

# KARADENİZ ZOOPLANKTON TÜRLERİNİN BELİRLENMESİNDE DNA BARKODLAMA VE MORFOLOJİK YÖNTEMLERİN BİRLİKTE KULLANILMASI

İ.H. Miraloğlu<sup>a\*</sup>, İ. D. Öztürk<sup>b</sup>, M. Kolukırk<sup>ad</sup>, A.E. Kideys<sup>b</sup>, O. İnce<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

<sup>b</sup>Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Enstitüsü, Erdemli, Mersin

<sup>c</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul

<sup>d</sup>Engy Ltd. Şti. İstanbul

(\*i.miraloglu@gmail.com)

## ÖZET

Biyoeçşitliliğin azalmasının önemi her geçen yıl daha da iyi anlaşılmakta olmasına rağmen, antropojenik faaliyetlerin artmasıyla çözülmesi çok zor bir küresel problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyoeçşitlilikle ilgili sorunun giderilmesinde atılacak adımların başında, var olan türlerin kolayca izlenmesi ve yeni türlerin hızla saptanması gelmektedir. Özellikle deniz ekosisteminin anahtar grubu olan zooplankton türlerinin tanımlanması oldukça zor olup, ileri seviyede uzmanlık, efor ve zaman gerektirmektedir. Dolayısı ile zooplankton türlerinin rutin izlenmesi pratikte kolay olmamaktadır. Bu bağlamda klasik morfolojik tabanlı tür tanımlama metodları yetersiz kalacağından, yeni tekniklerin pratik faydaları önem kazanmaktadır. Bu çalışmada amaç Karadeniz zooplankton türlerini hem morfolojik ve hem de DNA barkodlama yöntemleri ile tanımlayarak, zooplankton türlerinin moleküler yöntemlerle hızlı tanımlama analizlerinin yapılmasının mümkün olup olmadığını araştırmaktır.

Bu amaçla, proje süresince Karadeniz'in Türkiye kıyılarından seçilen 8 noktadan örneklemeler yapılmış, alınan örnekler morfolojik ve moleküler incelemeler için saklanmıştır. Zooplankton türlerinin morfolojik analizleri tamamlandıktan sonra, örneklerin mitokondriyal DNA'ları izole edilmiştir. Karadeniz'de rastlanılan ve rastlanılması muhtemel görülen organizma gruplarının sitokrom C oksidaz (COI) genine yönelik primerler hem spesifik hem evrensel olarak dizayn edilmiş ayrıca daha önce bildirilmiş bazı evrensel primerler de referans olarak sentezletirilmiştir. Bu primerlerle sanal polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapılmış ve en uygun adaylar seçilerek gerçek laboratuvar ortamında kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) işlemine başlanmıştır. Optimizasyon işlemlerinin ardından elde edilen sonuçlara göre seçilen evrensel primerlerle tüm örneklerin COI genleri qPCR ile çoğaltılmış, uygunlukları erime ve amplifikasyon eğrileri yardımıyla teyit edilmiştir. Ardından bu örnekler Sanger dizileme metodu ile sekanslanmış ve elde edilen sekanslar analiz edilerek uluslararası DNA veritabanlarında taratılmış, eşleşen organizmalar kaydedilerek morfolojik analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada Karadeniz zooplanktonunun bazı türlerinin tanımlanmasının DNA barkodlama yöntemi ile yapılabileceği gözlenmiştir. Bu yöntem (mitokondriyal DNA izolasyonu ve qPCR) toplam 4 saat içerisinde tamamlanabilmektedir. Her ne kadar, morfolojik metodlar daha güvenilir ise de, DNA barkodlama analiz çalışmalarının artması ile hemen her türün tanımlanmasına yönelik bilgi birikimi yakın gelecekte oluşacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** DNA barkodlama, PCR, qPCR, COI, zooplankton

# CLASSIFICATION OF ZOOPLANKTON SPECIES IN THE BLACK SEA USING DNA BARCODING COMBINED WITH MORPHOLOGICAL METHODS

İ.H. Miraloğlu<sup>a\*</sup>, İ. D. Öztürk<sup>b</sup>, M. Kolukırk<sup>ad</sup>, A.E. Kideys<sup>b</sup>, O. İnce<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Boğaziçi University, Institute of Environmental sciences, İstanbul*

<sup>b</sup>*Orta Doğu Teknik University, Institute of Marine Sciences, Erdemli, Mersin*

<sup>c</sup>*İstanbul Teknik University, Department of Environmental Engineering, İstanbul*

<sup>d</sup>*Engy Ltd. Şti. İstanbul*

*\*(i.miraloglu@gmail.com)*

## ABSTRACT

Although the importance of biodiversity decline has gained a much better understanding in recent years as a consequence of the increase in anthropogenic activities, this global problem is still extremely difficult to solve. The first steps in order to overcome problems related to biodiversity involve the straightforward monitoring of existing species and the rapid detection and observation of new species. In particular, the identification of zooplankton species considered a key group of the ecosystem is one milestone which is a challenging and difficult task requiring advanced expertise, effort and time. Therefore the routine monitoring of zooplankton species which in practice is not an easy task is being replaced. In this context, because of inadequate classical morphology-based species identification methods, the new technique has gained importance due to its practical benefits. By identifying the types of zooplankton species in the Black Sea using both morphological and DNA barcoding methods, this study aims to compare these two techniques and to determine whether molecular methods can be used to rapidly identify zooplankton species.

For this purpose, sampling was performed at eight stations on Turkey's Black Sea coast, samples taken were stored for morphological and molecular studies. After completion of the morphological analysis of zooplankton species, the mitochondrial DNA from the samples was isolated. Primers of the Cytochrome oxidase gene (COI) belonging to organisms occurring in the Black Sea were specifically or universally designed. Additionally, some universal primers were synthesized as reference markers. With these primers, a virtual polymerase chain reaction (PCR) was performed, the most suitable candidates were chosen and in the laboratory a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was initiated. According to the results obtained after the optimization process, the COI genes of all the samples selected by universal primers replicated by qPCR, eligibility was confirmed with the aid of amplification and melting curves. Subsequently, these samples were sequenced by the Sanger sequencing method, analysis of sequences obtained was performed by scanning the international DNA database. Matching organisms were recorded and compared with the results of morphological analysis.

In this study it was observed that some species of Black Sea zooplankton can be identified using the DNA barcoding method. This method (optimized method for the identification of groups of organisms, even mitochondrial DNA isolation and qPCR for zooplankton type organisms of different groups) can be completed in a total time of 4 hours. Although morphological methods are still considered to be more reliable, an increase in DNA barcoding analysis and the identification of which groups of organisms are suitable will become widespread since DNA barcoding will provide information for identification of almost every species type in the near future. This method (optimized method for the identification of groups of organisms, even mitochondrial DNA isolation and qPCR for zooplankton type organisms of different groups) can be completed in a total time of 4 hours.

**Keywords:** DNA Barcoding, PCR, qPCR, COI gene, zooplankton