

DNA Barcoding and Phylogeny of *Ambystoma mexicanum* Cultivated as a Model Organism in Regenerative Medicine Research at Mersin University Aquaculture Units of the Faculty of Fisheries

Badel ARSLAN^{1*}, Serdar SÖNMEZ², Cengiz KORKMAZ³, Gülsemin ŞEN AĞILKAYA³, Gamze AYAR¹

¹Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, Institute of Health Science, Mersin University, Mersin, Turkey.

²Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Adıyaman University, Adıyaman, Turkey

³Faculty of Fisheries and Science, Mersin University, 33169, Yenişehir, Mersin, Turkey

ORCID ID: Badel ARSLAN: <https://orcid.org/0000-00020004-3567>; Serdar SÖNMEZ: <https://orcid.org/0000-0002-4370-0539>; Cengiz KORKMAZ: <https://orcid.org/0000-0001-7231-9983>; Gülsemin ŞEN AĞILKAYA: <https://orcid.org/0000-0001-5108-0109>; Gamze AYAR: <https://orcid.org/0000-0002-5288-4755>

Received: 27.10.2021

Accepted: 01.12.2021

Published online: 05.12.2021

Issue published: 31.12.2021

Abstract: *Ambystoma mexicanum* belongs to the family Ambystomatidae. It is one of the 30 species of the genus *Ambystoma*, which lives in a wide geography from southern Mexico to southern Alaska. It is accepted as a model organism in evolutionary biology, developmental biology, and regenerative medicine research. It can regenerate the brain, heart, and kidney organs as well as limb regeneration. Accurate identification of the model organism is important for the reproducibility and comparability of experiments. We aimed to confirm the species identification of axolotls using integrated taxonomic methods that were grown at Mersin University Aquaculture Units of the Faculty of Fisheries. Cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) and cytochrome b (*Cytb*) gene fragments of mtDNA sequences were used as molecular markers for phylogenetic analyses and species delimitation methods and compared with the sequences that were submitted to NCBI GenBank as species of *Ambystoma*. In the analyses that were conducted with different data sets, the individuals in question were grouped as a candidate species with the *A. mexicanum* species whose sequences were given in previous studies. All sequences obtained in this study and *A. mexicanum* sequences obtained from NCBI GenBank were grouped as haplotypes and their genetic distances were found to be 0 and it was determined that the individuals which were the subject of this study definitely belong to the *A. mexicanum* species. The results revealed that some species within the genus *Ambystoma*, especially *A. barbouri* and *A. texanum*, may be species complexes. On the other hand, *A. mexicanum* was grouped together with *A. andersoni* as candidate species in all analyses performed with the combined datasets of *COI*, *Cytb*, and *COI+Cytb*. These results revealed that the taxa in question are paraphyletic and should be assigned to the *A. mexicanum* species.

Keywords: Regenerative medicine, axolotl, phylogeny, species delimitation, cytochrome b, cytochrome oxidase subunit I.

Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Birimleri'nde Rejeneratif Tıp Araştırmalarında Model Organizma Olarak Yetiştirilen *Ambystoma mexicanum*'un DNA Barkodlaması ve Filogenisi

Öz: *Ambystoma mexicanum* Ambystomatidae familyasında yer alır. Güney Meksika'dan Güney Alaska'ya kadar geniş bir coğrafyada yaşayan *Ambystoma* cinsinin 30 türünden biridir. Limb rejenerasyonunun yanında beyin, kalp, böbrek organlarını rejenerate edebilmeleri nedeniyle, evrimsel biyoloji, gelişim biyolojisi ve rejeneratif tıp araştırmalarında model organizma olarak kabul edilir. Model organizmaların kullanıldığı araştırmalarda canlıların tür teşhisinin doğru yapılması deneylerin tekrarlanabilirliği ve karşılaştırılabilirliği açısından önemlidir. Bu çalışmada; Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Birimleri'nde yetiştirilen aksolotlların tür teşhisini bütünlük taksonomik yöntemler kullanarak kesinleştirmek amacıyla mtDNA sitokrom oksidaz alt ünite 1 (*COI*) ve sitokrom b (*Cytb*) gen fragmentleri moleküler belirteç olarak kullanılmış ve NCBI GenBank'ta daha önce dizisi verilmiş olan *Ambystoma* türleri ile filogenetik analizler ve tür sınırlarını belirleme yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Farklı veri setlerinin kullanıldığı analizlerin tamamında söz konusu bireyler daha önceki çalışmalarda elde edilen *A. mexicanum* türü ile aday tür olarak gruplanmıştır. Bu çalışmada elde edilen tüm diziler ile NCBI GenBank'tan elde edilen *A. mexicanum* dizileri haplotip olarak gruplanmış olup genetik uzaklıkları 0 bulunmuş ve bu çalışmanın konusu olan bireylerin kesin olarak *A. mexicanum* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar *Ambystoma* cinsi içerisinde bazı türlerin özellikle *A. barbouri* ve *A. texanum* 'un tür kompleksi olabileceğini ortaya koymuştur. Diğer yandan *A. mexicanum*, *COI*, *Cytb* ve *COI+Cytb* birleştirilmiş veri setleri ile yapılan tüm analizlerde *A. andersoni* ile aday tür olarak gruplanmıştır. Bu sonuçlar söz konusu taksonların parafiletik olduğunu ve *A. mexicanum* türüne atanması gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Rejeneratif tıp, aksolotl, filogeni, tür sınırlarını belirleme, sitokrom b, sitokrom oksidaz alt ünite I.

1. Giriş

Ambystoma mexicanum (Aksolotl) rejeneratif tıp, evrimsel biyoloji ve onkoloji çalışmalarında model organizma olarak sıklıkla kullanılan bir semender türüdür (Gresens,

2004; Lust & Tanaka, 2019; Roy & Levesque, 2006). *A. mexicanum*, Amphibia sınıfının, Urodela takımına ait, 10 semender ailesinin içerisinde yer alır. Güney Meksika'dan, Güney Alaska'ya kadar geniş bir alanda yayılım gösteren Ambystomatidae familyasının, *Ambystoma* cinsine ait 30

*Corresponding author: badelarsln@gmail.com

türünden biridir ve yaygın adıyla köstebek semenderleri olarak da bilinirler (Farkas & Monaghan, 2015). Meksika Vadisi'nde, Xochimilco gölü civarında endemik olarak bulunurlar (Gresens, 2004).

Aksolotllar neotenik amfibiler olup, larval dönemlerinde cinsel olgunluğa ulaşırlar (Farkas & Monaghan, 2015). Kolonyalizm öncesi, yerli uygarlıkların halkları tarafından besin olarak tüketildikleri, astım ve bronşit gibi hastalıkları tedavi etmede terapötik amaçla kullanıldıklarına dair raporlar bulunmaktadır (Soriano-Lopez et al., 2006). Aksolotlların günümüzde de hala deney hayvanı olarak bu kadar popüler ve vazgeçilmez olmasının temel nedeni rejenerasyon kapasiteleridir (Roy & Levesque, 2016; Stamm et al., 2018; Reiß et al., 2015) Birçok semender türünün aksine metamorfoz geçirmedikleri için, embriyonik hücre benzeri yapıya sahiptirler ve bu sayede yaşamları boyunca rejenerasyon kapasitelerini koruyabilirler.

Memeliler ile karşılaştırıldıklarında, kompleks organ ve dokuları rejenere edebilmekte ve derin yaraları, memelilerde görünen aksine, yara izi olmaksızın iyileştirebilmektedirler (Levesque et al., 2010). Yara iyileşmesi kapasitelerini aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar *Ambystoma mexicanum* epidermal lipooksijenaz (AmbLOXe) proteinine odaklanmıştır (Mashkouli et al., 2020; Menger et al., 2011). Bu protein farklı insan hücre hatları ile oluşturulan in-vitro yara iyileşmesi modellerinde denenmiş, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırarak yara iyileşmesini anlamlı derecede artırdığı gösterilmiştir (Sibai et al., 2019; Mashkouli et al., 2020). Beyin ve omurilik gibi insanda rejenerasyon kapasitesi çok düşük olan dokuları kolayca yenileyebilmeleri nedeniyle de sinir bilim çalışmalarında popüler organizma haline gelmişlerdir (Lust & Tanaka, 2019; Demircan et al., 2020). Sinir doku rejenerasyon kapasitelerinin araştırıldığı çalışmalar, rejenerasyonda aktif rol alan hücresel yollar, hedef genler, kodlanmayan RNA'lar gibi moleküler belirteçlere odaklanmıştır (Sibai et al., 2019; Sabin et al., 2019; Diaz & Echeverri, 2013; Echeverri, 2020).

Bu canlının rejeneratif kapasitesinin sınırlarını aralamak ve bu bilgilerden yola çıkarak insanda rejeneratif kapasiteyi artırabilmek amacıyla yapılacak bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanımı popüler hale gelmektedir. Bu sebeple özellikle genetik temelli araştırmalar için model organizma olarak kullanılacak canlının tür sınırlarının bilinmesi ayrıca önem taşımaktadır.

Tür sınırlarını belirleme (Species delimitation) metodları, bütünleşik taksonomi ve sistematik çalışmalarında son yıllarda sıklıkla kullanılan güncel yaklaşımlardır (Sites & Marshall, 2003; Flot, 2015). Özellikle analiz edilen bireylerin aynı türü temsil ettiklerinden emin olunması için neredeyse bir ön koşul niteliğindedir (Bortolus, 2008). Büyük ölçüde morfolojik karakterlere dayanan geleneksel tür tanımlama yöntemleri halen yaygın bir biçimde kullanılsa da her geçen gün türlerin tanımlanmasında ve tür sınırlarının belirlenmesinde yeni nesil yaklaşım ve yöntemler geliştirilmektedir. Moleküler verilerin büyük hacimlerde ve kısa sürede üretilebilmesi ve biyoinformatik alanındaki gelişmelere paralel olarak tür sınırlarının belirlenmesinde uygulamalı yaklaşımlar geliştirilmekte ve

kullanılmaktadır (Sites & Marshall, 2003).

Bu çalışmanın amacı Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Birimleri'nde Rejeneratif Tıp Araştırmalarında Model Organizma Olarak Yetiştirilen *Ambystoma mexicanum*'un tür teşhisini bütünleşik taksonomik yöntemler kullanarak kesinleştirmektir. Bu amaçla mitokondri genomunda bulunan ve hayvanlar için DNA barkodlama bölgesi olarak bilinen sitokrom oksidaz alt ünite 1 (*COI*) ve sitokrom b (*Cytb*) gen fragmentleri moleküler belirteç olarak kullanılmış ve NCBI GenBank'ta daha önce dizisi verilmiş olan *Ambystoma* türleri ile filogenetik analizler ve tür sınırlarını belirleme testleri yardımıyla karşılaştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Birimleri'nde yetiştiricilik faaliyetleri sırasında ölen 3 adet 15-20 g ağırlığında juvenil aksolotl kuyruk biyopsisinden Clinic SV, GeneAll, 108-101 kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA izole edilen bireyler Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Koleksiyon'unda MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-002 ve MEUFR-21-11-003 numaraları ile saklanmaktadır. 200 mg kuyruk dokusu otomatik cam boncuklu doku homojenizatörü ile parçalandıktan sonra kit protokolü uygulanarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örneği -20°C'de saklanmıştır.

