

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE KIZIL TİLKİLERİNİN (*VULPES VULPES* (L.,
1758)) (MAMMALIA: CARNIVORA) MİTOKONDRIAL
Sitokrom *-b* SEKANSI YARDIMIYLA GENETİK ANALİZİ**

**Tezi Hazırlayan
Osman İBİŞ**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Coşkun TEZ**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2009
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE KIZIL TİLKİLERİNİN (*VULPES VULPES* (L.,
1758)) (MAMMALIA: CARNIVORA) MİTOKONDRIAL
Sitokrom *-b* SEKANSI YARDIMIYLA GENETİK ANALİZİ**

**Tezi Hazırlayan
Osman İBİŞ**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Coşkun TEZ**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FBY-08-582 kodlu proje ile desteklenmiştir**

**Temmuz 2009
KAYSERİ**

Doç. Dr. Coşkun TEZ danışmanlığında **Osman İBİŞ** tarafından hazırlanan “**Türkiye Kızıl Tilkilerinin (*Vulpes vulpes* (L., 1758)) (Mammalia: Carnivora) Mitokondrial Sitokrom b Sekansı Yardımıyla Genetik Analizi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

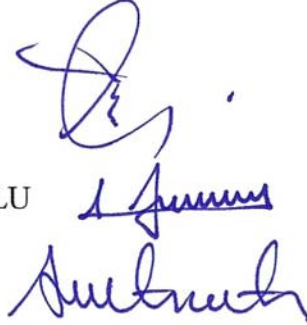
22 / 07 / 2009

JÜRİ:

Başkan: Doç. Dr. Coşkun TEZ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ayşe TOLUK

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 28/07/2009...tarih ve 2009/24-19.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

28/07/2009N. Ayyıldız
Prof. Dr. Nüsret AYYILDIZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımını esirgemeyen, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, örnek ve gerekli malzemelerin temininde bana yardımcı olan tez danışmanım Doç. Dr. Coşkun TEZ'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana önderlik eden, her türlü laboratuvar ihtiyaçlarımı karşılayan, iyi bir çalışma ortamı sağlayan ve değerli bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN'na, ihtiyaç duyduğumuzda yardımlarını hiç esirgemeyen, gerekli yönlendirmeleri yapan sayın hocam Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ'e örneklerin toplanmasında yardımcı olan biyoloji öğretmeni Rahime TEZ'e ve Ondokuz Mayıs Üniversitesinden yüksek lisans öğrencisi Cesur KIRMANOĞLU'na, Erciyes Üniversitesi yüksek lisans öğrencisi Şengül HASKILIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında hep yanımda olan desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Dr. Fahriye SÜMER'e, laboratuvarında uyum içinde çalıştığım, manevi desteklerini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Güler TOPRAK, Şeyda ERDOĞAN, Serkan KAYA, Canan TORUN ve Dilek CEYLAN'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı maddi olarak FBY-08-582 kodlu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Varlıklarının verdiği gücü her zaman yanımda hissettiğim ve bu sayede ayakta kaldığım, hayatımın her aşamasında bana destek olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan babam Nail İBİŞ, annem Hatice İBİŞ, kardeşlerim Emsal ve Emel İBİŞ'e en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hayatımın tüm safhalarında varlığının verdiği gücü hissettiğim, sağladığı her türlü imkânı kullandığım, beni yetiştiren, geliştiren ülkem, TÜRKİYEM'e sonsuz minnettarım.

**TÜRKİYE KIZIL TİLKİLERİNİN (*Vulpes vulpes* (L., 1758)) (MAMMALIA:
CARNIVORA) MİTOKONDRIAL Sitokrom – *b* SEKANSI YARDIMIYLA
GENETİK ANALİZİ**

Osman İBİŞ

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2009

Tez Danışman: Doç. Dr. Coşkun TEZ

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye kızıl tilkilerinin (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)) mitokondrial sitokrom – *b* gen varyasyonları araştırılmıştır. Türkiye'nin değişik lokalitelerinden toplanan toplam 47 kızıl tilki örneğinde Mitokondrial sitokrom – *b* geninin (375 bç) bir bölümünün dizi analizi yapılmıştır. Bu dizi analizleri sonucunda 12 farklı mtDNA haplotipi elde edilmiştir. Genetik uzaklık 0.0027 ile 0.0415 arasında bulunmuş ve haplotip çeşitliliği 0.7373 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Türkiye kızıl tilkilerinin birbirinden genetik olarak izole olmadığını ve birbirleri arasında gen akışının olduğunu göstermektedir. Filogenetik ağaçlar Parsimoni ve Neighbor Joining (NJ) analizi ile üretilmiştir. Sitokrom – *b* geninin analiz sonucu genetik olarak 3 farklı grup oluşturmuştur. Grup III sadece Denizli, Grup II Erzurum, Ordu, Gümüşhane ve Sivas haplotiplerini ve Grup I ise Türkiye'nin geriye kalan bölümlerindeki haplotipleri içermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mitokondrial DNA (mtDNA); sitokrom – *b* (cyt-*b*); *Vulpes vulpes*; kızıl tilki; haplotip.

**GENETIC ANALYSIS IN TURKISH RED FOXES (*Vulpes vulpes* (L., 1758))
(MAMMALIA: CARNIVORA) WITH MITOCHONDRIAL Cytochrome – *b*
GENE SEQUENCE**

Osman İBİŞ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Science

M.Sc. Thesis, July 2009

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Coşkun TEZ

ABSTRACT

In this study, the variations of mitochondrial cytochrome – *b* gene in Turkish red foxes (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)) were investigated. Portion of the mitochondrial cytochrome – *b* (375 bp) gene was sequenced in a total of 47 red fox specimens collected from various localities in Türkiye. The sequence analysis yielded twelve different mtDNA haplotypes. Genetic distance was ranged from 0.0027 to 0.0415 and haplotype diversity was determined as 0.7373. These results suggested that Turkish red foxes were not genetically isolated from one another and there was a gene flow among them. Phylogenetic trees were generated with Parsimony and Neighbor Joining (NJ) analysis. Phylogenetic analysis of the cytochrome – *b* gene produced three genetically distinct group. Group III was only found in Denizli, Group II comprised haplotypes from Erzurum, Ordu, Gümüşhane and Sivas and Group I included haplotypes from the remaining localities of Türkiye.

Keywords: Mitochondrial DNA (mtDNA); cytochrome – *b* (cyt-*b*); *Vulpes vulpes*; red fox; haplotype.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMA ve SİMGELER	x
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Ordo: Carnivora	3
2.1.1. Evrimsel Tarihi ve Sistematığı	3
2.1.2. Fiziksel Özellikleri	5
2.1.3. Yayılışı	5
2.1.4. Habitatı	5
2.1.5. Davranış Biyolojisi.....	6
2.1.6. Beslenme Tarzları ve Besinleri	6
2.1.7. Üreme Biyolojileri.....	6
2.2. Familya: Canidae.....	7
2.2.1. Evrimsel Tarihi ve Sistematığı	7
2.2.2. Fiziksel Özellikleri	8
2.3. Genus: <i>Vulpes</i>	9
2.3.1. Taksonomisi	9

2.3.2.	Fiziksel Özellikleri	9
2.3.3.	Yayılışı ve Yaşam Alanları	10
2.4.	Moleküler Belirteç Olarak Mitokondrial DNA (mtDNA)	11
3. BÖLÜM		
MATERYAL VE METOT		14
3.1.	Örneklerin Toplanması ve Saklanması	14
3.2.	Mitokondrial DNA'nın (mtDNA) Sitokrom- <i>b</i> (<i>cyt-b</i>) Gen Bölgesi Analizi ..	20
3.2.1.	Hayvansal Dokudan Total DNA İzolasyonu.....	20
3.2.2.	Total DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	22
3.2.3.	Sitokrom- <i>b</i> Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	23
3.2.4.	PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	24
3.3.	Sitokrom- <i>b</i> Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi	26
3.4.	Kısmi Sitokrom- <i>b</i> Gen Bölgesinin DNA Dizi Analiz Verilerinin Okunması ve Değerlendirilmesi.....	26
3.4.1.	Dizilerin Hizalanması ve Düzenlenmesi	26
3.5.	Filogenetik Analizler	26
3.5.1.	Mitokondrial Sitokrom- <i>b</i> Geninin Dizi Analizi	27
3.5.2.	Uzaklık (Distance) Analizi.....	27
3.5.3.	Tutumluluk (Parsimony) Analizi	27
3.5.4.	Gen Bankasından Elde Edilen <i>Vulpes vulpes</i> Sitokrom- <i>b</i> (375 bç) Haplotipleri ile Bu Çalışmada Tespit Edilen Haplotiplerin Birlikte Analiz Edilmesi	28
4. BÖLÜM		
BULGULAR.....		29
4.1.	Kızıl Tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)'de Tespit Edilen mtDNA Haplotipleri.....	29
4.2.	Mitokondrial Sitokrom- <i>b</i> Geninin Dizi Analiz Sonuçları	34
4.2.1.	Sitokrom- <i>b</i> Geninden Elde Edilen Dizinin Yapısı ve Varyasyonu.....	34

4.2.2.	Uzaklık (Distance) Analizi	36
4.2.3.	Tutumluluk (Parsimony) Analizi	37
4.3.	Gen Bankasından Elde Edilen <i>Vulpes vulpes</i> Sitokrom- <i>b</i> (375 bç) Haplotipleri ile Bu Çalışmada Tespit Edilen Haplotiplerin Birlikte Analiz edilmesi.....	40
5. BÖLÜM		
TARTIŞMA VE SONUÇ		45
5.1.	Tartışma.....	45
5.2.	Sonuç ve Öneriler.....	50
KAYNAKLAR		52
ÖZGEÇMİŞ		57

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Toplanan örneklerin listesi, müze numarası ve koordinat bilgileri.	15
Tablo 4.1.	Türkiye’den toplanmış 47 <i>Vulpes vulpes</i> örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipinin konsensus dizisi.	29
Tablo 4.2.	mtDNA analizi sonucunda <i>Vulpes vulpes</i> örneklerinde belirlenen haplotipler	30
Tablo 4.3.	Türkiye’de yayılış gösteren <i>Vulpes vulpes</i> türüne ait 47 örnekte sitokrom- <i>b</i> geninin kısmi dizi analizi sonucu tespit edilen 12 haplotipin baz dizileri	32
Tablo 4.4.	Türkiye’den toplanmış 47 <i>Vulpes vulpes</i> örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipinin baz içeriği	34
Tablo 4.5.	Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş haplotipler arasındaki genetik uzaklığı gösteren tablo	36
Tablo 4.6.	Türkiye’den toplanmış 47 <i>Vulpes vulpes</i> örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipi ile gen bankasından elde edilmiş <i>Vulpes vulpes</i> mtDNA haplotiplerinin baz içeriğini gösteren tablo	41
Tablo 4.7.	Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş Türkiye ‘de tespit edilen ve gen bankasından alınan haplotipler arasındaki genetik uzaklığı gösteren tablo	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>Vulpes vulpes</i> 'in dünya üzerindeki yayılışı	10
Şekil 3.1.	Çalışılan 47 <i>Vulpes vulpes</i> ve dış grup olarak kullanılan üç <i>Canis aureus</i> örneğinin toplandığı yerleri gösteren harita	19
Şekil 3.2.	Total DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	23
Şekil 3.3.	PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	25
Şekil 4.1.	Türkiye'den toplanmış 47 <i>Vulpes vulpes</i> örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipinin konsensus dizisinin kromatogram görüntüsü	33
Şekil 4.2.	Türkiye'de yayılış gösteren <i>Vulpes vulpes</i> türüne ait 47 örnekte tespit edilen 12 haplotipin dağılımını gösteren harita	35
Şekil 4.3.	Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş 12 <i>Vulpes vulpes</i> haplotipi arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ (Neighbor Joining) ağacı	37
Şekil 4.4.	Strict Konsensus ağaç	38
Şekil 4.5.	Majority Rule Konsensus Ağaç	39
Şekil 4.6.	Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş 12 Türkiye <i>Vulpes vulpes</i> haplotipi ile gen bankasından elde edilmiş haplotipler arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ (Neighbor Joining) ağacı.....	44

KISALTMA ve SİMGELER

A	: Adenin
bç	: Baz Çifti
bp	: Baz Çifti
C	: Sitozin
cyt- <i>b</i>	: Sitokrom – <i>b</i>
D-loop	: Kontrol Bölgesi
dNTP	: Di Nükleotid Tri-Fosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Asit
G	: Guanin
mtDNA	: Mitokondrial DNA
NJ	: Neighbor Joining
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
T	: Timin
TAE	: Tris, Glasial Asetik Asit, EDTA
U	: Urasil
u	: Ünite
UV	: Ultraviyole

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Kızıl tilki *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758), Mammalia sınıfı içerisinde yer alan Carnivora takımının bir üyesidir. Carnivora takımı üyeleri, Antarktika kıtası dahil olmak üzere tüm kıtalarda yayılış göstermektedir [1, 2]. Asya, Afrika ve Güney Amerika kıtalarının her biri ondan fazla kanid türü barındırır. Dünyadaki 192 ülkenin 155'inde (%81) kanid türleri bulunmaktadır. Afrika ülkesi Sudan, 10 tür ile en çok kanid türü barındıran ülkedir. Bunu dokuz tür ile ABD, sekiz tür ile Etiyopya izlemektedir [2, 3]. Karayip adaları, Madagaskar, Malta ve birçok Avustralya adasında ise hiçbir kanid türü bulunmamaktadır [1, 3].

Carnivora takımı Feliformia (kedi benzeri karnivorlar) ve Caniformia (köpek benzeri karnivorlar) olmak üzere iki alttakıma ayrılmaktadır. Feliformia alttakımına ait altı familya olup bunlar, Felidae, Viverridae, Eupleridae, Nandiniidae, Herpestidae ve Hyaenidae'dir. Bunlardan Felidae, Hyaenidae ve Herpestidae'ye ait türler Türkiye'de yayılış göstermektedir [2, 4, 5]. Caniformia alttakımına ait dokuz familya olup bunlar, Canidae, Ursidae, Otariidae, Odobenidae, Phocidae, Mustelidae, Mephitidae, Procyonidae ve Ailuridae'dir. Türkiye'de bu familyalardan Canidae, Ursidae, Phocidae ve Mustelidae'ye ait türler yayılış göstermektedir [2, 5, 6].

Canidae, dünyanın geniş bir alanında yayılış gösteren *Atelocynus*, *Canis*, *Cerdocyon*, *Chrysocyon*, *Dusicyon*, *Cuon*, *Lycalopex*, *Lycaon*, *Nyctereutes*, *Otocyon*, *Speothos*, *Urocyon* ve *Vulpes* olmak üzere toplam 13 cins ve bu cinsler içerisinde bulunan toplam 35 takson ile Carnivora takımının en belirgin familyasıdır [1 - 3].

Vulpes, Canidae familyası içerisinde en çok tür sayısına ve 70 milyon km²'lik yayılış alanıyla en geniş yayılış alanına sahip cinslerden biridir [1]. Kızıl tilki *Vulpes vulpes* Kuzey Amerika'nın büyük bir kısmı, bütün Avrupa, hemen hemen tüm Asya, Kuzey Afrika ve 19. yüzyılda kıtaya getirilmesiyle Avustralya'nın büyük bir kısmında yayılış göstermektedir. Kızıl tilki, Asya, Afrika ve Güney Amerika coğrafik bölgelerinde diğer 14 kanid türüyle simpatri gösterir. Bu bölgelerin ikisinde *Canis aureus* (Linnaeus, 1758) diğer 13 kanid türüyle simpatri, gri kurt *Canis lupus* (Linnaeus, 1758) 11 kanid türü ile (üç bölgede) simpatri gösterir. Buna karşın normalde kanid yayılışı bir bölge için bir ile beş arasında sınırlıdır [1, 3].

Kızıl tilki (*Vulpes vulpes*) ile ilgili Avrupa'daki değişik ülkelerden, İsrail, Japonya ve Kuzey Amerika'dan toplanan örneklerle dayalı olarak moleküler çalışmalar yapılmış ve türün genetik yapısı ile ilgili sonuçlara ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda sitokrom - b ve D-loop (control region) ile ilgili sekans analizleri ve mikrosatelit çalışmaları yapılarak türün ve dolayısıyla türe ait popülasyonların genetik ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır [7 - 12]. Fakat *Vulpes vulpes* türünün Türkiye popülasyonları ile ilgili moleküler çalışmaya rastlanılmamıştır.

Kızıl tilki *Vulpes vulpes*, Palaearktik bölge içerisinde yer alan ülkemizde geniş yayılış göstermektedir. Türkiye'den değişik araştırmacılar tarafından birçok yayılış kaydı verilmiştir. Yapılan çalışmalar ya yayılış kaydı ya da morfolojik çalışmayı kapsamaktadır [4, 5, 13, 14]. Kızıl tilki ile ilgili yakın zamandaki en detaylı çalışma, Temizer [13] tarafından morfolojik özellikler kullanılarak yapılmıştır.

Türkiye'de yayılış gösteren memelilerle ilgili mtDNA'ya dayalı çalışmalar yakın zamana ait olup özellikle rodent ve bazı insectivor türleri üzerine yaygın çalışmalar bulunmasına rağmen karnivorlarla ilgili mtDNA'ya ait çalışmalara rastlanılmamıştır [15 - 24].

Türkiye'de yaban hayatına yeterince önem verilmemektedir. Önemli yaban hayvanlarından olan kızıl tilki *Vulpes vulpes*, insanlara uzak alanlarda yaşadıkları gibi yakın alanlarda da yaşamını sürdürebilmektedir. Hatta yerleşim alanları içerisinde bile sıklıkla rastlanılabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, türün genetik yapısı araştırılarak koruma biyolojisine katkı sağlamaktır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Ordo: Carnivora

Karnivor memeliler, predatör memelilerdendir. Genellikle koku alma duyuları çok iyi gelişmiştir ve geniş bir kafatasına sahiplerdir. Premolar ve molar dişler köpek dişlerine benzer bir şekilde değişmiştir. Genellikle alt ve üst çenede 3 parçalı kesici dişler mevcuttur. Köpek dişleri çok iyi gelişmiştir [25].

Carnivora takımı üyeleri, kutuplar ve okyanuslar dahil olmak üzere hemen hemen tüm habitatlarda yaşarlar. Beslenme biçimleri adlarının aksine sadece et yemeye dayalı değil, ayı, çakal ve tilkilerde olduğu gibi bazı gruplarda omnivorluk da mevcuttur [2, 26].

