

***Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)' un İki Farklı
Populasyonunda Genetik Polimorfizimin Araştırılması**

**Two Different Population of *Clarias gariepinus* (Burchell,
1822) searched for Genetic polymorphism**

Yasemin KAÇAR¹, Ayşe KILINÇ²

¹Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ykacar@gmail.com

²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi

ÖZET

Bu çalışmada Hatay bölgesinde yer alan Asi ve Mersin bölgesinde Göksu Nehir'lerinde yetiştiriliciliği yapılan *Clarias gariepinus* bireylerinin genetik polimorfizmi araştırıldı. Mikrosatellit lokuslar Cga01, Cga02, Cga05, Cga06, Cga09 ve Cga10 ayrı ayrı PZR ile çoğaltılarak karşılaştırıldı. Cga01 ve Cga02 lokusları için yaklaşık 100 bp; Cga05 ve Cga09 lokusları için yaklaşık 200bp; Cga06 ve Cga10 lokusları için yaklaşık 150bp uzunluğunda DNA bantları elde edildi. Araştırılan mikrosatellit lokuslarının Asi ve Göksu bireyleri arasında DNA uzunluğu bakımından bir farklılık göstermediği bulundu.

Anahtar Kelimeler: *Clarias gariepinus*, Mikrosatellit lokus, Asi ve Göksu Nehri, PZR.

ABSTRACT

In this present study, individuals of two different cultivates of *Clarias gariepinus* species living in the Orontes river of Hatay region and Göksu river of Mersin region were genetically analyzed. Genomic DNA microsatellite loci Cga01, Cga02, Cga05, Cga06, Cga09 and Cga10 were separately amplified and compared. Cga01 and Cga02 loci amplification resulted in approximately 100 bp DNA fragment; for Cga05 and Cga09 loci app. 200bp; for Cga06 and Cga10 loci 150bp DNA fragment were obtained. DNA length polymorphism for all analyzed microsatellite loci did not show any difference.

Keywords: *Clarias gariepinus*, Microsatellite loci, Orontes and Göksu River, PCR.

GİRİŞ

Ülkemizde ekonomik öneme sahip olan ve kültür balıkçılığı yapılan Karabalık olarak bilinen *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)'un Türkiye'deki doğal dağılım alanının Adana, Antakya ve Mersin bölgelerindeki nehir ve göl sistemlerinde bulunduğu

bilinmektedir. Afrika kökenli olan bu balığın Avrupa, Asya ve Türkiye'ye geliştiği ticari yollarla olmuştur (Teugels, 1996; Skelton and Teugels). Ülkemize ilk defa antik dönemde (M.Ö 3000-Tunç Devri) ticari yollardan gelmiş olan karabalığın bugün mevcut populasyonların kaynağını Cumhuriyet Dönemi'nde DSI tarafından aşılandığı bilinmektedir (Ergene et.al., 1999; Geldiay ve Balık, 1996; Kosswig, 1969). Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan ihtiyolojik çalışmalarla *Clarias gariepinus*'un Türkiye'deki doğal dağılım alanları doğuda Asi, Ceyhan, Seyhan, Berdan, Göksu Nehirleri ve Göksu deltasında yer alan Akgöl ve batıda yer alan Acısu ve Aksu nehirlerinde görüldüğü bildirilmiştir (Kosswig, 1969; Kuru, 1979; Kuru, 1980; Ergene, 1994; Kuru, 2004; Küçük, et.al., 2007).

Günümüzde kültür balıkçılığının önemli sorunlarından birisi doğal türlerin yok olmasıyla birlikte o türe ait gen havuzunun daralmasıdır. Yeni gen akışı sağlanamaması durumunda bir süre sonra popülasyonda infertil bireylerin fazlalaşmasıyla kültür balıkçılığını uzun vadede etkilemesi beklenmektedir. Mevcut gen havuzu potansiyelinin saptanabilmesi çekirdek ve mitokondriyal DNA üzerinde moleküler genetik çalışmalar ile mümkün olmaktadır. Balık popülasyonlarının analizinde otuz yıldır moleküler belirteçler kullanılmakta ve her geçen gün yenileri tanımlanarak artmaktadır. Balık genetiğinde bugün mikrosatellit lokusların belirlenmesi ve her türe özgü mikrosatellit belirteçlerin tanımlanması önem kazanmaktadır. Balıklar için belirlenmiş mikrosatellit belirteçler genom haritalama, akrabalık derecesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. *Cyprinid*'ler, *Salmonid*'ler ve *Clarid*'ler için mikrosatellit belirteçler tanımlanmıştır (O'connell and Wright, 1997). *Clarid*'ler içinde ilk kez *Clarias gariepinus* türünde mikrosatellit belirteçler Galbusera et.al. (1996) tarafından izole edilerek tanımlanmıştır. *C. gariepinus* DNA'sında GT tekrar içeren yedi mikrosatellit lokus (Cga01-03; Cga05, Cga06; Cga09 ve Cga10) tanımlanmış ve bunlar için primer setleri tasarlanmıştır. Mikrosatellit lokus primerleri kullanılarak *C. gariepinus*, *C. anguillaris*, *C. alluardi* ve *Heterobranchus longifilis*'in allel çeşitliği araştırılmıştır (Galbusera et.al., 1996).