2.2. PCR reaksiyonu

PCR reaksiyonu PCR 2X MasterMix (WizPure™ (Katalog No: W1401) kullanılarak Applied Biosystems™ ProFlex termalcykler cihazında gerçekleştirilmiştir. Total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, 10 µl PCR 2X MasterMix, 2 µl template DNA, 6 µl DNase/RNase içermeyen moleküler su, 1 µl ileri yönlü primer ve 1 µl geri yönlü primer kullanılmıştır. Çalışmada evrensel barkodlama bölgelerinden *COI* ve *Cytb* seçilmiştir. Kullanılan primerlere ait diziler ve referansları Tablo 1'de verilmiştir, *COI* gen fragmentleri amplifikasyonu için AmphF2_t1/AmphR3_t1 primer çifti kullanılmıştır. PCR reaksiyonu koşulları Tablo 2'de verilmiştir. *Cytb* gen fragmentleri amplifikasyonu için ise MVZ15/MVZ16 primer çifti kullanılmıştır ve PCR reaksiyonu koşulları Tablo 3'te verilmiştir. PCR sonrasında AmphF2_t1/AmphR3 ve MVZ15/MVZ16 bölgelerinin PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (110V, 150mA, 45 dk.).

2.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Sanger Dizileme

PCR reaksiyonundan sonra saflaştırma aşamasında ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents, Thermo (Katalog No: 75001.200.UL) kiti kullanılmıştır. 10 µl PCR ürünü, 4 µl kit bileşeni ile sırasıyla 37°C'de 4 dk, 80°C'de 1 dk, 4°C'de 4 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sanger dizileme reaksiyonları PCR aşamasında kullanılan primer çiftleri ile gerçekleştirilmiş olup bu aşamada Atlas Biyoteknoloji'den hizmet alımı yapılmıştır.

2.4. *COI* ve *Cytb* Gen Fragmanlarının Kontrolü ve Hizalanması

Dizi analizi sonucu elde edilen ileri ve geri yönlü gen dizileri BioEdit v7.0 (Hall, 2004) programında göz ile

kontrol edilmiş, okuma kalitesi düşük 5' ve 3' uçları silinmiştir. Daha sonra ileri ve geri yönlü okumalar yine BioEdit v7.0 programında hizalanmış, göz ile kontrol edilip belirsiz bölgeler kromatogramlardan kontrol

edilerek düzenlenmiştir. Oluşturulan konsensus diziler NCBI Blast (Altschul et al., 1990) algoritması kullanılarak *Ambystoma* cinsine ve dizilenmesi hedeflenen gen bölgesine ait olup olmadıkları kontrol edilmiştir.

Tablo 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonları için kullanılan primerler ve dizileri.

Table 1. Primers and their sequences that were used for Polymerase Chain Reaction

Gen	Primer	Dizi (5' - 3')	Referans
COI	AmphF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTTTCAACWAAYCAYAAAGAYATYGG	Chambers & Hebert, 2016
	AmphR3_t1	CAGGAAACAGCTATGACTADACTTCWGGRTGDCRAARAATCA	
Cytb	MVZ15	GAACTAATGGCCACACWWTACGNAA	Moritz et al., 1992
	MVZ16	AAATAGGAAATATCATTCTGGTTAAT	

Tablo 2. AmphF2_t1/AmphR3_t1 Primer çifti için PCR reaksiyonunun koşulları.

Table 2. PCR conditions for AmphF2_t1/AmphR3_t1 primer couple

	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dk.	1
Denatürasyon	94	40 sn.	5
Primer Bağlanma	45	40 sn.	
Primer Uzama	72	60 sn.	
Denatürasyon	94	40 sn.	35
Primer Bağlanma	51	40 sn.	
Primer Uzama	72	60 sn.	
Son Uzama	72	5 min.	1

Tablo 3. MVZ15/MVZ16 Primer çifti için PCR reaksiyonunun koşulları.

Table 3. PCR conditions for MVZ15/MVZ16 primer couple

	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dk.	1
Denatürasyon	94	40 sn.	40
Primer Bağlanma	48	40 sn.	
Primer Uzama	72	60 sn.	
Son Uzama	72	5 dk.	1

2.5. Analizler İçin Veri Setlerinin Oluşturulması

Analizlerde 4 farklı veri seti kullanılmıştır. Tüm veri setlerine *Dicamptodon aterrimus* taksonu dış grup olarak dahil edilmiştir. Veri setine eklenen dizilere ait NCBI Genbank erişim numaraları ve bu dizilere atanmış türler Tablo 4 ve 5'te verilmiştir. Analizler için hazırlanan veri setleri:

1- COI veri seti: DNA izole edilen 3 bireyin 2'sinden COI dizisi elde edilebilmiştir (MEUFR-21-11-001 ve MEUFR-21-11-003). Bunun yanında Tablo 4'te bilgileri verilen diziler analizlere dahil edilmiştir.

2- Cytb veri seti: DNA izole edilen 3 bireyden başarılı bir şekilde elde edilen diziler ve Tablo 5'te erişim numaraları verilen diziler analizlere dahil edilmiştir.

3- COI ve Cytb birleştirilmiş veri seti: Bu veri setinde

DNA izole edilen 3 bireyden hem COI, hem de Cytb'nin dizilerine sahip olan 2 birey kullanılmıştır (MEUFR-21-11-001 ve MEUFR-21-11-003). Bunun yanında Tablo 4 ve 5'te erişim numaraları "*" ile işaretlenen 11 *Ambystoma* tür/alttürüne ve 1 dış gruba ait total mitogenom dizisinden ilgili gen bölgeleri ayrı ayrı hizalanarak alınan toplam 14 dizi dahil edilmiştir.

4- Total mitogenom veri seti: Yukarıdaki veri setleri ile gerçekleştirilen tür sınırlarını belirleme testlerinde *A. mexicanum* ve bu çalışmada dizisi verilen bireyler ile aday tür olarak gruplanan *Ambystoma* türlerin (bkz: Sonuçlar), birlikte gruplanma sebeplerinin, veri setinin tür sınırlarını belirlemede yetersiz olmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığının karşılaştırmasını yapabilmek için oluşturulmuştur. Bu amaçla yukarıda birleştirilmiş veri setinde kullanılan total mitogenom dizisi bir bütün olarak analiz edilmiştir.

Tablo 4. COI veri seti haplotip grupları, ait oldukları türler ve diziler.

Table 4. COI data set haplotype groups, attended species and sequences.

Haplotip	Tür	GenBank Erişim Numarası	Referansı
1	<i>Ambystoma mexicanum</i>	AY659991*	1
		AJ584639*	2
	MEUFR-21-11-001,	OK605096*	Bu çalışma
	MEUFR-21-11-003	OK605097*	

Haplotip	Tür	GenBank Erişim Numarası Referansı	
2	<i>A. andersoni</i>	AY659993*	1
3	<i>A. mavortium stebbinsi</i>	KP013120*	Yayınlanmamış
4	<i>A. tigrinum</i>	KU986212, KU986050, KU985809, KU986072	3
5	<i>A. dumerilii</i>	AY659994*	1
6	<i>A. tigrinum tigrinum</i>	AY659992*	1
7	<i>A. californiense</i>	AY659995*	1
8	<i>A. californiense</i>	KU986196, KU986165, KU986077, KU986040	3
9	<i>A. californiense</i>	KU985632	3
10	<i>A. laterale</i>	AY728218*	4
11	<i>A. laterale jeffersonianum</i> tür kompleksi	EF525710	5
12	<i>A. laterale jeffersonianum</i> tür kompleksi	EF525709	5
13	<i>Ambystoma</i> sp.	GU078472	6
14	<i>A. barbouri</i>	GU078469*	6
15	<i>A. barbouri</i>	GU078470*	6
16	<i>A. texanum</i>	GU078471*	6
17	<i>A. texanum</i>	MN135418, MN135417, MN135416	Yayınlanmamış
18	<i>A. annulatum</i>	KU986254, KU985678	3
19	<i>A. annulatum</i>	MT878234, MT878235	7
20	<i>A. macrodactylum</i>	MG421393	Yayınlanmamış
21	<i>A. bishopi</i>	KP289200*	Yayınlanmamış
22	<i>A. cingulatum</i>	KU986180, KU986169	3
23	<i>A. opacum</i>	MT878233, MT878232	7
24	<i>A. opacum</i>	MN135585	Yayınlanmamış
		KU986081, KU985732, KU985606	3
25	<i>A. talpoideum</i>	MG822788*	8
26	<i>Dicamptodon aterrimus</i>	GQ368657*	9

1: Samuels et al., 2005; 2: Arnason et al., 2004; 3: Chambers & Hebert, 2016; 4: Mueller et al., 2004; 5: Smith et al., 2008; 6: Bi, K., & Bogart 2010; 7: Siler et al., 2021; 8: Ren et al., 2019; 9: Zhang, & Wake, 2009. **COI+Cytb* ve total mitogenom veri setinde kullanılan diziler.

1: Samuels et al., 2005; 2: Arnason et al., 2004; 3: Chambers & Hebert, 2016; 4: Mueller et al., 2004; 5: Smith et al., 2008; 6: Bi, K., & Bogart 2010; 7: Siler et al., 2021; 8: Ren et al., 2019; 9: Zhang, & Wake, 2009. *Sequences also included in *COI+Cytb* and complete mitogenome data sets.

Tablo 5. *Cytb* veri seti haplotip grupları, ait oldukları türler ve diziler.

Table 5. *Cytb* data set haplotype groups, attended species and sequences.

Haplotip	Tür	GenBank Erişim Numarası ve Referansı	
1	<i>Ambystoma mexicanum</i>	AY659991*	1
	MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-002, MEUFR-21-11-003	OK631828*, OK631829, OK631830*	Bu çalışma
2	<i>A. mexicanum</i>	AJ584639*	2
3	<i>A. andersoni</i>	AY659993*	1
4	<i>A. mavortium stebbinsi</i>	KP013120*	Yayınlanmamış
5	<i>A. tigrinum</i>	EF036666	3
6	<i>A. dumerilii</i>	AY659994*	1
7	<i>A. tigrinum tigrinum</i>	AY659992*	1
8	<i>A. tigrinum</i>	EF036665, EF036667	3
9	<i>A. californiense</i>	AY659995*	1
10	<i>A. laterale</i>	AY728218*	4
		EF036629	3
11		EF036628	3
12		EF036624	3
13		EF036625	3
14		EF036631	3

