



## Van Gölü Havzası *Capoeta* Genusu (*Cyprinidae*) Populasyonlarının RFLP Yöntemi ile Genetik Varyasyonunun Tespit Edilmesi

**Mahmut ELP**

Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Kastamonu, TÜRKİYE

e-posta: mahmutelp@kastamonu.edu.tr

Geliş tarihi: 03/05/2017 Kabul tarihi: 04.12.2017

**Öz:** Van Gölü havzasında doğal yayılış gösteren balık türleri değerlendirildiğinde endemik oldukları görülmektedir (*Alburnustürü tarichi*, *Alburnus timarensis*, *Barbus ercisianus*, *Capoeta kosswigi*, *Oxynoemacheilus ercisianus*). Bu türlerden *Capoeta* havza su kaynaklarında yaygın olarak bulunmakta olup populasyonları arasında üreme boyu yönünden dikkat çekici nitelikte farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple havzada yayılış gösteren *Capoeta*'nın birden fazla türden oluştuğu fikri ortaya çıkmıştır. Bu çalışma ile havzada yayılış gösteren *Capoeta* genusu populasyonlarının genetik varyasyonunun tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile üreme karakterlerinde farklılık gözlenen *Capoeta* genusunun havzada tek bir tür ile mi yoksa birden fazla tür ile mi temsil edildiği çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılarak mtDNA (mitokondriyal DNA) üzerinden ortaya konulmuştur. *C. capoeta* populasyonları çeşitli enzimler kullanılarak sitokrom-b bölgesinin 400-500 bp'lik kısmına uygulanan RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) yönteminin agaroz jelinde kontrolü yapılmıştır. Agaroz Jel kontrollü sonucu kullandığımız kesme enzimlerine göre populasyonlar arasında herhangi bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Capoeta*, RFLP, sitokrom-b, Van Gölü Havzası

### Determination of Genetic Variation of Population of *Capoeta* Genusu (*Cyprinidae*) by the RFLP Method in Van Lake Basin

**Abstract:** When considered natural fish species in Lake Van basin it seen that all species endemic (*Alburnustürü tarichi*, *Alburnus timarensis*, *Barbus ercisianus*, *Capoeta kosswigi*, *Oxynoemacheilus ercisianus*). *Capoeta* species is common in the basin water resources. Reproductive size is varies between populations remarkably. Therefore the idea has emerged that *capoeta* genus may have multiple species. This study is aimed to detection of genetic variations in populations of the species in the genus *Capoeta* living in the basin. This study has determined the differences population of *Capoeta* genus represented with a single or more species in the basin by using various mtDNA enzymes. Using various enzymes RFLP Agarose gel control is made by 400-500 bp applied to part of the cytochrome-b of *C. capoeta* populason. It was concluded that there was no difference between populations depend on agarose gel control result by the cutting enzyme we use

**Keywords:** *Capoeta*, RFLP, sitokrom-b, Van lake basin

## GİRİŞ

Van Gölü havzasında doğal yayılış gösteren balıklarda *Alburnustürü tarichi*, *Alburnus timarensis*, *Barbus ercisianus*, *Capoeta kosswigi*, *Oxynoemacheilus ercisianus* türlerin havza için endemiktir. Bu türlerden *Capoeta* üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde üreme karakterlerinin dikkat çekici nitelikte farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir (Şen vd. 1999; Elp ve Katabatak 2007; Şen vd. 2008; Elp ve Şen 2009). Söz konusu karakterden dolayı havzada yayılış gösteren *Capoeta*'nın birden fazla türden oluştuğu fikri ortaya çıkmaktadır. Bu çalışma ile havzada yayılış gösteren *Capoeta* genusu populasyonlarının genetik varyasyonunun tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Su ürünlerinde genetik kaynakların korunması için uygun genetik işaretleyicilerin kullanımı büyük bir öneme sahiptir. Balık populasyonları ve bunlara ait grup temsilcilerinin tespitinde ortaya çıkan taksonomik ve sistematik problemlerin çözümü için farklı metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunların tespitinde metrik ve meristik farklı indisler yardımıyla birçok populasyon ve tür incelenmiştir. Fenotipik varyasyonun çevresel faktörlerin değişiminden etkilenmesi sınırlı kullanılmasına neden olmaktadır. Moleküler tekniklerin su ürünlerinde kullanımı ile daha önce fenotipik olarak farklı olan birçok populasyon veya türün genetik olarak farklı olmadığı ortaya



çıkıştır. Bunun sonucu moleküler belirteçlerin kullanımı birçok nedene bağlı olarak artmıştır (Conkle 1980; Nelson and Soule 1987; Velioglu vd 1998; Turan 2000).

