

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN *Myodes glareolus* SCHREBER, 1780
(MAMMALIA: RODENTIA)’un FİLOGENETİK ANALİZİ

Fatma Hümevra TAŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN *Myodes glareolus* SCHREBER, 1780 (MAMMALIA: RODENTIA)’UN FİLOGENETİK ANALİZİ

Fatma Hümeysra TAŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gül OLGUN KARACAN

Palearktık bölgenin yaprak döken ormanlarında yaşayan kızıl sırtlı orman faresi, *Myodes glareolus* Türkiye’de Karadeniz Bölgesinde yayılış gösteren önemli bir kemirici türüdür. Yaşanan iklimsel ve jeolojik değişiklikler sebebiyle birçok türün filocoğrafyasının şekillenmesinde önemli roller oynayan bu bölgede daha önce yapılan moleküler genetik çalışmalar *M. glareolus*’un Batı ve Doğu Karadeniz olmak üzere iki soy hattına ayrıldığını göstermiştir. *Cytb* gen bölgesiyle yapılan önceki çalışmalarda Türkiye’nin batısından toplanan Uludağ örneklerinin doğu örnekleri ile kümelenmesi, populasyonlar arası farklılaşmayı etkileyen unsurlar ile tür içi genetik varyasyona neden olan süreçlerin değerlendirilmesini gerekli kılmıştır. Bu tez çalışmasında Türkiye’nin 23 farklı lokalitesinden elde edilen mtDNA *Cytb* gen bölgesiyle birlikte ilk defa *COI* gen bölgesi çalışılmış ve *M. glareolus*’un Türkiye’deki filogenisini açıklamak için daha fazla örnek üzerinden analizler yapılmıştır. *COI* gen bölgesi analizleri kapsamında toplanan toplam 63 *M. glareolus* örneği ile GenBank’tan elde edilen 3 *M. glareolus* dizisi kullanılmış ve 11 haplotip elde edilmiştir. *Cytb* gen bölgesi analizleri kapsamında ise 29 *M. glareolus* örneği ile GenBank’ta kayıtlı 34 *M. glareolus* dizisi kullanılmış ve 35 haplotip elde edilmiştir. Çalışma sonucu Türkiye’deki kızıl sırtlı orman faresi populasyonlarının 2 grup oluşturduğu ortaya konulmuş ve analizler Uludağ grubunun yeniden doğu örnekleri ile kümelendiğini göstermiştir. Populasyonlar arası farklılaşmanın, Kuvaterner dönemde yaşanan gelişmeler ile Uludağ bölgesinin coğrafi özellikleri ve iklimsel değişikliklerden kaynaklandığı tartışılmıştır.

Şubat 2021, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Myodes glareolus*, mtDNA, *COI*, *cytb*, orman faresi, Türkiye

ABSTRACT

Master Thesis

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Myodes glareolus* SCHREBER, 1780 (MAMMALIA: RODENTIA) DISTRIBUTED IN TURKEY

Fatma Hümeyra TAŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Reyhan ÇOLAK

Co-Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Gül OLGUN KARACAN

Red-backed vole, *Myodes glareolus*, living in deciduous forests of Palearctic region is an important rodent species distributed in Black Sea region of Anatolia in Turkey. Former genetic researches conducted in the region where it has a significant role in shaping phylogeography of many species due to climatic and geological changes indicated that *M. glareolus* are separated into two genetic lineages as “western Black Sea” and “eastern Black Sea”. In previous studies made with *cytb* region of mtDNA, clustering of Uludag specimens, collected from the western part of Turkey, with eastern specimens made it necessary to evaluate the elements acting on differentiation among populations and processes leading to intraspecific genetic variation. In this thesis study *COI* region of mtDNA were used for the first time together with *cytb* region collected from 23 different localities of Turkey and analyses on more specimens were carried out to explain the phylogeny of *M. glareolus* in Turkey. Within the scope of *COI* analyses collected 63 *M. glareolus* specimens and 3 *M. glareolus* sequences, obtained from Genbank, were used and 11 haplotypes were acquired. Within the scope of *Cytb* analyses 29 *M. glareolus* specimens and 34 *M. glareolus* sequences, recorded in the Genbank, were used and 35 haplotypes were acquired. Findings of the study revealed that bank vole populations in Turkey formed 2 groups and Uludag group clustered with eastern specimens once again. It was discussed that differentiation among populations are derived from events in Quaternary period, geographical characteristics of Uludag region and climatic changes.

February 2021, 95 pages

Key Words: *Myodes glareolus*, mtDNA, *COI*, *cytb*, bank vole, Turkey

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her bir aşamasında sağladığı bilgi ve katkılar ile akademik yönden gelişmeye imkân sunan, öneri ve yönlendirmeleri ile her daim desteğini hissettiğim ve çalışmamı kararlılıkla tamamlamam için bana güven veren danışman hocam sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK’a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü), örneklerin temini ve teşhis edilmesini sağlayan ve aynı zamanda engin deneyimi ve bakış açısı ile desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK’a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü), laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen, çalışmamı düzenlememde bana yol gösteren ve aynı zamanda eş danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Gül OLGUN KARACAN’a, çalışmamda kullandığım örneklerin elde edilmesine katkı sunan Prof. Dr. Nuri YİĞİT’e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve laboratuvar deneylerinde bilgi ve tecrübesiyle yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Engin SELVİ’ye (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü) en içten duygularımla teşekkür ederim. Ayrıca bu süreçte gösterdikleri fedakârlıklar ile her daim arkamda olarak yüreklendiren ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Rukiye SARI, babam Mustafa SARI, ağabeyim Halid SARI ve değerli eşim Nurullah TAŞ’a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamı 19L0430009 nolu ‘Türkiye’de Yayılış Gösteren *Myodes glareolus* Schreber, 1780 (Mammalia: Rodentia)’un Filogenetik Analizi’’ konulu proje ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü’ne teşekkür ederim.

Fatma Hümeysra TAŞ

Ankara, Şubat 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1 Ordo: Rodentia Bowdich, 1821.....	7
2.2 Familya: Muridae Illiger, 1815	9
2.3 Alt familya: Arvicolinae Gray, 1821.....	11
2.4 Cins: <i>Myodes</i> Pallas, 1811.....	12
2.5 Tür: <i>Myodes glareolus</i> Schreber, 1780	13
2.5.1 Genel Özellikleri.....	13
2.5.2 Habitat ve Yayılışı.....	15
2.5.3 <i>Myodes glareolus</i> 'un Filocoğrafyası ve Etkileyen Olaylar.....	17
2.6 Moleküler Filogeni	19
2.7 Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Kullanılan Gen Bölgeleri.....	23
2.7.1 Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (<i>COI</i>) Gen Bölgesi.....	28
2.7.2 Sitokrom b (<i>Cytb</i>) Gen Bölgesi	28
2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
2.8.1 PCR'ın Bileşenleri.....	30
2.8.2 PCR'ın Temel Adımları.....	34
2.8.3 PCR'ın Uygulama Alanları	37

2.8.4 PCR'ın Avantajları Ve Dezavantajları	38
2.8.5 PCR Makinaları	38
2.8.6 PCR Reaksiyonunun Gerçekleştirildiği Tüpler	39
2.9 Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
2.10 DNA Dizi Analizi	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1 Örneklerin Tasnifi.....	42
3.2 DNA İzolasyonu.....	46
3.3 PCR Çalışmaları	51
3.4 Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları.....	54
3.5 Agaroz Jel Görüntüleme	55
3.6 DNA Dizi Analizi Çalışmaları	57
3.7 İstatistiksel Analizler	58
3.8 Moleküler Tarihleme Analizi	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	61
4.1 Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (COI) Gen Bölgesine Ait Bulgular	61
4.2 Sitokrom b (Cytb) Gen Bölgesine Ait Bulgular	67
4.3 Moleküler Tarihleme Analizine Ait Bulgular.....	74
5. TARTIŞMA	76
KAYNAKLAR	86

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
°C	Santigrat derece
μM	Mikrometre
2n	Diploid kromozom sayısı
C	Köpek dişi
cm	Santimetre
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
γ	Gama
gr	Gram
<i>h</i>	Haplotip çeşitliliği
I	Kesici diş
Kg	Kilogram
m	Metre
M	Molar diş
M	Molar
M1	Alt çenenin birinci molar dişi
M2	Alt çenenin ikinci molar dişi
M3	Alt çenenin üçüncü molar dişi
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür

Nf	Temel kromozom kol sayısı
Nfa	Otozomal kromozom kol sayısı
ng	Nanogram
pH	Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)
PM	Premolar
pmol	Pikomol
rpm	Dakikadaki dönüş hız birimi (revolution per minute)
u	Atomik kütle birimi
X	Dişi eşey kromozomu
Y	Erkek eşey kromozomu
α	Alfa
β	Beta
μ l	Mikrolitre
π	Nükleotid çeşitliliği
τ	Tau parametresi

Kısaltmalar

A	Adenin
ADP	Adenozin difosfat
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ATP	Adenozin trifosfat
BAP	Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
BI	Bayesian Çıkarımı (Bayesian Inference)
BIC	Bayesian Bilgi Kıstası (Bayesian information criterion)
bp	Baz çifti
BPP	Bayesian Ön Olasılıkları (Bayesian Posterior Probabilities)
C	Sitozin
C: IAA	Kloroform: izoamil alkol
COI	Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite 1

CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromid
Cytb	Sitokrom b
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
ddATP	Dideoksiadenintrifosfat
ddCTP	Dideoksisitozintrifosfat
ddGTP	Dideoksiguanintrifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleozid trifosfat
ddTTP	Dideoksitimintrifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
<i>D-loop</i>	Kontrol bölgesi
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
dsDNA	Çift zincirli DNA
dTTP	Deoksitimin trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ESS	Etkili örneklem büyüklüğü (Effective Sample Size)
EtBr	Etidyum Bromür
G	Guanin
GDP	Guanozin difosfat
GN	Gümüş nitrat
GTP	Guanozin trifosfat
HKY+G	Gamma parametrelili Hasegawa, Kishino ve Yano modeli
HPD	En yüksek posterior yoğunluk
IUCN	Tehdit Altındaki Türler Kırmızı Listesi
K2P	Kimura-2 parametresi
LC	En Az Endişe Verici
LGM	Son Buzul Dönemi (Last Glacial Maximum)
MIS6	Deniz İzotop Katı 6 (Marine Isotope Stage 6)
ML	Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood)
MP	Maksimum Tutumluluk (Maximum-Parsimony)
mtDNA	Mitokondriyal DNA

Myö	Milyon yıl önce
nDNA	Nükleer DNA
NDP	Nükleozit difosfatlar
NMP	Nükleozit monofosfat
NTP	Nükleozit trifosfatlar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
RAPD	Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Kesilen Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNAse A	Ribonükleaz A
rRNA	Ribozomal RNA
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSCP	Tek zincirli konformasyon polimorfizmi
ssDNA	Tek zincirli DNA
T	Timin
Ta	Primerin bağlanma sıcaklığı
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borik asit EDTA
TE	Tris EDTA
Tm	Primerin erime sıcaklığı
TMRCa	En yakın ortak atadan ayrılma zamanı
tRNA	Taşıyıcı RNA
U	Urasil
UV	Ultraviyole
βME	β-Merkaptoetanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kemiricilerin Diastema Boşluğu	8
Şekil 2.2 Kemiricilerin uterus tipleri.....	9
Şekil 2.3 <i>Myodes glareolus</i>	13
Şekil 2.4 <i>Myodes glareolus</i> 'un Göktepe'deki (Sinop) habitatı	15
Şekil 2.5 <i>Myodes glareolus</i> 'un dağılımı	16
Şekil 2.6 Hücre'de DNA'nın yapısı	21
Şekil 2.7 Pentoz şekerlerin kimyasal halka yapıları.....	22
Şekil 2.8 Nükleotid yapısı	23
Şekil 2.9 Mitokondriyal DNA.....	24
Şekil 2.10 Mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın yapısı.	25
Şekil 2.11 Forward ve revers primerlerin bağlanması	31
Şekil 2.12 Nükleotidlerin bileşenleri	33
Şekil 2.13 PCR'ın adımları	34
Şekil 2.14 DNA'nın tekrarlayan döngülerle çoğalması	36
Şekil 2.15 Sanger yöntemi ile bilgisayar destekli DNA dizileme.....	41
Şekil 3.1 <i>M. glareolus</i> örneklerinin toplandığı lokaliteler	42
Şekil 3.2 Su banyosunda inkübe edilen ependorf tüpleri	47
Şekil 3.3 Ependorf tüplerinin yerleştirildiği santrifüj cihazı.....	48
Şekil 3.4 PCR cihazları (Termal Döngü Cihazları)	52
Şekil 3.5 Jel tepsisine dökülecek sıvı haldeki agaroz jel	54
Şekil 3.6 PCR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara yüklenmesi	55
Şekil 3.7 Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I gen bölgesine ait agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 3.8 Sitokrom b gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	56
Şekil 3.9 Dizi analizi sonucu kromatogram dosyası	57
Şekil 4.1 <i>COI</i> gen bölgesine ait Maksimum Likelihood (ML) ağacı.....	62
Şekil 4.2 Bayesian MCMC yöntemi ile oluşturulan, <i>COI</i> gen bölgesine ait filogenetik ağaç	62
Şekil 4.3 <i>M. glareolus</i> ait <i>COI</i> dizilerinden elde edilen Median-Joining ilişki ağı	63
Şekil 4.4 Grup 1 populasyonunun <i>COI</i> gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği.....	65

Şekil 4.5 <i>M. Grup 2</i> populasyonunun <i>COI</i> gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği.....	65
Şekil 4.6 Türkiye populasyonunun <i>COI</i> gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği.....	66
Şekil 4.7 <i>Cytb</i> gen bölgesine ait Maksimum Likelihood (ML) ağacı.....	69
Şekil 4.8 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, <i>Cytb</i> gen bölgesine ait filogenetik ağaç	70
Şekil 4.9 <i>M. glareolus</i> 'a ait <i>Cytb</i> dizilerinden elde edilen Median-Joining ilişki ağı	71
Şekil 4.10 <i>M. glareolus</i> 'a ait Grup 1 populasyonunun <i>Cytb</i> gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği	72
Şekil 4.11 <i>M. glareolus</i> 'a ait Grup 2 populasyonunun <i>Cytb</i> gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği	73
Şekil 4.12 <i>M. glareolus</i> 'a ait Türkiye populasyonunun <i>Cytb</i> gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği	73
Şekil 4.13 <i>M. glareolus</i> örneklerine ait evrimsel ayrılma zamanlarını gösteren Bayesian tabanlı MCMC filogenetik ağacı.....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Myodes</i> 'e ait bütün türler ve tanımlayıcıları	12
Çizelge 2.2 Mitokondriyal DNA'nın Nükleer DNA'dan Farkları	26
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan <i>Myodes glareolus</i> örnekleri.....	43
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan <i>Myodes glareolus</i> örneklerine ve dış gruba ait GenBank numaraları ile örnek lokaliteleri	45
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması ve saklama koşulları.....	49
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan <i>Myodes glareolus</i> DNA miktarı ve saflık ölçümü	50
Çizelge 3.5 <i>COI</i> ve <i>Cytb</i> Gen Bölgeleri için kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları.....	21
Çizelge 3.6 <i>COI</i> ve <i>Cytb</i> için Kullanılan Primerler	22
Çizelge 3.7 Sitokrom c Oksidaz Alt ünite I (<i>COI</i>) gen bölgesi için optimum PCR koşulları.....	53
Çizelge 3.8 Sitokrom b (<i>Cytb</i>) gen bölgesi için optimum PCR koşulları.....	53
Çizelge 4.1 <i>Myodes glareolus</i> 'un <i>COI</i> gen bölgesine ait haplotipleri	61
Çizelge 4.2 <i>M. glareolus</i> 'un filogenetik analizlerde tanımlanan gruplarına ve Türkiye populasyonuna ait genetik çeşitlilik ve tarafsızlık (neutrality) analizleri.....	64
Çizelge 4.3 Türkiye'deki <i>Myodes glareolus</i> grupları için üç potansiyel evrimsel oranla hesaplanan genişleme süresi tahminleri	66
Çizelge 4.4 <i>Myodes glareolus</i> grupları arasındaki K2P genetik mesafe değerleri (%) ..	67
Çizelge 4.5 <i>Myodes glareolus</i> 'un <i>Cytb</i> gen bölgesine ait haplotipleri	68
Çizelge 5.1 Farklı Çalışmalardaki Haplotip (<i>h</i>) ve Nükleotid (π) Çeşitlilik Değerleri...	79

1. GİRİŞ

Pleistosen iklim değışikliklerine Avrupa faunasının tepkisinin araştırılmasında önemli bir tür olan, kızıl sırtlı orman faresi *Myodes glareolus* (Schreber, 1780), Avrupa'nın ılıman ve kuzey ormanları (Amori vd. 2008) ile palearktik bölgenin yaprak döken ormanlarında yaygın olan küçük bir orman kemiricisi olarak bulunmaktadır (Chiocchio vd. 2019). *M. glareolus*, Muridae familyasına ait 3 alt familyadan Arvicolinae'ye ait bir türdür ve bu alt familyaya ait 20 tür Türkiye'de de yaşamaktadır (Yiğit vd. 2006).

Türkiye; Avrupa, Asya ve Afrika kıtaları olmak üzere üç kıtanın birleştiği alanda yer almaktadır. Birinci ve ikinci jeolojik zaman dilimlerinde sular altında olan Anadolu, üçüncü jeolojik zaman dilimi olan Senozoik'le birlikte karasallaşma sürecine girmiş ve bu karasallaşma sonucu canlı türleri arasında kıtalar arası etkileşime yol açarak canlı gruplarının göç yollarında önemli bir yer tutmuştur. Anadolu, Oligosen'den beri yoğun bir türleşme ve coğrafik yayılım gösteren memeliler için köprü ve sığınak görevi görmüş ve bundan dolayı da Avrupa, Asya ve Afrika kıtaları arasında coğrafik bir kara köprüsü olmuştur.

Myodes glareolus'un en eski fosili 4,5 Myıl önce İspanya'nın yaşlı fosil yataklarında kaydedilmiştir. Bunun dışında Fransa, İtalya, Yunanistan ve Kafkaslardan daha genç zamanlı fosiller de tespit edilmiştir (Anonymous 2017). *M. glareolus*'un Türkiye'deki fosil kayıtları 1,95 Myö kadar geriye gitmektedir. Bugün yayılış göstermediği Emirkaya'dan (Seydişehir) ve Yarımburgaz Mağaraları'ndan (Trakya) da 1,95-0,01 Myıl öncesine ait fosil kaydı bulunmaktadır (Anonymous 2020). Elde edilen fosil kayıtları türün geçmişte Anadolu'da geniş bir yayılış alanına sahip olduğunu göstermektedir. Geçmişteki yayılış alanlarından türün yok olmasına sebep olan iklimsel, jeolojik ve tektonik olayların tartışılması önemlidir. Böylelikle *M. glareolus*'un yayılışını en çok etkileyen faktörlerin doğru şekilde tespit edilmesi mümkün olabilecektir.

Palearktik bölge boyunca yapılan filogenetik ve filocoğrafik çalışmalarla kızıl sırtlı orman faresinin evrimsel süreçte geçirmiş olduğu değışiklikler ortaya konmuştur (Çolak

vd. 2015, Lu vd. 2017, Chiocchio vd. 2019). Bu çalışmalarda özellikle Pleyistosen (1,81 Myö - →) dönemindeki iklim dalgalanmalarının türün farklılaşması üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca Orta Miyosen (15,3-14,7 Myö) (Frigola vd. 2018) iklim değişiklikleri, Akdeniz Tuzluluk Krizi (Messiniyen Tuzluluk Krizi) (5,96-5,33 Myö) (Duggen vd. 2003), Pliyosen iklim soğuması ve tektonik olaylar (5,33-1,1 Myö) ile Pleyistosen süresince meydana gelen diğer olayların türün yaşadığı alanları etkilediği gösterilmiştir. Geçmişten günümüze kadar yaşanan iklimsel değişiklikler, ormanlık alanların azalması ve parçalanmasına neden olmuştur. Özellikle Pleyistosen dönemindeki iklim değişiklikleri birçok popülasyonun buzul sığınaklarında kalması ile neticelenmiş ve böylece türde meydana gelen ikincil farklılaşmalar birçok farklı genetik soy hattını meydana getirmiştir. Buzul arası dönemlerde buzul sığınağından çıkan bu farklılaşmış soy hatları yeni alanlara yayılmışlardır. Bu soy hatlarının yayılış sınırlarının belirlenmesi *M. glareolus*'un evrimsel süreçteki davranışının ortaya konulması için önemlidir.

Pleistosen'in dinamik iklimsel salınımları, yüksek bölgelerdeki türlerin dağılımını önemli ölçüde değiştirmiştir. *Myodes gapperi* üzerine Runck ve Cook (2005)'un Kuzey Amerika'da yapmış olduğu moleküler araştırmalara göre, kuzey bölgelerin buzul sonrası kolonizasyon süreçleri başlangıçta düşünülenlerden daha da karmaşıktır. Kuzey Karolina, Pensilvanya, Minnesota, Idaho, Washington, Britanya Kolumbiyası, Kuzeybatı Eyaletleri ve Alaska'dan toplanan 64 *M. gapperi* örneğinin *Cytb* geninin kısmi dizileri üzerinde filocoğrafik analizleri yaparak Pleistosen sığınak ve buzul sonrası kolonileşme yolları ile ilgili hipotezleri test etmişlerdir. Doğu ve batı kladları arasında en yüksek net farklılığın ($dA = \% 5,2$) olduğu üç farklı klad (doğu, batı, orta) tanımlamışlardır. İki kıtasal buz tabakasının birleştiğine inanılan Mackenzie aralığının yakınında bulunan Kuzeybatı Eyaletlerinden gelen yüksek bölge popülasyonu, kalıcı bir kolonileştirici olmayan popülasyonla tutarlı demografik modeller ve genetik çeşitlilik sergilemiştir. Bu popülasyonda gözlemlenen moleküler varyasyon, kıta koridorunda farklılaşan öncü sınır popülasyonu veya yüksek bölge sığınak popülasyonunun bir sonucu olabilir.

Türkiye'de *M. glareolus* üzerine gerçekleştirilen çalışmalar 1900'lü yıllara kadar gitmektedir. Bu çalışmalar daha çok yayılış kayıtları niteliğindedir: Neuhauser (1936) *M. glareolus*'u Abant (Bolu), Karadere (Zonguldak) ve Tosya (Kastamonu)'dan, Osborn

(1962), Felten vd. (1971), Steiner (1972) ve olak ve Kıvanç (1991) Uludağ (Bursa), Bürnük-Bektaşağa (Sinop), Akçakoca (Bolu), Bicik (Giresun), Düzce, at (Rize), Sümela (Trabzon)’dan kaydetmişlerdir. Bu çalışmaların dışında karyolojik (olak vd. 1997) ve moleküler çalışmalarla (Matson ve Baker 2001, olak vd. 2013, Beteş vd. 2014, olak vd. 2015, Pereverzeva ve Primak 2016) türün genetik özellikleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

Osborn (1962) ve olak ve Kıvanç (1991)’e göre *M. glareolus*, Türkiye’de kesintili yayılış göstermektedir. Bu kesintili yayılış biçimi türün farklı populasyonları arasındaki gen akışını kesmektedir. Böylece bu populasyonlar birbirinden ayrı kalarak farklılaşmakta ve evrimleşmektedirler. Bu gibi populasyonların birçoğunun yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olduğu bilinmektedir. Bu özellikteki türlerin genetik yapıları üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Leitner ve Hartl (1988) Doğu Avusturya’da yayılış gösteren *M. glareolus*’un genetik varyasyonlarını çalışmışlar ve populasyonlar arasındaki genetik farklılığın yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Avrupa’da ise daha çok bu türün yayılış gösterdiği alanlardaki buzul dönem sığınakları ve sığınaklardan populasyonların yayılmaları üzerine araştırmalar yapılmıştır (Colangelo vd. 2011, Chiocchio vd. 2019).

Boonstra ve Krebs (2012) kısa ve uzun dönemli çalışmaları inceleyerek Kuzey Amerika’daki *Myodes*’lerde populasyon dinamiklerini Avrasya’daki benzer ve aynı türleriyle karşılaştırmışlardır. Populasyonlar arasında genelde döngüsellik  lmaması demografilerin ardarda etkili olan iki ana yönüyle ilişkilendirilmiştir. Bunlardan birincisi, çoğu yıllarda kış döneminde düşük oranlarda hayatta kalınması; ikincisi ise düzensiz ani çıkışın (patlamanın) olduğu yıllarla birlikte görülen kronik düşük yoğunluklardır. Araştırmacılar, *M. glareolus* populasyonlarını; gıda kaynakları, besinler, avlanma, türler arası rekabet, hastalık, hava durumu, mesafe koyan davranışlar ve interaktif etkiler üzerine inceleyerek döngülerde dalgalanma olup olmadığını ve diğer populasyonların neden düzensiz olarak dalgalandığını açıklamışlardır. Bunlardan yalnızca gıda kaynaklarını populasyon büyüklüğündeki değişiklikleri açıklamak için yeterli bulmuşlardır.

Colangelo vd. (2011) yürütmüş olduğu çalışmada, *M. glareolus*'un dağılım gösterdiği tüm alanlara ait önceden yayınlanmış 92 Cytb dizisi ile Kuzey, Orta ve Güney İtalya'dan 38 yeni Cytb dizisinin filocoğrafik analizlerini yapmıştır. Çalışma sonucunda türün 4 farklı evrimsel soya ayrıldığını, bu soylardan biri olan Kalabriya kladının diğer tüm *M. glareolus* soylarından daha önce ortaya çıktığını (Erken Pleistosen) ve bu kladın güçlü genetik farklılaşma gösterdiği için tüm *M. glareolus* filogenisinin temel kladı olduğunu bulmuşlardır. Chiocchio vd. (2019)'nin 15 bölgede 76 *Myodes glareolus*'a ait 13 mikrosatelit lokusunda yaptığı çalışmada ise; mitokondriyal DNA tarafından tanımlanan dört soyun aksine, İtalya yarımadasında *M. glareolus* içinde beş ana genetik kladın varlığı desteklenmiştir. Catena Costiera içindeki Aspromonte ve Sila popülasyonlarına dışardan bir katkı olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur. Bu iki grup arasında genetik farklılaşma olduğu ve bu durumun bazı morfolojik farklılıklar ile desteklendiği de görülmüştür. Bu durum Sila Masifi için *Myodes glareolus curcio* (von Lehmann, 1961) ve Aspromonte Masifi için *Myodes glareolus hallucalis* (Thomas, 1906) gibi farklı alt türlerin tanımlanmasına yol açmıştır.

Pleistosen sığınağı içinde yüksek genetik çeşitlilik ve uzun süreli demografik kararlılık görülmesine rağmen Kalabriya bölgesinde allopatrik farklılaşma ve ikincil temas döngülerini içeren dinamik mikroevrimsel süreçler meydana gelmiştir (Canestrelli vd. 2012, Colangelo vd. 2011).

Alpler'den ve Kuzey-Orta Apenin'den gelen popülasyonlar iki farklı genetik klada aittir. Önceki çalışmalara göre (Deffontaine vd. 2005, Colangelo vd. 2011, Filipi vd. 2015), Alpler'de yaygın olan genetik klad, Batı Avrupa sığınağından buzul sonrası bir yayılma ile meydana gelmiştir. Aksine Kuzey-Orta Apenin kladının ise Balkanlardan İtalyan ve İber yarımadalarına kadar yaygın olan ve daha yakın zamanda bir Apenin sığınağından izole olmuş eski bir Akdeniz soyundan türemiş olduğu düşünülmektedir.

Bazı araştırmacılar Karpatların *M. glareolus* için buzul sığınağı olduğunu ortaya koymuşlardır (Kotlík vd. 2006, Wójcik vd. 2010, Filipi vd. 2015). Benzer şekilde, Wójcik vd. (2010), tür için Karpat soy hattı belirlemişler ve türün Son Buzul Dönemi'nden

(LGM-The Last Glacial Maximum) sonra kuzeye doğru yayıldığını ortaya koymuşlardır. Filipi vd. (2015), LGM'den sonra Avrupa faunasının iklim değişikliklerine vermiş olduğu tepkiyi anlamak için *M. glareolus*'u kullanmışlardır. Araştırmacılar *M. glareolus*'un Karpatlar'daki kuzey buzul sığınakları için bir belirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Türkiye'de moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda mtDNA Cytb gen bölgesi dizi analizi ve RAPD-PCR analizleriyle türün genetik varyasyonları ortaya konmuştur (Beteş vd. 2014, Çolak vd. 2015). Çolak vd. (2013) yapmış oldukları allozim analizleri sonucunda Karadeniz bölgesinde batı ve doğu olmak üzere iki farklı grubun olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar deniz seviyesinden 27-605 metre ve 1003-1288 metre yükseklikteki bölgelerde yayılış gösteren populasyonların iki ayrı soy hattına ayrıldığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Beteş vd. (2014), Türkiye'de Karadeniz bölgesinde batı ve doğu olmak üzere türe ait iki soy hattının varlığını RAPD-PCR analizi yaparak ortaya koymuşlardır. Çolak vd. (2015), Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren *M. glareolus*'un Cytb ve D-loop bölgelerinin filogenetik analizine dayanarak Kızılırmak vadisiyle ayrılan doğu ve batı Karadeniz soy hatlarını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar Türkiye populasyonlarıyla Avrupa populasyonları arasındaki ayrılma zamanını 0,26 Myıl olarak hesaplamışlardır. Türkiye'deki iki soy hattı arasındaki ayrılma zamanını ise 0,20 Myıl olarak belirlemişlerdir. Çolak vd. (2015) Uludağ populasyonunun Doğu Karadeniz soy hattına yakın çıkmasının sürpriz bir sonuç olduğunu ortaya koyarken araştırmacılar bunun için iki sebep ileri sürmüşlerdir. Bunlardan bir tanesi benzer yükseklik ve benzer ekolojik koşullar, diğeri ise Uludağ populasyonunun izole olarak genetik dar boğazın etkisi altına girmesidir. Araştırmacılar daha fazla örnek kullanarak Uludağ grubunun çalışılmasının gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Bu bağlamda Uludağ'ın *M. glareolus* için buzul sığınağı olma olasılığı dikkate alınarak Uludağ soy hattının daha fazla örnek ve farklı genetik belirteçlerle yeniden değerlendirilmesinin önemli olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen verilerle; Türkiye'de yayılış gösteren *M. glareolus*'un mitokondriyal DNA'sından Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite 1 (CO1) gen bölgesi kullanılarak türün filogenetik ve taksonomik durumu ilk kez araştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda kullanılan az sayıda örnekle farklı bir soy hattı olarak tanımlanan ve filogenetik ağaçta beklenmedik bir şekilde Doğu Karadeniz bölgesindeki örneklerle kümelenen Uludağ grubuna ait örnek sayısı arttırılarak bu filogrubun durumunun hem

mitokondriyal DNA'dan Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite 1 (CO1) hem de mitokondriyal DNA'dan Sitokrom b (Cytb) gen bölgeleri kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan örneklerin *CO1* ve *Cytb* gen bölgeleri PCR ile çoğaltılarak elde edilen bu diziler, istatistik veri tabanlı programlarla analiz edilerek tür içi varyasyonu, populasyonlar arası ve populasyon içi genetik çeşitlilik ve farklılaşma verileri ortaya konmuştur.



2. KURAMSAL TEMELLER

En gelişmiş omurgalı sınıfı olan Memeliler; kendi içlerinde 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. Bu alt sınıflar ise Prototheria (Yumurtlayan Memeliler), Metatheria (Keseli Memeliler) ve Eutheria (Plasentalı Memeliler) şeklindedir. Yeryüzüne geniş şekilde yayılmış olan Plasentalı Memeliler içlerinde Artiodactyla, Lagomorpha, Proboscidea, Chiroptera ve Carnivora gibi birçok takım bulundurmakta olup bu tez çalışmasının araştırma konusunu teşkil eden Rodentia takımı da bu alt sınıf içerisinde (Anonim 2009).

