

**TÜRKİYE *ERINACEUS*
(ERINACEOMORPHA: MAMMALIA)
CİNSİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ:
MİTOKONDRIAL DNA (mtDNA)
ANALİZİ**

DUYGU TİRYAKİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE *ERINACEUS*
(ERINACEOMORPHA: MAMMALIA) CİNSİNİN MOLEKÜLER
FİLOGENİSİ: MİTOKONDRIAL DNA (mtDNA) ANALİZİ

DUYGU TİRYAKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. İSLAM GÜNDÜZ

SAMSUN-2009

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 27/08/2009 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Üye: Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ

Üye: Doç. Dr. Miray SÖKMEN

ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

/ /2009

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZ

TÜRKİYE *ERINACEUS*
(ERINACEOMORPHA: MAMMALIA) CİNSİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ:
MİTOKONDRIAL DNA (mtDNA) ANALİZİ

Bu çalışmada tRNA-Thr, tRNA-Pro ve kısmi D-loop (542 bç) mtDNA sekansları kullanılarak, Türkiye'deki *Erinaceus* cinsi kirpilerinin moleküler filogenisi çalışılmıştır. Kırkbeş farklı lokaliteden 41 birey analiz edilmiştir. Yirmi *Erinaceus concolor* (Martin, 1838) haplotipi ve 6 *Erinaceus roumanicus* (Barrett-Hamilton, 1900) haplotipi saptanmıştır. Bu haplotipler türlerin coğrafik yapısı ve sınırlarını saptamak için filogenetik analizlere tabi tutulmuşlardır. Distance, Parsimoni, Maksimum Likelihood ve Bayesian metotları mDNA filogenisini göstermek için kullanılmıştır.

mtDNA temelli filogeni 2 soy hattı ile sonuçlanmıştır. Anadolu'ya ait soy hattını *Erinaceus concolor* haplotipleri, Trakya Bölgesi'ndeki soy hattını *Erinaceus roumanicus* haplotipleri temsil etmektedir. Bu çalışmanın filogenetik analiz sonuçları Anadolu'da *Erinaceus roumanicus* bireylerinin olmadığına işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Erinaceus*, mtDNA, D-loop, tRNA, Filogeni, Türkiye

ABSTRACT

MOLECULAR PHYLOGENY IN TURKEY GENUS *ERINACEUS*
(ERINACEOMORPHA: MAMMALIA): MITOCHONDRIAL DNA (mtDNA)
ANALYSIS

This study reports on molecular phylogeny of hedgehogs, genus *Erinaceus*, in Turkey using Thr-tRNA, Pro-tRNA and part of the D-loop (542 bp) mtDNA sequences. Forty five individuals from 41 localities were studied. Twenty *Erinaceus concolor* (Martin, 1838) type haplotypes and 6 *Erinaceus roumanicus* (Barrett-Hamilton, 1900) type haplotypes were detected. These haplotypes were subjected to phylogenetic analyses to detect species boundaries and geographical structure. Distance, Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian methods were used to infer mtDNA phylogeny.

The mtDNA based phylogeny resulted in two main lineages. Lineage from Asia Minor represents haplotypes of *Erinaceus concolor* and lineage from Thrace represents haplotypes of *Erinaceus roumanicus*. *Erinaceus roumanicus* seems to be absent in Asia Minor.

Keywords: *Erinaceus*, mtDNA, D-loop, tRNAs, Phylogeny, Turkey

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın tüm aşamalarında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımnda fikir ve görüşleriyle, yapıcı ve öğretici eleştirileriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ'e,

Araştırma materyalinin temininde emeği geçen Sayın Doç. Dr. Coşkun TEZ'e,
Laboratuar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Araş. Gör. Sadık DEMİRTAŞ'a,

Her zaman yanımda olan maddi manevi desteğini esirgemeyen annem Rahime TİRYAKİ ve babam Fehim TİRYAKİ'ye,

Tezin yazım aşamasında ilgi ve desteklerini gördüğüm arkadaşlarım Bilge KILIÇASLAN ve Seda KOBAL'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
3. MATERYAL METOT.....	12
3.1. Çalışma Materyallerinin Toplanması ve Saklanması.....	12
3.2. Mitokondrial DNA Analizi.....	16
3.2.1. Toplanan DNA'nın İzolasyonu.....	16
3.2.2. Toplam DNA'nın İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	16
3.2.2.1. 50xTAE Çözeltinin Hazırlanışı.....	16
3.2.2.2. Orange G Boyasının Hazırlanışı.....	16
3.2.2.3. Ethidium Bromide Çözeltisinin Hazırlanışı.....	16
3.2.2.4. Agaroz Jelin Hazırlanışı.....	16
3.2.2.5. Total DNA İzolasyon Protokolü.....	17
3.2.2.6. Total DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi.....	18
3.2.2.7. Agaroz Jelin Görüntülenmesi.....	18
3.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Sonrası tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop Bölgesinin Sol Tarafının Eldesi.....	19
3.2.3.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İçin Master Karışımı Hazırlama Protokolü.....	20
3.2.3.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi.....	20
3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	21
3.2.3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması Protokolü.....	21
3.2.3.5. Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi.....	21
3.2.4. Sekans Analizi.....	22
3.2.5. Sekansların Okunması.....	22
3.2.6. Filogenetik Analizler.....	23
3.2.6.1. Bu Çalışma Verileri <i>Erinaceus</i> mtDNA Haplotipleri ile Yapılan Analizler.....	23
3.2.6.1.1. Distance Analizi (Uzaklık Analizi).....	24
3.2.6.1.2. Maksimum Parsimoni (MP) Analizi (Tutumluluk Analizi).....	24
3.2.6.1.3. Maksimum Likelihood (ML) Analizi.....	25

3.2.6.1.4. Bayesian (MrB) Analizi.....	25
3.2.6.2. Mitokondrial DNA haplotiplerinin Populasyon Analizi.....	26
3.2.6.3. Gen Bankası <i>Erinaceus</i> Kısmi tRNA-Pro ve D-loop Haplotipleri İle Bu Çalışmada Bulunan Haplotiplerin Birlikte Analizi.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. mtDNA Analiz Sonuçları.....	29
4.1.1. Sekans Kompozisyonu ve Varyasyonu.....	29
4.1.2. Bu Çalışmaya Ait mtDNA Verilerine Dayalı Filogeni.....	36
4.1.2.1. Distance Analiz Sonuçları.....	36
4.1.2.2. Maksimum Parsimoni (MP) Analizi (Tutumluluk Analizi)	39
4.1.2.3. Maksimum Likelihood (ML) Analizi.....	43
4.1.2.4. Bayesian (MrB) Analizi.....	45
4.1.3. Genetik Çeşitlilik Parametreleri.....	47
4.1.4. Gen Bankası <i>Erinaceus</i> Kısmi tRNA-Pro ve D-loop Haplotipleri ile Bu Çalışmada Bulunan Haplotiplerin Birlikte Analizi.....	48
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR.....	61
8. ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

AIC	Akaike bilgi kriteri (Akaike information criterion)
bç	Baz çifti
CI	Consistency indeksleri
D-loop	Kontrol bölgesi (Displacement loop)
dH₂O	Deiyonize H ₂ O
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
G (α)	Gamma doğrulama değeri (gamma distributed shape parameter)
HKY	Hasegawa-Kishino-Yano değişken baz frekansı
hLRT	Hiyerarşik olası oran testi (hierarchical likelihood ratio test)
I	Değişim göstermeyen pozisyon frekans değeri (proportion of invariable sites)
K2P	Kimura 2 Parameter değişken baz frekansı
K3P	Kimura 3-parameter değişken baz frekansı
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
ML	Maksimum Likelihood
MP	Maksimum Parsimoni
mtDNA	Mitokondrial DNA
MrB	Bayesian analizi
NJ	Neighbour joining
NOR	Nucleolar organizör region, nükleolus düzenleyici bölge
PAUP*	Parsimoni kullanarak filogenetik analiz (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
RI	Retention indeksleri
TAE	Tris-asetik-asit-EDTA
Taq Gold	Thermus aquaticus'dan izole edilen termostabil DNA polimeraz
TBR	Tree-bisection-reconnection araştırma algoritması
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
tRNA	Taşıyıcı RNA
rRNA	Ribozomal RNA

tRNA-Pro	Proline tRNA
tRNA-Thr	Threonyl-tRNA
TrN	(Timura-Nei) değişken baz frekansı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. <i>Erinaceus</i> cinsine ait 41 bireyin toplandığı lokaliteler, detaylı bilgi Çizelge 3.1’de verilmiştir.....	15
Şekil 3.2. Bitişik tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop geninin sol parçasını amplifiye etmek için L15408Marv ve H16498 primerleri ile yapılan PCR stratejisi.....	20
Şekil 3.3. L-15408Marv ve H-15498 nolu primerler ile elde edilen ham sekans verisinin kısmi görünümü.....	23
Şekil 4.1. Total DNA izolasyonu sonrası elde edilen jel (1-15: <i>Erinaceus</i> örnekleri ve B: 100 bç’lik belirteç).....	28
Şekil 4.2. L15408Marv ve H16498 primerleri ile elde edilen t-RNA-Thr,t-RNA-Pro ve D-loop geninin PCR ürünleri (1-14: PCR ürünleri, K: negatif kontrol, B: 100bç’lik belirteç).....	29
Şekil 4.3. <i>E. roumanicus</i> ’da bulunan 6 haplotipin konsensus sekansı.....	33
Şekil 4.4. <i>E. concolor</i> ’da bulunan 20 mtDNA haplotipinin konsensus sekansı.....	34
Şekil 4.5. HKY baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan 20 <i>Erinaceus</i> haplotipi arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren Neighbour Joining (NJ) ağaç. Dallar üzerindeki rakamlar 10 000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir. Dış grup olarak <i>E. europaeus</i> kullanılmıştır.....	38
Şekil 4.6. Parsimoni analizi sonucu elde edilen eşit olasılıkta 6 parsimoni ağacı. Ağaç uzunlukları 42, Consistency indeksleri (CI) 0,762 ve Retention indeksleri (RI) 0.905.....	40
Şekil 4.7. Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 6 kısa ağacı özetleyen %50 Majority Rule Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar hangi kladların ağaçların %50 sinde (3 ağaç) olduğunu göstermektedir. <i>E. europaeus</i> dış grup olarak kullanılmıştır.....	41
Şekil 4.8. Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 6 kısa ağacı özetleyen strict konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar 1000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir. <i>E. europaeus</i> dış grup olarak kullanılmıştır.....	42

Şekil 4.9. Maksimum likelihood analizi sonucu oluşturulan ağaç. Dallar üzerindeki rakamlar 1000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir.....	44
Şekil 4.10. Bayesian analizi sonucu elde edilen %50 Majority Rule konsensus ağacı. Ağaç üzerinde olasılık değerleri gösterilmiştir.....	46
Şekil 4.11. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan <i>E. concolor</i> 'a ait haplotipler ile bu çalışma sonrası elde edilen haplotiplerden K2P baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş NJ ağaç. Dallar üzerindeki rakamlar 10000 replikasyon sonucu oluşan bootstrap değerlerini göstermektedir. <i>E. europaeus</i> dış grup olarak kullanılmıştır.....	51
Şekil 4.12. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan farklı <i>Erinaceus</i> türlerine ait haplotipler ile bu çalışmada elde edilmiş haplotiplerin Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 25 kısa ağacını özetleyen %50 Majority Rule Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar hangi kladların ağaçların %50 sinde olduğunu göstermektedir. Parantez içlerinde eş haplotipler belirtilmiştir. <i>E. europaeus</i> dış grup olarak kullanılmıştır.....	53
Şekil 4.13. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan farklı <i>Erinaceus</i> türlerine ait haplotipler ile bu çalışmada elde edilmiş haplotiplerin Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 25 kısa ağacı özetleyen Strict Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar 1000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir. <i>E. europaeus</i> dış grup olarak kullanılmıştır.....	54
Şekil 4.14. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan farklı <i>Erinaceus</i> türlerine ait haplotipler ile bu çalışmada elde edilmiş haplotiplerin kimura 2 parametresi kullanılarak elde edilen mrbayes K2P %50 Majority rule konsensus ağacı. <i>E. europaeus</i> dış grup olarak kullanılmıştır.....	55

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. mtDNA Analizi İçin Kullanılan Türkiye <i>Erinaceus</i> Örneklerinin Lokaliteleri.....	13
Çizelge 4.1. Türkiye <i>Erinaceus</i> Bireylerinden Elde Edilen tRNA-Thr, tRNA-Pro, D-loop Sekans Verileri ve Sonrasında Bulunan Haplotipler.....	31
Çizelge 4.2. Eş Haplotipler, İndel Bölgelerinin Çıkarılmasıyla Aynı Olan Haplotipler (533 bç).....	34
Çizelge 4.3. Eş Haplotipler, İndel Bölgelerinin Çıkarılmasıyla Aynı Olan Haplotipler (389 bç).....	35
Çizelge 4.4. tRNAs+D-loop (indelli, 537 bç) Kullanılarak <i>Erinaceus</i> Türleri (<i>E. concolor</i> ve <i>E. roumanicus</i>) İçin Hesaplanan Ham DNA Çeşitliliği (Dxy, aşağıdaki köşe) ve Net DNA Çeşitliliği (Da, yukarıdaki köşe) Değerleri.....	47
Çizelge 4.5. tRNAs+D-loop (indelli, 542 bç) İçin <i>Erinaceus</i> Türleri İçindeki Haplotip Çeşitliliği (<i>h</i>) ve Nükleotit Çeşitliliği, Standart Hata (SH) Değerleri	48
Çizelge 4.6. Seddon ve ark., (2001, 2002) Tarafından Yayımlanan ve Gen Bankasında Depolanan <i>E. concolor</i> Türlerine Ait Haplotipler.....	50

1.GİRİŞ

Organizmaların DNA sekans verilerinin elde edilmesi, moleküler biyolojideki en önemli gelişmelerden birisidir. Mevcut DNA sekans verilerindeki hızlı büyüme, birçok türleşme, evrimsel genetik, taksonomi ve filocografik problemlerin anlaşılması ve açıklanması için moleküler verilerin daha da etkin ve yoğun bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. DNA sekans temeline dayalı moleküler filogenetik metotlar için bilgi elde edebileceğimiz moleküler karakterler yani genetik belirteçler proteinler ve DNA'dır. Nükleer DNA'dan da veri elde edebileceği gibi mitokondrial DNA (mtDNA) ve kloroplast DNA'sından da veri elde edebilir (Hall, 2007).

Taksonomide yaygın olarak eşey kromozomları, NOR (nucleolar organizier region, nükleolus düzenleyici bölge) bölgesi, mtDNA ve alloenzim analizleri kullanılmaktadır (Irvin ve ark., 1991; Nachman ve ark., 1994; Nagamine ve ark., 1994; Awasthi ve ark., 1999; Seddon ve ark.,2001; Hauffe ve ark., 2002; Brahim ve ark., 2005).

Hayvan mtDNA'sı ökaryotik genomun en iyi bilinen ve karakterize edilmiş bölgeleri arasındadır. Metazoaların mtDNA molekülü büyüklüğü 15 000 ile 19 500 bp arasında değişen, çift zincirli, kapalı halkasal yapıda bir DNA'dır. Yapısal karakteristikleri tüm metazoa mtDNA'larında ortaktır (Brown, 1985).

Yaklaşık olarak mtDNA'nın %94,4'ü kodlama yapar, transfer RNA (tRNA) genleri ribozomal RNA (rRNA) ve protein kodlayan genler arasına yerleşmiştir (Bibb ve ark., 1981). Hayvansal mtDNA büyük ölçüde korunmuş, 13 protein, 22 tRNA ve 2 rRNA genleri taşıyan yoğun genomlu bir organel DNA'sıdır (Anderson ve ark., 1981; Chomyn ve ark., 1985,1986).

Mitokondrial DNA'nın 879 nükleotitlik D-loop (displacement loop) bölgesi RNA ya da protein kodlamayan tek bölgedir. Bu bölge kontrol bölgesi olarak da bilinir çünkü L ve H zincirlerinin transkripsiyonunu başlatan promotor sekanslarını içerir (Clayton, 1984; Attardi, 1985; Cantatorre ve Saccone, 1987). H zinciri (O_H) D-loop bölgesindedir, L zinciri (O_L) beş tRNA geni arasında bulunur. mtDNA'nın replikasyonu devamlı, asimetrik ve tek yönlüdür (Clayton, 1982; Moritz ve ark., 1987).

Memeli mtDNA'sının önemli karakteristiği hızlı evrimleşmesidir (Brown, 1985). mtDNA sekans farklılaşması oran sırası D-loop > protein kodlayan genler > rRNA > tRNA genleri şeklindedir (Brown, 1985). En yüksek baz değişim oranı D-loop bölgesindedir (Aquadro ve Greenberg, 1983).

D-loop memeli mtDNA'sında kodlanmayan tek büyük bölgedir ve diğer bölgelere göre bu parçadaki sekans varyasyonu daha fazladır. Bu nedenle bu bölge sekansları çoğu hayvan türleri için türler arası ve tür içindeki ilişkiyi karşılaştırmada kullanılır (Yamagata ve Namikawa, 1999).

Nüklear DNA'dan farklı olarak mitokondrial DNA sadece önemli fonksiyonu olan gerekli proteinleri kodlar, kodlanmayan bölge nadirdir (Roderick ve Holmes, 2006).

Memelilerde mtDNA'daki mutasyonlar nüklear DNA'dan 10 kat daha hızlı biriktiği için moleküler populasyon ve sistematik çalışmalarında oldukça önemli bir materyaldir (Roderick ve Holmes, 2006).

mtDNA'nın basit yapıda ve gen organizasyonu yönünden küçük bir genom olması, hemen hemen bütün hayvanlarda bulunması, çok sayıda kopyası olması, bu sebeple izole edilmesinin kolay olması, anneden kalıtılması, rekombinasyon göstermemesi, evrimsel değişim hızı (Bibb ve ark., 1981; Brown, 1985) gibi genel özellikleri mtDNA'yı populasyon yapı çalışmalarında, gen akışı, hibridizasyon, biyocoğrafya ve çeşitli taksonomik seviyedeki filogenetik ilişkilerde kullanılan mükemmel bir araç yapar.

Bu çalışmada mitokondrial DNA'nın bitişik tRNA-Thr, tRNA-Pro ve en fazla değişkenlik gösteren D-loop'un sol bölgesi genetik belirteç olarak kullanılarak Türkiye'de yayılış gösteren *Erinaceus* cinsinin moleküler filogenisi yapılmış, DNA tabanlı gen ağaçları oluşturulmuş ve bu taksonun Türkiye'deki taksonomisi hakkında bilgi elde edilmiştir.

Nükleik asit ve protein dizilerinden filogenetik analiz yapabilmek için başlıca 4 yöntem vardır. Birincisi; distance metodu (neighbour joinig, UPGMA), ikincisi maksimum parsimoni (MP), üçüncüsü maksimum likelihood (ML), dördüncüsü bayesian (BAY) yöntemleridir. Hiçbir yöntem en iyi değildir, seçim veri setinin karışıklığı ve boyutuna bağlıdır (Hall, 2007).

Distance metodu sekans verilerinin evrimsel uzaklık değerlerine çevrilmesini temel alan bir metottur. Evrimsel uzaklığı içeren matris (nükleotit sayısı ya da iki

taksayı ayıran amino asit baz değişimi) bütün taksa çiftleri için karşılaştırılarak hesaplanır, ve filogenetik ağaç distance değer çiftleri içinde bazı fonksiyonel ilişkileri temel alan bir algoritma kullanılarak yapılır. Kullanılan iki distance metot UPGMA ve neighbour joining metotlarıdır (Swofford ve Olsen, 1990).

Maksimum parsimoni metodunun prensibi veri seti için evrimsel değişim sayısını minimum yapan filogeninin seçimidir. Diğer bir deyişle, orijinal veri setini açıklamak için, en az sayıda evrimsel basamağı (bir karakter durumunun başka bir durumuna dönüşmesi) gerektiren en parsimonik ağacı arar (Hillis ve Mortiz, 1990; Swofford ve Olsen, 1990).

Maximum likelihood metodu, Felsenstein (1973) ve Farris (1973) tarafından ortaya konmuştur. Bu metod, evrimsel değişimleri basit bir olasılık modeli altında ele alır. Veri seti için en olası ağacı seçer (Başbüyük ve ark., 2000).

Bayesian yaklaşımı (Rannala ve Yang 1996; Mau ve Newton 1997; Mau ve ark. 1999) çok yeni ve çoğu sistematikçinin yabancı kaldığı bir metottur. Hızlı bir popularite elde etmesi olası, güçlü bir yaklaşımdır. Diğer metotlara göre belirgin avantajlar sunar. Kullanımı kolay, hızlı bir programdır ve çok büyük filogenilerle baş edebilmesi açısından avantajlı bir programdır (Hall, 2007).