Balıklarda mtDNA genetik farklılıkların tespitinde iyi bir işaretleyici olarak kullanılmaktadır. MtDNA'nın haploit olması ve yalnızca anneden yavruya geçmesinden dolayı (Avisé and Vrijenhoek 1987; Giles *et al.* 1980) mini-mikrosatellitler ve alloenzimler gibi nükleer işaretleyiciler kullanarak popülasyonlardaki tespiti mümkün olmayan kalıtım bilgileri, genetik özellikler ve dağılım coğrafyası hakkında önemli bilgilere ulaşmamızı sağlar.

## MATERYAL ve METOT

Balık örnekleri Van Gölü Havzası'ndan toplanmıştır. Ayrıca daha önceki yıllarda toplanan komşu havza örneklerinin genetik materyali de agaroz jelde yürütülmüştür (Tablo 1).

**Tablo 1.** Balık Materyalleri

No	Balık adı	Yakalandığı yer
1	Siraz ( <i>Capoeta capoeta</i> )	Aygır Gölü
2	Siraz ( <i>Capoeta capoeta</i> )	Çığlı Deresi
3	Siraz ( <i>Capoeta capoeta</i> )	Nazik Gölü
4	Siraz ( <i>Capoeta capoeta</i> )	Süt Deresi
5	Siraz ( <i>Capoeta capoeta</i> )	Zilan Çayı
6	Siraz ( <i>Capoeta capoeta</i> )	Cem-i mazin
7	Siraz ( <i>Capoeta capoeta capoeta</i> )	Aras havzası
8	Siraz ( <i>Capoeta capoeta umbla</i> )	Karasu havzası
9	Siraz ( <i>Capoeta tinca</i> )	Çoruh havzası

Genetik materyali olarak mtDNA'nın sitokrom-b bölgesi, primer olarak ise mtDNA'nın sitokrom-b bölgesine spesifik universal primerler kullanılmıştır (Barlett and Davidson 1991; Cocolin *et al.* 2000).

DNA saflaştırılmasında; Tris, NaCl, EDTA-2Na, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Proteinaz K (10mg/ml), Fenol, Kloroform, İzamil alkol, Etanol, Sodyum Asetat ve DNA Ekstraksiyon Solüsyonu (TNES) kullanılmıştır.

PCR uygulamalarında; Taq DNA polimeraz, dNTP mix, PCR tamponu, MgCl<sub>2</sub>, DMSO (Dimetilsülfoksit) ve dH<sub>2</sub>O (steril) kullanılmıştır.

RFLP uygulamalarında 17 enzim kullanılmıştır (MboI, HinfI, SmaI, HaeIII, XhoI, AluI, SalI, DdeI, EcoRI, BamHI, KpnI, PmeI, PmlI, BglII, PacI, ScaI ve XbaI).

Elektroforezde; Agaroz, EtBr (10mg/ml), TBE tamponu (0.89 M Tris, pH=8.3; 0.02 M EDTA), DNA işaretleyici (50 bp-10.000 bp) ve Yükleme Tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) kullanılmıştır.

Laboratuvarda yapılan işlemler sırasında; PCR, UV Görüntüleme Sistemi, Elektroforez, Mikrodalga Fırın, Etüv, Rotor Disk, Otoklav, Derin Dondurucu, Santrifüj, Mikrosantrifüj, Çeker Ocak, Saf Su Cihazı, Su trompu, Elektronik Terazı (0.001g-320g), Vorteks, pH metre, Otomatik pipetler, PCR tüpleri, Plastik tüp, cerrahi makas, pensetler, pensler, bisturi ve değişik ebatlarda cam malzemeler (beher, erlenmayer, ölçü silindiri vs.) kullanılmıştır.

## Balıklardan Doku Örneklerinin Alınması, Genomik DNA ve mtDNA Ekstraksiyonu

Fenol/Kloroform Metodu Asahida *et al.* 1996; Kai *et al.* 2005'den modifiye edilmiştir). DNA'nın kontrolünde %0.8 agaroz jeli hazırlanmıştır. 0.28 g agaroz ve 35 ml 1XTBE tamponu mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra 7 µL EtBr (10mg/ml) konulmuş ve elektroforez küveti içerisine dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yükleneyecek kuyucuklar oluşturulmuştur. Her bir kuyuya 10µL örnek ve 2 µL yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) konulmuş ve 116 V'da 20 dak yürütülmüştür.