2.1.1. Evrimsel Tarihi ve Sistematığı

Carnivora takımının evrimsel tarihi ve sistematığı hakkındaki bilgi, fosil kayıtlarının yetersiz ve tam olmamasından dolayı belirsiz ve tartışmalıdır. Bu sınırlamaya rağmen memelilerin evrimsel tarihi, paleontoloji, evrimsel biyoloji ve genetik çalışmalarıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu alandaki en büyük ilerleme fosillerin kesin yaşının tespitiyle gerçekleşmiştir [26].

65 milyon yıl önce dinazorlar, dünya üzerinde dominant hayvan grubunu oluşturuyorlardı. Bu dönemde mevcut olan memeliler ise küçük vücutlu olup fare benzeri canlılardı. Dinozorların neslinin tükenmesiyle birlikte meydana gelen ekolojik boşluk memelilerin birçoğu tarafından hızlı bir şekilde doldurulmuştur. İlk memeli predatör grup, keseli memelilerdi. 30 milyon yıl boyunca karnivor keseli memeliler değişik şekil ve boyutlarda evrimleşerek güneydeki kıtalarda dominant hayvan grubu oldular [3, 26].

Aynı zamanlarda kuzeydeki kıtalarda ise plasentalı memeliler evrimleşmiştir. Bu plasentalı memelilerden sincap büyüklüğünde olan ve böceklerle beslenen Cimolestes, Carnivora evrimi için önemlidir. Cimolestes'in çene yapısı besini kesmeye uygun bir biçimde yassılaştırmış ve zamanla buradaki dişler köpek dişi şeklinde değişmişlerdir. Bu özellik, ayrılmış iki hayvan grubunda kalıtılmış, bunlardan biri modern Carnivora takımını, diğeri de Credont'lar olarak bilinen grubu vermiştir. İlk zamanlarda Credont'lar dünya et yiyicilerinin dominant grubunu oluşturmuştur. 35-55 milyon yıl önceki fosil kayıtları arasında kılıç şeklinde dişe sahip olan kedi, köpek, ayı ve sırtlan benzeri hayvanlar bulunmuştur. Fakat bunların hiçbiri gerçek Carnivora üyelerinden biri değildir. Bu zamandan sonraki fosil kayıtlarında ise daha çok Carnivora takım üyelerine ait fosillere rastlanılmıştır [26].

Credont'lar ile Carnivora arasındaki bu yer değiştirmenin sebebi tam olarak bilinmemektedir. Carnivora'da premolar dişler Credont'lara göre daha önde bulunmaktadır. Bu özellik, Carnivora takım üyelerine daha esnek bir besin tercihi sağlayarak diğer besinlerin de yenilmesine imkan sağlanmış olabilir. Credont'larda köpek dişinin arkasında diş olmaması onları sadece et yemeye mecbur bırakmış olabilir. Credont'ların iklimsel değişimler boyunca bıraktıkları fosiller bu görüşü destekler niteliktedir. Meydana gelen küresel soğuma ve mevsimsel değişiklikler avlanmayı olumsuz etkilemesine karşın meyve ve böceklerin sayısı artmıştır [26].

İlk Carnivora üyeleri miacid'ler olarak adlandırılan küçük vücutlu canlılardı. Günümüzdeki Carnivora takım üyelerinin tamamı bu gruptan evrimleşmiştir [1, 26].

Geleneksel olarak Carnivora takımı, anatomileri ve davranışları temel alınarak karasal karnivorlar (Fissipedia) ve deniz karnivorları (Pinnipedia) olarak 2 alt takıma ayrılmıştır [26]. Günümüzde bu ayırım geçerliliğini yitirmiş ve Carnivora takımı 6 familya içeren Kedi benzeri karnivorlar (Feliformia) ve 9 familya içeren Köpek benzeri karnivorlar (Caniformia) olmak üzere iki alt takıma ayrılmıştır [2]. Feliformia alttakımına dahil olan familyalar, Felidae (kediler), Viverridae (misk kedileri), Eupleridae, Nandiniidae, Herpestidae (firavun faresi) ve Hyaenidae (sırtlanlar)'dir. Caniformia alttakımına dahil olan familyalar ise Canidae (köpekler, çakallar, tilkiler vb.), Ursidae (ayılar), Otariidae (foklar, ayıbalıkları), Odobenidae (deniz aslanları), Phocidae, Mustelidae (su samurları, porsuklar, kokarcılar ve sansarlar), Mephitidae, Procyonidae (rakunlar) ve Ailuridae'dir [2].

2.1.2. Fiziksel Özellikleri

Carnivora üyelerinin vücut büyüklükleri 50 gramdan (*Mustela nivalis*) 2400 kilograma kadar (*Mirounga leonina*) değişik boyutlarda olabilir. Fiziksel görünüşlerine göre kolaylıkla ayırt edilebilirler. Karasal karnivorlar plantigrade (ayak tabanlarına basarak yürüyenler) veya digitigrade (parmaklarına basarak yürüyenler)'dirler. Uzunlar tırmanma, avlanma, koşma ve sıçrama sırasında şokları emecek biçimde evrimleşmiştir. Köprücük kemiği gelişmemiştir. Sırtlanlar hariç karnivorlarda kopulasyon sırasında görev alan ve bakulum olarak adlandırılan ince uzun bir penis kemiği vardır. Modifiye olmuş deri bezleri genellikle anal bölgede lokalize olmuştur ve buradan üretilen salgı aynı türün bireyleri arasında iletişimde ve bilgi alışverişinde kullanılmaktadır [1, 3, 26].

Karnivorların tipik diş formülü, $I3/3, C1/1, P4/4, M3/3 \times 2 = 44$ şeklinde olmakla birlikte taksonlar arasında molar ve premolar sayılarında farklılıklar mevcuttur. Köpek dişleri ve karnasial dişler genellikle büyüktür. Dördüncü üst premolar ve birinci alt molar dişlerin uç kısımları sivrilip keskinleşerek eti parçalamaya uygun bir şekilde değişmişlerdir (karnasial dişler). Tipik bir karnivor kafatası avın yakalanması ve etin koparılması için güçlü bir çeneye sahiptir [26].

2.1.3. Yayılışı

Carnivora takım üyeleri dünyanın hemen hemen tüm yerlerinde bulunurlar. Buna karşın Avustralya ve Antarktika da olduğu gibi bazı adalarda doğal olarak karasal karnivorlar bulunmaz. Buralardaki karnivorlar insan tarafından sonradan getirilerek sokulmuştur. Örneğin dingolar (*Canis lupus dingo*, Meyer, 1793) 3.500 yıl önce Avustralya'ya Asyalı denizciler tarafından getirilmiştir [1, 3, 26].

2.1.4. Habitatı

Carnivora takım üyeleri çok değişik habitatlarda yaşamaya toleranslıdır. Denizel ve karasal tüm habitatlarda bulunurlar. Sadece çok yüksek dağ zirvelerinde, ekstrem çöl şartlarının olduğu yerlerde ve çok derin okyanus çukurlarında bulunmazlar. Karasal karnivorların zamanlarının büyük kısmını yerde geçirmesine karşılık leoparlar (*Panthera pardus* (Linnaeus, 1758)) ve sansarlar (*Martes spp.*) ağaçlara tırmanmaya adapte olmuşlardır. Su samurları nehirler ve göllerde, kutup ayıları (*Ursus maritimus* (Phipps, 1774)) buz tutmuş deniz üzerinde yaşarlar. Gelincikler yer altı veya kar altında avlanabilirler. Deniz karnivorları kara üzerinde üreyip denizde avlanırlar [1, 26].

2.1.5. Davranış Biyolojisi

Çok sayıda tür içermesi, değişik habitatlara toleranslı olması, farklı diyet formları, iyi gelişmiş beyinleri, Carnivora takım üyelerine gelişmiş sosyal ilişkiler ve değişik davranışlar kazandırmıştır. Sadece primatlar sosyal karnivorlardan daha kompleks sosyal ilişkilere ve davranışlara sahiptirler [26].

Çoğu karnivor yiyecek arama sırasında soliter (tek başına)'dır (yaklaşık %85 – 90'nı) [27]. Buna karşın yapılan detaylı incelemeler sonucunda soliter olarak nitelendirilen türler her ne kadar yalnız yiyecek arasalar da bölgelerini diğer grup üyeleriyle de paylaşırlar ve bunlarla işbirliği ve iletişim içindedirler. [26].

2.1.6. Beslenme Tarzları ve Besinleri

Carnivora takım üyelerinden sadece birkaçının yalnız et ile beslenmesine karşın, takım üyelerinin geneli sadece et ile beslenmez, çeşitli besinler de yiyebilirler. Örneğin pandalar (*Ailuropoda melanoleuca* (David, 1869)) bambu ile beslenirler. Misk kedileri aynı zamanda meyve de yerler. Rakunlar hemen hemen hiç et yemezler. Mustelidae familyası üyeleri neredeyse sadece et ile beslenirler. Su samurları balık, kerevit, kurbağa vb. ile, porsuklar toprak solucanları ile beslenirler. Firavun fareleri, başlıca böcekleri yemesinin yanı sıra bazı türlerinin yılan avladıkları bilinmektedir. Felidae üyeleri de etçil canlılardır. Büyük kediler muhtemelen tüm predatörler içerisinde en başarılı olan gruptur. Ayılar, misk kedileri, köpekler ve sırtlanlar daha çok omnivor canlılardır. Bununla birlikte misk kedileri hariç hepsinin sadece et yiyen grupları da mevcuttur. Kutup ayıları, Afrika vahşi köpekleri, benekli sırtlanlar et dışında çok nadir başka şeyler yerler. Boz ayılar, kahverengi sırtlanlar (*Hyaena brunnea* (Thunberg, 1820)) ve çakallar tamamen omnivorlardır. Deniz karnivorları, balıklar, yumuşakçalar, kabuklu hayvanlar ve penguenler gibi çeşitli deniz hayvanlarıyla beslenirler [26, 27].

2.1.7. Üreme Biyolojileri

Çiftleşme davranışları sosyal davranışların en karmaşık, gelişmiş ve çeşitli olanıdır. Karnivorlar altrikal (bakıma muhtaç) olarak doğar, gelişmek ve hayatta kalabilmek için yetişkinlerin himayesine ihtiyaç duyarlar. Karnivorlarda temelde, monogami (tek eşlilik) ve poligami (çok eşlilik) olmak üzere iki tip çiftleşme tarzı vardır. Monogamide bir erkek bir dişiyle çiftleşir, poligamide ise bir erkek birkaç dişiyle ve/veya bir dişi birkaç erkekle çiftleşebilir. Poligami, monogamiye göre daha yaygındır. Her bir erkek

kendi bölgesindeki dişilerle çiftleşir. Monogamilik her iki cinsiyette de karakteristiktir ve sıklıkla daha büyük yavrular genç yavruların yetiştirilmesine, beslenmesine ve korunmasına yardım ederler. Eşeyssel dimorfizm görülmez. Poligami görülen türlerde erkekler genellikle dişilerden daha büyüktür ve aslanlarda olduğu gibi dişiye cezpedecek donanımlara sahiptirler. Genç bireylerin yetiştirilmesinde yardımlaşma daha az yaygındır. Fakat bazı poligamik sosyal türlerde yardımlaşma vardır. Örneğin dişi aslanlar gruptaki diğer dişilerin yavrularını emzirirler [1, 26].

Birçok karnivor türü zamanlarının büyük kısmını yalnız geçirirler. Bu yüzden çiftleşmeye hazır dişilerin bunu belli etmesi önemlidir. Bunun için idrarlarıyla ve anal salgılarıyla koku bırakmak karnivorlarda son derece yaygındır [26].

Küçük hayvanlar, büyük hayvanlara göre daha hızlı metabolik aktiviteye ve daha hızlı üreme kapasitesine sahiptirler. Küçük karnivorlar üç ayda eşeyssel olgunluğa ulaşabilir ve tek seferde 6 yavru doğurabilirler. Buna karşın daha büyük karnivordan aslanlar üç buçuk yılda tek doğum yapar ve her seferde üç ya da dört yavru doğururlar. Yavrular ancak üç yaşında eşeyssel olgunluğa ulaşırlar. Bununla birlikte eğer bir dişi tüm yavrularını kaybederse hemen hızlı bir şekilde tekrar çiftleşmeye hazır duruma gelir [26, 27].

2.2. Familya: Canidae

Canidae orta büyüklükte karnivordandır. Kurtlar, çakallar, tilkiler, köpekler bu grubun üyeleri arasındadırlar. 13 cins ve 35 tür içeren bir gruptur. [2].Siyah, kahverengi veya kırmızı renkte veya tonlarında olabilen bir kürke sahiptirler. Koşmaya uygun yapıda bacakları, koparma ve öğütmeye uygun dişleri olan predatör grupturlar. 1-75 kg arasında değişebilen vücut büyüklüğüne sahiptirler [1, 26].

2.2.1. Evrimsel Tarihi ve Sistematığı

Fosil kayıtları, köpek benzeri hayvanların 50 milyon yıl önce evrimleştiğini göstermektedir. Günümüzdeki kanidlere uygun anatomik yapılarla ilgili en eski fosil kaydına (10 milyon yıl yaşında) Kuzey Amerika'da ulaşılmıştır. 7 milyon yıl yaşındaki kafatası fosilleriyle günümüz kanidlerine ait kafatasları yeterli derecede benzerlik taşımaktadır. Kabul gören yaygın görüşe göre kanidlerin Asya, Avrupa ve Afrika'ya kolonizasyonu aynı yıllarda olmuştur [1, 26].

2.2.2. Fiziksel Özellikleri

Canidae familyası üyelerinin vücut büyüklükleri 1-75 kg arasında değişmektedir. Kürk rengi ve desenlenmesi önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Siyah, siyah-beyaz, kahverengi ve kızıl renk grup üyeleri arasında oldukça yaygın bir kürk rengidir. Uzun bacaklara sahiptirler. Bu sayede avlanma sırasında hızlı koşabilirler. Tipik olarak ön ayaklarda beş, arka ayaklarda dört parmak mevcuttur. Dördüncü parmak bacak üzerinde, körelmiş bir organ şeklindedir ve yere değmez. Bu parmak Afrika vahşi köpeğinde tamamen kaybolmuştur [1, 26].

Çene ve dişler, avı kavrama ve çiğnemeye uygun şekilde değişmiştir. Diş formülleri *Speothos venaticus* (Lund, 1842) (çalı köpeği) hariç $3/3 \ 1/1 \ 4/4 \ 2/3$ şeklindedir. Alt çenedeki son premolar ve üst çenedeki ilk molar diş besini daha iyi parçalayabilmek için köpek dişi şeklinde değişmiştir. Molarlar öğütmeye uygun bir yüzeye sahiptirler ve bu sayede de kemik ya da sebze gibi besinleri öğütebilirler. Sindirim sistemleri basit yapıda olup vücut büyüklüğünün beş katı uzunluğundadır. Yüksek organizasyonlu karnivorlarda bu sistem biraz daha kısadır. Kurt gibi birçok kanid, besinini hızlı bir şekilde yutar. Yavrular besinlerini yedikten 12 saat sonra kusarlar. Bunun sebebi açık olmamakla birlikte sindirime yavaş bir uyum sonucu ya da yutulan büyük parçalar sebebiyle meydana geliyor olması olabilir [1, 3, 26].

Kanidler, iyi bir koku alma duyusuna ve keskin bir görüğe sahiptirler. Fakat çubuk reseptörlerinin koni reseptörlere göre oldukça fazla olmasından dolayı renkleri daha az ayırt edebilirler. Buna karşın düşük ışıktaki görme kabiliyetleri daha fazladır ve bu yüzden birçok tür gece avlanır. Duyma kabiliyetleri de oldukça gelişmiştir [26].

Kanidler Antarktika ve Avustralya dahil tüm kıtalarda yayılış göstermektedirler. Canidae üyeleri, kalıcı buz kütlelerinin olduğu bölgeler ve yağmur ormanlarının da dahil olduğu hemen hemen tüm habitatlarda bulunurlar. Birkaç kanid türü özellikle de tilki türlerinden bazıları çöllerde yaşarlar. Gri kurt (*Canis lupus* (Linnaeus, 1758)) tundralarda buzulla kaplı alanlar, kuzey ormanları (boreal ormanları), Sinai (Sina) ve Kuzey Meksika çöllerini de içine alan çok geniş bir alanda yayılış gösterir [26].

Birçok Canidae üyesi ihtiyaç duydukları kalorinin büyük bir kısmını avladıkları memelilerden karşılamaktadırlar. Bazı zamanlarda bazı türler için meyve, böcek ve diğer omurgasızlar da önemli bir besin grubunu oluşturur. Her kanid türü fare ve sıçan

büyükliğünde avlar gördükleri zaman onları yakalamaya çalışır. Kurtlar için fareler tamamlayıcı besin kaynaklarıdır. Aynı zamanda fareler birçok tilki türünün besin grubunun merkezinde bulunur. Ayrıca kanid türleri rodentleri yakalamak için özel davranışlar geliştirmişlerdir. Özellikle yer altında yeni doğmuş fare veya sıçan yavrusu tespit ederlerse her iki ön ayaklarıyla hızlı bir şekilde yuvayı kazıp avlarını yakalarlar. Tavşanlar tipik olarak her kanidin av listesinde bulunur. Canidae üyelerinin hemen hemen hepsi meyve de yerler. Ayrıca omurgasızlar, tilkilerin besin grubu arasındadır [1, 3, 26].

2.3. Genus: *Vulpes*

Species: *Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758

2.3.1. Taksonomisi

Canis vulpes Linnaeus, 1758. Syst. Nat., 10th ed., 1:40.

Tip yeri: İsveç (Uppsala) [28].

Kuzey Amerikan kızıl tilkisi *Vulpes fulva*, önceleri ayrı bir tür olarak değerlendirilmiş, fakat günümüzde palearktık kızıl tilkisi *Vulpes vulpes* ile türdeş olduğu anlaşılmıştır. Kızıl tilkinin pek çok alttürü, coğrafi varyasyonlara dayanarak tanımlanmıştır. Fakat bunların birçoğunun durumu belirsizdir [26].

Kromozom sayısı: Kızıl tilki *Vulpes vulpes*, diploid sayıda 34 kromozoma ve üç ile beş arasında mikrozoma sahiptir [3, 29].

