

## Bazı Sazan Türlerinde Mikrosatellit DNA Markörlerinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Arif PARMAKSIZ<sup>1\*</sup>, Burçak ATEŞ<sup>1</sup>, Şahin TOPRAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 15.10.2015

Kabul Tarihi: 21.12.2015

**Özet:** Bu çalışmada; Cyprinidae familyasına ait üç tür (*Capoeta trutta* (Heckel, 1843), *Barbus luteus* (Heckel, 1843) ve *Cyprinion macrostomus* (Heckel, 1843)) için farklı mikrosatellit markörlerin çalışma durumu araştırılmıştır. Fırat ve Dicle nehir sistemlerinden yakalanan balık örneklerinden kas dokusu alınarak DNA izolasyonu kit ile yapılmıştır. Daha sonra sekiz mikrosatellit markör (MFW-1, CyPG3, CyPG8, SarN7G5, Barbus27, Barbus31, Barbus33, Barbus50) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sisteminin kullanılabilirliği çalışılmıştır. Bu markörlerden dört tanesinde (MFW-1, CyPG3, Barbus27, Barbus31) hibridizasyon (eşleşme) sağlanarak PZR ürünü elde edilmiştir. Oluşan ürünler kapiller elektroforez ile fragman analizi yapılarak bireylerin allelleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak; genetik çeşitlilik çalışmalarında bu dört mikrosatellit markörden yararlanmak mümkündür.

**Anahtar Kelimeler:** *Capoeta*, *Barbus*, *Cyprinion*, mikrosatellit, polimorfizm, PZR

### Investigation of Usefulness of DNA Microsatellite Markers in Some Carp Species

**Abstract:** In this study; application of different microsatellite markers were investigated for three species (*Capoeta trutta* (Heckel, 1843), *Barbus luteus* (Heckel, 1843) ve *Cyprinion macrostomus* (Heckel, 1843)) belonging to Cyprinidae family. Taking muscle tissue from the fishes that are caught from the Euphrates and Tigris rivers system, DNA extraction was performed by using kits. Then, the usefulness of Polymerase Chain Reaction (PCR) system was searched by using eight microsatellite markers (MFW-1, CyPG3, CyPG8, SarN7G5, Barbus27, Barbus31, Barbus33, Barbus50). The PCR products were then obtained in four of them (MFW-1 CyPG3, Barbus27, Barbus3) by amplification. The fragment analysis of the resulting products were performed by capillary electrophoresis in order to identify te alleles of individuals. As a result, it is possible to benefit from these four microsatellite markers in genetic diversity studies.

**Keywords:** *Capoeta*, *Barbus*, *Cyprinion*, microsatellite, polymorphism, PCR

### Giriş

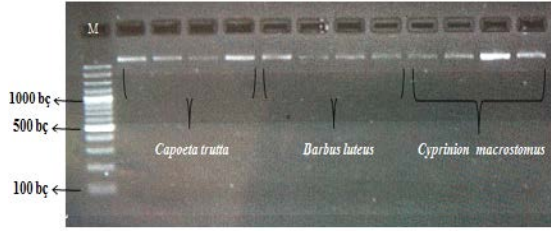
Cyprinidae (Sazangiller) tür sayısı bakımından oldukça geniş bir familya olup ülkemizde yaşayan tatlı su balıklarının büyük bir kısmı bu familyaya aittir (Çiçek, 2009). Bu ailenin birçok türü besin olarak tüketildiği için ekonomik öneme sahiptir. Bu nedenle bir bölgede yaşayan balık stoklarının devamının sağlanması ve bu stoklardan yüksek verim elde edilebilmesi için balığın genetik çeşitliliğinin çok iyi bilinmesi gerekir (Hewitt, 1996; Saccone ve ark., 2000; Stabile ve ark., 1996). Genetik çeşitliliği tanımlamak için kullanılan DNA'ya dayalı birçok genetik markör bulunmakta olup, su ürünlerinde en çok kullanılan metotlardan birisi polimorfizm oranlarının yüksek oluşu nedeniyle mikrosatellitler veya basit dizilim tekrarlarıdır (Aksakal, 2009). Türkiye'de yapılan bu konu ile ilgili bazı çalışmalardan bahsetmek gerekirse, Telli (2008) çalışmasında farklı *Pseudophoxinus* türlerinde genetik çeşitlilik hesaplamalarını mikrosatellit markörleri ve allozim belirteci üzerinden yapmıştır. Aksakal (2009) çalışmasında aynı yetiştirme koşullarındaki Gökkuşığı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*)