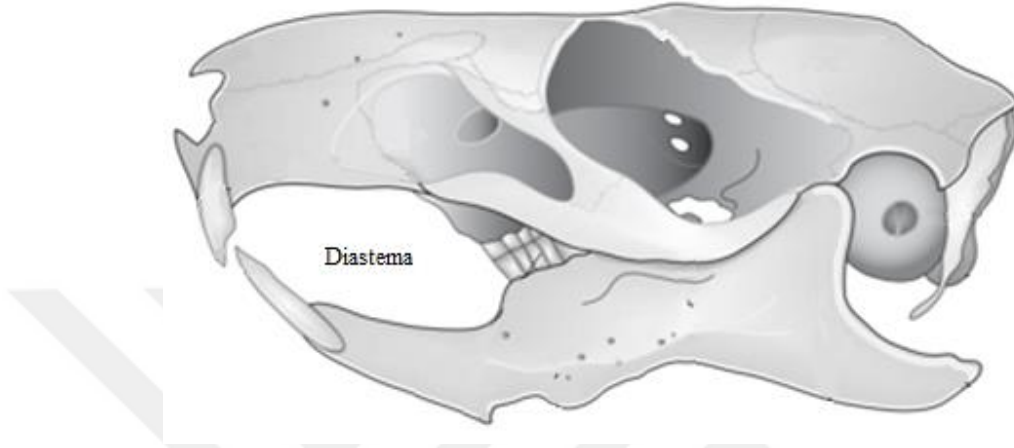
2.1 Ordo: Rodentia Bowdich, 1821

Tüm karasal ekosistemlerde memeli sınıfının en baskın takımı olan Kemiriciler; vücut ağırlığı 20 kg'ın üzerinde olan büyük türlerin nadir olarak bulunduğu ve genellikle küçük ila orta büyüklükteki otçullardır. Sincap, sıçan, kunduz, oklu kirpi, fare çokça bilinen bazı kemiricilerdir. Antarktika ve bazı izole adalar hariç olmak üzere dünya çapında yayılmışlardır. Wilson ve Reeder (2005) tarafından 2277 tür listelenmiş, ancak o zamandan beri yeni eklenen türler ile bu sayı 2800'ü aşmıştır. Türkiye'de ise yaklaşık 65 kemirici türü yaşamaktadır. Yarı-sucul formlar daha az yaygın olmakla birlikte çoğu karasal veya yarı-arborealdır (Kryštufek ve Vohralík 2005).

Çeşitli şartlara uyum sağlayacak şekilde yaşam sürme yeteneğine sahip olan kemiricilerin yer altı tünelleri, ormanlar, akarsu alanları ve çöller gibi birçok farklı habitatta yuvaları bulunmaktadır. Günün farklı zaman dilimlerinde aktif olabilen kemiriciler gelişmiş duyu özellikleri ve yüksek hareket kabiliyetlerine sahiptirler (Kuru 1999).

Genellikle meyveler, tohumlar ve yapraklar gibi çeşitli yiyecekler ile beslenen kemiricilerin en önemli ayırt edici özelliklerinden birisi ise kafatasının üst çene kesici dişlerinin arkasından başlayarak üst çene boşluğuna kadar gelen diastema boşluğuna sahip olmaları yani köpek dişlerinin ve bazen de premolar dişlerinin olmamasıdır (Şekil 2.1). Alt ve üst çenede önde bir çift sürekli büyüyen kesici dişe ve arkada üç çift çiğneme dişine (M1,M2,M3 molar dişleri) sahiptirler. Çiğneme dişleri; ilkel formlarda bunodont

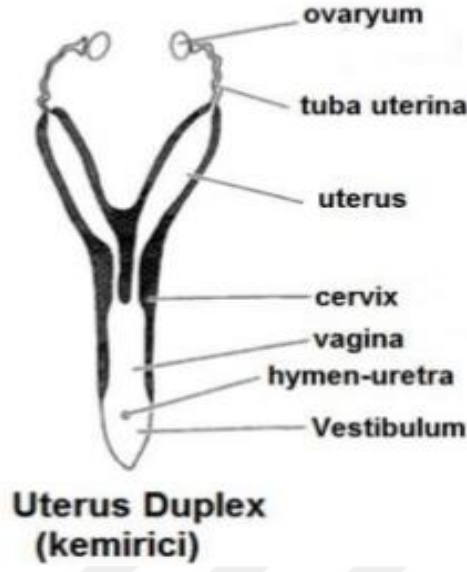
ve brachiodont, daha gelişmiş olanlarda ise lophodont ve hipsodont şeklindedir. Genel diş formülleri ise $I/I \ C/C \ PM/PM \ M/M \ 1/1 \ 0/0 \ 0/0 \ 3/3 \times 2 = 16$ veya $1/1 \ 0/0 \ 2/1 \ 3/3 \times 2 = 22$ şeklinde ifade edilmektedir. Dolayısıyla çenelerinin sağ ve sol taraflarında 8'er diş bulunup hiçbir durumda diş sayıları 22'yi geçmemektedir (Kryštufek ve Vohralík 2005).



Şekil 2.1 Kemiricilerin Diastema Boşluğu (Anonim 2014)

Besinlerin toplanmasına imkân sağlayan yanak keseleri bulunan türleri de bulunabilmektedir. Yaşadıkları habitata göre türler arasında farklı büyüklükte gözler olabilmekte ve hatta bazı türlerde gözler körelebilmektedir. Kafatası karakterleri önden arkaya doğru; nazal-frontal-parietal-interparietal-foramen magnum-occipital çıkıntı şeklinde sıralanmaktadır. Erkek bireylerin bakulumu (penis kemiği) ise 2 parçadan oluşmaktadır. Yüksek üreme kabiliyetlerine sahip olup üreme mevsiminde karın boşluğunda yer alan testislerini dışarı çıkarmaktadırlar. Dişi bireyler ise bir batında çok sayıda yavru bulunabilmesine imkan sağlayan dubleks uterus tipine sahiptirler (Şekil 2.2).

Gebelik süreleri yaklaşık 4 aya kadar sürebilen kemiricilerin her bir doğumlarında 1 ila 18 arasında değişen sayılarda yavruları olabilmektedir. Yaşam süresi ise özellikle küçük kemiricilerde iki yılı geçmemektedir (Kuru 1999).



Şekil 2.2 Kemiricilerin uterus tipleri (Anonim 2015)

Kemiriciler $2n$ (diploid) kromozom sayısına sahiptir ve karyolojik analizlerde kromozom sayılarının belirlenmesinde otozomal kromozom kol sayısı (N_{fa}), temel kromozom kol sayısı (N_f), dişi eşey kromozomu (X) ve erkek eşey kromozomu (Y) kullanılmaktadır.

2.2 Familya: Muridae Illiger, 1815

Muridae Familyası, hem Dünyadaki (1.326 tür; Musser ve Carleton, 1993) hem de Türkiye ve Kıbrıs bölgesindeki (44 tür; Kryštufek ve Vohralík, 2001) açık ara en büyük memeli grubudur. Antarktika hariç tüm kıtalarda ve birçok okyanus adasında bulunan Familya üyeleri çöllerden yağmur ormanlarına, tundradan savana ve ılıman ormanlık alanlara kadar uzanan ekosistemleri kaplamaktadırlar. Bazı türleri yeraltında yaşarken diğerleri ise tüm yaşamlarını tropikal ormanın gölgesinde ya da yarı-sucul biçimde sürdürmektedir (Anonymous 2001, Kryštufek ve Vohralík 2005). Musser ve Carleton (1993)'a göre Müridler on yedi alt familyaya ayrılmaktadır. Bu alt familyalara sahip oldukları tür sayısı sıralamasına göre Murinae, Sigmodontinae, Arvicolinae, Gerbilinae, Acomyane, Dendromurinae, Nesomyinae ve Cricetinae örnek olarak verilebilir (Anonim 2020).

Bilinen sıçan ve farelerin çoğunu kapsayan bu grubun kendi aralarında ve diğer kemiricilerle olan sistematik ilişkilerinin çözülmesi zor olmakla birlikte çoğu müridi birbirine bağlayan birtakım karakterler de söz konusudur. Bu grubun kafatasında, sinirleri ilkel olarak kafatasının rostral bölgesine ileten infraorbital foramenler, çoğunlukla zigomatik plakanın üzerinde yer almaktadır. Bu nedenle foramen çoğu formda kendine özgü bir "anahtar deliği" şekline sahiptir (ancak dar ventral kısım birkaç türde kaybolmuştur). Elmacık kemiğinin ön tabanından oluşan elmacık plakası geniştir ve kafatasının belirgin bir özelliğidir. Elmacık kemiğine katılan kemiklerden biri olan jugal küçüktür ve lakrimal ile temas etmemektedir. Frontal kemik göz çukurunun üzerinde kısıtlanmış olup interparietal kemik ise arka kısımda belirgin bir şekilde bulunmaktadır (Anonymous 2001).

Müridlerin vücut boyutları değişkenlik göstermekle birlikte boyları genellikle kuyruk hariç 10 cm civarındadır. Çoğunlukla kahverengi renge sahip olan müridlerin beyaz, gri ve siyah tonlara haiz türleri de bulunmaktadır (MacDonald 1984).

Tüm kemiricilerde olduğu gibi, çenenin her iki tarafında her daim üstte ve altta kesici dişler bulunur ve köpek dişler söz konusu değildir. Kesici dişlerin ardından diastema boşluğu gelmektedir. Üçten fazla molar diş bulunmayıp bazen bu sayı ikiye ve hatta bire düşebilmektedir. Molar dişlerinin şekil, boyut, çiğneme yüzeyi ve kök sayısı gibi özellikleri kendi içlerinde büyük değişiklikler gösterebilmektedir (Molar dişlerin köklü veya köksüz olması veya sivri uçlu, kat kat ya da prizmatik olması gibi). Beslenme alışkanlıkları ise solucanlar, yeraltı mantarları ve hatta suda yaşayan omurgasızlara kadar uzanabilmektedir. İnsan hayatı üzerinde önemli etkileri olan bu grubun bazı türleri tarım arazilerine ve depolanan gıdalara büyük zararlar vermektedirken bazıları da insan popülasyonlarını periyodik olarak yok eden bir dizi hastalığın vektörleri veya rezervuarları olabilmektedir. Bunu yanı sıra zararlı böceklere karşı biyolojik kontrollerde, mikorizal mantarları yaymadaki veya tohumları dağıtmadaki rolleri aracılığıyla ormanların korunmasında ve tıbbi araştırmalarda kullanılan türleri de söz konusudur (Anonymous 2001).

2.3 Alt familya: Arvicolinae Gray, 1821

Holoartrik bölgede yayılış göstermekte olan Arvicolinae alt familyası; tarla fareleri, lemmingler ve misk sıçanlarının dâhil olduğu orta ve büyük boyutlu 140'ın üzerinde kemirici türüne sahiptir. Türkiye'de bu alt familya önce Neuhäuser (1936) daha sonra da 10 tür tanımlayan Osborn (1962) tarafından incelenmiştir. Daha sonra Felten vd. (1971) Batı Anadolu türlerini; Steiner (1972) ise Türkiye'nin kuzeydoğusundaki türleri ayrıntılı olarak araştırmıştır. Yiğit vd. (2006) Türkiye'de bu alt familyaya ait 20 türün bulunduğunu belirtmiştir (Kryštufek ve Vohralík 2005, Berkovitz ve Shellis 2018).

Çoğunlukla karasal olmak üzere ağaçta, suda veya yer altında yaşayabilen Arvicolinae alt familyasının hem etçil hem de otçul olan türleri olsa da alt familya çoğunlukla otçuldur ve birçok çeşit bitkiyi besin kaynağı olarak kullanmaktadır. Kesici dişleri; proodont, ortodont veya opisthodont'tur. Molar dişleri ise hipsodont olabilir veya sınırlı büyüme gösterebilir. Molar dişleri D derecedir (grade D) ve oklüzal yüzey, yaklaşık olarak tepenin ortasında buluşan kademeli kıvrımlarla bir dizi elmas şeklinde veya üçgen alanlara bölünmüştür. Bu durum alt çenenin ön-arka hareketi yoluyla karşıt diş sırasındaki benzer kenarlara karşı çalışan sürekli zikzak kesme kenarları oluşturmaktadır. Yapının ön kenarları içbükey bir eğriliğe sahiptir. Karşıt kenarlar ise zıt yönde içbükeydir dolayısıyla ön kenarlar birbirine doğru kayarken temas alanı giderek azalmakta ve aralarında sıkışan yiyeceğe büyük kesme kuvvetleri uygulanmaktadır (Berkovitz ve Shellis 2018). Gözleri ve kulakları ise küçüktür ve kuyruk genelde baş ve vücut uzunluğunun yarısından daha kısadır. Uzunlar gövdenin bütünlüğünde büyük ölçüde gizli olduğundan görünüşte kısa bacaklıdır. Kafatası genellikle sağlam ve geniş kemerli olup ileri yaştaki bazı gruplarda sagittal bir tepe gelişmiştir. Burunları genellikle kısadır ve interorbital bölge açıkça tanımlanmıştır (Kryštufek ve Vohralík 2005).

Gebelik süreleri 14 ila 33 gün arasında değişen Arvicolinae alt familyasının çoğalma hızları yüksektir. Yaşam süreleri ise yaklaşık 2 yıldır (Kryštufek ve Vohralík 2001).

2.4 Cins: *Myodes* Pallas, 1811

Pas rengine benzeyen sırt bölgelerine ve köklü molar dişlere sahip tırmanıcı küçük orman fareleridir. Hızlı hareket kabiliyetine sahip bu cinsin kuyruğu orman fareleri için oldukça uzun; kulakları ve gözleri ise nispeten büyüktür. Burunları alt familyada yaygın olduğu kadar künt değildir (Şekil 2.3). Moleküler kanıtlar *Myodes*'in mevcut kapsamı içinde parafiletik olduğunu göstermektedir (Kryštufek ve Vohralík 2005). Geçmişte *Clethrionomys* şeklinde yapılan sınıflandırmanın yakın zamanda *Myodes*'in öncelikli olacağı biçimde yapılması gerektiği tartışılmıştır (Wilson ve Reeder 2005). Mevcut durumda tüm Holoarktik'in ılıman ve kuzey bölgelerini dolduran *Myodes*; Shenbrot ve Krasnov (2005) tarafından yapılan araştırmalar sonucu eklenen yeni türler ile toplamda on iki türe (Çizelge 2.1) ulaşmıştır. Türkiye'de ise tek bir türe (*Myodes glareolus*) ait bir alttürün (*M. glareolus ponticus*) yaşadığı ortaya konmuştur.

Çizelge 2.1 *Myodes*'e ait bütün türler ve tanımlayıcıları

Tür	Tanımlayan araştırmacı
<i>Myodes rutilus</i>	Pallas (1779)
<i>Myodes frater</i>	Thomas (1908)
<i>Myodes centralis</i>	Miller (1906)
<i>Myodes rufocanus</i>	Sundevall (1846)
<i>Myodes glareolus</i>	Schreber (1780)
<i>Myodes californicus</i>	Merriam (1890)
<i>Myodes gapperi</i>	Vigors (1830)
<i>Myodes regulus</i>	Thomas (1907)
<i>Myodes rex</i>	Imazumi (1971)
<i>Myodes shanseius</i>	Thomas (1908)
<i>Myodes smithii</i>	Thomas (1905)
<i>Myodes andersoni</i>	Thomas (1905)

Molar dişlerinin her biri 2-3 köklüdür ve sürekli büyüme görülmemektedir. Dolayısıyla aşındıkça çiğneme yüzeyleri alçaldığından yaklaşık 1.5 yaşında tamamen aşınarak yok olmaktadır (Demirsoy 1998).

2.5 Tür: *Myodes glareolus* Schreber, 1780

2.5.1 Genel özellikleri

Kızıl sırtlı orman faresi olan *Myodes glareolus* koyu kırmızımsı kahverengi kürke sahiptir (Şekil 2.3). Belli belirsiz şekilde sınırlandırılmış böğür daha çok devetüyü ve gri renklerde olup bu kısmın altı ise dorsalden daha sarımsı izler taşıyacak şekilde açık gri renktedir.



Şekil 2.3 *Myodes glareolus* (Fotoğraf: Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK)

4 parmaklı ön ayaklar ile 5 parmaklı arka ayaklara sahiptir. Ayaklar grimsi ila beyazımsı renkte; pençeler ise küçük ve beyazımsı renktedir. Kuyruğu, üstü siyah kahverengi altı ise açık gri olacak şekilde belirgin olarak çift renklidir ve baş ile vücut uzunluğunun yaklaşık yarısı kadardır (% 43 ile % 61'i arasında). Genellikle 4 ila 6.7 cm arasında kuyruk uzunluklarına sahiptirler. Kuyruk seyrek bir fırçaya benzeyecek şekilde ince kıllarla kaplı olup uzun kıllarla sonlanmaktadır. Geniş, kısa ve dairesele yakın olan kulakları ise kürklerini hafifçe aşmaktadır. Sırt kılları 10 mm uzunluğu bulabilmektedir. Koyu renkli ve uçları beyaz olan bıyıklarının uzunlukları ise 27 mm'den azdır. 4 çift meme ucuna sahiptirler (Vinogradov ve Argiropulo 1941, Demirsoy 1998, Kryštufek ve Vohralík 2005, Yiğit vd. 2006).

Kafatası belirgin çıkıntılar içermeyecek şekilde küçük ve hafif yapılıdır. Uzunluğu 6.8 mm ile 7.8 mm arasında değişmektedir. Zigomatik kemerler çok genişlememiş olup kondilobasal uzunluğun % 50.8'i ile %58.2'si arasındadır. Yetişkin kafatası oldukça sıgıdır ve interorbital bölge geniş ve düzdür. Ayrıca oldukça kısa bir buruna ve küçük gözlere sahiptir (Vinogradov ve Argiropulo 1941, Kryštufek ve Vohralík 2005).

Kesici dişler ince ve zayıftır. Minenin rengi turuncu-sarıdan soluk sarıya ve sarımsı beyaza kadar değişebilmektedir. Molar dişleri yetişkinlerde köklüdür ve pulpa (diş özü) yaşamın erken dönemlerinde kapanmaya başlar. 1. üst molar dişin üç; diğerlerinin ise sadece iki tane kökü vardır. Çıkıntılı açılar, *Microtus*'ta çok belirgin olan keskin açısallıktan yoksundur. 1. üst molar diş, ön halkanın arkasında dört üçgene sahiptir. 2. molar ön halkaya ek olarak üç üçgen içermektedir. 3. üst molar iç tarafta üç veya nadiren iki; dış tarafta ise iki veya üç girintili açıya sahiptir. Osborn (1962), karmaşık 3. üst moların (dil tarafında dört girintili açı ile) Anadolu'da norm olduğunu belirtmiştir (Kryštufek ve Vohralík 2005).

2.5.2 Habitat ve yayılışı

Myodes glareolus; Güney Avrupa yarımadalarında geleneksel olarak tanınan sığınağın çok daha kuzeyinde yer alan bir sığınak olan Avrupa'daki gizli kuzey sığınağı içerisindeki buzullarda hayatta kalınabileceğini gösteren ormanlık türlerin önde gelen örneklerinden biri olmuştur (Chiocchio vd. 2019).

Genetik farklılaşmanın popülasyonlar arasındaki bazı morfolojik ayırt edici özelliklerle de desteklenmesiyle Gargano burnu popülasyonu için *Myodes glareolus garganicus* (Hagen, 1958); Aspromonte Masifi için *Myodes glareolus hallucalis* (Thomas, 1906) gibi türe ait birçok farklı alt tür tanımlanmıştır (Chiocchio vd. 2019).



Şekil 2.4 *Myodes glareolus*'un Göktepe'deki (Sinop) habitatı (Fotoğraf: Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK)

Türkiye’de ise ilk örneği 1905 yılında A. Robert tarafından Trabzon’un güneyinde (Meryemana) toplanan *M. glareolus*, Thomas tarafından 1906 yılında kendi başına bir tür olarak tanımlanmış ve *Evotomys ponticus* adı verilmiştir. Genellikle Palearktik bölgenin yaprak döken ormanlarında yaşayan ve Türkiye’de bulunan yaklaşık 65 kemirici türünden bir tanesi olan bu tür; Marmara Denizi ve Karadeniz’in denize bakan yamaçları ile soğuk iklimin hüküm sürdüğü Karadeniz’in iç kesimlerinde yayılış göstermektedir (Şekil 2.5). Bu durum ise yayılış alanı boyunca farklı iklim bölgelerinde yaşadığını ortaya koymaktadır. Türün en önemli özelliği ise kayın ormanlarının bulunduğu ortamları tercih etmesidir (Şekil 2.4). Dolayısıyla ormanların tahribatı, *M. glareolus*’un populasyon yapısını derinden etkileyebilmektedir. Avrupa’nın çoğu yerinde yaygın dağılım gösteren bu tür mevcut durumda; hem İtalya’da (Battistoni vd. 2013) hem de küresel seviyede (Amori vd. 2008) IUCN Tehdit Altındaki Türler Kırmızı Listesi tarafından En Az Endişe Verici (LC) olarak sınıflandırılmaktadır (Chiocchio vd. 2019).



Şekil 2.5 *Myodes glareolus*’un dağılımı (Anonymous 2008)

2.5.3 *Myodes glareolus*'un Filocoğrafyası ve Etkileyen Olaylar

Genetik çeşitliliğin oluşmasında ve türlerin coğrafi dağılımlarında bilhassa Kuvaterner dönemde yaşanan iklimsel salınımlar büyük rol oynamıştır (Hewitt 2000). İklim değişikliklerinin etkisiyle buzul çağların meydana geldiği Pleyistosen dönemde, bir kısmı çok geniş kapsamlara ulaşan buzullaşmalar meydana gelmiştir. Bu durum deniz seviyelerini düşürmüş ve hayvanların farklı kıtalar arasında göçlerine imkân sağlayacak şekilde yeni kara geçiş köprüleri oluşturmuştur. Populasyonlar, farklı sığınaklardaki buzul dönemler arasında birçok kez izole edilmiş ve bu durum iklim düzelmeleri sonrasında çok sayıda yeniden-kolonileşme modeline yol açmıştır (Çolak vd. 2015). 5.96 Myö Miyosen dönemin sonlarında ise Cebelitarık boğazının kapanması ve Akdeniz ile Atlantik okyanusunun bağlantısının kopmasıyla başlayan süreç büyük paleocoğrafik değişimlere neden olmuştur. Yaşanan bu olaylar neticesinde Akdeniz kurumu ve bunun sonucu meydana gelen Messiniyen Tuzluluk Krizi ile bölgedeki ekosistemler ciddi biçimde etkilenmiştir. 5.33 Myö boğazın yeniden açılması ile Atlantik suları hızlı biçimde Akdeniz'i doldurmuş ve Zanklean transgresyonu denilen bu olayla kriz sona ermiştir (Clauzon vd. 1996).

Ayrıca Marmara denizi ve boğazların oluşum süreçleri sırasında meydana gelen deniz seviyesi değişiklikleri sonucu türler için geçiş yollarının oluşması ve Anadolu'daki jeolojik olaylar sırasında meydana gelen Anadolu Diyagonali ve dağ sıraları gibi oluşumlar nedeniyle çizilen biyocoğrafik sınırlar Türkiye'deki türlerin çeşitliliği ve coğrafi dağılımları üzerinde etkiler bırakmıştır (Gür 2016). Dolayısıyla hem küresel boyutta hem de Akdeniz havzası özelinde yaşanan bu gelişmeler, Türkiye'de bulunan türlere ait filocoğrafyanın oluşumunda yapıtaş görevi üstlenmiştir.

Çoğu çalışma; bazı türler daha kuzeydeki sığınaklarda ısrar etse de Güney Avrupa, Küçük Asya ve Kafkasya'nın şu anda yaygın olan taksonlar için buzul sığınağı olarak rol oynadığını göstermiştir. Güney Avrupa sığınaklarından birisine tekabül eden Türkiye'de ise bölgenin; dağlar (Anadolu Diyagonali, Toroslar ve Karadeniz Dağları) ve deniz yolları (Karadeniz, Ege ve Akdeniz) gibi birçok engelle karakterize olması; birçok türün populasyonları arasında binlerce yıl boyunca gen akışına mani olmuş ve muhtemelen

çoğunda genetik farklılaşmaya yol açmıştır. Bu durum şu anda Türkiye'de yaşayan endemik türlerin ve alt türlerin yüksek seviyesini açıklamaktadır. Türkiye'nin aynı zamanda biyocoğrafik açıdan Avrupa ve Asya arasında bir koridor olması, bu bölgenin filocoğrafik açıdan Asya ve Avrupa türleri arasındaki geçmiş ilişkilerin daha iyi anlaşılmasında bilhassa ilgi çekici olmasına neden olmaktadır. Ural Dağları'na kadar Avrupa bölgelerinin çoğunu kapsayan ve Batı Palearktik bölgesinde geniş çapta yayılış gösteren *Myodes glareolus*, belirli bir alt tür olarak tanımlandığı (*M. glareolus ponticus*) Kuzey Türkiye'de Karadeniz'in ve Marmara bölgelerinin 2000 m rakımlarında yaprak döken ve kayın ormanlarında yaşamaktadır (Çolak vd. 2015).

Myodes glareolus için varlığı kanıtlanan çoklu Avrupa kıta sığınakları, kuvaterner buzullaşmalar sırasında ortaya çıkan orman parçalanmaları ile ilişkilidir. Bu sığınaklardaki kızıl orman faresi popülasyonlarının izolasyonu, en az yedi farklı soy (İspanya, İtalya, Balkan, Batı Avrupa, Doğu Avrupa, Karpatlar ve Pireneler) ile karmaşık bir filocoğrafik yapının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Deffontaine vd. 2009, Kotlík vd. 2006). Türkiye'de ise Batı Karadeniz Bölgesi ile Uludağ ve Doğu Karadeniz Bölgesini içeren 19 lokaliteden 36 örnek üzerinde yapılan çalışma; Balkan soyunun diğer Avrupa soylarına kıyasla Türk gruplarıyla yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen filogenetik analizler, türün Türkiye'de iki soyunun (Batı Karadeniz soyu ve Doğu Karadeniz soyu) bulunduğunu ortaya koymuştur (Çolak vd. 2015).

Kızıl sırtlı orman farelerinin ana habitatlarını oluşturan yaprak döken ağaç türlerinin Pleistosen dönemde Türkiye'de var olduğu polen kayıtları ile teyit edilmiştir (Hewitt, 1996). Ancak bu yaprak döken ormanlar, Kuvaterneri tanımlayan farklı buzul çağlarında Avrupa'dakiler gibi muhtemelen çoğu kez parçalanmıştır (Deffontaine vd. 2005). Dolayısıyla Türkiye'deki soylar arasındaki bu farklılaşmanın, Kuvaterner'in son soğuk dönemlerinde yaprak döken ormanların parçalanması ile bağlantılı olması muhtemeldir. Türün Orta-Pleistosen'de Toros dağlarına uzanan büyük çapta bir yayılışa sahip olduğu da fosil kayıtlarında ayrıca ortaya çıkmıştır. Yine aynı dönemde olduğu belirtilen Orta Anadolu Gölü'nün bölgeyi Sinop'ta dar bir geçit bırakacak şekilde ayırmasıyla büyük ihtimal bariyer etkisi meydana gelmiştir ki bu durum Karadeniz

populasyonlarında oluşan iki farklı grubu kuvvetli şekilde desteklemektedir. Balkan soyu ile Türk grupları arasındaki yakın ilişki ve soylar arası benzerlik ise Marmara ile bağlantılı olan iki coğrafi bölgede yayılış göstermiş olmaları nedeniyle şaşırtıcı olmamaktadır. Pleistosen buzullaşmaları sırasında deniz seviyesinin düşmesi sebebiyle bölgeler arasında kara köprülerinin ortaya çıkmasının gen değişimi için bir imkân sağladığı muhtemeldir (Çolak vd. 2015). Türkiye'nin batısından örneklenen kızıl sırtlı orman faresinin Balkan örneklerine genetik olarak çok benzer olduğu Deffontaine vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada da ortaya çıkmıştır. Benzer sonuçlar *Apodemus sylvaticus* üzerinde yapılan çalışmalarda da görülmüştür (Michaux vd. 2003).

Sonuç olarak Pleistosen buzullaşmaları sırasında Güney sığınağında yer alan populasyonlar, bölgesel kısıtlama ve yayılışlara maruz kalmışlardır. Türkiye de bu buzul dönem sığınaklarından birisi olmuş ve kendi içerisinde bölgesel varyasyonlar göstermiştir. Bu varyasyonlar; *M. glareolus* populasyonları gibi küçük çapta habitat parçalanmalarından etkilenen türler üzerinde özellikle etkili olmuş ve Çolak vd. (2015) tarafından yapılan çalışmalar bu populasyonların Kuzey Anadolu bölgesi boyunca doğu ve batı yönlerinde farklılıklar gösteren iki farklı genetik soyunun olduğunu ortaya çıkarmıştır.

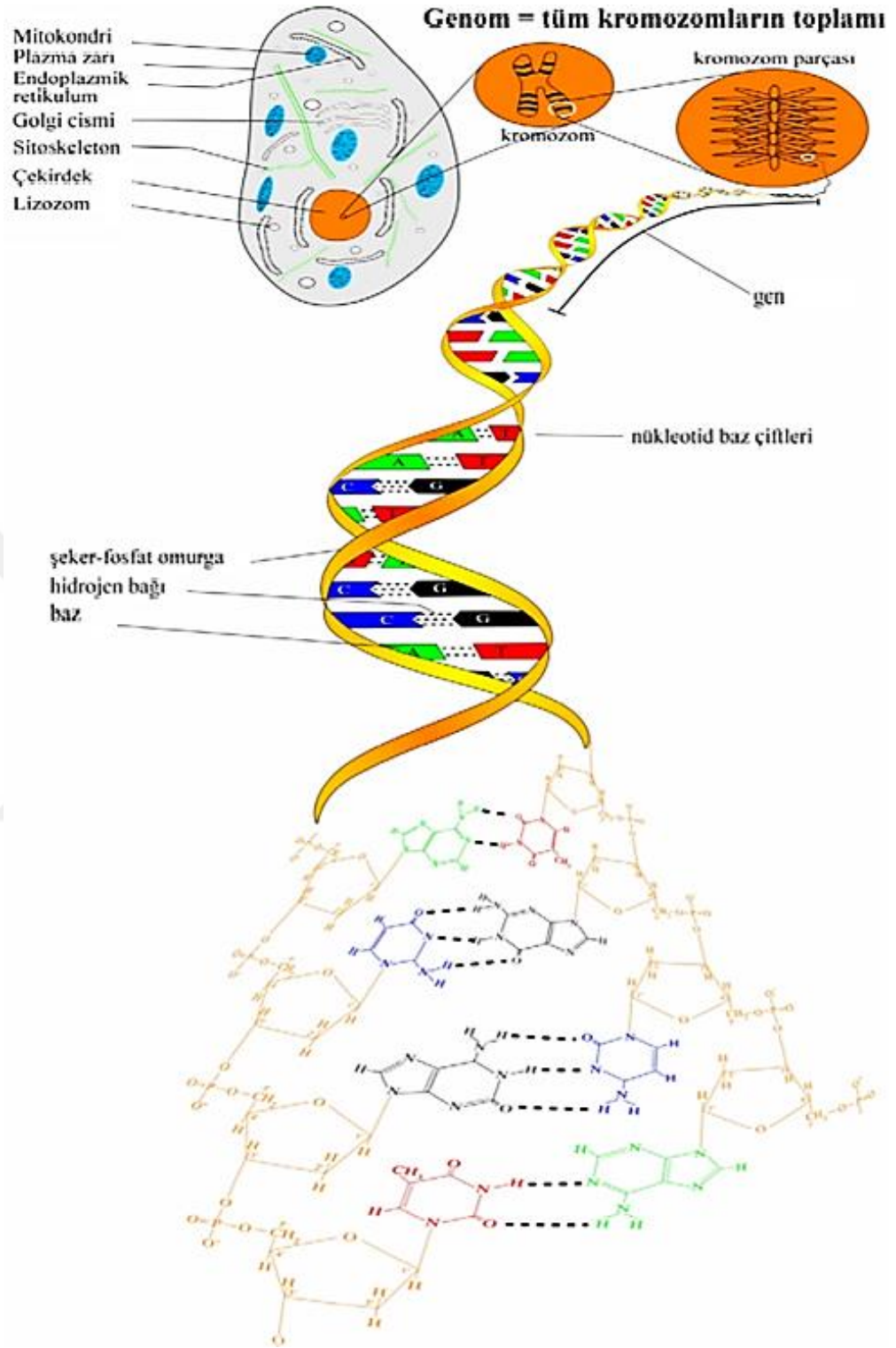
2.6 Moleküler Filogeni

Organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri inceleyerek bu ilişkileri ağaç diyagramlarında gösteren alt bilim dalına filogeni denmektedir. "Filogeni" terimi, Yunanca Phylon ("kabile", "klan" veya "ırk") ve genesis ("köken" veya "kaynak") kelimelerinin birleşiminden türetilmiştir. Sistematiği; organizmanın tanımlaması, isimlendirilmesi ve sınıflandırılması esasına dayanmaktadır. Linnaeus, 18. Yüzyılda ilk defa iki terimli isimlendirme sistemini geliştirmiş ve sistematığın alt bölümü olan taksonomi alanını ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalara ek olarak filogenetik ağacı çizen ilk kişi olmuştur. Daha sonra Charles Darwin, dallanma ve sonrasında farklılaşma oluşumunu filogeniye eklemiştir. Canlılar dünyasının tür içeriği açısından olağanüstü derecede zengin bir çeşitlilik barındırması (tanımlanan türlerin sayısı yaklaşık olarak 1,4 ile 1,8 milyon

arasındadır) çeşitli organizmaların filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi işini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu çeşitlilik sadece fenotipik karakterlere değil biyokimyasal ve moleküler özelliklere de yansımakta ve fenotipleri benzeyen organizmalar, farklı biyokimyasal ve moleküler özelliklere sahip olabilmektedir. Evrimsel süreçler sonucu oluşan her bir organizmanın evrimsel tarihinin bilinmesi, onun biyolojik terimlerle anlaşılması ve tanımlanması için elzemdir. Evrimsel tarih ise fenotip, genotip ile DNA ve proteinler arasındaki homolojiler araştırılarak belirlenebilir. Filogenetik çalışmalarda genel olarak; seçilen organizma veya gen ailesinin DNA izolasyonu, uygun moleküler belirteçlerle PCR, otomatik dizileme, hizalama ve daha sonra bu DNA veya protein dizilerini karşılaştıran evrimsel modeller kullanılmakta ve ortaya çıkan organizmanın filogenisi ile elde edilen bilgi, filogenetik bir ağaçta grafiksel formda temsil edilerek değerlendirilmektedir. Günümüzde biyoçeşitlilik çalışmalarını kolaylaştırmak amacıyla DNA barkodları olarak bilinen kısa DNA dizilerinin kullanılarak türlerin tanımlandığı DNA barkodlama gibi yöntemler kullanılmaktadır (Patwardhan vd. 2014).