2.3.2. Fiziksel Özellikleri

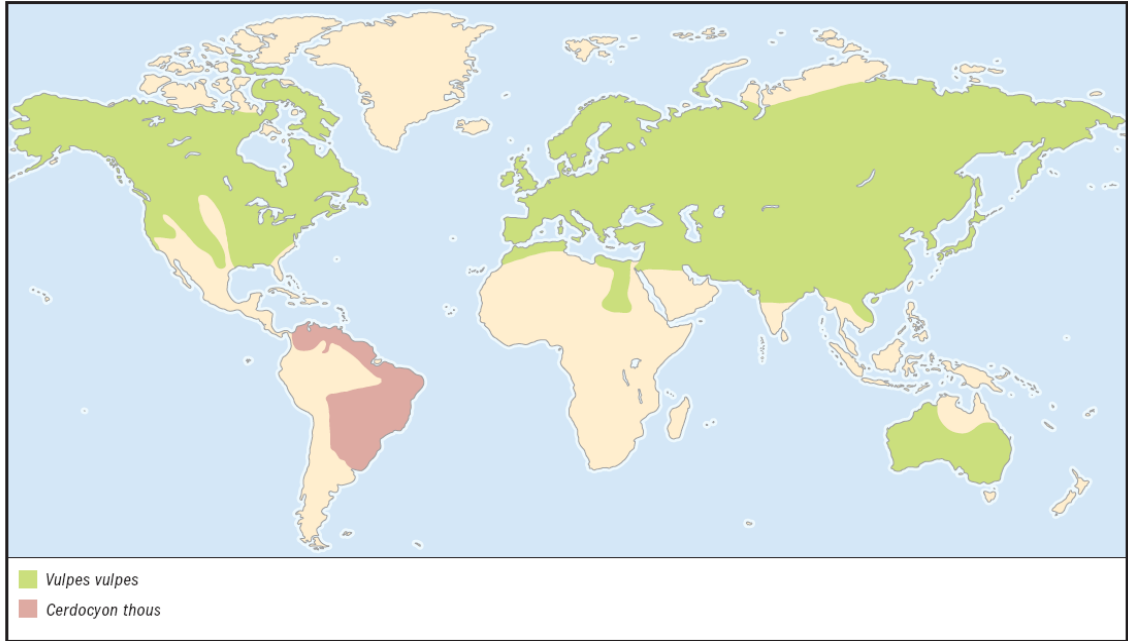
Orta boyutlu kanidlerdir. *Vulpes vulpes*, cins içerisindeki en büyük vücutlu grubu oluşturmakta ve yetişkin vücut ağırlığı 3 – 14 kg arasında değişmektedir. Erkek bireyler genellikle dişilerden daha büyüktürler. Avrupa kızıl tilkilerinde erkek bireyler ortalama olarak 6,7 kg, dişi bireyler ise ortalama olarak 5,4 kg'dır. Orta doğu çöllerindeki kızıl tilkiler, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki kızıl tilkilerden daha küçüktürler. Kuzey Amerika kızıl tilkilerinde eşeyssel dimorfizm açık bir şekilde görülür [1, 3, 26].

Dudağın üst kısmında beyaz bir bölge bulunan ince bir ağza sahiptirler. Burun uzun, köpek dişleri uzun ve sivridir. Molar dişler çok geniş değildir. Diş formülleri $3/3, 1/1, 3/4, 3/3 = 42$ şeklindedir. Kulaklar, geniş, sivri uçlu, kalkık ve arka kısmı siyah renklidir. Kürk, kırmızımsı kahverengidir, fakat renk kahverenginden koyu kırmızıya

veya sarımtırak griye kadar çok çeşitli tiplerde olabilir. Boyun ve/veya göğüs beyaz renkli olabilir. Bacaklar uzun ve ince, bacakların alt kısmı siyah renklidir. Kuyruk uzun, kalın ve yoğun bir şekilde kıllarla kaplıdır. Bazen kuyruğun uç kısmı beyaz olabilir. Yetişkin bir kızıl tilkinin baş ve vücut uzunluğu, 455 – 900 mm arasında, kuyruk uzunluğu 300 – 555 mm omuz yüksekliği 350 – 400 mm arasındadır [3, 26].

2.3.3. Yayılışı ve Yaşam Alanları

Kuzey yarımkürede kuzey kutup dairesinden kuzey Afrika'ya, Amerika kıtasının ortasına ve Asya steplerine kadar dahil olan yaklaşık 70.000.000 km²'lik bir coğrafik alanda yayılış gösterir. Avustralya'ya 1800'lü yıllarda insan tarafından sokulmuştur. Ayrıca Avrupa alttürleri de 17. Yüzyılda kuzey Amerika'nın doğusuna ve Kanada'ya getirilmiş ve akabinde buradaki yerli alttürlerle karışmıştır. İzlanda, arktik adalar, Sibiry'a'nın bazı bölgelerinde veya ekstrem çöl şartlarının hakim olduğu bölgelerde bulunmaz [3, 26].



Şekil 2.1. *Vulpes vulpes*'in dünya üzerindeki yayılışı [26]

Yaşam alanları olarak, tundralar, çöller, ormanlar ve şehir merkezlerinin de dahil olduğu çeşitli yerlerden kayıtlar verilmiştir. Doğal habitatları, kurak, karma araziler, makilikler ve ormanlık alanların kıyı kesimleridir. Ayrıca bozkırlar, dağlık bölgeler ve tarımsal arazilerde de bol miktarda bulunurlar. Deniz seviyesinden 4500 m yüksekliğe kadar

olan yerlerde yaşayabilirler. Yoğun ormanla kaplı bölgelerde nadir olarak bulunurlar [3, 26].

Kızıl tilkilerde başlıca monogami ve teritoriallik görülür. Erkekler, belli sezonlarda çiftleşmeye uygun duruma gelirler. Çiftleşme, genelde aralık – şubat ayları gibi gerçekleşir. Dişilerin çiftleşmeye uygun olma durumları üç gün sürer. Yavrular toprak altındaki yuvalarda genelde mart – mayıs aylarında gebeliğin 50. günlerinde doğarlar. Doğum ağırlığı yaklaşık olarak 100 gram kadardır. Yavrular ebeveynlerinin bölgelerinde kalırlar. Katı besinleri yemeye üç haftalık oldukları zaman başlarlar. 10 – 12 haftalık oldukları zaman avlanmaya çıkabilirler. Fakat kendi başına avlanabilmesi için yaklaşık olarak 9 – 12 aylık olmaları gerekir. Tilkiler, avlanmaya genelde yalnız çıkarlar. Eşeyssel olgunluğa 9. – 10. aylarda ulaşırlar. Temel olarak nokturnal ve krepuskulardır. Buna karşın rahatsız edilmediklerinde diurnalite de yaygın olarak görülür [3, 26].

Kızıl tilkiler değişik besin çeşitlerine uyum sağlayabilen oportunistik omnivorlardır. Besin çeşitleri arasında omurgasızlar (toprak solucanları, böcekler vb.), memeliler, kuşlar (avcı kuşlar dahil) ve çeşitli meyveler bulunur. Ayrıca kırsal ve kentsel kesimlerde leş ve çöpleri de yerler. Başlıca besin grubu arasında rodentler ve tavşanlar bulunur. Günlük olarak ortalama 500 gram besine ihtiyaç duyarlar [3, 26].

2.4. Moleküler Belirteç Olarak Mitokondrial DNA (mtDNA)

Moleküler yöntemler, populasyon ya da bireyler arasındaki var olan benzerlik ya da farklılıkların saptanmasında ve taksonomik birimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla moleküler yöntemlerin kullanılması 1960'lara dayanmaktadır. Populasyon ve türlerin genetik çeşitliliği, polimorfizm ve heterozigotluk seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan ilk moleküler yöntemleri protein ve allozim elektroforezi oluşturmaktadır [30, 31]. Kullanılan moleküler yöntemlerden etkili bir tanesi de DNA dizi analizi yöntemidir. Son zamanlarda moleküler filogenetik çalışmalarda mtDNA'daki dizi farklılıklarının analizi yoğun olarak kullanılmaktadır [32]. mtDNA molekülü bireyler, populasyonlar ve türler arasındaki evrimsel ilişkinin belirlenmesinde etkili bir moleküldür [33]. Bu amaçla mtDNA'nın ilk olarak kullanımı 1980'lerde başlamıştır [34].

Mitokondri, tüm çekirdekli memeli hücrelerinde bulunan maternal kalıtmalı, çift zarlı kendine ait DNA'sı olan bir hücre içi organelidir. Hücre içi haberleşmede, planlanmış hücre ölümünde, krebs ve trikarboksilik asit döngüsünde ve lipid, amino asit, kolesterol, steroid ve nükleotid metabolizmalarında rol alır. Mitokondri, ayrıca hücrenin enerji metabolizmasında da temel işlevi görür [34].

Hayvansal mitokondrial DNA (mtDNA), küçük, halkasal, çift sarmal yapıda çıplak bir DNA molekülüdür. Uzunluğu memelilerde yaklaşık olarak 16.6 kilo baz çifti kadardır ve aerobik solunumla ilgili genleri taşımaktadır [34]. Omurgalılarda 22 tane tRNA, 2 tane rRNA ve oksidatif fosforilasyon ve elektron taşıma sisteminde görev alan proteinleri kodlayan 13 tane mRNA kodlayan, toplam 37 tane gen bölgesi taşır. Sadece 1 tane 1.1 kilo baz çifti büyüklüğünde kodlama yapmayan, mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun başlaması ve düzenlenmesinde görev alan kontrol bölgesi olarak adlandırılan (D – loop) bir bölge taşır [30].

Mitokondrial DNA'nın moleküler çalışmalarda etkili bir araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmasının çeşitli sebepleri vardır. Her bir hayvan hücresinde hücre tipine bağlı olarak 100 ile 100.000 arasında mitokondri bulunmaktadır. Her bir mitokondride 2 ile 10 arasında mtDNA molekülü vardır. Sonuç olarak nispeten dokulardan mtDNA izolasyonu kolay olmaktadır. Ayrıca mtDNA molekülü halkasal yapıda ve ikili sarmal tek bir DNA molekülünden oluştuğu için çekirdek DNA molekülünde homolog kromozomlar arasında gerçekleşen parça değişimi (cross-over) meydana gelmemektedir. Böylece de yavru döllerde yeni kombinasyonlar oluşmamaktadır. Meydana gelen nükleotid farklılıkları yavru döllere eklemeli olarak aktarılmaktadır. mtDNA molekülü memeli hayvanlarda anaya ait kalıtım modeliyle (maternal kalıtım) kalıtılır. Bu sayede geçmişe dönük takipler yapılabilmektedir. Diğer bir özelliği de mtDNA molekülünün evrim hızının çekirdek DNA molekülünün evrim hızından daha yüksek olmasıdır. Memelilerde bu oran çekirdek DNA'sından 5 – 10 kez daha fazladır ve ortalama değişme oranı bir milyon yılda % 2'dir. Bunun sebebi mtDNA molekülünün oksijen radikallerine daha fazla maruz kalması, koruyucu ve tamir mekanizmalarının bulunmamasıdır. Bu yüzden mtDNA molekülü mutasyona daha açıktır. mtDNA üzerindeki her bir gen bölgesinin evrim hızı farklıdır [34].

mtDNA üzerinde bulunan, ND6 ve tRNA^{ser} gen bölgeleri arasında yer alan sitokrom – *b* gen bölgesi, oksidatif fosforilasyonda görev alan bir proteini kodlayan, yaklaşık 1140 baz çifti uzunluğunda bir gen bölgesidir. Sitokrom – *b* gen bölgesi, tür altı kategoriler dahil tüm taksonomik grupların tanımlanmasında çok etkili bir moleküler araçtır. Sitokrom – *b* gen bölgesi filogenetik çalışmalarda etkili bir araç olmasının çeşitli sebepleri bulunmaktadır. Bunlardan biri bu gen bölgesinin memeli takımlarında kolay bir şekilde protein kodlayan dizi şeklinde düzenlenebilmesidir. Diğer bir özelliği ise diğer gen bölgelerine oranla daha çok korunmuş bir bölge olması yani evrimleşme hızının düşük olmasıdır. Bu sayede taksonların filogenetik ilişkilerini çok iyi bir şekilde yansıtmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı sitokrom – *b* gen bölgesindeki dizi farklılıkları türlerin, cinslerin ve familyaların karşılaştırılmasında yoğun olarak kullanılmaktadır [33].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Bu çalışmada mtDNA'nın sitokrom – *b* gen bölgesinin bir kısmının dizi analizinde kullanılan kızıl tilki (*Vulpes vulpes*) dokuları, herhangi bir canlı hayvanın yaşamı sonlandırılmadan tamamen kara yollarında motorlu taşıtlar tarafından çarpma sonucu kaza ile ölmüş örneklerden 2002-2008 yılları arasında toplanmıştır. Alınan doku örnekleri etiketlenerek % 99'luk etil alkol tüpleri içerisinde +4 °C'de, Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde muhafaza edilmektedir. Çalışma sırasında toplam 47 birey kullanılmıştır (Tablo 3.1, Şekil 3.1). Örneklerin alındığı yerin koordinatları tarih ve adres bilgileri arazi defterine kaydedilmiştir. Yapılan çalışma sırasında kullanılan metodun hayvan hakları ve hayvan deneyleri etiğine uygunluğu, Erciyes Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Tablo 3.1. Toplanan örneklerin listesi, müze numarası ve koordinat bilgileri.

Haritada Lokalite Kodu	Müze No / Eşey	Takson Adı	Doku tipi	Lokalite	Koordinatlar	Tarih
1	536 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Özlüce/Boğazlıyan/ YOZGAT	39° 29' 185" N 35° 04' 298" E 1099 m	23.07.2007
2	538 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas	Boğazkale/ ÇORUM	39° 56' 087" N 34° 42' 963" E 1215m	23.07.2007
3	539 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Kızılırmak/ ÇANKIRI	40° 21' 169" N 33° 58' 767" E 555m	23.07.2007
4	587 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Bahadin/Sarıkaya/ YOZGAT	39° 36' 066" N 35° 15' 707" E 1123m	28.07.2007
5	589 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Yeniyapan/Keskin / KIRIKKALE	39° 35' 319" N 33° 42' 013" E 922m	31.07.2007
6	610 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Kandıra/ KOCAELİ	41° 04' 907" N 30° 10' 238" E 41m	05.08.2007
7	627 E	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Kemerhisar/Bor/ NİĞDE	37° 45' 509" N 34° 34' 032" E 1128m	20.08.2007
8	637 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	KARABÜK	41° 09' 810" N 32° 38' 428" E 304m	23.08.2007
9	660 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Bozca/Avanos/ NEVŞEHİR	38° 44' 331" N 35° 02' 312" E 1048m	05.09.2007
10	661 D	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk + Dil	Avanos/ NEVŞEHİR	38° 41' 409" N 34° 48' 850" E 1012m	05.09.2007
11	663 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	KONYA	38° 01' 340" N 32° 51' 829" E 1001m	05.09.2007
12	664 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	KONYA	37° 53' 613" N 32° 09' 022" E 1565m	05.09.2007

Tablo 3.1.'in devamı.

13	668 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	ISPARTA	39° 03'203" N 31° 25'615" E 1200m	06.09.2007
14	669 E	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Dikici köyü/Dinar/ AFYON	38° 00'140" N 30° 11'522" E 940m	07.09.2007
15	706 ?	<i>Vulpes</i>	Kuyruk	ISPARTA	37° 52'539" N 30° 30'730" E 935m	09.09.2007
16	707 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Eğirdir/ ISPARTA	37° 50'753" N 30° 51'579" E 922m	09.09.2007
17	708 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Çarıklı / NİĞDE	38° 11'639" N 34° 59'174" E 1368m	22.09.2007
18	733 E	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	YOZGAT	39° 48'504" N 34° 46'330" E 1204m	27.10.2007
19	760 D	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk + Kas	TOKAT	40° 03'833" N 36° 29'187" E 1143m	08.06.2008
20	763 E	<i>Vulpes</i>	Kulak	Çamlıbel/ TOKAT	40° 04'261" N 36° 29'011" E 1132m	09.06.2008
21	777 ?	<i>V. vulpes</i>	Dil	AMASYA	40° 41'779" N 35° 48'765" E 408m	11.06.2008
22	803 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas	Arguvan/ MALATYA		22.06.2008
23	821 D	<i>V. vulpes</i>	Kulak	Bekdiğin/Havza/ SAMSUN	40° 59'861" N 35° 46'125" E 725m	29.06.2008
24	923 E	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk + Kas	Taşköprü/Babaeski / KIRKLARELİ		13.07.2002
25	924 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk + Kas	Eğirdir/ ISPARTA		02.08.2002
26	925 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	Tavas / DENİZLİ		02.08.2002

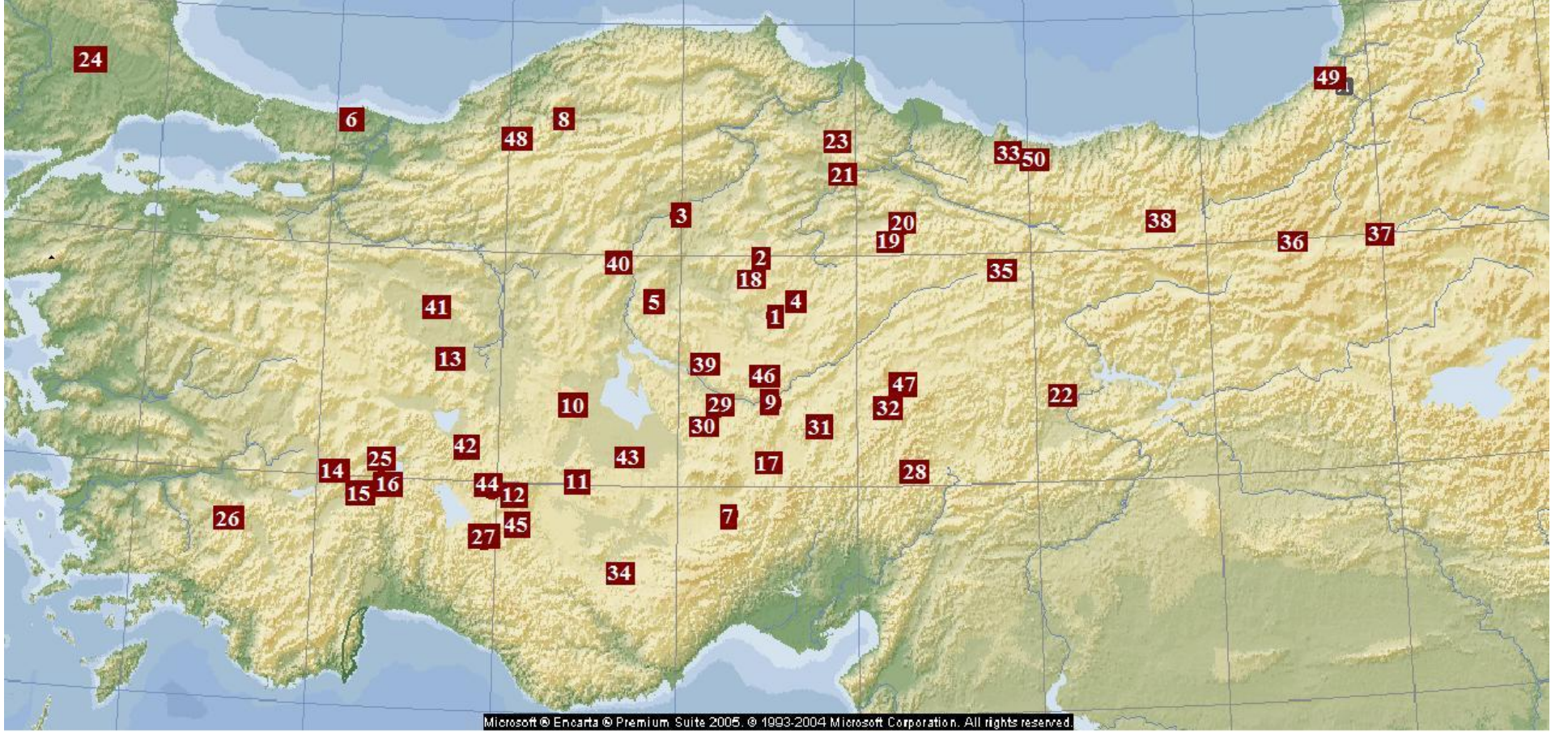
Tablo 3.1.'in devamı.