Ekonomik öneme sahip olan ve kültür balıkçılığı yapılan karabalığın ülkemizde populasyon analizi çekirdek, mitokondriyal ve allozim seviyesinde henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada Göksu ve Asi nehirlerinde yaşayan *C. gariepinus*'un iki farklı populasyonun çekirdek DNA'sında polimorfik lokuslar araştırılmıştır. Göksu nehri ve deltasının sulak alanlarında yaşayan *C. gariepinus*'un meristik, morfometrik analizlerinden başka karyolojisinin de belirlenmesiyle ilk genetik çalışma yapılmıştır (Ergene ve ark., 1998; 1999). Ancak bugün populasyon genetiği alanında gen seviyesinde araştırmalara da gerek duyulmaktadır. Bugün birçok tür için saptanan genetik belirteçler aracılığıyla tür ve populasyon hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir. Genetik belirteçlerin kullanımı özellikle balıkçılıkta doğal stok analizi, kültür balıkçılığı, taksonomi veya sistematik çalışmalarda etkin olarak kullanılmaktadır.

Yetiştiriciliği yapılan *C. gariepinus*'un moleküler düzeydeki genetik analizi sonucu elde edilecek bilgilerin ülkemiz kültür balıkçılığına katkı sağlaması amaçlanmaktadır. Populasyon içi ve populasyonlar arası genetik benzerlik ve farklılıkların saptanması biyolojik kaynaklarımızın yönetiminin etkin yapılabilmesi için şart olmaktadır.

YÖNTEM

Asi'den 3 ve Göksu'dan 4 olmak üzere yakalanan 7 canlı karabalık örneği laboratuara getirildikten sonra uygun akvaryumlara konarak doku örneği alıncaya kadar bekletildi. Hayvanlar sersemletildikten sonra servikal dislokasyon uygulandı ve çıkartılan dalaktan parça alınarak bekletilmeden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Organın kalan kısımları steril 10 ml'lik polikarbonat tüplere konuldu ve - 80°C hızla donduruldu ve saklandı.

Total DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için hayvan dokusuna özelleşmiş total DNA izolasyon kiti (DNA purification from tissues QIAamp DNA mini kit, Qiagen Firması) kullanıldı. Her bir balık örneğinin dalak dokusundan izolasyonu sonucu elde edilen total DNA örnekleri 1,5 ml'lik mikrofüj tüpleri içerisinde +4°C'de saklandı.

Mikrosatellit Lokusların PZR Yöntemi İle Çoğaltılması

Galbusera ve ark. (1996) tarafından Cga01, Cga02, Cga05, Cga06, Cga09, Cga10 olarak tanımlanmış olan mikrosatellit lokuslarına uygun primer setleri (Tablo 1) kullanılarak karabalık DNA örnekleri PZR yöntemiyle ayrı ayrı çoğaltıldı. Her lokusa özgü “reverse” (R) ve “forward” (F) primerlerinden oluşan primer seti, yapışma sıcaklığı ve MgCl₂ konsantrasyonu Tablo 1’de verilmiştir. PZR tepkime karışımı total hacim 25 µl içerisinde Taq buffer (1X), dNTP 0,2 mM, primerler 1 pmol, MgCl₂ konsantrasyonu Tablo 1.de belirtildiği gibi, Taq DNA polimeraz 0,5 U, kalıp DNA 100-200ng (2µl) olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR döngü koşulları başlangıç denatürasyonu 94°C’ de 240 sn, denatürasyon 94°C’ de 45 sn, Çizelge 1. deki yapışma sıcaklığı 30 sn, ve 72 °C, 30 sn uzatmadan oluşan 30 döngülük çoğaltma ve son uzatma 72 °C, 600 sn olan program Techne TC-512 cihazında uygulandı.