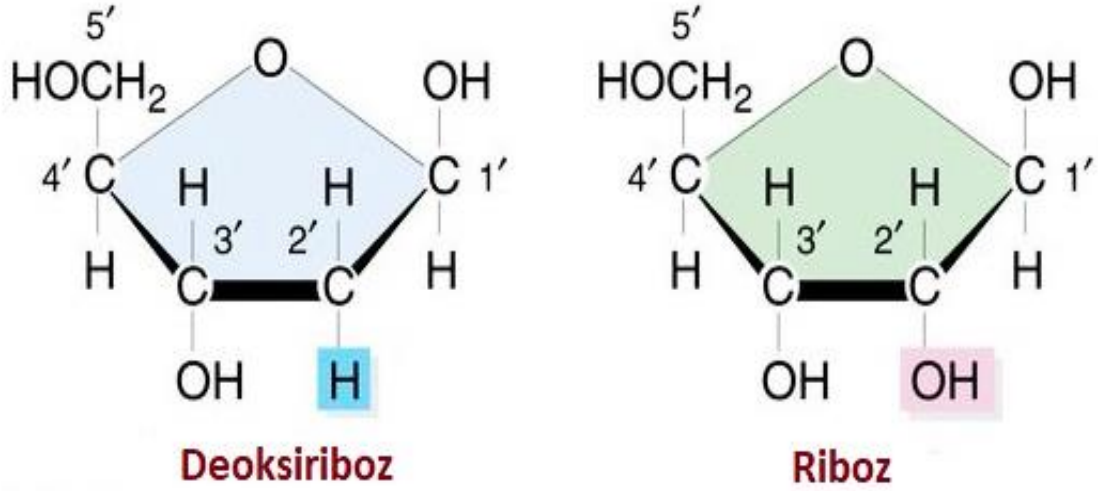
DNA; hücre içerisinde çekirdek, mitokondri ve kloroplastlarda bulunan, negatif yüklü, suda çözünmeyen ancak alkolde çözünebilen, genetik kodu yapısında bulunduran bir moleküldür (Şekil 2.6). Bir nükleik asit olan DNA'nın yapıtaşları, diğer bütün nükleik asitlerde olduğu gibi nükleotitlerden meydana gelmektedir.

Bir nükleotid; azotlu pürin (9-atomlu ve 2 halkalı adenin veya guanin) veya pirimidin bazları (6-atomlu ve tek halkalı timin, sitozin veya urasil), nükleik asite adını veren pentoz şeker molekülü (5-karbonlu deoksiriboz veya riboz, Şekil 2.7) ve trifosfat grubu olarak üç ana bölümden oluşmaktadır. DNA ve RNA'da ortak olarak A, C ve G bulunmakta; T bazı yalnız DNA'da, U bazı ise yalnız RNA'da bulunmaktadır. Pürin veya pirimidin bazları, pentoz zincirine N-glikosidik bağ ile; fosfat grubu 5' şekerin karbon atomuna ise diester bağ ile bağlanmaktadır (Sonna ve Querci 2010, Klug vd. 2011).



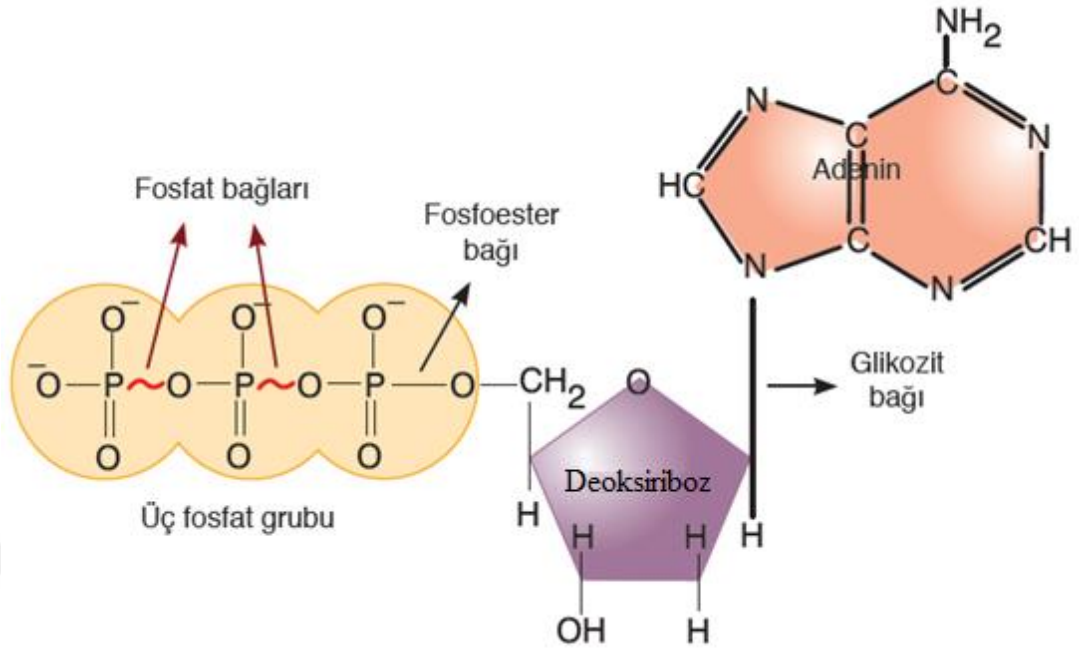
Şekil 2.6 Hücre’de DNA’nın yapısı (Anonymous 2000)

Bir molekülün pürin ya da pirimidin bazı ve riboz ya da deoksiriboz şekeri içermesi halinde nükleozit adı verilen kimyasal birim oluşmaktadır. Nükleozite fosfat grubunun ilavesiyle de nükleotit meydana gelmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.7 Pentoz şekerlerin kimyasal halka yapıları (Anonim 2020)

Nükleotitler, ayrıca nükleozit monofosfat (NMP) olarak da tanımlanabilmektedir. Bir fosfat eklenmesi ile nükleozit difosfatlar (NDP), iki fosfat eklenmesi ile ise nükleozit trifosfatlar (NTP) oluşmaktadır. Trifosfat formu; hücrede nükleik asit sentezinde öncü molekül olarak rol aldığı için çok önemlidir. Ayrıca uç (terminal) fosfat grubunun çıkarılması ya da ilavesiyle büyük miktarda enerji oluşması sebebiyle adenozin trifosfat (ATP) ve guanozin trifosfat (GTP) hücre biyoenerjitiğinde büyük önem teşkil etmektedir. Hücrede ATP'nin ADP ve inorganik fosfata, GTP'nin GDP ve inorganik fosfata hidrolizi ile de fazla miktarda enerji açığa çıkmaktadır. Dolayısıyla genetik işlemlerin de dahil olduğu birçok hücre faaliyetinde ATP ve GTP'den faydalanılmaktadır (Somma ve Querci 2010, Klug vd. 2011).

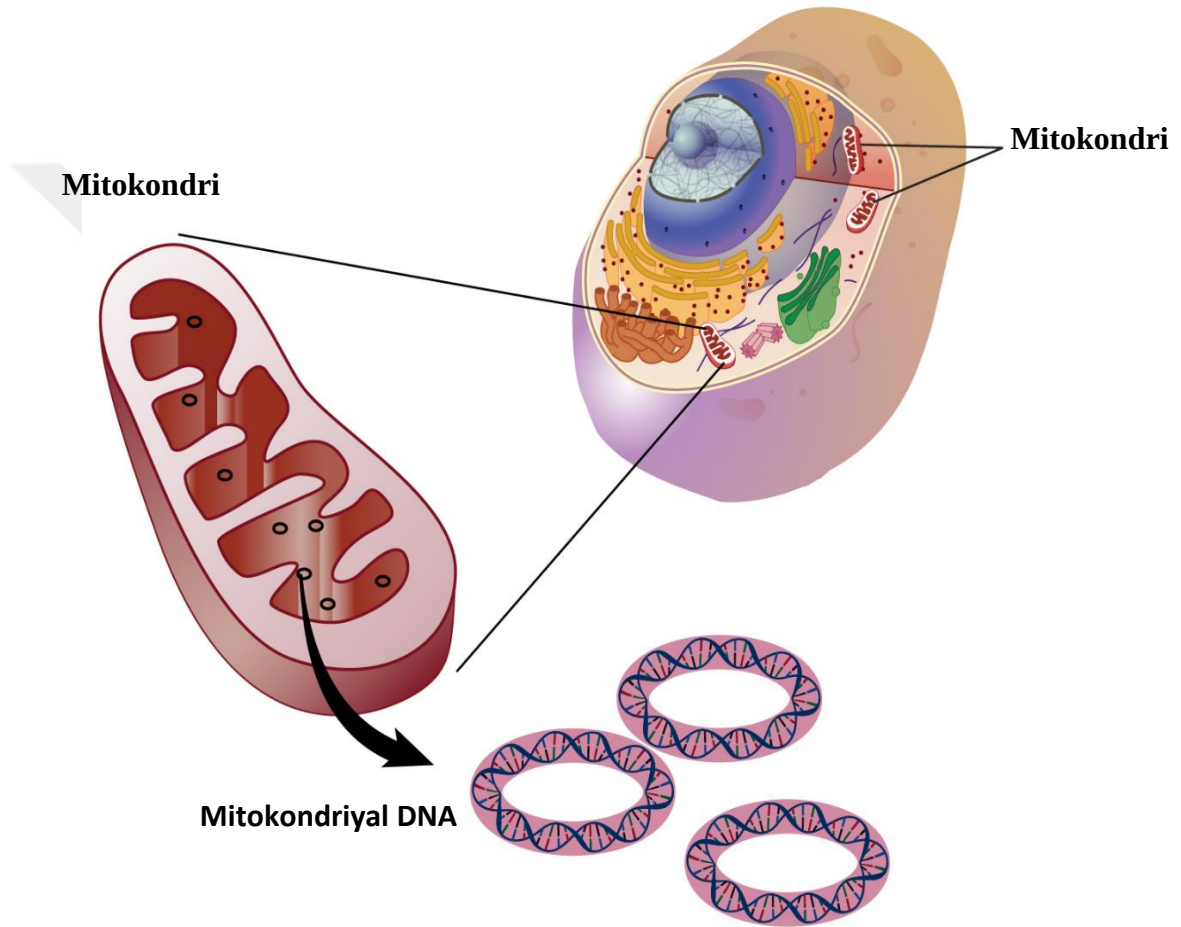


Şekil 2.8 Nükleotid yapısı (Anonim 2018)

2.7 Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Kullanılan Gen Bölgeleri

Mitokondri, hücrelerin sitoplazmasında bulunan ve besin maddeleri ve oksijenden enerji üreten organeldir. İki katlı iç ve dış zar, zarlar arası boşluk, matriksler ve kristalardan oluşan bir yapıya sahip olup, hücrenin enerji gereksinime bağlı olarak her hücrenin sitoplazmasında yüzlerce ya da binlere ulaşan sayılarda bulunabilmektedirler. Mitokondri; hücre içerisinde en önemli görevi olan enerji üretiminin yanı sıra genetik hastalıklar, apoptozis ve kalsiyum homeostezinde de rol oynamaktadır. Diğer birçok organelden farklı olarak mitokondrinin kendine özgü bir DNA'sı bulunmaktadır ve bu DNA, mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.9). İnsanlarda mitokondriyal DNA, hücrelerdeki toplam DNA'nın küçük bir bölümünü temsil etmekte olup 16.569 nükleotit içeren, hafif (iç) ve ağır (dış) zincirler (sarmal) olmak üzere ayrı replikasyon kaynaklarına sahip dairesel DNA zincirlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.10). Mitokondriyal DNA, tümü normal mitokondriyal fonksiyon için elzem olan genleri içermekte olup bu genlerin on üçü oksidatif fosforilasyonda yer alan enzimlerin yapımına

yönelik talimatlarda bulunmaktadır. Oksidatif fosforilasyon ise hücrenin ana enerji kaynağı olan adenosin trifosfatı (ATP) oluşturmak için oksijen ve basit şekerlerin kullanıldığı bir süreçtir. Kalan genler, taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) adı verilen moleküllerin yapımına yönelik talimatlar sağlamaktadır. Bu RNA türleri ise amino asitleri proteinlere dönüştürmeye yardımcı olmaktadır (Brown vd. 1979, Koç ve Sarıca 2003, Anonymous 2020).

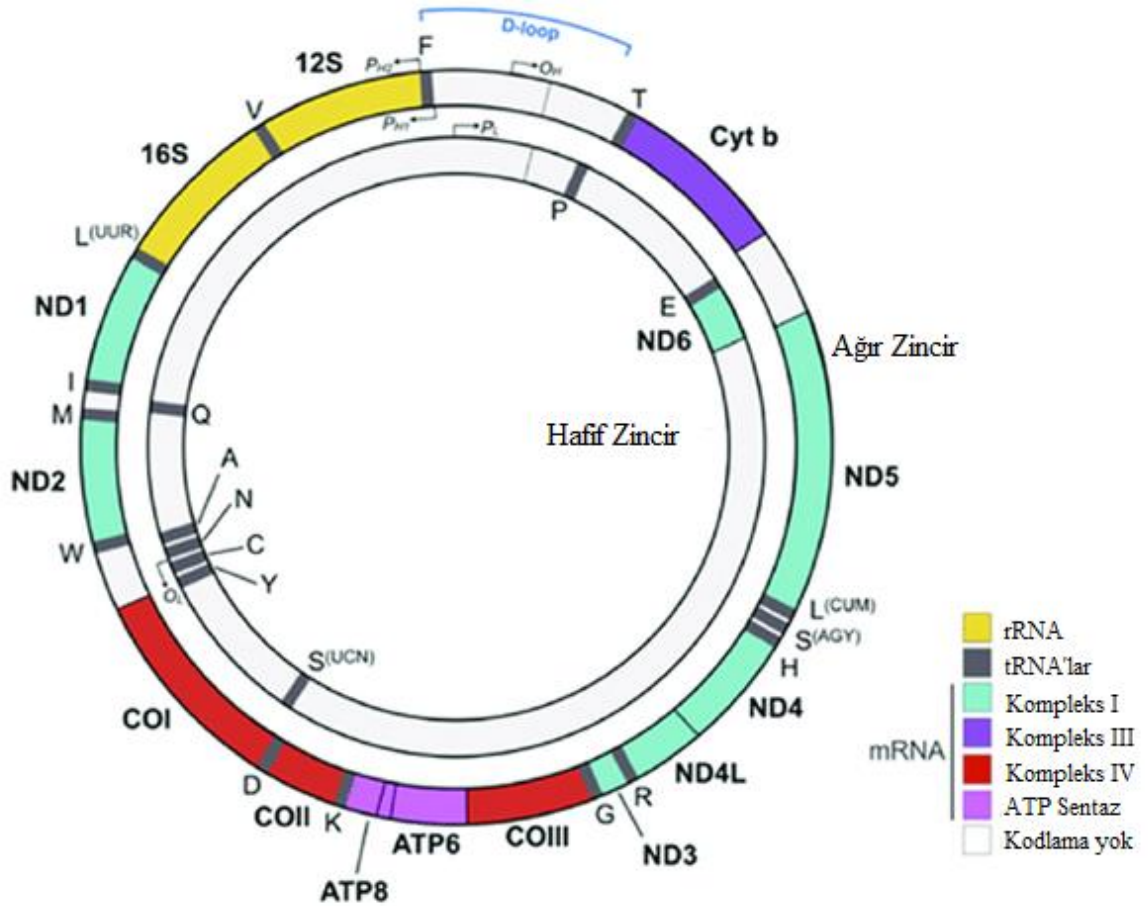


Şekil 2.9 Mitokondriyal DNA (Anonymous 2017)

Mitokondriyal DNA'nın ağır zinciri (H), oksidatif fosforilasyon sisteminin 12 alt birimini, 14 tRNA'yı ve iki ribozomal RNA'yı (12S ve 16S) kodlamaktadır. Hafif zincir (L) ise, bir alt birimi ve 8 tRNA'yı kodlamaktadır. Dolayısıyla mtDNA, tümü oksidatif

fosforilasyonda yer alan 2 rRNA, 22 tRNA ve 13 protein alt birimi olmak üzere 28'i H-zincirde, 9'u L-zincirde bulunan toplamda 37 geni kodlamaktadır (Barshad vd. 2018).

Oksidatif fosforilasyon sisteminin beş enzim kompleksi mitokondriyal iç zarda yer almakta olup substratlardan geçen elektronlar, matriksten iç membran üzerindeki kompleks I, III, IV'te hidrojen iyonlarına enerji sağlamaktadır. Kompleks I'de NADH-CoQ redüktaz (7 alt birim), kompleks II'de Suksinat-CoQ redüktaz, kompleks III'de CoQ-sitokrom C redüktaz (1 alt birim), kompleks IV'de sitokrom c oksidaz (3 alt birim) ve kompleks V'de (2 alt birim) ise ATP sentaz enzimi rol oynamaktadır (Koç ve Sarıca 2003). D-loop ise mtDNA'nın kodlayıcı olmayan ana bölgesinde yer almakta olup ağır ve hafif zincirlerde transkripsiyonun başlatılmasını yönetmektedir (Barshad vd. 2018).



Şekil 2.10 Mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın yapısı (Hoffmann ve Spengler 2018).

Mutasyon hızı oldukça yüksek olan mitokondriyal DNA'nın yüksek memelilerde nükleer DNA'dan daha hızlı değişime uğradığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. MtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızının diğer kısımlarına göre % 2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha hızlı olduğu bildirilmektedir. mtDNA'nın birçok moleküler yöntemin (DNA dizileme, PCR, RFLP, SSCP, SNP, vb.) kullanımına uygun olmasında, küçük boyutlu ve kolay elde edilebilir olması rol oynamaktadır. Bu moleküler yöntemlerin mtDNA'ya uygulanması sayesinde ise gen akışı, genetik mesafe, bireyin biyografisi, popülasyondaki varyasyon, gen klonlanması, etkili popülasyon büyüklüğü, ortak ebeveyn veya prenatal tanı, doku tiplmesi ve enfeksiyon ajanlarının tespiti gibi çalışmalarda yapılabilmektedir. MtDNA vasıtasıyla farklı popülasyonların birbirleri ile ne derecede akraba olduklarının tespiti sayesinde ırklardaki genetik varyasyonun ve filogenetik ilişkilerin araştırılabilmesi sağlanmaktadır. MtDNA nükleer DNA'dan (nDNA) farklı birçok niteliğe sahiptir (Çizelge 2.2). Mutasyon hızının nDNA'ya göre çok daha yüksek olması nedeniyle aynı nesil içerisindeki mutasyonları dahi gösterebilmesi, rekombinasyon göstermemesi, maternal olarak kalıtılarak klonal kalıtım özelliği taşıması, bir hücre içerisinde çok fazla sayıda kopyasının bulunması ve haploid özellik göstermesi gibi avantajlarıyla mtDNA; bireylerin filogenisindeki nasıl, nerede ve ne zaman gibi sorulara daha kesin yanıtlar sunmakta ve alternatif marker olarak genetik çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Özdemir ve Doğru 2011).

Çizelge 2.2 Mitokondriyal DNA'nın Nükleer DNA'dan Farkları (Anonymous 2017)

mtDNA'nın nükleer DNA'dan farkları		
Farklı nitelik	mtDNA	nDNA
Kapsam	Mitokondriyal genom içerir.	Mitokondriyal DNA dâhil hücrenin genomunu içerir.
DNA yapısı	Çift zincirli, dairesel bir yapıya sahiptir.	Çift zincirli, doğrusal bir yapıya sahiptir.

Çizelge 2.2 Mitokondriyal DNA'nın Nükleer DNA'dan Farkları (devamı)
(Anonymous 2017)

Kromozom sayısı	Tek bir kromozom ile düzenlenir.	Birçok kromozom ile düzenlenir. Örneğin insan nDNA'sı 46 kromozom içerir.
Kompozisyon	Hayvan hücrelerinde genetik bileşimin (genotip) %0,25'ini oluşturur.	Hayvan hücrelerinde genetik bileşimin %99,75'ini oluşturur.
Çevrili olma	Çekirdek zarı tarafından çevrilmez.	Çekirdek ile çevrilidir.
Lokasyon	Mitokondriyal matriks içerisinde serbestçe yüzer.	Çekirdek zarına sabitlenmiş şekilde çekirdek matriksinde bulunur.
Genom boyutu	16.569 baz çiftinden oluşur.	3.3 milyar baz çiftinden oluşur.
Histon protein	Histon proteini ile sarılmaz.	Histon proteini ile sıkıca sarılır.
Kopya sayısı	Her bir hücre için binden fazla kopya bulunabilir.	Türe göre değişir. İnsan somatik hücreleri 2 kopya içerir.
Gen sayısı	13 protein, 22 tRNA ve 2 rRNA'yı kodlayan 37 genden oluşur.	Üç mt geni dahil 20.000-25.000 genden oluşur.
Kalıtım	Maternal (anneden) kalıtım yoluyla alınır.	Anne ve babadan eşit şekilde kalıtım yoluyla alınır.
Mutasyon hızı	nDNA'ya kıyasla çok daha yüksektir.	Düşüktür.

Bu çalışmada ise mitokondriyal DNA'nın Sitokrom c Oksidaz Alt ünite I (*COI*) gen bölgesi ve Sitokrom b (*Cytb*) gen bölgesi kullanılarak kızıl sırtlı orman faresi *Myodes glareolus*'un filogenetik ve filocoğrafik analizi gerçekleştirilmiştir.

2.7.1 Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (COI) Gen Bölgesi

Mitokondriyal DNA'nın ağır zincirinde bulunan ve yaklaşık 894 baz çiftinden oluşan Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I enzimi; sitokrom c solunum kompleksi IV'ün üç mitokondriyal DNA (mtDNA) kodlu alt ünitesinden (*COI*, *CO2*, *CO3*) birisidir. Kompleks IV ise mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun elektron taşıma zincirinin üçüncü ve son enzimidir. *COI* geni, diğer protein kodlayan mtDNA genlerine göre daha az evrimleşme hızına sahip olmasından dolayı moleküler filogenileri ortaya çıkarmak için geniş kapsamda kullanılmaktadır (Russo vd. 1996, Dianat vd. 2013, Patwardhan vd. 2014, Riemsdijk vd. 2018). Ayrıca bu genin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğü, metazoan türler için evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesi ve birçok farklı taksonomik seviyede kullanılabilir bir filogenetik sinyale sahip olmasıdır (Keskin ve Atar 2013). *COI* barkod bölgesinin, metazoan mitokondriyal genomu bakımından tür içerisinde %3'ten küçük, türler arasında ise ortalama %10 ila %25 arasında belirgin bir farklılık gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuş bir gerçektir (Hebert vd. 2003). *COI* geninde bulunan kodonların üçüncü pozisyonundaki nükleotidleri yüksek oranda değişim göstermekte ve böylece mitokondriyal rRNA genlerine oranla üç kat daha yüksek moleküler evrim hızına sahip olarak değerlendirilmektedirler. Bir başka önemli nokta da *COI* geninde gerçekleşen evrimin, yakın türlerin ayırımına imkân tanıyan ve coğrafik yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek bir hızda gerçekleşmesidir (Bucklin vd. 2011).

2.7.2 Sitokrom b (Cytb) Gen Bölgesi

Mitokondriyal DNA'nın ağır zincirinde bulunan ve yaklaşık 1140 baz çiftinden oluşan sitokrom b, elektron taşıma zincirinin bir parçası olarak işlev görmekte olup transmembran sitokrom bc1 (koenzim Q) ve b6f komplekslerinin ana alt ünitesidir (Eposti vd. 1993).

Solunum zinciri kompleks III'ün bileşeni olan sitokrom-b; dizi değişkenliği sebebiyle organizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın şekilde kullanılan

bir mitokondriyal DNA bölgesidir. Özellikle familyalar ve cinsler arasındaki ilişkilerin tanımlanmasında en faydalı gen bölgelerinden birisidir. Sitokrom-b'yi içeren karşılaştırmalı çalışmalar, yeni sınıflandırma şemaları ile sonuçlanmakta ve yeni tanımlanan türlerin bir cinse bağlanması ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerin derinlemesine anlaşılmasında kullanılmaktadır (Castresana 2001).

Günümüzde omurgalılar arasında en kapsamlı şekilde sekanslanan gen bölgesi olan mitokondriyal sitokrom b'nin evrimsel dinamikleri ve protein ürününün biyokimyası diğer birçok moleküler sistemlerden daha iyi karakterize edilmektedir. Kardeş türler, aynı cinsten ve aynı familyadan olan türler ile ilişkili olan genetik farklılaşma seviyelerinin karşılaştırılması; sitokrom b'nin filogenetik olarak bilgi verici olduğunu ve üst üste eklenen nükleotid yer değiştirmelerini içeren doygunluk etkileri ile uyuşma-uzlaşma olasılığının ciddi şekilde düşük seyrettiğini göstermektedir (Johns ve Avise 1998).

2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

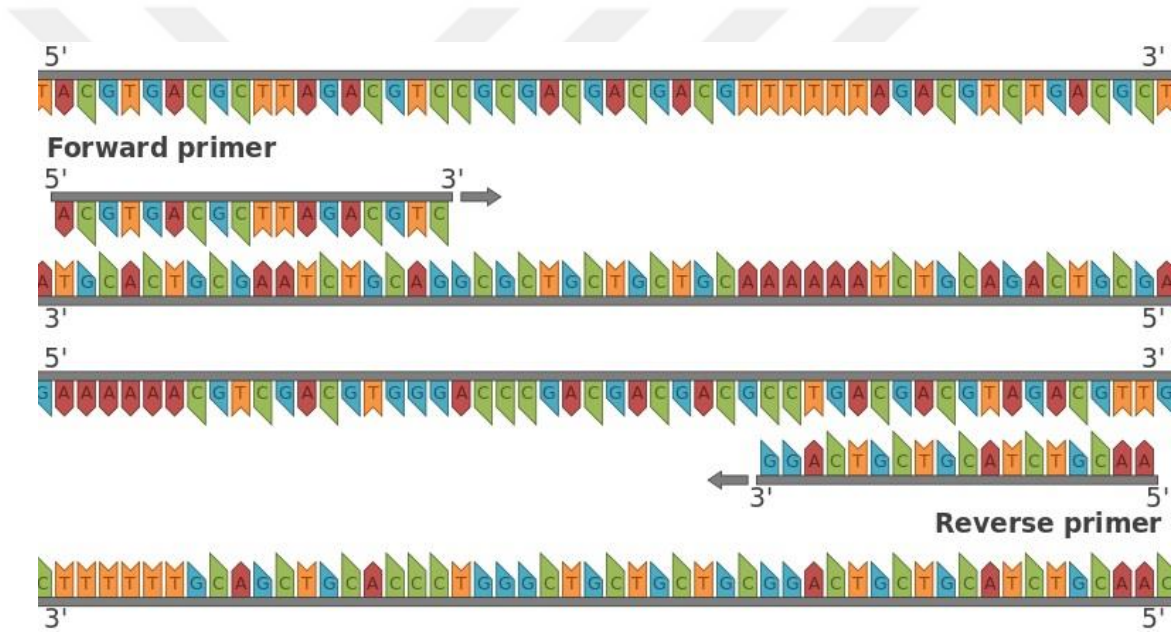
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik ve spesifik bir DNA'daki özgül bölgelerin uygun primerlerce yönlendirilerek enzimatik olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) içeren invitro bir tekniktir. İnvitro koşullarda DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan ve spesifik, hassas, basit ama çok başarılı bir DNA sentezi yöntemi olan PCR ile DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasının kısa zamanda yapılması sağlanmaktadır (Yılmaz ve Devran 2003, Temizkan ve Arda 2018). İlk defa, 1985 yılında R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulanmıştır. Devrim niteliğinde bir rekombinant DNA yöntemi olan PCR Kary Mullis'e 1993 yılında Kimya Nobel ödülünü kazandırmıştır (Anonim 2018).

2.8.1 PCR'ın Bileşenleri

Amplifiye edilecek (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA; kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 20 bazlık, sentetik, kısa, tek zincirli DNA molekülleri olan forward ve revers oligonükleotid primerler (Şekil 2.11); termostabil karakterli *Taq* DNA polimeraz enzimi; kofaktör olması açısından önem arz eden magnezyum klorür ($MgCl_2$); *Taq* DNA polimerazın substratları olan serbest deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP); içerisinde nükleaz bulunmayan distile su (dH_2O) ve tampon çözeltisi (Tris-HCl) PCR'da yer alan ana bileşenlerdir. PCR reaksiyonundaki optimal koşulların elde edilebilmesinde bileşenlerin rolü çok önemlidir ancak arzu edilen şartların oluşturulmasında bu bileşenlerin dışında birçok faktör de etkin olmaktadır. Dolayısıyla uygun olmayan primerler ile zaman ve sıcaklık parametrelerinin kullanılması (özellikle bağlanma sıcaklığı), PCR döngü sayısı, polimeraz enzimi kalitesi, çoğaltılacak ürünün uzunluğu ve Mg^{+2} konsantrasyonu gibi diğer önemli parametreler de göz önünde bulundurulmalıdır (Wilson 1997, Okutucu ve Pehlivan 2003, Arı 2004, Kahya vd. 2013).

15-40 oligonükleotitten oluşan primerler DNA sentezinin başlatılmasını sağlayan DNA parçacıkları olup bu primerler sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır. Primerler sentetik olarak dizayn edilirken; primerin erime sıcaklığı (T_m), primerin bağlanma sıcaklığı (T_a), primerin G-C miktarı, G-C klamları, tekrarlanan bölgeler, art arda aynı nükleotit sıralanması, 3' ucun kararlılığı ve kalıp DNA'da katlanma yapabilecek bölgeler göz önünde bulundurulmalıdır. Primerler, tekrar eden bölgeler (ATATAT gibi) içermemeli ve primer çiftlerinin 3' uçları birbirlerine komplementer yapıda olmamalıdır. Primer boyutu 16 ila 30 baz arasında değişmekle birlikte genellikle 18-24 baz çifti seçilmektedir. Düşük baz çifti kullanımı sonucu primerin özgüllüğü azalabilirken yüksek kullanımda ise primerin kalıp DNA'ya bağlanması güçleşebilmektedir. Konsantrasyonun yüksek olması sonucu primer-dimer adı verilen küçük DNA ürünleri oluşabileceğinden primer konsantrasyonuna önem verilmeli ve yaklaşık olarak 0.1-0.5 μM arasında olması sağlanmalıdır. Primerlerin baz dizilişinde; guanin, sitozin (G+C) miktarı ve primerlerin erimesi için gerekli sıcaklık miktarı (T_m) arasında iyi bir ilişki kurulmalı ve spesifik ürün

elde edilebilmesi için T_m iyi ayarlanmalıdır. Bu denge sağlanamadığı takdirde PCR uygulamalarından iyi sonuç almak mümkün olmamaktadır. Hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına olanak sağlayacağından G+C bazlarının %50 veya daha yukarı oranda bulunması sağlanmalıdır (2 hidrojen bağı içeren adenin ve timin baz çiftine kıyasla guanin ve sitozin baz çifti 3 hidrojen bağı içermesi nedeniyle daha güçlü bir bağa sahiptir). Bir primerin baz dizisinde G+C oranı % 50 ve T_m değeri 56-62°C arasında olursa bu primerin sorunsuz bir şekilde çalışması beklenmektedir. Ayrıca böyle birleşmeler, yüksek sıcaklıkta oluşturulan reaksiyon sırasında görülebilecek non-spesifik bağlanmaları da azaltmaktadır (Yılmaz ve Devran 2003, Arı 2004, Kahya vd. 2013, Anonim 2015).