Kullanılacak primerlerin Tm (Erime sıcaklıkları) sıcaklıkları Oligo analyzer 3.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Ancak hesaplanan bu Tm sıcaklığında iyi sonuçlar elde edilemediğinden farklı sıcaklıklar denenmiş ve en uygun Tm sıcaklığı 53°C olarak belirlenmiştir.

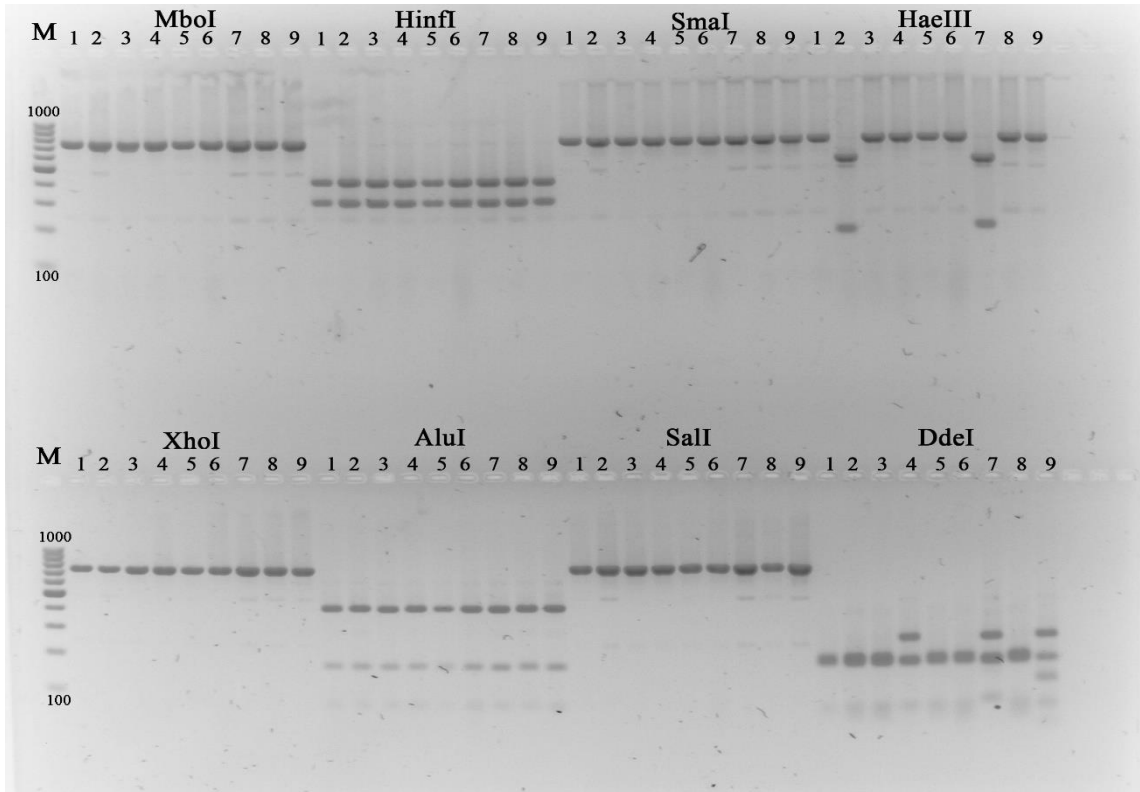
MtDNA'nın sitokrom-b bölgesi PCR ile amplifiye edilmiştir. PCR ürününün kontrolünde %1'lik agaroz jeli hazırlanmıştır. 0.35 g agaroz ve 35 ml 1XTBE tamponu mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra 7 µL EtBr (10 mg/ml) konulmuş ve elektroforez küveti içerisine dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur. DNA işaretleyiciden 10 µL ve her bir örneğe ait 10 µL PCR ürünü ve 2 µL yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) kuyulara yüklenmiştir ve 80 V'da 20 dak yürütülmüştür.

RFLP sonuçlarının kontrolü için % 1.5'lik agaroz jeli hazırlanmıştır. Yaklaşık 1.5 g agaroz ve 100 ml 1XTBE tamponu mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra 18 µL EtBr (10 mg/ml) konulmuş ve elektroforez küveti içerisine dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur. DNA işaretleyiciden 15 µL ve her bir örneğe ait RFLP ürününden 15 µL+2 µL yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) olacak şekilde yüklenmiş, 55 V'da 90 dak yürütülmüştür.