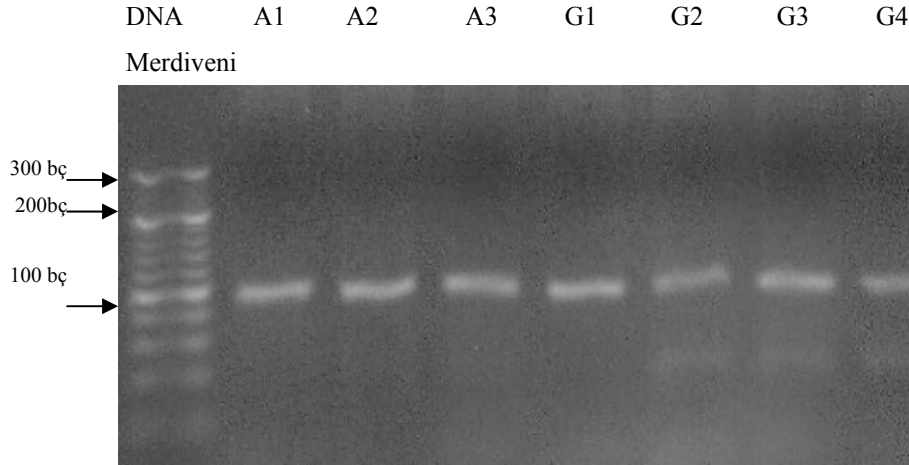
Tablo 1. Primerlerin baz dizisi, yapışma sıcaklığı ve MgCl₂ konsantrasyonu

Primer	BAZ DİZİSİ (5’-3’)	Yapışma Sıcaklığı °C	PZR-DNA uzunluğu (bp)	MgCl ₂ Derişimi (mM)
Cga01	F:GGCTAAAAGAACCCTGTCTG R:TACAGCGTCGATAAGCCAG	59	92-104	1
Cga02	F:TACAGCGTCGATAAGCCAGG R:ACCTCTGAGATAAAACACAGC	60	102-110	1
Cga05	F:TCCACATTAAGGACAACCACC R:TTTGCAGTTCACGACTGCCG	62	204-212	1.5
Cga06	F:CAGCTCGTGTTTAATTTGGC R:TTGTACGAGAACCGTGCCAGG	56	134-142	1.5
Cga09	F:CGTCCACTTCCCCTAGAGCG R:CCAGCTGCATTACCATACATG	59	180-196	1
Cga10	F:GCTGTAGCAAAAATGCAGATG R:TCTCCAGAGATCTAGGCTGTC	59-60	102-138	1

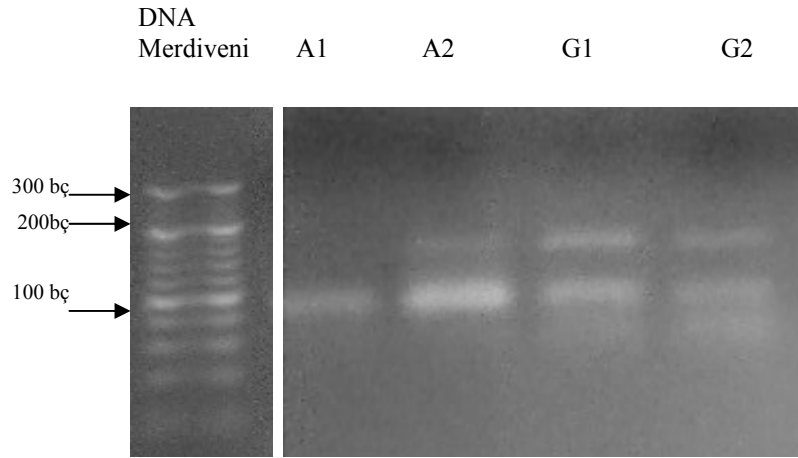
Çalışmada elde edilen DNA'ların (genomik DNA ve PZR ile çoğaltılan DNA) miktarı, kalitesi ve uzunluklarını belirlemek için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. DNA örnekleri için agaroz konsantrasyonu %2 olarak kullanıldı. Ayrıca her jele örneklerle birlikte 300 ile 25 bp arasında uzunluklarda DNA merdiveni uygulandı.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Asi Nehri'nden 3 ve Göksu Nehri'nden 4 karabalık bireyinin Cga01 mikrosatellit lokusu PZR sonucu şekil 1de, Cga02 şekil 2 de, Cga05 ve Cga 06 şekil 3, Cga09 ve Cga10 şekil 3'de gösterilmiştir. Cga01 lokusu için Asi ve Göksu'dan alınan *Clarias gariepinus* örneklerinin hepsinde aynı uzunlukta DNA (100 bç) elde edildi. Cga02 için hem Asi hem de Göksu'dan alınan *Clarias gariepinus* örnekleriyle yaklaşık 100 bç uzunluğunda PZR bandı elde edildi.