Şekil 2.11 Forward ve revers primerlerin bağlanması (Anonymous 2019)

Primerlerin açılan DNA kalıplarına hatasız bir şekilde bağlanabilmesi için erime sıcaklığının hesaplanabilmesine yönelik bir formül geliştirilmiştir. Bu formüle göre $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ şeklinde bulunabilmektedir (Yılmaz ve Devran 2003).

Taq DNA polimerazı, DNA moleküllerinin komplementerleriyle eşlenmesine yardımcı olup onların çoğaltılmasını sağlamaktadır. Primerler ile başlatılan çift sarmal oluşumu hedef zincirin DNA polimeraz tarafından dNTP'leri kullanarak uzatılmasıyla devam

etmektedir. *Taq* DNA polimeraz enziminin konsantrasyonu belli oranlarda (her primer için farklı) olmalıdır. Konsantrasyonun çok olması durumunda hatalı eşleşmeler ve spesifik olmayan bantlar ortaya çıkmakta, az olması halinde ise yeterli miktarda eşleşme olmamakta ve bu sebeple az miktarda ürün (DNA) elde edilmektedir (Okutucu ve Pehlivan 2003).

Taq DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması önemlidir. PCR reaksiyon karışımında olması gereken Mg^{+2} miktarı ise ortalama 0.5-2.5 mM olmalıdır (Yılmaz ve Devran 2003).

Magnezyum (Mg) iyon konsantrasyonunun ayarlanması; primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını, kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PCR sonucunda elde edilen DNA kalitesini, primer-dimer bağ oluşumlarını, enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilediği için PCR'ın özgünlüğü ve ürün verimi açısından son derece önemlidir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonunda primerler zincire daha zor bağlandığı için ürün oluşumunda azalma olurken yüksek Mg^{+2} konsantrasyonunda ise baz eşleşmesi çok güçlü olacağı ve 95°C'de dahi zincirler birbirinden ayıramayabileceği için spesifik olmayan ürün oluşumu söz konusu olmaktadır (Yılmaz ve Devran 2003, Kahya vd. 2013).

DNA'nın yapıtaşı olan nükleotidler; deoksiadenozin trifosfat (dATP), deoksiguanin trifosfat (dGTP), deoksisitozin trifosfat (dCTP) ve deoksitimin trifosfat (dTTP) olup (Şekil 2.12) bu dört nükleotid deoksinükleotid trifosfat (dNTP) olarak adlandırılmaktadır (Somma ve Querci 2010).

dNTP'lerdeki α fosfatlara bağlanırken, β ve γ fosfatların ayrılmasına yardımcı olarak *Taq* polimerazın dNTP'lere bağlamasını kolaylaştırmaktadır. Mg konsantrasyonu arttıkça *Taq* polimeraz daha etkin çalışmakta ancak özgüllüğü düşmekte ve dolayısıyla istenmeyen bantlar görülebilmektedir. dNTP'ler Mg^{+2} iyonunu bağladıklarından dNTP konsantrasyonu arttığında serbest Mg^{+2} konsantrasyonu azalmaya başlayabileceğinden optimizasyon bu durum göz önüne alınarak yapılmalıdır (Kahya vd. 2013).

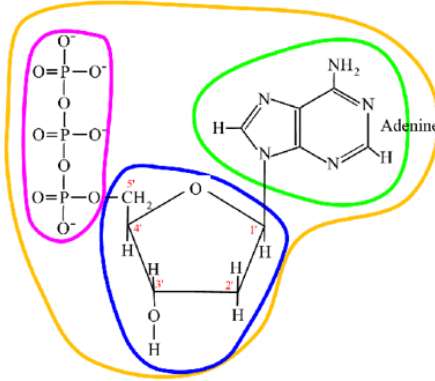
PCR uygulamalarından iyi sonuç alınabilmesi için; nükleotid oranlarının eşit miktarlarda kullanılması ve her bir deoksinükleotid (A, G, C, T) konsantrasyonunun 20-200 μM arasında olması sağlanmalıdır. PCR spesifikliğini ve güvenilirliğini artırarak yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin ortaya çıkmasını önleyebileceğinden dNTP konsantrasyonu düşük tutulmalıdır. Başlangıç stok solüsyonu 10 mM kadar seyreltildikten sonra, küçük hacimlere ayrılarak -20°C 'de saklanmalıdır (Yılmaz ve Devran 2003).

Nükleotidlerin Bileşenleri

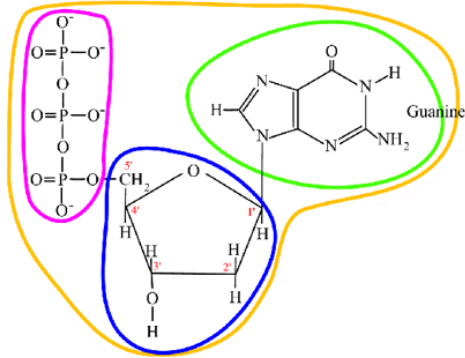
Nükleotid = Baz + şeker + fosfat

4 farklı dNTP (deoksinükleotid trifosfat)

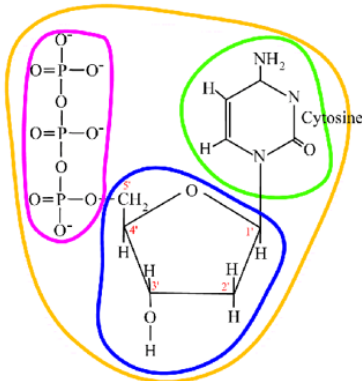
deoksiadenozin trifosfat (dATP)



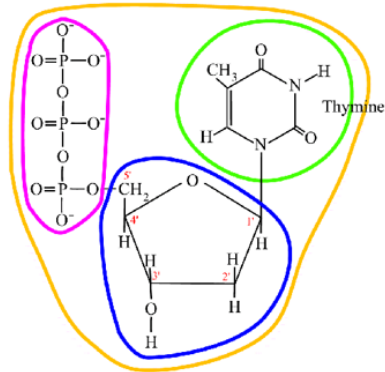
deoksiguanin trifosfat (dGTP)



deoksisitozin trifosfat (dCTP)



deoksitimin trifosfat (dTTP)

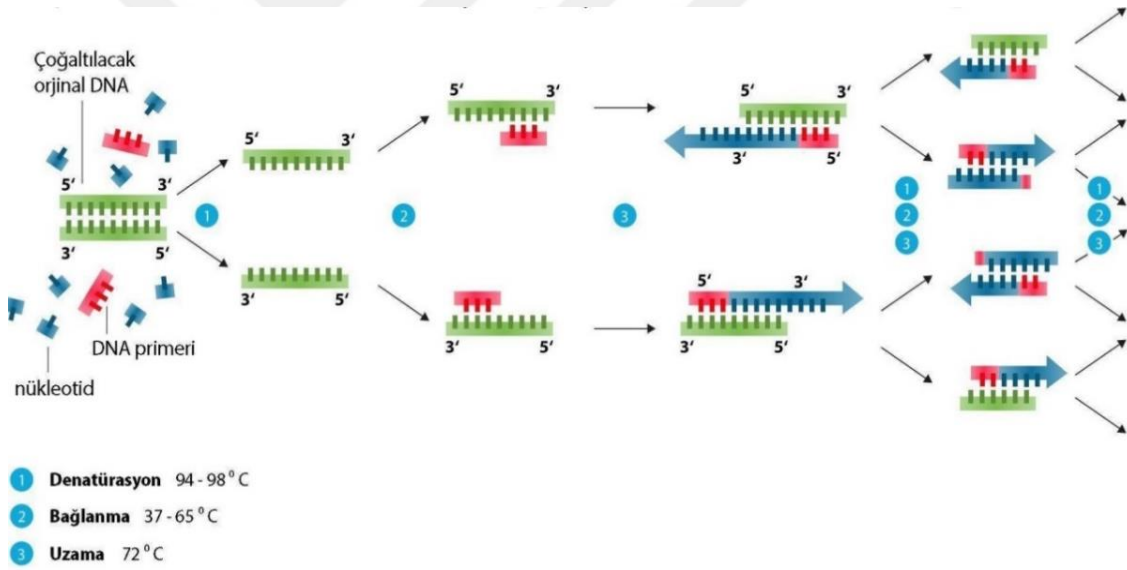


Şekil 2.12 Nükleotidlerin bileşenleri (Anonymous 2000)

PCR uygulamalarında yaklaşık 10-50 mM arasında Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.3-8.8/ 20°C’de pH 6.8-7.8) kullanılmaktadır. PCR karışımına 50 mM KCl eklenmesi primer bağlanmasını kolaylaştırmaktayken, 50 mM’ın üzerinde KCl veya 50 mM NaCl eklenmesi *Taq* DNA polimeraz aktivitesini engellemektedir (Yılmaz ve Devran 2003).

2.8.2 PCR’ın Temel Adımları

DNA, bir organizmanın yapısını ve fonksiyonunu bütünüyle tanımlayan tüm genetik bilgiyi içermektedir. PCR işleminde temel olarak; çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) biçimine çözülmekte, primerler bağlanmakta, hedef zincir boyunca uzatılmakta ve kopyalanarak çoğaltılmaktadır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 PCR’ın adımları (Anonim 2020)

DNA, jelde rahatça görülüp dizisinin yapılabilmesi için milyonlarca kez çoğaltılmakta ve PCR işleminde hedef DNA’nın çoğaltılması 20 ila 40 döngü arasında gerçekleşmektedir. Her döngü; DNA zincirinin açılması (denatürasyon), primerlerin açılan DNA zincirlerine bağlanması (annealing) ve primer uzaması (primer extension) olmak üzere farklı sıcaklıklardan oluşan 3 adım içermektedir (Okutucu ve Pehlivan 2003).

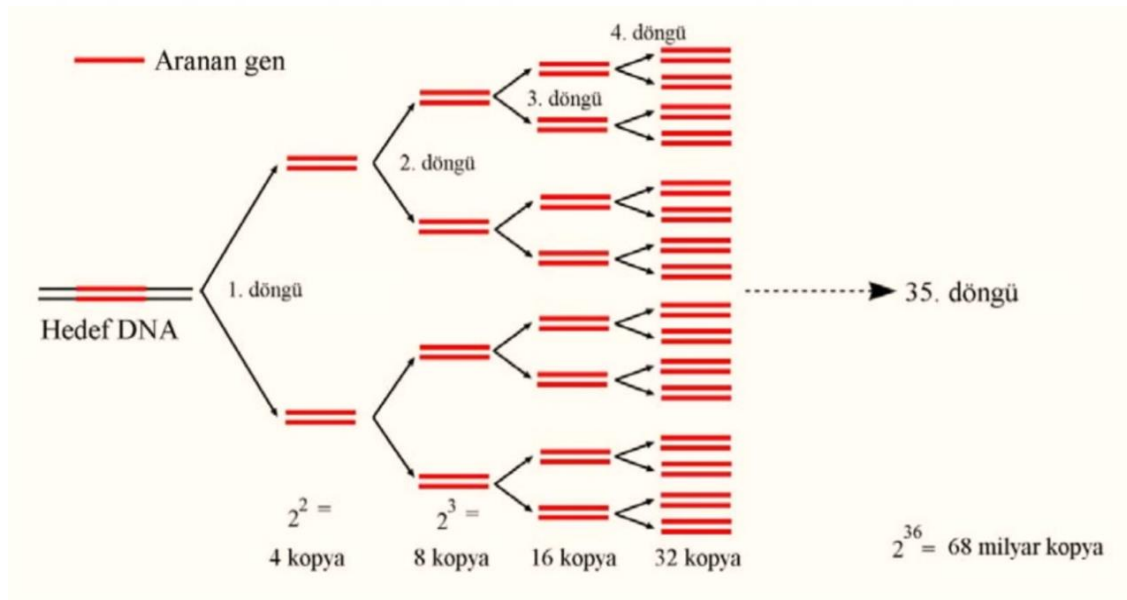
Denatürasyon adımı; PCR bileşenleri ile aynı ortamda bulunan kalıp DNA (template DNA), 92-95°C’de 1-2 dakika tutulmaktadır. Çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri arasındaki hidrojen bağları kırılıp birbirlerinden ayrılmakta ve tek zincirli hale gelmektedir. DNA zincirlerinin daha da açılması için, bazı durumlarda döngünün başına 5-10 dakika ön denatürasyon eklenmesi gerekebilmektedir. GC bazlarınca zengin kalıp DNA zincirinin yeterince açılmaması halinde sıcaklık ve süre artırılarak sorun çözülebilmektedir (Watson vd. 1992; Hadidi vd. 1995, Yılmaz ve Devran 2003, Anonim 2015).

PCR’ın ikinci adımı olan bağlanmada; ortam sıcaklığı 37-65°C’ye düşürülerek, 15-30 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotid primerler açılan DNA zincirlerinde kendi baz dizilerine karşılık gelen bölge ile birleşmektedir. Bağlanma, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniye sürmektedir. Kalıp DNA’nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapan primerlerin yanlış yerlere bağlanması nedeniyle hatalı DNA dizilerinin ortaya çıkmasını önlenmek için bağlanma sırasında sıcaklık artırılarak DNA seçiciliği de artırılabilir. PCR uygulamasının hassasiyetini yükseltmek ve spesifik olarak beklenen DNA parçacıklarının sentezlenebilmesi için özellikle PCR işleminin ilk birkaç devrinde sıcaklık artırılmalıdır. Yeni sentezlenen DNA dizilerinde hatalı baz bağlanmaları sıcaklığın düşürülmesinden kaynaklı olabilmektedir (Innis ve Gelfand 1990, Yılmaz ve Devran 2003, Klug vd. 2011).

Uzama ise PCR’ın son adımıdır. Tek zincirli hedef DNA’nın komplementeri olan primer ile zincir başlamaktadır. Mg^{+2} iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz enzimi (*Taq* DNA polimeraz) nükleotidleri 5’ ucundan 3’ ucuna doğru ekleyerek hedef zincir boyunca uzatmakta ve ortam sıcaklığı 72°C’ye yükseltildiğinde *Taq* Polimeraz için optimum çalışma sıcaklığı elde edilerek istenilen bölge sentezlenmeye başlamaktadır. Sıcaklık düşürülmesi ise primerlerin hatalı şekilde uzamaya başlamasına neden olmaktadır. Primerlerin uzaması için gerekli süre baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yapılması halinde son uzama işlemiyle 1 döngü tamamlanmakta ve nihai durumda primerin de içinde bulunduğu yeni sentezlenmiş çift zincirli DNA molekülü elde edilmiş olmaktadır (Erlich vd. 1991, Yılmaz ve Devran 2003, Okutucu ve Pehlivan 2003,

Anonim 2015, Klug vd. 2011). Elde edilen bu ürünün (amplikon) uzunluğu ise çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Hadidi vd. 1995, Yılmaz ve Devran 2003).

Üç basamaktan (denatürasyon, annealing, primer extension) oluşan bu işlem, bir PCR devrini temsil etmektedir. Bu çalışmada, DNA zincirlerinin daha da açılabilmesi amacıyla siklusların başına ön denatürasyon, sonuna ise son uzama adımı eklenmiştir. PCR’da DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkmakta ve eski zincirlerle beraber yeni zincirler de bir sonraki döngüde kalıp görevi görmektedirler. Yaklaşık 5 dk süren bir döngü birçok kez tekrar edilmektedir. 3 saatten daha az bir zamanda 25-30 döngü sonunda DNA miktarı milyon katından daha fazla artmakta (Şekil 2.14) ve tekrarlanan bu döngüler sonucu orijinal DNA dizisi milyon kattan daha fazla çoğalmış olmaktadır (Klug vd. 2011). PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamit jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenmektedir (Hadidi vd. 1995, Yılmaz ve Devran 2003).



Şekil 2.14 DNA’nın tekrarlayan döngülerle çoğalması (Anonymous 2000)

Bu adımlar, termal döngü cihazlarında önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlar ile otomatik olarak gerçekleştirilmekte ve klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi birçok amaç için kullanılabilen özgün DNA dizileri bol miktarlarda elde edilebilmektedir (Klug vd. 2011).

2.8.3 PCR'ın Uygulama Alanları

PCR; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim ve adli tıp gibi birçok alanda faydalanan bir yöntem olmuştur. Bilhassa modern genetiğin pek çok alanında en fazla kullanılan tekniklerden birisidir (Klug vd. 2011). Enfeksiyonların teşhisi, özel amaçlarla genlerin belirlenmesi ve DNA parçalarının klonlanmasında PCR teknikleri giderek önem kazanmış; PCR, genetiği değiştirilmiş DNA'nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün kontrolü gibi yeni alanlarda da incelemelere olanak sağlamıştır (Kahya vd. 2013). Bu yöntemin sıklıkla tercih edildiği bazı spesifik çalışmalar şu şekilde sıralanabilir (Arı 1999, Okutucu ve Pehlivan 2003, Somma ve Querci 2010 Temizkan ve Arda 2018):

1. Hasta genlerindeki bozukluklar tespit edilerek kalıtsal hastalıkların teşhisi (hemofili vb.) yapılabilen ve böylece taşıyıcılar da erken teşhis edilebilmektedir.
2. Onkogen ve tümör supresör genlerdeki mutasyonlar için PCR temelli stratejiler kullanılarak kanser araştırmaları yapılmaktadır.
3. Orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi vb. genetik hastalıkların teşhisinde PCR kullanılmaktadır.
4. Suçlu kişilere ait ya da babalık testi için gerekli olan DNA analizleri yapılarak adli tıp çalışmaları aydınlatılmaktadır.
5. Biyoteknolojik alanda, rekombinant proteinlerin (insulin ya da büyüme hormonu) ve rekombinant aşılarda geliştirilmesinde kullanılmaktadır.
6. Bakteri ve virüslerin tespitinde; geliştirilmiş özel PCR yöntemleri kullanılmakta ve bu durum hastalıkların teşhisinde hız ve duyarlılık kazandırmaktadır.
7. DNA dizi analizinde, parmak izi analizinde, büyük miktardaki DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizi tayininde, invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede,

implantasyon öncesi genetik testlerin yapılmasında, allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, DNA-protein interaksiyonunun araştırılmasında, İnsan Genom Projesi'ndeki araştırmalarda ve Mısır'daki mumyalardan DNA klonlamasında kullanılmaktadır.

8. Doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı ve türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi ile taksonomi ve sistematik çalışmalarında sıklıkla faydalanılmaktadır.

2.8.4 PCR'ın Avantajları Ve Dezavantajları

PCR'ın avantajlarına; kısa süre içerisinde milyarlarca kopyanın elde edilmesine imkan sunma, düşük hata payına sahip olma ve ayrıca spesifik ve güvenilir bir yöntem olma gibi hususlar örnek olarak verilebilmektedir. Dezavantajlarına ise pahalı laboratuvar ekipmanları gerektirme, çok iyi eğitim almış personel gerekliliğine olan ihtiyaç, pahalı sarf malzemeleri ve bulaşma veya diğer faktörler etkisiyle zaman zaman da olsa hatalı sonuçların alınabilmesi sayılabilmektedir (Yılmaz ve Devran 2003).

2.8.5 PCR makinaları

PCR makinaları, temelde blok ısıtmalı ve hava ısıtmalı olmak üzere iki çeşittir. Geleneksel blok ısıtmalı PCR makinelerinde, aksesuarların sıcaklık geçirgenliğinin az olması nedeniyle istenilen sıcaklığa ulaşmak uzun sürebilmektedir. Bütün zamanın PCR'ın basamakları arasındaki geçişlerde harcanması ise büyük dezavantajlar getirmektedir. Günümüzde artık pek kullanılmayan blok ısıtmalı termal döngü makinelerinde PCR süresi 2-4 saat sürmektedir (Kahya vd. 2013).

Hava ısıtmalı makinalarda ise; hava, bloğa göre çok daha hızlı ısınıp soğuduğu için PCR zamanı minimuma inmektedir. Yeni kullanılan PCR makinalarının hemen hepsi hava ısıtmalı sistemlerdir. Bu sistemler sayesinde testlerin performansı artarken süre azalmaktadır. Son zamanlarda PCR amplifikasyonunu ve amplifiye olmuş ürünün (amplikon) kontrolünü aynı kapalı sistemlerde gerçekleştiren ve amplikonun

görüntülenmesine izin veren yeni sistemler geliştirilerek; gıdalardan, memeli genomundan, genetik olarak geliştirilmiş organizmalardan, insan ve veteriner mikrobiyoloji alanlarındaki çok değişik örneklerden nükleik asitlerin aranmasında kullanılmaya başlanmıştır. Real-Time (RT) PCR olarak adlandırılan bu sistemler sıcaklık değişimini geleneksel hava ısıtmalı termo döngülere göre çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştirmekte ve her PCR döngüsü sonunda, hedef DNA'ya nükleik probalar veya floresan boyalar bağlandıktan sonra açığa çıkan floresanı tespit eden sistemlerle çalışmaktadırlar (Kahya vd. 2013).

2.8.6 PCR Reaksiyonunun Gerçekleştirildiği Tüpler

PCR reaksiyon hacimleri ve kullanılan PCR tüplerinin özellikleri de PCR makinası kadar PCR performansını etkileyen öğeler arasındadır. PCR'da, 200 µl'lik ince çeperli tüpler tercih edilmelidir. Çünkü kalın çeperli PCR tüpleri, içerisindeki örnekler sıcaklık transferini etkin bir şekilde yapamamaktadırlar. Tüpün kapağı kapandıktan sonra buharlaşma olmaması, sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması, düşük ısı kütleye sahip olması, çapraz reaksiyonlara izin vermeksizin reaksiyon reagentlerinin tüplere konulabilmesi iyi bir PCR tüpünün sahip olması gereken özelliklerdir (Kahya vd. 2013).

2.9 Agaroz jel elektroforezi

PCR ile elde edilen DNA'ların çoğalıp çoğalmadığının kontrolü için kullanılmaktadır. Genel olarak elektroforez, bir karışımdaki molekülleri bir elektrik alanının etkisiyle hareket etmelerini sağlayarak ayırmaktadır. Elektroforez tankında elektrik akımı verilen DNA (-) yüklü olduğu için (+) ya doğru gidecektir. Eğer iki molekül yaklaşık aynı kütleye ve biçime sahipse, net yükü en fazla olan, zıt polaritedeki elektroda doğru daha hızlı hareket etmekte ve küçük moleküller büyük moleküllere göre jelde daha hızlı yol almaktadır. Ayırımın kilit noktası jel matrisine (gözeneklere) dayanmaktadır. Gözenekler ise büyük moleküllerin hareketini küçüklere göre daha fazla kısıtlamaktadır. Elektroforez tamamlandıktan sonra, çeşitli büyüklüklerdeki molekülleri temsil eden

bantlar, ya otoradyografi ile (molekölün 10 bileşenlerinden biri radyoaktif işaretli ise) ya da nükleik asitlere bağlanan floresan bir boya ile görüntülenmektedir. Elektroforez sonrası boş bir jel görülmesi halinde; primerler, bağlanma sıcaklığı ve magnezyum konsantrasyonu kontrol edilmelidir (Klug vd. 2011, Anonim 2018).

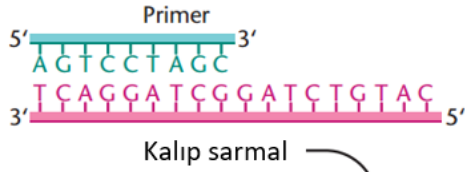
2.10 DNA Dizi Analizi

Klonlanmış bir DNA molekülü ya da bir klondan bir genoma kadar herhangi bir DNA ancak nükleotid dizisi bilindiği zaman tam anlamıyla karakterize edilebilmektedir. Dolayısıyla genin yapısı, fonksiyonu ve regülasyonu ile ilgili mekanizmaların anlaşılmasında DNA dizi analizi önemli bir yer tutmaktadır. En çok kullanılan DNA dizi analiz yöntemi, James Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemdir. Bu işlemde dizisi belirlenecek DNA molekülü bir seri eşlenik zincirlerinin sentezlenebilmesi için önce tek zincirli hale dönüştürülmektedir. Bu eşlenik zincirlerden her biri; farklı, özgül nükleotidlerde gelişigüzel sonlanmaktadır. Bu işlem sonucunda elektroforezle birbirinden ayrılan bir seri DNA parçaları ortaya çıkmakta ve DNA dizisinin saptanması için incelenmektedir (Klug vd. 2016).

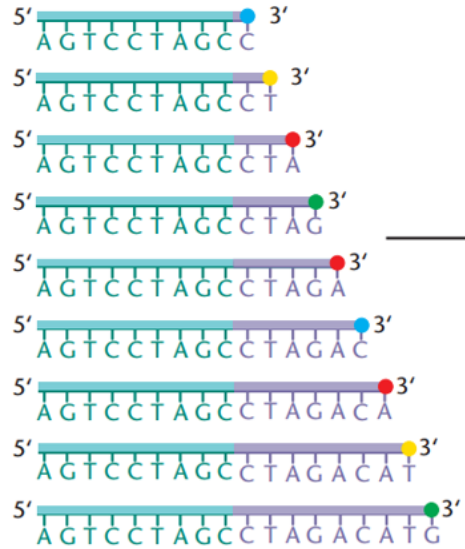
Son 20 yılda, Sanger tekniğinin modifikasyonları sayesinde reaksiyonların tek bir tüpte dizilenmesine imkân sunan teknolojiler ortaya çıkmıştır (Şekil 2.15). Dört ddNTP'nin her biri farklı renkli bir floresan boya ile etiketlenmekte ve daha fazla okuma ve çalıştırma kapasitesine izin veren döngü reaksiyonları kullanılmaktadır. Reaksiyon ürünleri, kapiler jel (kapiler jel elektroforezi) adı verilen tek, ultra ince çaplı bir poliakrilamid tüp jel ile ayrılmakta ve DNA parçaları jel içerisinde hareket ederken lazer ile taranmaktadır.

1.Reaksiyon bileşenleri

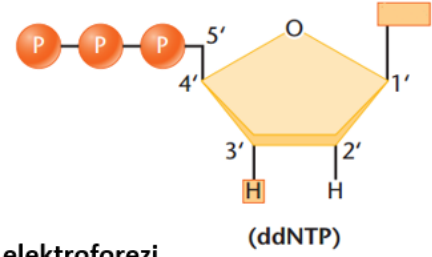
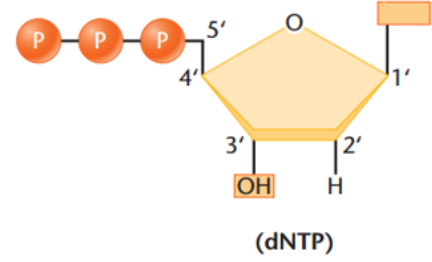
- Kalıp DNA
- Primer
- DNA polimeraz
- dNTP'ler
- Düşük miktar ddNTP



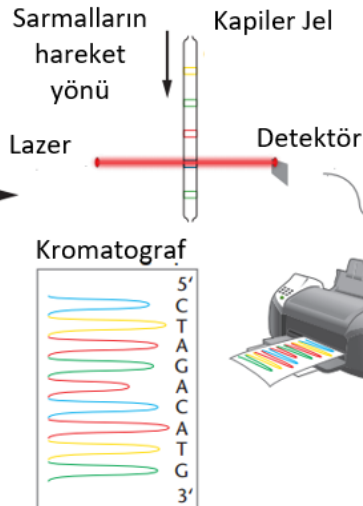
2.Primer uzaması ve zincir sonlanması



- ddNTP
- ddATP
- ddCTP
- ddGTP
- ddTTP



3. Kapiler jel elektroforezi ile ayrı DNA parçaları



4. Lazer ve detektör her bir ddNTP'nin floresanını tespit eder ve dizi analizi için bilgisayara girdi sağlar.

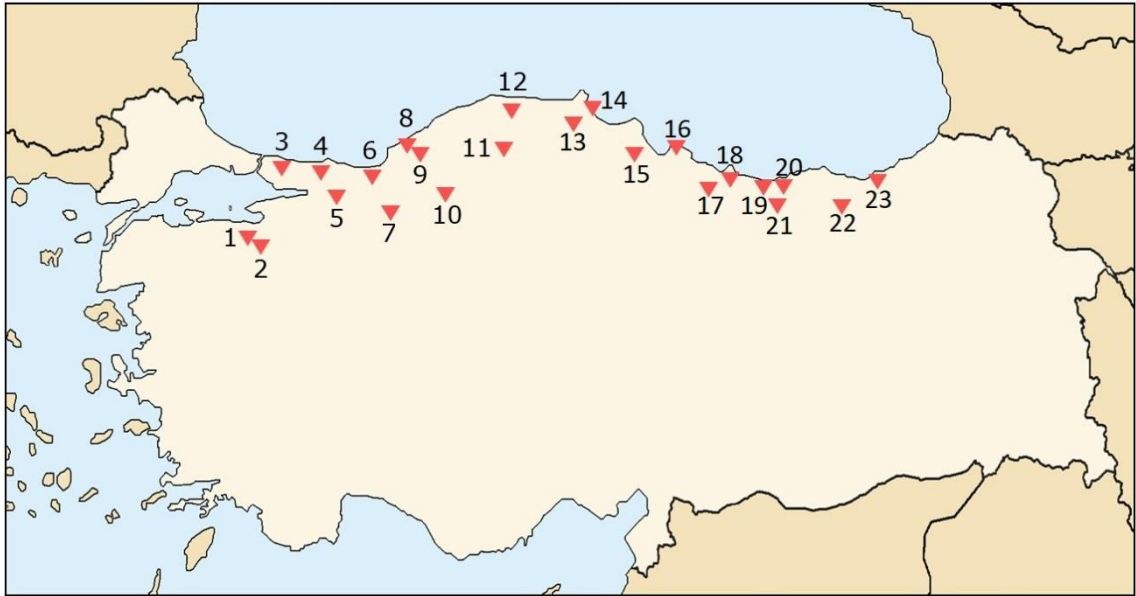
Şekil 2.15 Sanger yöntemi ile bilgisayar destekli DNA dizileme (Klug vd. 2016).

Lazer, her bir DNA parçasındaki floresan boyaları uyarmakta ve bu boyalar, her bir ddNTP için farklı dalga boylarında ışık yaymaktadır. Yayılan ışık, ışık modellerini teknik olarak bir elektroferogram veya kromatograf olarak adlandırılan bir DNA dizisine dönüştürmek için bu bilgileri büyüten ve bir bilgisayara ileten dedektör tarafından yakalanmaktadır. Veriler, her biri dizideki bir nükleotide karşılık gelen bir dizi renkli tepe olarak temsil edilmektedir (Klug vd. 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Örneklerin Tasnifi

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 19L0430009 numaralı tez projesi ile desteklenmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerin birçoğu daha önce yapılmış arazi çalışmalarında canlı hayvan yakalama kapanlarıyla toplanmış, Hayvan Deneyleri Etik Kurulu yönetmeliğine uygun yüksek dozda anestezik madde ile uyutularak dokuları alınmış ve bu dokular tez çalışmasında kullanılmak üzere laboratuvarında -86 °C’de muhafaza edilmiştir. Daha sonra Ilgaz-Çankırı ve Bursa’da toplanan yeni örnekler de çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada, 23 lokaliteden toplam 63 örneğin böbrek, karaciğer ve kas dokuları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1’de örneklerin toplandığı lokaliteler gösterilmektedir.