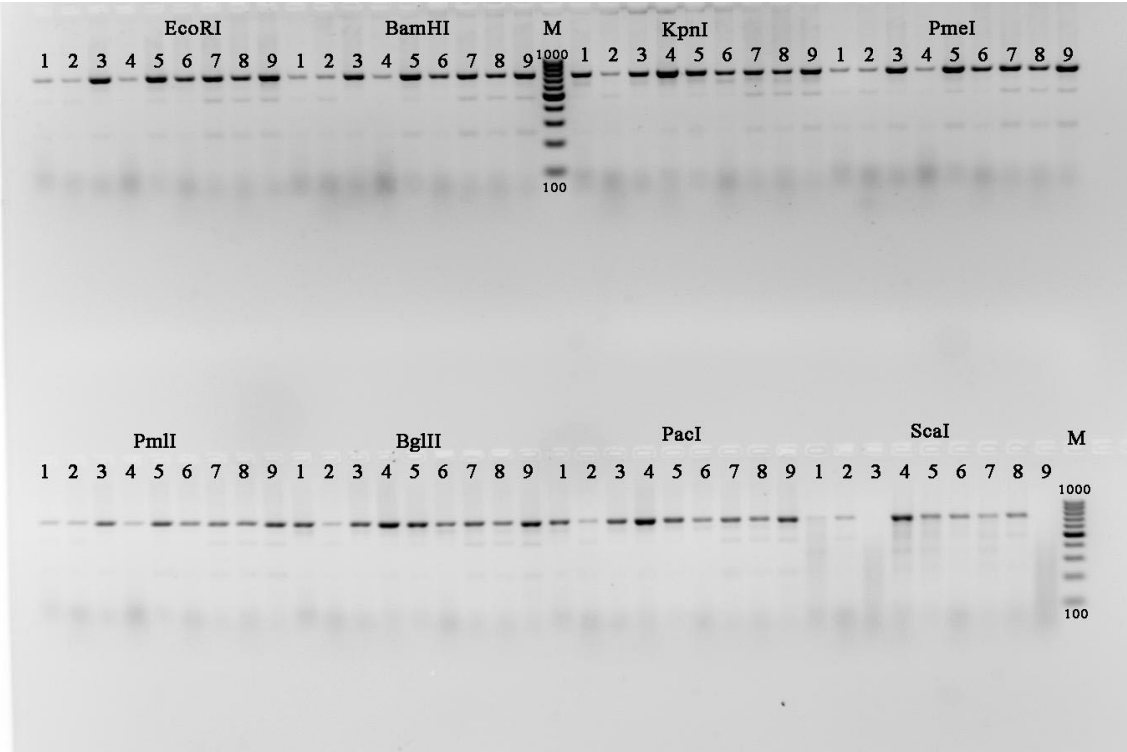
## BULGULAR

PCR ürününün kontrolünde agaroz jeli hazırlanmıştır. Tampon mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra EtBr konulmuş ve elektroforez küveti içerisine dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur. DNA işaretleyiciden ve her bir örneğe ait PCR ürünü ve yükleme tamponu kuyulara yüklenmiştir ve yürütülmüştür.

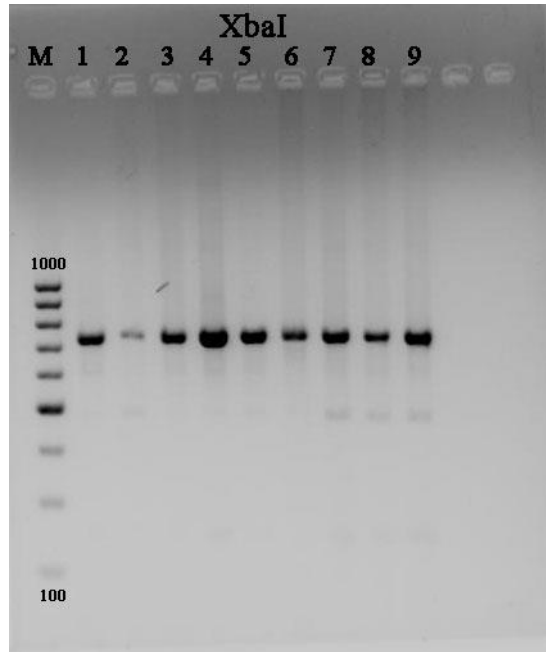
RFLP sonuçlarının kontrolü için agaroz jeli hazırlanmıştır. Agaroz ve tampon mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra EtBr konulmuş ve elektroforez küveti içerisine dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur. DNA işaretleyiciden ve her bir örneğe ait RFLP ürününden yükleme tamponu yüklenmiş, 55 V'da 90 dak yürütülmüştür (Şekil 1, 2 ve 3).