gruplarında yüksek ve düşük canlı ağırlığa sahip bireyler arasındaki genetik varyasyonu mikrosatellit markörlerini kullanarak ortaya çıkarmıştır. Fırat ve Dicle nehirlerinde yaşayan Sazangiller türlerinde mikrosatellitlerle ilgili detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, *Capoeta trutta*, *Barbus luteus* ve *Cyprinion macrostomus* türlerinde seçilen 8 farklı mikrosatellit markörünün genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılabilirliğinin tespit edilmesidir.

### Materyal ve Metot

Her üç tür için 5'er birey Dicle Nehri'nden, 5'er birey de Fırat Nehri'nden avlama yapmak suretiyle toplamda 30 birey yakalanmıştır. Yakalanan örneklerden dorsal veya pektoral yüzgeçlerin kaidesindeki kas dokusu alınarak %95'lik etanol içeren 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine konulup laboratuvara getirilmiştir. Total DNA izolasyonu GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden 2 µl alınarak %0.8'lik agaroz jelde

SYBR Green eklendikten sonra 120 Volt, 30 dakika elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 1). Balık örneklerinden elde edilen total DNA'lar +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 1. Türlerle ait bazı bireylerin total DNA örnekleri (M: 100 bç DNA Ladder).

### Hedef DNA Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması:

PZR, belli bir DNA bölgesi kopyalarının primerler tarafından seçilerek, enzim yardımıyla sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir (Arı, 2008). Bu çalışmada bu yöntem

BIO-RAD T100™ Thermal Cyler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR optimizasyonları yapılmış ve sadece 4 primerde (MFW-1, CyPG3, Barbus27, Barbus31) ürün elde edilmiştir. Diğer primerlerde ise ürün elde edilmemiştir. Ürün oluşturan lokusların PZR koşulları; 94°C'de 3 dakika denatürasyon, 94°C'de 35 saniye denatürasyon, MFW-1 için 60°C'de, CyPG3 ve Barbus27 için 62.5°C, Barbus31 için 60.5°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirilmiş, son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak sonlandırılmıştır. PZR ile çoğaltma (amplifikasyon) reaksiyonlarında kullanılan DNA miktarı, kimyasalların konsantrasyonları ve mikrosatellit lokuslarının her birine özgü primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PZR cihazında optimize edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikrosatellit markörlerine ait bilgiler Tablo 1'de, Ürün oluşturan mikrosatellit bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mikrosatellit markörlerine ait özellikler.

Mikrosatellit markörler	Erişim numarası	Primer sekansları (5'-3')	Hedef uzunlukları (bç)	Kaynak
MFW-1	AY703055	F:GTCCAGACTGTCATCAGGAG R:GAGGTGTACACTGAGTCACGC	175-212	Crooijmans ve ark., 1997
CyPG3	AY439122	F:AGTAGGTTCCAGCATCATTGT R:GACTGGACGCCTCTACTTTCATA	170-330	Baerwald ve May, 2004
CyPG8	AY439126	F:AGACAAAACAATGGGACTGAC R:GACAGACAGATAGACAAAGATACA	135-250	Baerwald ve May, 2004
SarN7G5	AJ566136	F: GAGCTTCAGCACCGAGGAC R:CTACATGACAAGCATCTGCAGTAA	111-127	Mesquita ve ark., 2003
Barbus27	HF975635	F: ATATCCAGCCACCCTTACCC R: TGCTTTAGCTGCCAGACAGA	109-125	Gettova ve ark., 2013
Barbus31	HF975637	F: ATGTAAGGTGACTGCTGGGC R: TGAATGCAGCTTGGTTTGAC	180-204	Gettova ve ark., 2013
Barbus33	HF975639	F: TGAATGCATCATGGGCTAGA R: CAGAGCGAATCAAACATGGA	101-154	Gettova ve ark., 2013
Barbus50	HF975649	F: GTTACAGGCCAACGTCAAGG R: GTTAGTCTGCAATCCGCCAT	100-125	Gettova ve ark., 2013