Haplotip	Tür	GenBank Erişim Numarası ve Referansı	
15		EF036630	3
16		EF036626	3
17	<i>A. jeffersonianum</i>	EF036685	3
18		EF036686	3
19		EF036678, EF036677, EF036681	3
20		EF036687	3
21		EF036676	3
22		KT780869	Yayınlanmamış
23	<i>A. macrodactylum</i>	EF036633, EF036634	3
24	<i>A. barbouri</i>	GU078484	5
		EF036599	3
25		GU078474	5
		EF036596	3
26		GU078505	5
		EF036619	3
27		GU078513, GU078512	5
		EF036613	3
28		GU078470*, GU078511	5
29		GU078500	5
30		GU078499, GU078482, GU078483	5
		EF036605	3
31		GU078486, GU078487, GU078503, GU078485	5
		EF036607	3
32		GU078501	5
33	<i>Ambystoma sp.</i>	GU078472, GU078476, GU078475, GU078509, GU078507	5
	<i>A. barbouri</i>	EF036609	3
34	<i>Ambystoma sp.</i>	GU078473	5
		EF036668, EF036669	3
35	<i>A. barbouri</i>	EF036612	3
36	<i>Ambystoma sp.</i>	EF036674	3
37	<i>Ambystoma sp.</i>	EF036673	3
38	<i>Ambystoma sp.</i>	EF036675	3
39	<i>A. barbouri</i>	EF036617	3
40		GU078490	5
41		GU078492	5
42		GU078496, GU078497, GU078480, GU078502, GU078488	5
		EF036600	3
43		GU078479	5
		EF036603	3
44		GU078478	5
		EF036601	3
45		GU078481	5
46		GU078469*	5
47		EF036610	3
48		GU078471*	5
49		GU078506	5
		EF036642	3
50		EF036655	3
51		EF036663	3
52		EF036656, EF036648, EF036652, EF036653	3

Haplotip	Tür	GenBank Erişim Numarası ve Referansı	
53		EF036654	3
54		EF036643	3
55		EF036646	3
56		EF036644	3
57		GU078495	5
		EF036616	3
58	<i>A. texanum</i>	EF036664	3
59		EF036662	3
60	<i>A. mabeei</i>	EF036632	3
61	<i>A. bishopi</i>	KP289200*	Yayınlanmamış
62	<i>A. cingulatum</i>	EF036621	3
63	<i>A. maculatum</i>	EF036637	3
64		EF036636	3
65		EF036635	3
66	<i>A. gracile</i>	AY691729	6
67	<i>A. gracile</i>	EF036622	3
68	<i>A. gracile</i>	EF036623	3
69	<i>A. opacum</i>	KT780868	Yayınlanmamış
70	<i>A. talpoideum</i>	MG822788	7
		EF036639	3
71	<i>Dicamptodon aterrimus</i>	GQ368657*	8

1: Samuels et al., 2005; 2: Arnason et al., 2004; 3: Robertson et al., 2006; 4: Mueller et al., 2004; 5: Bi & Bogart 2010; 6: Chippindale et al., 2004; 7: Ren et al., 2019; 8: Zhang, & Wake, 2009. **COI+Cytb* ve total mitogenom veri setinde kullanılan diziler.

1: Samuels et al., 2005; 2: Arnason et al., 2004; 3: Robertson et al., 2006; 4: Mueller et al., 2004; 5: Bi & Bogart 2010; 6: Chippindale et al., 2004; 7: Ren et al., 2019; 8: Zhang, & Wake, 2009. *Sequences also included in *COI+Cytb* and complete mitogenome data sets.

2.6. Veri Setlerinin Analizlere Hazırlanması

Tüm veri setlerinin çoklu hizalamaları MAFFT (Katoh & Standley, 2013) algoritması kullanarak gerçekleştirilmiştir. Veri setlerinin çoklu hizalamaları Mesquite V3.6 (Maddison, 2021) programında kontrol edilerek düzenlenmiş ve ileriki analizlerde kullanılacak dosya formatlarına uygun şekilde dışarı aktarılmıştır. Bu amaçla *COI*, *Cytb* ve *COI+Cytb* veri setleri bu çalışmada elde edilen dizilerin uzunluğu dikkate alınarak kırpılmıştır. *COI* ve *Cytb* veri setlerinde aynı popülasyona ait olduğu bilinen (erişim numaralarından kontrol edilmiştir), veri setine göre çok kısa olan ve çok miktarda belirsiz bölge içeren diziler veri setinden çıkarılmıştır. Daha sonra *COI* ve *Cytb* veri setleri DnaSP 6 (Rozas et al., 2017) programında daha sonraki analizler için haplotiplere gruplanmış ve analizler bu haplotipler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Haplotip olarak gruplanan *COI* ve *Cytb* veri setleri tekrar Mesquite V3.6 programında işlenerek kodon pozisyonları belirlenmiştir. *COI+Cytb* birleştirilmiş veri setinde ise haplotip gruplandırması yapılmamıştır. Bu veri setinde ilgili gen bölgeleri tekrar çoklu hizalandıktan sonra birleştirilmiş ve her bir gen bölgesi için kodon pozisyonları belirlenmiştir.

Total mitogenom dizilerini içeren 4. Veri setinde ise hizalama sonrası DnaSP 6 programında boşluk içeren ve belirsiz bölgeler çıkarılmış ve sonuç olarak 16101 bç uzunluğunda bir veri seti elde edilmiştir. Bu veri seti gen bölgeleri ve kodonlara göre bölümlenmeden analiz

edilmiştir.

2.7. Genetik Uzaklıkların Belirlenmesi

COI ve *Cytb* veri setleri için ikili genetik uzaklıklar MEGA-X (Kumar et al., 2018) programında Kimura-2 parametresi (K2P) (Kimura, 1980) kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen bu uzaklıklar tür sınırlarını belirleme testlerinden ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) (Puillandre et al., 2012) analizinde kullanılmak üzere MEGA uzaklık dosyası olarak dışarı aktarılmıştır.

2.8. Nükleotid Substitüsyon Modellerinin Belirlenmesi

Maksimum Olasılık ve Bayesian çıkarsama analizleri için kullanılacak olan nükleotid substitüsyon modelleri PartitionFinder V2.1 (Lanfear et al., 2017) programında BIC (Bayesian information criterion) a göre belirlenmiştir. Bölümlenme şeması *COI*, *Cytb* ve *COI+Cytb* veri setleri için kodon pozisyonlarına göre belirlenmiş, total mitogenom veri seti için ise bütün olarak analiz edilmiştir. Bayesian çıkarsama analizlerinin gerçekleştirildiği MrBayes programı PartitionFinder V2.1 tarafından denenen tüm modelleri desteklemediği için Bayesian çıkarsama analizlerinde kullanılacak olan modeller belirlenirken "models=mrbayes" parametresi kullanılmıştır. Veri setlerinde analizlere göre kullanılan nükleotid substitüsyon modelleri Tablo 6'da özetlenmiştir. Bunların yanında GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) (Pons et al., 2006) analizlerinde kullanılmak üzere gerekli olan ultrametrik ağaçlar için gerekli substitüsyon modeli Beast v2.6.6 (Bouckaert et al., 2014) programında yer alan bModelTest v1.2.1 paketi (Bouckaert & Drummond, 2017)

kullanılarak otomatik olarak belirlenmiştir.

2.9. Filogenetik Ağaçların İnşası

Maksimum Olasılık ağaçları IQTree 2 (Minh et al., 2020) programı kullanılarak inşa edilmiştir. Dal destek değerleri aynı programda yer alan Ultrafast Bootstrap Approximation 2 (UFBoot2) (Hoang et al., 2018) algoritması kullanılarak 1000 tekrarlı ve “-bnni” parametresi ile hesaplanmıştır. Bayesian ağaçları ise MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) programı kullanılarak inşa edilmiştir. *COI*, *Cytb* ve total mitogenom veri setleri için 10⁶ jenerasyon, *COI+Cytb* birleştirilmiş veri için 500000 jenerasyon her biri 3 sıcak ve 1 soğuk 4 zincirli birbirinden bağımsız 2 süreç ile analiz gerçekleştirilmiştir. Tüm veri setleri için ağaçlar her 100 döngüde bir örneklenmiştir. Jenerasyon sayısı 2 bağımsız süreçteki ayrılma frekanslarının standart sapmasının 0.02'nin altında olup olmadığı değerlendirilerek aşamalı olarak artırılıp belirlenmiştir. Ayrıca model parametrelerinin 2 bağımsız süreç için Efektif Örneklem Büyüklüğü (ESS) Tracer V1.17 (Rambaut et al., 2018) programı yardımıyla kontrol edilmiştir (önerildiği üzere tüm analizlerde her bir süreç tüm parametrelerde ESS'nin 200'ün üzerinde olduğu

görüldükten sonra analiz sonlandırılmıştır). Örneklenen ağaçların ilk %25'i analizden uzaklaştırılmış (burn-in), kalan ağaçlardan %50 çoğunluk ağacı (50% majority rule tree) inşa edilmiştir. Ultrametrik ağaçlar Beast v2.6.6 (Bouckaert et al., 2014) programı kullanılarak inşa edilmiştir. Tüm veri setlerinde “Relaxed Clock Log Normal” saat modeli ön tanımlı öncüller ile kullanılmıştır. İnşa edilen ultrametrik ağaçlarda türlerin ayrılma zamanlarının belirlenmesinden ziyade dalların birbirine görece ayrılma zamanlarının belirlenmesi amaçlandığından tüm veri setleri için substitüsyon oranı “1” olarak kullanılmıştır. Ağaç öncülü için “Yule Model” ön tanımlı parametreler ile seçilmiştir. Analiz için jenerasyon sayısı yukarıda anlatıldığı şekilde Tracer V1.7.1 programı ile belirlenmiştir (*COI* veri seti için 15X10⁶, *Cytb* veri seti için 25X10⁶, *COI+Cytb* ve total mitogenom veri setleri için 2X10⁷ jenerasyon). Analiz sonucu inşa edilen ağaçlardan %10'u yakılarak mcc ağacı (Maximum Clade Credibility Tree) TreeAnnotator v2.6.2 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen nexus formatındaki ağaç dosyaları GMYC analizinde kullanılmak üzere newick formatına FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018) programı yardımıyla çevrilmiştir.

Tablo 6. Filogenetik analizler için kullanılan modeller

Table 6. Models used in phylogenetic analyses

Veri Seti	Bölümleme Tablosu		Model	
			IQTree	MrBayes
<i>COI</i>	1-616\3		TRNEF+I	SYM+I
	2-617\3		F81+I	
	3-615\3		TRN+G	HKY+G
<i>Cytb</i>	1-697\3		GTR+G	
	2-698\3		SYM+G	
	3-696\3		HKY+I	
<i>COI+Cytb</i>	<i>COI</i>	<i>Cytb</i>	IQTree	MrBayes
	1-709\3	711-1461\3	HKY+I	
	2-707\3	712-1462\3	GTR+G	
	3-708\3	710-1460\3	TRNEF+G	SYM+G
Total mitogenom	-		-	GTR+I+G

2.10. Tür Sınırlarını Belirleme Testleri

Bu çalışmada dizileri elde edilen bireyler ile karşılaştırmak üzere dizileri NCBI GenBank veri tabanından indirilen türlerin (Tablo 4 ve 5) ayrı birer türü temsil edip etmediğinin belirlenmesi için 4 farklı yaklaşım kullanılmıştır. *COI* ve *Cytb* veri setleri için uzaklık tabanlı ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery = Otomatik Barkod Boşluğu Keşfi) (Puillandre et al., 2012) yukarıda anlatıldığı şekilde MEGA X programında hesaplanan ikili uzaklıklar üzerinden gerçekleştirilmiştir. Göreceli barkod boşluğu ön tanımlı olan X=1.5 değerinde bölümleme oluşmadığı için programda önerildiği şekilde 0.1'lik basamaklar ile 1'e düşürülmüştür. Ayrıca istatistiksel parsimoni ile şebeke analizleri TCS (Crandall et al., 2000) programı ile %90 ve %99 bağlantı limiti ile gerçekleştirilmiştir. Bunlar dışında tüm veri setleri için ağaç tabanlı bir yaklaşım olan bPTP (Poisson Tree Processes) analizleri pPTP web sunucusunda (Zhang et al., 2013), Bayesian ağaçları girdi olarak kullanılarak ön

tanımlı parametreler ile (jenerasyon sayısı farklı olarak 500000 seçilmiştir) gerçekleştirilmiştir. Tüm testlerde bütün veri setleri için dış grup analize dahil edilmemiştir. GMYC (Pons et al., 2006) analizleri ise tek ve çoklu eşik değerleri ile ayrı ayrı GMYC web sunucusunda (Zhang et al., 2013) gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