Şekil 3.1 *M. glareolus* örneklerinin toplandığı lokaliteler

1. Bursa, 2. Uludağ, 3. Şile, 4. Kandıra, 5. Kartepe, 6. Akçakoca, 7. Abant, 8. Zonguldak, 9. Çaycuma, 10. Kızılcahamam, 11. Ilgaz, 12. Küre, 13. Bürnük, 14. Göktepe, 15. Çakallı, 16. Ünye, 17. Gürgentepe, 18. Ulubey, 19. Bulancak, 20. Bicik, 21. Barça, 22. Sümela, 23. İkizdere

Her bir örneğe ait harita numaraları, PCR numaraları ve müze kayıt numaraları ile her lokaliteden çalışılan örnek sayıları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Ayrıca Çizelge 3.1’de, ilk defa bu çalışmada analiz edilen örnekler “yeni” ibaresiyle belirtilmiştir. Çizelge 3.1’de “Çolak vd. 2015” olarak belirtilen örnekler ise bu çalışmada yeni örneklerle beraber değerlendirilmek üzere kullanılan GenBank’ta kayıtlı daha önceki çalışmaya ait dizilerdir. Bu dizilere ait GenBank numaraları ile çalışmada kullanılan *Myodes glareolus*’a ait Avrupa örneklerinin ve dış grup olarak kullanılan *Myodes centralis*’in GenBank numaraları Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Myodes glareolus* örnekleri

Harita No	PCR No	Müze No	Lokalite	Örnek sayısı	COI	Cytb
1	115	7660	Bursa	9	yeni	yeni
	116	7661	Bursa		yeni	yeni
	117	7662	Bursa		yeni	yeni
	118	7663	Bursa		yeni	yeni
	119	7664	Bursa		yeni	yeni
	120	7665	Bursa		yeni	yeni
	121	7666	Bursa		yeni	yeni
	123	7668	Bursa		yeni	yeni
	124	7669	Bursa		yeni	yeni
2	1	3711	Uludağ-Bursa	3	yeni	Çolak vd. 2015
	2	3733	Uludağ-Bursa		yeni	Çolak vd. 2015
	4	3739	Uludağ-Bursa		yeni	Çolak vd. 2015
3	14	4994	Şile-İstanbul	4	yeni	Çolak vd. 2015
	15	4995	Şile-İstanbul		yeni	Çolak vd. 2015
	17	4997	Şile-İstanbul		yeni	yeni
	18	4998	Şile-İstanbul		yeni	yeni
4	8	4988	Kandıra-Kocaeli	3	yeni	Çolak vd. 2015
	9	4989	Kandıra-Kocaeli		yeni	Çolak vd. 2015
	10	4990	Kandıra-Kocaeli		yeni	Çolak vd. 2015
5	101	6404	Kartepe-Kocaeli	3	yeni	Çolak vd. 2015
	102	6405	Kartepe-Kocaeli		yeni	Çolak vd. 2015
	104	6409	Kartepe-Kocaeli		yeni	Çolak vd. 2015
6	35	5016	Akçakoca-Düzce	3	yeni	Çolak vd. 2015
	36	5018	Akçakoca-Düzce		yeni	Çolak vd. 2015
	37	5019	Akçakoca-Düzce		yeni	Çolak vd. 2015

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Myodes glareolus* örnekleri (devamı)

Harita No	PCR No	Müze No	Lokalite	Örnek sayısı	COI	Cytb
7	29	5010	Abant-Bolu	4	yeni	Çolak vd. 2015
	30	5011	Abant-Bolu		yeni	Çolak vd. 2015
	31	5012	Abant-Bolu		yeni	Çolak vd. 2015
	33	5014	Abant-Bolu		yeni	yeni
8	81	5236	Zonguldak	4	yeni	Çolak vd. 2015
	82	5237	Zonguldak		yeni	Çolak vd. 2015
	83	5238	Zonguldak		yeni	yeni
	84	5239	Zonguldak		yeni	yeni
9	3	3738	Çaycuma-Zonguldak	1	yeni	yeni
10	79	5168	Kızılcahamam-Ankara	1	yeni	Çolak vd. 2015
11	109	7569	Ilgaz-Çankırı	4	yeni	yeni
	110	7570	Ilgaz-Çankırı		yeni	yeni
	111	7571	Ilgaz-Çankırı		yeni	yeni
	112	7572	Ilgaz-Çankırı		yeni	yeni
12	23	5003	Küre-Kastamonu	3	yeni	Çolak vd. 2015
	24	5004	Küre-Kastamonu		yeni	Çolak vd. 2015
	44	5050	Küre-Kastamonu		yeni	yeni
13	48	5055	Bürnük-Sinop	2	yeni	Çolak vd. 2015
	76	5103	Bürnük-Sinop		yeni	yeni
14	49	5056	Göktepe-Sinop	4	yeni	Çolak vd. 2015
	60	5073	Göktepe-Sinop		yeni	Çolak vd. 2015
	61	5078	Göktepe-Sinop		yeni	yeni
	62	5079	Göktepe-Sinop		yeni	yeni
15	96	5332	Çakallı-Samsun	1	yeni	Çolak vd. 2015
16	90	5307	Ünye-Ordu	2	yeni	Çolak vd. 2015
	91	5310	Ünye-Ordu		yeni	yeni
17	50	5057	Gürgentepe-Ordu	2	yeni	Çolak vd. 2015
	52	5061	Gürgentepe-Ordu		yeni	yeni
18	51	5058	Ulubey-Ordu	2	yeni	Çolak vd. 2015
	70	5092	Ulubey-Ordu		yeni	yeni
19	94	5325	Bulancak-Kışla köyü-Giresun	1	yeni	Çolak vd. 2015
20	88	5302	Bicik-Giresun	1	yeni	Çolak vd. 2015
21	86	5290	Barça köyü-Giresun	2	yeni	Çolak vd. 2015
	98	5350	Barça köyü-Giresun		yeni	yeni
22	46	5053	Sümela-Trabzon	3	yeni	Çolak vd. 2015
	47	5054	Sümela-Trabzon		yeni	Çolak vd. 2015
	57	5066	Sümela-Trabzon		yeni	yeni
23	100	5711	İkizdere-Rize	1	yeni	yeni

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan *Myodes glareolus* örneklerine ve dış gruba ait GenBank numaraları ile örnek lokaliteleri

Tür	Ülke	Lokalite	GenBank Numaraları		
			Cytb		COI
<i>Myodes glareolus</i>	Türkiye	Uludağ-Bursa	KM508997,	KM508998,	KM508997
		Şile-İstanbul	KM508989,	KM508990	
		Kandıra-Kocaeli	KM508989,	KM508991,	KM508992
		Kartepe-Kocaeli	KM509000,	KM509001,	KM509002
		Akçakoca-Düzce	KM508993,	KM508990,	KM508994
		Abant-Bolu	KM508995,	KM508995,	KM508996
		Zonguldak	KM508999,	KM508989	
		Kızılcahamam-Ankara	KM509003		
		Küre-Kastamonu	KM509005,	KM508996	
		Bürnük-Sinop	KM509006		
		Göktepe-Sinop	KM509007,	KM509008	
		Çakallı-Samsun	KM509009		
		Ünye-Ordu	KM509011		
		Gürgentepe-Ordu	KM509010		
		Ulubey-Ordu	KM509010		
		Bulancak-Giresun	KM509012		
		Bicik-Giresun	KM509012		
		Barça köyü-Giresun	KM509013		
		Sümela-Trabzon	KM509014,	KM509014	
	Finlandiya	Sotkomo	AY309419		
	İtalya	Abbruzzo	EU483554		
	Rusya	Tikhvinskiy District (COI)			JF903067
<i>Myodes centralis</i>	İngiltere	Wales (Cytb),	AY309420		JQ794805
		Malham Tarn Nature Res. (COI)			
	Norveç				HM380210
	Sırb. Karadağ		DQ472300,	DQ472303	
	Bulgaristan		DQ472233,	DQ472236	DQ472238
<i>Myodes centralis</i>	(dış grup)				
	Çin		KY968281		KY968255

Çalışmalar için gerekli izinler, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2019-11-108) ve Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden (21264211-288.04-2175385) alınmıştır.

Bu tez kapsamında DNA izolasyonu ve PCR analizleri Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan "Moleküler Sistemik Laboratuvarı"nda gerçekleştirilmiş olup, çoğaltılan gen bölgelerinin DNA dizi analizi sonuçları hizmet alımı yoluyla elde edilmiştir. Bunun yanında filogenetik ve populasyon genetiği analizleri paket programlar kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.2 DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında *M. glareolus*'a ait tüm örneklerin böbrek, karaciğer ve kas dokuları kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonu "CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) DNA izolasyonu" (Doyle ve Doyle 1991) prosedürü ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmalarında kullanılan tamponlar ile bunların hazırlanma ve saklanma koşulları Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

DNA izolasyonu sırasıyla şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Bistüri yardımıyla minimal boyuttaki küçük parçalara ayrılan doku örnekleri pensle alınarak numaralandırılan ependorf tüplerine konulmuştur. Üzerine 150 µl CTAB (Kloroform, Tris-HCl, EDTA, NaCl) tamponu eklenip tek kullanımlık havaneli yardımıyla biraz ezilmiştir.
- Bu karışımın üzerine 150 µl daha CTAB tamponu eklenmiş ve mümkün olduğu kadar homojen bir sıvı elde edinceye kadar ezilmiştir.
- Homojenata sırasıyla 300 µl CTAB ve 50 µl βME (β-Merkaptoetanol) eklenip ependorf tüp hafifçe karıştırılmıştır.
- Karışım 65 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Su banyosunda inkübe edilen ependorf tüpleri

- 500 µl C: IAA (Kloroform: izoamil alkol) (24:1) ilave edilip karışım süte benzer bir kıvamda gelinceye kadar hafifçe karıştırılmıştır.
- Ependorf tüpler 13.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden çıkan ependorf tüpleri, oluşan ikili fazı bozmayacak ve aynı eğik açıda olacak şekilde buza yerleştirilmiştir. Üst faz, pipetle iki aşamada 500 µl olacak şekilde ve içinde beyaz kloroform olmamasına çok dikkat edilerek çekilmiş ve ependorf tüplerine konulmuştur. Alınan bu sıvı faz ile DNA toplanmıştır.
- Nükleik asitlerin çöktürülmesi amacıyla 500 µl -20°C'de soğutulmuş izopropanol tüplere eklenmiş ve tüpler yavaşça karıştırılmıştır. Sonuçta, bulut şeklinde nükleik asit ipliği gözlenmiştir. Kas dokusu kullanıldığında beyaz görünen bulut şeklindeki yapı karaciğer dokusu kullanıldığında mor renkte görülmüştür.

- Alt üst edilen tüpler -20°C 'de bir gece veya -80°C 'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- Donmuş haldeki tüpler erirmeden 13.000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.3). Dipteki DNA'ya zarar vermeden üstte kalan süpernatant yavaşça beherglasa dökülmüş ve dibe çöken DNA moleküllerinin bulunduğu pellet %70'lik etil alkol ile 2 kere, %100'lük etil alkol ile de 1 kere yıkanmıştır.



Şekil 3.3 Eppendorf tüplerinin yerleştirildiği santrifüj cihazı

- Yıkama sonucu ependorf tüpündeki çöken pelletler kurutma kağıdında ters çevrilerek en az 1 saat kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan DNA'nın üzerine 100 µl TE (Tris-EDTA) tamponu ilave edilerek DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır.
- Çözünen DNA pelletleri üzerine 2 µl RNase A (10 mg/mL) eklenip 30 dakika 37 °C etüvde bekletilmiştir. Böylece RNA'dan arındırılmış DNA elde edilmiştir.
- Elde edilen DNA örnekleri PCR'da çalışmak için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması ve saklama koşulları

Kullanılan Kimyasallar	Hazırlanışı	Saklama Koşulu
CTAB (100 ml)	100 ml tampon çözelti için; 2 gr CTAB, 10 ml 1 M Tris Base (pH=8), 4ml 0.5 M EDTA (pH=8), 28ml 5M NaCl dH ₂ O ile 100 ml tamamlanır.	4 °C
Tris Base (1M) pH:8.0 (MW:121.1)	12,11 gr Tris Base dH ₂ O ile 100 ml tamamlanır.	
EDTA (0.5M) pH:8.0 (MW:372.2 gr)	18,61 gr EDTA dH ₂ O ile 100 ml tamamlanır.	
NaCl (5M) (MW:58.44 gr)	29,22 gr NaCl dH ₂ O ile 100 ml tamamlanır.	
RNase (10mg/ml, Fermentas)	2 µl	-20°C
TE Tamponu pH:8.0	1 ml 1 M Tris Base çözeltisi, 20 µl EDTA dH ₂ O ile 100 ml tamamlanır.	-24°C
BME Stok (MW:78.13 gr) (250 ml)	17,5 ml BME 232,5 ml dH ₂ O ile 250 ml tamamlanır.	4 °C

M. glareolus'a ait genomik DNA'nın saflığını belirlemek için spektrofotometre (NanoDrop 2000) ile absorbans (A260 /A280 ve A260 / A230) değerleri ölçülmüş, DNA miktarı ve saflığı hesaplanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan *Myodes glareolus*'un DNA miktarı ve saflık ölçümü

Müze No	Lokalite	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/µl)	260/280	260/230
3711	Uludağ-Bursa	341	2,29	0,75
4988	Kandıra-Kocaeli	303,5	1,75	0,97
4989	Kandıra- Kocaeli	561,2	2,32	0,94
4990	Kandıra- Kocaeli	636,5	2,43	0,82
4994	Şile-İstanbul	399,4	1,74	1,09
4995	Şile-İstanbul	519	2,57	0,73
5004	Küre-Kastamonu	258,3	1,77	1,12
5010	Abant-Bolu	455,3	1,81	1,33
5011	Abant-Bolu	316,1	1,85	1
5016	Akçakoca-Düzce	135,7	2,24	0,54
5019	Akçakoca-Düzce	168,2	1,65	0,78
5054	Sümela-Trabzon	605,2	1,77	1,15
5055	Büyük-Sinop	582,8	2,16	1,04
5056	Göktepe-Sinop	440,1	1,78	1,05
5057	Gürgentepe-Ordu	458,5	2,07	1
5066	Sümela-Trabzon	1151,3	2,08	2,22
5073	Göktepe-Sinop	318,5	1,8	1,17
5092	Ulubey-Ordu	242,4	1,98	0,86
5168	Kızılcahamam-Soğuksu	318,5	1,72	0,88
5236	Zonguldak	336	1,78	1,06
5237	Zonguldak	157,3	1,71	0,79
5310	Ünye-Ordu	372,7	1,95	1,04
5325	Bulancak-Kışla köyü-Giresun	348,9	1,74	0,96
5332	Çakallı-Samsun	401,4	1,68	0,88
5711	İkizdere-Rize	327,1	1,77	1,04
6404	Kartepe-Kocaeli	312,3	1,77	1,01
6405	Kartepe-Kocaeli	366,5	1,78	1
6409	Kartepe-Kocaeli	624,5	1,78	1,24
7569	Ilgaz-Çankırı	2658,3	1,99	2,08
7570	Ilgaz-Çankırı	4021,8	1,89	1,72
7571	Ilgaz-Çankırı	1576,2	1,94	1,85
7572	Ilgaz-Çankırı	643	1,98	1,96

3.3 PCR Çalışmaları

PCR için kullanılan bileşenler mikropipet yardımıyla 1,5'luk ependorf tüpte birleştirilerek negatif kontrol ve örnek sayısı kadar karışım (PCR mix) hazırlanmıştır (Çizelge 3.5). Bu karışım vorteks cihazında birkaç saniye döndürülmüştür. Her bir müze numarası yazılmış PCR tüpüne bu karışımdan 24 µl konmuştur. Üzerine müze numaralarına dikkat edilerek her örneğin izole edilmiş kalıp DNA'sından 1 µl konup pipetaj yapılarak PCR'a hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.5 *COI* ve *Cytb* Gen Bölgeleri için kullanılan PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları

Bileşenler	Konsantrasyon	Hacim
Steril distile su (dH ₂ O)	-	13 µl
Deoksinükleosid trifosfat (dNTP)	0,2 mM	4 µl
Tampon çözelti	750mM Tris-HCl ph:8.8, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂	2 mM	2 µl
Forward Primeri	20 pmol	1 µl
Reverse Primeri	20 pmol	1 µl
<i>Taq</i> Polimeraz Enzimi	1,5 u	0,5 µl
DNA	80 ng	
Toplam Hacim		25 µl

Çalışmada kullanılacak dNTP'lerin hazırlanmasında bir ependorf tüp alınarak içerisine 12,5 µl dATP, 12,5 µl dGTP, 12,5 µl dCTP ve 12,5 µl dTTP eklenmiş ve üzerine 950 ml steril su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu karışım vortekslenerek çalışmalarda kullanmaya hazır hale getirilmiştir.

Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (*COI*) ve Sitokrom b (*Cytb*) gen bölgeleri, literatürde yer alan evrensel primerler (Çizelge 3.6) ile bunlara uygun PCR döngü şartları (Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8) kullanılarak termal döngü cihazlarıyla çoğaltılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 PCR cihazları (Termal Döngü Cihazları)

COI gen bölgesinin çoğaltılabilmesi için Folmer vd. (1994) tarafından hayvanlar için geliştirilen ve yaklaşık 700bp uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltan evrensel primerler (LCO1490 ve HCO2198) kullanılmıştır. *Cytb* gen bölgesinin çoğaltılabilmesi için ise Irwin vd. (1991) tarafından geliştirilen ve 1200bp uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltan evrensel primerler (L14724 ve H15915) kullanılmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 *COI* ve *Cytb* için Kullanılan Primerler

Primer	Gen Bölgesi	Primere Ait Baz Dizisi	Referans
Forward	LCO1490	(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')	Folmer vd. 1994
Reverse	HCO2198		
Forward	L14724	(5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3')	Irwin vd. 1991
Reverse	H15915		

Çizelge 3.7 Sitokrom c Oksidaz Alt ünite I(*COI*) gen bölgesi için optimum PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	96°C	1 dakika	1
Denatürasyon	94°C	1 dakika	35
Bağlanma	55°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1,30 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

Çizelge 3.8 Sitokrom b (*Cytb*) gen bölgesi için optimum PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	94°C	1 dakika	34
Bağlanma	46°C	1 dakika	
Uzama	65°C	1,30 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

3.4 Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları

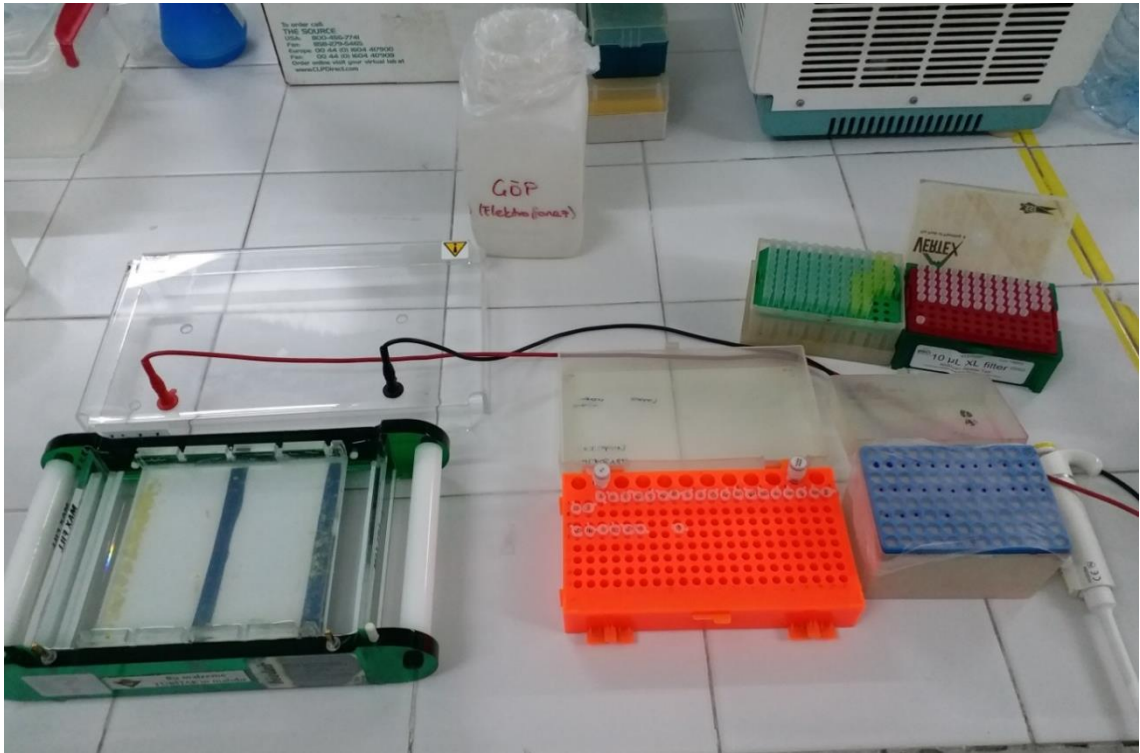
PCR sonucunda elde edilen DNA'ların çoğalıp çoğalmadığını görüntülemek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlamak için TBE (Tris-Borik asit- EDTA) tampon kullanılmıştır. Bunun için 5 X TBE stoktan 1 X TBE seyreltilerek % 1,2 lik agaroz jel hazırlanmıştır (Şekil 3.5).

% 1,2 lik agaroz jel hazırlamak için 150 ml'lik erlenmayer alınmış ve 1.8 gr agaroz hassas terazide tartılarak içerisine dökülmüştür. Mezür ile 150 ml 1X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) ölçülerek erlen içerisindeki agarozun üzerine eklenmiştir. Bu karışım çalkalanarak mikrodalga fırına yerleştirilmiştir. Çözelti, içerisinde partikül kalmayıp berrak ve homojen bir hal alana kadar mikrodalgada bekletilmiştir. Homojen hale gelen jel, erlenin dairesel hareketlerle hafifçe çevrilmesi yoluyla 5-10 dk soğutulmuştur. Elektroforez işlemi için, elektroforez tankının kasetine uygun mesafede olacak şekilde taraklar yerleştirilmiş ve açıkta kalan kenarları 3 kat bantlanıp köpük içerisinde sıkıştırılmıştır. Kasetin bir köşesinden elle tutulabilecek hale gelen jel, kabarcık oluşturulmamasına dikkat edilerek yavaşça dökülmüştür. Sızma olup olmadığı kontrol edilmiş ve 30 dk sonra oda sıcaklığında donan jelden, taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.



Şekil 3.5 Jel tepsisine dökülecek sıvı haldeki agaroz jel

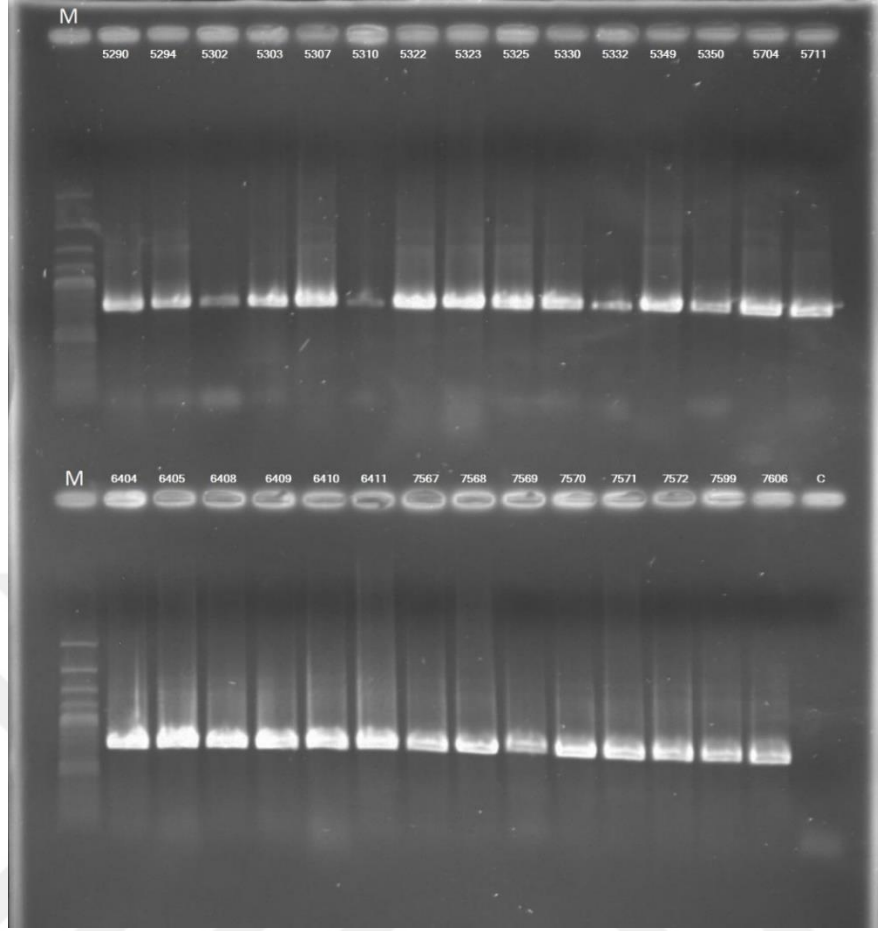
Hazırlanan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildikten sonra maksimum seviyesine kadar 1X TBE konmuş ve jeldeki her bir kuyuya 1:1 oranında, yükleme boyası (loading dye) ve PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Ayrıca çoğaltılan PCR ürünlerinin büyüklüklerini görebilmek için her agaroz jelin ilk sırasına 50bp DNA Ladder (belirteç, marker) yüklenmiştir. PCR ürünlerinde kontaminasyon olup olmadığını değerlendirebilmek adına her PCR karışımı için 1 adet DNA içermeyen negatif kontrol örneği kullanılmış ve her jelin son kuyusuna bu örnek yüklenmiştir. Agaroz jel elektroforezi, 100 voltta 1 saat boyunca sürdürülmüştür (Şekil 3.6).



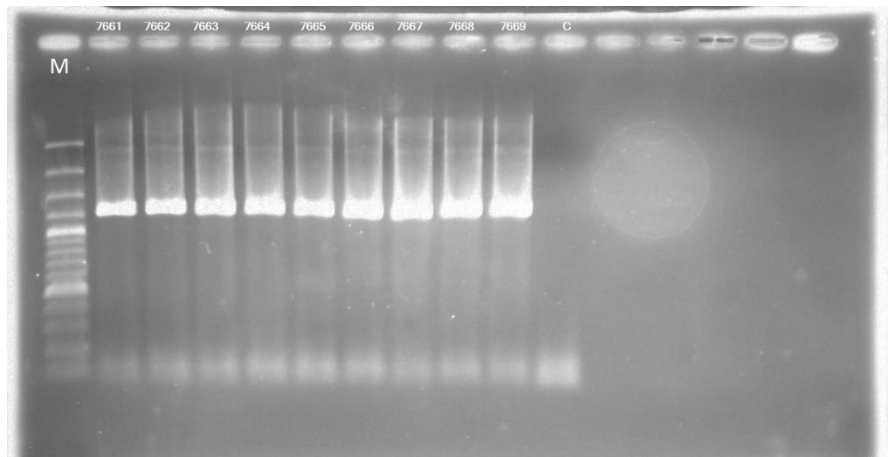
Şekil 3.6 PCR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara yüklenmesi

3.5 Agaroz Jel Görüntüleme

Elektroforez işleminin ardından tanktan çıkarılan agaroz jel, etidyum bromür (EtBr) ile hazırlanan boyama solusyonunda 10-15 dakika bekletilmiştir. Agaroz jeldeki PCR ürünlerine ait bantlar UV ışık altında farklı yoğunluklarda (0,75/1,00/1,25) fotoğraflanarak kaydedilmiştir (KODAK Jel Görüntüleme Sistemi). COI ve Cytb gen bölgelerinin agaroz jel görüntülerine ait örnekler Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de verilmiştir.



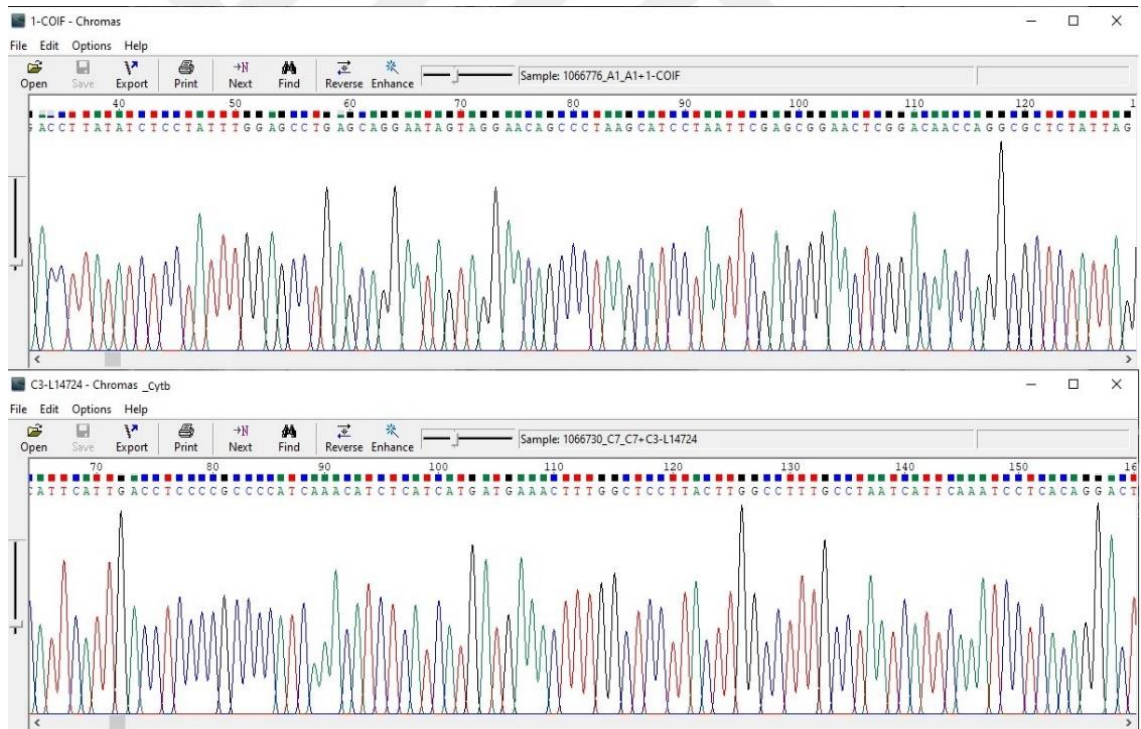
Şekil 3.7 Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I gen bölgesine ait agaroz jel görüntüsü (M: Markır, belirteç; C: Kontrol)



Şekil 3.8 Sitokrom b gen bölgesine ait jel görüntüsü (M: Markır, belirteç; C: Kontrol)

3.6 DNA Dizi Analizi Çalışmaları

Çoğaltılan Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (*COI*) ve Sitokrom b (*Cytb*) gen bölgelerinin dizi analizi hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır. Her bir gen bölgesine ait PCR ürünü, dizilerin kontrollü ve hatasız değerlendirilebilmesi için hem ileri (forward) hem de geri (reverse) olmak üzere iki yönlü okutulmuştur. Otomatik dizi makinesi ile zincir durdurma metodu olarak bilinen Sanger yöntemi kullanılarak DNA dizileri belirlenmiştir. Bu metoda göre her bir DNA nükleotidi farklı floresan boya (Big Dye Mix) ile boyanmış ve DNA parçaları kolondan geçtikten sonra lazer ışığı yardımı ile DNA bazlarının dizisi tespit edilmiştir. Dizi analizi sonucunda; 110 kromatogram dosyası (74 *COI* / 36 *Cytb*) elimize ulaşmıştır (Şekil 3.9). Bu kromatogram dosyaları CHROMAS Lite 2.6.4 (www.technelysium.com.au) ile görselleştirilmiştir.



