	T	.	A	.	.	G	.	.	G	T	G	C	T	A	.	.	G	A	A						
<i>O. paucilepis</i> H9	A	.	A	.	T	A	.	T	.	A	G	.	.	T	.	A	G	.	T	.	A	G	.	T	G	G	T	A	.	C	.	C	T	.	C	.	.	A	.	.	A	G	A							
<i>O. bergianus</i> H10	A	G	A	A	G	.	C	.	A	T	G	.	A	.	T	C	T	G	.	.	G	.	T	.	C	T	A	G	.	G	.	T	.	C	T	A	G	.	G	C	T	G	C	.	C	A	G	.	A	.	A	T	T	G	A	G	.
<i>O. bergianus</i> H11	A	G	A	A	G	.	C	.	A	T	G	.	A	.	T	T	G	.	.	G	.	T	G	C	T	A	G	.	G	.	T	.	C	T	A	G	.	G	C	T	G	C	.	C	A	G	.	A	.	A	T	T	G	A	G	.	
<i>O. bergianus</i> H12	A	G	A	A	G	.	C	.	A	T	G	.	A	.	T	.	T	G	A	G	.	.	T	G	A	G	.	G	.	T	.	C	T	A	G	.	G	C	T	G	C	.	C	A	G	.	A	.	A	T	T	G	A	G	.		



Şekil 1. *Oxyoemacheilus* genusunun intraspesifik (tür içi) ve interspesifik (türler arası) ayrışması için barkod boşluğunu temsil eden mesafelerin histogramları.

Figure 2. Histograms of distances representing the barcode space for the intraspecific and interspecific differentiation of the genus *Oxyoemacheilus*.

Barkodlama Başarısı: *Oxyoemacheilus* türünün COI verisine dayalı olarak türlerarası ortalama genetik mesafe (%3,6) ile tür içi ortalama genetik varyasyon (%0,45) arasında yaklaşık 7 katlık bir sekans farklılığı belirlenmiştir (Şekil 2). Ayrıca, 6 *Oxyoemacheilus* türü içinde COI'ye dayalı K2P için en yüksek tür içi genetik mesafe (%0,59; *O. phoxinoides*) ile en düşük türlerarası mesafe (1,62; *O. atili* ve *O. eregliensis*) belirlenmiştir. Fırat nehir havzasındaki *Oxyoemacheilus* genusu için en yakın eşleşme (BCM) analizine göre mtDNA COI veri setinin tür sınırlaması için % 1,62'lik bir en iyi eşik değeri belirlenmiştir. Varsayımsal eşığe dayalı BCM yöntemleri, bu veri setinde % 90,4 yüksek başarı oranı sağlayan 250 bireyden 226'sı doğru tanımlanmasını sağladı ve tüm dizilerin % 9,6'sını (24 birey) yanlış tanımladı. BCM testine göre, *Oxyoemacheilus* genusuna ait yedi türde

örtüşme bulundu (*O. cinicus*-*O. mesudae*-*O. germencicus*, *O. seyhanensis*-*O. kosswigi* ve *O. phoxinoides*-*O. angorae*). Bu nedenle, *Oxynoemacheilus* veri seti BCM testinin sonuçlarına dayanarak yirmi altı gruba indirgenmiştir (Şekil 3). Filogenetik tabanlı barkodlama başarısı analizinde ise Fırat Nehri havzasındaki 6 balık türünden oluşan dizi kütüphanemizde, aynı türün tüm dizi haplotipleri üç komşu birleştirme analizi ile oluşturulan ağaçta da yüksek güvenilirlik destekli ağaç topolojileri oluşturdu (Şekil 3).

Filogenetik Analizler: Anadolu'da dağılım gösteren türlerden Genbank veritabanında COI verileri bulunanlara ait haplotipler ile birlikte Anadolu'da Fırat nehrinde dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* popülasyonlarına ait mtDNA COI-Barkod haplotiplerinin neighbour joining (NJ), maksimum tutumluluk (MP) ve maksimum olasılık (ML) metotları kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizlerinden elde edilen filogenetik ağaç topolojileri hemen hemen birbirinin aynı olup önceden tanımlanmış *Oxynoemacheilus* türlerine karşılık gelen 26 grubun varlığını gösterecek şekilde yüksek güvenilirlik değerleri (NJ: 88-100, MP:78-100, ML:70-100; Şekil 3) ile desteklenmiştir.