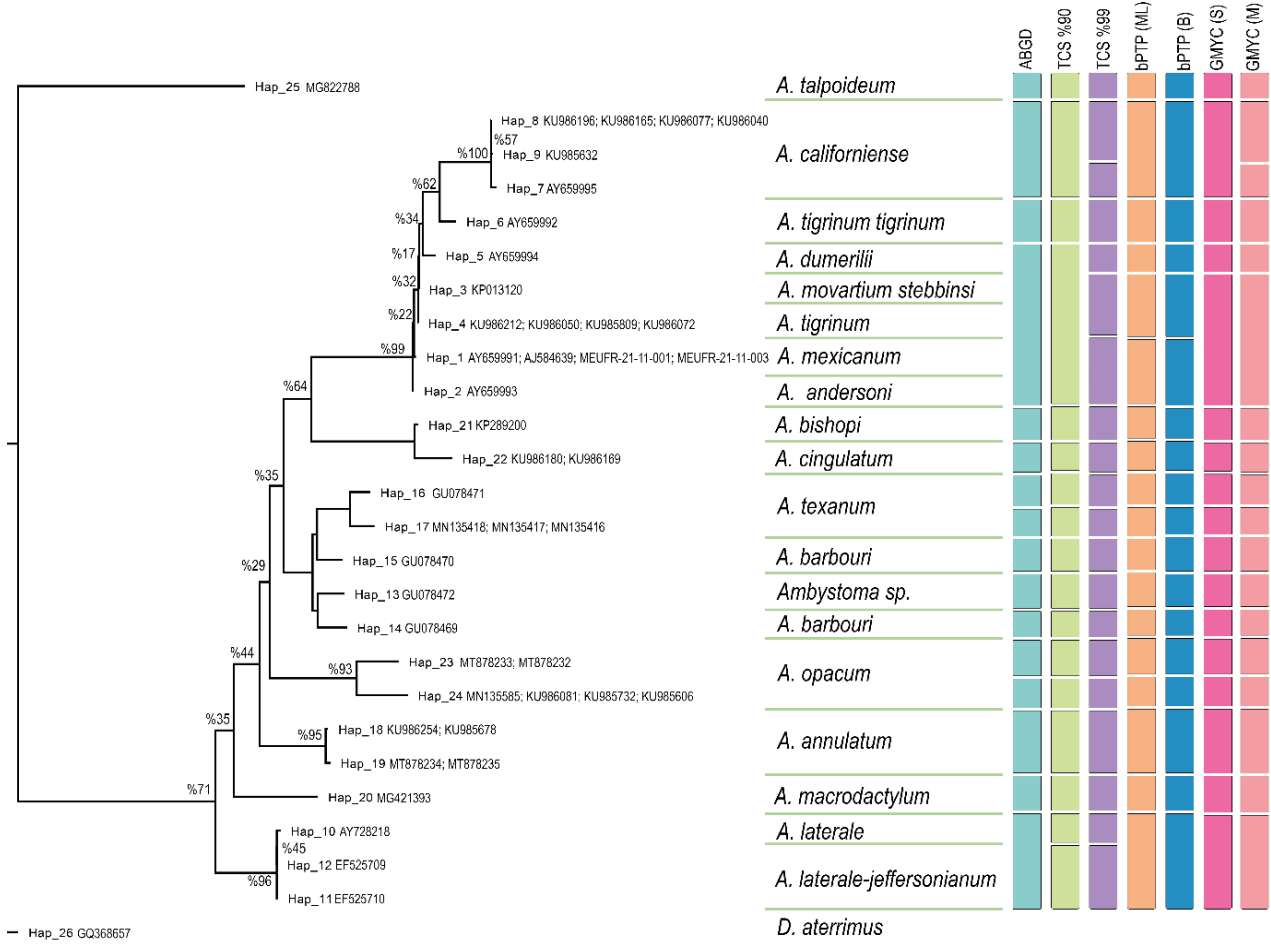
3.1. *COI* veri seti

Veri setinin oluşturulduğu toplam 43 *COI* dizisi 26 haplotip olarak gruplanmıştır (Tablo 4). Bu çalışmada dizileri elde edilen bireyler daha önceki çalışmalardan dizileri verilen *A. mexicanum* (AY659991 ve AJ584639) ile Haplotip 1 olarak gruplanmış olup genetik uzaklıkları 0'dır. Haplotip 1'e en yakın grup *A. andersoni* türünün tek yer aldığı Haplotip 2 olup genetik uzaklığı 0,00651 olarak hesaplanmıştır. Haplotip 1'e *Ambystoma* türlerinin yer aldığı haplotiplerden en uzak grup ise *A. talpoideum*'un tek yer aldığı Haplotip 25 olup genetik uzaklığı 0,19649 olarak

hesaplanmıştır. Haplotip 1'in dış gruba (*Dicamptodon aterrimus*, Haplotip 26) olan genetik uzaklığı ise 0,25830 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen Maksimum Olasılık ağacında Haplotip 1

ve 2 kardeş takson olarak gruplanmış olup dal destek değeri %99'dur (Şekil 1). Bayesian analizleri sonucunda elde edilen ağacın topolojisi benzer olup (Şekil 2) Haplotip 1 ve 2,052 soncul olasılık değeri ile kardeş takson olarak dallanmıştır.



Şekil 1. *COI* veri seti ile inşa edilen maksimum olasılık ağacı (solda), % rakamlar UfBoot2 ile hesaplanan dal destek değerlerini göstermektedir. Sağdaki renkli sütunlar tür sınırlarını belirleme testlerine göre aday tür gruplarını göstermektedir.

Figure 1. Maximum likelihood tree constructed with *COI* data set (left), numerals show UfBoot2 clad supports. Coloured columns on the right show candidate species groupings according to species delimitation methods

Otomatik barkod boşluğu keşfi (ABGD) analizi sonucunda 0.039 uzaklığında bir barkod boşluğu (Barcode gap distance) hesaplanmış ve bu boşluğa göre 16 aday tür gruplanmıştır. Bu gruplamada Haplotip 1-5 (MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-003, *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. movartium stebbinsi*, *A. tigrinum*, *A. dumerilii*) birlikte yer almaktadır (Şekil 1).

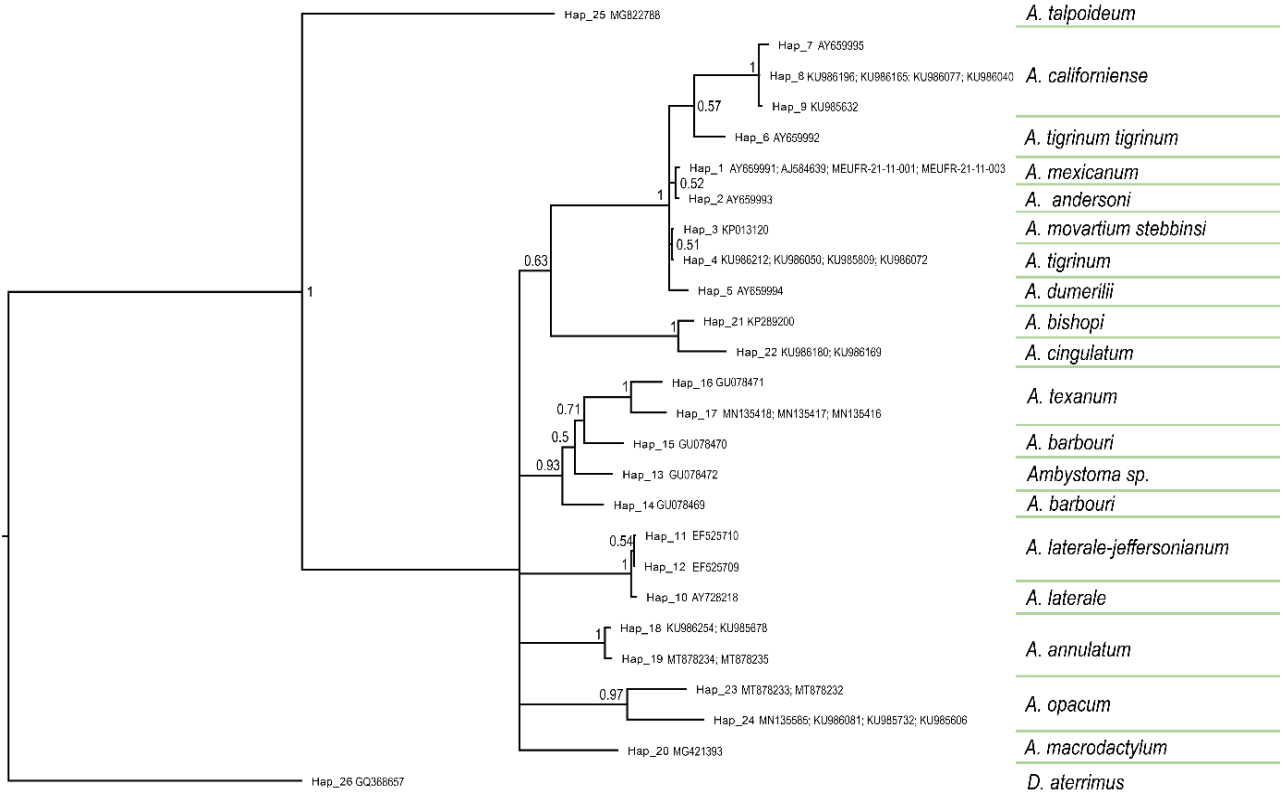
TCS programı ile gerçekleştirilen istatistiksel parsimoni analizlerinde ise %90 bağlantı limitindeki gruplama ABGD ile aynıdır. %99 bağlantı limiti ile yapılan analizde ise beklenen şekilde daha fazla aday tür hesaplanmış (21 aday tür) olup haplotip 1 ve 2 birlikte gruplanmıştır (MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-003, *A. mexicanum*, *A. andersoni*) (Şekil 1)

PTP (Poisson Tree Processes) analizleri için Bayesian çıkarsama sonucunda elde edilen ağaç kullanılmıştır. Maksimum olasılık ve Bayesian çözümü aynı sonuçları vermiş olup 18 aday tür belirlenmiştir. Haplotip 1 ve 2 (MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-003, *A. mexicanum*, *A. andersoni*) birlikte gruplanmıştır (Şekil 1).

GMYC analizinde tekli eşik değerinde (Single threshold) 17, çoklu eşik değerinde (Multi threshold) ise 18 aday tür tespit edilmiştir. Her iki eşik değerinde de Haplotip 1, 2, 3 ve 4 (*A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. tigrinum*, ve *A. movartium stebbinsi*) birlikte aday tür olarak gruplanmıştır (Şekil 1).