Şekil 3.9 Dizi analizi sonucu kromatogram dosyası

3.7 İstatistiksel Analizler

M. glareolus'un *COI* ve *Cytb* gen bölgesine ait diziler ve literatürde yer alan *Myodes* cinsine ait diğer türlerin aynı gen bölgelerine ait dizileri arasındaki nükleotid farklılıkları karşılaştırılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Örneklere ait diziler, BioEdit (ver.7.2.5) (Hall 1999) programı ile hizalanmış ve kötü okuma yapılan baş ve son bölgelerinden budanmıştır. DnaSP (ver.6.12.03) (Rozas vd. 2017) programı ile her bir gen bölgesine ait haplotipler belirlenmiştir. Örnekler arasındaki filogenetik ilişkileri belirleyebilmek için Maksimum likelihood (ML) ve Bayesian çıkarımı (BI) yaklaşımlarıyla her gen bölgesine ait ayrı ve birleştirilmiş veri setinde filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. ML ve BI yaklaşımlarıyla filogenetik ağaçları oluşturabilmek için öncelikle her bir gen bölgesine ait en uygun nükleotid değişim modeli Modeltest (ver. 3.7) (Posada ve Crandall 1998) ile belirlenmiştir. BIC (Bayesian information criterion) yaklaşımıyla belirlenen en uygun nükleotid değişim modeli kullanılarak, MEGAX (Kumar vd. 2018) programı ile ML ağacı, MrBayes (ver.3.1.2) (Huelsenbeck ve Ronquist 2001) programı ile de Bayesian ağacı oluşturulmuştur. ML ağacının güvenilirliğini belirlemek için analiz 1000 bootstrap tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Bayesian ağacının $P < 0,01$ anlamlılık derecesine ulaşması için, *COI* gen bölgesi 2 milyon, *Cytb* gen bölgesi ise 5 milyon tekrarlı gerçekleştirilmiş olup ilk %25 tekrar atılmıştır (burn-in). Haplotipler arasındaki bağlantı ilişkilerini ortaya koymak için Network (ver. 10.1.0) (Bandelt vd. 1999) programı ile Median-Joining ağacı oluşturulmuştur. Filogenetik ve Median-Joining ağaçlarında ortaya çıkan gruplar arasındaki genetik farklılaşma miktarı Kimura-2 parametresi ile MEGA X programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu grupların nükleotid çeşitliliği (π), haplotip çeşitliliği (h) ve büyüme-düşüş yöntemi altında demografik geçmiş (mismatch dağılımı) hesaplamaları DnaSP (ver.6.12.03) (Rozas vd. 2017) programı ile gerçekleştirilmiştir. Arlequin (ver.3.5.2.2) (Excoffier ve Lischer 2010) programı ise çalışılan gruplar için populasyon genişlemesi ve darboğazı hakkında bilgi veren Tajima'nın D (Tajima 1989) ve Fu'nun F_s (Fu 1997) yaklaşımlarıyla hesaplanan tarafsızlık analizlerini (neutrality) gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Populasyonun en son genişleme zamanından itibaren geçen süreyi

belirlemek için DnaSP programıyla hesaplanan τ (Tau) parametresi kullanılmıştır. Çalışılan her iki gen bölgesine göre ortaya çıkan grupların en son populasyon genişlemesi yaşadığı zamandan itibaren geçen süre (T), “ $T = \tau / 2u$ ” formülü kullanılarak tahmin edilmiştir. Bu eşitlikte τ , DnaSP kullanılarak tahmin edilen genişlemeden bu yana geçen süreye orantılı istatistiksel bir değerdir ve u , tüm haplotip için nesil başına mutasyon oranıdır (Rogers ve Harpending 1992). “ u ” değeri ise 1 milyon yıl içinde gen bölgesinde gerçekleşen nükleotid değişimi (μ) (substitutions/site/My) ve çalışılan haplotipin dizi uzunluğu (k) değerleriyle hesaplanır. Bu eşitlikler kullanılarak “ $T = \tau / 2\mu k$ ” formülüyle populasyon genişlemesinden yana geçen süre milyon yıl olarak hesaplanmıştır. Ho vd. (2005), özellikle son 2 milyon yıldan daha az sürede farklılaşma gösterdiği düşünülen (örneğin tür içi varyasyonların araştırıldığı durumlarda) moleküler tarihlleme için mutasyon oranlarının kullanılmasının daha uygun olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda Türkiye’deki *M. glareolus* populasyonlarının Pleistosen döneminde geçirdikleri genişleme zamanlarını hesaplamak için literatürde yer alan 0,11, 0,047 ve 0,028 substitutions/site/My (Suzuki vd. 2015, Hanazaki vd. 2017, Honda vd. 2019) olmak üzere üç farklı mutasyon oranı kullanılmıştır.

3.8 Moleküler tarihlleme analizi

En yakın ortak atadan ayrılma zamanı (TMRCA) ve %95 en yüksek posterior yoğunluk (HPD) değerleri, Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I ve Sitokrom b gen bölgelerinin birleştirilmesiyle BEAST (ver. 1.8.4) (Drummond ve Rambaut 2007) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

BEAUTi programıyla, evrimsel tarihlleme hesaplamaları için model parametreleri oluşturulmuştur. Sonuç olarak, mtDNA verisi için 0,03 substitutions/site/My mutasyon oranıyla “strict clock” modellenli Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) temelli filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir (Hanazaki vd. 2017). Bayesian tabanlı MCMC tarama yöntemi 10 milyon zincir üzerinden gerçekleştirilmiş ve ağaçlar her 1.000 zincirde bir örneklenerek toplamda 10.000

ağaç elde edilmiştir. Tracer (ver. 1.7.1) (Rambaut vd. 2013) programı ile etkili örneklem büyüklüğüne (ESS) bakılmıştır. Analiz sonucunda ESS değerlerinin 200'ün üstünde olduğu görülmüştür. Örneklenen 10000 ağaçtan 1000 tanesi (%10) ön deneme olarak analizden atılmış (burn-in) ve geriye kalan 9000 ağaç, *M. glareolus*'un evrimsel ayrılma zamanlarını ortaya koyan consensus ağacının oluşturulmasında ve ardıl olasılık değerlerinin (BPP-bayesian posterior probabilities) hesaplanmasında kullanılmıştır. Bayesian MCMC filogenetik ağacı, FigTree (ver. 1.4.4) (Rambaut 2012) programı kullanılarak görselleştirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (COI) Gen Bölgesine Ait Bulgular

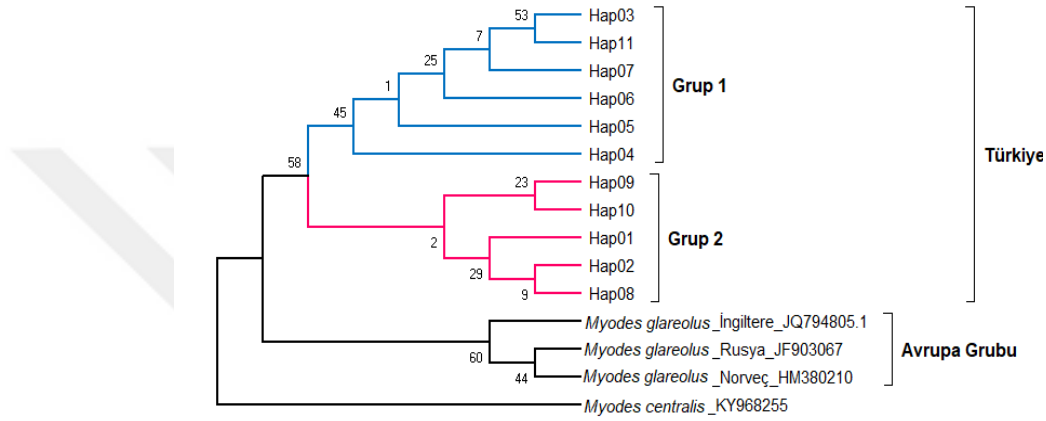
Bu tez çalışmasında COI gen bölgesi için Türkiye'nin 23 farklı lokalitesinden toplanan toplam 63 *Myodes glareolus* örneği ile GenBank'tan elde edilen 3 *M. glareolus* örneği analizlerde kullanılmıştır (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Bunun yanında *Myodes centralis* (KY968255) dış grup olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada dizi analizi yapılan 63 Türkiye örneğinden hizalama ve budama işlemleri sonrasında COI gen bölgesine ait 716 baz çifti (bp) uzunluğundaki bölge analizlerde kullanılmaya uygun görülmüştür.

Analizlerde kullanılan 63 *M. glareolus* Türkiye örneğinden toplam 11 haplotip elde edilmiştir. Tüm COI haplotiplerine ait haplotip numaraları, haplotiplere ait örnek sayı ve lokaliteleri Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

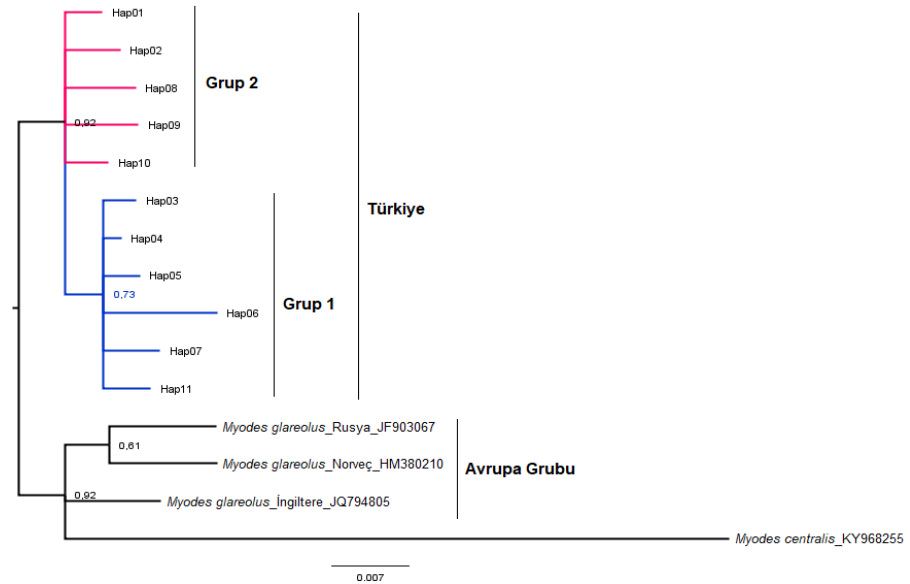
Çizelge 4.1 *Myodes glareolus*'un COI gen bölgesine ait haplotipleri

Haplotip No	Örnek sayısı	Örnek Numara ve Lokalite
Hap01	22	1_Uludağ, 4_Uludağ, 9_Kandıra, 46_Sümela, 47_Sümela, 51_Ulubey, 57_Sümela, 70_Ulubey, 86_Barça, 88_Bicik, 90_Ünye, 91_Ünye, 96_Çakallı, 115_Bursa, 116_Bursa, 117_Bursa, 118_Bursa, 119_Bursa, 120_Bursa, 121_Bursa, 123_Bursa, 124_Bursa
Hap02	1	2_Uludağ
Hap03	7	3_Çaycuma, 23_Küre, 31_Abant, 44_Küre, 60_Göktepe, 76_Bürnük, 84_Zonguldak
Hap04	21	8_Kandıra, 10_Kandıra, 14_Şile, 17_Şile, 29_Abant, 30_Abant, 35_Akçakoca, 36_Akçakoca, 37_Akçakoca, 48_Bürnük, 61_Göktepe, 79_Kızılcahamam, 81_Zonguldak, 82_Zonguldak, 83_Zonguldak, 102_Kartepe, 104_Kartepe, 109_Ilgaz, 110_Ilgaz, 111_Ilgaz, 112_Ilgaz
Hap05	2	15_Şile, 18_Şile
Hap06	1	24_Küre
Hap07	3	33_Abant, 49_Göktepe, 62_Göktepe
Hap08	3	50_Gürgentepe, 52_Gürgentepe, 98_Barça
Hap09	1	94_Bulancak
Hap10	1	100_İkizdere
Hap11	1	101_Kartepe

COI gen bölgesine ait dizilerden elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koyabilmek için maksimum likelihood (ML) ve Bayesian ağaçları oluşturulmuştur. HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma) nükleotid değişim modeli BIC yaklaşımına göre filogenetik ağaçları oluşturmak için kullanılması gereken en uygun model olarak seçilmiştir. Her iki yaklaşımla oluşturulan filogenetik ağaçlara ait sonuçlar birbirini desteklemiş ve bu ağaçlarda *M. glareolus*'un Türkiye örneklerinin iki gruba ayrıldığı ortaya konmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



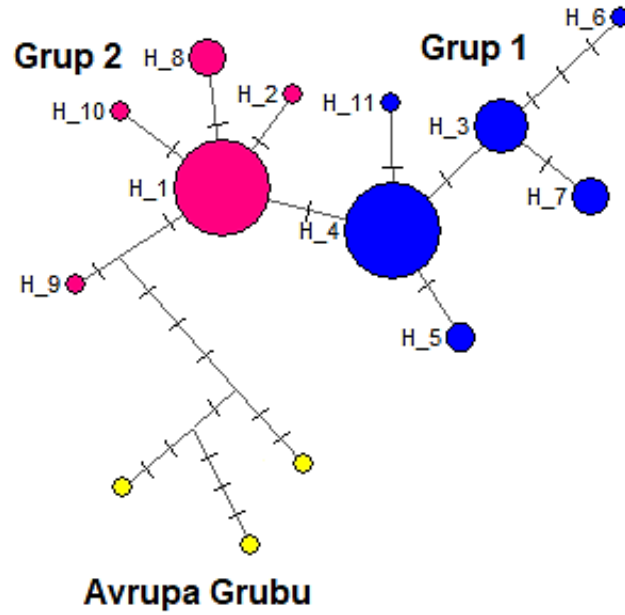
Şekil 4.1 *COI* gen bölgesine ait Maksimum Likelihood (ML) ağacı. Her bir dal üzerindeki sayısal değerler Bootstrap yüzdelerini ifade etmektedir.



Şekil 4.2 Bayesian MCMC yöntemi ile oluşturulan, *COI* gen bölgesine ait filogenetik ağaç (BPP-Bayesian posterior probability değerleri her dal için gösterilmektedir)

Filogenetik ağaçlarda Grup 1 olarak adlandırdığımız klad; Şile, Kandıra, Kartepe, Akçakoca, Abant, Zonguldak, Çaycuma, Kızılcahamam, Ilgaz, Küre, Bürnük ve Göktepe örneklerini içerirken; Grup 2 olarak adlandırdığımız klad ise Bursa, Uludağ, Çakallı, Ünye, Gürgentepe, Ulubey, Bulancak, Bicik, Barça, Sümela ve İkizdere örneklerinden oluşmaktadır. *COI* gen bölgesine ait dizilere göre ortaya çıkan bu iki grup arasındaki farklılaşma her iki filogenetik ağaç ile yüksek güvenilirlikle desteklenmiştir (ML: %58, BI: 0.92).

Median-Joining ilişki ağı, filogenetik ağaçlarda ortaya çıkan bu iki *M. glareolus* grubunun haplotipleri arasındaki bağlantı ilişkilerini ortaya koymuştur (Şekil 4.3). Median-Joining ilişki ağı, Türkiye'deki *M. glareolus*'a ait bu iki grubun az sayıda mutasyonla birbirinden farklılaştığını ve Avrupa örneklerinin ise Grup 2 ile yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.3 *M. glareolus*'a ait *COI* dizilerinden elde edilen Median-Joining ilişki ağı. Haplotipler arasındaki mutasyon sayısı çizgilerle ifade edilmiştir. Daire büyüklüğü haplotiplerin içerdiği örnek sayısıyla orantılıdır.

Grup 1, *M. glareolus*'un Türkiye popülasyonu içindeki en yüksek haplotip çeşitliliğine sahiptir ($h = 0,943$). Nükleotid çeşitliliği her iki grupta çok yakın bulunmuştur. Her iki grup beraber değerlendirildiğinde Türkiye popülasyonuna ait nükleotid çeşitliliği 0,004 olarak hesaplanmıştır. Tüm haplotip ve nükleotid çeşitliliğine ait bilgiler Çizelge 4.2'de her grup için ayrı ayrı gösterilmektedir.

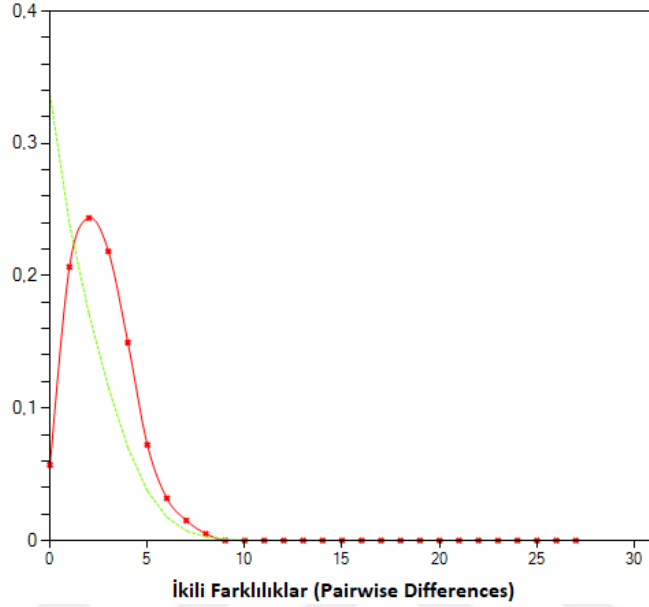
Çizelge 4.2 *M. glareolus*'un filogenetik analizlerde tanımlanan gruplarına ve Türkiye popülasyonuna ait genetik çeşitlilik ve tarafsızlık (neutrality) analizleri

Parametre	cytb			COI		
	Grup 1	Grup 2	Türkiye	Grup 1	Grup 2	Türkiye
Örnek sayısı	36	27	63	35	28	63
Haplotip sayısı	22	13	35	6	5	11
Haplotip çeşitliliği (h)	0,962	0,906	0,971	0,943	0,929	0,969
Nükleotid çeşitliliği (π)	0,0033	0,0031	0,004	0,0037	0,0035	0,004
Tajima'nın D 'si	-1,81*	-1,54	-1,82*	-0,71	-0,99	-0,98
Fu'nun F_s 'si	-15,86**	-4,57	-25,7**	-16,9**	-10,2**	-26,14**

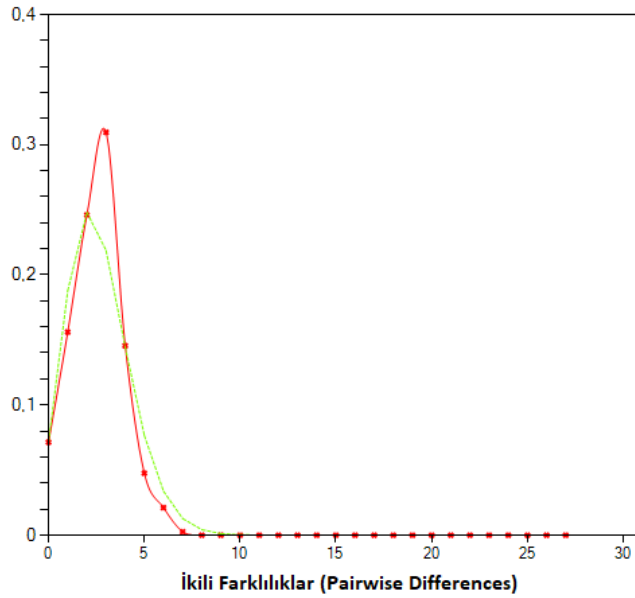
*Anlamlılık derecesi: $P < 0,05$. **Anlamlılık derecesi: $P < 0,01$.

Bu analizlerle beraber *COI* gen bölgesine ait diziler kullanılarak, her bir filogenetik grubun ve tüm Türkiye popülasyonunun darboğazda ya da seçilimin etkisinde olup olmadığını ortaya koymak için Tajima'nın D ve Fu'nun F_s yaklaşımlarıyla hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Buna göre Tajima'nın D yaklaşımıyla gerçekleştirilen hesaplamalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0,05$). Tersine *COI* gen bölgesi kullanılarak hesaplanan Fu'nun F_s değerleri her iki Türkiye grubu için anlamlı derecede negatif bulunmuştur. Popülasyonun demografik yapısını ortaya koymak için gerçekleştirilen bir diğer analiz ise popülasyon büyümesi-düşüşü modeli altında gerçekleştirilen uyumsuzluk dağılımı grafikleridir. Şekil 4.4'te, Şekil 4.5'de ve Şekil 4.6'da her bir filogenetik grup ve *M. glareolus*'un Türkiye popülasyonu için

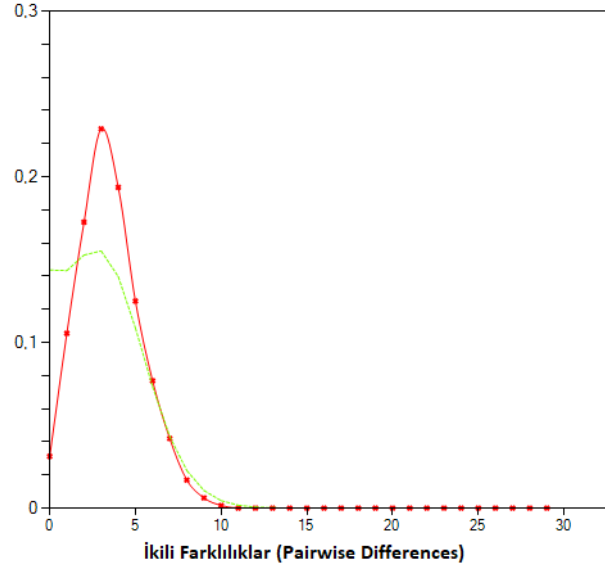
gerçekleştirilen uyumsuzluk dağılımı analizine ait grafikler sunulmuştur. Buna göre uyumsuzluk dağılımı analizleri, her iki *M. glareolus* grubunun ve tüm Türkiye popülasyonunun hızlı bir ani dağılıma maruz kaldığını ortaya koyan tek modellen kalıplar oluşturmuştur.



Şekil 4.4 Grup 1 popülasyonunun *COI* gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği (kırmızı çizgi: gözlenen frekans, yeşil çizgi: beklenen frekans)



Şekil 4.5 *M.* Grup 2 popülasyonunun *COI* gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği (kırmızı çizgi: gözlenen frekans, yeşil çizgi: beklenen frekans)



Şekil 4.6 Türkiye populasyonunun *COI* gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği (kırmızı çizgi: gözlenen frekans, yeşil çizgi: beklenen frekans)

Çalışılan grupların son genişleme zamanını ortaya koyabilmek için elde edilen τ değeri *COI* gen bölgesi için hesaplanan iki grupta 6,126 (Grup 1) ve 6,350 (Grup 2) olarak bulunmuştur. Bu da son genişlemeden bu yana geçen sürelerin yaklaşık 40.000, 90.000 ve 150.000 yıl olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Türkiye'deki *Myodes glareolus* grupları için üç potansiyel evrimsel oranla hesaplanan genişleme süresi tahminleri

			Populasyonların genişleme		
			zamanı (My)*		
			0,028	0,047	0,11
<i>COI</i>					
Sitokrom b	Grup 1	6,126	0,152	0,091	0,038
	Grup 2	6,35	0,158	0,094	0,04
	Grup 1	3,237	0,052	0,030	0,013
	Grup 2	3,213	0,051	0,030	0,013

* Populasyonların genişleme zamanları literatürde belirtilen üç farklı evrimsel oranla hesaplanmıştır. Bu evrimsel oranlar 1 milyon yılda görülen mutasyonun oranıdır (substitutions/site/My).

M. glareolus'un Türkiye'de yayılış gösteren grupları arasındaki ve Türkiye popülasyonu ile Avrupa popülasyonu arasındaki Kimura-2 parametresi (K2P) yaklaşımıyla elde edilen genetik farklılaşma değerleri Çizelge 4.4'de gösterilmektedir. Buna göre *COI* dizileri değerlendirildiğinde, *M. glareolus*'un Türkiye grupları arasındaki genetik farklılaşma değeri çok düşük olmakla beraber (%K2P=0,6) Türkiye ve Avrupa popülasyonu arasındaki genetik farklılaşma değeri nispeten yüksek bulunmuştur (%K2P=1,7).

Çizelge 4.4 *Myodes glareolus* grupları arasındaki K2P genetik mesafe değerleri (%)

Gruplar	<i>cytb</i>	<i>COI</i>
Grup 1-Grup 2	0,6	0,6
Türkiye-Avrupa Grubu	1,2	1,7
Türkiye-Balkan Grubu	1	-

4.2 Sitokrom b (Cytb) Gen Bölgesine Ait Bulgular

PCR ve DNA dizi analizi ilk defa bu tez çalışmasında gerçekleştirilen 29 *Myodes glareolus* örneği ile GenBank'ta kayıtlı ve hâlihazırda elde bulunan 34 *M. glareolus* dizisi analizlerde kullanılmıştır (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Bunun yanında *M. glareolus*'a ait 8 Balkan ve Avrupa örneğinin GenBank'ta kayıtlı dizileri de çalışmada değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2). *Cytb* bölgesinin filogenetik analizlerinde *Myodes centralis* (KY968281) dış grup olarak kullanılmıştır.

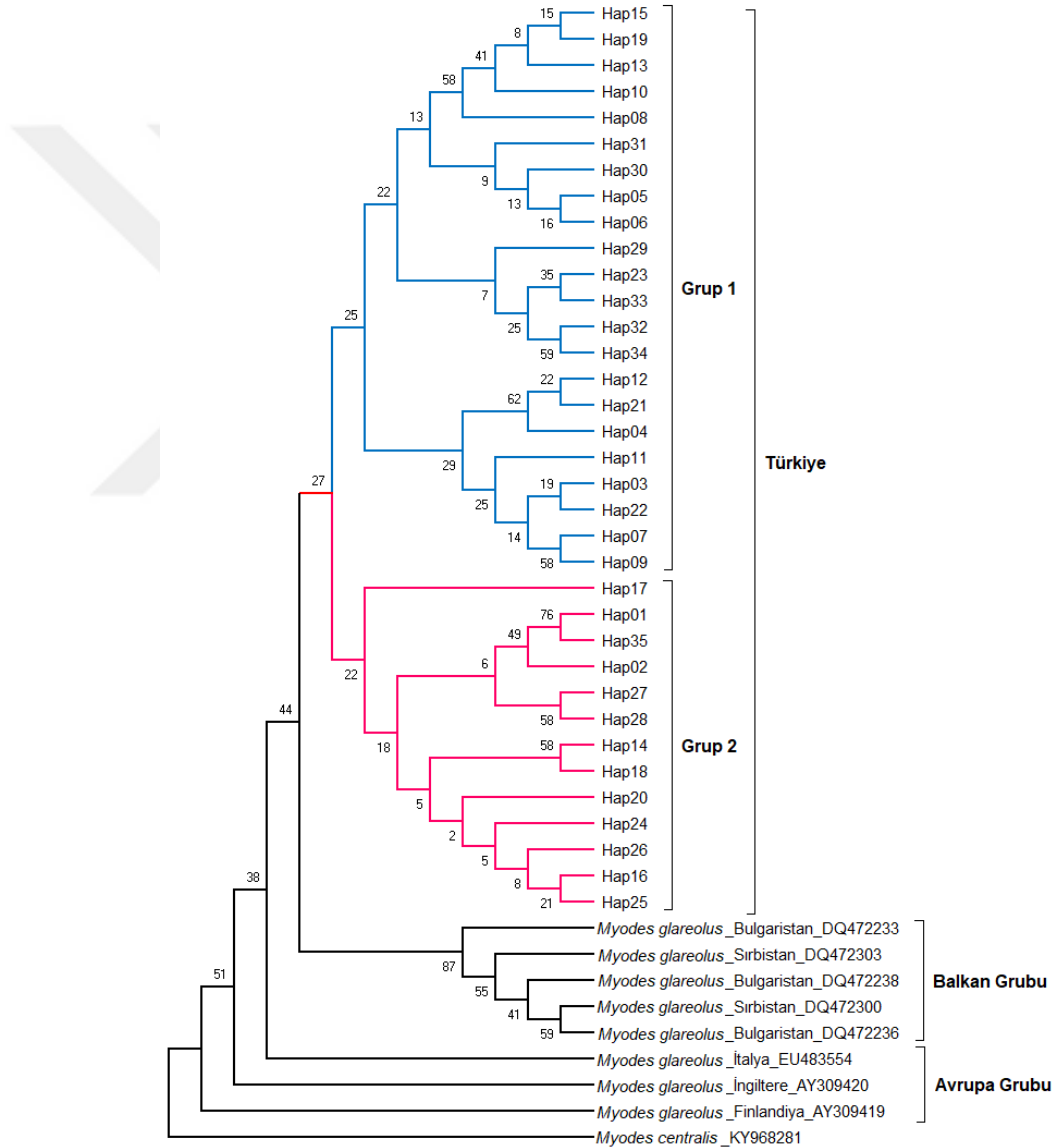
Çalışmada dizi analizi yapılan 29 Türkiye örneğinden hizalama ve budama işlemleri sonrasında *Cytb* gen bölgesine ait 1111 baz çifti (bp) uzunluğundaki bölge, analizlerde kullanılmaya uygun görülmüştür.

Analizlerde kullanılan *M. glareolus*'un toplam 63 Türkiye örneğinden 35 haplotip elde edilmiştir. Tüm *Cytb* haplotiplerine ait haplotip numaraları, haplotiplere ait örnek sayısı ve lokaliteleri Çizelge 4.5'de gösterilmektedir.

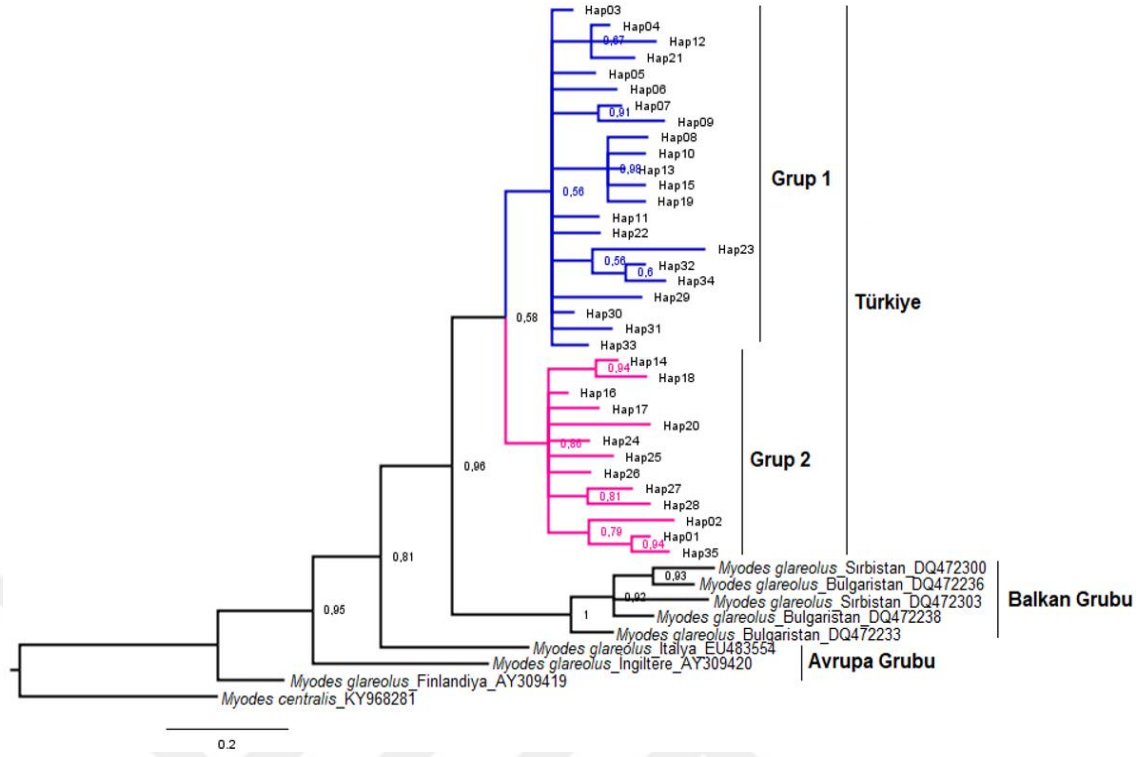
Çizelge 4.5 *Myodes glareolus*'un *Cytb* gen bölgesine ait haplotipleri

Haplotip No	Örnek sayısı	Örnek Numara ve Lokalite
Hap01	5	KM508997_Uludağ, KM508997_Uludağ, 116_Bursa 119_Bursa 121_Bursa
Hap02	6	KM508998_Uludağ, 115_Bursa, 117_Bursa, 118_Bursa, 120_Bursa, 124_Bursa
Hap03	4	3_Çaycuma, 17_Şile, 84_Zonguldak, KM509000_Kartepe
Hap04	4	KM508989_Kandıra, KM508989_Şile, 18_Şile, KM508989_Zonguldak
Hap05	1	KM508991_Kandıra
Hap06	1	KM508992_Kandıra
Hap07	2	KM508990_Şile, KM508990_Akçakoca
Hap08	3	KM509005_Küre, KM508996_Küre, KM508996_Abant
Hap09	2	KM508995_Abant, KM508995_Abant
Hap10	1	33_Abant
Hap11	1	KM508993_Akçakoca
Hap12	1	KM508994_Akçakoca
Hap13	4	44_Küre, KM509007_Göktepe, KM509007_Göktepe, 61_Göktepe
Hap14	2	KM509014_Sümela, KM509014_Sümela
Hap15	2	KM509006_Bürnük, 76_Bürnük
Hap16	4	KM509010_Gürgentepe, KM509010_Ulubey, 86_Barça, 90_Ünye
Hap17	1	52_Gürgentepe
Hap18	1	57_Sümela
Hap19	1	62_Göktepe
Hap20	1	70_Ulubey
Hap21	1	KM509003_Kızılcahamam
Hap22	1	KM508999_Zonguldak
Hap23	1	82_Zonguldak
Hap24	2	KM509012_Bicik, KM509012_Bulancak
Hap25	1	KM509011_Ünye
Hap26	1	KM509009_Çakallı
Hap27	1	KM509013_Barça
Hap28	1	100_İkizdere
Hap29	1	KM509001_Kartepe
Hap30	1	KM509002_Kartepe
Hap31	1	109_Ilgaz
Hap32	1	110_Ilgaz
Hap33	1	111_Ilgaz
Hap34	1	112_Ilgaz
Hap35	1	123_Bursa

Cytb gen bölgesine ait dizilerden elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koyabilmek için maksimum likelihood (ML) ve Bayesian ağaçları oluşturulmuştur. HKY+I+G (Hasegawa-Kishino-Yano + Invariable-Gamma) nükleotid değişim modeli BIC yaklaşımına göre filogenetik ağaçları oluşturmak için kullanılması gereken en uygun model olarak seçilmiştir. Her iki yaklaşımla oluşturulan filogenetik ağaçlara ait sonuçlar birbirini desteklemiş ve bu ağaçlarda *M. glareolus*'un Türkiye örneklerinin iki gruba ayrıldığı ortaya konmuştur (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



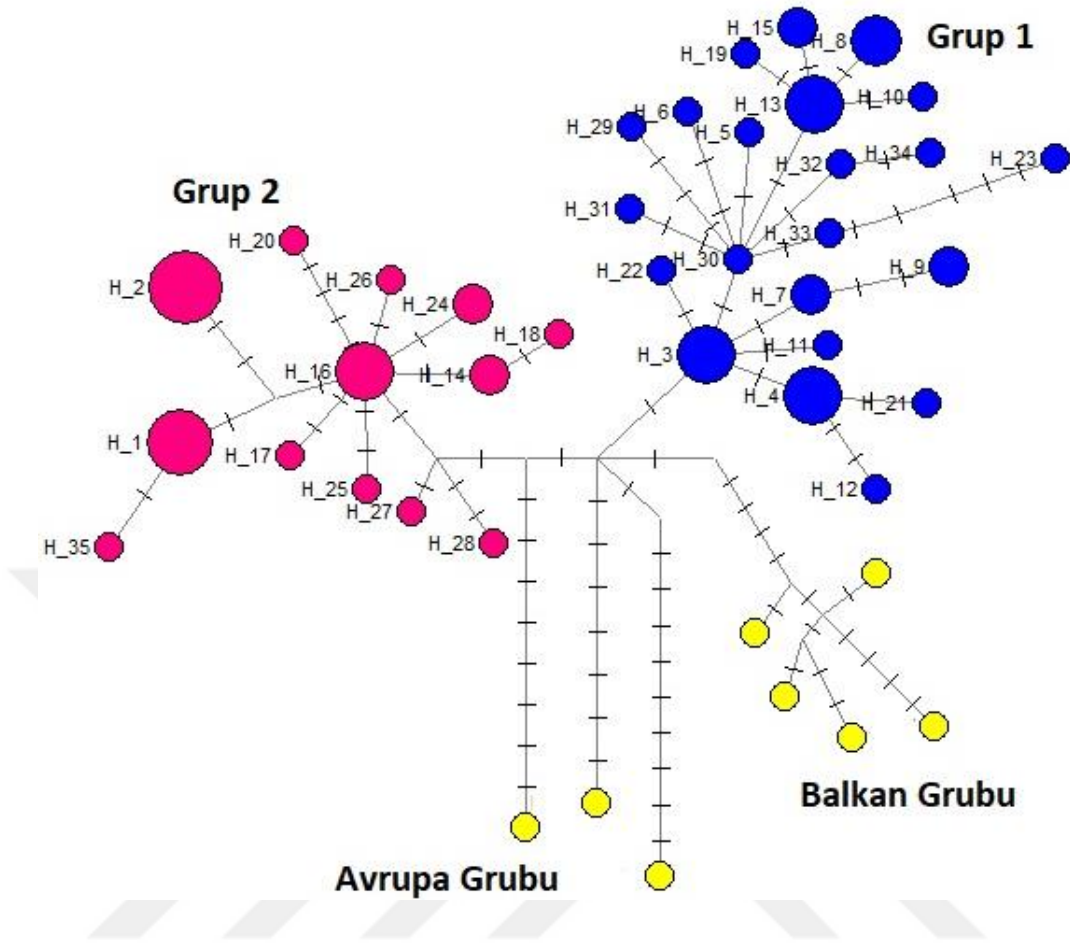
Şekil 4.7 Cytb gen bölgesine ait Maksimum Likelihood (ML) ağacı. Her bir dal üzerindeki sayısal değerler Bootstrap yüzdelelerini ifade etmektedir.