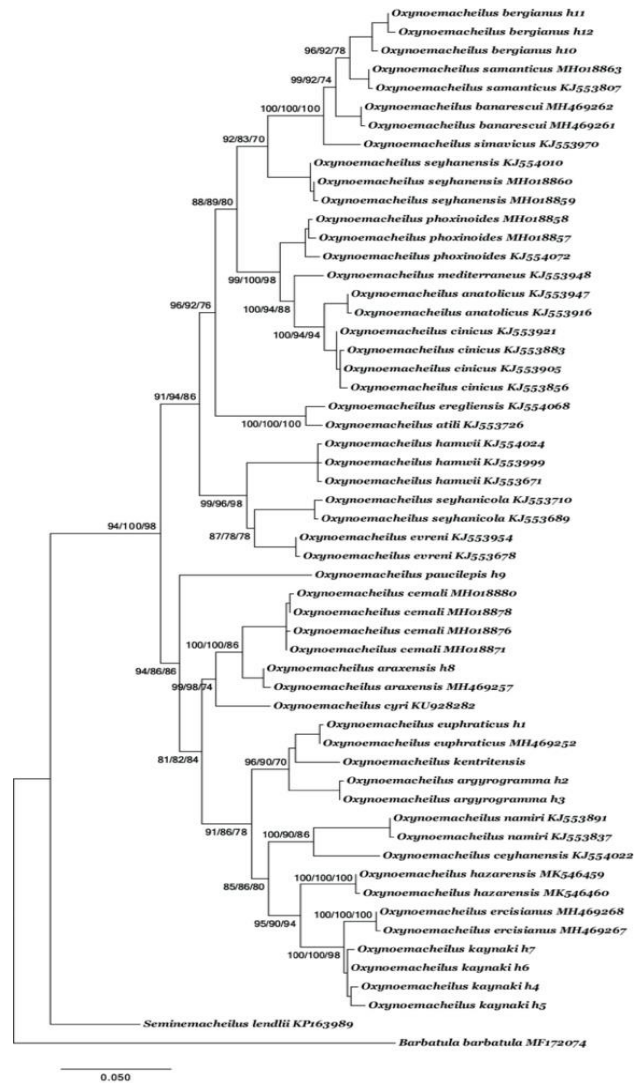
SONUÇ VE TARTIŞMA

Genetik Çeşitlilik: Fırat havzasındaki nehir sistemlerinden örneklenen *Oxynoemacheilus* bireylerinin tümü, 627 bp'lik mitokondri COI barkod dizisine dayalı analizler ile morfolojik olarak gruplandırıldıkları taksonlar içinde tanımlanmıştır. Belirlenen 12 adet haplotip'in herbirinin sadece 1 *Oxynoemacheilus* türünde temsil edildiği belirlenmiştir ki bu durum nehir sisteminde henüz yeni dağılım gösterdiklerine işaret etmektedir (Tablo 3).

Oxynoemacheilus paucilepis, *Oxynoemacheilus araxensis*, *Oxynoemacheilus euphraticus* ve *Oxynoemacheilus argyrogramma* türleri için belirlenen haplotip sayısının az oluşu (1 veya 2), genellikle düşük düzey haplotip ($h=0,000-0,425$; Tablo 3) ve düşük nükleotit sayıları ($\pi=0,000-0,005$; Tablo 3) gösterirken hemen hemen aynı *Oxynoemacheilus bergianus*'un nispeten daha yüksek haplotip ($h=$ lokalitelerde dağılım gösteren *Oxynoemacheilus kaynakı* ve $0,656-0,735$; Tablo 3) ve fakat düşük nükleotit sayılarına ($\pi=0,004-0,005$; Tablo 3) sahip olması bu türlerin kendilerine özgü daha yüksek sayıda mutasyon biriktirecek kadar uzun bir zamandır bu bölgede olduklarını akla getirmektedir. Zira, balıklarda düşük haplotip ve nükleotit sayılarının yakın zamandaki popülasyon darboğazını veya tek başına veya birkaç mtDNA soyu ile kurucu etkisi (Grant & Bowen, 1998), yüksek haplotip ve nükleotit sayılarının ise popülasyon darboğazını takiben hızlı nüfus artışı ve mutasyonların birikmesi (Avice vd., 1984; Grant &

Bowen, 1998; Rogers & Harpending, 1992) fenomenini işaret ettiğini ileri sürmüşlerdir. Bu bilgilere dayanarak *Oxynoemacheilus kaynakı* ve *Oxynoemacheilus bergianus* türlerinin bölgeye öncelikli girişlerini takiben hızlı bir nüfus artışı ve buna bağlı mutasyon birikimine henüz yeni başlamış olduğu söylenebilir.