PZR sonucunda çoğaltılmış mikrosatellit bölgelerinin uzunluklarının belirlenmesinde kapiller elektroforezi (ABI 3100 Genetic Analyzer) kullanılmış olup, genotipleme için gerekli ham

veriler ticari firmadan tarafımıza gönderilmiştir. Her bir mikrosatellit bölgesi (FAM) işaretlenmiş ve uzunlukları Tamra (Taqman®TAMRATM Probe) isimli standart işaretleyici yardımı ile belirlenmiştir.

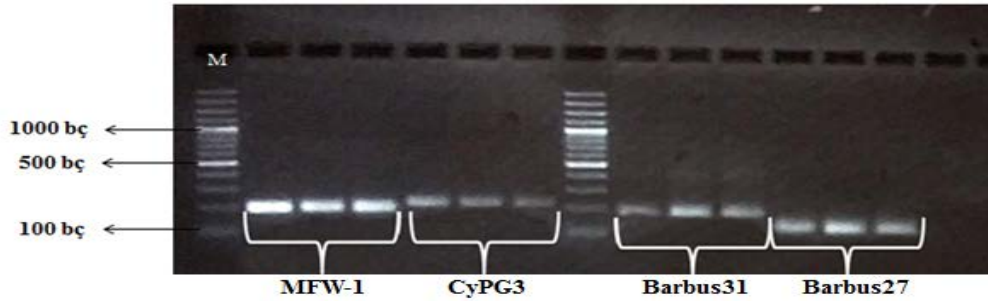
Tablo 2. Ürün oluşturan mikrosatellit bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı.

PZR Kimyasallar	Konsantrasyon	MFW-1	CyPG3	Barbus27	Barbus31
dH <sub>2</sub> O	-	9.5 µl	9.54 µl	9.4 µl	9.3 µl
Taq Buffer	1x	1.5µl	1.5µl	1.5µl	1.5µl
dNTP mix	0.2 mM	0.3µl	0.3µl	0.3µl	0.3µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1.2 µl	1.2 µl	1.2 µl	1.2 µl
Primer mix	10 pmol/µl	0.4 µl	0.36 µl	0.5 µl	0.6 µl
Taq DNA Polimeraz	1U/µl	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl
DNA	30 ng/µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
TOPLAM	-	15µl	15µl	15µl	15µl