Bu çalışma Türkiye *Erinaceus* cinsi üzerine yapılan moleküler bir çalışmadır. Türkiye’de bugüne kadar *Erinaceus* cinsi üzerine yapılan çalışmalar genel olarak karyolojik ve morfolojik bilgilere dayanmaktadır (Kral, 1966; Kratochvil, 1966; Giagia, 1977; Corbet, 1978; Dulic ve Tritkovic, 1979; Giagia ve Ondrias, 1980; Kryštufek, 1983; Gündüz ve Doğramacı, 1993). Fakat bu yöntemler günümüzdeki taksonomik araştırmalarda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenlerle son yıllarda moleküler çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bugüne kadar yapılan allozim, sitokrom *b*, D-loop bölgesi, çalışmalarında *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758 ve *Erinaceus concolor* Martin, 1838 ayrımı kesinleşmiştir. Ayrıca *E. concolor* popülasyonunun iki alt soy hattına ayrıldığı ve bu soy hatlarından Avrupa *E. concolor* popülasyonunun, Anadolu ve İsrail *E. concolor* popülasyonundan farklı olduğu görülmüştür (Filippucci ve Simson, 1996; Santucci ve ark., 1998; Seddon ve ark., 2001, 2002). Bu soy hatlarından Avrupa popülasyonunu oluşturan soy hattının *Erinaceus roumanicus* Barrett-Hamilton, 1900 olması gerektiği belirtilmiştir (Filippucci & Simson, 1996). Buna ek olarak, Seddon ve ark. (2002)’nin belirttiği Kafkasya Sıradağları’nın kuzey ve güney *E. concolor* gruplarındaki ayrılık, Türkiye ve Yakın Doğu’da gizli kalmış refuj ya da bir refujdan

çoktandır devam eden bir parçalanmanın olabileceğini göstermektedir. Kafkasya Sıradağları'nın güney parçasında kolonize olmuş kirpilerin kökeni net değildir. (Seddon ve ark., 2002; Arslan ve ark., 2008).

Berggren ve ark. (2005), *E. concolor* alt soy hatları arasındaki farklılığın Boğazlar ile ilişkili olabileceğini ve Boğazlar'ın bu ayrıma neden olabileceğini belirtmişlerdir.

E. concolor soy hatlarındaki Anadolu, İsrail ve Avrupa dağılımı farkı, Kafkasya Sıradağları'nın kuzey ve güneyindeki *E. concolor* farklılığı nedenleriyle Türkiye'deki *E. concolor*'ların durumunu anlayabilmek ve daha fazla örneğe dayalı bir çalışma yapılmasına gereksinim duyulmuştur. Bu sebeple Türkiye'de yayılış gösteren *Erinaceus* cinsine ait türler arasındaki filogenetik ilişkiler ve hem türler arası hem de tür içi genetik varyasyonlar moleküler belirteçler kullanılarak bu çalışmada araştırılmıştır. Çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden *Erinaceus* cinsine ait örnekler toplanmış, mitokondrial DNA (mtDNA) analizleri ve buna dayalı filogenileri yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Erinaceus Linnaeus, 1758 (Kirpiler), Erinaceidae G. Fischer, 1814 familyası, Erinaceomorpha ordosuna bağlı bir cinstir. *Erinaceus* (Kirpiler) daha önceki çalışmalarda Insectivora (Hutterer, 1993) veya Lipotyphla ordosunda yer almasına rağmen, şu anda Erinaceomorpha ordosu içinde değerlendirilmektedir. Erinaceomorpha ismini 1910 yılında Gregory önermiştir ve geniş olarak paleontoloji literatüründe o zamandan beri kullanılmaktadır (Hutterer, 2005).

Şu andaki çoğu taksonomik görüşe göre (MacPhee ve Novacek, 1993) Insectivora ordosu Lipotyphla üç subordo içermektedir: Erinaceomorpha Erinaceidae familyası (kirpiler, gymnures) ile; Chrysochloromorpha Chrysochloridae (altın köstebek) familyası ile; ve Soricomorpha Solenodontidae (solenodons), Tenrecidae (Madagascan tenrec, Afrika su sivrifaresi), Soricidae (sivrifare) ve Talpidae familyasıyla (köstebek, sivrifare-köstebek, misk faresi).

Erinaceidae familyası Erinaceomorpha ordosunun yaşayan tek familyasıdır (Hutterer, 2005).

Erinaceus cinsi üçü batı palearktik bölgede yaşayan dört tür içerir. Bu türler *Erinaceus amurensis* Schrenk, 1859 Rusya ve Doğu Sibirya'da, *Erinaceus concolor* Martin, 1838 Anadolu'da, İsrail, Suriye, Lübnan, Irak ve İran; Güney Kafkasya (Gürcistan, Ermenistan, Azerbaycan) Bölgesi'nde görülür (Hutterer, 2005). Batı Avrupa kirpisi olan *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758 Batı Avrupa'da İskandinavya'da ve Rusya'nın Kuzey batı parçasında dağılım göstermektedir (Mitchell-Jones ve ark., 1999). *Erinaceus roumanicus* Barrett-Hamilton, 1900 Avrupa'da, Polonya'dan Avusturya ve Slovenya'ya; Balkan devletlerinde, Yunanistan ve Adriyatik adalarında (Girit, Korfu, Rodos), Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde; doğuda Rusya ve Ukrayna, Kuzey Kafkasya, Batı Sibirya ve Ob nehri boyunca görülür (Hutterer, 2005).

Türkiye kirpileri üzerine yapılan morfolojik çalışmalarda ilk defa Bennet (1835), Abbot tarafından 1833–1835 yılları arasında Trabzon'dan toplanan örneklerle dayanarak *E. europaeus* kaydı vermiştir. Martin (1838), Abbot tarafından toplanan bu örneklerle dayanarak *Erinaceus concolor* adı ile yeni bir tür tanımlamıştır. 1993 yılında Gündüz ve Doğramacı (1993) Türkiye'deki *Erinaceus* cinsi üzerine yaptıkları karyolojik çalışmada

Türkiye’de *E. concolor* türüne ait üç alttür: *E. c. concolor* Martin, 1838, Türkiye’nin kuzey ve kuzeydoğusu; *E. c. transcaucasicus* Satunin, 1905, Anadolu’nun güneyi ve merkezi; *E. c. drozdovskii* Martino, 1930, Türkiye’nin Trakya Bölgesi’nde olduğunu tespit etmişlerdir.

Miller (1912), doğu kirpilerini batıda bulunan *E. europaeus*’den ayırmış ve *Erinaceus roumanicus* Barrett-Hamilton, 1900 ismini vermiştir. Buna rağmen Kratochvil (1966, 1975) iki kirpinin merkez Avrupa’da çakıştığını göstererek Doğu kirpilerini tekrar *E. concolor* Martin, 1838 adı altında birleştirmiştir.

Erinaceus cinsi, Palearktık bölgede geniş bir yayılış göstermektedir. 1966 yılına kadar yapılan morfolojik araştırmalarda Avrupa ve Türkiye’de yalnızca *Erinaceus europaeus* L., 1758 türünün dağılım gösterdiği kaydedilmiştir (Corbet, 1978). 1966 yılından itibaren yapılan karyolojik araştırmalarda ise Kuzey ve Batı Avrupa’da *Erinaceus europaeus* L., 1758 türünün Doğu ve Güneydoğu Avrupa’da ise *Erinaceus concolor* Martin, 1838 türünün yayılış gösterdiği belirlenmiştir (Kratochvil, 1966; Kryštufek, 1983). Kratochvil (1966)’ dan sonra yapılan karyolojik çalışmalarda bu tarihe kadar Doğu Avrupa’da morfolojik özelliklere göre *E. europaeus* olarak verilen tüm populasyonların *E. concolor*’a ait olduğu, *E. europaeus*’un Kuzey ve Batı Avrupa’da *E. concolor*’un ise Doğu ve Güney Doğu Avrupa’da yayılış gösterdiği tespit edilmiştir (Kral, 1966; Giagia, 1977; Dulic ve Tritkovic, 1979; Giagia ve Ondrias, 1980; Kryštufek, 1983). Gündüz ve Doğramacı (1993) Trabzon’dan toplanan topotip örneklerinin morfolojik ve karyolojik özelliklerini detaylı inceleyerek literatür bilgileri ile karşılaştırılmış ve Türkiye *E. concolor* topotip örneklerinin karyotipinin, Batı Avrupa *E. europaeus* örnekleri için verilen karyotipten farklı, Doğu Avrupa ve Rusya’dan verilen *E. concolor* örneklerinin karyotipi ile benzer olduğunu tespit etmişlerdir ve Türkiye *Erinaceus* örneklerini *E. concolor* olarak vermişlerdir. Kirpi taksonomisi yapılan karyolojik çalışmalarla kısmen çözümlenmiştir (Filippucci ve Simson, 1996).

Giagia ve ark. (1996) tarafından *E. concolor*’larda morfometrik karakter analizi Yunanistan’dan 191 tür içinde ve yayınlanmış veriler (Bulgaristan’dan 76, Yugoslavya’dan 21, Anadolu’dan 9) kullanılarak uygulanmıştır. Bu analizlerde *E. concolor*’a ait *E. c. bolkayi*, Martino, 1930; *E. c. transcaucasicus* Satunin, 1905; *E. c. drozdovskii* Martino, 1930; *E. c. nesiotetes* Bate, 1905; *E. c. rhodius* Festa, 1925’ a

rastlanmıştır. Anadolu'dan bir örnek *E. c. transcausicus* olarak tanımlanmıştır (Wettstein, 1942).

Yakın zamanda yapılan moleküler araştırmalar *Erinaceus* cinsi içerisinde filogenetik ve taksonomik sorunlara işaret etmektedir (Filippucci ve Simson, 1996; Santucci ve ark., 1998; Seddon ve ark., 2001). Filippucci ve Simson, 1996 yılında yaptıkları allozim analizleri sonucunda Batı Palearktik bölgede dört farklı türün yayılış gösterdiğini belirtmişlerdir. Buna göre İber yarım adasında *E. hispanicus* Barrett-Hamilton, 1900, İber yarım adası hariç Kuzey ve Batı Avrupa'da *E. europaeus* L., 1758, Doğu Avrupa ve Balkanlar'da *E. roumanicus* Barrett-Hamilton, 1900 ve Anadolu ve Orta Doğu'da *E. concolor* Martin, 1838 türleri dağılım göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *Erinaceus* cinsi arasında parapatric dağılımla karakterize edilen birçok kardeş türün varlığını gösterir. Ayrıca Filippucci ve Simson (1996), *E. concolor*'un Avrupa ve Orta Doğu popülasyonunun genetik olarak farklı olduğunu *E. concolor* isminin Orta Doğu popülasyonu için kullanılması gerektiğini, Orta Avrupa ve Balkan popülasyonunun *E. roumanicus* olarak isimlendirilmesi gerektiğini söylemiştir.

Santucci ve ark., (1998), *E. europaeus* ve *E. concolor*'a ait Avrupa kirpi popülasyonlarında, mitokondrial DNA alışması yürütmüşlerdir. Bu araştırmada 383 bç'lik sitokrom *b* gen bölgesi sekans analizi kullanılarak, filogenetik ağaçlar üretilmiştir. Hemen hemen tüm Avrupa, Türkiye ve İsrail'den 56 *Erinaceus* bireyi analizlerde kullanılmıştır. Yapılan analizlerde *E. europaeus* ve *E. concolor* arasında belirgin farklılıklar bulunmuştur. Bu Filippucci ve Simson (1996)'un bulgularını da destekler bir sonuçtur. Gözlenen örneklerdeki farklılığın Pleistosen buzullaşmasının etkisiyle olduğu sonucu çıkarılmıştır (Santucci ve ark., 1998). Yine bu çalışmada *E. europaeus* ve *E. concolor*'un iki ana soy hattına ayrıldığı, bu ana soy hatlarının da kendi içinde alt soy hatlarına ayrıldığı görülür. *E. europaeus* için üç alt soy hattı elde edilmiştir. *E. concolor*'un da iki alt soy hattı mevcuttur. *E. concolor*'un bu soy hatlarından ilki Balkanlar, Yunanistan ve Kuzey Doğu İtalya'dan, ikinci soy hattı ise, Türkiye ve İsrail'den haplotipleri içermektedir. Türkiye ve İsrail soy hatlarındaki haplotiplerin, Balkanlar, Yunanistan ve Kuzey Doğu İtalya'daki haplotiplerden farklılığı Türkiye'nin kuzeyinde ve Yakın Doğu'da bir refuj olabileceği ihtimalini artırmıştır (Santucci ve ark., 1998).

Erinaceus europaeus ve *Erinaceus concolor* arasındaki farklılık Seddon ve ark. (2001)'nin Avrupa kirpileri üzerinde yaptıkları mtDNA analizleriyle de desteklenmiştir.

Kontrol bölgesi ve sitokrom *b* gen bölgesi sekans analizleriyle filogenetik ağaçlar elde edilmiştir. Tüm ağaçlarda iki ana soy hattı *E. europaeus* ve *E. concolor* yüksek bootstrap değeriyle desteklenmiştir. Bu ana soyhatlarında da üç *E. europaeus* alt soy hattı ve iki *E. concolor* alt soy hattı bulunmuştur. *E. concolor*'dan elde edilen iki soy hattı C1 ve C2 olarak isimlendirilmiştir. C1 soy hattı Doğu Avrupa'da Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde ve Yunanistan'da, Avusturya, Macaristan ve Estonya'da, C2 soy hattı Türkiye (Anadolu) ve İsrail'de tanımlanmıştır. Bu daha önceki çalışmalarda elde edilen iki *E. concolor* soy hattını ve bunlardan Trakya'da bulunan C1 soy hattının *E. roumanicus* olması gerektiği düşüncesini (Filippucci ve Simson, 1996; Santucci ve ark., 1998) destekler bir sonuçtur.

Çoğu Avrupa türü için Alp Sıradağları ve Pirene Sıradağları önemli bir bariyer görevi görmektedir (Hewitt, 1999). Benzer bir bariyerin doğuda Kafkasya Sıradağları'ndan dolayı *E. concolor* türü için var olduğu düşünülmektedir. Bu bölge çoğu taxa için bir sınır gibi görünmektedir (Manceau ve ark., 1999). Bu sıradağların güney bölgesi ve kuzey bölgesinde bulunan kirpilerde belirgin bir mtDNA ayrılığı olması Kafkasya Sıradağları ile bölünmüş ve refuj bölgelerinden köken almış iki kolonizasyon rotasının varlığını önermektedir. Balkan refujundan kirpiler Rusya'nın içlerine kuzeye doğru Kafkasya Sıradağları'nın kuzey tepelerine kolonize olmuştur. Kafkasya bölgesinin fosil ve iklimik verileri güney Karadeniz kıyılarında bir glasiyal refuj göstermesine rağmen, Kafkasya bölgesinin güney parçasında kolonize olmuş kirpilerin kökeni net değildir. Kafkasya Sıradağları'nın güney gruplarındaki ayrılık, Türkiye ve Yakın Doğu'da gizli kalmış refuj ya da bir refujdan çoktandır devam eden bir parçalanmanın olabileceğini göstermektedir (Seddon ve ark., 2002).

Yine Seddon ve ark. (2002)'nin Kafkasya bölgesi ve Rusya'dan topladıkları 15 kirpi örneğinin kısmi sitokrom *b* gen bölgesi ve kontrol bölgesi sekansları ile yaptıkları filogenetik analizler ile elde edilen neighbour joining ağacında Kafkasya Sıradağları'nın güneyi ve kuzeyinden toplanan *E. concolor* örneklerinde net bir ayrılık gözlemlenmiştir. Bu haplotipler daha önceki Seddon ve ark., (2001) tarafından elde edilen haplotiplerle birleştirilerek yeniden filogenetik analizleri yapılmış ve Kafkasya Sıradağları'nın güneyine ait haplotiplerin (Gürcistan, Azarbaycan, Ermenistan), Türkiye (Boğazlar'ın Güneyi) ve İsrail haplotipleriyle benzerlik gösterdiğini, örneklerden kuzeye ait olanların (Rusya, Ukrayna) ise Balkanlardaki refujlarda Avusturya, Macaristan ve Estonya'da, Türkiye (Trakya), Yunanistan haplotipleriyle benzerlik

gösterdiğini gözlemlenmişlerdir. Bu nedenle Kafkasya Sıradağları'nın, türlerin son Pleistosen yapılanmasında önemli bir görevi olduğu düşünülmektedir (Seddon ve ark., 2002).

Schaschl ve ark. (2002) tarafından Girit kirpilerinde alloizm ve sitokrom *b* geni çalışması yürütülmüş, üç Girit mtDNA haplotipinin Balkan ve Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nden haplotiplerle benzer olduğu Anadolu ve Filistin örneklerinde ise farklı olduğu görülmüştür ve Girit ve Balkan haplotipleri *E. romanicus* olarak Anadolu ve İsrail haplotipleri ise *E. concolor* olarak değerlendirilmiştir.

Avrupa *E. concolor*'larındaki belirgin ayrılık (Santucci ve ark., 1998, Seddon ve ark., 2001) alloizm verileriyle de doğrulanmıştır (Filippucci ve Simon, 1996). Bu gen havuzu ayırımında mevcut iki tür olabileceği tahmin edilir; Anadolu'da ve Orta Doğu'da *E. concolor*, merkez, doğu ve güneydoğu Avrupa'da *E. roumanicus* (Schaschl ve ark., 2002).

Avrupa kirpilerinde morfometrik (kafatası) varyasyon çalışılmış ve *E. roumanicus* ile *E. concolor* morfotipleri arasında net bir farklılık gözlenmiştir (Kryštufek, 2002). Aynı çalışmada burun-çenekemiği yapısı Doğu Avrupa kirpilerinde iki uzak grubu göstermektedir. Yani Yakın ve Orta Doğu *E. roumanicus* morfotipinin iki uzak taksa içermesi olasıdır (Kryštufek, 2002). Filippucci ve Simon (1996)'ya göre bu durum kuzeybatı Anadolu'dan Avrupa örneklerine benzer fakat diğer Türkiye kirpilerinden ayrı tek bir örnek olarak elde edilmiştir.

Avrupa kirpileri olan Doğu Avrupa'da *E. concolor*, Batı Avrupa'da *E. europaeus*'un iki parapatric tür olması olasıdır (Reeve, 1994).

Berggren ve ark. (2005) Avrupa kirpileri *E. concolor* ve *E. europaeus*'un filocağrafyasına açıklık getirebilmek için MHC (major histocompatibility complex) genlerindeki varyasyonu incelemişlerdir. Allellerin coğrafik dağılımı açısından bu çalışmada elde edilen sonuçlarla, daha önce yapılan mtDNA analizleriyle (Seddon ve ark. 2001) elde edilen sonuçlar arasında net bir benzerlik vardır. Özellikle *E. concolor* türünde Türkiye Boğazları'yla uyumlu olarak bir ayrılma vardır (Berggren ve ark., 2005).

Yapılan biyokimyasal ve moleküler çalışmalar, Doğu Avrupa veya beyaz göğüslü kirpi olan *E. concolor* ve Kuzey beyaz göğüslü kirpi olan *E. roumanicus*'un parapatric dağılımla oluşmuş iki uzak tür olduğunu önermektedir (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Suchentrunk ve ark. 1998; Mitchell-Jones ve ark. 1999; Seddon

ve ark. 2001, 2002; Bannikova ve ark. 2003). Yapılan morfolojik çalışmalar da bunu desteklemiştir (Kryštufek, 2002).

E. roumanicus'un Pleistosen fosil kayıtları çok nadirdir ve ağırlıklı olarak Yunanistan'dandır (Sommer, 2007). Ancak fosil kayıtları Seddon ve ark., (2001)'nin da beklediği gibi Balkanlar'daki refujda Son Glasiyal (23 000-16 000 bin yıl önce) boyunca yaşadığıdır (Koumouzelis ve ark., 2001; Bailey ve ark., 1983). Polonya'dan iki tartışmaya açık *E. romunaicus* fosil kaydı bulunmuştur (Cyrek ve ark., 2000; Rzbeik-Kowalska, 2003). Fosil kayıtlarından birinin bulunduğu katman Holosen katmanıdır (30 000-32 000 bin yıl önce) ve diğer fosil kaydı ise Son Glasiyal'a yakın bir katmanda bulunmuştur (Sommer, 2007).

E. roumanicus'un Holosen fosil kayıtlarında da çok nadirdir sadece Yunanistan'da erken Holosen kayıtlarında vardır (Sommer, 2007; Payne, (1975); Symeonidis ve ark., (1980)'dan).

Genetik veriler de (Beggren ve ark., 2005), fosil kayıtlarında olduğu gibi, *E. europaeus* ile *E. roumanicus*'un kolonizasyonlarının farklı olduğunu belirtir.

Karataş ve ark. (2007), İran kirpilerinin karyotipini çalışmışlar ve Anadolu'daki örneklerle benzer olmayan sonuçlar elde etmişlerdir.