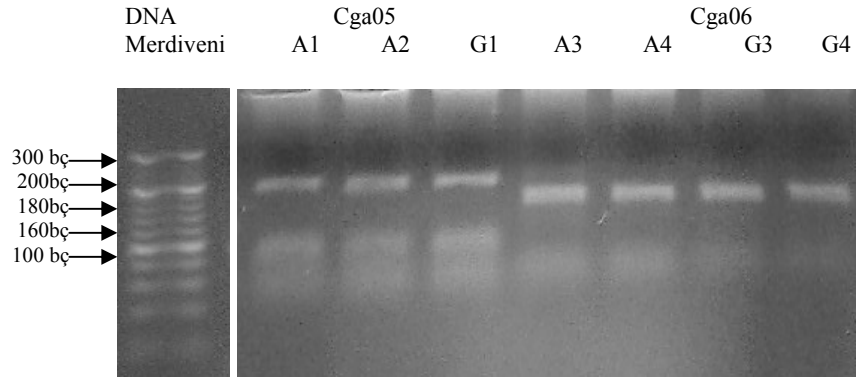


Şekil 1. Asi (A1-3) ve Göksu (G1-4) *Clarias gariepinus* örneklerinin Cga01 mikrosatellit lokusu PZR-DNA bantları (%2'lik agaroz jel)

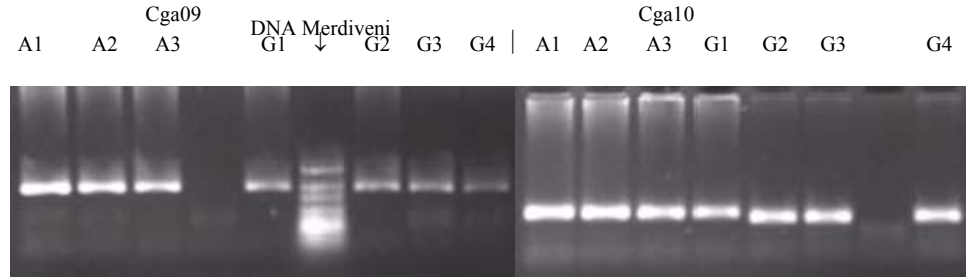


Şekil 2. Asi (A1-2) ve Göksu (G1-2) *Clarias gariepinus* örneklerinin Cga02 mikrosatellit lokusu PZR-DNA bantları (%2'lik agaroz jel)

İncelenen Asi ve Göksu'ya ait tüm karabalık örneklerinin Cga05 mikrosatellit lokusu için yaklaşık 200 bp'lik; Cga06 için yaklaşık 150 bç'lik; Cga09 lokusu için yaklaşık 200 bp'lik; Cga10 lokusu için yaklaşık 150 bç'lik DNA bantları elde edildi.



Şekil 3. Asi (A1-2) ve Göksu (G1) *C. gariepinus* örneklerinin Cga05 mikrosatellit ve Asi (A3-4) ve Göksu (G3-4) örneklerinin Cga06 lokusu PZR-DNA bantları (%2'lik agaroz jel)



Şekil 4. Asi (A1-3) ve Göksu (G1-4) *C. gariepinus* örneklerinin Cga09 mikrosatellit PZR -DNA bantları (200 bç) ve Asi (A3-4) ve Göksu (G3-4) örneklerinin Cga10 lokusu PZR-DNA bantları (150 bç). (%2'lik agaroz jel)