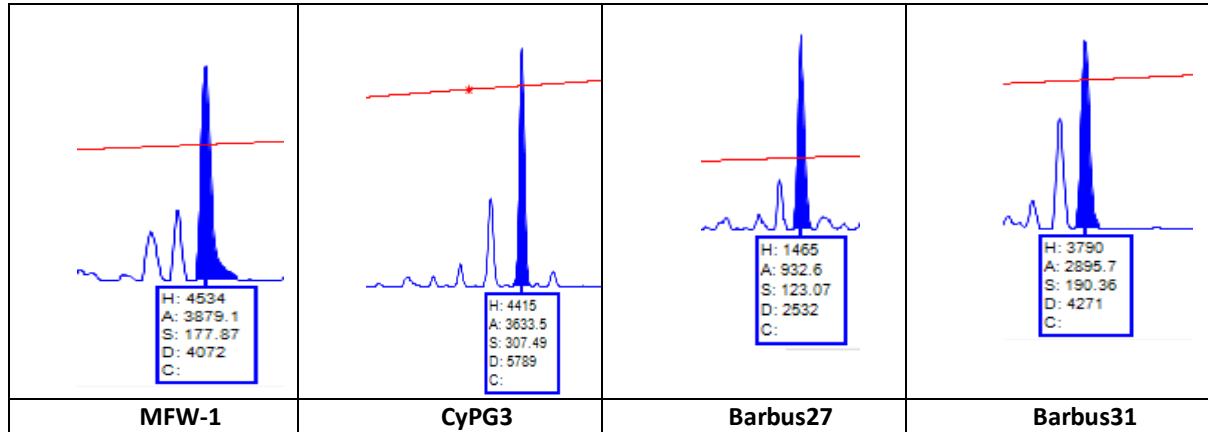
## Bulgular

Çalışmamızda her bir nehir sisteminden her tür için 5'er birey olmak üzere toplam 3 türe ait 30 bireyden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup 8 farklı mikrosatellit markörü kullanılmıştır. PZR sonucunda çoğaltılan bölgeler Şekil 2' de görülmekte olup bu bantların gözlenmesi için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. SYBR Green eklenen agaroz jel 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) solüsyonunun bulunduğu tank içerisinde PZR ürünleri kuyulara yüklendikten sonra 100 V elektrik akımında 30 dakika boyunca yürütülerek ultraviyole (UV) ışık veren görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Mikrosatellit markörlerinin allellerini tespit etmek amacıyla, PZR sonucunda oluşan ürünler ticari bir firmaya gönderilerek,

analizlerde kapiller elektroforezi (ABI 3100 Genetic Analyzer) kullanılmıştır. Elektroferogramlardan data analizi için Applied Biosystems Peak Scanner™ Software v1.0 (www.appliedbiosystems.com) programı kullanılıp bireylerin allelleri tespit edilmiştir. Ürün elde edilen 4 marköre ait bazı bireylerin pikleri Şekil 3'te verilmiştir. Çalışmada mikrosatellit bölgelerine ait piklerin elektroferogram görüntülerinin analizi sonucu genotiplendirilen mikrosatellit bölgelerine ait allel sayıları Tablo 3'te verilmiştir. Mikrosatellit bölgelerinin allel sayıları bakımından en çok polimorfizmi gösteren lokusun 8 allel sayısı MFW-1 ve CyPG3, en az polimorfizm gösteren lokusun ise 2 allel sayısı Barbus31 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2. Mikrosatellit bölgelerinin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü (M: 100 bp DNA Ladder).



Şekil 3. Mikrosatellit bölgelerine ait piklerin elektroferogram görüntüleri.

Tablo 3. Mikrosatellit bölgelerinde görülen allel sayıları.

Tür adı	MFW-1	CyPG3	Barbus27	Barbus31
<i>Capoeta trutta</i>	8	6	5	3
<i>Barbus luteus</i>	7	8	4	3
<i>Cyprinion macrostomus</i>	5	4	4	2

## Tartışma ve Sonuç

Populasyon genetiği araştırmalarında mikrosatellit kullanılmasında en büyük engellerden biri kullanılacak türe ait mikrosatellit lokusların

belirlenmemiş olmasıdır (Eroğlu ve ark., 2014). Bundan dolayı çalışmaya başlarken iyi bir tarama ve mevcut primer setlerinin denendiği bir ön çalışma yapılmalıdır (Eroğlu ve ark., 2014). Bu