Son filocoğrafik çalışmalar (Seddon ve ark., 2001, 2002) Boğazlar ve Kafkasya Dağları'nı kirpi populasyonlarını ayıran olası bir bariyer olarak sunmaktadır. Bu duruma açıklık getirebilmek için Türkiye'nin Anadolu ve Trakya Bölgeleri'nden *Erinaceus* örnekleri üzerinde yapılan karyotip çalışmasında C-heterokromatin bölgelerinin varyasyonu incelenmiş Anadolu ve Trakya Bölgesi örnekleri arasında farklılıklar görülmüştür (Arslan ve ark., 2008). Bu farklı karyotipler, Arslan ve ark. (2008)'nin bildirdiğine göre Mandahl (1978)'in *Erinaceus* cinsi üzerine yaptığı karyotip bulgularıyla da uyumludur. Buna göre Trakya'da *E. roumanicus* ve Anadolu'da *E. concolor* bulunmaktadır ve bu iki türde karyotiplerindeki C-heterokromatin bölgeleri dağılımı farklıdır. Bu çalışmada NOR bölgelerininin dağılımına da bakılmış ve Güney Kafkasya (Gürcistan, Ermenistan, Azerbaycan)'dan mitotiplerin batı ve merkez Anadolu ve İsrail'den farklı olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile Türkiye'de toplanan *Erinaceus* örnekleri üzerinde mtDNA (tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop bölgesinin sol kısmı) analizi yapılarak DNA tabanlı filogenileri oluşturulmuştur. Ayrıca elde edilen mtDNA haplotipleri daha önce yayınlanmış (Seddon ve ark., 2001, 2002) haplotiplerle bir araya getirilerek hemen

hemen Tüm Avrupa'yı içeren daha geniş veri matrisi oluşturulmuştur. Bu veri matrisinin analizi ile elde edilen evrimsel ağaçların yorumlanması ile Türkiye *Erinaceus* cinsinin filogenisi ve filocoğrafyasına katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

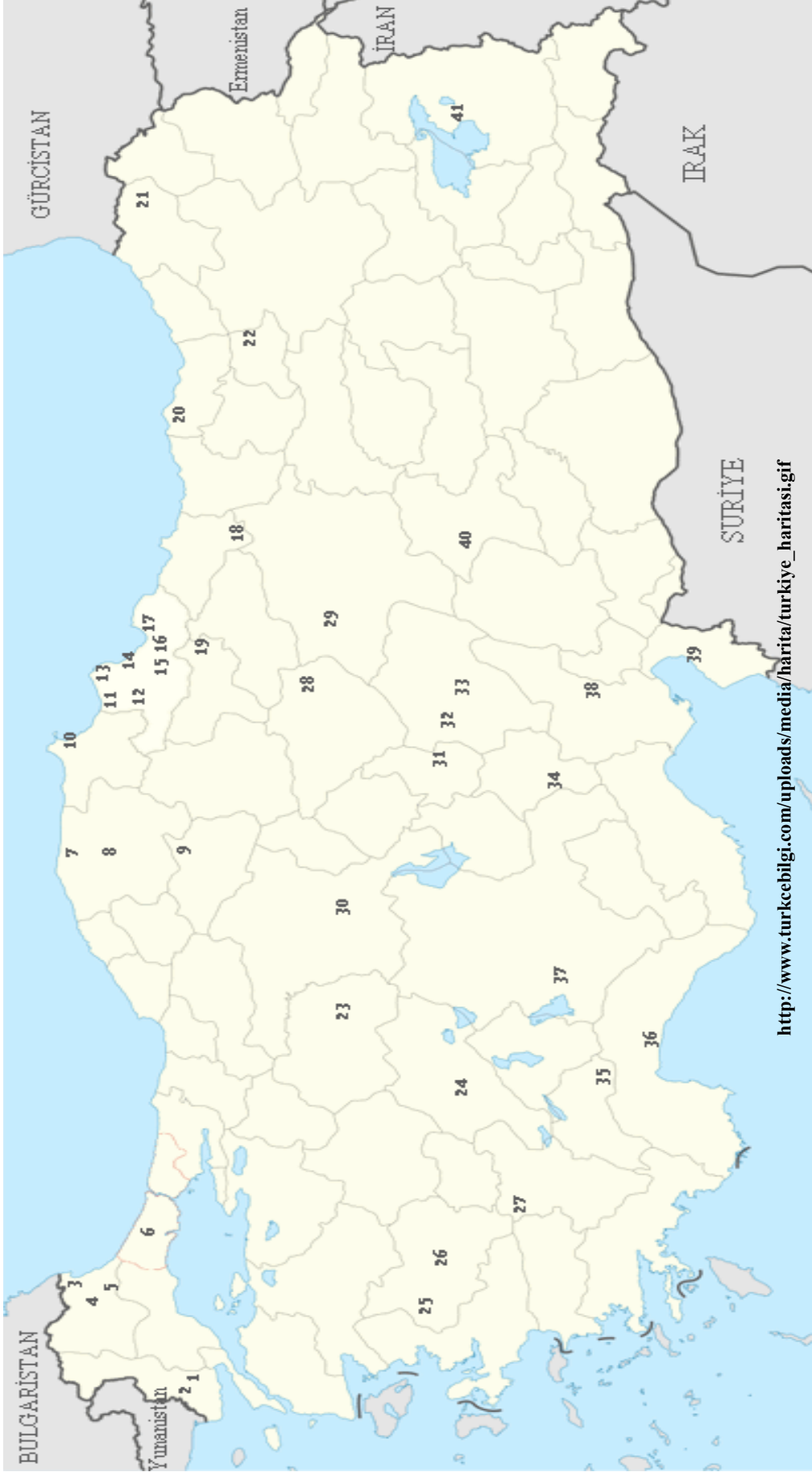
3.1. Çalışma Materyallerinin Toplanması ve Saklanması

Araştırma materyali 2001–2007 yılları arasında Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ, Doç. Dr. Coşkun TEZ tarafından Türkiye'nin 41 lokalitesinden toplanan ve 19 Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi doku bankasında korunan *Erinaceus* cinsine ait doku örneklerinden oluşmaktadır (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1). Örneklerin bazıları canlı olarak toplanmış bunlardan tırnak parçaları alınmıştır, bazıları ise yollarda ölü olarak bulunmuş ve bunlardan bulunduğu yerde örnek alınmıştır. Örnekler böbrek, kuyruk, tırnak dokularından alınmıştır. Alınan örnekler %100 alkol içerisinde +4⁰C de saklanmıştır. Yapılan çalışma sırasında uygulanan metodun, hayvan hakları ve deney etiği açısından uygun olduğu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

ÇİZELGE 3.1. mtDNA Analizi İçin Kullanılan Türkiye *Erinaceus* Örneklerinin Lokaliteleri

Lokalite	Enlem/Boylam	Harita Lokalite Kodu	Birey Sayısı N	Birey Numarası
EDİRNE				
Kızkapan, Keşan	40° 44' N 26° 29' E	1	1	2
İbriktepe, İpsala	41° 00' N 26° 38' E	2	1	4
KIRKLARELİ				
Balaban, Demirköy	41° 49' N 27° 39' E	3	1	49
Balkaya köyü, Vizeler	41° 37' N 27° 57' E	4	1	7
Vize	41° 35' N 27° 46' E	5	1	8
İSTANBUL				
Kızılcaali	41° 14' N 28° 33' E	6	1	9
KASTAMONU				
Gemiciler, İnebolu	41° 58' N 33° 54' E	7	1	558
İmrenler Köyü, Halaçoğlu Mahallesi, Seydiler	42° 39' N 33° 41' E	8	1	556
ÇANKIRI				
Onaç Köyü, Ilgaz	40° 59' N 33° 41' E	9	1	550
SİNOP				
Sarıkum	42° 02' N 34° 56' E	10	1	33
SAMSUN				
Eskikillik, Alaçam	41° 36' N 35° 28' E	11	1	477
Eskikillik, Alaçam	41° 36' N 35° 28' E	11	1	478
Central, Alaçam	41° 38' N 35° 38' E	12	1	481
Karaköy, Bafra	41° 32' N 36° 02' E	13	1	26
Yeşilköy, 19 Mayıs	41° 28' N 36° 04' E	14	1	473
Yeşilköy, 19 Mayıs		14	1	474
Erikli Köyü	41° 12' N 35° 03' E	15	1	485
Ondokuzmayıs Üniversitesi Kampusü Kurupelit	41° 22' N 36° 11' E	16	1	484
Ondokuzmayıs Üniversitesi Kampusü Kurupelit	41° 22' N 36° 11' E	16	1	476
Kirazlık	41° 14' N 36° 24' E	17	1	28
ORDU				
Günalı	40° 58' N 37° 23' E	18	1	30
AMASYA				
Durucasu Köyü, Taşova	40° 46' N 36° 07' E	19	1	480
TRABZON				
Kaleköyü, Çarşıbaşı	41° 05' N 39° 23' E	20	1	25
ARTVİN				
Cevizli Köyü, Şavşat	41° 48' N 42° 21' E	21	1	622
BAYBURT				
Kopgeçidi	40° 02' N 40° 25' E	22	1	45
ESKİŞEHİR				
Babadut Köyü, Sivrihisar	39° 32' N 31° 39' E	23	1	32
AFYON				
Sandıklı	38° 28' N 30° 16' E	24	1	17
MANİSA				
Hacırahmanlı,	38° 44' N 27° 35' E	25	1	18

Saruhanlı				
Gölmarmara	38° 42' N 27° 55' E	26	1	34
DENİZLİ				
Buldan	38° 03' N 28° 50' E	27	1	13
YOZGAT				
Yozgat Ana Kampüsü, Divanlı	39° 46' N 34° 48' E	28	1	16
SİVAS				
Üçtepe Köyü	39° 35' N 37° 12' E	29	1	47
Üçtepe Köyü	39° 35' N 37° 12' E	29	1	438
ANKARA				
Demirciobası, Şereflikoçhisar	38° 57' N 33° 45' E	30	1	424
NEVŞEHİR				
Mustafa Kemal Paşa, Ürgüp	38° 34' N 34° 54' E	31		455
KAYSERİ				
Yenidoğan, Talas	38° 41' N 35° 34' E	32	1	161
Yenidoğa uygulama çiftliği		33	2	200
NİĞDE				
Edikli	38° 14' N 34° 57' E	34	1	335
BURDUR				
İncirhan Mevki, İncirdere, Bucak	37° 29' N 30° 29' E	35	1	490
ANTALYA				
Serik	36° 55' N 31° 10' E	36	1	453
KONYA				
Kuşluca, Beyşehir,	37° 50' N 31° 36' E	37	1	50
ADANA				
Kozan	37° 26' N 35° 49' E	38	1	240
HATAY				
İskenderun	36° 34' N 36° 10' E	39	1	187
MALATYA				
Samanköy (Merkez)	38° 22' N 38° 18' E	40	1	650
Van				
Merkez	38° 30' N 43° 24' E	41	1	456



Şekil 3.1. *Erinaceus* cinsine ait 41 bireyin toplandığı lokaliteler, detaylı bilgi Çizelge 3.1’de verilmiştir

3.2. Mitokondrial DNA Analizi

3.2.1. Toplanan DNA'nın İzolasyonu

Türkiye'nin 41 lokalitesinden toplanan, *Erinaceus* cinsine ait 45 bireyden alınan ve %100'lük etil alkolde saklanan dokulardan DNA izole edilmiştir. Toplam DNA'nın izolasyonu için QIAGEN adlı firma tarafından üretilen hazır olarak satılan QIAGEN DNeasy adlı doku kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu, firmanın kit ile birlikte göndermiş olduğu protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Toplam DNA'nın İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.2.2.1. 50xTAE Çözeltinin Hazırlanışı

242 g Tris, 57,1 ml asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH: 8.0) 1 litre distile suyla tamamlanmıştır. 1xTAE hazırlamak için stok 50xTAE çözeltisinden 20 ml alınmış ve 1 litreye distile suyla tamamlanmıştır.

3.2.2.2. Orange G Boyasının Hazırlanışı

%50 w/v gliserol, 10 mM Tris (pH:8), 25 mM EDTA karıştırılmıştır.

3.2.2.3. Ethidium Bromide Çözeltisinin Hazırlanışı

500 ml distile H₂O içerisine 50µl ethidium bromide (10 mg/ml stok) ilave edilmiştir.

3.2.2.4. Agaroz Jelin Hazırlanışı

- Erlen içerisinde 1.25 g agaroz, 100 ml 1xTAE solüsyonu ile karıştırılmıştır.
- Solüsyon kaynayanaya kadar ısıtılmıştır.
- Erlen 10 dakika kadar oda sıcaklığında tutulmuş ve daha sonra elektroforez tankına yavaşça dökülmüş ve 20 dakika beklenmiştir.

- Jelde, yürütülecek örnek sayısına bağlı olarak taraklarla oyuklar açılmıştır.
- Tankın kovulacağı küvete 1xTAE solüsyonu doldurulmuştur.
- Jel, tankın içinden alınarak elektroforez küvetine yerleştirilmiştir.

3.2.2.5. Total DNA İzolasyon Protokolü

- Su banyosu 55⁰C'ye ayarlanmıştır.
- Her bir dokuyu koymak için steril kaplar hazırlanmış ve bu kaplara numaralar verilmiştir.
- %100'lük etil alkolde saklanan böbrek dokularından küçük miktarda (en fazla 25 mg) parçalar alınarak steril kaplara konulmuştur.
- Parçalar daha küçük parçalara bölünmüştür. Üzerlerine 1-2 damla distile H₂O damlatılmıştır.
- Küçük parçalar ependorflara konulmuştur.
- Üzerlerine 180µl ATL buffer eklenmiştir.
- Ependorfla kısa süre vortekslenmiştir.
- Ependorfların üzerine 20µl Proteinaz eklenmiştir.
- Ependorflar vortekslenmiş ve ağızları parafinle kapatılmıştır.
- Ependorflar 55⁰C' de 10 dakika bekletilmiştir.
- Çıkarılan ependorflara 200 µl AL buffer konulmuştur. Bu sırada su banyosunun sıcaklığı 55⁰C' ye ayarlanmıştır.
- Kolonlar hazırlanmıştır.
- Ependorftaki sıvı koluma aktarılmıştır.
- Kolonlar 8 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon altında biriken sıvı, tüple birlikte atılmıştır.
- Kolon alınarak yeni kolum tüp içerisine konulmuştur.
- Üzerine 500 µl AW 1 buffer eklenmiştir.
- Kolon 8 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolonun altındaki sıvı ile birlikte atılmıştır.
- Kolon tüpleri içersine kolumlar yerleştirilmiştir.
- Kolon içerisine 500 µl buffer (tampon) AW2 konulmuş ve 13 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

- 1 dakika daha santrifüj için yeni kolon tüpüne konulmuştur.
- Kolon altında biriken sıvı, tüple atılmıştır.
- Kolon tekrar yeni kolon tüpüne yerleştirilmiştir.
- Kolon içersine 200µl AE buffer eklenmiştir.
- 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir.
- 8 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Kolon atılmıştır.
- Etiketli ependorf hazırlanmıştır.
- Kolon tüpü içinde biriken sıvı, etiketli ependorfa aktarılmıştır.
- Ependorflar +4⁰C'de saklanmıştır.

Bu işlemlerden sonra total DNA'nın izole edilip edilmediğini tespit etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır.

3.2.2.6. Total DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

- Her örnek için 500µl lik ependorf tüpleri içersine 3 µl Orange G boyası, üzerine de 5 µl total DNA ilave edilmiştir.
- Elde edilen karışım alınarak jel içersindeki kuyulara aktarılmıştır. En son kuyuya ise 3 µl belirteç (Phix174 DNA/HaeIII., Promega) konulmuştur.
- Güç kaynağı 100 Volt'a ayarlanarak yaklaşık 1 saat jeldeki karışım yürütülmüştür.

3.2.2.7. Agaroz Jelin Görüntülenmesi

Elektroforez tankından çıkarılan jel 20 dakika ethidium bromide'de bekletilmiştir. Daha sonra 10 dakika distile H₂O içersinde bekletilmiştir.

Bekleme işleminden sonra jel, görüntüleme cihazına (GeneGenius, SyneGene, Bio Imagiinig Systems, UK) yerleştirilmiş ve UV ışını altında görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Sonrası tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop Bölgesinin Sol Tarafının Eldesi

Kırkbeş bireyden QIAGEN DNeasy adlı doku kiti ile gönderilen protokol takip edilerek izole edilen total DNA, UV ışığında görüntüledikten sonra, her bir örnek için, L15408Marv (Haynes ve ark., 2003) ve H16498 (Gündüz ve ark., 2000) adlı spesifik primer çiftleri kullanılmış ve aşağıda detayı verilen PCR stratejisi uygulanmıştır (Şekil 3.2).

tRNA-Thr (65 bç), tRNA-Pro (67 bç) ve D-loop bölgesinin çok yüksek varyasyon gösteren sol tarafına (405 bç) ait sekanslar tüm analizlerde dış grup ve referans olarak kullanılan *E. europaeus* (X88898, Krettek ve ark., 1995) mtDNA'sındaki bölgeleri içerir. Bu bölgeler 15322-15386 (tRNA-Thr), 15387-15454 (tRNA-Pro) ve 15455-15858 (D-loop) pozisyonlarına karşılık gelir.

Uygulanan PCR yönteminin basamakları :

1. 95⁰C.....1 dak. (denatürasyon)
2. 60⁰C1 dak. (bağlanma)
3. 72⁰C1 dak. 45 saniye (uzama)
4. 94⁰C1 dak.
- 4' kadar aşamalar 35 kez tekrarlanır.
5. 60⁰C10 dak.
6. 72⁰C10 dak.
7. 4⁰C(Soğutma)

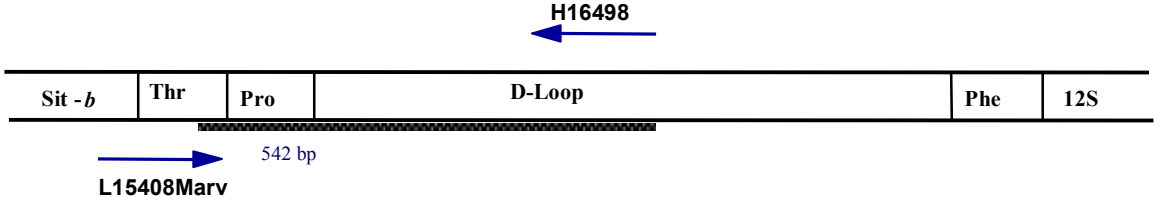
PCR işleminden sonra PCR ürünlerinden 5 µl alınarak agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışığında fotoğraflanmıştır.

Kullanılan primer çifti:

L15408Marv (5'-GCAGACAAAATCCCATTTCCA-3')

H16498 (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3')

PCR Stratejisi



Şekil 3.2. Bitişik tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop geninin sol parçasını amplifiye etmek için L15408Marv ve H16498 primerleri ile yapılan PCR stratejisi

3.2.3.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İçin Master Karışımı Hazırlama Protokolü

Her bir örnek için 50µl master karışımı hazırlanır.

Master Karışım:

29,65 µl	dH ₂ O (deiyonize H ₂ O)
5 µl	10x <i>Taq</i> tamponu (Thermophilic DNA Poly 10xBuffer, Promega)
5 µl	L15408Marv (5'-GCAGACAAAATCCCATTCCA-3')
5 µl	H16498 (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3')
1 µl	dNTPs, 10Mm (PCR nücleotid Mix, Roche)
3 µl	MgCl ₂ , 25 Mm
0.35 µl	<i>Taq</i> polimeraz (5 birim/ µl) (<i>Taq</i> DNA polimeraz, Promega)

Her bir örnek için master mix içerisinden 49,02 µl alınıp PCR tüpüne aktarılmış ve üzerine total DNA'dan 0,8 µl ilave edilerek PCR tüpleri termal cycler'a (MWG BIOTECH) yerleştirilmiştir.

3.2.3.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

- Her bir örnek için 500 µl'lik ependorf tüpleri içerisine 3 µl Orange G boyası, üzerine de 5 µl PCR ürünü ilave edilmiştir.
- Elde edilen karışım alınarak jel içerisindeki kuyulara aktarılmıştır. En son kuyuya ise 3 µl belirteç (*PhiX174* DNA/*HaeIII*, Promega) konulmuştur.

- Güç kaynağı 100 Volt'a ayarlanarak yaklaşık 1 saat jeldeki karışım yürütülmüştür.

3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünleri QIAGEN QIAquick adlı kit kullanılarak saflaştırılmış ve bu işlem sırasında firmanın kit ile birlikte göndermiş olduğu protokol takip edilmiştir.

3.2.3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması Protokolü

- Ependorfa 225 µl PB tamponu ve üzerine 45 µl PCR ürünü ilave edilmiştir.
- Karışım 5 saniye vortekslenmiştir.
- Ependorlardaki sıvı kolona aktarılmıştır.
- 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon altında biriken sıvı boşaltılmıştır.
- Boşaltılan tüplerin içerisine kolum yeniden konulmuştur.
- Kolonun üzerine 700 µl PE buffer konulmuştur.
- Kolonun ağzı yavaşça kapatılmıştır.
- 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Alttaki tüp, biriken sıvıyla birlikte atılmıştır.
- Kolonlar yeni kolon tüpü içerisine konulmuştur.
- 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon atılmış ve tüpün içerisinde biriken sıvı etiketli ependorfa aktarılmış ve ağzı parafinlenerek saklanmıştır.

3.2.3.5. Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

- Her örnek için 500 µl'lik ependorf tüpleri içerisinde 3 µl Orange G boyası, üzerine de 5 µl saflaştırılmış PCR ürünü ilave edilmiştir.
- Elde edilen karışım alınarak jel içerisindeki kuyulara aktarılmıştır. En son kuyuya ise 3 µl belirteç (*PhiX174 DNA/HaeIII*, Promega) konulmuştur.

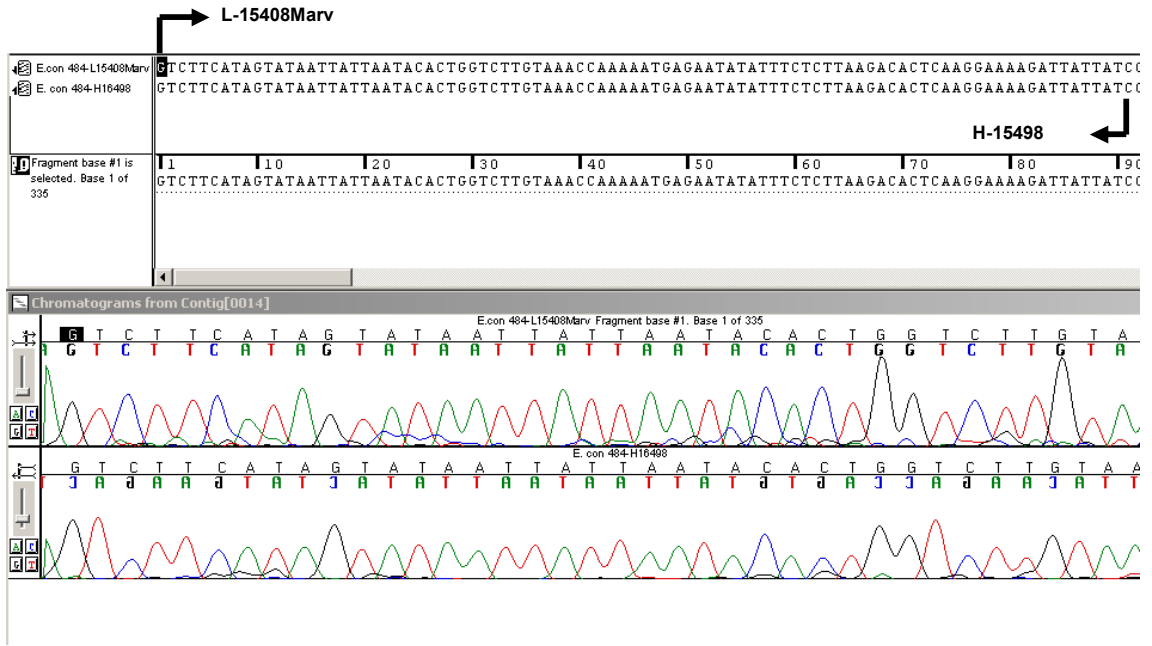
- Güç kaynağı 100 Volt'a ayarlanarak yaklaşık 1 saat jeldeki karışım yürütülmüştür.