Araştırma alanında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* türleri arasındaki genetik mesafe aralığına bakıldığında (%3,7-13,1; Tablo 4), Sayyahzadeh vd., (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Orta Doğu'daki Nemacheilid balıklarda *Oxynoemacheilus* genusu için belirlenen türler arası genetik mesafeler aralığı (%1,4-16,3; Tablo 4) ile uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 3. *Oxynoemacheilus* türlerine ait mtDNA COI-Barkod dizilerinden belirlenen haplotiplerin ML metodu yardımıyla oluşturulan filogenetik ağacı. NJ, MP ve ML metotları benzer topolojiler vermiştir ve bu nedenle sadece olasılık ağacı gösterilmiştir. NJ, MP ve ML seç bağla testi değerleri yakın dallarda gösterilmiştir.

Figure 3. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of *Oxynoemacheilus* species based on the COI-barcode gene haplotypes. NJ, MP and ML methods yielded identical topologies and so only the likelihood tree is shown. NJ, MP and ML bootstrap values are indicated near branches.

Türlerin tanımlanması, DNA dizisindeki türe özgü genetik polimorfizmlerin tespitine dayandırıldığı (Liu & Cordes, 2004) için mitokondri DNA COI-Barkod genine ait ayırt edici türe özgü nükleotit pozisyonlarının sayısının *O. euphraticus*, *O. argyrogramma*, *O. kaynaki*, *O. araxensis*, *O. paucilepis* ve *O. bergianus* (Tablo 5) için tür düzeyinde genetik tanımlama için yeterli olduğu söylenebilir.

Barkodlama Başarısı: Özellikle balık türlerinin tanımlanmasında etiket olarak COI genini kullanan DNA barkodlama son zamanlarda dikkat çekmektedir (Knebelberger vd., 2014; McCusker vd., 2013). Barkod geni olarak COI'nin seçilmesinin ana nedenlerinden biri, tür içi ve türlerarası genetik mesafeler arasındaki örtüşmeme belirgin bir farklılıkla ifade edilen ve sayısız tür için gözlemlenen tipik bir çeşitlilik modeli olmasıdır (Hebert vd., 2003a, b). K2P'ye dayanan tür içi genetik mesafeler genellikle düşüktür (% 1'in altındadır) ve balıklar dahil (Ward, 2012) geniş bir taksona boyunca nadiren % 2'den fazladır (Hebert vd., 2003a, b). Gerçekleştirilen bu çalışmada belirlenen ve incelenen 6 türde de K2P tür için genetik mesafenin % 0,59'i aşmadığını dolayısıyla 1'den fazla lokaliteden örneklenen *Oxynoemacheilus euphraticus*, *Oxynoemacheilus argyrogramma*, *Oxynoemacheilus kaynaki*, *Oxynoemacheilus araxensis* ve *Oxynoemacheilus bergianus*'un tek bir lokaliteden örneklenen *Oxynoemacheilus paucilepis*'dekine oranla genetik değişkenliklerinde önemli bir artış olmadığını gösterildi.

Freyhof ve Özuluğ (2017), Fırat nehir drenajındaki 8 tür (*O. araxensis*, *O. argyrogramma*, *O. bergianus*, *O. erdali*, *O. euphraticus*, *O. kaynaki*, *O. paucilepis*, and *O. samanticus*) tanımlamış olmasına rağmen Freyhof vd., (2019) *O. erdali* ve *O. bergianus*'in sinonimi olarak kabul ederken *O. samanticus* Fırat ve Kızılırmak nehirlerinin sınırına çok yakın bir bölgede tespit edilmiştir. Bu çalışmada *O. erdali*'nin sinonimizasyonunu desteklemektedir ve fakat *O. samanticus* örneklenemediğinden verisetimize eklenememiştir.