27	926 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk	20.km G. Konya-Seydişehir yolu KONYA		01.07.2003
28	927 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas	Kanlıkavak/Göksun / K.MARAŞ		11.08.2003
29	933 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk + Tüberkü lül	Acıgöl/ NEVŞEHİR	38° 32'691'' N 34° 29'174'' E 1264m	08.07.2008
30	934 ?	<i>V. vulpes</i>	Kuyruk + Kulak	AKSARAY	38° 30'969'' N 34° 21'098'' E 1227m	08.07.2008
31	952 ?	<i>V. vulpes</i>	Kulak	Erciyes Dağı / KAYSERİ	38° 31'587'' N 35° 31'566'' E 2215m	11.07.2008
32	953 ?	<i>V. vulpes</i>	Kulak	Pınarbaşı/ KAYSERİ	38° 41'848'' N 36° 21'790'' E 1546m	11.07.2008
33	954 D	<i>V. vulpes</i>	Böbrek	Karakoca/Ulubey / ORDU		23.12.2007
34	1017 D	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	Kayaönü mah. / KARAMAN	37° 14'318'' N 33° 21'128'' E 1039m	29.07.2008
35	1027 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	Zara / SİVAS	39° 51'772'' N 37° 37'428'' E 1340m	18.08.2008
36	1045 ?	<i>V. vulpes</i>	Yanak	Ilıca / ERZURUM	39° 58'751'' N 40° 56'382'' E 1881m	20.08.2008
37	1046 ?	<i>V. vulpes</i>	Üst dudak	Horasan/ ERZURUM	40° 00'299'' N 41° 57'455'' E 1594m	21.08.2008
38	1070 D	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	Kelkit/ GÜMÜŞHANE	40° 14'022'' N 39° 27'077'' E 1723m	29.08.2008
39	1096 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	KIRŞEHİR	39° 05'094'' N 34° 16'287'' E 1200m	03.09.2008

Tablo 3.1.'in devamı.

40	1097 ?	<i>V. vulpes</i>	Kulak	Elmadağ/ ANKARA	39° 55'348" N 33° 15'923" E 1072m	05.09.2008
41	1100 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	ESKİŞEHİR	39° 30'058" N 31° 13'424" E 1028m	05.09.2008
42	1107 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	İlgin / KONYA	38° 18'062" N 31° 39'356" E 1080m	07.09.2008
43	1108 ?	<i>V. vulpes</i>	Kulak	Eşmekaya/ AKSARAY	38° 15'152" N 33° 28'976" E 971m	07.09.2008
44	1111 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	Beyşehir/ KONYA	37° 54'691" N 31° 56'955" E 1270m	10.09.2008
45	1122 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	KONYA	37° 45'674" N 32° 12'683" E 1328m	14.09.2008
46	1137 ?	<i>V. vulpes</i>	Kas + Kulak	Çalış/ NEVŞEHİR	38° 58'846" N 34° 54'890" E 1316m	25.10.2008
47	1160 ?	<i>V. vulpes</i>	Kulak	Pınarbaşı / KAYSERİ		06.02.2009
48	638 D	<i>C. aureus</i>	Kuyru k	Devrek/ ZONGULDAK	40° 58'149" N 32° 04'596" E 675m	25.08.2007
49	856 D	<i>C. aureus</i>	Kulak	Arhavi / ARTVİN	41° 18'993" N 41° 14'284" E 4m	01.07.2008
50	1252 D	<i>C. aureus</i>	Karac iğer	Karakoca/Ulubey/ ORDU		28.12.2008

D: Dişi, E: Erkek, ?: Cinsiyeti belirlenemeyen



Şekil 3.1. Çalışılan 47 *Vulpes vulpes* ve dış grup olarak kullanılan üç *Canis aureus* örneğinin toplandığı yerleri gösteren harita.

3.2. Mitokondrial DNA'nın (mtDNA) Sitokrom - b (cyt-b) Gen Bölgesi Analizi

Türkiye'nin değişik lokalitelerinden toplanan *Vulpes vulpes* türüne ait 47 bireyden alınan ve etil alkolde saklanan değişik dokulardan total DNA elde edilmiştir. Total DNA izolasyonu için bu konuda yapılan çalışmalarda da belirtilen QIAGEN adlı firma tarafından üretilmiş ve ticari olarak satılmakta olan QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit kullanılmıştır. Bu çalışmada total DNA izolasyonu sırasında kit ile birlikte gönderilen protokol takip edilmiştir.

3.2.1. Hayvansal Dokudan Total DNA İzolasyonu

Tüm santrifüj aşamaları oda sıcaklığında (15 – 25 °C) gerçekleştirilmiştir.

Vorteks işlemi 5 – 10 saniye arasında yapılmıştır.

Gerekli olması durumunda Buffer AL ve Buffer ATL 56 °C'ye ısıtılarak tekrar çözünür.

Kitin ilk kullanımında Buffer AW1 ve AW2'ye % 99.9'luk Etanol eklenmiştir.

İzolasyona başlamadan önce thermal block 56 °C'ye ayarlanmıştır.

Steril 1.5 ml'lik ependorf tüpleri etiketlenerek hazırlanır.

Kitle birlikte gelen DNeasy Mini spin column ve koleksiyon tüpleri etiketlenir.

Etil alkolde saklanan dokulardan 25 mg'dan fazla olmayacak şekilde etiketlenmiş tüplere alınır.

Lizis aşamasının daha etkili olabilmesi için alınan doku parçaları daha küçük parçalara bölünür.

Üzerine 180 µl ATL Buffer eklenir ve tüpler vortekslenir.

20 µl Proteinaz K eklenir ve vortekslenir.

Bu ependorf tüpleri daha önce +56 °C'ye ayarlanmış thermal block'a alınır.

Dokular tamamen lizis oluncaya kadar burada bekletilir (yaklaşık 3 – 4 saat).

Bu süre boyunca ependorf tüpleri düzenli aralıklarla (25 – 30 dk) vortekslenir.

Tamamen lizis olan örnekler thermal blockdan alınır ve yaklaşık 15 saniye vortekslenir.

Üzerine 200 µl AL Buffer eklenir ve vortekslenir.

200 µl % 96 – 100'lük etanol eklenir ve vortekslenir.

Homojen bir solüsyon elde etmek için Buffer AL ve etanol mümkün olduğunca çabuk eklenmeli ve tüpler vortekslenmelidir.

Elde edilen karışım önceden hazırlanmış DNeasy Mini spin column'a pipetlenir ve spin columnlar 2 ml'lik koleksiyon tüpleri içerisine yerleştirilir.

DNeasy Mini spin columnlar 6.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilir.

Altta biriken sıvı ve koleksiyon tüpü atılır.

DNeasy Mini spin column yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpü içerisine yerleştirilir.

Üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenir.

DNeasy Mini spin columnlar 6.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilir.

Altta biriken sıvı ve koleksiyon tüpü atılır.

DNeasy Mini spin column yeni bir 2ml'lik koleksiyon tüpü içerisine yerleştirilir.

Üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenir.

DNeasy Mini spin columnlar 20.000 rcf'de 3 dakika santrifüj edilir.

Spin column dikkatli bir şekilde sıvıya değmeden alınır.

Altta biriken sıvı ve koleksiyon tüpü atılır.

DNeasy Mini spin column membranının kuru olması önemlidir. Buradan taşınacak olan etanol ileriki safhalar için olumsuz sonuç doğurabilir.

Etanolün membran ile teması halinde DNeasy Mini spin columnlar tekrar 6.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilir.

DNeasy Mini spin columnlar önceden etiketlenmiş 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisine yerleştirilir.

Doğrudan membran üzerlerine 200 µl Buffer AE eklenir.

DNeasy Mini spin columnlar oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılır.

6.000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilir.

İstenilmesi durumunda bu basamak tekrarlanabilir.

DNeasy Mini spin column atılır ve ependorfta biriken sıvı +4 °C'de saklanır.

Uzun süreli saklamak için tüpler -20 °C'ye alınır.

Yapılan işlemler sonucu Total DNA'nın elde edilip edilmediğinin anlaşılması için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır.

3.2.2. Total DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Total DNA % 0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Bunun için bir erlen içerisine 1.2 gram agaroz konur ve üzerine 150 ml 0.5X TAE (Trisma Base, Glacial Asetic Acid, EDTA) çözeltisi eklenerek karıştırılır.

Elde edilen karışım mikrodalgada agaroz tamamen çözünene kadar ısıtılır.

Agaroz tamamen çözüldükten sonra üzerine 10 mg/ml'lik Ethidium Bromide çözeltisinden 9 µl eklenir.

Manyetik karıştırıcıda karışım 50 – 55 °C'ye gelinceye kadar karıştırılır.

Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilir ve karışım yavaşça dökülür.

Agaroz jel tamamen donuncaya kadar beklenir ve donduktan sonra taraklar dikkatlice jelden alınır.

Elektroforez tepsi elektroforez tankına yerleştirilir ve üzerine jeli tamamen kaplayacak kadar 0,5X TAE çözeltisi eklenir.

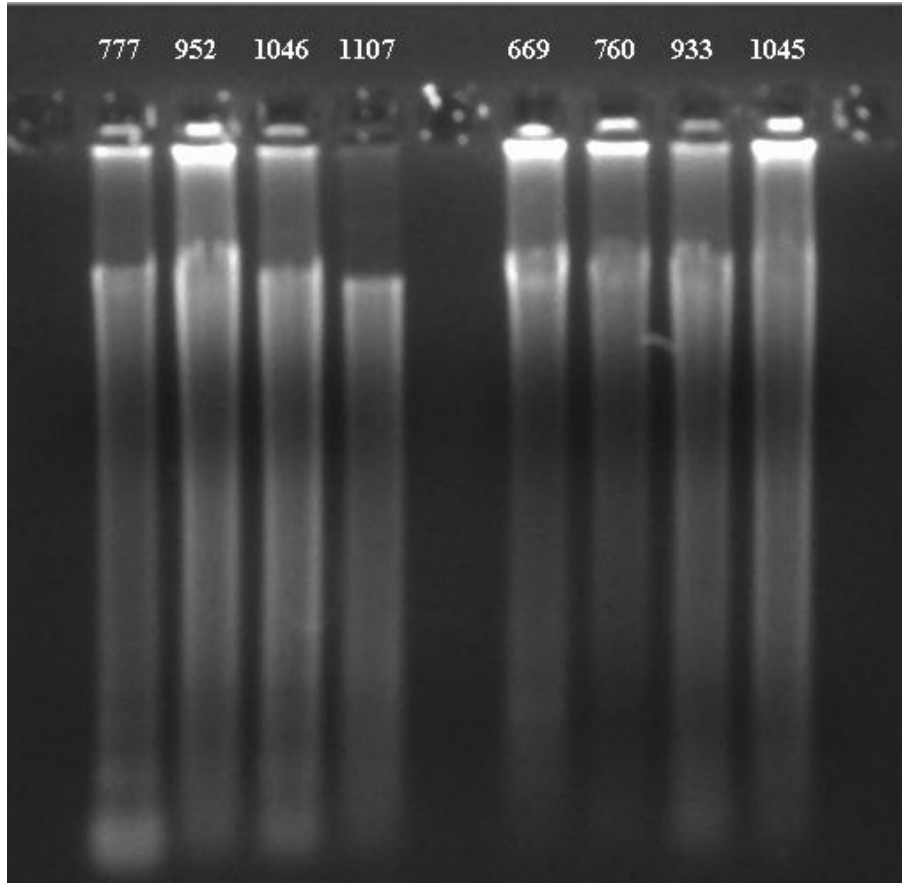
Elde edilen total DNA'dan 10 µl alınıp temiz bir PCR tüpüne konur ve üzerine 2 µl 6X Loading Dye (% 40'luk sükröz, xylene cyanol FF ve Bromophenol Blue) eklenir, pipetle karıştırılır.

Karışım jelde açılan kuyucuklara pipetlenir.

Bir kuyucuğa 6 µl 100 bp DNA Ladder konulur.

Jele 80 volt doğrusal akım verilerek örneklerin jel üzerinde, elektriksel alanda 60 dakika yürümesi sağlanır.

Süre sonunda jel elektroforez tankından çıkarılıp görüntüleme cihazına yerleştirilir ve UV altında görüntülenip fotoğrafı çekilir (KODAK Gel Logic 1500 jel görüntüleme sistemi) (Şekil. 3.2).



Şekil 3.2. Total DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (669 – 1107: *Vulpes vulpes* örnekleri).

3.2.3. Sitokrom-*b* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Her bir örnek için elde edilen total DNA'lar, Mitokondrial DNA'nın Sitokrom – *b* bölgesi için kaynak olarak kullanılmıştır.

Sitokrom – *b* gen bölgesini çoğaltmak için L14724 ve H15149 [8, 10] isimli spesifik primer çiftleri kullanılmıştır.

PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları;

Bileşenler	Alınan Hacim	Son Konsantrasyon
Steril Distile Su (dH ₂ O)	24.6 µl	---
10X Taq Buffer	5 µl	1X
10mM dNTP Mix	1 µl	0.2 mM
10µM L14724 Primer	5 µl	1 µM
10µM H15149 Primer	5 µl	1 µM
Taq DNA Polimeraz (5 u/µl)	0.4 µl	2 u
25mM MgCl ₂	4 µl	2 mM
DNA (1/5 oranında seyreltilmiş)	5 µl	---
Toplam:	50 µl	

Elde edilen karışım istenilen gen bölgesinin çoğaltılması için Thermo-Cycler'ra alınır.

PCR Döngü Programı;

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94 °C	3.00 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1.00 dk	30
Bağlanma	50 °C	1.00 dk	30
Uzama	72 °C	1.00 dk 30 sn	30
Sonlandırma	72 °C	7.00 dk	1

3.2.4. PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR ürünü % 2'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Bunun için bir erlen içerisine 3 gram agaroz konur ve üzerine 150 ml 0.5X TAE (Trisma Base, Glacial Asetic Asid, EDTA) çözeltisi eklenerek karıştırılır.

Elde edilen karışım mikrodalgada agaroz tamamen çözünene kadar ısıtılır.

Agaroz tamamen çözüldükten sonra üzerine 10 mg/ml'lik Ethidium Bromide çözeltisinden 9 µl eklenir.

Manyetik karıştırıcıda karışım 50 – 55 °C'ye gelinceye kadar karıştırılır.

Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilir ve karışım yavaşça dökülür.

Agaroz jel tamamen donuncaya kadar beklenir ve donduktan sonra taraklar dikkatlice jelden alınır.

Elektroforez tepsi elektroforez tankına yerleştirilir ve üzerine jeli tamamen kaplayacak kadar 0,5X TAE çözeltisi eklenir.

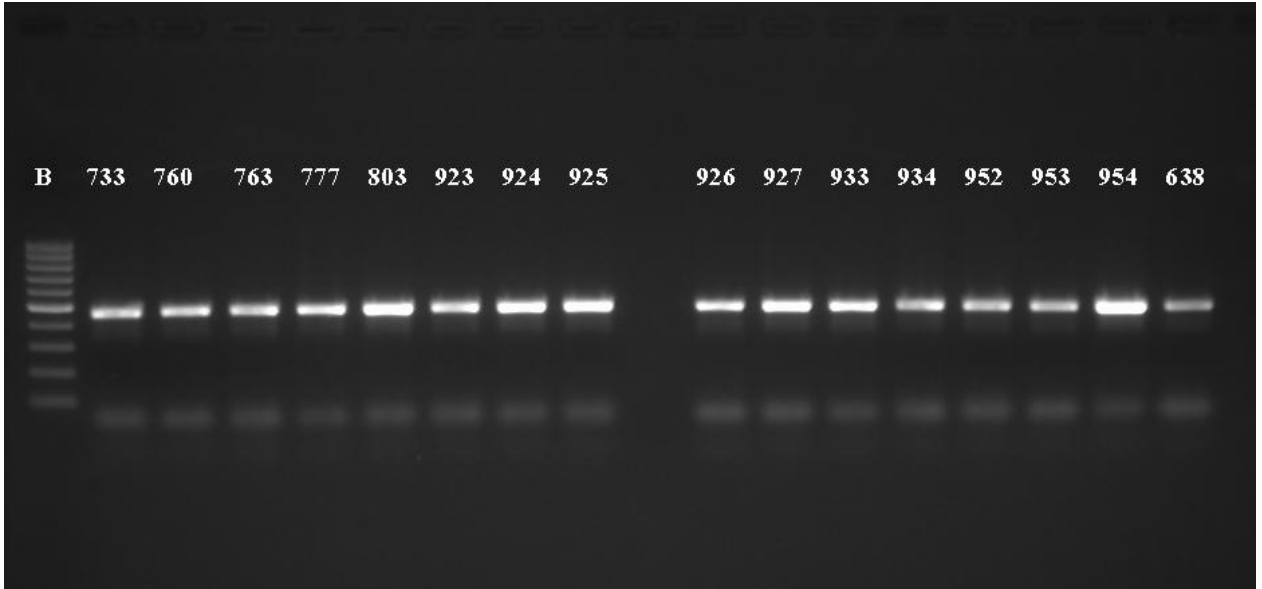
Elde edilen total DNA'dan 10 µl alınıp temiz bir PCR tüpüne konur ve üzerine 2 µl 6X Loading Dye eklenir, pipetle karıştırılır.