3.2.4. Sekans Analizi

Her bir birey için saflaştırılan PCR ürünlerinin sekansları analiz için Güney Kore'deki MacroGen adlı firmaya gönderilmiştir, PCR ürün sekansları her iki yönde okunmuştur. Birinci primer olarak L15408Marv (5'-GCAGACAAAATCCCATTCCA-3') ve ikinci primer olarak H16498 (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3') kullanılmıştır. Burada sekans reaksiyonu için BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) kullanılmış ve sekans ürünleri ABI Prism 3100 kapilar otomatik sekans aletinde (Applied Biosystems) yürütülmüş ve elde edilen ham sekans verileri e-posta ile gönderilmiştir.

3.2.5. Sekansların Okunması

Her birey için ABI Prism 3100 kapilar otomatik sekans aletinden elde edilen ham sekans verileri SEQUENCHER (version 4.5) veya SEQMAN II module of the LASERGENE 99 (Applied Biosystems) adlı programlarına aktarılarak hizalanmış ve her bir baz tek tek kontrol edilmiştir. Şekil 3.3'de 484 numaralı *E. concolor*'a ait L-15408Marv ve H-15498 nolu primerler ile elde edilen ham sekans verileri verilmiştir.



Şekil 3.3. L-15408Marv ve H-15498 nolu primerler ile elde edilen ham sekans verisinin kısmi görünümü

3.2.6. Filogenetik Analizler

3.2.6.1. Bu Çalışma Verileri *Erinaceus* mtDNA Haplotipleri ile Yapılan Analizler

Elde edilen t-RNA-Thr, t-RNA-Pro ve D-loop bölgesinin sol taraf sekansları bir araya getirilerek, *Erinaceus* cinsinin Türkiye'deki yayılış alanının hemen hemen tamamını temsil edecek kadar sekansı içeren bir DNA veri matrisi oluşturulmuştur. Bunun için tüm DNA sekansları ayrı ayrı MacClade versiyon 4.08 (Madison ve Madison, 2000) adlı filogenetik analiz programına aktarılmıştır. Bu matristeki sekanslar arasında kaç tane farklı sekans (haplotip) olduğu ve her haplotipin frekansı belirlenmiştir. Bundan sonra sadece farklı haplotipleri (542 bç) içeren ikinci bir DNA veri matrisi oluşturulmuştur. Yine aynı programda haplotiplerden indel bölgeleri çıkarılmış ve yeni bir matris oluşturulmuştur, bütün filogenetik analizler buna göre yapılmıştır. İndel bölgelerinin çıkarılmasıyla (533 bç) bazı haplotiplerin birbiriyle aynı olması nedeniyle haplotip sayısı azalmıştır. İndel bölgelerinin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler bütün ağaçlarda parantez içinde gösterilmiştir.

Filogenetik analizler için distance, maksimum parsimony, maksimum likelihood analizleri kullanılarak haplotipler arasındaki filogenetik ilişki değerlendirilmiş ve

evrimsel ağaçlar elde edilmiştir. Bayesian (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001) analizi de yürütülerek evrimsel ağaç elde edilmiştir. Her bir metotla elde edilen evrimsel ağaçlar karşılaştırılmıştır. Bütün analizlerde gen bankasında depo edilen *Erinaceus europaeus* türüne ait tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop haplotipi (X88898, Krettek ve ark., 1995) dış grup olarak kullanılmıştır. Bu bölgeler 15322-15386 (tRNA-Thr), 15387-15454 (tRNA-Pro) ve 15455-15858 (D-loop sol taraf) pozisyonlarına karşılık gelmektedir.

3.2.6.1.1. Distance Analizi (Uzaklık Analizi)

MacClade versiyon 4.08 (Madison ve Madison, 2000) programında oluşturulan indel (insersiyon ve delesyon) bölgeleri çıkarılmış DNA veri matrisi önce dış grup dahil edilerek MODELTEST versiyon, 3.07 (Posada & Crandall, 1998) adlı programa tabi tutulmuştur ve hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) model seçim taslağı ve akaike information criterion (AIC) model seçim taslağının önerdiği DNA veri matrisine en iyi uyan baz değişim modeli saptanmıştır.

Aynı DNA veri matrisi dış grup dahil edilmeden MODELTEST programına tabi tutulmuştur. MODELTEST programının hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) model seçim taslağı ve akaike information criterion (AIC) model seçim taslağına göre en iyi uyan baz değişim modeli tespit edilmiştir.

Ayrıca hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) ve akaike information criterion (AIC)'nin önerdiği baz değişim modellerine ek olarak test amaçlı basit bir baz değişim modeli olan Kimura 2 parametresi (Kimura, 1980) kullanılarak da NJ ağacı elde edilmiştir.

Bu modellerin saptanmasından sonra veri matrisi PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) programına aktararak belirlenen baz değişim modellerine göre distance analizi yapılmıştır. Verilen tüm modeller ayrı ayrı kullanılarak NJ ağaçları oluşturulmuş ve aynı modellerle ağaçtaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini göstermek amacıyla 10 000 replikasyon analizi ile bootstrap yapılmıştır.

3.2.6.1.2. Maksimum Parsimoni (MP) Analizi (Tutumluluk Analizi)

MacClade programında indel bölgeleri çıkarılarak oluşturulan DNA veri matrisi (533 bç) PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) programına aktarılmış ve Parsimoni

analizi Branch-and-bound araştırma algoritması ve 10 000 rastgele tekrar seçenekleri kullanılarak yapılmıştır. Branch-and-bound araştırma sonucunda ağaç uzunlukları, consistency indeksleri (CI), retention indeksleri (RI) ile birlikte birden fazla eşit olasılıkta kısa ağaç elde edilmiştir. Yine PAUP* kullanılarak bu kısa ağaçların tümünü özetleyen strict ve %50 majority rule konsensus ağaçları üretilmiştir. Bu ağaçlar üzerinde indel bölgelerinin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler de gösterilmiştir. Parsimoni ağacının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini görmek amacıyla Branch-swapping algoritması: tree-bisection-reconnection (TBR) araştırma algoritması kullanılarak bootstrap analizi 100 rastgele tekrarlama ve 10000 replikasyon kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen bootstrap değerleri strict konsensus ağacı üzerinde gösterilmiştir.

3.2.6.1.3. Maksimum Likelihood (ML) Analizi

Maksimum likelihood (ML) analizi PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) programında heuristic araştırma algoritması kullanılarak yapılmıştır. Yine aynı programda bootstrap değeri heuristic araştırma algoritması kullanılarak, 1000 bootstrap tekrarı ve 10 rastgele tekrarla elde edilmiş ve ML ağacı üzerinde gösterilmiştir. Bootstrap değeri Branch-swapping algoritması: tree-bisection-reconnection (TBR) araştırma algoritması kullanılarak 10 rastgele tekrar ve 1000 bootstrap tekrarı ile hesaplanmıştır.

3.2.6.1.4. Bayesian (MrB) Analizi

Bayesian analizi (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001) MrBayes 3 (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) programında ML analizinde model olarak kullanılan baz değişim modeli ile yapılmıştır. Bunun için şu ayarlar kullanılmıştır:

mcmc ngen = 1000000 sampledfreq = 100

sump burnin = 2500

sumt burnin = 2500

Elde edilen ağaç dosyaları Treeview (Page, 1996) programında açılarak %50 Majority Rule konsensus ağacı elde edilmiş ve olasılık değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir.

3.2.6.2. Mitokondrial DNA Haplotiplerinin Populasyon Analizi

Filogenetik analizlerde kullanılan haplotiplerin DNA veri matrisleri her bir haplotipin frekansını içerecek şekilde hazırlanarak populasyon genetik analiz programında haplotip çeşitliliği (h) ve nükleotit çeşitliliği (π) ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Kimura 2 parametre (K2P; Kimura, 1980) modeline göre Haplotip çeşitliliği (h) Arlequin version 3.0 (Excoffier ve ark., 2005) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Segrasyon sayısı (S) türler ve filogruplar için DnaSP versiyon 5 (Librado ve ark., 2009) kullanılarak hesaplanmıştır. Nükleotit çeşitliliği (π) (Nei ve Li, 1979) Arlequin version 3.0 (Excoffier ve ark., 2005) ve nükleotit çeşitliliği (θ) DnaSP versiyon 5 (Librado ve ark., 2009) ile, net DNA çeşitliliği ve ham DNA çeşitliliği (D_a ve D_{xy} ; Nei, 1987) K2P model kullanılarak MEGA versiyon 4 (Tamura ve ark., 2007) programı ile hesaplanmıştır.

3.2.6.3. Gen Bankası *Erinaceus* Kısmi tRNA-Pro ve D-loop Haplotipleri İle Bu Çalışmada Bulunan Haplotiplerin Birlikte Analizi

Gen bankasında depolanan *E. concolor* türlerine ait (Seddon ve ark., 2001, 2002) 32 t-RNA-Pro (21 bç) ve D-loop (405 bç) haplotipleri gen bankasından indirilmiş ve bu çalışmada bulunan 26 haplotip ile bir araya getirilerek yeni bir DNA matrisi hazırlanmıştır ve ikinci bir filogenetik analiz yürütülmüştür. Elde edilen DNA veri matrisindeki indel (insersiyon, delesyon) bölgeleri çıkarılmış ve bütün analizler bu matrise göre yapılmıştır. İndellerin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler elde edilen filogenetik ağaçlar üzerinde parantez içinde belirtilmiştir. Distance, maksimum parsimoni ve bayesian analizleri yapılmış ve bu çalışmadaki haplotipler ile gen bankası haplotiplerini içeren filogenetik ağaçlar elde edilmiştir. Dış grup olarak gen bankasından elde edilen *E. europaeus* türüne ait kısmi tRNA-Pro ve D-loop haplotipi (X88898, Krettek ve ark., 1995) kullanılmıştır. Bu bölgeler 15434-15454 (tRNA-Pro) ve 15455-15858 (D-loop sol taraf) pozisyonlarına karşılık gelmektedir.

MODELTEST versiyon 3.07 (Posada ve Crandall, 1998) adlı programında dış grup dahil edilerek ve dahil edilmeden 'hierarchical likelihood ratio test (hLRT)' (Huelsenbeck and Rannala, 1997) ve 'Akaike information criterion (AIC)' (Akaike, 1974) baz değişim modeli testleri kullanılarak DNA veri matrislerine en iyi uyan baz

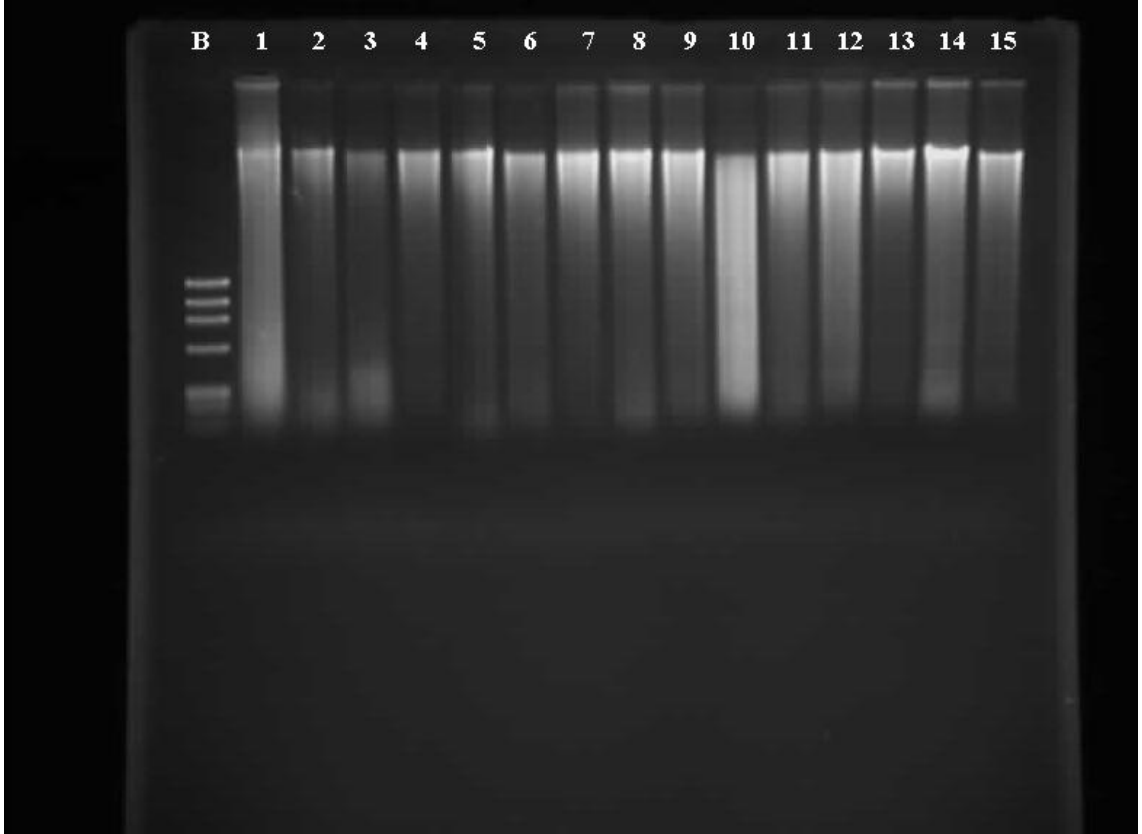
değişim modelleri saptanmıştır. Önerilen baz değişim modelleri kullanılarak neighbour joining (NJ) ağaçları elde edilmiştir. Ayrıca bu baz değişim modellerine ek olarak test amaçlı basit bir baz değişim modeli olan Kimura 2 parametresi (Kimura, 1980) kullanılarak da NJ ağacı elde edilmiştir. Aynı baz değişim modelleri kullanılarak ağaçlardaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini göstermek amacıyla 10 000 replikasyon analizi ile bootstrap (Felsenstein, 1985) analizi yapılmıştır. Elde edilen NJ ağaçlarıyla bootstrap değerleri karşılaştırılmış ve en iyi değerlere sahip olduğu düşünülen ağaç kullanılmıştır.

Maksimum parsimoni analizi için veri seti PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) adlı programa aktararak filogenetik analizler yürütülmüştür. Parsimoni analizi heuristik araştırma seçeneği ile 100 rastgele tekrar branch-swapping algoritması: tree-bisection-reconnection (TBR) araştırma algoritması kullanılarak yapılmıştır. Ağaç uzunlukları, consistency indeksleri (CI), retention indeksleri (RI) ile birlikte birden fazla eşit olasılıkta kısa ağaç elde edilmiştir. Bu kısa ağaçların tümünü özetleyen %50 Majority rule ve stric ağaçları PAUP*'da elde edilmiştir. Aynı programda branch-swapping algoritması: tree-bisection-reconnection (TBR) araştırma algoritması kullanılarak 10 000 bootstrap tekrarı ve 10 rastgele tekrar ile bootstrap yapılmıştır. Elde edilen değerler strict konsensus ağacı üzerinde gösterilmiştir.

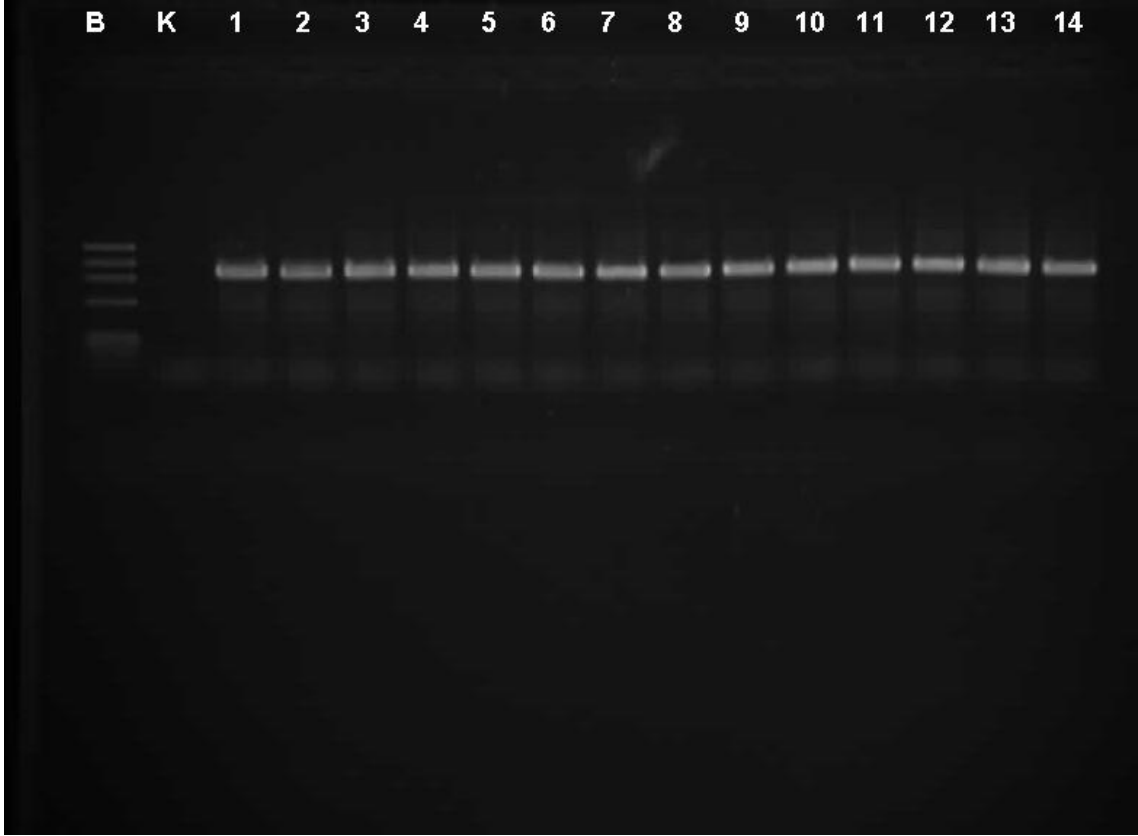
Bayesian analizi (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001) MrBayes 3 (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) programında yapılmıştır. Elde edilen ağaç dosyaları Treeview (Page, 1996) programında açılarak %50 Majority Rule ağacı elde edilmiş ve olasılık değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir.

4.BULGULAR

QIAGEN DNeasy adlı doku kiti ile gönderilen protokol takip edilerek izole edilen total DNA, UV ışığında görüntülenmiştir (Şekil 4.1). Daha sonra, her bir örnek için, ve tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop bölgesinin sol parçası L15408Marv (Haynes ve ark., 2003) ve H16498 (Gündüz ve ark., 2000) adlı spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR işleminden sonra PCR ürünlerinden 5 µl alınarak agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışığında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Total DNA izolasyonu sonrası elde edilen jel (1-15: *Erinaceus* örnekleri ve B: 100 bç'lik belirteç)



Şekil 4.2. L15408Marv ve H16498 primerleri ile elde edilen t-RNA-Thr, t-RNA-Pro ve D-loop geninin PCR ürünleri (**1-14**: PCR ürünleri, **K**: negatif kontrol, **B**: 100bç'lik belirteç).