Şekil 1. Agaroz jel içerisinde yürütülen PCR ürünü görüntüsü



Şekil 2. Agaroz jel içerisinde yürütülen PCR ürünü görüntüsü



Şekil 3. Agaroz jel içerisinde yürütülen PCR ürünü görüntüsü



## SONUÇLAR

Taksonomik sınıflandırmada kullanılan PCR-RFLP yöntemi diğer tekniklere nazaran daha hassas ve güvenilirdir (Dilmeç vd 1999; Cocolin *et al.* 2000; Colombo *et al.* 2002). Çalışmada sitokrom-b bölgesinde yapılan PCR-RFLP yöntemi ile türler arasındaki genetiksel farklılığın gösterilmesi birçok balık türünde yapılan çalışmalarda da uygulanmıştır (Nielsen *et al.* 1998; Fuchs *et al.* 2000; Szalanski *et al.* 2000; Colombo *et al.* 2002).

Tsigenopoulos *et al.* (2005), *Capoeta capoeta angorae* ve *Capoeta trutta*; Durand *et al.* (2005), *Capoeta capoeta* türleri üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda sitokrom-b bölgesinin baz dizilimlerini belirlemişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada Bioedit (Anonymous 2005a) ve Clustal W (Anonymous 2005b) programlarını kullanarak; bu tür ve alt türler arasında yüksek oranda benzerlik, tekrarlamaya bölgesi ve baz dizilimlerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Çalıştığımız tür ve alt türlere yakın akrabalıkları ile bilinen bu tür ve alt türler arasındaki genetiksel farklılık, bulduğumuz sonuçları teyit eder niteliktedir.

Amplifiye ettiğimiz mtDNA'nın sitokrom-b bölgesine spesifik universal primerler kullanılmıştır (Barlett and Davidson 1991; Cocolin *et al.* 2000). PCR uygulamaları sonrasında elde ettiğimiz ürünün agaroz jelinde kontrolünde yaklaşık 400-500 bp'lik bir kısmı amplifiye ettiğimiz tespit edilmiştir. Amplifiye ettiğimiz bölgeye uygulanan RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon enzimleri, çalıştığımız *C. capoeta* populasyonlarının (Durand *et al.* 2005) sitokrom-b bölgesi baz dizilimlerinden faydalanılarak Restriction map adresinden (Anonymous 2005c); SpeI, HpaII, HinfI ve AluI olarak belirlenmiştir. Bu 4 enzimle sitokrom-b bölgesinin 400-500 bp'lik kısmına uygulanan RFLP yönteminin agaroz jelinde kontrolü yapılmıştır. Agaroz Jel kontrollü sonucu kullandığımız kesme enzimlerine göre populasyonlar arasında herhangi bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

PCR-RFLP uygulamaları ile amplifiye edip restriksiyon enzimleriyle kesilen sitokrom-b bölgesinin 400-500 baz çiftine sahip kısmının DNA Sequencer'da hangi bazlardan oluştuğunun tespit edilmesine ihtiyaç vardır. Söz konusu baz dizilimlerinin belirlenmesiyle çalıştığımız populasyonların sitokrom-b bölgesinin baz dizilimlerinde hangi bölgelerin farklı olduğunun tespiti yapmış olduğumuz çalışmanın bir ileri aşaması ve önerebileceğimiz sonuçlardan biridir. Kullandığımız sitokrom-b bölgesine spesifik universal primerlerin bu bölge ile yapılacak diğer çalışmalar içinde kullanılabilirliği görülmektedir.