Şekil 4.8 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, Cytb gen bölgesine ait filogenetik ağaç (BPP-Bayesian posterior probability değerleri her dal için gösterilmektedir)

Filogenetik ağaçlarda Grup 1 olarak adlandırdığımız klad; Şile, Kandıra, Kartepe, Akçakoca, Abant, Zonguldak, Çaycuma, Kızılcahamam, Ilgaz, Küre, Bürnük ve Göktepe örneklerini içerirken; Grup 2 olarak adlandırdığımız klad ise Bursa, Uludağ, Çakallı, Ünye, Gürgentepe, Ulubey, Bulancak, Bicik, Barça, Sümela ve İkizdere örneklerinden oluşmaktadır. Cytb gen bölgesine ait dizilere göre filogenetik ağaçlarda bu iki grup ortaya çıksa da gruplar arasındaki farklılaşma her iki filogenetik ağaç ile çok düşük güvenilirlikle desteklenmiştir (ML: %27, BI: 0,58).

Median-Joining ilişki ağı, filogenetik ağaçlarda ortaya çıkan bu iki *M. glareolus* grubunun haplotipleri arasındaki bağlantı ilişkilerini ortaya koymuştur (Şekil 4.9). Median-Joining ilişki ağı, Türkiye'deki *M. glareolus*'a ait bu iki grubun az sayıda mutasyonla birbirinden farklılaştığını ve hem Avrupa hem de Balkan örneklerinin her iki Türkiye grubuyla da yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

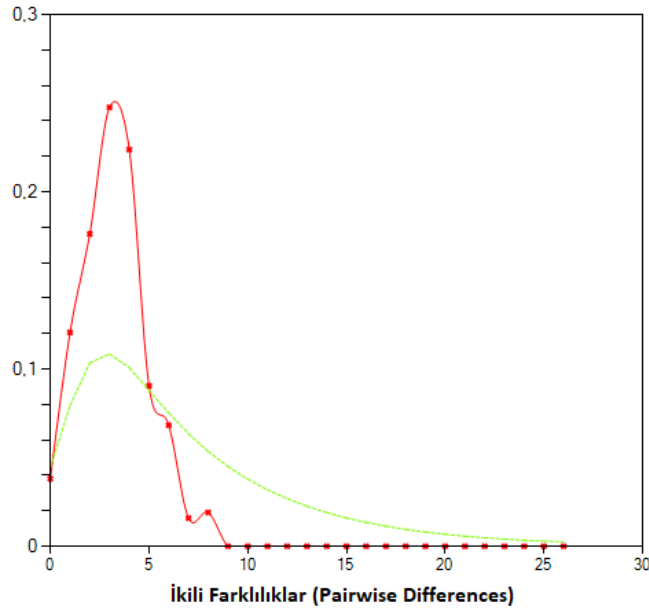


Şekil 4.9 *M. glareolus*'a ait Cytb dizilerinden elde edilen Median-Joining ilişki ağı. Haplotipler arasındaki mutasyon sayısı çizgilerle ifade edilmiştir. Daire büyüklüğü haplotiplerin içerdiği örnek sayısıyla orantılıdır.

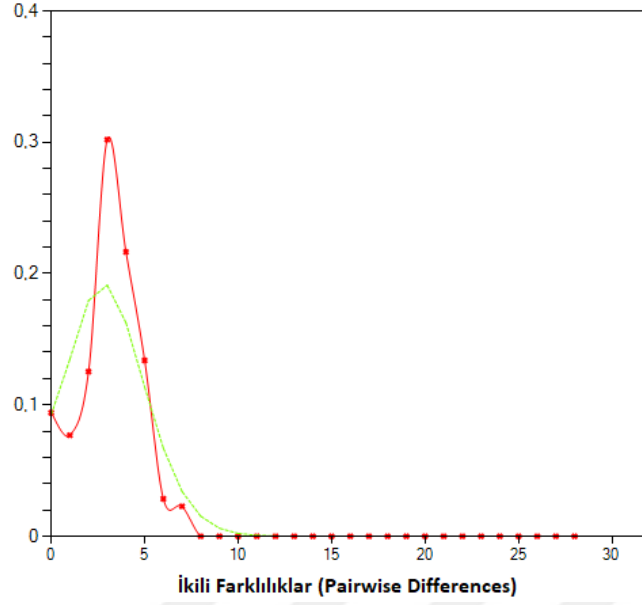
Cytb dizileri kullanılarak gerçekleştirilen polimorfizm hesaplamalarına göre, Grup 1'in, *M. glareolus*'un Türkiye popülasyonu içindeki en yüksek haplotip ve nükleotid çeşitliliğine sahip olduğu ortaya konmuştur ($h= 0,962$, $\pi= 0,0033$). Her iki grup beraber değerlendirildiğinde Türkiye popülasyonuna ait nükleotid çeşitliliği 0,004 olarak hesaplanmıştır. Tüm haplotip ve nükleotid çeşitliliğine ait bilgiler Çizelge 4.2'de her grup için ayrı ayrı gösterilmektedir.

Bu analizlerle beraber Cytb gen bölgesine ait diziler kullanılarak, her bir filogenetik grubun ve tüm Türkiye popülasyonunun darboğazda ya da seçilimin etkisinde olup

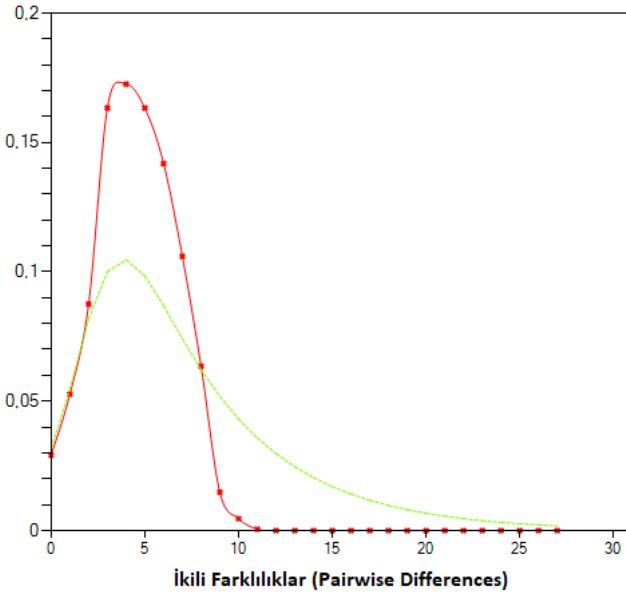
olmadığını ortaya koymak için Tajima'nın D ve F_u 'nın F_s yaklaşımlarıyla hesaplamalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Buna göre Grup 1 ve Türkiye populasyonlarına ait Tajima'nın D değeri bu populasyonlarda yakın dönemde aniden bir mutasyonun ortaya çıktığına işaret eden istatistiksel olarak anlamlı negatif bulunmuştur ($D=-1,81$, $P<0,05$). Grup 2 ise negatif çıksa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. F_u 'nın F_s yaklaşımına göre ise sitokrom b gen bölgesi için tüm populasyonlara ait hesaplamalar negatif olup, Grup 1 ve Türkiye populasyonu için bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,01$). Populasyonun demografik yapısını ortaya koymak için gerçekleştirilen bir diğer analiz ise populasyon büyümesi-düşüşü modeli altında gerçekleştirilen uyumsuzluk dağılımı grafikleridir. Şekil 4.10'da, Şekil 4.11'de ve Şekil 4.12'de her bir filogenetik grup ve *M. glareolus*'un Türkiye populasyonu için gerçekleştirilen uyumsuzluk dağılımı analizine ait grafikler sunulmuştur. Buna göre uyumsuzluk dağılımı analizleri, her iki *M. glareolus* grubunun ve tüm Türkiye populasyonunun hızlı bir ani dağılıma maruz kaldığını ortaya koyan tek modellen kalıplar oluşturmuştur.



Şekil 4.10 *M. glareolus*'a ait Grup 1 populasyonunun *Cytb* gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği (kırmızı çizgi: gözlenen frekans, yeşil çizgi: beklenen frekans)



Şekil 4.11 *M. glareolus*'a ait Grup 2 popülasyonunun *Cytb* gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği (kırmızı çizgi: gözlenen frekans, yeşil çizgi: beklenen frekans)



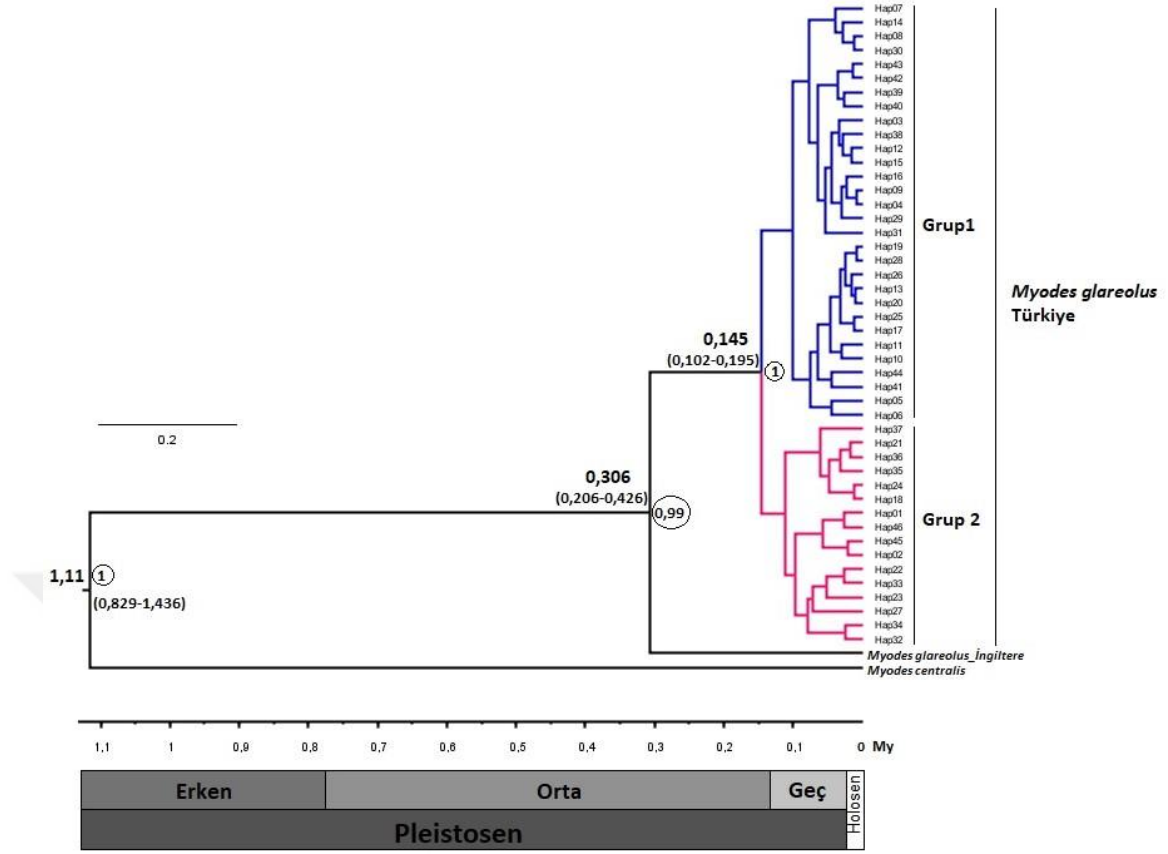
Şekil 4.12 *M. glareolus*'a ait Türkiye popülasyonunun *Cytb* gen bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafiği (kırmızı çizgi: gözlenen frekans, yeşil çizgi: beklenen frekans)

Çalışılan grupların son genişleme zamanını ortaya koyabilmek için elde edilen τ değeri sitokrom b gen bölgesi için hesaplanan iki grupta 3,237 (Grup 1) ve 3,213 (Grup 2) olarak bulunmuştur. Bu da son genişlemeden bu yana geçen sürelerin yaklaşık 13.000, 30.000 ve 50.000 yıl olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.3).

M. glareolus'un Türkiye'de yayılış gösteren grupları arasındaki ve Türkiye popülasyonu ile Avrupa popülasyonu ve Balkan örnekleri arasındaki K2P yaklaşımıyla elde edilen genetik farklılaşma değerleri Çizelge 4.4'de gösterilmektedir. Buna göre Cytb dizileri değerlendirildiğinde *M. glareolus*'un Türkiye grupları arasındaki genetik farklılaşma değeri çok düşük olmakla beraber (%K2P=0,6) Türkiye ve Avrupa popülasyonu arasındaki genetik farklılaşma değeri nispeten yüksek bulunmuştur (%K2P=1,2). Bunun yanında Türkiye ve Balkan örnekleri arasındaki genetik farklılaşma değeri, Türkiye ile Avrupa popülasyonu arasındaki farklılaşma değerinden daha düşük çıkmıştır (%K2P=1).

4.3 Moleküler Tarihleme Analizine Ait Bulgular

Evrimsel ayrılma zamanı hesaplamaları, *M. glareolus*'un Türkiye'deki 2 grubunun orta Pleistosen döneminin sonlarına doğru farklılaştığını ortaya koymuştur (0,145 Myö). Bunun yanında, Türkiye ve Avrupa *M. glareolus* popülasyonunun yaklaşık 306 bin yıl önce orta Pleistosen döneminde ayrıldığı görülmüştür. Evrimsel ayrılma zamanına ait Bayesian MCMC ağacı Şekil 4.13'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.13 *M. glareolus* örneklerine ait evrimsel ayrılma zamanlarını gösteren Bayesian tabanlı MCMC filogenetik ağacı. Her bir dalın ayrılma noktası (nod) üzerinde evrimsel farklılaşma zamanı Myö (Milyon yıl önce) olarak verilmiştir. Parantez içindeki değerler %95 HPD (en yüksek posterior yoğunluk) değerlerini göstermektedir. Bayesian ardıl olasılık değerleri (BPP) daire içinde gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde geniş bir yayılım gösteren *M. glareolus*'un diğer çalışmalardan farklı olarak mitokondriyal DNA'sından Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (COI) gen bölgesi ilk defa kullanılmış ve türün filogenetik ve taksonomik durumu araştırılmıştır. Çalışma ile türün bölgedeki fiziki bariyerler ile habitat parçalanmasından etkilenip etkilenmediği değerlendirilmiş ve tür içi varyasyonu, popülasyonlar arası ve popülasyon içi genetik çeşitlilik ve farklılaşma verileri ortaya konmuştur. Çolak vd. (2015) tarafından yapılan çalışmadan elde edilen filogenetik analizler, önceki çalışmalardan farklı olarak batıda yer alan Uludağ örneklerinin ilginç bir şekilde Doğu Karadeniz bölgesindeki örneklerle kümelendiğini göstermiştir. Bu sebeple çalışmada mitokondriyal DNA'dan Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I (COI) ve Sitokrom b (Cytb) gen bölgeleri birlikte değerlendirilerek, örnek sayısı arttırılan Uludağ filogrubunun durumu da analiz edilmiştir.

Moleküler filogenileri tanımlamak için sıkça kullanılan COI gen bölgesinin tercih edilmesinde diğer protein kodlayan mtDNA genlerine göre daha az evrimleşme hızına sahip olması etkili olmuştur (Russo vd. 1996, Dianat vd. 2013, Patwardhan vd. 2014, Riemsdijk vd. 2018). Ayrıca birçok farklı taksonomik seviyede kullanılabilen filogenetik sinyale sahip olması ve metazoan türlerde evrensel primer çiftleri kullanılarak çoğaltılabilmesi bu genin diğer protein kodlayan mitokondriyal genlerden üstünlüğünü teşkil etmektedir (Keskin ve Atar 2013). COI geninde gerçekleşen evrimin, yakın türlerin ayırımına imkân tanıyan ve coğrafik yapı ile ilişkilendirilebilen tür içi varyasyonu ortaya koyabilecek bir hızda olması da diğer dikkate alınması gereken önemli bir noktadır (Bucklin vd. 2011). Cytb gen bölgesi ise bilhassa familyalar ve cinsler arasındaki ilişkilerin tanımlanmasında çok faydalı olmakta ve bu gen ile gerçekleştirilen karşılaştırmalı çalışmalar, yeni sınıflandırma şemalarını ortaya çıkararak yeni tanımlanan türlerin bir cinse bağlanması ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerin derinlemesine anlaşılmasında kullanılmaktadır (Castresana 2001).

Çolak vd. (2013) 94 *M. glareolus* örneğinin 16 enzim sistemine ait 24 lokusu, nişasta ve poliakrilamid jel elektroforezi yöntemleriyle analiz etmişler ve incelenen populasyonlar, genetik mesafe değerleri doğrultusunda ortaya çıkan dendrograma göre iki küme oluşturmuştur. Beteş vd. (2014) ise Türkiye’deki 17 lokaliteden toplam 84 örneği RAPD-PCR tekniğiyle 15 primeri kullanarak analiz etmiş ve populasyonlar arasındaki genetik ilişkileri göstermek için Nei (1978)’nin genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamalarını kullanmıştır. Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogramda, *M. glareolus* populasyonları batı ve doğu populasyonları şeklinde iki küme oluşturmuştur. İlk küme kendi arasında iki altkümeye ayrılmıştır. Uludağ populasyonu birinci altkümede yer alırken, diğer batı populasyonları da ikinci altkümeyi oluşturmuştur. İkinci küme de benzer şekilde Sümela populasyonu ve diğer doğu populasyonları şeklinde 2 alt kümeye ayrılmıştır. Uludağ populasyonunun diğer Batı Anadolu populasyonlarından genetik olarak daha farklı olması, populasyonların habitatları arasında rakım farkı ile ilişkilendirilmiş ve Uludağ populasyonunun, diğerlerinden genetik ayırma neden olabilecek farklı adaptasyon değerlerine sahip olabileceğine işaret edilmiştir. Ledevin vd. (2018) çalışmasında iklim ve filogeninin kızıl sırtlı orman faresinin evrimi üzerindeki rolünü araştırmış ve farklılaşmanın izole populasyonlarda biriktiğini belirtmiştir. Belirli bir coğrafi alana kısıtlı kalmanın Beteş vd. (2014)’e benzer şekilde adaptif (uyumsal) farklılaşmayı destekleyebileceğini ileri süren Ledevin vd. (2018), Uludağ bölgesinden örnekleri de kullandığı çalışmasında Marmara denizinin doğusunda yer alan orman farelerinin diğer dağılım alanlarından bağlantısı kesilmiş izole bir parça görünümünde olduğunu belirtmiştir. Steiner (1972) çalışmasında İkizdere’nin doğusundan (Çat) örnekler kaydetmiştir. Tez kapsamında yapılan arazi çalışmalarında, İkizdere’den (Rize) iki örnek toplanmıştır. Ancak daha doğuda yapılan arazi çalışmalarında ise herhangi bir örnek elde edilememiştir. İkizdere’nin klad 2’nin yayılış alanının en doğu sınırı olabileceği söylenebilir. Örnek toplanan lokalite ise İkizdere nehrinin batı yamacında yer almaktadır. Dolayısıyla İkizdere nehrinin ya da bölgeye yapılan karayolunun, *M. glareolus*’un doğuya yayılması önünde bir engel olabileceği düşünülebilir.

Çolak vd. (2015)’nin Türkiye’de 19 lokaliteden topladıkları 36 örnek ve GenBank’tan elde ettikleri 47 *cytb* ve 8 D-loop dizileri üzerinde yaptıkları çalışma sonucu ortaya çıkan filogenetik analizlerde; Türk gruplarının *cytb* ve D-loop gen bölgelerinin NJ, MP ve ML

ağaç analizlerinin birbirleriyle tutarlı olduğu görülmüştür. Çolak vd. (2015), BS değerleri düşük olsa dahi (Cytb BS değerleri: NJ için %24, MP için %38, ML için %26 ve D-loop BS değerleri: NJ için % 38, MP için % 35 ve ML için % 43) Türk gruplarının; Doğu Karadeniz ve Batı Karadeniz olmak üzere iki soy hattına ayrıldığını ortaya koymuştur. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişkinin açıklanabilmesi amacıyla ML ve Bayesian ağaçlarının kullanıldığı bu tez çalışmasında da iki ağaç analizi birbirini desteklemiş ve Çolak vd. (2015) ile Beteş vd. (2014)'ne benzer şekilde Türk gruplarının, hem cytb hem de COI gen bölgeleri için kendi içerisinde iki gruba ayrıldığı ortaya çıkmıştır. Cytb BS değeri ise Çolak vd. (2015)'nin çalışmasına çok yakın olacak şekilde % 27 olarak tespit edilirken, COI BS değeri daha yüksek (% 58) olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan Uludağ örnekleri ise Çolak vd. (2015) çalışmasına benzer şekilde Doğu Karadeniz soy hattı ile kümelenmiştir. Çalışmasında Uludağ bölgesinden bir örneği de kullanan ve dağılım alanı boyunca yayılmış 62 lokaliteden toplanan 207 *M. glareolus*'un cytb gen bölgesi üzerinde analizler gerçekleştiren Deffontaine vd. (2005) ise Marmara Denizi'nin kurumuş olduğu son buzullaşma sırasında bu popülasyonlar arasında yakın zamanlı bir temas olduğuna atıfta bulunarak, Uludağ örneğini Balkanlardan alınan örnekler ile genetik olarak çok benzer bulmuş ve bu örneği Balkan filogrubu altında göstermiştir. İki çalışma arasındaki bu farklılık; iki grubun benzer rakımlar ile ekolojik koşullarda yaşaması ve bu benzer ekolojik koşullar nedeniyle aynı haplotiplerin seçilmesinden dolayı veya *M. glareolus* için izole bir habitat gibi görünen Uludağ lokalitesinin genetik çeşitliliği azaltan genetik bir darboğaza neden olması ve genetik sürüklenme ile rastgele seçilen haplotiplerin Uludağ grubunu rastlantısal olarak Doğu Karadeniz soyuyla kümelemesinden kaynaklanabilir (Çolak vd. 2015). Karadeniz bölgesinde batıdan doğuya doğru gidildikçe *M. glareolus*'un yayılış alanında Sakarya havzası ve Kızılırmak havzası iki farklı coğrafik bariyer olarak yer almaktadır. Çolak (1989) yüksek lisans tezinde, Sakarya havzasının batısında yer alan Şile'den aldıkları örnekleri biyometrik olarak analiz etmiş ve Şile örneklerinin *M. glareolus*'un diğer popülasyonlarından farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında Sakarya nehrinin doğu ve batısından toplanan örnekler üzerinde yapılan analizlerde haplotiplerin birbirine karıştığı görülmüştür. Bu da *M. glareolus*'un klad 1'i içinde herhangi bir farklılaşmanın olmadığını ve Sakarya havzasının izolasyon etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Bunun aksine Kızılırmak havzasının batısında klad 1 ve doğusunda klad 2'nin

yayılış gösterdiği ortaya konmuştur. Klad 1 ve klad 2 arasında 145 bin yıllık bir ayrılma zamanı tespit edilmiştir. Bu ayrılma zamanı buzul döneminde hem batıda hem de doğuda herhangi bir yerde *M. glareolus* için iki farklı buzul sığınağının olabileceğine işaret etmektedir. Buzul sonrası batı ve doğu buzul sığınağından iki kladın da genişlediği söylenebilir. Bu iki kladın doğuya ve batıya doğru genişlemelerinin Kızılırmak ya da başka bir coğrafik engel tarafından durdurulduğu sonucuna varılmıştır. Bunun kesinliğinin ortaya konabilmesi için Kızılırmak’a yakın lokalitelerden örneklerin analiz edilmesi önem arz etmektedir.

Çolak vd. (2015)’nin birleşik veri seti üzerinden genetik çeşitliliğe dair sonuçlarında yüksek haplotip çeşitliliği ve düşük nükleotid çeşitliliği ortaya çıkmış ve tez çalışmasında bu durum hem *cytb* hem de *COI* gen bölgelerinde benzerlik göstermiştir (Çizelge 5.1). İki çalışmada da Batı Karadeniz bölgesine karşılık gelen gruplar daha yüksek haplotip çeşitliliği göstermiştir. Türkiye’de Kuzey Anadolu’da yer alan dağ sıraları batıya yönelmiştir ve bu dağların yükselteri doğuya doğru giderek artmaktadır. Ayrıca Çiner (2003) tarafından Pleistosen buzullaşmalarının Doğu Karadeniz dağlarını neredeyse tamamen etki altına aldığı bildirilmektedir. Dolayısıyla bölgenin geniş dağları arasında kalan türlerin genetik darboğazdan etkilenmeleri muhtemeldir.

Çizelge 5.1 Farklı Çalışmalardaki Haplotip (*h*) ve Nükleotid (*π*) Çeşitlilik Değerleri

Çalışmalar	Filogrular	Haplotip çeşitliliği (<i>h</i>)	Nükleotid çeşitliliği (<i>π</i>)
Çolak vd. (2015)	Grup 1 (Birleşik veri seti)	0.99	0.0060
	Grup 2 (Birleşik veri seti)	0.97	0.0049
Tez çalışması	Grup 1 (<i>cytb</i>)	0.96	0.0033
	Grup 2 (<i>cytb</i>)	0.90	0.0031
	Türkiye	0.97	0.004
	Grup 1 (<i>COI</i>)	0.94	0.0037
	Grup 2 (<i>COI</i>)	0.93	0.0035
	Türkiye	0.97	0.004

Bu tez çalışmasında, filogenetik ağaçlarla desteklenen *M. glareolus*'un 2 Türkiye grubu arasındaki genetik farklılaşma değerleri K2P yaklaşımıyla hesaplanmıştır. İki DNA dizisi ortak bir atadan farklılaştığı zaman sonraki nesiller nükleotid değişimleriyle kademeli olarak farklılaşırlar. Bu sekans farklılaşmasını ölçmenin kolay bir yolu da iki dizinin farklılaştığı nükleotid bölgelerinin oranını hesaplamaktır (Nei ve Kumar, 2000). Kimura (1980) her bir yıldaki bölge başına düşen transisyonel nükleotid değişim oranlarının transversiyonel olanlardan farklı oranlarda değiştiğini ortaya koyan bir Kimura 2 parametre modelini üretmiştir. Bu modele göre *M. glareolus*'un 2 Türkiye grubunun genetik farklılaşma değerleri bu çalışmada kullanılan her iki gen bölgesine göre de % 0,6 bulunmuştur. Baker ve Bradley (2006), genetik farklılaşma değerinin % 2'nin altında olduğu durumlarda populasyonların türdeş olduğunu ifade etmektedir. Buna göre bu tez çalışmasında ortaya çıkan genetik farklılaşma değerleri *M. glareolus*'un Türkiye gruplarındaki bireylerin aynı populasyonun üyeleri olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde birçok filogeni çalışmasında tür içi farklılaşma değerlerinin % 2'nin altında olduğu görülmektedir. Kryštufek vd. (2013), *Allactaga* türlerinin *cytb* ve 16SrRNA gen bölgelerine göre hesaplanan K2P genetik farklılaşma değerlerini ortaya koydukları çalışmalarında, aynı türe ait populasyonlar arasındaki farklılaşma değerlerinin ($K2P < 4,05$) türler arası genetik farklılaşma değerlerinden ($K2P > 12$) daha düşük olduğu görülmüştür. Darvish vd. (2015), sitokrom b gen bölgesini kullanarak *Apodemus* türlerindeki tür içi ve türler arası K2P genetik farklılaşma değerini ortaya koymuştur. Araştırma sonuçlarına göre tür içi genetik farklılaşma değerlerinin % 2,2'den az, türler arası K2P değerlerinin ise % 6'dan fazla olduğu görülmüştür. Lebedev vd. (2018) ise *Cricetulus migratorius* populasyonunun alttürleri arasında % 2,5-% 2,8 arasında bir genetik farklılaşma olduğunu göstermiştir. Tang vd. (2018), sitokrom b bölgesi verilerini kullanarak oluşturdukları filogenetik ağaçta, tür olarak sınıflandırılan *M. shanseius* ile *M. rufocanus*'un alttürlerinin beraber kümелendiğini göstererek bu türler arasındaki K2P genetik mesafe değerlerinin % 2,3-% 3,8 arasında olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak *M. shanseius*'un aslında *M. rufocanus*'a ait bir alttür olduğunu desteklemişlerdir. Beteş vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada *M. glareolus* Türkiye populasyonları arasında yüksek gen akışı ($N_m=0.6990$) bulunmuştur. Yüksek gen akışı oranları ise iki grup arasındaki genetik farklılaşmayı azaltarak homojenliği artırabilmekte ve grupların gen havuzlarını birleştirerek farklılaşmaya ve

adaptasyona yol açacak genetik varyasyondaki farklılıkların gelişimini engellemektedir (Slatkin 1987, Bolnick ve Nosil 2007). Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde *M. glareolus*'un filogenetik ağaçlarla belirlenen 2 grubu arasında alttür seviyesindeki genetik farklılaşma düzeyinden daha da az bir farklılaşma olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında ayrıca *cytb* ve *COI* gen bölgelerine göre *M. glareolus*'un Avrupa ve Türkiye ile Türkiye ve Balkan populasyonları arasındaki K2P genetik farklılaşma değerleri de hesaplanmıştır. Buna göre bu populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma değerleri % 2'nin altında çıkmıştır. Bu sonuçlar da Türkiye ile Avrupa ve Balkan populasyonları arasında alttür seviyesinde bir farklılaşma olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte Çolak vd. (2015)'nin çalışmasında; Balkan soyunun diğer Avrupa soylarına (İtalya, İspanya, Doğu Avrupa, Batı Avrupa) kıyasla Türkiye soyuna daha yakın olduğu sonucu da tez çalışmasında elde edilen Türkiye ve Balkan populasyonları arasındaki daha düşük K2P genetik farklılaşma değeri ile desteklenmiştir. Bu durum pleistosen buzulları sırasında Marmara denizinin seviyesinin düşmesi ve iki bölge arasında kara köprülerinin ortaya çıkması sonucu Balkan ve Anadolu populasyonları arasında gen alışverişinin başlamasıyla açıklanabilir.