Barkodlama çalışmalarında ortalama intraspesifik varyasyon ve ortalama interspesifik genetik mesafelerin karşılaştırılması genellikle türleri sınırlandırmak için kullanılır. *Oxynoemacheilus* türünün COI veri setine dayalı ortalama türlerarası ve tür içi ortalama genetik varyasyon düzeyi arasındaki yaklaşık 7 katlık fark (Şekil 2), Hebert vd., (2004) tarafından önerilen ortalama türlerarası ve tür içi ayrılma arasındaki en az 10 katlık farklılık eşik değerden daha düşük olsa bile bu çalışmada elde edilen mtDNA COI sekansları itibarıyla türlerarası genetik mesafe ve tür içi genetik varyasyon aralığının üst üste binmediği görülmüştür (Şekil 2). Ancak, en büyük tür içi genetik çeşitlilik değeri ve en küçük türler arası genetik

mesafelerin kullanılmasının yerine ortalama çeşitlilik ve mesafe değerlerin kullanılması "barkod boşluğu" boyutunu arttırmakta ve yanlış tanımlamaya da yol açabilmektedir (Meier vd., 2008). Bundan dolayı, barkodlama aralığını doğru saptamak için en iyi yaklaşım, en yüksek tür içi genetik mesafeler ve en düşük türler arası mesafe arasında örtüşmeyi tespit etmektir (Meier vd., 2008). Bu çalışmada, Fırat nehir havzasındaki 6 *Oxynoemacheilus* türünün hiçbirinde böyle bir örtüşme saptamadığımız gibi COI'ye dayalı barkod bölgesi itibarıyla K2P için %0,59 (*O. phoxinoides*) ile % 1,59 (*O. atili* ve *O. eregliensis*) arasında belirgin bir barkod aralığı olduğu gösterilmiştir.

COI-dayalı barkodlamaya dayalı olarak Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* genusu için en yakın eşleştirme (BCM) analizine göre %90,4 doğrulukla tanımlanan türler için belirgin bir barkod boşluğunun varlığı, morfolojik olarak tanımlamanın gerçekten zor olduğu *Oxynoemacheilus* genusuna ait türlerinin genetik tanımlanmasında COI barkod bölgesinin kullanışlı olduğunu da göstermiştir. BCM testine dayalı olarak Anadolu *Oxynoemacheilus* türleri için elde edilen barkodlama başarı oranı (% 90), Kanada tatlı su balıkları (% 93, Hubert vd., 2008) ve Kuzey Amerika tatlı su balıkları (% 90; April vd., 2011) için rapor edilenlerle benzerlik göstermektedir. Veri setimizdeki COI dayalı DNA barkodlarının yüksek ayırt edici gücü, bazı Anadolu *Oxynoemacheilus* türlerinin, 2-4 milyon yıl Kuvaterner dönemindeki jeolojik ve iklimsel olaylarla özelleştiği düşünülen (Bektaş vd., 2017; Levin vd., 2012) genç evrim grupları olduğu gerçeğiyle açıklanabilir (Zareian vd., 2016).

Filogenetik tabanlı barkodlama başarısı analizi ile elde NJ ağacı (Şekil 3) *Oxynoemacheilus* türlerinin NJ barkodunda monofiletik birimler halinde kümelendiği göstermektedir. Bu da DNA barkodunun tür tanımlamasında yüksek verime sahip olduğunu göstermektedir. Oysaki, morfolojik yanlış tanımlama NJ ağacının sonucunu değiştirebilir (Bingpeng vd., 2018). Dolayısıyla, veri setimizdeki DNA barkodunun tür tanımlama da %100 başarılı olması diğer bir deyişle yüksek ayırım gücü, Fırat Nehri'ndeki *Oxynoemacheilus*'un doğal kaynaklarının tespitini ve korunmasını garanti edecek balıkçılık araştırmaları için oldukça değerli ve güvenilir bir tanımlama aracı olduğu görüşünü desteklemektedir.