4.1. mtDNA Analiz Sonuçları

4.1.1. Sekans Kompozisyonu ve Varyasyonu

Kırkbir lokaliteden toplanan 45 *Erinaceus* örneğinin sekans analizi sonucunda 65 bç. tRNA-Thr, 67 bç. tRNA-Pro ve 405 bç. D-loop bölgesine ait olan ve toplam uzunluğu 542 bç olan 26 farklı haplotip elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu haplotipler daha önce Avrupa'da verilen haplotiplerle (Seddon ve ark., 2001,2002) bir araya getirilerek ön analizler yapılmıştır, bu analizler sonucunda bu çalışmada brlirlenen haplotiplerin iki grupta yer aldığı görülmüştür. Daha önceki araştırmacıların önerileri (Filippucci & Simson, 1996; Santucci ve ark., 1998; Kryštufek, 2002; Seddon ve ark., 2001,2002) göz önüne alınarak bu haplotiplerin iki tür *E. roumanicus* ve *E. concolor* olduğu kanısına varılmıştır. Yapılan tüm analizlerde Türkiye haplotipleri *E. roumanicus* (Trakya) ve *E. concolor* (Anadolu) olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen 45 *Erinaceus* örneğinin 6'sının *E. roumanicus* türüne ait olduğu ve bu 6 *E. roumanicus* bireyinin de 6

haplotipinin oluştuğu saptanmıştır. Diğer 39 *Erinaceus* örneğinin *E. concolor* olduğu ve bunlarında 20 haplotip iğerdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Türkiye *Erinaceus* Bireylerinden Elde Edilen tRNA-Thr, tRNA-Pro, D-loop Sekans Verileri ve Sonrasında Bulunan Haplotipler

Lokalite	Enlem/Boylam	Harita Lokalite Kodu	Birey Sayısı N	Haplotip Kısaltması	tRNAs+ D-loop Haplotipi	Birey Numarası
EDİRNE						
Kızkapan, Keşan	40° 44' N 26° 29' E	1	1	<i>E.rou.1</i>	<i>E.roumanicus.1</i>	2
İbriktepe, İpsala	41° 00' N 26° 38' E	2	1	<i>E.rou.4</i>	<i>E.roumanicus.4</i>	4
KIRKLARELİ						
Balaban, Demirköy	41° 49' N 27° 39' E	3	1	<i>E.rou.6</i>	<i>E.roumanicus.6</i>	49
Balkaya köyü, Vizeler	41° 37' N 27° 57' E	4	1	<i>E.rou.5</i>	<i>E.roumanicus.5</i>	7
Vize	41° 35' N 27° 46' E	5	1	<i>E.rou.3</i>	<i>E.roumanicus.3</i>	8
İSTANBUL						
Kızılcaali	41° 14' N 28° 33' E	6	1	<i>E.rou.2</i>	<i>E.roumanicus.2</i>	9
KASTAMONU						
Gemiciler, İnebolu	41° 58' N 33° 54' E	7	1	<i>E.con.17</i>	<i>E. concolor.17</i>	558
İmrenler Köyü, Halaçoğlu Mahallesi, Seydiler	42° 39' N 33° 41' E	8	1	<i>E.con.9</i>	<i>E. concolor.9</i>	556
ÇANKIRI						
Onaç Köyü, Ilgaz	40° 59' N 33° 41' E	9	1	<i>E.con.3</i>	<i>E. concolor.3</i>	550
SİNOP						
Sarıkum	42° 02' N 34° 56' E	10	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	33
SAMSUN						
Eskikillik, Alaçam	41° 36' N 35° 28' E	11	1	<i>E.con.8</i>	<i>E.concolor.8</i>	477
Eskikillik, Alaçam	41° 36' N 35° 28' E	11	1	<i>E.con.8</i>	<i>E. concolor.8</i>	478
Central, Alaçam	41° 38' N 35° 38' E	12	1	<i>E.con.7</i>	<i>E.concolor.7</i>	481
Karaköy, Bafra	41° 32' N 36° 02' E	13	1	<i>E.con.2</i>	<i>E.concolor.2</i>	26
Yeşilköy, 19 Mayıs	41° 28' N 36° 04' E	14	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	473
Yeşilköy, 19 Mayıs	41° 28' N 36° 04' E	14	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	474
Erikli Köyü	41° 12' N 35° 03' E	15	1	<i>E.con.7</i>	<i>E.concolor.7</i>	485
Ondokuzmayıs Üniversitesi Kampusü Kurupelit	41° 22' N 36° 11' E	16	1	<i>E.con.7</i>	<i>E.concolor.7</i>	484
Ondokuzmayıs Üniversitesi Kampusü Kurupelit	41° 22' N 36° 11' E	16	1	<i>E.con.10</i>	<i>E.concolor.10</i>	476
Kirazlık	41° 14' N 36° 24' E	17	1	<i>E.con.7</i>	<i>E.concolor.7</i>	28
ORDU						
Güneli	40° 58' N 37° 23' E	18	1	<i>E.con.15</i>	<i>E.concolor.15</i>	30
AMASYA						
Durucasu Köyü, Taşova	40° 46' N 36° 07' E	19	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	480
TRABZON						
Kaleköyü, Çarşıbaşı	41° 05' N 39° 23' E	20	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	25
ARTVİN						
Cevizli Köyü, Şavşat	41° 48' N 42° 21' E	21	1	<i>E.con.3</i>	<i>E.concolor.3</i>	622
BAYBURT						
Kopgeçidi	40° 02' N 40° 25' E	22	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	45
ESKİŞEHİR						
Babadut Köyü, Sivrihisar	39° 32' N 31° 39' E	23	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	32

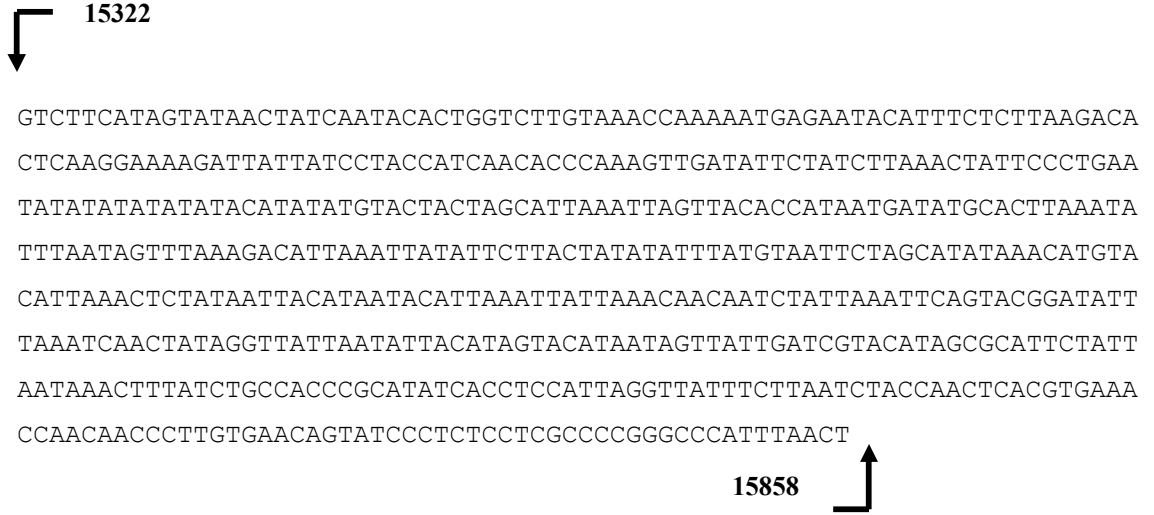
AFYON						
Sandıklı	38° 28' N 30° 16' E	24	1	<i>E.con.18</i>	<i>E.concolor.18</i>	17
MANİSA						
Hacırahmanlı, Saruhanlı	38° 44' N 27° 35' E	25	1	<i>E.con.14</i>	<i>E.concolor.14</i>	18
Gölmarmara	38° 42' N 27° 55' E	26	1	<i>E.con.5</i>	<i>E.concolor.5</i>	34
DENİZLİ						
Buldan	38° 03' N 28° 50' E	27	1	<i>E.con.4</i>	<i>E.concolor.4</i>	13
YOZGAT						
Yozgat Ana Kampüsü,Divanlı	39° 46' N 34° 48' E	28	1	<i>E.con.15</i>	<i>E.concolor.15</i>	16
SİVAS						
Üçtepe Köyü	39° 35' N 37° 12' E	29	1	<i>E.con.11</i>	<i>E.concolor.11</i>	47
Üçtepe Köyü	39° 35' N 37° 12' E	29	1	<i>E.con.12</i>	<i>E.concolor.12</i>	438
ANKARA						
Demirciobası, Şereflikoçhisar	38° 57' N 33° 45' E	30	1	<i>E.con.20</i>	<i>E.concolor.20</i>	424
NEVŞEHİR						
Mustafa Kemal Paşa, Ürgüp	38° 34' N 34° 54' E	31		<i>E.con.20</i>	<i>E.concolor.20</i>	455
KAYSERİ						
Yenidoğan, Talas	38° 41' N 35° 34' E	32	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	161
Yenidoğa uygulama çiftliği		33	2	<i>E.con.16</i>	<i>E.concolor.16</i>	200
NİĞDE						
Edikli	38° 14' N 34° 57' E	34	1	<i>E.con.12</i>	<i>E.concolor.12</i>	335
BURDUR						
İncirhan Mevki, İncirdere, Bucak	37° 29' N 30° 29' E	35	1	<i>E.con.19</i>	<i>E.concolor.19</i>	490
ANTALYA						
Serik	36° 55' N 31° 10' E	36	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	453
KONYA						
Kuşluca, Beyşehir,	37° 50' N 31° 36' E	37	1	<i>E.con.15</i>	<i>E.concolor.15</i>	50
ADANA						
Kozan	37° 26' N 35° 49' E	38	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	240
HATAY						
İskenderun	36° 34' N 36° 10' E	39	1	<i>E.con.6</i>	<i>E.concolor.6</i>	187
MALATYA						
Samanköy (Merkez)	38° 22' N 38° 18' E	40	1	<i>E.con.13</i>	<i>E.concolor.13</i>	650
Van						
Merkez	38° 30' N 43° 24' E	41	1	<i>E.con.1</i>	<i>E.concolor.1</i>	456

E. roumanicus için belirlenen 6 haplotipe ait sekansların konsensus sekansları Şekil 4.3’de verilmiştir. Konsensus sekansındaki ilk 65 baz tRNA-Thr genine, 67 baz tRNA-Pro genine, kalan 405 baz D-loop bölgesinin sol tarafına aittir. *E. europaeus* referans sekanstaki ilgili bölgeler 15322-15858 pozisyonuna karşılık gelmektedir (Şekil 4.3).

15322
 GTCTTCATAGTATAACCATCAATACATTGGTCTTGTAACCAAAAATGAGAATACATTTCTCTTAAGACA
 CTCAAGGAAAAGATTACTATCCTACCATCAACACCCAAAGTTGATATTCTGTCTTAAACTATTCCCTGAA
 TATATATATGTATACATATATGTACTACTAACATTAATACTAACCTACACCATAATGATATGCACTTAAATA
 TTTAATAGTCTAAAGACATTAATTATATTCTTACTATATATTTATGTAATTCTAGCATATAAGCATGTA
 CATTAAACTCTATAATTACATAAAACATTAAACTATTAACAACAATCTATTAAATTCAATACGAATATT
 CAAATCAATTATAGATTATTAATATTACATAGTACATATTAATATTGATCGTACATAGCGCATCCTATTA
 AATAACTTTATCTACCACCCGCATATCACCTCCATTAGGTTATTTCTTAATCTACCAACTCACGTGAAAC
 CAACAACCCTTGTGAACAGTATCCCTCTCCTCGCCCCGGGCCCATTTAACT
 15858

Şekil 4.3. *E. roumanicus*’da bulunan 6 haplotipin konsensus sekansı

E. concolor için bulunan 20 haplotipe ait sekansların konsensus sekansları Şekil 4.4’de verilmektedir. Konsensus sekansındaki ilk 65 baz tRNA-Thr genine, 67 baz tRNA-Pro genine, kalan 405 baz D-loop bölgesinin sol tarafına aittir. *E. europaeus* referans sekanstaki ilgili bölgeler 15322-15858 pozisyonuna karşılık gelmektedir (Şekil 4.4).



 15322

 GTCTTCATAGTATAACTATCAATACACTGGTCTTGTAACCAAAAATGAGAATACATTTCTCTTAAGACA

 CTCAAGGAAAAGATTATTATCCTACCATCAACACCCAAAGTTGATATTCTATCTTAAACTATTCCCTGAA

 TATATATATATACATATATGTACTACTAGCATTAAATTAGTTACACCATAATGATATGCACTTAAATA

 TTTAATAGTTTAAAGACATTAAATTATATTCTTACTATATATTTATGTAATTCTAGCATATAAACATGTA

 CATTAAACTCTATAATTACATAATACATTAAATTATTAACAACAATCTATTAAATTCAGTACGGATATT

 TAAATCAACTATAGGTTATTAATATTACATAGTACATAATAGTTATTGATCGTACATAGCGCATTCTATT

 AATAAACTTTATCTGCCACCCGCATATCACCTCCATTAGGTTATTTCTTAATCTACCAACTCACGTGAAA

 CCAACAACCCCTTGTAACAGTATCCCTCTCCTCGCCCCGGGCCCATTTAACT

 15858

Şekil 4.4. *E. concolor*'da bulunan 20 mtDNA haplotipinin konsensus sekansı

Bütün analizlerde elde edilen haplotiplerden indel bölgeleri çıkarılmış ve analizler bu yeni matrise göre yapılmıştır. İndel bölgelerinin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Büyük filogenetik analizde daha önce yayınlanmış (Seddon ve ark., 2001, 2002) ve gen bankasında depolanan farklı *Erinaceus* türlerine ait haplotiplerle bu çalışma haplotiplerinden yeni bir matris oluşturulmuş ve indel bölgeleri yine çıkarılmış analizler bu matrise göre yapılmıştır. İndel bölgelerinin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler Çizelge 4.3'de verilmiştir. İndel bölgesinin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler elde edilen bütün ağaçlar üzerinde parantez içinde belirtilmiştir.

ÇİZELGE 4.2. Eş Haplotipler, İndel Bölgelerinin Çıkarılmasıyla Aynı Olan Haplotipler (533 bç)

Haplotip	Eşdeğer Haplotip
<i>E. roumanicus</i> .4.	<i>E. roumanicus</i> .3.
<i>E. concolor</i> .2.	<i>E. concolor</i> .1.
<i>E. concolor</i> .3.	<i>E. concolor</i> .1.
<i>E. concolor</i> .8.	<i>E. concolor</i> .7.
<i>E. concolor</i> .9.	<i>E. concolor</i> .7.
<i>E. concolor</i> .12.	<i>E. concolor</i> .11.
<i>E. concolor</i> .13.	<i>E. concolor</i> .11.
<i>E. concolor</i> .15.	<i>E. concolor</i> .14.
<i>E. concolor</i> .16.	<i>E. concolor</i> .14
<i>E. concolor</i> .17	<i>E. concolor</i> .14
<i>E. concolor</i> .19.	<i>E. concolor</i> .18.

ÇİZELGE 4.3. Eş Haplotipler, İndel Bölgelerinin Çıkarılmasıyla Aynı Olan Haplotipler (389 bç)

Haplotip	Eşdeğer Haplotip
<i>E. roumanicus.4.</i>	<i>E. roumanicus.3.</i>
<i>E. concolor.2.</i>	<i>E. concolor.1.</i>
<i>E. concolor.3.</i>	<i>E. concolor.1.</i>
<i>E. concolor.7.</i>	<i>E. concolor.1.</i>
<i>E. concolor.8.</i>	<i>E. concolor.1.</i>
AF379764.C2-02	<i>E. concolor.1.</i>
<i>E. concolor.12.</i>	<i>E. concolor.11.</i>
<i>E. concolor.13.</i>	<i>E. concolor.11.</i>
<i>E. concolor.15.</i>	<i>E. concolor.14.</i>
<i>E. concolor.16.</i>	<i>E. concolor.14.</i>
<i>E. concolor.17.</i>	<i>E. concolor.14.</i>
AF379765.C2-03	<i>E. concolor.14.</i>
<i>E. concolor.19.</i>	<i>E. concolor.18.</i>
AF481503.con3	AF379750.C1-01
AF379753.C1-04	AF379751.C1-02
AF379755.C1-06	AF379754.C1-05
AF379756.C1-07	AF379754.C1-05
AF379757.C1-08	AF379754.C1-05
AF379760.C1-11	AF379759.C1-10
AF481504.con4	AF379759.C1-10
AF481502.con2	AF481501.con1
AF481508.con8	AF481507.con7
AF481509.con9	AF481507.con7
AF481511.con11	AF481510.con10
AF481512.con12	AF481510.con10
AF481515.con15	AF481514.con14

4.1.2. Bu Çalışmaya Ait mtDNA Verilerine Dayalı Filogeni

4.1.2.1. Distance Analiz Sonuçları

MacClade version 4.08 (Madison ve Madison, 2000) programında oluşturulan indel (insersiyon ve delesyon) bölgeleri çıkarılmış DNA veri matrisi önce dış grup dahil edilerek MODELTEST versiyon, 3.07 (Posada & Crandall, 1998) adlı programa tabi tutulmuştur ve DNA veri matrisine en iyi uyan baz değişim modeli saptanmıştır. MODELTEST programının hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) (Huelsenbeck and Rannala, 1997) model seçim taslağı, gama doğrulama değeri (G) 0,022 olan HKY (Hasegawa ve ark., 1985) baz değişim modelini önermiştir. Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1974) model seçim taslağı ise değişim göstermeyen pozisyon frekansı değeri (I) 0.7962 olan TrN (Tamura Nei, 1993) baz değişim modelini önermiştir.

Aynı DNA veri matrisi dış grup dahil edilmeden MODELTEST programına tabi tutulmuştur. MODELTEST programının hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) model seçim taslağı HKY baz değişim modelini önermiştir. Akaike information criterion (AIC) model seçim taslağına göre en iyi uyan baz değişim modeli Kimura 3 parametresi (Kimura, 1981)'dir.

Ayrıca bu baz değişim modellerine ek olarak test amaçlı basit bir baz değişim modeli olan Kimura 2 parametresi (Kimura, 1980) kullanılarak da NJ ağacı elde edilmiştir.

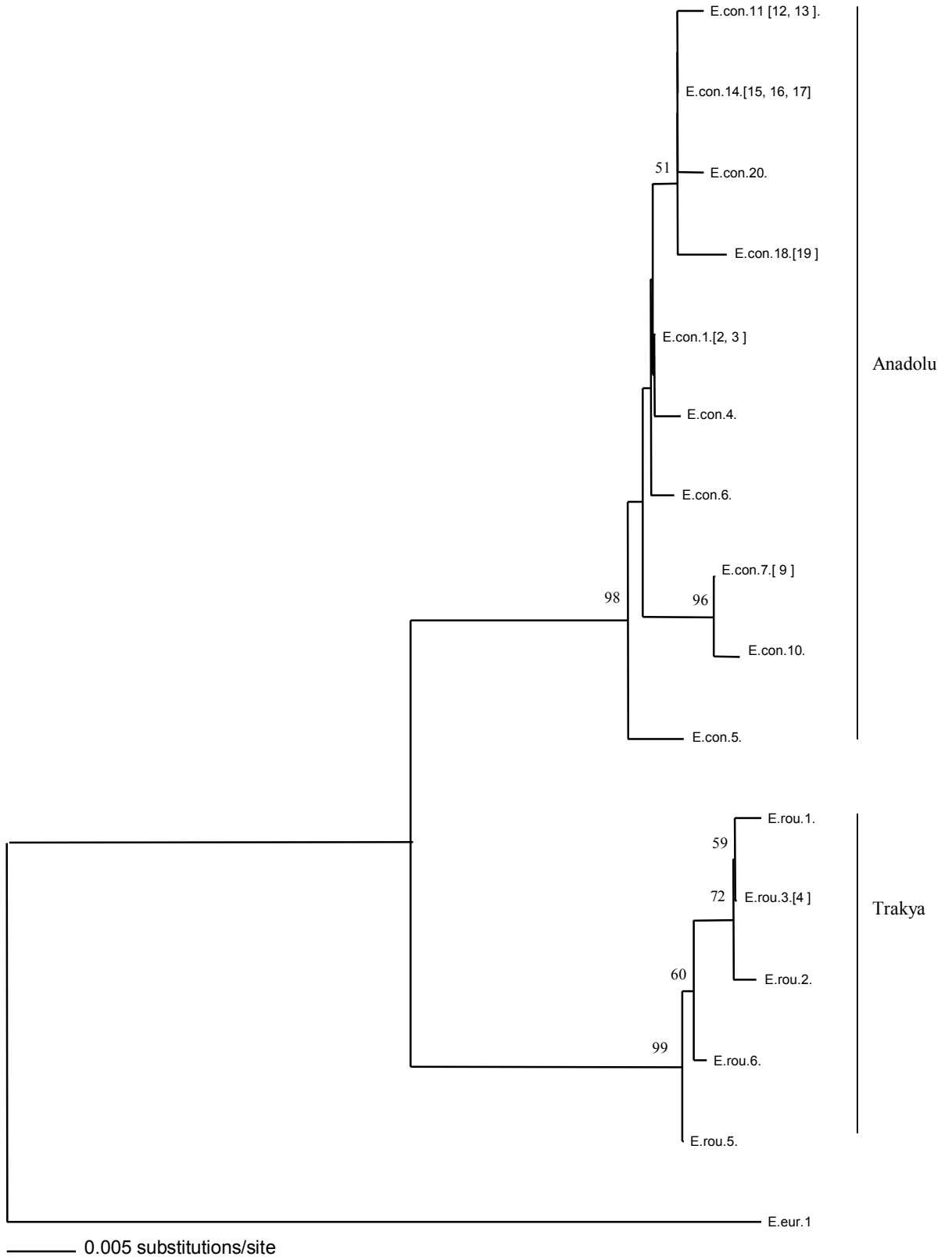
Bu modellerin saptanmasından sonra veri matrisi PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) programına aktararak belirlenen baz değişim modellerine göre distance analizi yapılmıştır. Verilen tüm modeller ayrı ayrı kullanılarak NJ ağaçlar oluşturulmuş ve aynı modellerle ağaçtaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini göstermek amacıyla 10 000 replikasyon analizi ile bootstrap (Felsenstein, 1985) yapılmıştır. Elde edilen NJ ağaçlarına bakıldığında bootstrap değerlerinin hemen hemen aynı olduğu gözlenmiş ve bu sonuçlardan yararlanarak en yüksek bootstrap değerlere sahip olduğu düşünülen ağacın, dış grup kullanılmadan HKY (Hasegawa ve ark., 1985) baz değişim modeli kullanılarak elde edilen NJ ağacı olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.5). Parantez içinde indel (insersiyon ve delesyon) bölgelerinin çıkarılmasıyla aynı olan haplotipler belirtilmiştir (Şekil 4.5).

NJ ağacında %98 ve %99 bootstrap değeriyle iki ana soy hattının yani hapotip grubunun olduğu görülür. Bu soy hatlarından *E. concolor* haplotiplerinin coğrafik dağılımı incelendiğinde (Çizelge 4.1) Anadolu'da olduğu görülür.