Karışım jelde açılan kuyucuklara pipetlenir.

Boş bir kuyucuğa 6 µl 100 bp DNA Ladder konulur.

Jele 80 volt doğrusal akım verilerek örneklerin jel üzerinde, elektriksel alanda 60 dakika yürümesi sağlanır.

Süre sonunda jel elektroforez tankından çıkarılıp görüntüleme cihazına yerleştirilir ve UV altında görüntülenip fotoğrafı çekilir. (Şekil. 3.3).



Şekil 3.3. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (**638**: *Canis aureus*, **733 – 954**: *Vulpes vulpes* örnekleri, **B**: 100 bp DNA Ladder).

3.3. Sitokrom-*b* Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi

Her bir örnek için elde edilen PCR ürünlerinin 10 µl'sinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü yapıldıktan sonra geriye kalan kısım DNA dizi analizi için alınmıştır.

Her bir örnek için DNA dizi analizi her iki yönde de yapılmıştır. Bunun için birinci primer olarak L14724 (5'-GATATGAAAACCATCGTTG-3') ve ikinci primer olarak da H15149 (5'-CAGAATGATATTTGTCCTCA-3') kullanılmıştır [8, 10].

DNA dizi analizi, otomatik DNA dizi analizi sisteminde (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) RefGen (ODTÜ-Teknopark/Ankara) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.4. Kısmi Sitokrom-*b* Gen Bölgesinin DNA Dizi Analiz Verilerinin Okunması ve Değerlendirilmesi

3.4.1. Dizilerin Hizalanması ve Düzenlenmesi

Her bir birey için otomatik DNA dizi analizi sisteminden elde edilen ham dizi analiz verileri, Dizilerin Hizalanması ve Düzenlenmesi (Sequence alignment and editing) için BioEdit version 7.0.9.0 [35] programına aktarılmıştır. Her bir birey için aynı bölgeye ait ileri ve geri (Forward ve Revers) primerler ile elde edilen dizilerin kromatogramları tek tek gözden geçirilmiş ve her bir birey için ilgili bölgenin en ortak (consensus) dizileri oluşturulmuştur. Hizalanan dizilerin başlangıç ve sondaki fazlalıkları kesilip (trim edilip) aynı uzunluğa getirilmiştir. Aynı uzunluğa getirilen bu diziler diğer programlar tarafından okunabilmesi ve diğer formlara dönüştürülebilmesi için .fasta formatında kaydedilmiştir.

3.5. Filogenetik Analizler

Örneklerin dizi analizi sonucu elde edilen kısmi sitokrom – *b* gen bölgesi verileri bir araya getirilerek kızıl tilki *Vulpes vulpes* için nispeten geniş bir coğrafik alanı temsil edecek kadar veri içeren bir DNA matriksi elde edilmiştir. Dizi analizi yapılan örneklerin içerisindeki haplotip sayısını belirlemek için veriler, DnaSP Version 5.00.04 [36] adlı programa aktarılmış, haplotipler belirlendikten sonra sadece haplotipleri içeren ikinci bir DNA matriksi oluşturulup, filogenetik analizler için bu matriks kullanılmıştır (Tablo 4.2). Filogenetik analizler için evrimsel ağaç oluşturma metodlarından olan uzaklık (distance) ve tutumluluk (parsimony) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen filogenetik

analizler için dış grup olarak Canidae familyasının diğer bir üyesi olan *Canis aureus* kullanılmıştır. Çalışmada mtDNA sitokrom – *b* gen bölgesinin dizi analizi yapılan *Canis aureus* örnekleri içinde *Vulpes vulpes* örnekleri için kullanılan primer çifti kullanılmıştır.

3.5.1. Mitokondrial DNA Sitokrom – *b* Geninin Dizi Analizi

Elde edilen haplotiplere ait dizi analiz verileri DnaSP Version 5.00.04 [36] adlı programa aktarılmış, program çalıştırılarak monomorfik ve polimorfik bölgeler, parsimoni olarak bilgi içeren bölgeler, haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd), nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, P_i , π) ayrı ayrı hesaplatılmıştır. Haplotiplerin baz kompozisyonlarının hesaplanması için oluşturulan DNA matriksi MEGA version 4.02 [37, 38] adlı programa aktarılmış ve analizler gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Uzaklık (Distance) Analizi

Oluşturulan DNA veri matriksi MEGA version 4.02 [37, 38] adlı programa aktarılmış, programdan Kimura 2-Parametre baz değişim modeli seçilerek uzaklık (distance) analizi bu programda yapılmıştır (Tablo 4.5). Uzaklık (Distance) analizi için Neighbor Joining adlı algoritma [39], ağaç türetme tekniği olarak kullanılmıştır. Türetilen ağaçlardaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini belirlemek için bootstrap analiziyle (10.000 replicates) elde edilen değerler oluşturulan ağaç üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.3).

3.5.3. Tutumluluk (Parsimony) Analizi

Oluşturulan DNA veri matriksi PAUP Version 4.0b10 adlı programa aktarılmış ve tutumluluk (parsimony) analizi gerçekleştirilmiştir. Üretilen olası en kısa ağaçların ağaç uzunlukları (tree length, TL), tutarlılık indeksi (consistency index, CI), ve koruma indeksi (retention index, RI) belirlenmiştir. Üretilen olası en kısa ağaçları özetleyen Strict ve % 50 Majority konsensus ağaçları oluşturulmuştur (Şekil 4.4, 4.5).

3.5.4. Gen Bankasından Elde Edilen *Vulpes vulpes* Sitokrom – b (375 bç) Haplotipleri ile Bu Çalışmada Tespit Edilen Haplotiplerin Birlikte Analiz Edilmesi

Gen bankasından, Frati ve ark., [8] tarafından çalışılan Z80957-Z80997 gen bankası erişim (accession) numarasıyla depolanan *Vulpes vulpes* türüne ait sitokrom – b geni dizi verileri ile Inoue ve ark., [10] tarafından çalışılan AB292741 – AB292765 gen bankası erişim (accession) numarasıyla depolanan *Vulpes vulpes* türüne ait sitokrom – b geni dizi verileri alınmış ve bu çalışmada elde edilen dizilerle birleştirilmiştir. Oluşturulan tüm veriler, DnaSP Version 5.00.04 [35] adlı programa aktararak haplotipler belirlenmiş ve bu haplotipleri içeren bir DNA veri matrisi oluşturup filogenetik analizler için bu matris kullanılmıştır. Filogenetik analiz olarak yukarıdaki yöntemle göre sadece uzaklık (distance) analizi (Tablo 4.7) yapılmış ve Neighbor Joining ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.6). Yine bu analizde de dış grup olarak bu çalışmada elde edilen *Canis aureus* türüne ait mtDNA sitokrom – b haplotipi kullanılmıştır.

4. BÖLÜM

BULGULAR

4.1. Kızıl Tilki (*Vulpes vulpes*)’de Tespit Edilen mtDNA Haplotipleri

Türkiye’deki 47 lokaliteden elde edilen kızıl tilki *Vulpes vulpes* türüne ait 47 örnek için mtDNA’nın kısmi sitokrom – *b* geni (375 bç) dizi analizi sonuçlarına göre 12 sitokrom – *b* haplotipi tespit edildi (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2). Konsensus haplotipe ait kromatogram Şekil 4.1’de ve bu çalışmada belirlenmiş 12 haplotipe ait 375 bazlık diziler Tablo 4.1’de verildi. Çalışılan alandaki *Vulpes vulpes* türü için haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd) 0.7373 olarak tespit edildi. Haplotip çeşitliliğinin 1’e yakın olması dizi analizi yapılan bireylerin her birinin farklı bir haplotipe sahip olduğu ve çalışılan grubun genetik çeşitliliğinin fazla olduğu anlamına gelir. *Vulpes vulpes* taksonu için nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, Pi, π) 0.00939 olarak tespit edilmiştir. Bu iki durum, örneklerin geniş bir coğrafi alandan toplanmış olmasına rağmen örneklerin alındığı lokaliteler arası gen akışının fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 4.1. Türkiye’den toplanmış 47 *Vulpes vulpes* örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipinin konsensus dizisi.

```
ATGACCAACATTGAAAGACTCACCCACTAGCTAAAATCGTAAACGACTCATTGATCGAC
CTTCCCGCACCATCAAATATTTCTGCCTGATGGAACCTCGGGTCCCTGCTAGGTGTATGC
CTTATTCTACAGATTGCAACAGGTCTATTTTTAGCCATACACTATAACATCTGACACAGCT
ACTGCTTTCTCATCTGTCACCCACATCTGCCGAGACGTTAACTATGGCTGAATTATCCGC
TACATACATGCAAACGGAGCATCTATATTTTTTATCTGCCTCTTCATGCACGTAGGACGA
GGCTTATATTATGGATCTTATGTATTATAGAAACATGAAATATTGGAATTATCTTATTG
TTCGCAACCATGGCC
```

Tablo 4.2. mtDNA analizi sonucunda *Vulpes vulpes* örneklerinde belirlenen haplotipler.

Sıra No	Cyt – b Haplotipi	Lokalite Kodu	Koleksiyon Numarası	Lokalite	Koordinat
1	<i>V. vulpes</i> – 1	1	536	Özlüce/Boğazlıyan / YOZGAT	39° 29'185" N 35° 04'298" E 1099m
2	<i>V. vulpes</i> – 1	2	538	Boğazkale / ÇORUM	39° 56'087" N 34° 42'963" E 1215m
3	<i>V. vulpes</i> – 1	7	627	Kemerhisar/Bor / NİĞDE	37° 45'509" N 34° 34'032" E 1128m
4	<i>V. vulpes</i> – 1	8	637	KARABÜK	41° 09'810" N 32° 38'428" E 304m
5	<i>V. vulpes</i> – 1	9	660	Bozca/Avanos / NEVŞEHİR	38° 44'331" N 35° 02'312" E 1048m
6	<i>V. vulpes</i> – 1	10	661	Avanos / NEVŞEHİR	38° 41'409" N 34° 48'850" E 1012m
7	<i>V. vulpes</i> – 1	11	663	KONYA	38° 01'340" N 32° 51'829" E 1001m
8	<i>V. vulpes</i> – 1	12	664	KONYA	37° 53'613" N 32° 09'022" E 1565m
9	<i>V. vulpes</i> – 1	18	733	YOZGAT	39° 48'504" N 34° 46'330" E 1204m
10	<i>V. vulpes</i> – 1	19	760	TOKAT	40° 03'833" N 36° 29'187" E 1143m
11	<i>V. vulpes</i> – 1	20	763	Çamlıbel / TOKAT	40° 04'261" N 36° 29'011" E 1132m
12	<i>V. vulpes</i> – 1	21	777	AMASYA	40° 41'779" N 35° 48'765" E 408m
13	<i>V. vulpes</i> – 1	23	821	Bekdiğin/Havza / SAMSUN	40° 59'861" N 35° 46'125" E 725m
14	<i>V. vulpes</i> – 1	25	924	Eğirdir / ISPARTA	
15	<i>V. vulpes</i> – 1	29	933	Acıgöl / NEVŞEHİR	38° 32'691" N 34° 29'174" E 1264m
16	<i>V. vulpes</i> – 1	30	934	AKSARAY	38° 30'969" N 34° 21'098" E 1227m
17	<i>V. vulpes</i> – 1	34	1017	Kayaönü mah. / KARAMAN	37° 14'318" N 33° 21'128" E 1039m
18	<i>V. vulpes</i> – 1	39	1096	KIRŞEHİR	39° 05'094" N 34° 16'287" E 1200m
19	<i>V. vulpes</i> – 1	40	1097	Elmadağ / ANKARA	39° 55'348" N 33° 15'923" E 1072m
20	<i>V. vulpes</i> – 1	41	1100	ESKİŞEHİR	39° 30'058" N 31° 13'424" E 1028m
21	<i>V. vulpes</i> – 1	42	1107	İlgin / KONYA	38° 18'062" N 31° 39'356" E 1080m
22	<i>V. vulpes</i> – 1	46	1137	Çalış / NEVŞEHİR	38° 58'846" N 34° 54'890" E 1316m
23	<i>V. vulpes</i> – 1	47	1160	Pınarbaşı / KAYSERİ	
1	<i>V. vulpes</i> – 2	3	539	Kızılırmak / ÇANKIRI	40° 21'169" N 33° 58'767" E 555m

Tablo 4.2.'in devamı.

1	<i>V. vulpes</i> – 3	4	587	Bahadin / Sarıkaya / YOZGAT	39° 36'066" N 35° 15'707" E 1123m
1	<i>V. vulpes</i> – 4	5	589	Yeniyapan / Keskin / KIRIKKALE	39° 35'319" N 33° 42'013" E 922m
1	<i>V. vulpes</i> – 5	6	610	Kandıra / KOCAELİ	41° 04'907" N 30° 10'238" E 41m
1	<i>V. vulpes</i> – 6	13	668	ISPARTA	39° 03'203" N 31° 25'615" E 1200m
2	<i>V. vulpes</i> – 6	14	669	Dikici köyü/Dinar / AFYON	38° 00'140" N 30° 11'522" E 940m
3	<i>V. vulpes</i> – 6	44	1111	Beyşehir / KONYA	37° 54'691" N 31° 56'955" E 1270m
1	<i>V. vulpes</i> – 7	15	706	ISPARTA	37° 52'539" N 30° 30'730" E 935m
2	<i>V. vulpes</i> – 7	16	707	Eğirdir / ISPARTA	37° 50'753" N 30° 51'579" E 922m
3	<i>V. vulpes</i> – 7	22	803	Arguvan / MALATYA	
4	<i>V. vulpes</i> – 7	24	923	Taşköprü/Babaeski / KIRKLARELİ	
5	<i>V. vulpes</i> – 7	27	926	Konya-Seydişehir yolu / KONYA	
6	<i>V. vulpes</i> – 7	45	1122	KONYA	37° 45'674" N 32° 12'683" E 1328m
1	<i>V. vulpes</i> – 8	17	708	Çarıklı / NİĞDE	38° 11'639" N 34° 59'174" E 1368m
2	<i>V. vulpes</i> – 8	28	927	Kanlıkavak / Göksun / KAHRAMANMARAŞ	
3	<i>V. vulpes</i> – 8	31	952	Erciyes Dağı / KAYSERİ	38° 31'587" N 35° 31'566" E 2215m
1	<i>V. vulpes</i> – 9	26	925	Tavas / DENİZLİ	
1	<i>V. vulpes</i> – 10	32	953	Pınarbaşı / KAYSERİ	38° 41'848" N 36° 21'790" E 1546m
1	<i>V. vulpes</i> – 11	33	954	Karakoca/Ulubey / ORDU	
2	<i>V. vulpes</i> – 11	35	1027	Zara / SİVAS	39° 51'772" N 37° 37'428" E 1340m
3	<i>V. vulpes</i> – 11	36	1045	İlica / ERZURUM	39° 58'751" N 40° 56'382" E 1881m
4	<i>V. vulpes</i> – 11	37	1046	Horasan / ERZURUM	40° 00'299" N 41° 57'455" E 1594m
5	<i>V. vulpes</i> – 11	38	1070	Kelkit / GÜMÜŞHANE	40° 14'022" N 39° 27'077" E 1723m
1	<i>V. vulpes</i> – 12	43	1108	Eşmekaya / AKSARAY	38° 15'152" N 33° 28'976" E 971m
1	<i>C. aureus</i> –1	48	638	Devrek / ZONGULDAK	40° 58'149" N 32° 04'596" E 675m
2	<i>C. aureus</i> –1	49	856	Arhavi / ARTVİN	41° 18'993" N 41° 14'284" E 4m
3	<i>C. aureus</i> –1	50	1252	Karakoca/Ulubey / ORDU	

Tablo 4.3.'ün devamı.

	310	320	330	340	350	360	370
V.vulpes	-	GGCTTATATTATGGATCTTATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGAATTATCTTATTGTTGCAACCATGGCC					
V.vulpes	-					A.
V.vulpes	-					T.
V.vulpes	-					A.
V.vulpes	-
V.vulpes	-				C
V.vulpes	-					T.
V.vulpes	-					T.
V.vulpes	-	C.....C.....				
V.vulpes	-			C.....	
V.vulpes	-					C.....
V.vulpes	-
C. aureus	-	...C...C.....C.....				C.....G.AC.C.A.....A.....



Şekil 4.1. Türkiye'den toplanmış 47 *Vulpes vulpes* örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipinin konsensus dizisinin kromatogram görüntüsü.