Filogenetik Analizler: Batı Palearktığın önemli biyoçeşitlilik merkezlerinden biri olan Anadolu'dan daha önce Genbank veri tabanında rapor edilmiş *Oxynoemacheilus*'un COI haplotipleri, Fırat nehri havzasında dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* popülasyonlarına ait haplotiplerle birlikte farklı temellere dayalı olarak çalışılan maksimum tutumluluk (MP), maksimum olasılık (ML) ve neighbour joining metotları ile

gerçekleştirilen filogenetik analizlerinden elde edilen filogenetik ağaç topolojileri (Şekil 3) hemen hemen birbirinin aynı olup önceden Fırat nehri havzasında morfolojik olarak tanımlanmış olan *Oxynoemacheilus* türlerine (Erk'akan vd., 2007, 2008; Freyhof vd., 2011; Freyhof & Özuluğ, 2017) karşılık gelen 6 grubun varlığını gösterecek şekilde yüksek güvenilirlik değerleri (NJ: 88-100, MP:78-100, ML:70-100; Şekil 3) ile desteklendiği belirlenmiştir.

Taksonomik durumları hala karmaşık olan *Oxynoemacheilus* genusunu (Prokofiev, 2009, 2010; Sayyadzadeh vd., 2016, 2017) kapsayan Akdeniz'de tatlı su balıklarının mekansal heterojenliği üzerine yeni bir çalışma (Geiger vd., 2014) bu genusun bazı popülasyonlarının genetik olarak tanımlanmadığını ortaya koymuştur. Bu ihtiyaçtan hareket ile taranan Fırat nehir havzasındaki *Oxynoemacheilus* popülasyonlarının ait mitokondri COI lokusuna dayalı olarak belirlenen 12 adet haplotip ile gerçekleştirilen barkod analizi sonucu % 1,62'lik barkod eşik değerine dayalı olarak daha önce morfolojik olarak tanımlanmış olan 6 türün genetik olarak tür teyidi yapılmıştır.

Daha önce Jouladeh-Roudbar vd., (2016) tarafından kısmen de olsa araştırma kapsamında alınan Anadolu *Oxynoemacheilus* türlerinin ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç topolojilerinde türler genellikle coğrafik dağılımları ile uyumlu olarak konumlanmış olmasına rağmen iki önemli istisna mevcuttur. Bunlardan ilki Fırat havzasından örneklenen *O. bergianus*'un Karadeniz (*O. samanticus* ve *O. banarescui*) ve Ege havzasında (*O. simavicus*) dağılım gösteren türlerle gruplanmasıdır.

İkinci istisnai durum ise Ceyhan nehrinde dağılım gösteren *O. ceyhanensis* 'in Fırat nehrinde dağılım gösteren *Oxynoemacheilus* türleri ile birlikte kümelenmiş olmasıdır (Şekil 3). Fırat nehir yatağının geç Miyosen-erken Pliyosen dönemi boyunca evrimini kaydeden geç Senozoik nehir çöküntü teraslarına bakılarak yaklaşık 4 milyon yıl önce doğuya yönelmeden önce modern Ceyhan nehri boyunca güneybatı yönünde Akdeniz'e doğru aktığı (Seyrek vd., 2007; Westaway, 2004) tahmini bu iki nehir sisteminin temasını dolayısıyla faunal ilişkisine fırsat vermiş olma ihtimalleri Ceyhan nehrinde bulunan *O. ceyhanensis*'in ağaç topolojisindeki eğilimini açıklayabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ BAP, Proje No: 2015.53008.103.01.01) bilimsel araştırma fonları tarafından finanse edilmiştir.