İkinci haplo grup ya da soy hattı Trakya Bölgesi'nde olup coğrafik dağılımı Çizelge 4.1' de verilmiştir. Bu soy hattı *E. roumanicus* türünü temsil etmektedir.

Bu iki ana soy hattı da kendi içinde alt soy hatlarına ayrılmıştır. *E. concolor* için Türkiye'nin kuzey ve kuzey doğusunun benzer haplotiplere, güney ve merkezinin benzer haplotiplere sahip olduğu görülür. NJ ağacında Anadolu'nun doğusu ve batısı arasında da bir ayrılma olduğu görülmektedir. *E.con.7-10* (Samsun, Kastamonu) haplotipleri %96 ve %51 bootstrap ile *E.con.11-20* (Sivas, Malatya, Manisa, Yozgat, Kayseri, Kastamonu, Afyon, Burdur, Ankara, Nevşehir) haplotiplerinden ayrılmaktadır. *E.con.1-6* (Samsun, Sinop, Trabzon, Amasya, Artvin, Eskişehir, Bayburt, Kayseri, Antalya, Hatay, Van, Adana, Denizli, Hatay) haplotipleri diğer haplotiplerden uzak çıkmıştır. Ayrıca *E.con.5* (Manisa) haplotipi bütün haplotiplerden ayrı bulunmuştur.

Aynı şekilde NJ ağacında elde edilen *E. roumanicus* kladlarında da kendi içinde ayrılma mevcuttur. *E.rom.1-4* (Edirne, İstanbul, Kırklareli) haplotipleri %72 bootstrap ile, *E.rom.5.* (Kırklareli) %99 bootstrap ile, *E.rom.6.* (Kırklareli) %60 bootstrap değeri ile ayrılmaktadır.



Şekil 4.5. HKY baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan 26 *Erinaceus* haplotipi arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren Neighbour Joining (NJ) ağaç. Dallar üzerindeki rakamlar 10 000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir. Dış grup olarak *E. europaeus* kullanılmıştır.

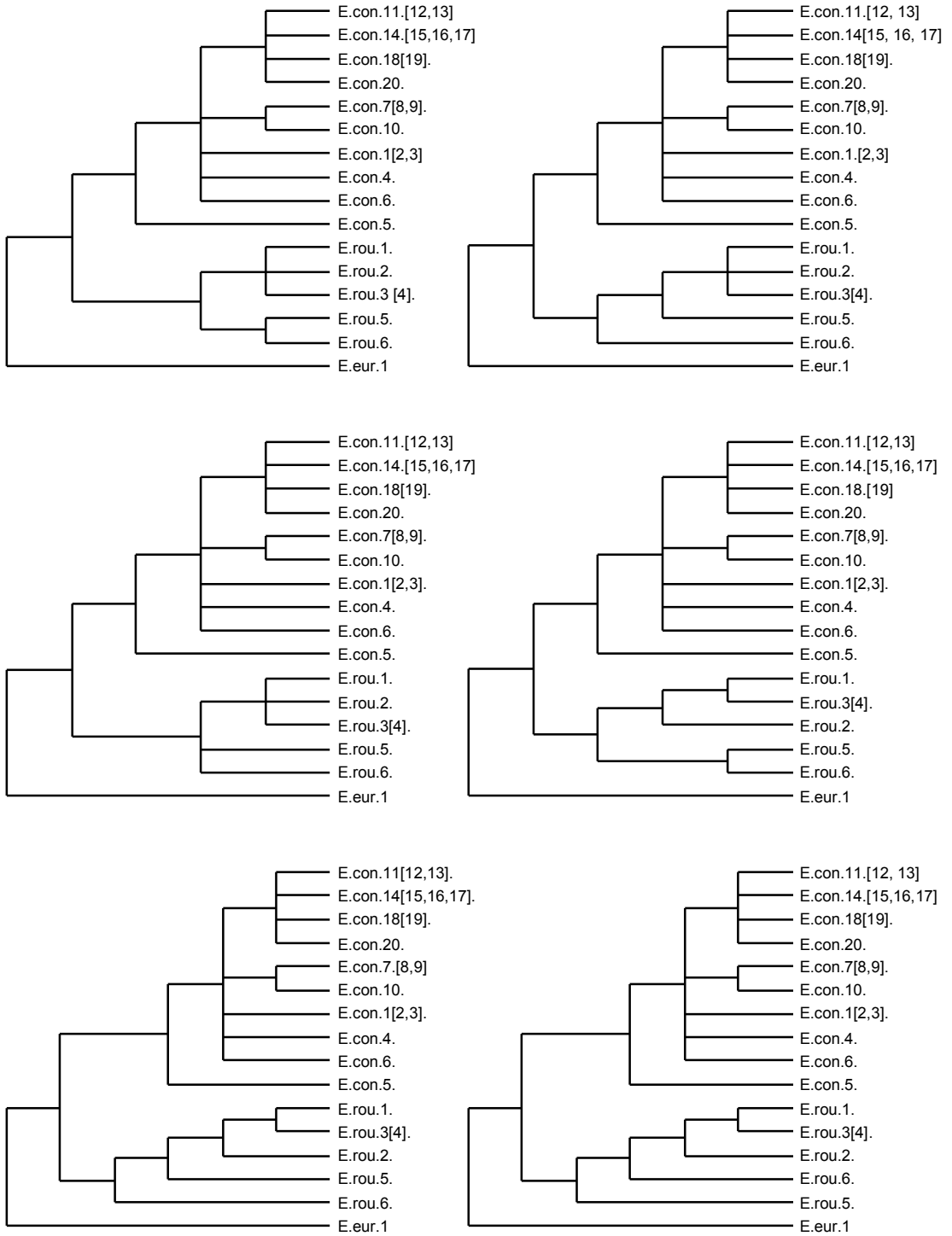
4.1.2.2. Maksimum Parsimoni (MP) Analizi (Tutumluluk Analizi)

MacClade version 4.08 (Madison ve Madison, 2000) programında oluşturulan DNA veri matrisinden indel (insersiyon ve delesyon) bölgeleri çıkarılarak elde edilen yeni DNA veri matrisi kullanılarak PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) programına aktarılmış ve parsimoni analizi yapılmıştır. Parsimoni olarak bilgi içeren 533 karakterin (indelsiz) kullanımı ile yürütülen parsimoni analizi sonucu ağaç uzunlukları 42, Consistency indeksleri (CI) 0,762 ve Retention indeksleri (RI) 0.905 olan eşit olasılıkta 6 parsimoni ağacı üretilmiştir (Şekil 4.6). DNA veri matrisindeki 533 karakterin 67 tanesinde baz değişimi gözlenmiştir, bunlardan 30 tanesi parsimonik olarak bilgi içerici (Sinapomorfik).

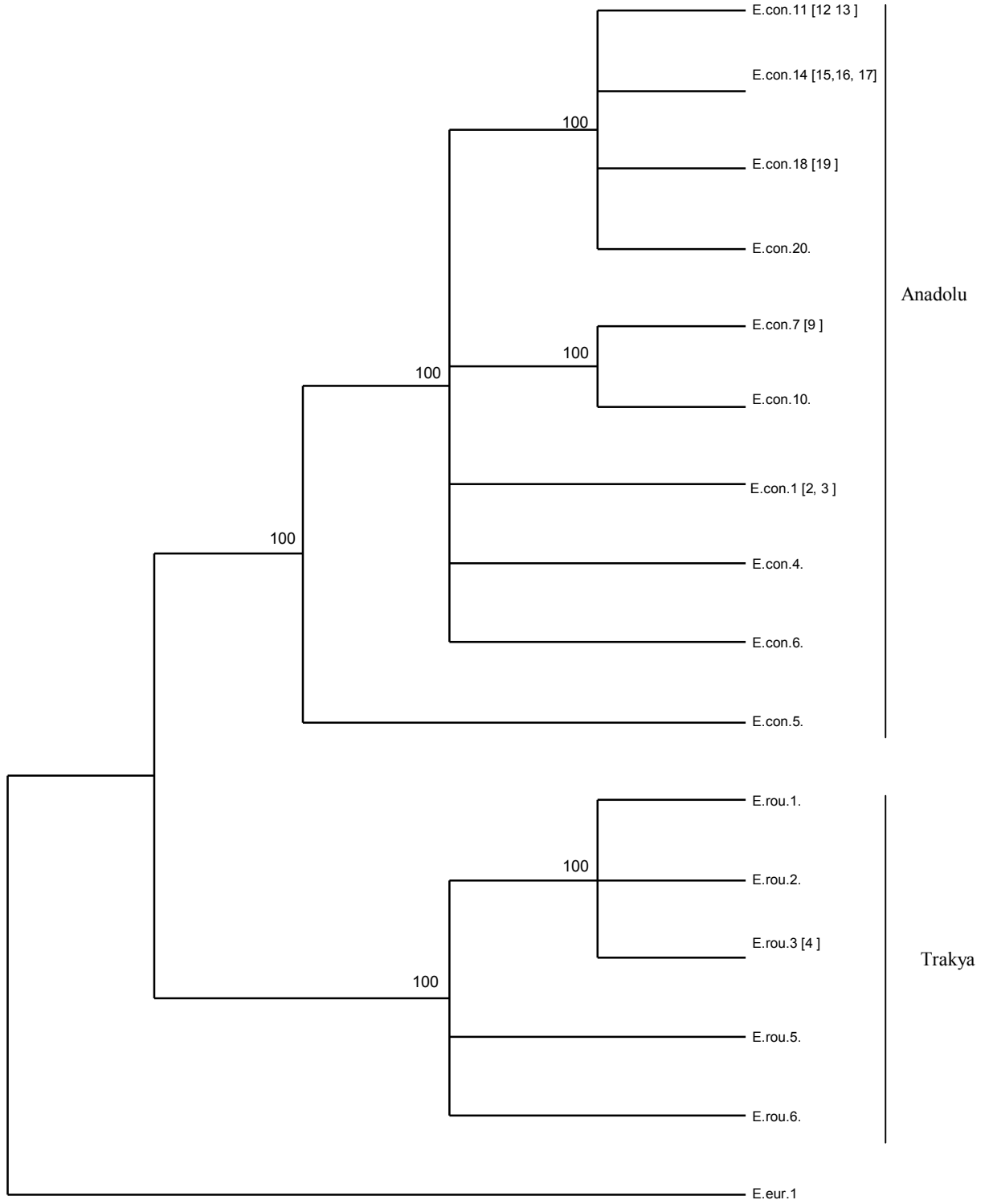
Daha sonra yine aynı programla bu 6 kısa ağacın tümünün özeti olan %50 Majority Rule ve Strict konsensus ağaçları elde edilmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Elde edilen %50 Majority Rule konsensus ağacı incelendiğinde %100 bootstrap değeriyle haplotiplerdeki iki soy hattını rahatlıkla görebilmekteyiz. Aynı şekilde Strict konsensus ağacına baktığımızda %97 ve %99 bootstrap değerleriyle bu ağaçta da iki soy hattını görebilmekteyiz. Bu soy hatlarının coğrafi dağılımını Çizelge 4.1'den incelediğimizde birinci soy hattı Anadolu'da ikinci soy hattı da Trakya Bölgesi'nde dağılım gösterir. Birinci soy hattını *E. concolor*, ikinci soy hattını *E. roumanicus* temsil etmektedir. Yine bu ağaçlarda parantez içinde indel bölgelerinin çıkarılmasıyla eş olan haplotipler gösterilmektedir.

%50 Majority Rule konsensus ve Strict konsensus ağacında *E. concolor* ve *E. roumanicus* ana soy hatları kendi içinde alt soy hatlarına NJ ağacının topolojisine benzer şekilde ayrılmıştır. *E. concolor* için Türkiye'nin kuzey ve kuzey doğusunun benzer haplotiplere, güney ve merkezinin benzer haplotiplere sahip olduğu görülür. *E.con.11-20* (Sivas, Malatya, Manisa, Yozgat, Kayseri, Kastamonu, Afyon, Burdur, Ankara, Nevşehir) haplotipleri güney ve merkez illerde, *E.con. 7-10* (Kastamonu, Samsun) haplotiplerinden ayrı olduğu görülür. *E.con.1-3* (Samsun, Sinop, Trabzon, Amasya, Artvin, Eskişehir, Bayburt, Kayseri, Antalya, Hatay, Van, Adana), *E.con.4.*(Denizli) ve *E.con.6* (Hatay) haplotipleri politomi olarak bulunmuştur. *E.con.5* (Manisa) haplotipi ise bütün diğer gruplardan ayrı bulunmuştur.

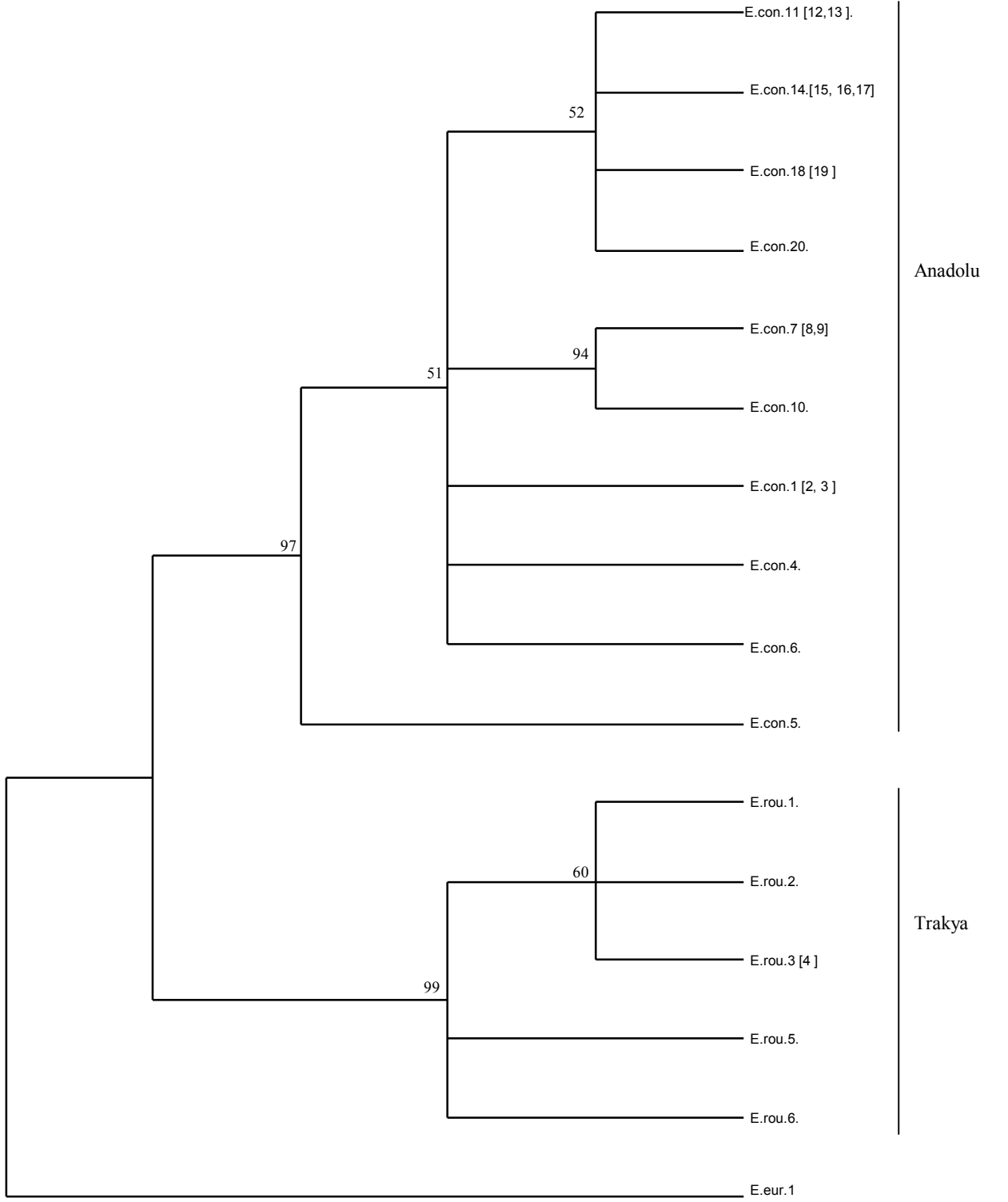
E. roumanicus içinde de *E.rom.1-4* (Edirne, İstanbul, Kırklareli) haplotipleri ile *E.rom.5,6* (Kırklareli) haplotiplerinde ayrılma mevcuttur.



Şekil 4.6. Parsimoni analizi sonucu elde edilen eşit olasılıkta 6 parsimoni ağacı. Ağaç uzunlukları 42, Consistency indeksleri (CI) 0,762 ve Retention indeksleri (RI) 0.905.



Şekil 4.7. Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 6 kısa ağacı özetleyen %50 Majority Rule Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar hangi kladların ağaçların %50 sinde (3 ağaç) olduğunu göstermektedir. *E. europaeus* dış grup olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 6 kısa ağacı özetleyen Strict Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar 1000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir. *E. europaeus* dış grup olarak kullanılmıştır.

4.1.2.3. Maksimum Likelihood (ML) Analizi

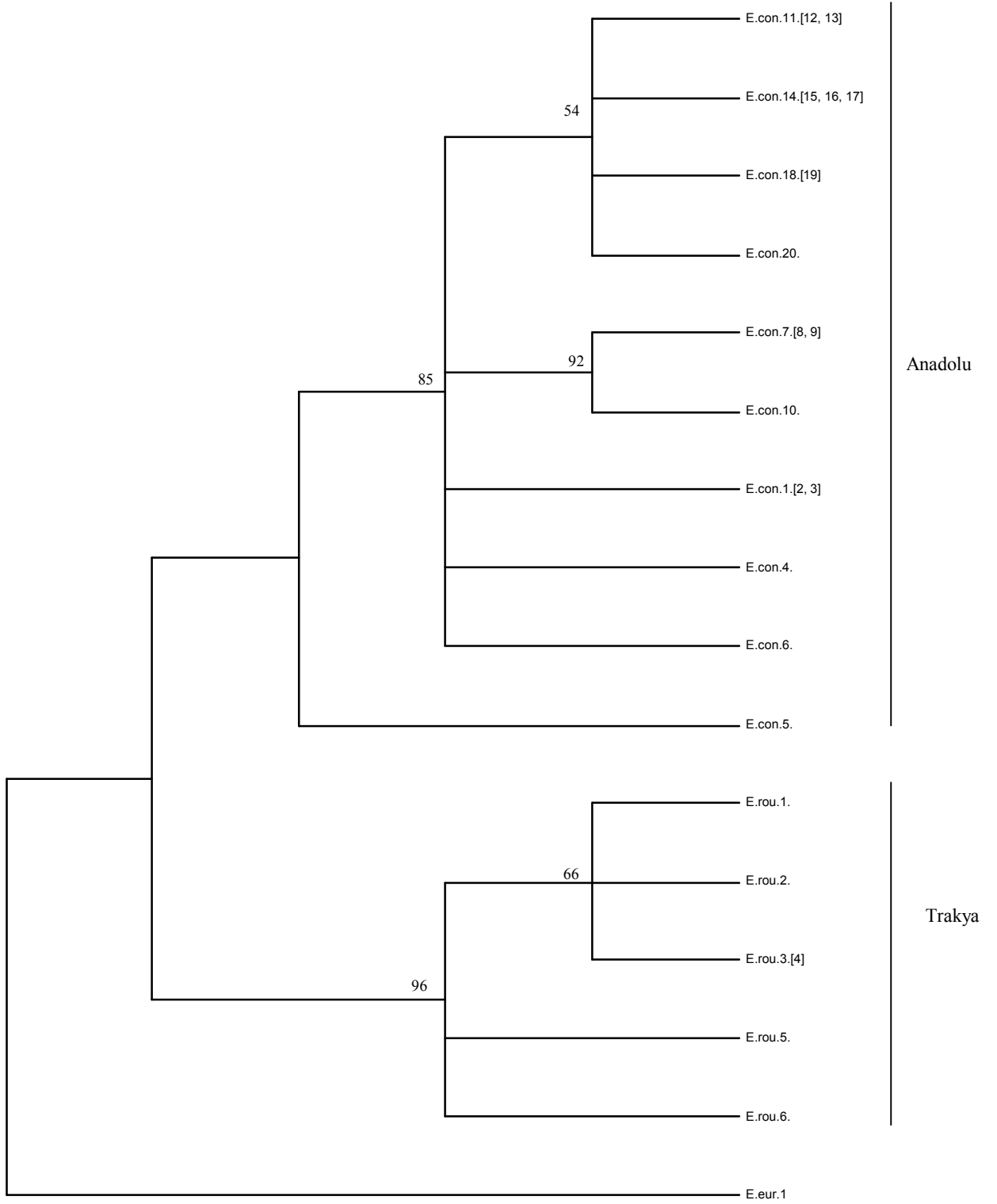
Heuristic araştırma algoritması ve HKY (Hasegawa ve ark., 1985) baz değişim modeli kullanılarak maksimum likelihood ağacı elde edilmiştir. 1000 bootstrap replikasyonu yapıp ağaç üzerlerinde bu değerler belirtilmiştir (Şekil 4.9).

ML ağacı elde edilen NJ ve parsimoni ağaçlarının topolojilerine benzer sonuçlar vermiştir. Yine bu ağaca göre de haplotipler için %98 ve %85 bootstrap değerleriyle iki soy hattı görülür, bu soy hatları incelendiğinde ilk soy hattının dağılımının Anadolu'da *E. concolor*'a ait olduğunu ikinci soy hattının da Trakya Bölgesi'nde *E. roumanicus*'a ait olduğu görülür. Elde edilen bootstrap değerleri ağacın hemen hemen yüksek değerlerle desteklendiğini göstermektedir.