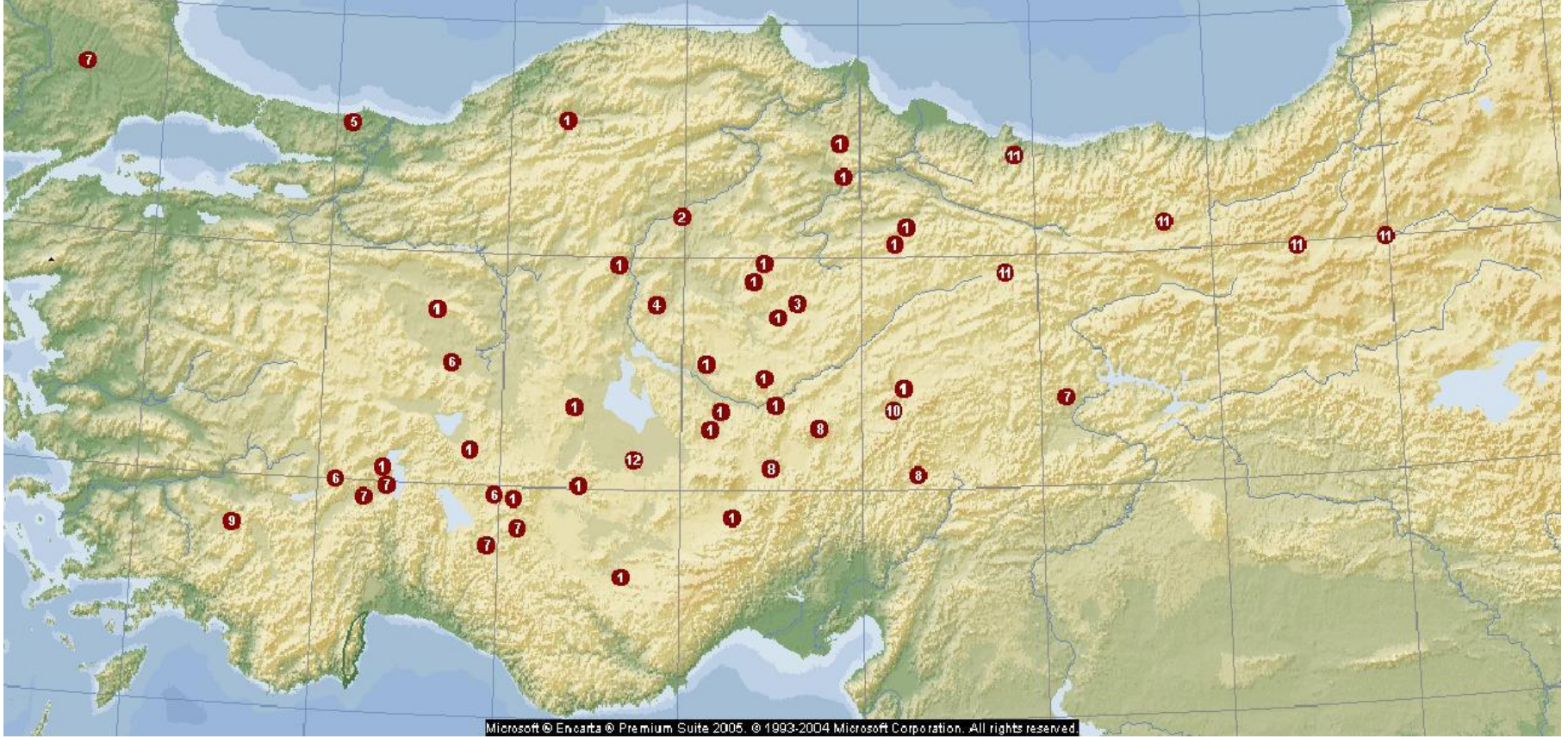
4.2. Mitokondrial Sitokrom – *b* Geninin Dizi Analiz Sonuçları

4.2.1. Sitokrom – *b* Geninden Elde Edilen Dizinin Yapısı ve Varyasyonu

Sitokrom – *b* geninin dizi analizi yapılan 375 baz çiftlik kısmında elde edilen 12 haplotipe dayanılarak oluşturulan matriksteki bazların oranı A: % 28.0, C: % 25.3, G: % 16.0, T(U): 30.7 şeklinde tespit edildi. Örneklere ilişkin DNA dizileri A – T’ce nispeten zengin olup (%58.7), G – C oranı daha azdır (%41.3).

Tablo 4.4. Türkiye’den toplanmış 47 *Vulpes vulpes* örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipinin baz içeriği.

	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
V. vulpes - 1	30.7	25.3	28.0	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 2	30.7	25.3	28.3	15.7	375	28.0	16.8	31.2	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 3	31.2	25.1	27.5	16.3	375	28.8	16.8	29.6	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - 4	30.9	25.3	28.0	15.7	375	28.8	16.8	30.4	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 5	30.9	25.1	28.3	15.7	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	33.6	6.4	125
V. vulpes - 6	30.1	25.9	27.7	16.3	375	27.2	17.6	30.4	24.8	125	36.8	26.4	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - 7	30.9	25.1	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - 8	31.2	24.8	27.5	16.5	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	28.0	32.0	31.2	8.8	125
V. vulpes - 9	30.1	25.9	28.0	16.0	375	26.4	18.4	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 10	30.7	25.3	28.3	15.7	375	28.0	16.8	31.2	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 11	30.7	25.3	28.0	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 12	30.4	25.3	28.3	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	36.8	25.6	21.6	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
Avg.	30.7	25.3	28.0	16.0	375	27.9	17.0	30.5	24.6	125	37.5	25.7	20.9	16.0	125	26.7	33.3	32.5	7.5	125.0



Şekil 4.2. Türkiye’de yayılış gösteren *Vulpes vulpes* türüne ait 47 örnekte tespit edilen 12 haplotipin dağılımını gösteren harita.

12 haplotipin lokalitelere göre dağılımı Tablo 4.2 ve Şekil 4.2 da verildi. Şekil 4.2. incelendiğinde haplotiplerin nispeten belli bir coğrafik alanda gruplandığı görülmektedir. En çok tespit edilen *V. vulpes* – 1 haplotipi İç Anadolu bölgesinde geniş bir alanında bulunmaktadır.

4.2.2. Uzaklık (Distance) Analizi

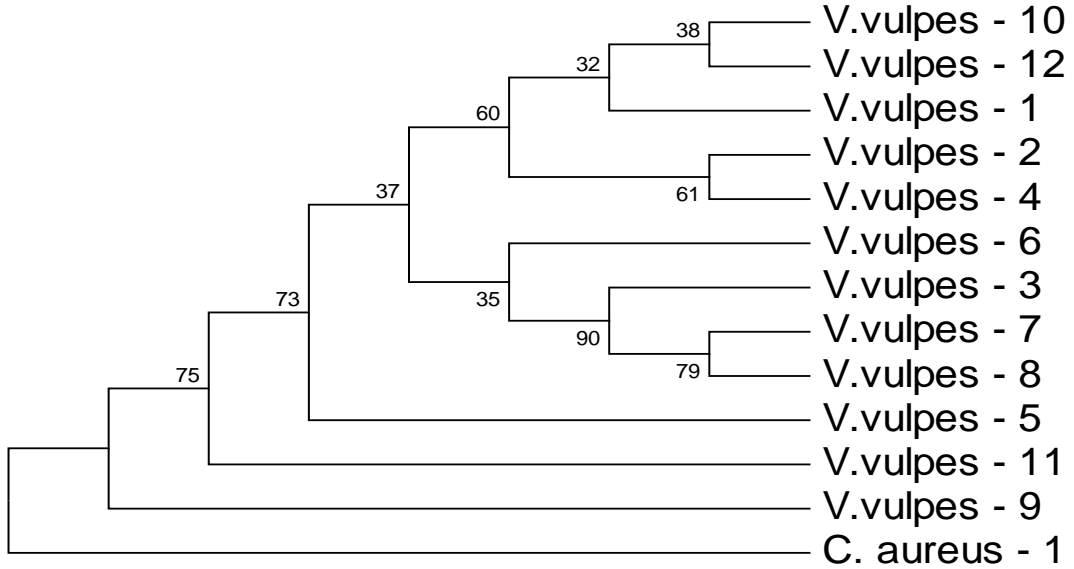
Haplotipler arasındaki genetik uzaklığın belirlenmesi için MEGA programı ve Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak elde edilen örnekler arası uzaklık matrisi tablo 4.5’de verildi. Tablo 4.5 incelendiğinde en küçük genetik uzaklık değeri (0,0027); haplotip 1 ve 2, haplotip 1 ve 10, haplotip 1 ve 12, haplotip 2 ve 4, haplotip 3 ve 7 arasında gözlenirken en büyük genetik uzaklık değeri (0,0415) ise haplotip 8 ve 9 arasında gözlemlendi. Bu değerler, takson içerisinde genetik olarak önemli derecede farklılıklar olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.5. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş haplotipler arasındaki genetik uzaklığı gösteren tablo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[1] *												
[2] 0.0027 *												
[3] 0.0135 0.0162 *												
[4] 0.0054 0.0027 0.0135 *												
[5] 0.0054 0.0081 0.0135 0.0108 *												
[6] 0.0081 0.0108 0.0162 0.0135 0.0135 *												
[7] 0.0108 0.0135 0.0027 0.0162 0.0108 0.0135 *												
[8] 0.0163 0.0190 0.0080 0.0217 0.0163 0.0190 0.0054 *												
[9] 0.0301 0.0329 0.0385 0.0357 0.0301 0.0386 0.0358 0.0415 *												
[10] 0.0027 0.0054 0.0162 0.0080 0.0081 0.0108 0.0135 0.0190 0.0329 *												
[11] 0.0135 0.0162 0.0217 0.0189 0.0135 0.0217 0.0189 0.0245 0.0218 0.0162 *												
[12] 0.0027 0.0054 0.0162 0.0080 0.0080 0.0108 0.0135 0.0190 0.0328 0.0054 0.0162 *												

Bu çalışmada tespit edilen 12 haplotipin sitokrom – *b* geninin 375 bazlık kısmının dizi analizine göre haplotipler arasındaki ilişkiler Şekil 4.3’e verilen NJ ağacında gösterilmektedir. NJ ağacı oluşturmak için Kimura 2-Parametre baz değişim modeline göre elde edilen uzaklık matrisi kullanıldı. Bu ağaç elde edilirken dış grup olarak *Canis aureus* (çakal)’dan ağacı köklendirmek için yararlanıldı. Bu NJ ağacı incelendiğinde (Şekil 4.3) 12 haplotipin iki ana soy hattı şeklinde gruplandığı görülmektedir. Birinci ana soy hattı 11 haplotipten ibaret olup ikinci ana soy hattı tek haplotipten oluşmaktadır. Birinci ana soy hattı % 75’lik bootstrap değeri ile

desteklenmektedir. Ayrıca 11 haplotipten oluşan birinci ana soy hattı kendi içerisinde 3 grupta toplanmıştır.

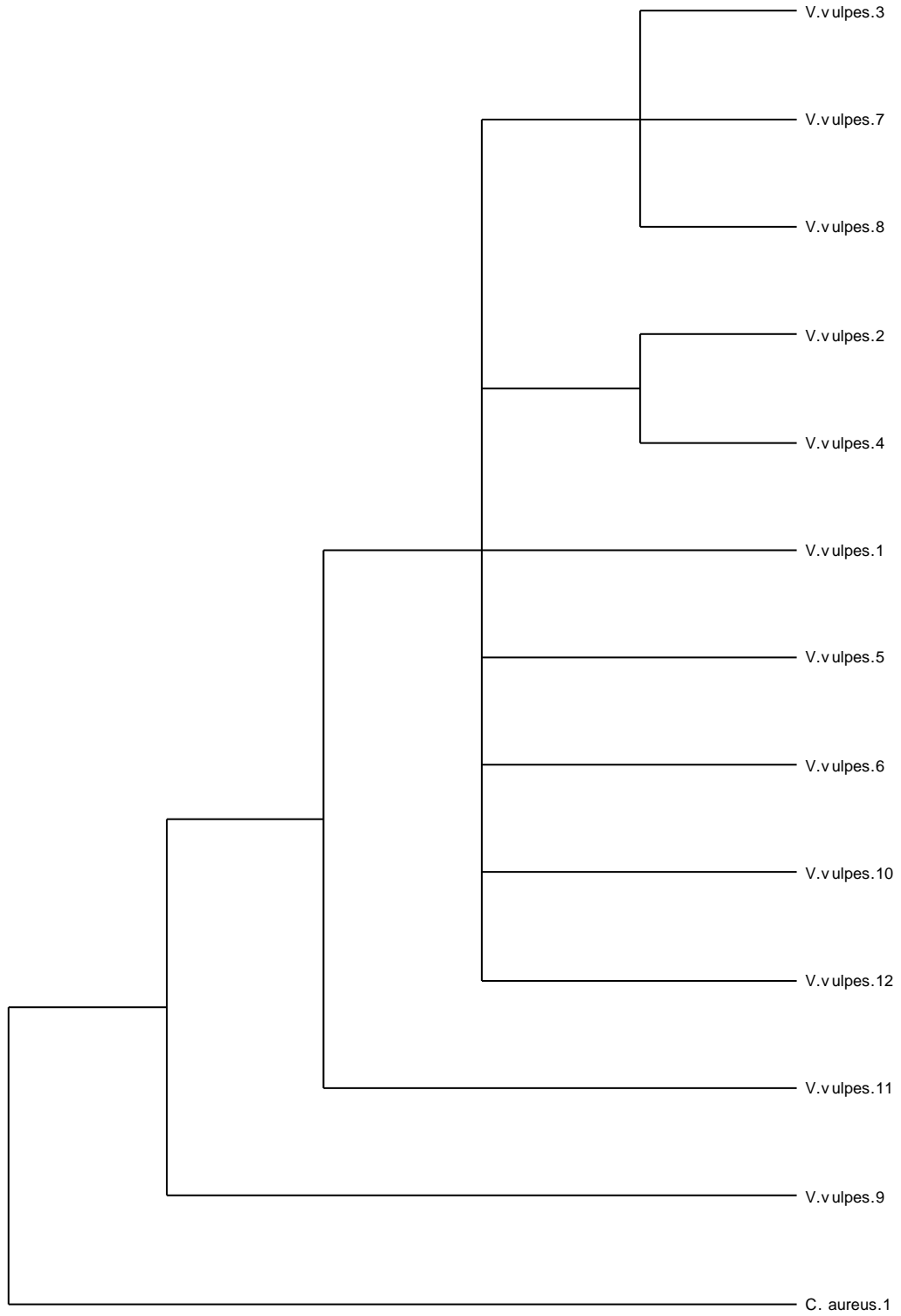


Şekil 4.3. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş 12 *Vulpes vulpes* haplotipi arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ (Neighbor Joining) ağacı.

4.2.3. Tutumluluk (Parsimony) Analizi

Tespit edilen *Vulpes vulpes*'e ait 12 mtDNA haplotipinin bir araya getirilmesiyle elde edilen DNA veri setinde sitokrom – *b* geninin 375 bazlık kısmının 351 nükleotid pozisyonunda benzerlik (monomorfik bölge) tespit edilirken (% 93.6) 24 nükleotid pozisyonunda varyasyon (polimorfik bölge) gözlemlendi (% 6.4). Bu 24 değişken pozisyondan 20'si transisyon (% 83.33), 4'ü transversiyondur (% 16.67). Delesyon ve insersiyona rastlanılmamıştır. Bu pozisyonlardan 9 tanesi (1, 42, 150, 189, 195, 201, 294, 363, 364. bölgeler) parsimoni olarak bilgi içeren bölge (% 37.5), 15 tanesi (2, 108, 151, 168, 171, 196, 204, 207, 240, 266, 304, 309, 321, 345, 355. bölgeler) parsimoni olarak bilgi içermeyen bölgelerdir (% 61.5). Bu bilgi içeren bölgeler kullanılarak PAUP (Version 4.0b10) programında yürütülen parsimoni analizi sonucunda ağaç uzunluğu (tree length, TL) 21, tutarlılık indeksi (consistency index, CI) 0.714 ve koruma indeksi (retention index, RI) 0.760 olan toplam 5 tane eşit olasılıkta en kısa parsimonik ağaç bulunmuştur. Bu beş olası en kısa ağacın topolojisini özetleyen Strict ve %50 Majority Rule Konsensus ağaçları Şekil 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Strict



Şekil 4.4. Strict Konsensus ağaç.

Bu ağaç parsimoni analizli sonucu oluşturulan ve ağaç uzunluğu (tree length, TL) 21, tutarlılık indeksi (consistency index, CI) 0.714 ve koruma indeksi (retention index, RI) 0.760 olan toplam 5 tane eşit olasılıkta en kısa en kısa parsimonik ağacı özetlemektedir. *Canis aureus* dış grup (out group) olarak kullanılmıştır.

Strict Consensus ağacı incelendiğinde (Şekil 4.4) bir araya getirilen haplotipler 2 soy hattına ayrıldığı görülmektedir. Birinci soy hattında 11 haplotip bulunurken ikinci soy hattında Denizli bölgesine ait olan *V. vulpes* – 9 haplotipi bulunmaktadır. Birinci soy hattı kendi içerisinde iki soy hattına ayrılmaktadır. Bunlardan birinci grupta 10 haplotip bulunurken ikinci grupta Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgesine ait bir haplotip bulunmaktadır. % 50 Majority Rule Konsensus ağacı (şekil 4.5) incelendiğinde yine aynı örnekleri içeren iki soy hattına ayrılmıştır. Birinci soy hattı üç gruba ayrılmış olup birinci grup olası tüm ağaçların % 60'ında bulunmaktadır. İkinci grup Kocaeli bölgesine ait olan *V.vulpes* – 5 haplotipi olup olası tüm ağaçların % 100'ünde bulunmaktadır. Üçüncü grup ise Doğu Anadolu ve Doğu Karadeniz bölgesine ait olan *V. vulpes* – 11 haplotipi olup olası en kısa tüm ağaçların % 100'ünde bulunmaktadır.