3.2. *Cytb* veri seti

Veri setinin oluşturulduğu toplam 115 *Cytb* dizisi 71 haplotip olarak gruplanmıştır (Tablo 5). Bu çalışmada dizisi elde edilen 3 birey daha önceki çalışmalardan dizisi verilen *A. mexicanum* (AY659991) ile Haplotip 1 olarak gruplanmış olup genetik uzaklıkları 0'dır. Haplotip 1'e en yakın grup diğer bir *A. mexicanum* (AJ584639) dizisini içeren Haplotip 2 olup genetik uzaklığı 0,0014347212 olarak hesaplanmıştır. Haplotip 1'e *Ambystoma* türlerinin yer aldığı haplotiplerden en uzak grup ise *Ambystoma maculatum* (EF036636)'un tek yer aldığı Haplotip 64 olup genetik uzaklığı 0,1906534778 olarak hesaplanmıştır. Haplotip 1'in dış gruba (*Dicamptodon aterrimus*, Haplotip 71) olan genetik uzaklığı ise 0,2671068700 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. COI veri seti ile inşa edilen Bayesian çıkarsama ağacı. Düğüm üzerindeki numaralar kladların soncul olasılık değerlerini göstermektedir.

Figure 2. Bayesian tree constructed with COI data set. Numerals above the nodes shows the posterior probability of the clades

Elde edilen Maksimum Olasılık ağacında bu çalışmada dizilenen 3 örnek ile AY659991 erişim numaralı *A. mexicanum* dizisi (Haplotip 1) ve AJ584639 erişim numaralı *A. mexicanum* (Haplotip 2) kardeş takson olarak gruplanmış olup dal destek değeri %76'dır Haplotip 3 (*A. andersoni*) ise Haplotip 1 ve 2'nin oluşturduğu klada kardeş takson olarak dallanmış olup dal destek değeri %99'dur (Şekil 3). Bayesian analizleri sonucunda elde edilen ağacın topolojisi benzer olup (Şekil 4) Haplotip 1 ve 2 0,87 soncul olasılık değeri ile kardeş takson olarak dallanmıştır. Haplotip 3 (*A. andersoni*) ise %91 dal destek değeri ile bu klada kardeş takson olarak yer almaktadır.

Otomatik barkod boşluğu keşfi (ABGD) analizi sonucunda 0.032 uzaklığında bir barkod boşluğu (Barcode gap distance) hesaplanmış ve bu boşluğa göre 21 aday tür gruplanmıştır. Bu grupta Haplotip 1-5 (MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-002, MEUFR-21-11-003, *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. mavortium stebbinsi*, *A. tigrinum*) birlikte yer almaktadır (Şekil 3).

TCS programı ile gerçekleştirilen istatistiksel parsimoni analizlerinde ise %90 bağlantı limitindeki aday tür sayısı ve gruplama ABGD ile aynıdır. %99 bağlantı limiti ile daha fazla aday tür tespit edilmiş olup (29 aday tür) olup haplotip, 1, 2 ve 3 birlikte gruplanmıştır (MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-11-003, *A. mexicanum*, *A. andersoni*) (Şekil 3)

PTP (Poisson Tree Processes) analizleri için Bayesian çıkarsama sonucunda elde edilen ağaç kullanılmıştır. Maksimum olasılık çözümü sonucunda 24, Bayesian çözümü sonucunda ise 25 aday tür hesaplanmıştır. Her iki çözümde de Haplotip 1-5 (MEUFR-21-11-001, MEUFR-21-

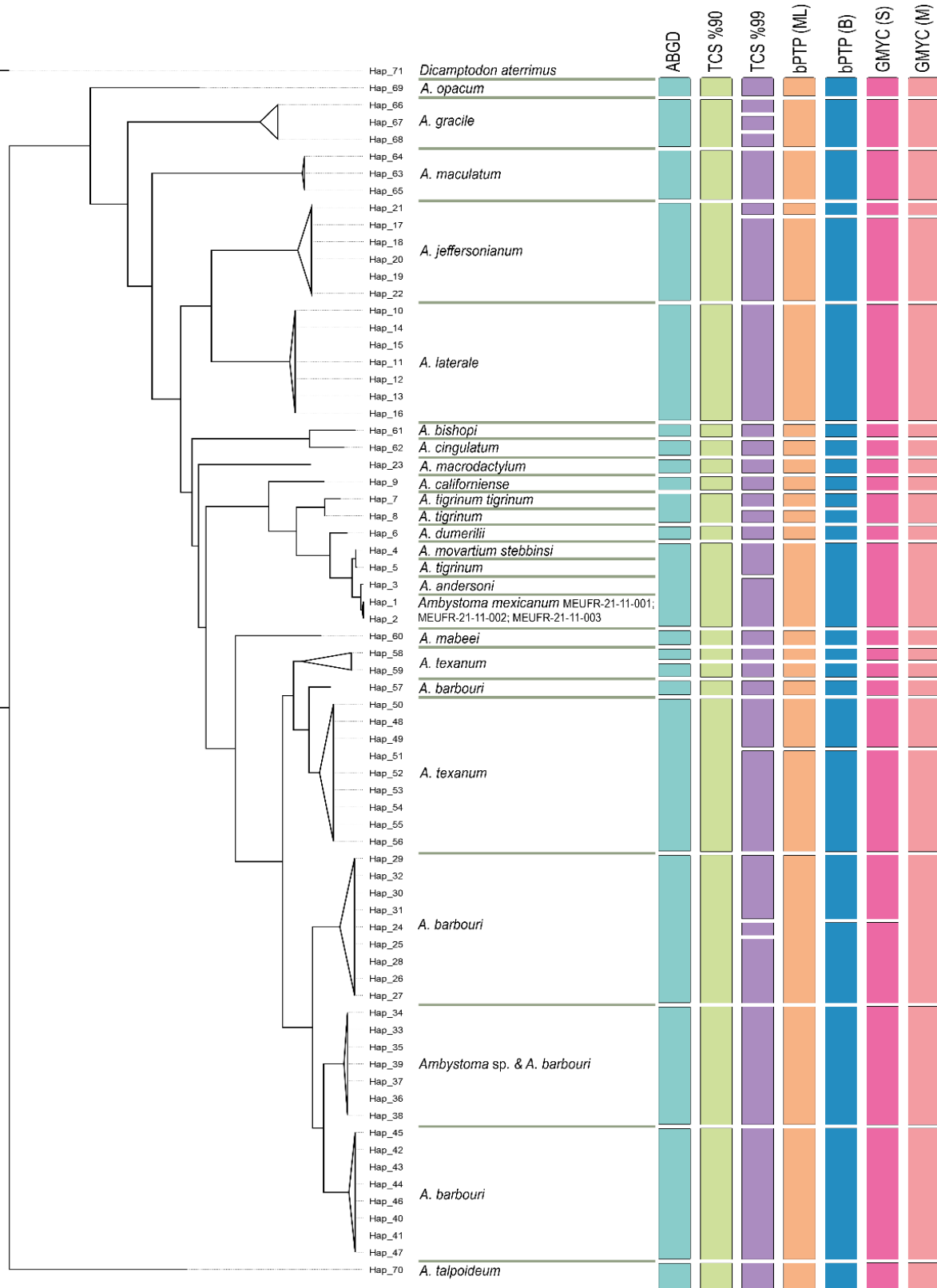
11-002, MEUFR-21-11-003, *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. mavortium stebbinsi*, *A. tigrinum*) birlikte aday tür olarak gruplanmıştır (Şekil 3).

GMYP analizinde tekli eşik değerinde (Single threshold) 24, çoklu eşik değerinde (Multi threshold) ise 23 aday tür tespit edilmiştir. Her iki eşik değerinde de COI veri setine benzer şekilde çalışmanın konusu olan *A. mexicanum* ile *A. andersoni*, *A. tigrinum*, ve *A. mavortium stebbinsi* birlikte aday tür olarak gruplanmıştır (Şekil 3).

3.3. COI+Cytb birleştirilmiş veri seti

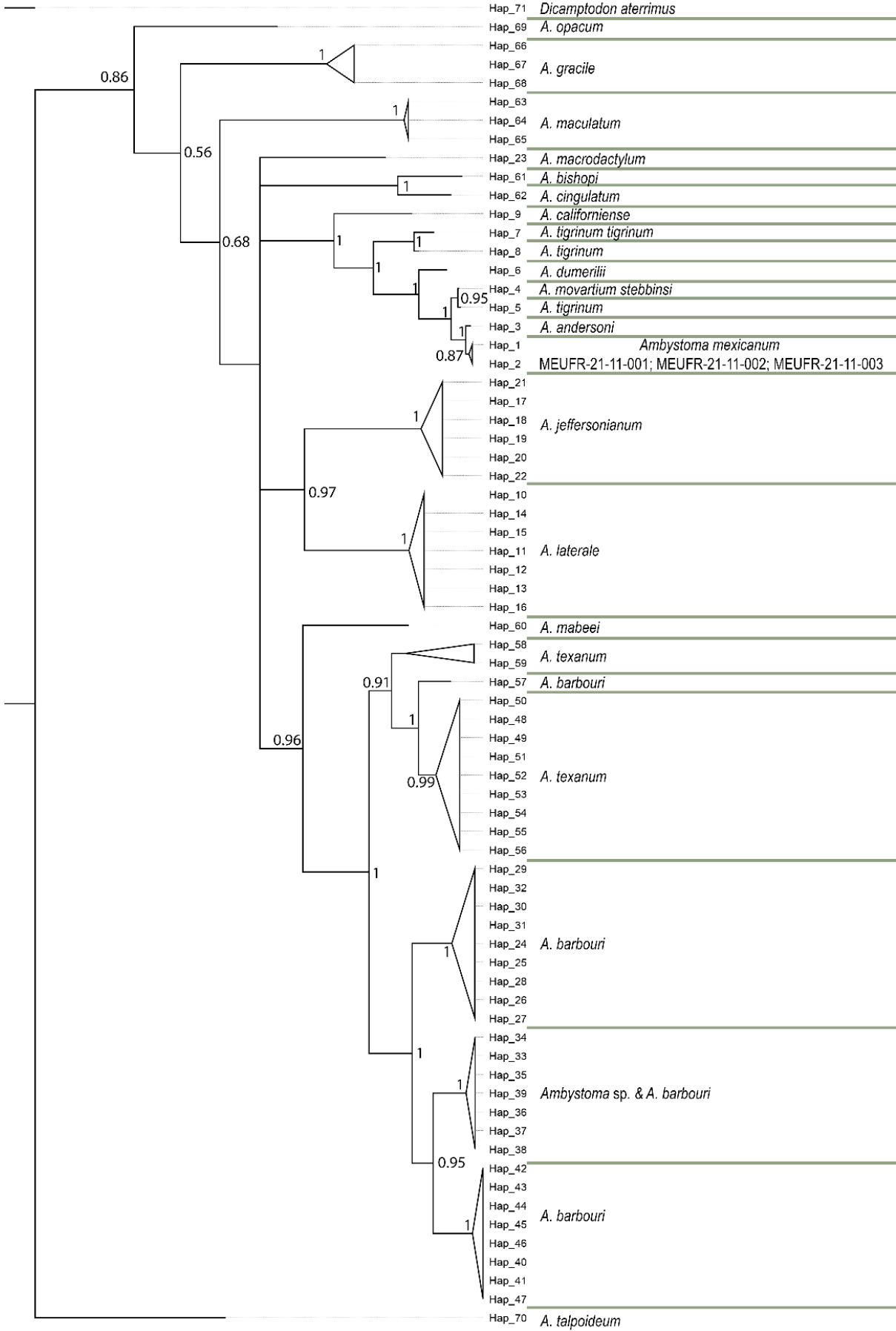
Bu veri setinde aynı bireylerden izole edilen DNA'lardan dizilenmiş COI ve Cytb dizilerinin birleştirilmesi hedeflendiğinden, NCBI Gen Bank'ta hali hazırda bulunan total mitokondri genomları ile bu çalışmada her iki gen bölgesinin başarılı bir şekilde dizilenebildiği MEUFR-21-11-001 ve MEUFR-21-11-003 katalog numaralı bireylere ait dizileri kullanılmıştır (Analizde kullanılan diziler Tablo 4 ve 5'te * ile işaretlenmiştir). Maksimum olasılık analizleri sonucunda elde edilen ağaçta elimizdeki örnekler ile *A. mexicanum*'a ait diziler %99 dal destek değeri ile aynı klada yer almaktadır. Bu klada kardeş takson olarak yer alan *A. andersoni*'nin de yer aldığı klada ise dal destek değeri %95'tir (Şekil 5). Bayesian çıkarsama ile elde edilen ağaçta da topoloji benzer olup yukarıda bahsedilen kladların soncul olasılıkları sırası ile 0,98 ve 1'dir (Şekil 6).