Bu tez çalışmasında Türkiye'deki her iki *M. glareolus* grubu için tüm gen bölgelerinde haplotip çeşitliliği yüksek çıkarken nükleotid çeşitliliği düşük bulunmuştur (Çizelge 4.2). Yüksek haplotip-düşük nükleotid çeşitliliği değeri, atasal bir populasyondan hızlı bir büyümeyi işaret etmektedir (Avice 2000). Populasyonun aniden büyüme gösterdiği bu kısa süre, mutasyon yoluyla haplotip varyasyonunun geri kazanılması için yeterliyken, büyük bir sekans farkının birikimi için bu süre yetersiz gelmiştir. Bunun yanında Tajima'nın D değeri, sadece sitokrom b gen bölgesine göre Grup 1 populasyonunda son dönemdeki demografik genişlemeyi destekler şekilde anlamlı derecede negatif bulunmuştur. Sitokrom b gen bölgesi için Grup 2 ve *COI* gen bölgesi için ise tüm populasyonlarda Tajima'nın D değeri negatif çıksa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fu'nun Fs değeri ise hem sitokrom b hem de *COI* gen bölgesi için çalışılan tüm populasyonlarda negatif olup, sadece *cytb* gen bölgesi için çalışılan Grup 2 populasyonunda istatistiksel olarak anlamsız çıkmıştır. Ayrıca, bu tez çalışmasında kullanılan her iki gen bölgesine göre gerçekleştirilen uyumsuzluk dağılımı analizleri, haplotip ve nükleotid çeşitliliği verilerini destekleyecek şekilde her iki *M. glareolus*

grubunun ve tüm Türkiye popülasyonunun hızlı bir ani dağılıma maruz kaldığını ortaya koyan tek modellenli kalıplar oluşturmuştur. Tajima'nın D ve Fu'nun Fs değerleri arasındaki bu farklılıklar bu iki nötralite testinin farklı parametreler kullanılarak hesaplanmasından kaynaklanmaktadır. Tajima'nın D değeri dizilerdeki ayırıcı bölgelere diğer bir deyişle nükleotid farklılıklarına göre hesaplanırken, Fu'nun Fs değeri hesaplanırken popülasyondaki haplotip çeşitliliği hesaba katılmaktadır (Ramírez-Soriano vd. 2008). Bu tez çalışmasında *M. glareolus*'un hem Türkiye gruplarında hem de tüm popülasyonda nükleotid çeşitliliği değeri haplotip çeşitliliğinden düşük bulunmuştur. Bu da nötralite hesaplamalarında farklılıklar ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunun yanında her bir gen bölgesindeki ayırıcı bölge (S: segregating sites) sayısı farklılık göstermektedir. En yüksek ayırıcı bölge sitokrom b gen bölgesine ait dizilerin bulunduğu Türkiye popülasyonunun tamamında (S=46) ve Grup 1 popülasyonunda (S=28) görülmüştür. Bu durum sadece bu popülasyonlarda Tajima'nın D değerine göre anlamlı derecede negatif çıkmasını açıklamaktadır. Ayrıca Fu'nun Fs değerinin özellikle rekombinasyonun olmadığı durumlarda Tajima'nın D değerinden daha güçlü bir belirteç olduğu gösterilmiştir (Ramos-Onsins ve Rozas 2002, Ramírez-Soriano vd. 2008). Nötralite testlerinde ortaya çıkan tüm bu negatif değerler ve uyumsuzluk dağılımı analizleri, çalışılan *M. glareolus* popülasyonlarında son zamanlarda görülen popülasyon genişlemesine ve nadir görülen mutasyonlara işaret etmektedir. Bunun yanında bu tez çalışmasında hem Sitokrom b hem de Sitokrom c Oksidaz Alt Ünite I gen bölgesine ait diziler, birçok bireyin aynı haplotipi paylaştığı, diğerlerininse bunlardan 1-3 mutasyonla farklılaştığı genetik darboğaza işaret eden yıldız benzeri Median-Joining ilişki ağı oluşturmuştur. Bu durumda Türkiye'de yayılış gösteren *M. glareolus* popülasyonunun bir darboğaza maruz kaldığı ve bunu sonradan çok yeni bir demografik genişlemenin takip ettiği sonucuna varılmaktadır.

Bu tez çalışmasında mtDNA gen bölgesine göre gerçekleştirilen evrimsel ayrılma zamanı analizleri *M. glareolus*'un iki Türkiye grubunun yaklaşık 145 bin yıl önce orta Pleistosenin sonlarında farklılaştığını ortaya koymaktadır. Bu tarih, MIS6 (Marine Isotope Stage 6) olarak adlandırılan ve tüm Avrupa'ya hakim olan bir buzul döneme denk gelmektedir (Hughes vd. 2011). Türkiye filogrubunda görülen bu farklılaşma zamanı, sadece sitokrom b gen bölgesi kullanılarak gerçekleştirilen ve geç Pleistosenin buzul

döneminde farklılaştığı ileri sürülen hem Türkiye (Çolak vd. 2015) hem de Avrupa filogrubuyla gerçekleştirilen çalışmalardan farklılık göstermektedir (Deffontaine vd. 2005). Bu çalışmada moleküler tarihlendirme analizinde sitokrom b bölgesine ek olarak *COI* gen bölgesinin de kullanılması ve *COI* gen bölgesindeki nükleotid değişim oranlarının düşük olması hesaplama sonucuna etki etmiştir. Evrimsel ayrılma zamanı hesaplamaları populasyonların farklılaşma zamanlarını ortaya koymaktadır. Bu farklılaşmanın en önemli nedenlerinden biri iklimsel dalgalanmalar sırasında populasyonların kendi çevresel gereksinimlerine göre yaşamlarını sürdürebilecekleri sığınak alanlarda uzun süre yaşayarak bu süre içinde soy içi üreme yoluyla diğer sığınaktaki populasyonlardan genetik olarak farklılaşmasıdır. Türkiye'deki *M. glareolus* populasyonlarının buzul dönemde farklılaşması bu dönemde Anadolu'da bulunan sığınak bölgelere yerleştiklerine işaret etmektedir. *M. glareolus* gibi ılıman iklimlere adapte olmuş türlerin buzul dönemlerde sığınakları kullandığı, buzul arası dönemlerde ise bu sığınaklardan yayılım gösterdiği düşünülmektedir (Hewitt 1996). Ayrıca *M. glareolus* ile gerçekleştiren çalışmalarda bu türün buzul dönemde Avrupa ve Türkiye'yi de içine alan güney sığınaklarda hayatta kaldığını göstermektedir (Deffontaine vd. 2005, 2009). Bunun yanında, Wójcik vd. (2010) *M. glareolus*'un Karpatlar'daki soy hattının buzul arası dönemde (MIS 5) genişleme gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında her iki gen bölgesine göre literatürdeki 0,11, 0,047 ve 0,028 substitutions/site/Myıl oranları kullanılarak Türkiye'deki her bir *M. glareolus* grubunun genişleme zamanı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre, *COI* gen bölgesi ve 0,028 mutasyon oranı kullanılarak gerçekleştirilen hesaplamalar hariç, kalan tüm genişleme zamanı hesaplamaları Türkiye'de yayılım gösteren *M. glareolus*'un buzul arası dönemde nüfus sayısını arttırıp yayılım gerçekleştirdiğine işaret etmektedir. Sitokrom b gen bölgesine ait diziler kullanılarak 0,11, 0,047 ve 0,028 mutasyon oranları ile yapılan hesaplamalar sırasıyla yaklaşık 13.000 (MIS1), 30.000 (MIS3) ve 50.000 (MIS3) yıl önce gerçekleşen ısınma olaylarıyla populasyonun genişlediğini ortaya koymuştur. *COI* gen bölgesi aynı mutasyon oranlarıyla daha eski dönemdeki genişleme olaylarını ortaya koymuştur. Bunlar sırasıyla yaklaşık 40.000 (MIS3), 90.000 (MIS5) ve 150.000 (MIS6) yıl olarak hesaplanmıştır. Her iki gen bölgesi arasındaki bu farklılıklar, *COI* gen bölgesindeki mutasyon oranının sitokrom b gen bölgesine göre daha az olmasından kaynaklanabilir. Bu bağlamda *COI* gen bölgesi, kullanılan mutasyon oranları altında daha eski dönemlerde

gerçekleşen genişleme zamanlarına işaret ediyor olabilir. Bunun yanında, kullanılan bu mutasyon oranları sitokrom b bölgesi analizlerini içeren çalışmalarda ortaya konmuştur (Suzuki vd. 2015, Hanazaki vd. 2017, Honda vd. 2019). Bu sonuçlara göre genişleme zamanı analizleri için *COI* gen bölgesine özgü farklı mutasyon oranları kullanılarak hesaplama yapılması gerektiği görülmektedir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde: (1) Nötralite testleri ve mismatch analizleri Türkiye’de yayılış gösteren *M. glareolus* populasyonlarının bir genetik darboğazın ardından son dönemde genişlediğini ortaya koymuştur. (2) Her iki gen bölgesine göre oluşturulan Median-Joining ilişki ağı ve filogenetik analizler, *M. glareolus*’un Kuzey Anadolu’da düşük genetik farklılaşma gösteren iki grubunun olduğunu göstermiştir (özellikle *COI* gen bölgesi analizlerinde). (3) Ortaya çıkan bu iki grubun Pleistosen buzul dönemlerinde Kuzey Anadolu’nun batısı ve doğusu olmak üzere iki farklı mikrorefüj alanını kullanan populasyonlar olduğu düşünülebilir. (4) Bu gruplar arasındaki evrimsel ayrılma zamanının buzul döneme denk gelmesi, *M. glareolus* populasyonunun orta Pleistosen dönemindeki iklimsel dalgalanmalardan etkilendiği söylenebilir.

M. glareolus’un Türkiye’deki fosil kayıtları 1,95 Myö kadar geriye gitmektedir. Bugün yayılış göstermediği Emirkaya’dan (Seydişehir) ve Yarımburgaz Mağaralar (Trakya)’dan da 1,95 Myıl öncesine ait fosil kaydı bulunmaktadır. Elde edilen fosil kayıtları türün geçmişte Anadolu’da geniş bir yayılış alanına sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum tıpkı Avrupa’daki soylarında olduğu gibi (Defontaine vd. 2005) *M. glareolus*’un erken ve orta Pleistosen dönemindeki iklimsel dalgalanmaların etkisiyle habitat parçalanmalarından etkilenmesi ve atasal soyunun yok olması ile açıklanabilir.

Bu tez çalışmasında Çolak vd. (2015) çalışmasını destekler şekilde Uludağ ve Bursa örneklerinin beklenmedik bir şekilde bu bölgelerden mesafe olarak uzak olan Doğu Karadeniz örnekleriyle beraber kümелendiği görülmüştür. Hewitt (1996), buzul arası dönemlerde populasyonlar hızlı bir genişleme gösterdiğinden, ana koloninin çok ilerisinde yeni koloniler kurabileceğinden bahsetmiştir. Bu bağlamda, buzul dönemde

Doğu Karadeniz’de olduğu düşünölen mikro-sığınaklardaki populasyonlar buzul arası dönemde hızlı ve uzun mesafeli bir yayılış göstererek Bursa ve Uludağ bölgelerinde kurucu etkisiyle bir koloni oluşturmuş olabilir.



KAYNAKLAR

- Amori, G., Contoli, L. ve Nappi, A. 2008. Fauna d'Italia, Mammalia II: Erinaceomorpha, soricomorpha, lagomorpha, rodentia. Bologna, Italy: Calderini.
- Anonim. 2009. Web Sitesi: <http://www.ziraatciyiz.biz/memeliler-memelilerin-siniflandirilmesi-memelilerin-zellikleri-t620.html?s=17badd7951c09b4ff0a15ef8ff1b667d&> Erişim Tarihi: 23.11.2020.
- Anonim. 2014. Web Sitesi: <https://o.quizlet.com/hwvl8mAh5Kj9bfXsTmz3BA.png> Erişim Tarihi: 02.12.2020.
- Anonim. 2015. Web Sitesi: http://www.filocografya.net/uploads/9/6/6/2/9662576/pcr_can_elverici.pdf Erişim tarihi: 03.09.2020.
- Anonim. 2015. Web Sitesi: <https://image.slidesharecdn.com/genitalsistemembryolojisihakki-150323062837-conversion-gate01/95/genital-sistem-embryolojisi-profdr-smail-hakk-nur-46-638.jpg?cb=1518450892> Erişim Tarihi: 06.06.2020.
- Anonim. 2018. Web Sitesi: <http://molekulerbiyolojivegenetik.org/polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-ve-nasil-yapilir/> Erişim Tarihi: 03.08.2020.
- Anonim. 2018. Web Sitesi: <https://www.fikir.gen.tr/enerjinin-temel-molekulu-atp-adenozin-trifosfat/> Erişim Tarihi: 09.08.2020.
- Anonim. 2020. Web Sitesi: <https://ogreniyo.com/nukleik-asit/> Erişim Tarihi: 17.08.2020.
- Anonim. 2020. Web Sitesi: <https://tahlil.com/blog/pcr-testi-pcr-analizi-polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-5590> Erişim tarihi: 18.10.2020.
- Anonymous. 2000. Web Sitesi: <https://docplayer.net/21600506-The-central-dogma-of-molecular-biology.html> Erişim Tarihi: 05.11.2020.
- Anonymous. 2001. Web Sitesi: <https://animaldiversity.org/accounts/Muridae/> Erişim Tarihi: 12.11.2020.
- Anonymous. 2008. Web Sitesi: <https://www.iucnredlist.org/species/4973/115070929> Erişim Tarihi: 12.12.2020.
- Anonymous. 2017. Web Sitesi: <https://paleobiodb.org/navigator/> Erişim Tarihi: 25.03.2019.
- Anonymous. 2017. Web Sitesi: https://www.researchgate.net/publication/315724234_Home_Science_Biology_Cell_Biology_Difference_Between_Mitochondrial_DNA_and_Nuclear_DNA_Difference_Between_Mitochondrial_DNA_and_Nuclear_DNA Erişim Tarihi: 06.10.2020.

- Anonymous. 2019. Web Sitesi: <https://www.differencebetween.com/difference-between-forward-and-vs-reverse-primer/> Erişim Tarihi: 13.09.2020.
- Anonymous. 2020. Web Sitesi: <https://medlineplus.gov/genetics/chromosome/mitochondrial-dna/#description> Erişim Tarihi: 13.07.2020.
- Anonymous. 2020. Web Sitesi: <https://www.britannica.com/animal/Muridae> Erişim Tarihi: 16.06.2020.
- Anonymous. 2020. Web Sitesi: <http://www.helsinki.fi/science/now> Erişim Tarihi: 16.11.2020.
- Arı, Ş. 1999. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, “DNA’nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması”. Ed. Temizkan, G. ve Arda, N. Nobel Kitabevi, 57-67, İstanbul.
- Arı, Ş. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, DNA’nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması. Ed. Temizkan, G. ve Arda, N. Biyogem yayınları, Nobel Tıp Kitabevleri, No:1, Bölüm 5, 101-120, İstanbul.
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Baker, R. J. ve Bradley, R. D. 2006. Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. *Journal of Mammalogy*, 87(4); 643–662.
- Bandelt, H. J., Forster, P. ve Röhl, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Barshad, G., Marom, S., Cohen, T. ve Mishmar, D. 2018. "Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective". *Trends Genet.*, 34 (9); 682–692.
- Battistoni, A., Peronace, V., Rondinini, C. ve Teofili, C. 2013. Lista rossa dei vertebrati italiani. Rome.
- Berkovitz, B. ve Shellis P. 2018. The Teeth of Mammalian Vertebrates. Academic Press, 105-143.
- Beteş, D., Çolak, R., Karacan, G. O., Kandemir, I., Kankılıç, T. ve Çolak, E. 2014. Population genetic variability of *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) (Mammalia: Rodentia) distributed in northern Anatolia as revealed by RAPD-PCR analysis. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66, 31–7.
- Bolnick, D. I. ve Nosil, P. 2007. Natural selection in populations subject to a migration load. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 6(9); 2229–43.
- Boonstra, R. ve Krebs, C. J. 2012. Population dynamics of red-backed voles (*Myodes*) in North America. *Oecologia*, 168(3); 601-20.

- Brown, W. M., George, M. J. R. ve Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1967-71.
- Bucklin, A., Steinke, D. ve Blanco-Bercial, L. 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Reviews of Marine Science*. 3, 471-508.
- Canestrelli, D., Sacco, F. ve Nascetti, G. 2012. On glacial refugia, genetic diversity, and microevolutionary processes: deep phylogeographical structure in the endemic newt *Lissotriton italicus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(1); 42–55.
- Castresana, J. 2001. "Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals". *Molecular Biology and Evolution*. 18(4); 465–471.
- Chiocchio, A., Colangelo, P., Aloise, G., Amori, G., Bertolino, S., Bisconti, R., Castiglia, R. ve Canestrelli, D. 2019. Population genetic structure of the bank vole *Myodes glareolus* within its glacial refugium in peninsular Italy. *J Zool Syst Evol Res.*, 57, 959–969.
- Clauzon, G., Suc, J. P., Gautier, F., Berger, A. ve Loutre, M. F. 1996. "Alternate interpretation of the Messinian salinity crisis: Controversy resolved?". *Geology*. 24(4); 363.
- Colangelo, P., Aloise, G., Franchini, P., Annesi, F. ve Amori, G. 2011. Mitochondrial DNA reveals hidden diversity and an ancestral lineage of the bank vole in the Italian peninsula. *Journal of Zoology*, 287, 41-52.
- Çiner, A. 2003. Recent glaciers and late quaternary glacial deposits of Turkey. *Geol Bull Turk*, 46, 55–78.
- Çolak, E. 1989. Kuzey Anadolu'daki *Clethrionomys* (Tiselius, 1850) (Mammalia: Rodentia) Cinsinin Taksonomik Durumu ve Yayılışı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 43, Ankara.
- Çolak, E. ve Kıvanç, E. 1991. Distribution and taxonomic status of genus *Clethrionomys* (Tiselius, 1850) (Mammalia: Rodentia) in North Anatolia. *Commun Fac Univ. Ank*, 9, 1–16.
- Çolak, E., Yiğit, N., Özkurt, S. ve Sözen, M. 1997. Karyotype of *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Turk J Zool.*, 21, 123–5.
- Çolak, R., Kandemir, I., Karacan, G. O., Kankılıç, T., Çolak, E., Yiğit, N. ve Özkurt, Ş. 2013. Allozyme variation in bank vole, *Myodes glareolus* (Mammalia: Rodentia) in Northern Anatolia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 304–309.
- Çolak, R., Karacan, G. O., Kandemir, I., Çolak, E., Kankılıç, T., Yiğit, N. ve Michaux, J. 2015. Genetic variations of Turkish bank vole, *Myodes glareolus* (Mammalia: Rodentia) inferred from mtDNA. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(6); 4372-4379.
- Darvish, J., Mohammadi, Z., Ghorbani, F., Mahmoudi, A. ve Dubey, S. 2015. Phylogenetic Relationships of *Apodemus* Kaup, 1829 (Rodentia: Muridae) Species

- in the Eastern Mediterranean Inferred from Mitochondrial DNA, with Emphasis on Iranian Species. *J Mammal Evol.*, 22, 583–595.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J. B. ve Michaux, J. R. 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, 14(6); 1727-1739.
- Deffontaine, V., Ledevin, R., Fontaine, M. C., Quere, J. P., Renaud, S., Libois, R. ve Michaux, J. R. 2009. A relict bank vole lineage highlights the biogeographic history of the Pyrenean region in Europe. *Mol Ecol.*, 18, 2489–502.
- Demirsoy, A. 1998. Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar/Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler). Meteksan, ISBN: 975-7746-02-9. Ankara.
- Dianat, M., Aliabadian, M., Darvish, J. ve Akbarirad, S. 2013. Molecular phylogeny of the Iranian Plateau five-toed jerboa, *Allactaga* (Dipodidae: Rodentia), inferred from mtDNA. *Mammalia*, 77, 95–103.
- Doyle, J. J. ve Doyle, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1); 13-15.
- Drummond, A. J. ve Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.*, 7, 214.
- Duggen, S., Hoernle, K., Bogaard, P. V. D., Rupke, L. ve Morgan, J. P. 2003. Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 422, 602-605.
- Erlich, H. A., Gelfand, D. H. ve Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*, 252, 1643-1650.
- Esposti, M. D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. ve Meyer, A. 1993. "Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein" (PDF). *Biochim. Biophys. Acta*. 1143(3); 243–71.
- Excoffier, L. ve Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Felten, H., Spitzenberger, F. ve Storch, G. 1971. Zur Kleinsäugerfauna west-Anatoliens. *Senckenb Biologica*, 52, 393–424.
- Filipi, K., Marková, S., Searle, J. B. ve Kotlík, P. 2015. Mitogenomic phylogenetics of the bank vole *Clethrionomys glareolus*, a model system for studying end glacial colonization of Europe. *Mol Phylogenet Evol*, 82, 245–57.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. ve Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5); 294-299.

- Frigola, A., Prange, M. ve Schulz, M. 2018. Boundary conditions for the Middle Miocene Climate Transition (MMCT v1.0). *Geoscientific Model Development*, 11, 1607–1626.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-25.
- Gür, H. 2016. The Anatolian diagonal revisited: testing the ecological basis of a biogeographic boundary. *Zoology in the Middle East*, 62, 189–199.
- Hadidi, A., Levy, L. ve Podleskis, E. V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. Eds. Singh, R. P. ve Singh, U. S. Boca Raton: CRS Press. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, 167-187.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment, editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hanazaki, K., Tomozawa, M., Suzuki, Y., Kinoshita, G., Yamamoto, M., Irino, T. ve Suzuki, H. 2017. Estimation of evolutionary rates of mitochondrial DNA in two Japanese wood mouse species based on calibrations with quaternary environmental changes. *Zoological Science*, 34, 201–210.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. ve Dewaard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 96-99.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 247–276.
- Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–13.
- Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., Cooper, A. ve Drummond, A. J. 2005. Time Dependency of Molecular Rate Estimates and Systematic Overestimation of Recent Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution*, 22(7); 1561–1568.
- Hoffmann, A. ve Spengler, D. 2018. The Mitochondrion as Potential Interface in Early-Life Stress Brain Programming. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12, 306.
- Honda, A., Murakami, S., Harada, M., Tsuchiya, K., Kinoshita, G. ve Suzuki, H. 2019. Pleistocene climate change and population dynamics of Japanese *Myodes* voles inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. *Journal of Mammalogy*, 100(4); 1156–1168.
- Huelsenbeck, J. P. ve Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Hughes, P. D., Woodward, J. C., van Calsteren, P. C. ve Thomas, L. E. 2011. The glacial history of the Dinaric Alps, Montenegro, *Quaternary Science Reviews*, 30(23–24); 3393-3412.

- Innis, M. A. ve Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. ve White T. J. (eds.). PCR protocols A guide to methods and applications. Academic Press, 3-12.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. ve Wilson, A. C. 1991. Evolution of the Cytochrome-B Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128–144.
- Johns, G. C. ve Avise, J. C. 1998. A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15(11); 1481–1490.
- Kahya, S., Büyükçangaz, E. ve Çarlı, K. T. 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 32(1); 31-38.
- Keskin, E. ve Atar, H. H. 2013. DNA Barkodlama: Mitokondriyal *COI* Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2); 01-08.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111–120.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. ve Spencer, C. A. 2011. Genetik Kavramlar. (8. Baskıdan çeviri). C. ÖNER, S. SÜMER, R. ÖNER, A. ÖĞÜŞ, L. AÇIK. (eds.) Palme Yayıncılık, 677, Ankara.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. ve Spencer, C. A. 2016. *Essentials of Genetics*. (9th edition) Pearson Education, ISBN 978-0-134-04779-9.
- Koç, F. ve Sarıca, Y. 2003. Mitokondri; *Biyokimyası. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(5); 1-13.
- Kotlík, P., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J. R. ve Searle, J. B. 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 14860-14864.
- Kryštufek, B. ve Vohralík, V. 2001. Mammals of Turkey ve Cyprus Introduction, Checklist Insectivora. *Knjznica Annales Majora*, 40-47. Koper.
- Kryštufek, B. ve Vohralík, V. 2005. Mammals of Turkey and Cyprus Rodentia 1: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae. *Zgodovinsko društvo za južno Primorsko*, 3, 105-143, Koper.
- Kryštufek, B., Arslan, A., Shehab, A., Mounir, R., Abi-Said, M. R., Zupan, S. ve Lud, M. 2013. Mitochondrial sequences point on a crypticspecies in five-toed jerboas, subgenus *Paralactaga*. *Mammalia*, 77, 433-438.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. ve Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.*, 35, 1547-1549.
- Kuru, M. 1999. Omurgalı Hayvanlar. Palme Yayıncılık, Ankara. ISBN: 975-7477-52-4.

- Lebedev, V., Poplavskaya, N., Bannikova, A., Ryurikov, G. ve Surov, A. 2018. Genetic differentiation in *Cricetulus migratorius* Pallas, 1773 (Rodentia, Cricetidae). *Mamm Biol.*, 92, 115–119.
- Ledevin, R., Chevret, P., Helvacı, Z., Michaux, J. R. ve Renaud, S. 2018. Bank Voles in Southern Eurasia: Vicariance and Adaptation. *J Mammal Evol.*, 25, 119–129.
- Leitner, M. ve Hartl, G. 1988. Genetic variation in the bank vole *Clethrionomys glareolus*: biochemical differentiation among populations over short geographic distances. *Acta. Theriol.*, 16, 231–245.
- Lu, T., Zhu, M., Yi, C., Si, C., Yang, C. ve Chen, H. 2017. Complete mitochondrial genome of the gray redbacked vole (*Myodes rufocanus*) and a complete estimate of the phylogenetic relationships in Cricetidae. *Mitochondrial DNA Part A*, 28(1); 62–64.
- Macdonald, D. 1984. *The Encyclopedia of Mammals*. vol. 2. George Allen and Unwin, London.
- Matson, C. W. ve Baker, R. J. 2001. DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Control Region of Red-Backed Voles (*Clethrionomys*). *Mol. Biol. Evol.*, 18(8); 1494–1501.
- Michaux, J. R., Magnanou, E., Paradis, E., Nieberding, C. ve Libois, R. 2003. Mitochondrial phylogeography of the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. *Mol Ecol.*, 12, 685–97.
- Musser, G. G. ve Carleton, M. D. 1993. Family Muridae. In: Wilson, D. E., Reeder, D. A. M. (eds.) *Mammal species of the World. A taxonomic and geographic reference*. 2nd ed. Smithsonian Institution Press, 501-755, Washington.
- Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from A Small Number of Individuals. *Genetics*, 89(3); 583-90.
- Nei, M. ve Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Neuhauser, G. 1936. Die muriden von kleinasien. *Z Saugetierkd*, 11, 161–236.
- Okutucu, B. ve Pehlivan, S. 2003. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Dergipark Arşiv*, 12, 138-140.
- Osborn, D. J. 1962. Rodents of the subfamily Microtinae from Turkey. *J Mammal*, 43, 515–29.
- Özdemir, M. ve Doğru, Ü. 2011. Genetik Karakterizasyonda Mitokondriyal DNA Kullanımı. 105-111.
- Patwardhan, A., Ray, S. ve Roy, A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*, 2, 131.

- Pereverzeva, V. V. ve Primak, A. A. 2016. Genetic diversity of the cytochrome b gene fragment haplotypes in red-backed vole *Myodes (Clethrionomys) rutilus* Pallas, 1779. Russ J Genet., 52, 164–172.
- Posada, D. ve Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14, 817–818.
- Rambaut, A. 2012. FigTree version 1.4. Available at: < <http://tree.bio.ed.ac.uk/>>.
- Rambaut, A., Suchard, M. A. ve Drummond, A. J. 2013. Tracer, Version 1.6. Available at: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>>.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S. E., Rozas, J., Calafell, F. ve Navarro, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. Genetics, 179(1); 555-67.
- Ramos-Onsins, S. E. ve Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Mol Biol Evol., 19, 2092–2100.
- Riemsdijk, I. V., Arntzen, J. W., Bogaerts, S., Franzen, M., Litvinchuk, S. N., Kurtuluş, O. ve Wielstra, B. 2018. The Near East as a cradle of biodiversity: A phylogeography of banded newts (genus *Ommatotriton*) reveals extensive inter- and intraspecific genetic differentiation. Molecular Phylogenetics and Evolution, 114, 73–81.
- Rogers, A. R. ve Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution, 9, 552–569.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. ve Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. Mol Biol Evol., 34, 3299-3302.
- Runck, A. M. ve Cook, J. A. 2005. Postglacial expansion of the southern red-backed vole (*Clethrionomys gapperi*) in North America. Mol Ecol., 14(5); 1445-56.
- Russo, C. A., Takezaki, N. ve Nei, M. 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. Mol Biol Evol, 13, 525–536.
- Shenbrot, G. I. ve Krasnov, B. R. 2005. An atlas of the geographic distribution of the Arvicolinae rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). 336, Moscow.
- Slatkin, M. 1987. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. Science, 236(4803); 787–792.
- Somma, M., ve Querci, M. 2010. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri. Bölüm 6:PCR, Dünya Sağlık Örgütü, 84-108.
- Steiner, H. M. 1972. Systematik und Ökologie (Microtine, Mammalia) der vonderasiatischen gebirge ostpontus. Talysch und Elburs, 110–115.

- Suzuki, Y., Tomozawa, M., Koizumi, Y., Tsuchiya, K. ve Suzuki, H. 2015. Estimating the molecular evolutionary rates of mitochondrial genes referring to quaternary ice age events with inferred population expansions and dispersals in Japanese Apodemus. BMC Evolutionary Biology, 15, 187.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics, 123, 597-601.
- Tang, M. K., Jin, W., Tang, Y., Yan, C. C., Murphy, R. W., Sun, Z. Y., Zhang, X. Y., Zeng, T., Liao, R., Hou, Q. F., Yue, B. S. ve Liu, S. Y. 2018. Reassessment of the taxonomic status of Craseomys and three controversial species of Myodes and Alticola (Rodentia: Arvicolinae). Zootaxa, 5, 4429(1); 1-52.
- Temizkan, G. ve Arda, N. 2018. Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler. Nobel Tıp Kitabevleri, 291-307, İstanbul.
- Vinogradov, B. S. ve Argiropulo, A. I. 1941. Fauna of the U.S.S.R. Mammals. Translated from Russian, 1-230, Moscow, Leningrad.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. ve Zoller, M. 1992. The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA. Second Edition. 79-98, New York.
- Wilson, D. E. ve Reeder, D. M. 2005. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, 63, 3741-3751.
- Wójcik, J. M., Kawałko, A., Marková, S., Searle, J. B. ve Kotlík, P. 2010. Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens. Journal of Zoology, 281, 249-262.
- Yılmaz, S. ve Devran, Z. 2003. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. Derim, 20, 31-42.
- Yiğit, N., Çolak, E., Sözen, M. ve Karataş, A. 2006. Rodents of Türkiye. Ed. Demirsoy, A. Meteksan. 154, Ankara.