Bu çalışmada Asi ve Göksu nehrinde yetiştiriciliği yapılan *C. gariepinus* bireylerinin altı mikrosatellit lokus moleküler belirteç olarak kullanarak iki populasyon arasındaki genetik çeşitlilik araştırılmıştır. Daha önce Ergene (1994) ve Ergene ve ark. (1998) Göksu Deltası Akgöl-Paradeniz ve Asi Nehri *C. gariepinus* (*Clarias lazera*) bireylerinin morfometrik analizleri sonucu Teugels'in (1996) yaptığı çalışmayla karşılaştırmış ve Göksu'daki *C. gariepinus* bireylerinin Afrika'daki bireylerden farklılık gösterdiğini bulmuştur. Daha sonra Ergene ve ark. (1999) Göksu deltası populasyonun kromozom analizini yapmış ve *C. gariepinus* için kromozom yapısını 18 M, 26 SM, 12 A ($2n=56$) bulmuşlardır. Ozouf-Costaz ve ark. (1990) *C. gariepinus* için buldukları kromozom sayısı Göksu bireyleriyle aynı ancak kromozom yapısında farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle genetik farklılığın daha net belirlenebilmesi için moleküler genetik yöntemler kullanılması önerilmiştir.

Bu çalışmada Asi ve Göksu Nehir'lerinde ait *Clarias gariepinus* bireylerinin genetik polimorfizmi çekirdek DNA'sındaki altı farklı mikrosatellit lokus PZR yöntemiyle araştırıldı. Araştırılan mikrosatellit lokuslarının Asi ve Göksu bireyleri arasında DNA uzunluğu bakımından bir farklılık göstermediği bulundu. Mikrosatellit lokusların içerdiği tekrar dizisi bakımından farklılığın belirlenmesi için elde edilen DNA

bantlarının dizi analizinin yapılması ve mitokondriyel DNA belirteçlere bakılması gerekmektedir. Benzer çalışmalarda tek bir belirtecin özellikle populasyonlar arası çalışmalarda yetersiz olabileceği gösterilmiştir. Örneğin Afrika'daki Senegal Irmağında yaşayan *C. gariepinus* ve *C. anguillaris* 'in genetik analizlerinde mitokondriyel DNA-RFLP, allozim ve mikrosatellit çalışmaları morfometrik verilerle birlikte değerlendirilmesi sonucu her iki türün de birbirine çok yakın olduğu bulunmuştur.(Galbusera et.al., 1996; Agnese et.al. 1997; Agnese and Teugels, 2005).

Teşekkür

Bu çalışmayı destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (proje no:BAP-FBE BB (AK) 2009-8) teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Agnese, J. F., Teugels, G. G., Galbusera, P., Guyomard, R., Volckaert, F. (1997). Morphometric and Genetic Characterization of Sympatric Populations of *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris* from Senegal. *J. Fish Biol.*, 50, 1143–1157
- Agnese, J. F., Teugels, G. G. (2005). Insight Into the Phylogeny of African Clariidae (Teleostei, Siluriformes): Implications for Their Body Shape Evolution, Biogeography and Taxonomy. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36, 546-553.
- Ergene, S. (1994). *Silifke Akgöl-Paradeniz Dalyanında Yaşayan Bazı Ekonomik Balık Türlerinin Büyüme Oranları, Üreme ve Beslenme Özellikleri*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 207
- Ergene, S., Yalcın, S. ve Karahan, A. (1998). *İki Farklı Lokalitede Yaşayan Clarias lazera'nın (Valenciennes, 1840) Metrik ve Meristik Karakter Değişimi Üzerine Ön Çalışma*. III. Su Ürünleri Sempozyumu, Erzurum, 569-574.
- Ergene, S., Portakal, E. ve Karahan, A. (1999). Karyological Analysis and Body Proportion of Catfish (Clariidae, *Clarias lazera*, Valenciennes, 1840) in the Göksu Delta, Turkey. *Tr. J. Zoology*, 23, 423-426.
- Galbusera, P., Volckaert, F. A., Hellemans, B., Ollevier, F. (1996). Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Molecular Ecology*, 5, 703-705.
- Geldiay, R. ve Balık, S. (1996). Türkiye Tatlısu Balıkları. İzmir: E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları. sf. 410.