Elde edilen Bayesian çıkarsama ağacının girdi olarak kullanıldığı bPTP analizinde maksimum olasılık ve Bayesian çözümleri aynı sonucu vermiş olup 10 aday tür işaret etmiştir. Elimizdeki örnekler ile *A. mexicanum*, *A. andersoni*, ve *A. mavortium stebbinsi* birlikte aday tür olarak gruplanmıştır (Şekil 5).



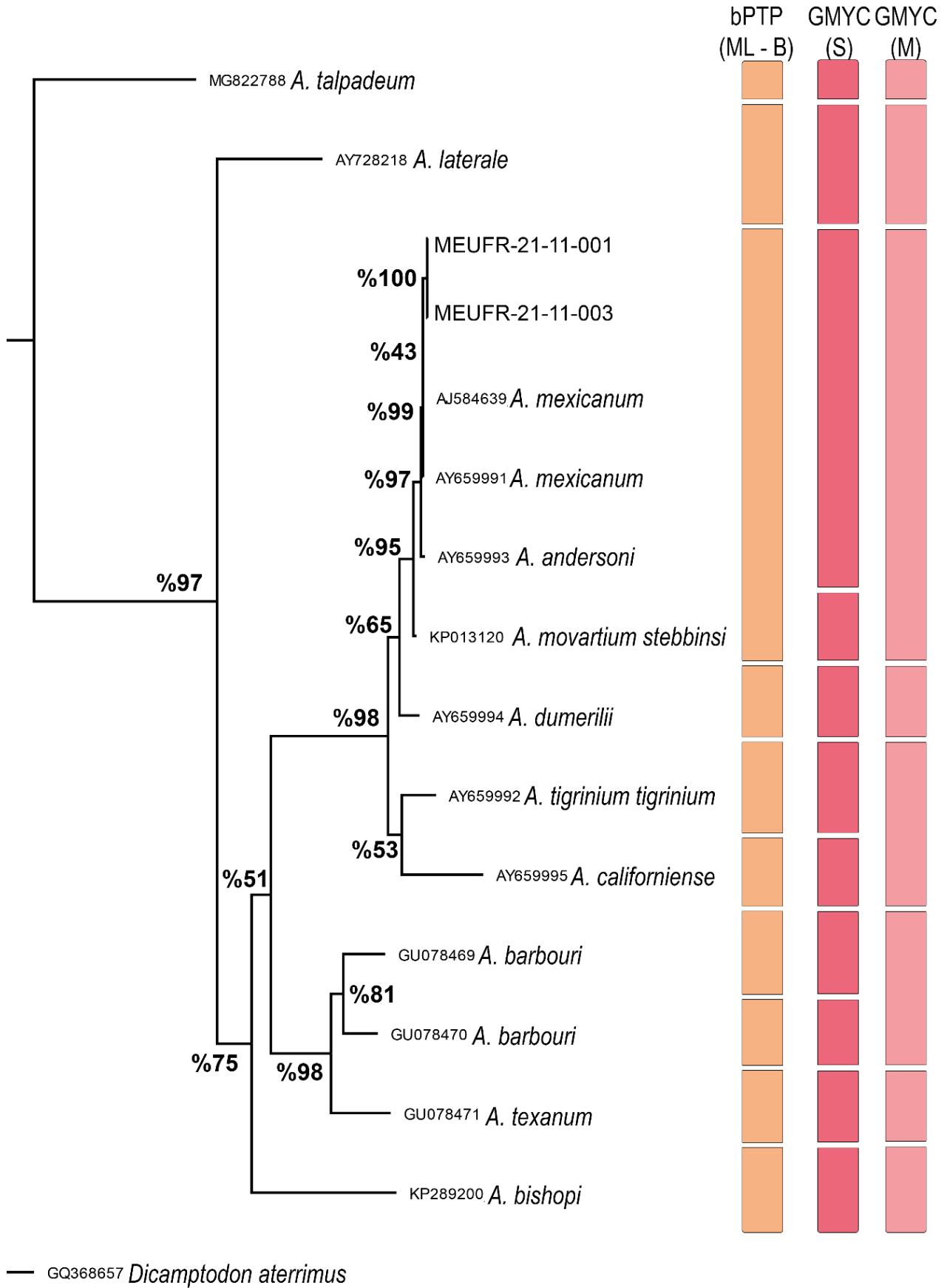
Şekil 3. *Cytb* veri seti ile inşa edilen maksimum olasılık ağacı (solda), % rakamlar UfBoot2 ile hesaplanan dal destek değerlerini göstermektedir. Sağdaki renkli sütunlar tür sınırlarını belirleme testlerine göre aday tür gruplarını göstermektedir.

Figure 3. Maximum likelihood tree constructed with *Cytb* data set (left), numerals show UfBoot2 clad supports. Coloured columns on the right show candidate species groupings according to species delimitation methods.



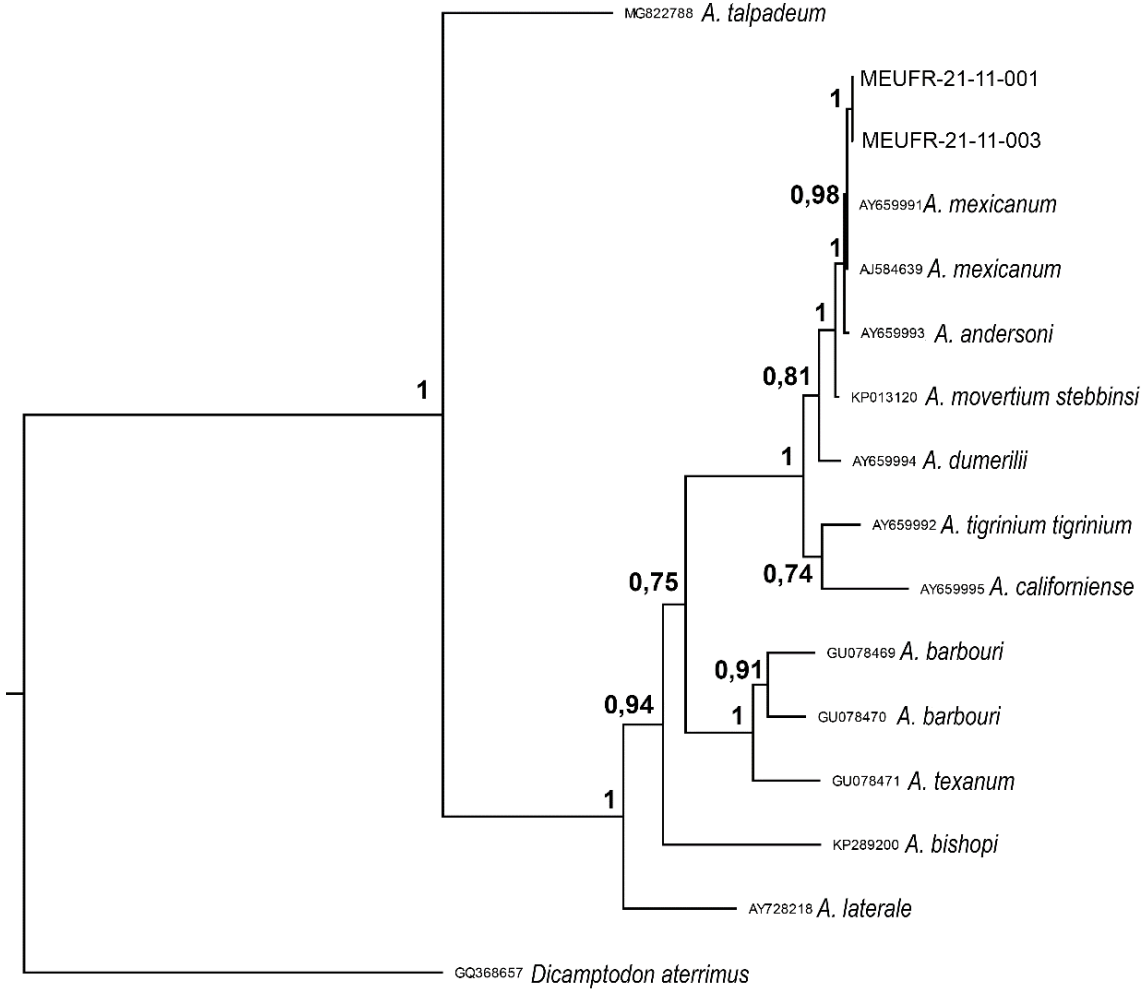
Şekil 4. *Cyth* veri seti ile inşa edilen Bayesian çıkarılma ağacı. Dğümler üzerindeki numaralar kladların soncul olasılık değerlerini göstermektedir.

Figure 4. Bayesian tree constructed with *Cyth* data set. Numerals above the nodes shows the posterior probability of the clades.



Şekil 5. *COI+Cytb* birleştirilmiş veri seti ile inşa edilen maksimum olasılık ağacı (solda), %rakamlar UfBoot2 ile hesaplanan dal destek değerlerini göstermektedir. Sağdaki renkli sütun bPTP testine göre aday tür gruplarını göstermektedir.

Figure 5. Maximum likelihood tree constructed with *COI+Cytb* concatenated data set (left), numerals show UfBoot2 clad supports. Coloured column on the right show candidate species groupings according to bPTP test.



Şekil 6. *COI+Cytb* birleştirilmiş veri seti ile inşa edilen Bayesian çıkarsama ağacı. Düğüm üzerindeki numaralar kladların soncul olasılık değerlerini göstermektedir.

Figure 6. Bayesian tree constructed with *COI+Cytb* concatenated data set. Numerals above the nodes shows the posterior probability of the clades.