4.3. Gen Bankasından Elde Edilen *Vulpes vulpes* Sitokrom *b* (375 bç) Haplotipleri ile Bu Çalışmada Tespit Edilen Haplotiplerin Birlikte Analiz Edilmesi

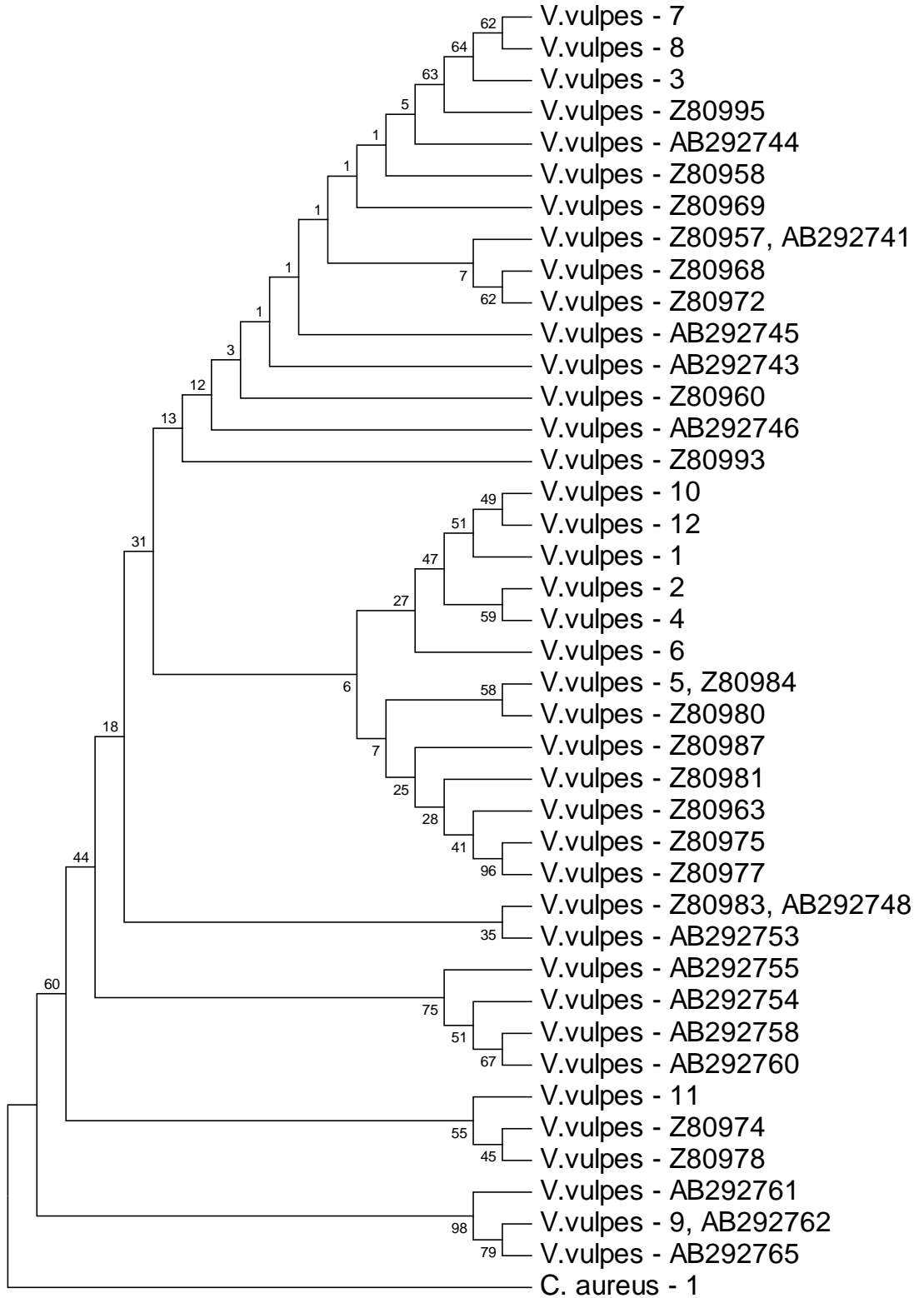
Gen bankasından elde edilen 66 adet *Vulpes vulpes* sitokrom – *b* (375 bç) geninin dizi verileri [8, 10] ile bu çalışmada analizi yapılan 47 adet *Vulpes vulpes* sitokrom – *b* geninin dizi verilerinin bir araya getirilmesiyle elde edilen sonuçlara göre 40 sitokrom – *b* haplotipi tespit edildi. Bu 113 *Vulpes vulpes* bireyi için sitokrom – *b* haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd) 0.9354 olarak, nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, Pi, π) 0.01171 olarak tespit edildi. Haplotip çeşitliliğinin 1'e yakın olması dizi analizi yapılan bireylerin her birinin farklı bir haplotipe sahip olduğu ve çalışılan grubun genetik çeşitliliğinin fazla olduğu anlamına gelir.

Elde edilen 40 haplotipe dayanılarak oluşturulan matriksteki bazların oranı A: % 27.8, C: % 25.3, G: % 16.2, T(U): 30.7 şeklinde tespit edildi. Örneklere ilişkin DNA dizileri A – T'ce nispeten zengin olup (% 58.5), G – C oranı daha azdır (% 41.5).

Tablo 4.6. Türkiye’den toplanmış 47 *Vulpes vulpes* örneğinde tespit edilen 12 mtDNA haplotipi ile gen bankasından elde edilmiş *Vulpes vulpes* mtDNA haplotiplerinin baz içeriğini gösteren tablo.

	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
V. vulpes - 1	30.7	25.3	28.0	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 2	30.7	25.3	28.3	15.7	375	28.0	16.8	31.2	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 3	31.2	25.1	27.5	16.3	375	28.8	16.8	29.6	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - 4	30.9	25.3	28.0	15.7	375	28.8	16.8	30.4	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 5	30.9	25.1	28.3	15.7	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	33.6	6.4	125
V. vulpes - 6	30.1	25.9	27.7	16.3	375	27.2	17.6	30.4	24.8	125	36.8	26.4	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - 7	30.9	25.1	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - 8	31.2	24.8	27.5	16.5	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	28.0	32.0	31.2	8.8	125
V. vulpes - 9	30.1	25.9	28.0	16.0	375	26.4	18.4	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 10	30.7	25.3	28.3	15.7	375	28.0	16.8	31.2	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 11	30.7	25.3	28.0	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - 12	30.4	25.3	28.3	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	36.8	25.6	21.6	16.0	125	26.4	33.6	32.8	7.2	125
V. vulpes - Z80957	30.9	25.1	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80958	30.9	25.1	28.0	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.8	7.2	125
V. vulpes - Z80960	30.7	25.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80963	30.7	25.3	27.7	16.3	375	27.2	17.6	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80968	31.7	24.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	29.6	30.4	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80969	30.9	25.1	28.0	16.0	375	28.0	16.8	31.2	24.0	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80972	31.2	24.5	28.0	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	28.0	31.2	32.8	8.0	125
V. vulpes - Z80974	30.4	25.6	27.7	16.3	375	27.2	17.6	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80975	29.6	26.4	27.5	16.5	375	26.4	18.4	30.4	24.8	125	36.0	27.2	20.0	16.8	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80977	29.9	25.9	27.5	16.8	375	27.2	17.6	30.4	24.8	125	36.0	26.4	20.0	17.6	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80978	30.7	25.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80980	30.7	25.3	28.3	15.7	375	27.2	17.6	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	33.6	6.4	125
V. vulpes - Z80981	30.7	25.3	28.3	15.7	375	27.2	17.6	32.0	23.2	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80983	30.9	25.3	27.5	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	33.6	31.2	8.0	125
V. vulpes - Z80987	30.4	25.6	27.7	16.3	375	26.4	18.4	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - Z80993	31.2	24.8	27.5	16.5	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	28.0	32.0	31.2	8.8	125
V. vulpes - Z80995	30.7	25.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - AB292743	30.7	25.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - AB292744	30.9	24.8	28.0	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	24.8	21.6	16.0	125	27.2	32.8	32.0	8.0	125
V. vulpes - AB292745	30.7	25.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - AB292746	30.7	25.3	27.7	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
V. vulpes - AB292753	31.2	25.1	27.5	16.3	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	28.0	32.8	31.2	8.0	125
V. vulpes - AB292754	30.7	25.6	27.7	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	34.4	32.0	7.2	125
V. vulpes - AB292755	30.9	25.3	27.7	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	33.6	32.0	7.2	125
V. vulpes - AB292758	30.9	25.3	27.7	16.0	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	33.6	32.0	7.2	125
V. vulpes - AB292760	30.9	25.3	28.0	15.7	375	28.0	16.8	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	27.2	33.6	32.8	6.4	125
V. vulpes - AB292761	29.9	26.1	28.0	16.0	375	26.4	18.4	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	25.6	34.4	32.8	7.2	125
V. vulpes - AB292765	30.1	25.9	27.7	16.3	375	26.4	18.4	30.4	24.8	125	37.6	25.6	20.8	16.0	125	26.4	33.6	32.0	8.0	125
ort.	30.7	25.3	27.8	16.2	375	27.7	17.1	30.5	24.7	125	37.5	25.7	20.8	16.1	125	26.9	33.2	32.2	7.7	125

Daha önce Avrupa’da 41 *Vulpes vulpes* örneğinde Frati ve arkadaşlarının [8] tespit ettikleri ve gen bankasında depoladıkları 18 kısmi sitokrom - *b* haplotipleri, Japonya’da Inoue ve arkadaşlarının [10] aynı türün 25 bireyinde tespit ettikleri ve gen bankasında depoladıkları 14 sitokrom – *b* haplotipi ve bu çalışmada tespit edilen 12 sitokrom – *b* haplotipinin bir araya getirilerek oluşturulan DNA matriksi kullanılarak ve Kimura 2-Parametre baz değişim modeline göre elde edilen Neighbor Joining ağacı Şekil 4.6’da verildi. Bu NJ ağacı incelendiğinde bir araya getirilen haplotipler iki ana soy hattında gruplandığı görülmektedir (Grup I ve Grup II). Bu gruplar % 60 ve % 98’lik bootstrap değerleri ile desteklenmektedir. Birinci ana soy hattı 37 haplotipten oluşurken ikinci ana soy hattı üç haplotipten oluşmaktadır. 37 haplotipten oluşan birinci ana soy hattı kendi içerisinde beş grupta toplanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen *V. vulpes* – 5 haplotipi ile Z80984 haplotipi, *V. vulpes* – 9 haplotipi ile AB292762 haplotipi, Frati ve arkadaşlarının [8] tespit ettiği Z80957 haplotipi ile AB292741 haplotipi ve Z80983 haplotipi ile AB292748 haplotipi benzerdir.



Şekil 4.6. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş 12 Türkiye *Vulpes vulpes* haplotipi ile gen bankasından elde edilmiş haplotipler arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ (Neighbor Joining) ağacı.

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Memelilerin evrimi ve sınıflandırılması çalışmalarında moleküler yöntemler, son yıllarda önemli bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır [40]. Mitokondrial DNA (mtDNA), son çeyrek yüzyılda bireyler, populasyonlar ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerin anlaşılmasında etkili bir molekül olarak kullanılmaya başlanmıştır [33]. Carnivora takımının evrimsel ilişkisi geniş ölçüde çalışılmış ve filogenetik çalışmalar değişik tipteki verilere, örnek tiplerine ve metotlara dayanmaktadır [41]. mtDNA'nın sitokrom – *b* gen bölgesi, tür tanımlama ve filogeni çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun için gen üzerindeki homoloji ve varyasyon gösteren bölgeler tanımlanmış, evrensel ve tür spesifik primerler dizayn edilerek çalışmalarda kullanılmıştır [42]. Dalen ve ark. [43] gerekli durumlarda dışkı örneklerinden de tür tanımlaması yapabilmek için tür spesifik primerler dizayn etmiştir.

Carnivora takımı içerisinde yer alan ve dünyada çok geniş bir yayılış alanına sahip olan kızıl tilki *Vulpes vulpes* dünya çapındaki yabani memeliler içerisinde, çok miktarda ekoloji ve davranışları üzerine çalışmaların olması, değişik habitatlara insan tarafından sokulması ve buradaki nesli tükenme tehlikesi altında olan türler üzerindeki etkileri ve zoonotik hastalıklar için vektör rolü oynamaları sebebiyle en çok çalışılan türler arasındadır [9].

Wyne ve ark. [44], Kuzey Amerika, Avrupa, Çin ve Ortadoğu'dan 21 gri kurt (*Canis lupus* (Linnaeus, 1758)) populasyonundan toplam 350 gri kurt örneğinde coğrafik bölgeler arasındaki mtDNA varyasyonlarını araştırdılar. Yazarlar, 21 farklı restriksiyon enzimi kullanarak 18 mtDNA genotipi belirlemişler ve 95 tane restriksiyon bölgesi tespit ederek bunun da ortalama olarak 500 baz çiftlik mtDNA bölgesini ya da kanidlerdeki mtDNA genomunun % 3'ünü temsil ettiğini ifade etmişlerdir.

Vila ve ark. [45], gri kurt *C. lupus*'un genetik varyasyonlarını ve evrimsel tarihini mitokondrial DNA'nın kontrol bölgesinin (D – loop) dizi analiz verilerini kullanarak açıklamaya çalışmış ve 259 kurt örneğinden elde ettikleri genetik varyasyon verilerini 17 *Canis latrans* (Say, 1823) bireylerinden elde ettikleri verilerle karşılaştırmışlardır. Haplotip çeşitliliğini *C. latrans*'da kurda oranla daha yüksek olarak tespit edilmiş olup gri kurtta 34, *C. latrans*'da 15 mtDNA haplotipi buluşlardır. Her iki grupta da 16 tane parsimoni olarak bilgi içeren bölge belirlemişlerdir.

Sommer ve Benecke [46] Avrupa kanid faunasının geç pleistosen ve erken holosen dönemleri üzerine yaptıkları çalışmada, kızıl tilkinin bol miktardaki fosil kayıtlarıyla Avrupa'da en sık rastlanılan karnivor memeli türü olduğunu, Pleni- ve Late- glacial dönemine ait 100 fosil kaydıyla kızıl tilki için tipik bir holosen türü olduğunu belirtmişlerdir. Yazarlar, bu tür milattan önce 38.000 – 25.000 yıl önce orta Avrupa'da yayıldığını ve muhtemelen kutup tilkisi *Apolex lagopus* (Linnaeus, 1753) ile simpatrik bir yayılım gösterdiğini ve kutup tilkisinin pleistosen döneminin tipik faunal elmanı kaydetmişlerdir.

Delisle ve Strobeck [41], köpek benzeri karnivorların (Caniformia, Carnivora) filogenisini 38 türün mtDNA'sının 12 geninin (10.842 baz çifti) sekans analizine dayalı büyük bir veri seti ile çalışmışlardır. Bunun için 35 Caniformia türü ve dış grup olarak kullanmak amacıyla üç Feliformia (kedi benzeri karnivorlar) türü kullanmışlardır. Caniformia içerisindeki akrabalık ilişkisini çözümlmek için Maksimum Parsimoni, Maksimum Likelihood ve Bayesian yaklaşım analizlerini kullanmışlardır. Arctoidea kladı içerisinde üç ana monofiletik grup göstermiş olup bunları Pinnipedia, Ursidae ve Musteloidea olarak belirtmişlerdir. Bu üç klad içerisindeki familyalar arasındaki akrabalık ilişkileri kullandıkları yöntemlerle iyi bir şekilde desteklenmiştir.

Bardeleben ve ark. [32], Canidae familyası içerisinde bulunan 23 türün filogenetik akrabalık ilişkilerini yeniden oluşturmak amacıyla altı nükleer lokusun DNA dizi analizini kullanmışlardır. Yazarlar çalışmalarına, her bir gen ağacını Maksimum Parsimoni ve Maksimum Likelihood analizleri kullanarak elde etmişler ve genel olarak bireysel gen ağaçlarının iyi bir ayrılma göstermediğini, birden fazla lokusun kullanılması sonucu birkaç tane benzer grup sağlandığını ifade etmişlerdir. Ayrıca bu örnekler için mtDNA'nın cyt-b, COI ve COII gen bölgeleri'nin (2001 baz çifti) dizi analiz verileri de filogenetik ilişki çalışmalarında kullanılmıştır. Altı nükleer gen bölgesi ve mtDNA'dan elde edilen Maksimum Likelihood ağacına göre de üç ana klad tanımlanmış olup bunlar; kızıl tilki benzeri kanidler, Kuzey Amerikan tilkileri ve Kurt benzeri kanidlerdir.

Zachos ve ark. [47], Sırbistan'daki altı bölgeden toplanan 121 örnek üzerinden *Canis aureus* türünün genetik çeşitliliği, farklılaşması ve kurucu etkilerini mitokondrial kontrol bölgesinin dizi analizini ve sekiz nükleer mikrosatelit lokusunu kullanarak analiz etmiştir. Çalışılan örneklerin hiçbirinde mtDNA'nın kontrol bölgesinde varyasyon saptanamadığını (tamamı monomorfik), buna karşılık nükleer mikrosatelit lokuslarında ise çok düşük varyasyon gözlemlendiğini vurgulamışlardır. Çalıştıkları sekiz lokusun tamamının polimorfik olduğunu ve her birinin iki ile beş arasında allel verdiğini belirlemişlerdir. Analiz edilen örneklerde genetik çeşitliliğin çok düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Perrine ve ark. [48], Kaliforniya'daki Nevada sıradağları kızıl tilkisini mtDNA'nın sitokrom – *b* geninin 354 baz çiftlik kısmını kullanarak çalışmıştır. Toplam 73 örneğin 354 baz çiftlik bölümünde 17 nükleotid pozisyonunda varyasyon (13 transisyon, 4 transversiyon) gözlemlenmişler ve 14 haplotip tanımlamışlardır. Aubry ve ark. [12], Kuzey Amerikan kızıl tilkilerinin filocoğrafyası üzerine bir çalışma yapmış ve bunun için 1850 – 1940 yılları arasında toplanıp değişik müzelerde koruma altında olan toplam 321 kızıl tilki örneği kullanmışlardır. Analiz için mtDNA'nın sitokrom – *b* ve kontrol bölgelerini kullanmışlardır. 354 baz çiftlik kısmi sitokrom – *b* genini tamamının dizi analizi yapılabildiği 220 örnek için 29 haplotip ($220/29 = 7.586$ birey) tespit etmişler ve dizilerin 24 transisyon (%82.75) ile beş transversiyon (% 17.25) içerdiğini belirlemişlerdir. Bu haplotiplerden 10 tanesi daha önce Frati ve ark. [8] ile Perrine ve ark. [48] tarafından yayınlanmış haplotiplerle aynıdır. Kontrol bölgesinin 342 baz çiftlik

bölgesinin analiz edilebildiği 174 örnekte 39 tamsisyon, 11 tamsversiyon ve 7 tanede insersiyon veya delesyon bulunmuştur. 174 örnekte ikisi daha önce Valiere ve ark. [49] tarafından verilen haplotiple aynı olan 54 tane haplotip (3.222) elde edilmiştir. Sitokrom – *b* analizine göre günümüzden 400.000 yıl önce ayrılmış olan 2 klad tanımlamışlar, bunlardan birincisine Holarktık, ikincisine Nearktık klad ismini vermişlerdir. Holarktık klad içerisinde özellikle Avrasya, Alaska ve Batı Kanada türlerinden oluşurken Nearktık klad Kuzey Amerika türlerinden oluşmaktadır. D-loop bölgesinin analizi sonucu yine iki klad oluşmuş olup Nearktık klad üç farklı alt klada ayrılmıştır.