## REFERANSLAR

- Anonymous, 2005a. Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), 18.05.2005.
- Anonymous, 2005b. Clustal W Programı (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), 20.05.2005.
- Anonymous, 2005c. Restriction Mapper (<http://www.restrictionmapper.org/>), 17.05.2005.
- Asahida, T., Kobayashi T., Saitoh K. and Nakayama I., 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sci.* 62:727-730.
- Avise, J.C. and Vrijenhoek R.C., 1987. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of genus *Poeliciopsis*. *Mol. Biol. Evol.* 4, 514-525.
- Barlett, S.E. and Davidson W.S., 1991. Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b gene. *Can J. Fish Aquatic Sci* 48(2), 309-317.
- Cocolin, L., Dagaro E., Manzano M., Lanari D. and Comi G., 2000. Rapid PCR-RFLP Method for the Identification of Marine Fish Fillets (Seabass, Seabream, Umbrine and Dentex). *Journal of Food Science.*, 65, 8.
- Colombo, F., Cerioli M., Colombo M., Marchisio E., Malandra R. and Renon P., 2002. A simple polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for the differentiation of cephalopod mollusc families Loliiginidae from Ommastrephidae, to avoid substitutions in fishery field. *Food Control* 13, 185-190.
- Conkle, M.T., 1980. Amount and Distribution of Isozyme Variation in Various Conifer Species. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> Meeting. Canadian For. Ser., 109-117.
- Dilmeç, F., Matur A., Alhan E. ve Aksaray N., 1999. Çukurova Bölgesi Visseral Leishmania Etkenlerinde Total DNA Restriksiyon Endonükleaz Profilleri. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24, 4, 158-164.
- Durand, J.D., Tsigenopoulos C.S., Unlu E. and Berrebi, P., 2005. Phylogeny and biogeography of the family Cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome-b DNA evolutionary significance of this region, (Yayınlanmamış), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 18.07.2005.





- Elp, M., Karabatak, M., 2007. A Study on *Capoeta capoeta*(*Guldenstaedt.1772*) Population Living in Koçköprü Dam Lake, Van, Turkey
- Elp, M., Şen, F., 2009. Byological Properties of *Capoeta capoeta*(*Guldenstaedt.1773*) Population Living in Karasu Stream, Van, Turkey
- Fuchs, H., Schlee P., Blusch J., Werner T., Stein H., and Rottmann O., 2000. Phylogenetic studies in cyprinid species from central Europe by cytochrome b sequences of mitochondrial DNA. J. Appl. Ichthyol. 16, 79-82.
- Giles, R.E., Blanc H., Cann H.M. and Wallace D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6715-6719.
- Kai, W., Kikuchi K., Fujita M., Suetake H., Fujiwara A., Yoshiura Y., Ototake M., Venkatesh B., Miyaki K. and Suzuki Y., 2005. A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. Genetics: Published Articles Ahead of Print, published on June 21.
- Nelson, K. and Soule M., 1987. Genetical conservation of exploited fishes. Population Genetics and Fishery Managment, Ryman, N. and F. Utter (eds.). University of Washington Press, 420, Seattle.
- Nielsen, E.E., Hansen M.M. and Mensberg K.L.D., 1998. Improved primer sequences for the mitochondrial ND1, ND3/4 and ND5/6 segments in salmonid fishes: application to RFLP analysis of Atlantic salmon. Journal of Fish Biology. 53, 216-220.
- Szalanski, A.L., Bischof R. and Mestl G., 2000. Population genetic structure of Nebreska paddlefish based on mitochondrial DNA variation. Transaction of the American Fisheries Society 129, 1060-1065.
- Şen, F. Çetinkaya, O., Elp, M., 1999. Nazik Gölü(Ahlat-Bitlis)Siraz(*Capoeta capoeta*, G., 1773) Populasyonu Üzerinde Bir Araştırma. X. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 22-24 Eylül, Temel Bilimler ve Biyoloji Çeşitlilik Sektörleri, Adana, s 465-475
- Şen, F., Elp, M., Kankaya, E., 2008. Growth and Reproduction Properties of *Capoeta capoeta*(*Guldenstaedt.1772*)in Zerne Dam Lake, Van, Turkey
- Tsigenopoulos, C.S., Durand J.D., Unlu E. and Berrebi P., 2005. Evidence for rapid radiation of Barbus species during the Messinian Lago Mare phase of the Mediterranean Sea inferred from complete cytochrome b sequences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Yayınlanmamış), 18.07.2005.
- Turan, C., 2000. Doğu Anadolu Bölgesi IV. Su Ürünleri Sempozyumu 28-30 Haziran 2000, 914, Erzurum.
- Velioğlu, E., Çengel B., Kaya Z. ve Tolun A.A., 1998. Kazdağları'ndaki Doğal Karaçam (*Pinus nigra* Arnold. subspecies *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) Populasyonlarında İzoenzim Çeşitliliği ODC: 165.3. Orman Bakanlığı Yayın No: 75 ISBN: 975-8273-18-3 Müdürlük Yayın No: 11. Ankara.