GMYP analizinde tekli eşik değerinde (Single threshold) 11, çoklu eşik değerinde (Multi threshold) ise 8 aday tür tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diziler için çoklu eşik değerindeki gruplandırma bPTP analizindeki gruplandırma ile (*A. mexicanum*, *A. andersoni*, ve *A. mavortium stebbinsi*) ile aynıdır. Tekli eşik değerinde ise bu gruplandırmadan *A. mavortium stebbinsi* aday tür olarak ayrılmıştır (Şekil 3).

3.4. Total mitogenom veri seti

Yukarıda detayları verilen ve 3 farklı veri seti ile gerçekleştirilen analizlerde bu çalışmada dizilenen örnekler ile daha önceki çalışmalardan elde edilen *A. mexicanum*'a ait diziler her ne kadar birlikte gruplansalar da beklenen şekilde yalın ve diğer morfolojik türlerden farklı bir grup oluşturmadıkları görülmüştür. Bu durumun elimizdeki sınırlı uzunlukta ve 2 gen bölgesi ile sınırlı dizilerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının test edilmesi amacı ile NCBI GenBank veri tabanında bulunan ve içerisinde referans genomların da yer aldığı total mitogenomlar ile ek analizler gerçekleştirilmiştir (referans genom olan dizilerin numaraları ağaç görsellerinde erişim numaraları yanında parantez içerisinde verilmiştir). Bir dış grup dahil toplam 14 taksona ait 16101 bç

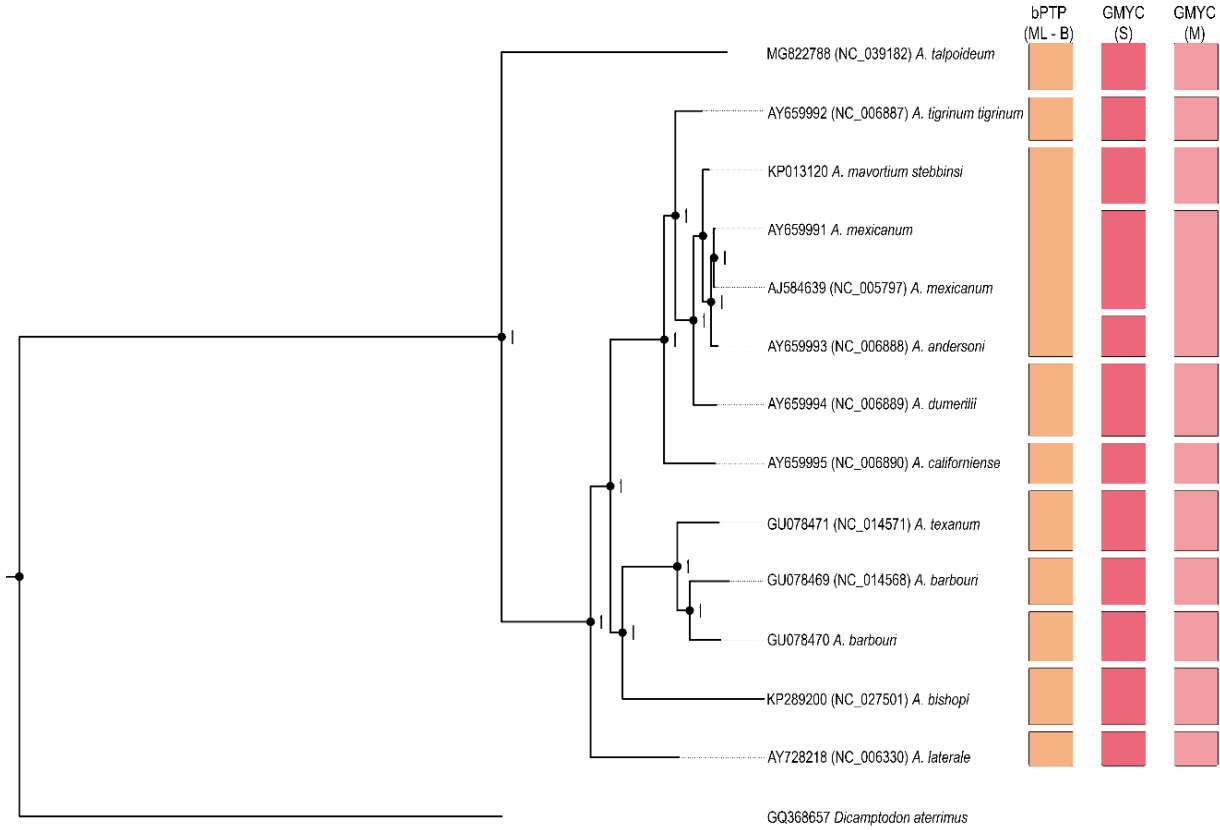
uzunluğunda dizi ile gerçekleştirilen Bayesian çıkarsama analizinde tüm kladlar 1 soncul olasılık değeri ile ayrılmıştır. Yukarıda farklı veri setleri ile gerçekleştirilen analizlere benzer şekilde *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. mavortium stebbinsi* ve *A. dumerilii* taksonlarının bulunduğu klad benzer topolojiye sahiptir. Bu ağacın girdi olarak kullanıldığı bPTP analizinin her iki çözümünde de 11 *Ambystoma* taksonu 10 aday türe ayrılmıştır. Bu 11 taksondan *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. mavortium stebbinsi* yukarıdaki analizlere benzer şekilde aday tür olarak gruplanmıştır. GMYP analizinde tekli eşik değerinde 12, çoklu eşik değerinde ise 11 aday tür tespit edilmiştir. *A. mexicanum*, *A. andersoni*, *A. mavortium stebbinsi* taksonlarının dışında diğer taksonlar bPTP analizindeki şekli ile gruplanmıştır. Tekli eşik değerindeki gruplama morfolojik türler ile aynıdır. Çoklu eşik değerinde ise diğer tüm analizlerde olduğu gibi *A. mexicanum* ve *A. andersoni* taksonları birlikte aday tür olarak gruplanmıştır (Şekil 7).

4. Tartışma

Ambystoma mexicanum türü yüksek rejeneratif kapasitesi nedeniyle bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve rejenerasyon kapasiteleri birçok araştırmaya konu

olmuştur. Diğer semender türlerinin aksine bu tür uygun yaşam koşullarında metamorfoz geçirmeden kalabilir ve bu sayede embriyonik hücre benzeri rejenerasyon potansiyelini koruyabilir. Kompleks organ ve dokuları

rejenera edebilir ve bunu yara izi olmadan gerçekleştirebilirler (Gresens, 2004; Lust & Tanaka, 2019). Bu özellikleri sebebi ile sıklıkla model organizma olarak yetiştirilmektedirler.



Şekil 7. Total mitogenom veri seti ile inşa edilen Bayesian çıkarsama ağacı (solda). Düğümler üzerindeki numaralar kladların soncul olasılık değerlerini göstermektedir. Sağdaki renkli sütun bPTP testine göre aday tür gruplarını göstermektedir.

Figure 7. Bayesian tree constructed with complete mitogenome data set. Numerals above the nodes shows the posterior probability of the clades. Coloured column on the right show candidate species groupings according to bPTP test.

Genel olarak canlıların konu olduğu tüm araştırmalarda olduğu gibi özellikle rejeneratif tıp alanı gibi model organizmaların kullanıldığı alanlarda hem çalışma sonuçlarının tekrar edilebilirliği, hem de farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmaların sağlıklı karşılaştırılabilirliği açısından, üzerinde çalışılan canlının tür teşhisinin doğru yapılması önemlidir (Bortolus, 2008). Bu sebeple bu çalışmada Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Birimleri'nde rejeneratif tıp araştırmalarında kullanılmak üzere model organizma olarak yetiştirilen ve morfolojik olarak *Ambystoma mexicanum* olarak teşhis edilmiş olan bireylerin tür teşhisleri yukarıda detayları verilen moleküler filogenetik analizler ile test edilmiştir. Farklı veri setlerinin kullanıldığı bu analizlerin tamamında söz konusu bireyler daha önceki çalışmalarda elde edilen *A. mexicanum* türü ile aday tür olarak gruplanmıştır.

Bunun yanında *COI* veri seti için bu çalışmalardan elde edilen diziler ile NCBI GenBank'tan elde edilen *A. mexicanum* dizileri haplotip olarak gruplanmış olup genetik uzaklıkları 0'dır. Benzer şekilde *Cytb* veri setinde de bu çalışmada dizi bilgisi elde edilmiş olan örnekler *A. mexicanum*'a ait bir dizi ile (AY659991) ile haplotip olarak gruplanmış (genetik uzaklık 0) olup diğer bir *A. mexicanum* (AJ584639) örneği ile ise genetik uzaklığı 0,0014'tür. Bu uzaklık ise toplam 698 bç uzunluğundaki dizide 1

nükleotid substitüsyonundan kaynaklanmaktadır. Bu substitüsyon 3. kodon pozisyonunda yer almakta olup kodlanan aminoasiti (lösin) değiştirmemektedir (TTA → TTG, transiyonel sessiz mutasyon). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmanın konusu olan bireyler *A. mexicanum* türüne aittir.

Bununla birlikte *COI* ve *Cytb* veri setlerini birlikte kullanarak yapılan analizlerde *Ambystoma* cinsi içerisinde *A. barbouri* ve *A. texanum*'un tür kompleksi olabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmanın amacı *Ambystoma* cinsinin filogenisi olmadığından bu duruma ayrıntılı değinilmemiştir, fakat bu çalışmanın konusunu oluşturan *A. mexicanum*'un durumu aşağıda ayrıntılı tartışılmıştır.

COI, *Cytb* ve *COI+Cytb* birleştirilmiş veri setleri ile yapılan tüm analizlerde *A. mexicanum* (ve bu çalışmanın konusu bireyler, bundan sonra *A. mexicanum* olarak geçecektir) en geniş anlamda *A. andersoni*, *A. mavortium stebbinsi*, *A. tigrinum* ve *A. dumerilii* ile birlikte, en dar anlamda ise *A. andersoni* ile birlikte bir tür olarak gruplanmıştır. Bu durumun iki gen bölgesi ile sınırlı veri setinden mi kaynaklandığının anlaşılabilmesi için söz konusu taksonların total mitogenomları ile oluşturulan dördüncü bir veri setinden bPTP ve GMYC testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testin sonucundaki gruplama *COI+Cytb* birleştirilmiş veri seti ile yapılan gruplama ile aynı olup gerçekleştirilen analizlerde (tek eşik değerlikli

GMYC analizi hariç) *A. mexicanum*, tekrar *A. andersoni* ile aday tür olarak gruplanmıştır. Bu durumun üç sebebi olabilir; i) NCBI veri bankasında mitogenomu verilen dizi (*A. andersoni*; AY659993) yanlış taksona atanmıştır, ii) bu takson parafiletik olup *A. mexicanum* türüne atanmalıdır, veya çok az olasılıkla bir ihtimal olarak iii) total mitogenom dahil veri setleri *Ambystoma* cinsi için tür sınırlarını belirlemede yetersizdir. Elde edilen tüm ağaçlardaki dal uzunlukları da göz önünde bulundurulduğunda birinci ve ikinci senaryonun olabilirliği ağır basmaktadır. Söz konusu iki taksona ait dizilerin sadece birer total mitogenom ile sınırlı olması kesin bir yargıya varmayı güçleştirmektedir.