- Kosswig, C. (1969). New Contributions to the Zoogeography of Fresh Water Fish of Asia Minor, Based on Collections Made Between 1964-1967. *Israel Journal of Zoology*, 18, 249-254.
- Kuru, M. (1978). The Freshwater Fish of South-Eastern Turkey 2 (Euphrates_Tigris System). *Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering*, 7-8, 105-114.
- Kuru, M. (1980). *Türkiye Tatlı Su Balıkları Katalogu*. Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları Yardımcı Kitaplar Dizisi-1, 73.
- Kuru, M. (2004). Türkiye İçsu Balıklarının Son Sistematik Durumu. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24(3), 1-21.
- Küçük, F., Gümüş, E., Güle, İ. and Güçlü, S. S. (2007). The Fish Fauna of the Göksu River (Türkiye): Taxonomic and Zoogeographic Features. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7, 53-63.
- O'connell, M. and Wright J. M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 331-363.
- Ozout Costaz, C., Teugels, G. G. and Legendre, M. "Karyological Analysis of Three Strains of the African Catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae) Used in Aquaculture", *Aquaculture*, 87, 271-277 (1990)
- Skelton, P., Teugels, G. (1992). Neotype Description for the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Pisces: Siluroidei: Clariidae). *Ichthyological Bulletin of the J. L. B. Smith Institute of Ichthyology*, 56, 1-8.
- Teugels, G. G. (1996). Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of Catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): An Overview. *Aquat. Living Resource*, 9, 9-34.

SUMMARY

Clarias gariepinus (Burchell, 1822) known as "karabalık" cultivated in Turkey is an economically important fish species. Several ichthyological studies revealed that natural distribution of *Clarias gariepinus* species in Turkey are river and fresh water systems of Adana, Antakya and Mersin region namely Orontes, Ceyhan, Seyhan, Berdan, Göksu rivers, Akgöl lake in Göksu Delta in the east and in the west Acısu and Aksu river (Kosswig, 1969; Kuru, 1979; Kuru, 1980; Ergene, 1994; Kuru, 2004; Küçük, et.al., 2007). The African originated catfish *Clarias gariepinus* (Skelton and Teugels, 1992; Teugels, 1996) introduced to Asia, Anatolia and Europa by trading. Archeozoological evidences date the trading activities in Anatolia in antic age. The resent *C. gariepinus*

population living in Turkey were cultivated for 80 years (Kosswig, 1969; Geldiay ve Balık, 1996; Ergene et.al., 1998).

Since natural fish populations disappearing, a bottleneck expected in cultivated fish populations and the genetic variability of fish cultivates became an important aspect. To discriminate among fish species and populations various molecular markers were developed and applied in last 30 years. In the last ten years from various fish species such as Cyprinid's, Salmonid's and Clarid's microsatellite loci markers were isolated and applied for population genetic studies, parentage analysis and genome mapping (O'connell and Wright, 1997). Among Clarid's firstly in *Clarias gariepinus* species microsatellite markers were isolated and used (Galbusera et.al., 1996). In *C. gariepinus* genomic DNA seven GT reach microsatellit loci were identified (Cga01-03; Cga05,Cga06; Cga09 and Cga10) and appropriate primer sets designed for PCR amplification. These microsatellite loci primers were used to identify and analyse alel variability of *C. gariepinus*, *C. anguillaris*, *C. alluardi* and *Heterobranchus longifilis* (Galbusera et.al., 1996).

Meristic and morphometric analysis of *C. gariepinus* (*Clarias lazera*) species living in the Orontes river of Hatay regoin and Göksu river of Mersin region were compared. Also caryotype of both populations were determined and caryotype found as 18 M, 26 SM, 12 A ($2n=56$). (Ergene et.al., 1998; 1999). Chromosome number of African *C. gariepinus* population (Ozouf-Costaz et.al.,1990) were same with Göksu population but chromosome structure and patttern differ from each other (Ergene et.al.,1999). Further moleculer genetic analysis were needed to resolve differences between African and Anatolian populations. There were several tools developed for genetic characterization such as allozyme variation, mitochondrial DNA-RFLP, mitchondrial markers (Cytc; ND1-5) and microsatellit loci polymophizm (Agnese et.al. 1997).

In this study, cultivates of *C. gariepinus* species of Orontes river in Hatay region and of Göksu river in Mersin region were compared for microsatellite loci alel variability. DNA isolated from spleen tissue of *C. gariepinus* individuals of Göksu and Orontes river and subjected to PCR amplification and microsatellite loci. PCR-DNA of Cga01,

Cga02, Cga05, Cga06, Cga09, Cga10 amplified by PCR for both cultivates and were compared.