ML ağacında iki ana soy hattının *E. concolor* ve *E. roumanicus* kendi içinde alt soy hatlarına ayrılmaları neighbour joining ve parsimoni ağacı topolojileriyle uymaktadır. Yani, *E. concolor* için Türkiye'nin kuzey ve kuzey doğusunun benzer haplotiplere, güney ve merkezinin benzer haplotiplere sahip olduğu görülür.

E.con.11-20 (Sivas, Malatya, Manisa, Yozgat, Kayseri, Kastamonu, Afyon, Burdur, Ankara, Nevşehir) haplotipleri güney ve merkez illerde %54 bootstrap değeriyle ayrılmış, *E.con. 7-10* (Kastamonu, Samsun) haplotipleri %92 bootstrap ile ayrılmıştır ve *E.con.1-3* (Samsun, Sinop, Trabzon, Amasya, Artvin, Eskişehir, Bayburt, Kayseri, Antalya, Hatay, Van, Adana), *E.con.4.*(Denizli) ve *E.con.6* (Hatay) haplotipleri politomi olarak bulunmuştur. *E.con.5* (Manisa) haplotipi ise bütün diğer gruplardan ayrı bulunmuştur.

E. roumanicus içinde de *E.rom.1-4* (Edirne, İstanbul, Kırklareli) haplotipleri % 66 ve % 96 bootstrap değeri ile *E.rom.5,6* (Kırklareli) haplotiplerinden ayrılmaktadır.



Şekil 4.9. Maksimum likelihood analizi sonucu oluşturulan ağaç. Dallar üzerindeki rakamlar 1000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir.

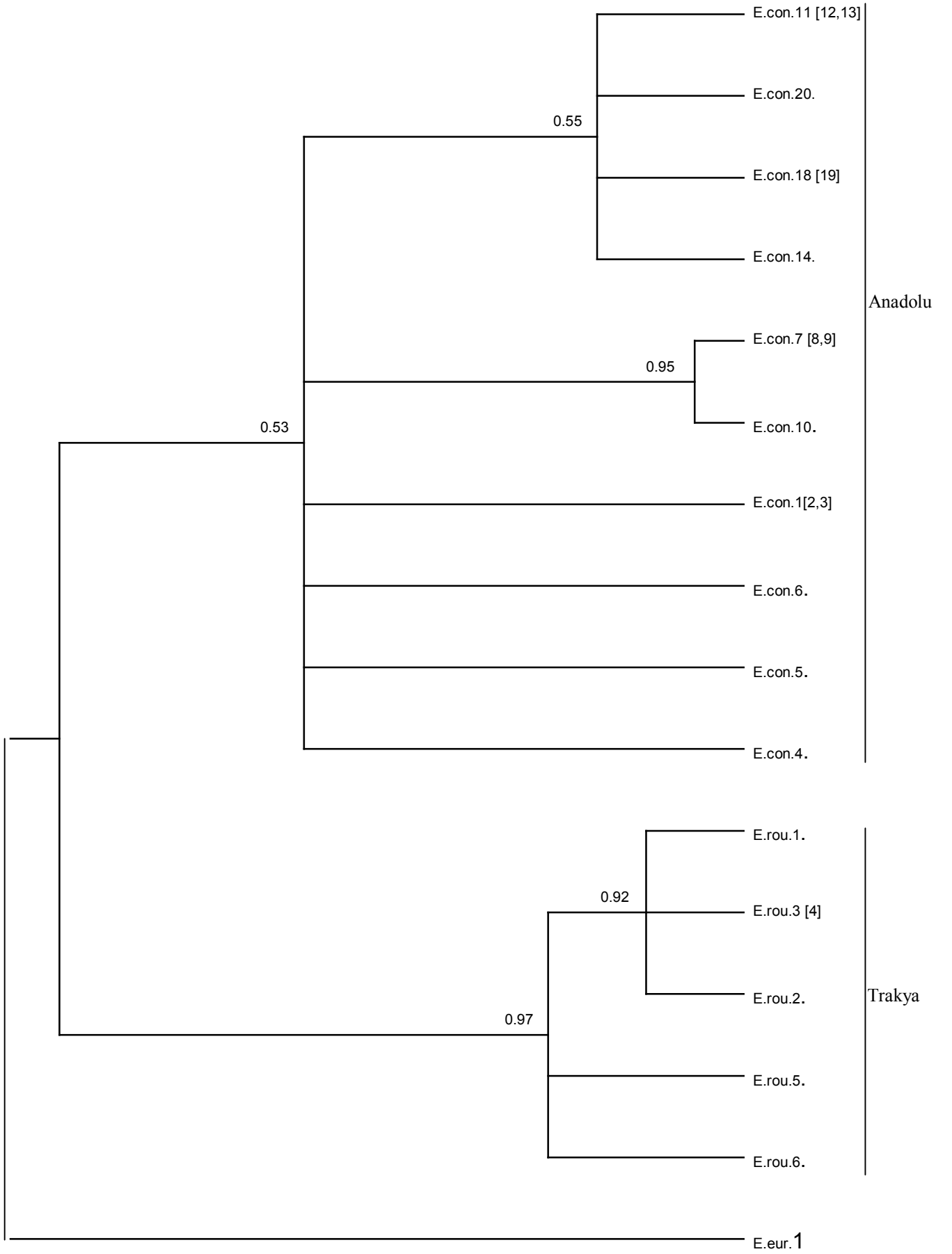
4.1.2.4. Bayesian (MrB) Analizi

Bayesian analizi (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001), HKY (Hasegawa ve ark., 1985) baz değişim modeli kullanılarak MrBayes 3 (Ronquist ve Huelsenbeck, 2003) programında yapılmış ve PAUP* programında %50 Majority rule konsensus ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.10).

Bayesian analizi sonucu elde edilen tek bir ağaç da NJ, parsimoni ve ML ağaçlarında olduğu gibi iki soy hattını gostermektedir. Üzerinde gosterilen olasılık değerleri de bunu desteklemektedir.

Bayesian ağacında *E. concolor* ve *E. roumanicus* ana soy hatlarının kendi içinde alt soy hatlarına ayrımları da NJ, parsimoni ve ML ağacı topolojileriyle uymaktadır. Türkiye'nin kuzey ve kuzey doğusunun benzer haplotiplere, güney ve merkezin benzer haplotiplere sahip olduğu görölür. *E. concolor* içinde fazla çeşitlilik olmamakla birlikte yine batıdan örnekler de farklılık elde edilmiştir. *E.con.11-20* (Sivas, Malatya, Manisa, Yozgat, Kayseri, Kastamonu, Afyon, Burdur, Ankara, Nevşehir) haplotipleri güney ve merkez illerde 0,55 olasılık değeriyle ayrılmış, *E.con. 7-10* (Kastamonu, Samsun) 0,95 olasılık ile bulunmuştur. *E.con.1-3* (Samsun, Sinop, Trabzon, Amasya, Artvin, Eskişehir, Bayburt, Kayseri, Antalya, Hatay, Van, Adana), *E.con.4.*(Denizli) ve *E.con.6* (Hatay) haplotipleri politomi olarak bulunmuştur. *E.con.5* (Manisa) haplotipi ise bütün diğer gruplardan ayrı bulunmuştur.

E. roumanicus haplotiplerinde de kendi içinde iki alt soy hattına ayrılmıőtir. 0,92 olasılıkla *E.rom.1-4* (Edirne, İstanbul, Kırklareli) haplotipleri, 0,97 olasılıkla *E.rom.5,6* (Kırklareli) haplotiplerinden ayrılmaktadır.



Şekil 4.10. Bayesian analizi sonucu elde edilen %50 Majority rule konsensus ağacı. Ağaç üzerinde olasılık değerleri gösterilmiştir.

4.1.3. Genetik Çeşitlilik Parametreleri

Kimura 2 parametre (K2P; Kimura, 1980) modeline göre Haplotip çeşitliliği (h) Arlequin versiyon 3.0 (Excoffier ve ark., 2005) programı kullanılarak, segrasyon sayısı (S) türler ve filogruplar için DnaSP versiyon 5 (Librado ve ark., 2009) ile hesaplanmıştır. Nükleotit çeşitliliği (π) (Nei ve Li, 1979) ve net DNA çeşitliliği ve ham DNA çeşitliliği (Da ve Dxy; Nei, 1987) K2P model ve MEGA versiyon 4 (Tamura ve ark., 2007) programı kullanılarak hesaplanmıştır. *Erinaceus* türleri arasındaki net DNA çeşitliliği %3,8 (0,038998), ham DNA çeşitliliği ise %4,3 (0,043211) olarak bulunmuştur. Standart hatalar (SH) 10000 bootstrap tekrarı ile yine aynı programla elde edilmiştir (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5).

E. roumanicus türü için haplotip çeşitliliği (h) $1 \pm 0,0962$ olarak, Arlequin v. 3.0 da K2P kullanılarak elde edilen nükleotit çeşitliliği (π) $0,004815 \pm 0,003448$ (SH) , DnaSP versiyon 5 (Librado ve ark., 2009) ile hesaplanan nükleotit çeşitliliği (θ) $0,00326 \pm 0,00210$ (SH) bulunmuştur. Haplotip çeşitliliğinin (h) 1 olması, sekansı yapılan her bireyin farklı haplotiplere sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum örneklerin coğrafik olarak farklı lokalitelerden toplanmış olmasının ve her bir bölgeden örnek sayısının az olmasının bir sonucudur.

E. concolor türü için haplotip çeşitliliği (h) $0,0982 \pm 0,0358$ (SH), nükleotit çeşitliliği (π) $0,008387 \pm 0,004682$ (SH), DnaSP versiyon 5 (Librado ve ark., 2009) ile hesaplanan nükleotit çeşitliliği (θ) $0,00664 \pm 0,00252$ (SH) bulunmuştur. Haplotip çeşitliliğinin 1'e yakın olması sekans yapılan her bireyin neredeyse farklı haplotipe sahip olduğunu ve genetik çeşitliliğin daha fazla olduğunu gösterir.

ÇİZELGE 4.4. tRNAs+D-loop (indelli, 537 bç) Kullanılarak *Erinaceus* Türleri (*E. concolor* ve *E. roumanicus*) İçin Hesaplanan Ham DNA Çeşitliliği (Dxy, aşağıdaki köşe) ve Net DNA Çeşitliliği (Da, yukarıdaki köşe) Değerleri.

	<i>Erinaceus concolor</i>	<i>Erinaceus roumanicus</i>
<i>Erinaceus concolor</i>	-	0,038998 (0,008156)
<i>Erinaceus roumanicus</i>	0,043211 (0,008397)	-

Dip Not: Bu Değerler Kimura-2P Uzaklık Metodu Kullanılarak Analiz Edilmiştir. Parantez İçindeki Değerler 10000 Bootstrap Tekrarı Sonucu Elde Edilen Standart Hata (SH) Değerlerini Göstermektedir

ÇİZELGE 4.5. tRNAs+D-loop (indelli, 542 bç) İçin *Erinaceus* Türleri İçindeki Haplotip Çeşitliliği (h) ve Nükleotid Çeşitliliği, Standart Hata (SH) Değerleri

	Birey sayısı N	Haplotip sayısı	Haplotip çeşitliliği (h) \pm SH	Ayrım gösteren baz bölgesi sayısı (S)	Nükleotid çeşitliliği	
					(π) \pm SH	(θ) \pm SH
<i>E. concolor</i>	39	20	0,0982 \pm 0,0358	15	0,008387 \pm 0,004682	0,00664 \pm 0,00252
<i>E. roumanicus</i>	6	6	1 \pm 0,0962	4	0,004815 \pm 0,003448	0,00326 \pm 0,00210

4.1.4. Gen Bankası *Erinaceus* Kısmi tRNA-Pro ve D-loop Haplotipleri ile Bu Çalışmada Bulunan Haplotiplerin Birlikte Analizi

Daha önce yayınlanmış (Seddon ve ark., 2001, 2002) ve gen bankasında depolanan farklı *Erineceus* türlerine ait 32 tRNA-Pro (21 bç) ve D-loop (405 bç) haplotipi (Çizelge 4.3) ile bu çalışmada bulunan 26 tRNA-Pro (21 bç) ve D-loop haplotipi beraber yeni bir matris oluşturulmuş ve bu matrisden indel bölgeleri çıkarılarak ikinci bir matris elde edilmiştir. Filogenetik analizler bu matris kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen tüm ağaçlarda parantez içlerinde indel bölgelerinin çıkarılmasıyla eş olan haplotipler (Çizelge 4.3) belirtilmiştir.

Dış grup içeren veriler için MODELTEST version 3.07 (Posada ve Crandall, 1998) adlı programda ‘hierarchical likelihood ratio test (hLRT)’ HKY baz değişim modeli (Hasegawa ve ark., 1985) gamma doğrulama değeri (G) 0.0131 ile önerilmiştir. Bu baz değişim modeli kullanılarak NJ ağacı elde edilmiştir. Buna ek olarak HKY baz değişim modeli G değeri olmadan da NJ ağacı elde edilmiştir. MODELTEST programında AIC model seçim taslağı K8luf (Kimura 3 parametre; Kimura, 1981) baz değişim modeli değişim göstermeyen pozisyon frekans değeri (I) 0.7958 ile önerilmiştir. Yine bu baz değişimi kullanılarak NJ ağaç üretilmiştir. Buna ek olarak K8luf (Kimura 3 parametre; Kimura, 1981) baz değişim modeli I değeri olmadan da NJ ağacı elde edilmiştir.

Dış grup içermeyen veriler için de MODELTEST programında hLRTS model seçim taslağına göre, HKY baz değişim modeli gamma doğrulama değeri (G) 0.0152 ile seçilmiştir. Yine G değeri olmadan da NJ ağacı elde edilmiştir. AIC model seçim taslağına göre K8luf (Kimura 3 parametre; Kimura, 1981) baz değişim modeli değişim

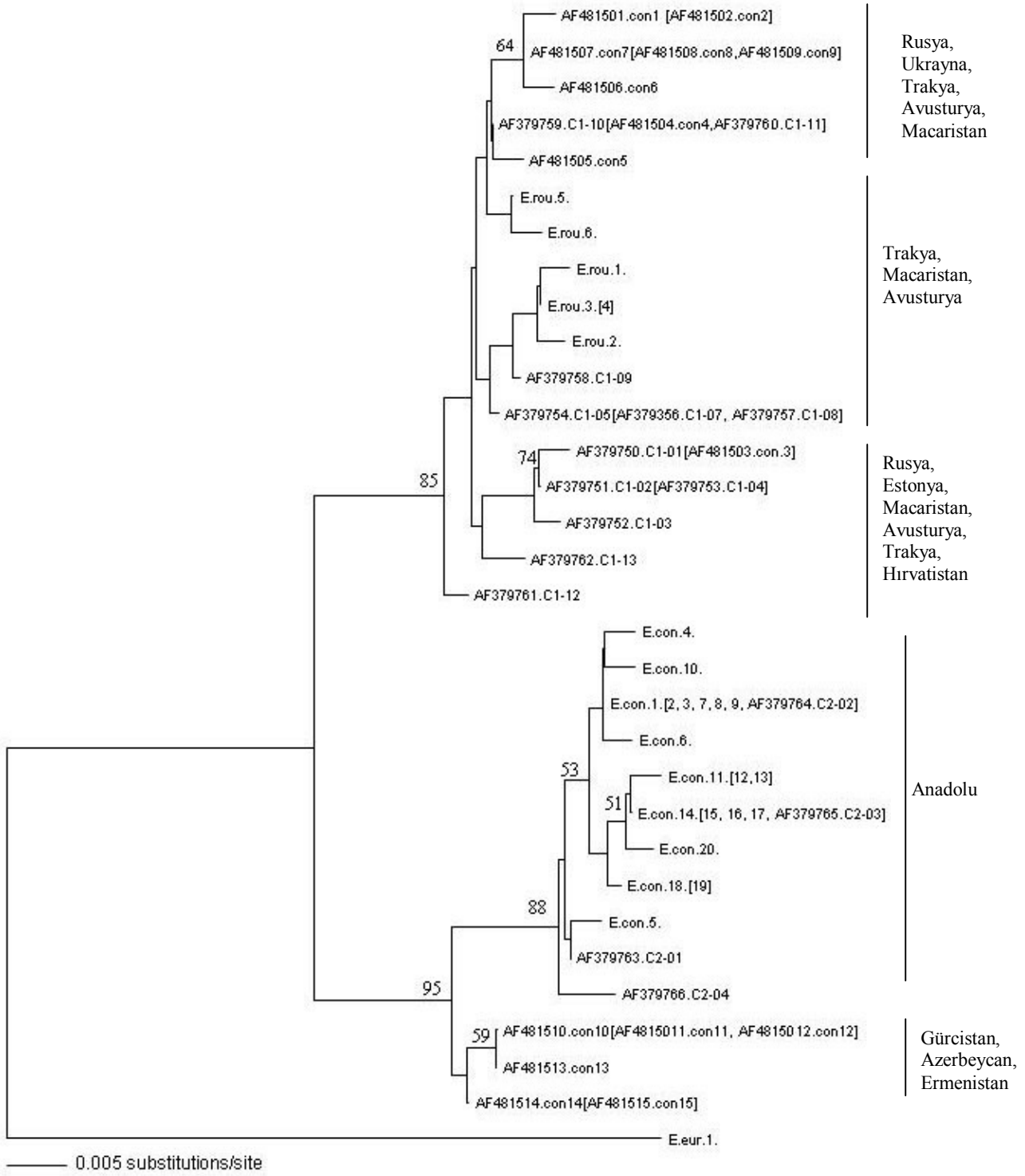
göstermeyen pozisyon frekans değeri (I) 0.8369 ile seçilmiştir. Yine I değeri olmadan da NJ ağacı elde edilmiştir.

MODELTEST'in önerdiği baz değişim modellerine ek olarak test amaçlı basit bir baz değişim modeli olan Kimura 2 parametre (K2P; Kimura, 1980) kullanılarak da NJ ağacı elde edilmiştir.

Elde edilen NJ ağaçlarının hepsinin 10 000 replikasyon analizi ile bootstrap değerleri hesaplanmış ve en iyi bootstrap değerine sahip olduğu düşünülen ağaç Kimura 2 parametre kullanılarak üretilen NJ ağacı seçilmiştir (Şekil 4.11). NJ ağacını incelediğimizde ağaçta okla gösterilen yerden %95 ve % 85 bootstrap değerleriyle iki soy hattının ayrıldığını görürüz. Bu soy hatlarında A soy hattının coğrafik dağılımına (Çizelge 4.6) baktığımızda Rusya, Ukrayna, Avusturya, Macaristan, Türkiye (Trakya), Estonya, Yunanistan, Hırvatistan'da bulunduğunu görmekteyiz. B soy hattının ise, Türkiye (Anadolu), Gürcistan, Azerbaycan ve Ermenistan (Güney Kafkasya)'da bulunduğunu görmekteyiz. B soy hattındaki örnekler Anadolu ve yakın bölgelerde dağılmışlardır. Gen bankası haplotipleri ve kendi verilerimizle yaptığımız büyük filogenetik analiz sonucu NJ ağacından elde ettiğimiz bilgiler, coğrafik dağılım olarak kendi verilerimizle elde ettiğimiz NJ ağacı ile benzerlik göstermektedir.