çalışmada Fırat ve Dicle nehirlerinde yaşayan Cyprinidae (Sazanğiller) familyasına ait üç türün (*Capoeta trutta*, *Barbus luteus* ve *Cyprinion macrostomus*) popülasyon genetiği araştırmalarına bir ön çalışma yapmak için sekiz farklı mikrosatellit markör kullanılmıştır. Her bir primere ayrı PZR uygulanmış olup sadece dört primerde (MFW-1, CyPG3, Barbus27, Barbus31) ürün elde edilmiştir. Diğer dört primerde (CyPG8, SarN7G5, Barbus33, Barbus50) ürün elde edilmemiştir. Crooijmans ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada *Cyprinus carpio* türünde MFW-1 lokusu için 5 allel tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bu lokus için *Capoeta trutta*'da 8, *Barbus luteus*'da 7, *Cyprinion macrostomus* türünde ise 5 allel tespit edilmiştir. Baerwald ve May (2004) yaptıkları çalışmada farklı türlerde CyPG3 lokusu için allel sayısını 4, 5, 7 ve 10 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise bu lokus için *Capoeta trutta*'da 6, *Barbus luteus*'da 8, *Cyprinion macrostomus* türünde ise 4 allel tespit edilmiştir. Gettova ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada Barbus27 ve Barbus31 lokuslarını da içeren bir çalışmada farklı *Barbus* türlerini çalışmışlar, Barbus27 lokusu için allel sayısını 1, 3, 4 ve 8, Barbus31 lokusu için ise allel sayısını 1, 2, 3, 5 ve 9 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da Barbus 27 ve Barbus 31 lokusları için sırasıyla *Capoeta trutta*'da 5 ve 3, *Barbus luteus*'da 4 ve 3, *Cyprinion macrostomus* türünde ise 4 ve 2 allel tespit edilmiştir. Sonuç olarak popülasyon genetiği çalışması yapılacak *Capoeta trutta*, *Barbus luteus* ve *Cyprinion macrostomus* türlerinde dört çeşit mikrosatellit markör (MFW-1, CyPG3, Barbus27, Barbus31) kullanılmasının uygun olduğu görülmektedir.

## Kaynaklar

- Aksakal E, 2009: Düşük ve yüksek canlı ağırlığa sahip gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) arasındaki genetik varyasyonun mikrosatellit markörler kullanılarak belirlenmesi. Doktora tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arı Ş, 2008: DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. İçinde "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler", Ed; Temizkan G ve Arda N, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. Ankara.
- Baerwald MR, May B, 2004: Characterization of microsatellite loci for five members of the minnow family Cyprinidae found in the Sacramento-San Joaquin Delta and its tributaries. *Mol. Ecol. Notes*, 4 (3), 385-390.
- Crooijmans RPMA, Bierbooms VAF, Komen J, Van Der Poel JJ, Groenen MAM, 1997: Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics*, 28, 129-134.
- Çiçek T, 2009: Dicle ve Fırat su sistemlerinde yaşayan Cyprinidae familyasına ait bazı türlerde görülen morfolojik ve meristik varyasyonların incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, DÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Eroğlu O, Afan F, Firidin Ş, 2014: Su ürünlerinde mikrosatellit belirteçlerin kullanımı. İçinde: 5. Doğu Anadolu Bölgesi Su Ürünleri Sempozyumu, Elazığ, sayfa. 244-245.
- Gettova L, Gilles A, Berrebi P, Simkova A, 2013: The 454 GS-FLX isolation and characterisation of microsatellites in *Barbus meridionalis* and cross-species amplification in three European tetraploid *Barbus* species: a tool for studying population genetics in hybrid zones. Unpublished, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim tarihi; 01.09.2015.
- Hewitt GM, 1996: Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and separation. *Biol J Linnean Soc*, 58, 247-276.
- Mesquita CN, Cunha B, Hänfling GR, Carvalho LZ, Tenreiro R, Coelho MM, 2003: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Portuguese freshwater fish *Squalius aradensis* (Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 572-574.
- Saccone C, Gissi C, Lanave C, Larizza A, Pesole G, Reyes A, 2000: Evolution of the mitochondrial genetic systems. *Gene*, 261, 153-159.
- Stabile J, Waldman J, Parauka F, Wirgin I, 1996: Stock structure and homing fidelity in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) based on restriction fragment length polymorphism and sequence analyses of mitochondrial DNA. *Genetics*, 144 (2), 767-775.
- Telli M, 2008. Endemik ve soyu tehlike altında olan iç su balık türlerinden *Pseudophoxinus*' da şekil ve genetik çeşitlilik ilişkisi. Doktora tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

\*Yazışma Adresi: Arif PARMAKSIZ

Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: aprmksz@gmail.com