KAYNAKLAR

- April, J., Mayden, R.L., Hanner, R.H. & Bernatchez, L. (2011).** Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 10602-10607.
- Aquilino, S.V.L., Tango, J.M., Fontanilla, I.K.C., Pagulayan, R.C., Basiao, Z.U., Perry, S.O. & Quilang, J.P. (2011).** DNA barcoding of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. *Molecular Ecology Resource*, **11**, 612-619.
- Ardura, A., Linde, A.R., Moreira, J.C. & Garcia-Vazquez, E. (2010).** DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, **143**, 1438-1443.
- Avise, J.C., Neigel, J.E. & Arnold, J. (1984).** Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, **20**, 99-105.
- Bektaş, Y., Turan, D., Aksu, İ., Çiftçi, Y., Eroglu, O., Kalayci, G. & Beldüz, A.O. (2017).** Molecular phylogeny of the genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia, Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, **70**, 80-94
- Bingpeng, X, Heshan, L, Zhilan, Z, Chunguang, W, Yanguo, W. & Jianjun, W. (2018).** DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *Plos One*, **13**, 0198109.
- Brown, S.D., Collins, R.A., Boyer, S., Lefort, M-C., Malumbres-Olarte, J., Vink, C.J. & Cruickshank, R.H. (2012).** Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 562-565.
- Dayrat, B. (2005).** Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 407-415.
- Erk'Akan, F., Nalbant and T.T. & Özeren, S.C. (2007).** Seven new species of *Barbatula*, three new species of *Schistura* and a new species of *Seminemacheilus* (Ostariophsi: Balitoridae: Nemachilinae) from Turkey. *Journal of Fisheries International*, **2**, 69-85. DOI: [jfish.2007.69.85](https://doi.org/10.1007/s10646-007-9185-8)
- Erk'Akan, F., Özeren and S.C. & Nalbant, T.T. (2008).** Two new species of stone loaches from Turkey (Teleostei: Nemacheilidae), *Journal of Fisheries International*, **3**, 115-119.
- Freyhof, J., Erk'Akan, F., Özeren, C. & Perdices, A. (2011).** An overview of the western Palaearctic loach genus *Oxynoemacheilus* (Teleostei:

- Nemacheilidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, **22**(4), 301-312.
- Freyhof, J. & Geiger, M. (2017).** *Oxynoemacheilus zarzianus*, a new loach from the Lesser Zab River drainage in Iraqi Kurdistan (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa*, **4273**, 258-270.
- Freyhof, J. & Özuluğ, M. (2017).** *Oxynoemacheilus hazarensis*, a new species from Lake Hazar in Turkey, with remarks on *O. euphraticus* (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa*, **4247**(4), 378-390.
- Freyhof, J., Kaya, C., Turan, D. & Geiger, M. (2019).** Review of the *Oxynoemacheilus tigris* group with the description of two new species from the Euphrates drainage (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa*, **4612**(1), 29-57.
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Casal-Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Kärst, H., Kottelat, M., Kovačić, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marčić, Z., Özuluğ, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Šanda, R., Schneider, M., Šlechtová, V., Stoumboudi, M., Walter, S. & Freyhof, J. (2014).** Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, **14**, 1210-1221.
- Grant, W.A.S. & Bowen, B.W. (1998).** Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, **89**, 415-426.
- Hall, T.A. (1999).** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de Waard, J.R. (2003a).** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **270**, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & de Waard, J.R. (2003b).** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society London*, **270**, 596-599.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004).** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 14812-14817.
- Hebert, P.D.N. & Gregory, T.R. (2005).** The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, **54**, 852-859.
- Hubert, N., Hanner, R. & Holm, E. (2008).** Identifying Canadian freshwaterfishes through DNA barcodes. *PloS One*, **3**, 2490.
- Jouladeh-Roudbar, A., Eagderi, S. & Hosseinpour, T. (2016).** *Oxynoemacheilus freyhofi*, a new nemacheilid species (Teleostei, Nemacheilidae) from the Tigris basin, Iran. *Fish Taxa*, **1**, 94-107.
- Kaya, C., Turan, D., Bayçelebi, E., Kayalci, G., Freyhof, J. (2020).** *Oxynoemacheilus cilicicus*, a new nemacheilid loach from the Göksu River in southern Anatolia (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa*, **4808**(2), 284-300.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Kneibelsberger, T., Dunz, A.R., Neumann, D. & Geiger, M.F. (2014).** Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 562-572.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt L.A. & Janzen, D.H. (2005).** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 8369-8374.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018).** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology*, **35**, 1547-1549.
- Levin, B.A., Freyhof, J., Lajbner, Z., Perea, S., Abdoli, A., Gaffaroğlu, M., Özuluğ, M., Rubenyan, H.R., Salnikov, V.B. & Doadrio, I. (2012).** Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62**, 542-549.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009).** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Liu, Z.J. & Cordes, J.F. (2004).** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, **238**, 1-37.
- Lleonart, J., Taconet, M. & Lamboeuf, M. (2006).** Integrating information on marine species identification for fishery purposes. *Marine Ecology Progress Series*, **316**, 231-238.
- McCusker, M.R., Denti, D., Van Guelpen, L., Kenchington, E. & Bentzen P. (2013).**

- Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, **13**, 177-188.
- Meier, R., Kwong, S., Vaidya, G. & Ng, P.K.L. (2006).** DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, **55**, 715-728.
- Meier, R., Zhang, G.Y. & Ali, F. (2008).** The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the 'Barcoding Gap' and leads to misidentification. *Systematic Biology*, **57**, 809-813.
- Nelson, J.S., Grande, T.C. & Wilson, M.V.H. (2016).** Fishes of the World. Fifth Edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 1-707.
- Posada, D. (2008).** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology*, **25**, 1253-1256.
- Prokofiev, A.M. (2009).** Problems of the classification and phylogeny of Nemacheiline loaches of the group lacking the preethmoid I (Cypriniformes: Balitoridae: Nemacheilinae). *Journal of Ichthyology*, **49**, 874- 898.
- Prokofiev, A.M. (2010).** Morphological classification of loaches (Nemacheilinae). *Journal of Ichthyology*, **50**, 827-913.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992).** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. & Esmaeili, H.R. (2016).** A new loach of the genus *Oxynoemacheilus* from the Tigris River drainage and its phylogenetic relationships among the nemacheilid fishes (Teleostei: Nemacheilidae) in the Middle East based on mtDNA COI sequences. *Iranian journal of ichthyology*, **3**, 236-250.
- Sayyadzadeh, G., Esmaeili, H.R., Eagderi, S., Jouladeh-Roudbar, A., Masoudi, M. & Vatandoust, S. (2017).** Re-description of *Oxynoemacheilus longipinnis* from the Persian Gulf basin (Teleostei: Nemacheilidae). *Zoology in the Middle East*, **63**(3), 228-238.
- Seyrek, A., Demir, T., Pringle, M.S., Yurtmen, S., Westaway, R., Beck, A. & Rowbotham, G. (2007).** Kinematics of the Amanos Fault, southern Turkey, from Ar/Ar dating of offset Pleistocene basalt flows: Transpression between the African and Arabian plates. *Geological Society*, **290**, 255-284.
- Shen, Y.J., Guan, L.H., Wang, D.Q. & Gan, X.N. (2016).** DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River. *Ecology and Evolution*, **6**, 2702-13.
- Strauss, R.E. & Bond, C.E. (1990).** Taxonomic methods: morphology. In: Schreck CB, Moyle PB (eds) *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, 109-140.
- Sungur, S. (2020).** *Oxynoemacheilus kosswigi* a Junior Synonym of *O. seyhanensis* (Teleostei: Nemacheilidae). *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, **44**, 563-573.
- Triantafyllidis, A., Bobori, D., Koliamitra, C., Gbandi, E., Mpanti, M., Petriki, O. & Karaïskou, N. (2011).** DNA barcoding analysis of fish species diversity in four north Greek lakes. *Mitochondrial DNA*, **22**, 37-42.
- Turan, D., Kaya, C., Kalayci, G., Bayçelebi, E. & Aksu, İ. (2019).** *Oxynoemacheilus cemali*, a new species of stone loach (Teleostei: Nemacheilidae) from the Çoruh River drainage, Turkey. *Journal of Fish Biology*, **94**, 458-468.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D.N. (2005).** DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **360**, 1847-1857.
- Ward, R.D., Hanner, R. & Hebert, P.D.N. (2009).** The campaign to DNA barcode all fishes, *Journal of Fish Biology*, **74**, 329-356.
- Ward, R. (2012).** A case study for DNA barcodes. Pp. 423– 439 in W. J. Kress, D. L. Erickson, eds. DNA barcodes: methods and protocols, methods in molecular biology. Springer Science Business Media, LLC, New York, FISH-BOL. 858.
- Westaway, R. (2004).** Kinematic consistency between the Dead Sea Fault Zone and the Neogene and Quaternary left-lateral faulting in SE Turkey, *Tectonophysics*, **391**, 203-237.
- Zareian, H., Esmaeili, H.R., Heidari, A., Khoshkholgh, M.R. & Mousavi-Saber, H. (2016).** Contribution to the molecular systematics of the genus *Capoeta* from the south Caspian Sea basin using mitochondrial cytochrome b sequences (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Biology Research Communications*, **5**, 65-75.