Simonsen ve ark. [50], 1997 - 1999 yılları arasında tüm Danimarka'dan topladığı 411 kızıl tilki örneğinin 205'inin kafatası ölçülerini ve 308'inide enzim sistemlerini yatay nişasta jel elektroforeziyle incelemiştir. Çalıştığı 18 enzim sisteminin 14'ünü monomorfik, 4'ünü polimorfik olarak bildirmiş, Danimarka kızıl tilki popülasyonunun gen akışının düşük olduğunu belirtmiştir. Wandeler ve Funk [9], kızıl tilki *V. vulpes* için yedi adet kısa mikrosatelit lokusu karakterize etmişlerdir. Gachot-Neveu ve ark. [51], Kuzeydoğu Fransa'nın Andennes bölgesinden topladığı 85 kızıl tilki örneği üzerindeki çalışmalarda 66 RAPD primerinden yararlanarak 6'sını kullanmış ve genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Kukekova ve ark. [52], kanidler için daha önce dizayn edilmiş olan 700 tane mikrosatelit belirtecini tilki genomunda deneyerek tilki DNA'sında sonuç aldığını tespit ettiği 400 tanesini kullanarak *V. vulpes*'in genetik haritasının oluşturulması üzerine bir çalışma yapmıştır.

Türkiye kızıl tilkisi *V. vulpes* ile ilgili moleküler temelli çalışmalar tespit edilememiştir. Mevcut çalışmalar, sınırlı bir bölgedeki tilkilerin kafatası morfolojisine dayanmakta veya envanter ve yayılış kayıtları şeklindedir. Özkurt ve ark. [4], Türkiye'deki beş Carnivora türünün (*Herpestes ichneumon*, L., 1758, *Hyaena hyaena*, L., 1758, *Meles meles*, L., 1758, *Vulpes vulpes Lutra lutra*, L., 1758) dış ve kafatası morfolojisine dayalı bazı karakteristik özellikleri ile dağılım kayıtları hakkında bilgi vermişlerdir. Temizer [13], Türkiye kızıl tilkisi *V. vulpes* alttürlerinin morfolojik ve kafatası özelliklerini karşılaştırmalı olarak incelemiş, sonuç olarak Türkiye'de yaşayan *V. vulpes alpherakyi*, *V. vulpes caucasica*, *V. vulpes anatolica* alt türlerinin morfolojik ve morfometrik bakımdan birbirinden ayrıldıklarını tespit etmiştir. Turan [53], 2001 yılında Ankara ili Nallıhan ilçesi sınırları içerisinde Emremsultan yaban hayatı koruma sahasında bulunan ve yaşayan memeli türleri ile kuş türlerinin envanter kayıtlarını yapmıştır. Bu

envanter kapsamında 8938 hektarlık alan içerisinde 378 kızıl tilkinin bulunduğunu belirtmiştir. Yiğit ve ark. [14], Kazdağı milli parkı ve çevresindeki memeli hayvanlar hakkında bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma sonucunda kızıl tilki *V. vulpes*'in bu bölge için yayılış kaydını vermiştir.

Bu çalışmada Türkiye'nin değişik lokalitelerinden toplanan *Vulpes vulpes* türüne ait toplam 47 örnek ve dış grup olarak kullanmak amacıyla üç farklı lokaliteden toplanan *C. aureus* türüne ait toplam üç örnek çalışılmıştır (Tablo 3, Şekil 3.1). Bu çalışma moleküler tekniklere dayalı olup mtDNA'nın sitokrom – *b* geninin 375 baz çiftlik kısmındaki farklılıklara dayanmaktadır.

Türkiye kızıl tilkileri ile ilgili daha önceki zamanlarda yapılmış moleküler temelli çalışmaların tespit edilememiş olması ve var olan çalışmaların da sayısının çok az olması ve sadece morfolojiye dayalı olması bu çalışmanın önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmada 47 kızıl tilki örneğinde 12 tane mtDNA sitokrom – *b* haplotipi tespit edildi. Bu ortalama olarak $47/12 = 3.916$ bireyden biri farklı bir haplotip taşıdığı anlamına gelir. Frati ve ark. [8], geniş bir Akdeniz havzasından topladığı 41 kızıl tilki örneğinde 18 sitokrom – *b* haplotipi ($41/18 = 2.277$ birey) bulmuştur. Inoue ve ark. [10], Kuzey Japonya'dan topladıkları 25 kızıl tilki örneğinde 14 sitokrom – *b* haplotipi ($25/14 = 1.785$ birey) tespit etmişlerdir. Türkiye için aynı haplotipli bireylerin oranının fazla olması, Türkiye'deki kızıl tilki populasyonlarını birbirinden ayırabilecek coğrafik bariyerlerin Frati ve ark. [8] ile Inoue ve ark. [10]'nın çalıştıkları alana oranla daha az olmasından kaynaklanmaktadır. Frati ve ark. [8], alloenzim ve mtDNA verilerinden elde ettikleri sonuca göre çalıştıkları her bir kızıl tilki populasyonunun bir diğerinden genetik yapısı yönünden açıkça izole olduğunu ve bunlar arasında gen akışının düşük olduğunu belirtmişlerdir. mtDNA'nın daha çok varyasyon gösteren D – loop bölgesi için Krischning ve ark. [11]'nin Kuzey Sırbistan'da beş lokaliteden topladıkları 110 kızıl tilki örneğinde 9 D-loop haplotipi (335 baz çiftlik D – loop bölgesi için) tespit etmişlerdir ($110/9 = 12.222$ birey). Daha çok varyasyon gösteren bir bölgede az sayıda haplotip bulmaları, çalıştıkları coğrafi alanın dar olmasından kaynaklanmaktadır. Aynı bölgenin 332 baz çiftlik kısmı için Valiere ve ark. [49], Pyrenees, Güneybatı Fransa ve İsviçre'de topladıkları 74 kızıl tilki örneğinde 27 D-loop haplotipi ($74/27 = 2.740$) tespit etmişlerdir.

mtDNA'nın kısmi sitokrom – *b* kısmın için bu çalışmada 24 polimorfik bölge (% 6.4) tespit edilirken (24 transisyon, 4 transversiyon), Frati ve ark. [8], 26 polimorfik bölge (% 6.9) (20 transisyon, 6 transversiyon), Inoue ve ark. [10], 21 polimorfik bölge (%5.6) tespit etmişlerdir. Haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd), Akdeniz havzası örnekleri için 0.9183 [8], Kuzey Japonya örnekleri için 0.9367 [10] iken bu çalışmadaki örneklerde 0.7373'tür. Tüm örneklerde nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, P_i , π) Akdeniz havzası örnekleri için 0.00803, Kuzey Japonya örnekleri için 0.01435 ve bu çalışmadaki örnekler için 0.00939 olarak hesaplanmıştır. Haplotipler arası genetik uzaklık Kimura 2-Parametre baz değişim modeline göre Akdeniz havzası örnekleri için 0.003 – 0.024 arasında, Kuzey Japonya örnekleri için 0.003 – 0.036 ve bu çalışmadaki örnekler için 0.003 – 0.041 arasındadır.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada Türkiye'deki değişik lokaliteden toplanan 47 *V. vulpes* örneğinin mtDNA'sının – *b* gen bölgesinin 375 baz çiftlik kısmının dizi analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar hem kendi içerisinde hem de bu konuda yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla birlikte değerlendirildi. Türkiye haplotiplerinin kendi içerisinde Kimura 2-Parametre baz değişim modeline göre değerlendirilmesiyle elde edilen haplotipler arası genetik uzaklık değerleri 12 haplotip için 0.0027 ile 0.0415 arasında tespit edildi (Tablo 4.5). Bu sonuca göre Türkiye *V. vulpes* örnekleri arasında farklı genetik yapıya sahip bireylerin olduğu ifade edilebilir. Yürütülen filogenetik analizler sonucunda elde edilen haplotip çeşitliliğinin ülkemiz kıvıltılkileri için (0.7373) tespit edilen değer, Frati ve ark. [8] (0.9183) ile Inoue ve ark. [10] (0.9367) tarafından kaydedilen haplotip çeşitliliği değerinden nispeten düşük olması büyük ihtimalle Türkiye kıvıltılkilerini birbirinden ayırabilecek coğrafi bariyerlerin Frati ve ark., [8] ile Inoue ve ark., [10] çalışmaları alana oranla daha az olmasından kaynaklanmaktadır. Bu ifadeyle Türkiye kıvıltılkileri arasında gen akışının fazla olduğu sonucuna varılabilir.

Türkiye haplotipleri için oluşturulan Neighbor Joining ağacı (Şekil 4.3) incelendiğinde oluşan soy hatları nispeten örneklerin coğrafi konularına göre ayrılmaktadır. Ama yinede Türkiye kıvıltılkilerinin genetik yapısı ve evrimsel durumu hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edebilmek için Türkiye'nin örnek alınamayan diğer bölümlerinden de örnekler toplamak gerekmektedir. Ayrıca maternal olarak kalıtılan mtDNA için sitokrom – *b* geninin yanında diğer kullanışlı mtDNA ve nükleer DNA genlerinin

analizleriyle elde edilecek verilerin birlikte değerlendirilmesi kızıl tilki *V. vulpes* türünün genetik çeşitliliğinin ortaya konmasına çok daha fazla katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Macdonald, D.W., Sillero-Zubiri, C., The Biology and Conservation of Wild Canids, Wildlife Conservation Research Unit, University of Oxford, 2004.
2. Wilson, D.E., Reeder, D.M., Mammal species of the world, Smithsonian Institution press, Washington, USA, 2005.
3. Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M., Macdonald, D.W., Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs Status Survey and Conservation Action Plan, IUCN – The World Conservation Union, 2004.
4. Özkurt, Ş. ve ark., Notes on Distributional Records and Some Characteristics of Five Carnivore Species (Mammalia: Carnivora) in Turkey, Turk. J. Zool., 22, 285–288, 1998.
5. Kryštufek, B., Vohralik, V., Mammals of Turkey and Cyprus, Introduction, Checklist, Insectivora, University of Primorska, Koper, Slovenia, 2001.
6. Corbet, G.B., Hill, J.E., A World List Mammalian Species, Natural History Museum Publications Oxford University press, 1991.
7. Geffen, E. ve ark., Phylogenetic relationships of the fox-like canids: mitochondrial DNA restriction fragment, site and cytochrome b sequence analyses, J. Zool., 228, 27-39, 1992.
8. Frati, F. ve ark., Quaternary radiation and genetic structure of the red fox *Vulpes vulpes* in the Mediterranean Basin, as revealed by allozymes and mitochondrial DNA, J. Zool., 245, 43-51, 1998.
9. Wandeler, P., Funk, S., M., Short microsatellite DNA markers for the red fox (*Vulpes vulpes*), Mol. Ecol. Notes, 6, 98-100, 2005.
10. Inoue, T. ve ark., Mitochondrial DNA Phylogeography of the Red Fox (*Vulpes vulpes*) in Northern Japan, Zool. Scien., 24, 1178–1186, 2007.
11. Kirschning, J. ve ark., Population Genetic Analysis of Serbian Red Foxes (*Vulpes vulpes*) by Means of Mitochondrial Control Region Sequences, Biochem. Genet., 45 (5/6), 409-420, 2007.

12. Aubry, K. B. ve ark., Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia, *Mol. Ecol.*, 18, 2668–2686, 2009.
13. Temizer, A., Türkiye Tilkileri (*Vulpes vulpes*) Alttürlerinin Taksonomik Durumu, *F.Ü. Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi*, 13 (2), 15-24, 2001.
14. Yiğit, N. ve ark., Notes on the Mammals Found in Kazdağı National Park and Its Environs, *Turk. J. Zool.*, 30, 73–82, 2006.
15. Gündüz, İ. ve ark., Mitochondrial DNA and chromosomal studies of wild mice (*Mus*) from Turkey and Iran, *Heredity*, 84 (4), 458-467, 2000.
16. Gündüz, İ. ve ark., Mitochondrial DNA variation in the western house mouse (*Mus musculus domesticus*) close to its site of origin: studies in Turkey, *Biol. J. of Linn. Soc.*, 84, 473–485, 2005.
17. Gündüz, İ. ve ark., Multigenic and morphometric differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, Scuriidae, Rodentia) in Turkey, with a description of a new species, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43, 916-935, 2007.
18. Vogel, P.J., Cosson, J.F., Jurado, L.F.L., Taxonomic status and origin of the shrews (Soricidae) from the Canary islands inferred from a mtDNA comparison with the European *Crocidura* species, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 27, 271- 282, 2003.
19. Neumann, K. ve ark., Molecular phylogeny of the Cricetinae subfamily based on the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes and the nuclear vWF gene, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 39, 135-148, 2006.
20. Dubey, S. ve ark., Molecular phylogenetics of Shrew (Mammalia: Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations, *Mol. Phlogenet. Evol.*, 44, 126-137, 2007.
21. Dubey, S. ve ark., Mediterranean populations of the lesser white-toothed shrews (*Crocidura suaveolens* groups): an unexpected puzzle of pleistocene survivor and prehistoric introductions, *Mol. Ecol.*, 16, 3438 - 3452, 2007.

22. Dubey, S. ve ark., Molecular evidence of Pleistocene bidirectional faunal exchange between Europe and the Near East: the case of the bicoloured shrew (*Crocidura leucodon*, Soricidae), European Society for Evolutionary Biology, 20, 1799 - 1808, 2007.
23. Dubey, S. ve ark., Biogeographic origin and radiation of the old world crocidurinae shrews (Mammalia: Soricidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes, Mol. Phylogenet. Evol., 48, 953-963, 2008.
24. Dubey, S. ve ark., Secondary contact zones and hybridization: the case of the lesser white-toothed shrew (*Crocidura suaveolens* group, Soricidae), Biol. J. of Linn. Soc., 95, 557-565, 2008.
25. Miller, S., Harley, J.P., Miller–Harley: Zoology, Fifth Edition, The McGraw–Hill Companies, 2001.
26. Kleiman, D.G., Geist, V., McDade, M.C., Grzimek's Animal Life Encyclopedia, Second Edition, V.14, Mammals III, Gale Group, 2003.
27. Nowak, R. M., Walker's Mammals of the World, The Johns Hopkins University Press, London, 1991.
28. Larivière, S., Pasitschniak, M., *Vulpes vulpes*, Mammalian species, 537, 1-11, 1996.
29. O'Brien, S.J., Menninger, J.C., Nash, W.G., Atlas of Mammalian Chromosomes, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2006.
30. Ruokonen, M., Phylogeography and Conservation Genetics of the Lesser White-Fronted Goose (*Anser erythropus*), Department of Biology, University of Oulu, 2001.
31. Avise, J.C., Molecular Markers, Natural History and Evolution Chapman and Hall, London, 1994.
32. Bardeleben, C., Moore, R.L., Wayne, K., A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci, Mol. Phylogenet. Evol., 37, 815–831, 2005.

33. Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A., C., Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals, *J. Mol. Evol.*, 32, 128-44, 1991.
34. Bandelt, H-J., Macaulay, V., Richards, M., Human Mitochondrial DNA and the Evolution of *Homo sapiens*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006.
35. Hall, T., BioEdit v.7.0.9, Biological Sequence Alignment Editor for Win95 / 98 / NT / 2K / XP., Ibis Biosciences, 2007.
36. Rozas, J., Librado, P., DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25, 1451-1452, 2009.
37. Tamura, K. ve ark., MEGA4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0., *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599, 2007.
38. Kumar, S. ve ark., MEGA, A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences, *Briefings in Bioinformatics*, 9, 299-306, 2008.
39. Saitou, N., Nei, M., The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425, 1987.
40. Wilson, A.C., Restriction mapping in the molecular systematics of mammals: a retrospective salute, Elsevier Science Publisher Biomedical Division, 29, 407-419, 1989.
41. Delisle, I., Strobeck, C., A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37, 192–201, 2005.
42. Tobe, S.S., Linacre, A.M.T., A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene, *Electrophoresis*, 29, 340–347, 2008.
43. Dalen, L., Götherström, A., Angerblön, A., Identifying species from pieces of faeces, *Conserv. Genet.*, 5, 109–111, 2004.
44. Wayne, R.K. ve ark., Mitochondrial DNA Variability of the Gray Wolf: Genetic Consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation, *Conserv. Biol.*, 6 (4), 559-569, 1992.

45. Vilà, C. ve ark., Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*, *Mol. Ecol.*, 8, 2089–2103, 1999.
46. Sommer, R., Benecke, N., Late-Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (Canidae), *Mamm. Biol.*, 70 (4), 227–241, 2005.
47. Zachos, F.E. ve ark., Genetic Variability, Differentiation, and Founder Effect in Golden Jackals (*Canis aureus*) from Serbia as Revealed by Mitochondrial DNA and Nuclear Microsatellite Loci, *Biochem. Genet.*, 47, 241–250, 2009.
48. Perrine, J. D. ve ark., Genetic evidence for the persistence of the critically endangered Sierra Nevada red fox in California, *Conserv. Genet.*, 8, 1083–1095, 2007.
49. Valière, N. ve ark., Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years, *Animal Conservation*, 6, 83–92, 2003.
50. Simonsen, V. ve ark., Genetic differentiation of foxes (*Vulpes vulpes*) analysed by means of craniometry and isozymes, *J. Nat. Conserv.*, 11, 109–116, 2003.
51. Gachot-Neveu, H. ve ark., Genetic Detection of Sex-Biased and Age-Biased Dispersal in a Population of Wild Carnivore, the Red Fox, *Vulpes vulpes*, *Zool. Scien.*, 26, 145–152, 2009.
52. Kukekova, A.V. ve ark., A Marker Set for Construction of a Genetic Map of the Silver Fox (*Vulpes vulpes*), *J. Hered.*, 95 (3), 185–194, 2004.
53. Turan, L., Ankara Nallıhan Örneğinde Yaban Hayatı Envanteri, *Trakya Üniv. Bil. Arş. Derg.*, 4 (1), 9-16, 2003.

ÖZGEÇMİŞ

Osman İBİŞ 15.03.1984 tarihinde Yozgat'ın Şefaati ilçesinde doğdu. İlköğrenimini İbrahimhacılı köyü ilkokulunda, orta öğrenimini Yozgat Erdoğan Akdağ Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2007 yılında bu programdan mezun oldu. 2007 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji bölümünde yüksek lisansa başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.

Adres İbrahimhacılı köyü
Şefaati, YOZGAT
66800

Telefon Cep: 0535 369 9775
Ev: 0354 574 5024

E-mail ibis.osman@gmail.com