Ambystoma andersoni' nin bu makalede kullanılan dizisi diğer dört *Ambystoma* total mitogenom dizisi ile birlikte (*A. californiense*, *A. tigrinum*, *A. dumerilii*, *A. mexicanum*, *A. andersoni*) Ambystomidae familyasının filogenetik pozisyonunu çözmek amacıyla Samuels et al. (2005) tarafından dizilenmiş ve aynı çalışmada analiz edilmiştir. Çalışma sonucu bu 5 taksondan oluşan ağaçta bu çalışmada elde edilen ağaçlara benzer şekilde *A. mexicanum* ve *A. andersoni* kardeş takson olarak yer almış (soncul olasılığı 1), *A. dumerilii* ise bu klada kardeş takson olarak yer almıştır (soncul olasılık 1). Beş taksonun tümü birlikte değerlendirildiğinde analiz sonucunda elde ettikleri akrabalık ilişkileri bu çalışmada elde edilen ile benzer sonuçları vermektedir. Fakat Samuels et al. (2005) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmanın hedefi *Ambystoma* içerisindeki tür sınırlarının belirlenmesinden ziyade Ambystomidae familyasının filogenisini belirlemek olduğundan bu iki türün (*A. mexicanum* ve *A. andersoni*) yakın ilişkisini ayrıntılı tartışmamışlardır.

Farklı veri setleri ile elde edilen ağaçlarda birlikte gruplanan *A. californiense*, *A. tigrinum*, *A. dumerilii*, *A. moveratum* *stebbinsi* ve *A. mexicanum* uzun süredir *A. tigrinum* tür kompleksinin birer üyesi olarak bilinmektedir (Gehlbach, 1967). *Ambystoma* içerisinde durumun çözümü ile ilgili sınırlı çalışmalar bulunmakta olup (Shaffer & McKnight, 1996; O'Neill et al., 2013) bu çalışmada da elde edilen sonuçlar tür kompleksinin henüz çözülmediğini göstermiştir.

Son olarak 3 sınırlı veri seti ile yapılan analizler total mitogenom veri seti ile yapılan analizler ile karşılaştırıldığında, farklı veri setleri arasındaki toplam aday tür sayısındaki değişimin analizlere dahil edilebilen takson sayısı (NCBI GenBank'ta söz konusu genin dizisine sahip takson sayısı) ile orantılı olarak arttığı görülmüştür. Bu bağlamda dış grup hariç, *COI* veri setine dahil edilen 19 takson 16-20 aday türe, *Cytb* veri setine dahil edilen 24 takson 21-29 aday türe, *Cytb+COI* ve total mitogenom veri setine dahil edilen 11 takson ise sırasıyla 8-11 ve 10-12 aday türe gruplanmıştır. Fakat tüm veri setlerinde ortak olan 11 takson düşünüldüğünde aday tür gruplamalarının benzer olduğu görülmüştür. Bu sebeple en azından çalışma konusu olan *Ambystoma* cinsi için tek bir gen bölgesinden oluşan sınırlı veri setinin de aday türlerin belirlenmesinde yeterli olduğu düşünülmektedir.

Teşekkür: Bu proje, Mersin Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından 2021-1-AP7-4362 proje kodu ile desteklenmiştir.

Etik kurul onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı alınmasına gerek yoktur.

Çıkar çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Kaynaklar

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arnason, U., Gullberg, A., Janke, A., Joss, J., & Elmerot, C. (2004). Mitogenomic analyses of deep gnathostome divergences: a fish is a fish. *Gene*, 333, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.014>
- Bi, K., & Bogart, J.P. (2010). Time and time again: unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) are the oldest unisexual vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-238>
- Bortolus, A. (2008). Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO: A Journal of The Human Environment*, 37(2), 114-118. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2008\)37\[114:ECITBS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2008)37[114:ECITBS]2.0.CO;2)
- Bouckaert, R.R., & Drummond, A.J. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1-11.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., ... & Drummond, A.J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537.
- Chambers, E.A., & Hebert, P.D. (2016). Assessing DNA barcodes for species identification in North American reptiles and amphibians in natural history collections. *PLoS One*, 11(4), e0154363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154363>
- Chippindale, P. T., Bonett, R. M., Baldwin, A. S., & Wiens, J. J. (2004). Phylogenetic evidence for a major reversal of life-history evolution in plethodontid salamanders. *Evolution*, 58(12), 2809-2822.
- Crandall, M.C.D.P.K., Clement, M., & Posada, D. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657-1660. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Demircan, T., Hacıbektaşoğlu, H., Sibai, M., Fescioğlu, E.C., Altuntaş, E., Öztürk, G., & Süzek, B.E. (2020). Preclinical molecular signatures of spinal cord functional restoration: Optimizing the metamorphic axolotl (*Ambystoma mexicanum*) model in regenerative medicine. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 24(6), 370-378. <https://doi.org/10.1089/omi.2020.0024>
- Diaz Quiroz, J.F., & Echeverri, K. (2013). Spinal cord regeneration: where fish, frogs and salamanders lead the way, can we follow?. *Biochemical Journal*, 451(3), 353-364. <https://doi.org/10.1042/BJ20121807>
- Echeverri, K. (2020). The various routes to functional regeneration in the central nervous system. *Communications Biology*, 3(1), 1-4. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0773-z>
- Farkas, J.E., & Monaghan, J.R. (2015). Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Salamanders in Regeneration Research* (pp. 27-46), Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2495-0_3
- Flot, J.F. (2015). Species delimitation's coming of age. *Systematic Biology*, 64(6), 897-899. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv071>
- Gehlbach, F.R. (1967). *Ambystoma tigrinum*. Catalogue of American Amphibians and Reptiles (CAAR).
- Gresens, J. (2004). An introduction to the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab Animal*, 33(9), 41-47. <https://doi.org/10.1038/labani1004-41>
- Hall, T. (2004). BioEdit version 7.0. 0. Distributed by the author, website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
- Hoang, D.T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B.Q., & Vinh, L.S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Katoh, K., & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Lévesque, M., Villiard, É., & Roy, S. (2010). Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(8), 684-697. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21371>
- Lust, K., & Tanaka, E.M. (2019). A comparative perspective on brain regeneration in amphibians and teleost fish. *Developmental Neurobiology*, 79(5), 424-436. <https://doi.org/10.1002/dneu.22665>
- Maddison, W.P. (2021). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.6. <http://mesquiteproject.org>
- Mashkouli, M., Aghaei, M., & Mofid, M. R. (2020). Purification of Soluble Membrane-Bound Ambystoma mexicanum Epidermal Lipoxigenase from *E. coli* and Its Growth Effect on Human Fetal Foreskin Fibroblast. *The Protein Journal*, 39(4), 377-382. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09898-w>
- Menger, B., Vogt, P.M., Allmeling, C., Radtke, C., Kuhbier, J.W., & Reimers, K. (2011). AmbLOXe—an epidermal lipoxigenase of the Mexican axolotl in the context of amphibian regeneration and its impact on human wound closure in vitro. *Annals Of Surgery*, 253(2), 410-418. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318207f39c>
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Moritz, C., Schneider, C.J., & Wake, D.B. (1992). Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41(3), 273-291. <https://doi.org/10.1093/sysbio/41.3.273>
- Mueller, R.L., Macey, J.R., Jaekel, M., Wake, D.B., & Boore, J.L. (2004). Morphological homoplasy, life history evolution, and historical biogeography of plethodontid salamanders inferred from complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(38), 13820-13825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405785101>
- O'Neill, E.M., Schwartz, R., Bullock, C.T., Williams, J S., Shaffer, H.B., Aguilar-Miguel, X., ... & Weisrock, D.W. (2013). Parallel tagged amplicon sequencing reveals major lineages and phylogenetic structure in the North American tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) species complex. *Molecular Ecology*, 22(1), 111-129. <https://doi.org/10.1111/mec.12049>
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., ... & Vogler, A.P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55(4), 595-609.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G.J.M.E. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Rambaut, A. FigTree v1. 4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. 2018.
- Rambaut, A., Drummond, A., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M.A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Reiß, C., Olsson, L., & Hofsfeld, U. (2015). The history of the oldest self-sustaining laboratory animal: 150 years of axolotl research. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324(5), 393-404. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22617>
- Ren, Z.L., Yao, N.N., Liu, L., Wu, Y., & Qian, Z.Q. (2019). Characterization of the complete mitochondrial genome of the mole salamander *Ambystoma talpoideum* (Caudata: Ambystomatidae). *Conservation Genetics Resources*, 11(4), 397-400. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1031-2>
- Robertson, A. V., Ramsden, C., Niedzwiecki, J., Fu, J., & Bogart, J. P. (2006). An unexpected recent ancestor of unisexual *Ambystoma*. *Molecular Ecology*, 15(11), 3339-3351.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Roy, S., & Lévesque, M. (2006). Limb regeneration in axolotl: is it superhealing?. *The Scientific World Journal*, 6, 12-25. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.324>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sabin, K.Z., Jiang, P., Gearhart, M.D., Stewart, R., & Echeverri, K. (2019). AP-1 cFos/JunB/miR-200a regulate the pro-regenerative glial cell response during axolotl spinal cord regeneration. *Communications Biology*, 2(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0335-4>
- Samuels, A.K., Weisrock, D.W., Smith, J.J., France, K.J., Walker, J.A., Putta, S., & Voss, S.R. (2005). Transcriptional and phylogenetic analysis of five complete ambystomatid salamander mitochondrial genomes. *Gene*, 349, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.037>
- Shaffer, H.B., & McKnight, M.L. (1996). The polytypic species revisited: genetic differentiation and molecular phylogenetics of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata) complex. *Evolution*, 50(1), 417-433. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb04503.x>
- Sibai, M., Parlayan, C., Tuğlu, P., Öztürk, G., & Demircan, T. (2019). Integrative analysis of axolotl gene expression data from regenerative and wound healing limb tissues. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56829-6>
- Siler, C.D., Freitas, E.S., Yuri, T., Souza, L., & Watters, J.L. (2021). Development and validation of four environmental DNA assays for species of conservation concern in the South-Central United States. *Conservation Genetics Resources*, 13(1), 35-40. <https://doi.org/10.1007/S12686-020-01167-3>
- Sites Jr, J.W., & Marshall, J.C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(9), 462-470. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00184-8)
- Smith, M.A., Poyarkov Jr, N.A., & Hebert, P.D. (2008). DNA barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*, 8(2), 235-246. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01964.x>
- Sortiano-Lopez, M., Mota-Rojas, D., Iglesias, A.V., Ramirez-Necoechea, R., Olmos-Hernandez, A., Toca-Ramirez, J., & Alonso-Spilsbury, M. (2006). The Axolotl (*Ambystoma mexicanum*): Factors That Limit its Production and Alternatives for its Conservation. *International Journal of Zoological Research* 2(4), 362-368. <https://doi.org/10.3923/ijzr.2006.362.368>
- Stamm, A., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2018). Positive in vitro wound healing effects of functional inclusion bodies of a lipoxigenase from the Mexican axolotl. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0904-0>
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>
- Zhang, P., & Wake, D.B. (2009). Higher-level salamander relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(2), 492-508. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.07.010>