ÇİZELGE 4.6. Seddon ve ark., (2001, 2002) Tarafından Yayınlanan ve Gen Bankasında Depolanan *E. concolor* Türlerine Ait Haplotipler

Gen Bankası No	Haplotip	Lokalite (Orijinal Tanımlama)
AF481501	Con 1	Moskova, Rusya
AF481502	Con 2	Riazan, Rusya
AF481503	Con 3	Briansk, Rusya
AF481504	Con 4	Borisovka, Belgorod bölgesi, Rusya
AF481505	Con 5	Borisovka, Belgorod bölgesi, Rusya
AF481506	Con 6	Ribaltchai Keherson bölgesi, Ukrayna
AF481507	Con 7	Stavropol, Rusya
AF481508	Con 8	Stavropol, Rusya
AF481509	Con 9	Dagestan, Rusya
AF481510	Con 10	Abkhazia, Gruzia, Gürcistan
AF481511	Con 11	Abkhazia, Gruzia, Gürcistan
AF481512	Con 12	Abkhazia, Gruzia, Gürcistan
AF481513	Con 13	Abkhazia, Gruzia, Gürcistan
AF481514	Con 14	Khosrov reservation, Ermenistan
AF481515	Con 15	Karabah, Azerbaycan
AF379750	C1-01	Rusya, Estonya
AF379751	C1-02	Macaristan
AF379752	C1-03	Avusturya
AF379753	C1-04	Avusturya
AF379754	C1-05	Macaristan, Avusturya
AF379755	C1-06	Yunanistan
AF379756	C1-07	İtalya
AF379757	C1-08	Yunanistan
AF379758	C1-09	Yunanistan
AF379759	C1-10	Avusturya, Macaristan, Türkiye (Trakya)
AF379760	C1-11	Polonya
AF379761	C1-12	Hırvatistan
AF379762	C1-13	Yunanistan, Türkiye (Trakya)
AF379763	C2-01	Türkiye (Anadolu)
AF379764	C2-02	İsrail
AF379765	C2-03	israil
AF379766	C2-04	Türkiye (Anadolu)

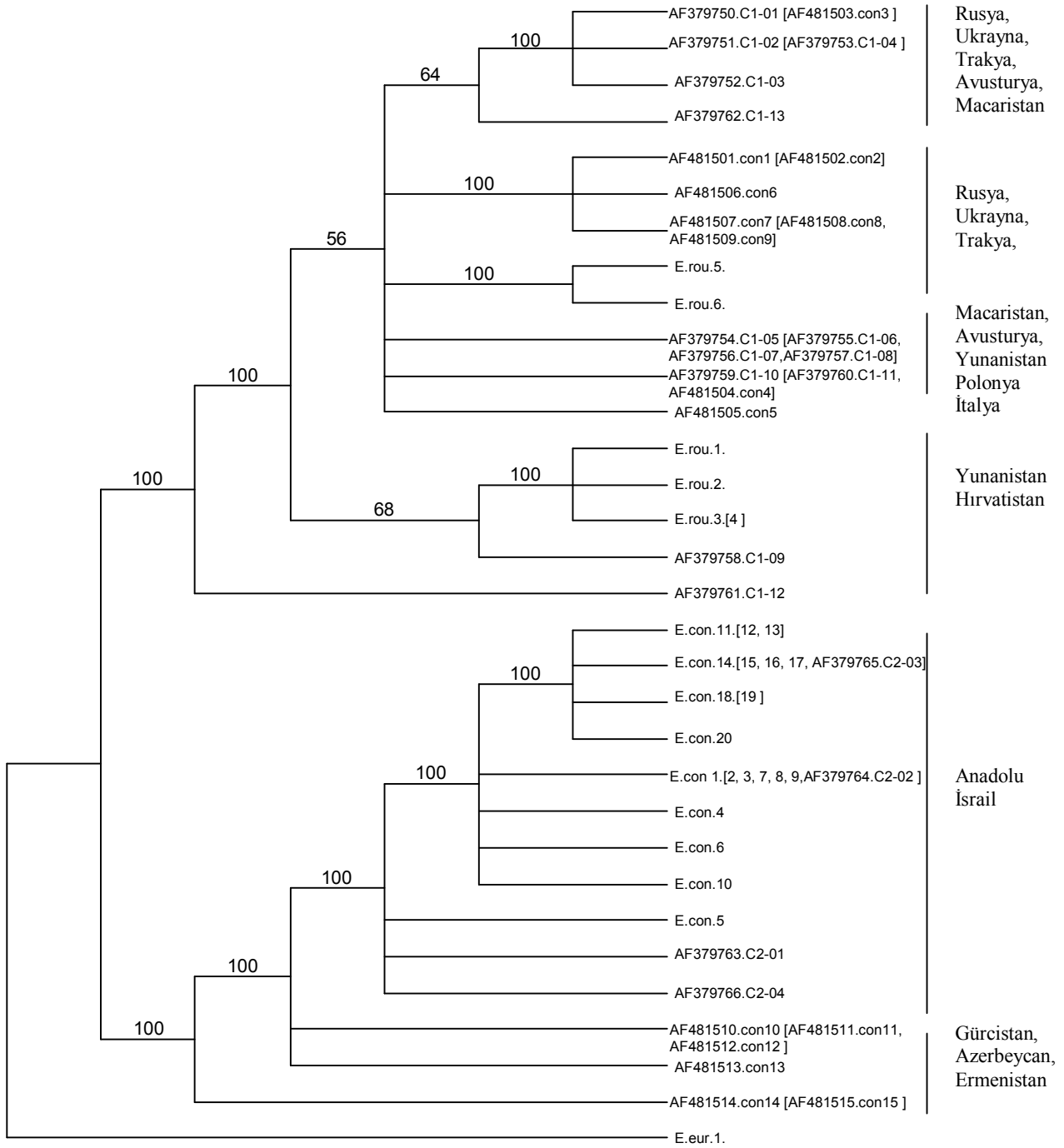


ŞEKİL 4.11. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayımlanan ve gen bankasında depolanan *E. concolor*'a ait haplotipler ile bu çalışma sonrası elde edilen haplotiplerden K2P baz değişim modeli kullanılarak elde edilmiş NJ ağaç. Dallar üzerindeki rakamlar 10000 replikasyon sonucu oluşan bootstrap değerlerini göstermektedir. *E. europaeus* dış grup olarak kullanılmıştır

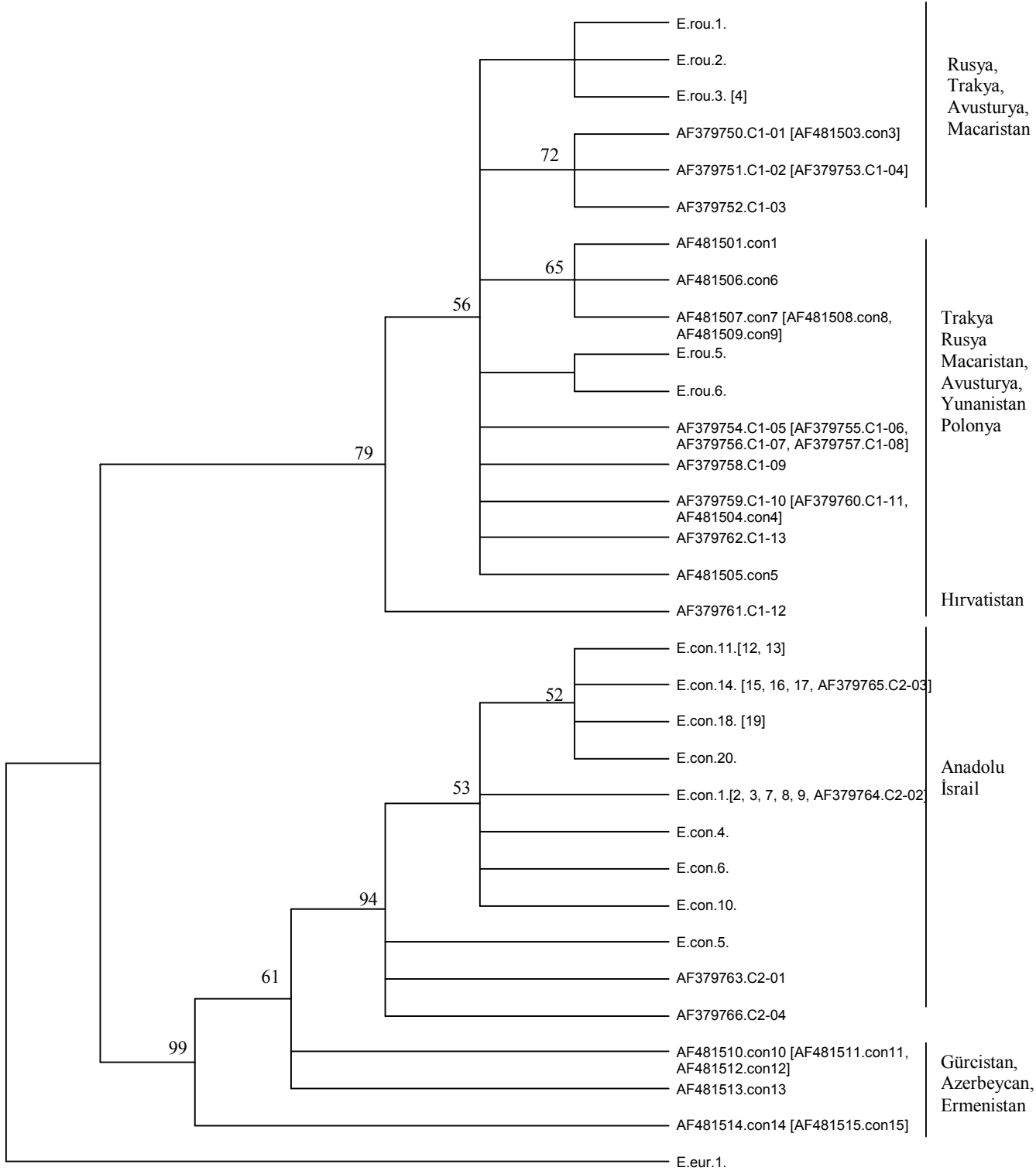
Gen bankasında depolanan farklı *Erineceus* türlerine ait 32 tRNA-Pro ve D-loop haplotipi (Çizelge 4.3) ile bu çalışmada bulunan 26 tRNA-Pro ve D-loop haplotipi birleştirilerek elde edilen matris PAUP* versiyon 4.0b10 (Swofford, 2003) programına aktarılmış ve parsimoni analizi de yapılmıştır. 389 karakterden 52'sinde baz değişimi, bunlarında 25'inde parsimoni için bilgi içeren karakterler bulunmuştur (Sinapomorfik).

Parsimoni analizi heuristik araştırma seçeneği ile 100 rastgele tekrar Branch-swapping algoritması: tree-bisection-reconnection (TBR) araştırma algoritması kullanılarak yapılmıştır. Ağaç uzunlukları 45, Consistency indeksleri (CI) 0,644, ve Retention indeksleri (RI) 0,923 olan eşit olasılıkta 25 parsimoni ağacı üretilmiştir. Daha sonra yine aynı programla bu 25 kısa ağacın tümünün özeti olan %50 Majority rule ve Strict konsensus ağaçları elde edilmiştir (Şekil 4.12 ve 4.13). Branch-swapping algoritması: tree-bisection-reconnection (TBR) araştırma algoritması kullanılarak 10 000 bootstrap tekrarı ve 10 rastgele tekrar ile bootstrap yapılmıştır. Elde edilen değerler strict konsensus ağacı üzerinde gösterilmiştir. %50 Majority rule ve strict konsensus ağaçları incelendiğinde Türkiye (Anadolu), İsrail ve Güney Kafkasya (Gürcistan, Ermenistan, Azerbaycan) ve bu çalışmadan da Anadolu örnekleri (*E. concolor*) aynı soy hattında yer almaktadır. Diğer soy hattını ise Yunanistan, Türkiye'den Trakya Bölgesi Avusturya, Macaristan, Ukrayna, Rusya, Estonya ve Hırvatistan ve bu çalışmadan Türkiye'nin Trakya bölgesi örnekleri (*E. roumanicus*) oluşturmaktadır. Bu daha önceki bulguları destekler bir sonuçtur.

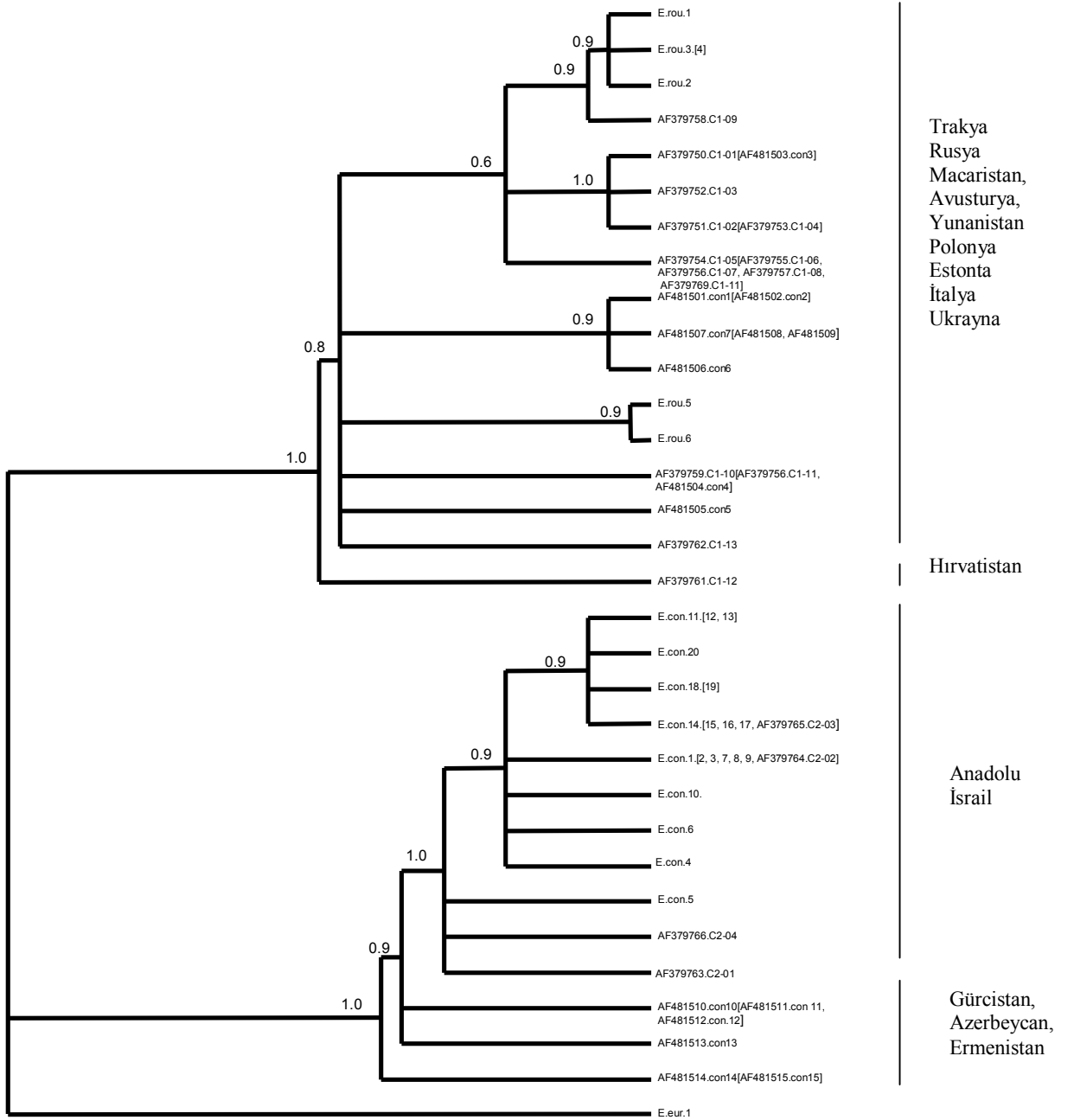
Yine gen bankası verileri ve bu çalışmanın verileriyle oluşturulan DNA veri matrisi kimura 2 parametresi kullanılarak Bayesian analizi yapılmıştır ve elde edilen ağaç dosyaları Treeview (Page, 1996) programında açılarak %50 Majority Rule ağacı elde edilmiş ve olasılık değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.14). Mrbayes K2P %50 majority rule konsensus ağacı incelendiğinde de NJ ve MP ağaçlarında olduğu gibi iki ana soy hattı görmekteyiz. Ağaç üzerinde belirtilen yüksek olasılık değerleriyle de bu durum deseklenmektedir. Yine diğer ağaçlarda olduğu gibi Türkiye (Anadolu), İsrail ve Güney Kafkasya (Gürcistan, Ermenistan, Azerbaycan) ve bu çalışmadan da Anadolu örnekleri (*E. concolor*) aynı soy hattında yer almaktadır. Yunanistan, Türkiye'den Trakya Bölgesi Avusturya, Macaristan, Ukrayna, Rusya, Estonya ve Hırvatistan ve bu çalışmadan Türkiye'nin Trakya bölgesi örnekleri (*E. roumanicus*) ise diğer soy hattını oluşturmaktadır.



Şekil 4.12. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan farklı *Erinaceus* türlerine ait haplotipler ile bu çalışmada elde edilmiş haplotiplerin Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 25 kısa ağacını özetleyen %50 Majority Rule Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar hangi kladların ağaçların %50'sinde olduğunu göstermektedir. Parantez içlerinde eş haplotipler belirtilmiştir. *E. europaeus* dış grup olarak kullanılmıştır



Şekil 4.13. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan farklı *Erinaceus* türlerine ait haplotipler ile bu çalışmada elde edilmiş haplotiplerin Parsimoni analizi sonucu oluşturulan eşit olasılıklı 25 kısa ağacı özetleyen Strict Konsensus ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar 1000 replikasyon sonucu elde edilen bootstrap değerlerini göstermektedir. *E. europaeus* dış grup olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Seddon ve ark. (2001, 2002) tarafından yayınlanan ve gen bankasında depolanan farklı *Erinaceus* türlerine ait haplotipler ile bu çalışmada elde edilmiş haplotiplerin kimura 2 parametresi kullanılarak elde edilen mrbayes K2P %50 majority rule konsensus ağacı. *E. europaeus* dış grup olarak kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Erinaceus concolor Martin, 1838 Anadolu'da, İsrail, Suriye, Lübnan, Irak ve İran; Güney Kafkasya Bölgesi'nde görülür (Hutterer 2005). Batı Avrupa kirpisi olan *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758 Batı Avrupa'da İskandinavya'da ve Rusya'nın Kuzey batı parçasında bulunmaktadır (Mitchell-Jones ve ark. 1999). Bu iki türün parapatric olarak ayrıldığı (Reeve, 1994) ve bu ayrılmada Pleistosen buzullaşmasının etkisi olduğu düşünülmektedir (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001).

Yapılan allozim, mtDNA sitokrom *b*, kontrol bölgesi, MHC varyasyonu çalışmalarında (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001; Seddon ve ark., 2002; Berggren ve ark., 2005) *E. concolor*'un kendi içinde iki alt soy hattına ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu soy hatlarından birinin Doğu Avrupa'da ve Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde, diğer soy hattının ise Türkiye (Boğazlar'ın Güneyi) ve İsrail' den örnekler içerdiği belirtilmiştir. Bu örneklerden Trakya ve Doğu Avrupa örneklerinin *E. roumanicus* olması gerektiği, Anadolu ve İsrail örneklerinin ise *E. concolor* olması gerektiği vurgulanmıştır (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001). Yapılan morfolojik çalışmalar da bunu desteklemiştir (Kryštufek, 2002).

Seddon ve ark. (2001)'nin kontrol bölgesi kullanarak yaptığı analizlerde elde edilen iki *E. concolor* alt soy hatları arasında net nükleotit çeşitliliği (Da) %4,84 olarak bulunmuştur. Pesole ve ark. (1999) tarafından ortalama $12,6 \cdot 10^{-9}$ subs/baz yıl olarak verilen substitutions değerini kullanarak iki *E. concolor* kladı (yani *E. roumanicus* ve *E. concolor*) arasındaki %4,84'lük net sekans farklılığının 2,2 milyon yıla denk geldiğini hesaplamıştır. Bu araştırmacılar aynı şekilde *E. europaeus* ve *E. concolor* kladlarının da 3,2-4,5 milyon yıl önce ayrıldığını ifade etmişlerdir. Bu tarih pre-Pleistosen'e denk gelse de, Suchentrunk ve ark. (1998) biyokimyasal ve alloizm çalışması kullanarak, bu iki türün ata Avrupa kirpi havuzundan ayrılma zamanının 0,4-0,5 milyon yıl önce olduğunu, yani Pleistosen'e denk geldiğini belirtmişlerdir. Aynı formülü kullanarak bizim bu çalışmada bulduğumuz *E. roumanicus* ve *E. concolor* arasında 3,89'lük net sekans farklılığı ise, yaklaşık olarak 1,7 milyon yıl öncesini yani Pleistosen dönemini işaret etmektedir. Hem bizim bulgularımız hem de Seddon ve ark. (2001)'nin bulguları

yakın zamanda yapılan fosil çalışmalarıyla da uyum içindedir. Şöyle ki, Sommer (2007) tarafından 269 arkeolojik bölgede yapılan *E. roumanicus* fosil kaydı çalışmasında her ne kadar *E. roumanicus*'a Holosen'de rastlansa da *E. roumanicus*'un Pleistosen kayıtları çok nadirdir ve ağırlıklı olarak Yunanistan'dandır.

Özetlemek gerekirse, bu çalışmadan elde edilen NJ, parsimoni, ML ve bayesian ağaçlarında daha önce yapılan moleküler çalışmaları (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001) destekler şekilde iki ana soy hattı elde edilmiştir. Bu soy hatlarından *E. concolor* haplotipleri Anadolu'da, *E. roumanicus* haplotipleri ise Trakya Bölgesi'nde olacak şekilde ayrılmışlardır. Anadolu' da *E. roumanicus* haplotipine rastlanmamıştır.

Bu çalışmadan elde edilen haplotiplerle gen bankasından elde edilen daha önce yayınlanmış çalışmalara (Seddon ve ark., 2001, 2002) ait *E. concolor* haplotipleriyle yapılan büyük filogenetik analizlerden parsimoni, NJ ve bayesian ağaçları elde edilmiştir. Türkiye'nin Anadolu Bölgesi'nden, Gürcistan'dan, Ermenistan'dan ve Azerbaycan'dan gen bankası *E. concolor* haplotipleri ile bu çalışmada Anadolu'da dağılım gösteren *E. concolor* haplotipleri aynı soy hattı içerisinde yer almışlardır. Trakya Bölgesi'nde bulunan *E. roumanicus* haplotipleri ile gen bankası haplotiplerinden Yunanistan, Türkiye (Trakya Bölgesi), Avusturya, Macaristan, Ukrayna, Rusya, Estonya ve Hırvatistan'dan *E. concolor* haplotipleri de aynı soy hattı içerisinde bulunmuştur. Bu durum daha önceki çalışmalarda (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001) *E. concolor* olarak verilen soy hatlarından Trakya ve Doğu Avrupa'ya ait grubun *E. roumanicus* olması gerektiği bulgusunu desteklemektedir. Ayrıca daha önceki moleküler çalışmalardan (Seddon ve ark., 2002) elde edilen verilere göre Kafkasya Sıradağları'nın kuzeyi ve güneyi arasındaki *E. concolor* haplotipleri arasında bulunan ayrılmayı da desteklemektedir.

Önceki moleküler çalışmalaradan (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001; Seddon ve ark., 2002; Berggren ve ark., 2005) elde edilen *E. concolor* alt soy hatlarındaki Anadolu ve İsrail örnekleri ile Trakya ve Doğu Avrupa örnekleri arasındaki ayrım sebebiyle Boğazlar'ın bu *E. concolor* alt soy hatları için bir ayrılma zonu olabileceği düşünülmüştür (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001; Seddon ve ark., 2002; Berggren ve ark., 2005).

Bu bulgular, çoğu araştırmacının söylediğinin aksine (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001; Seddon ve ark., 2002; Berggren ve ark.,

2005) 7000 yıl kadar öncesine kadar Boğazlar' da bağlantılar mevcut olmasından dolayı (Gökaşan ve ark., 1997; Kerey ve ark., 2004) Boğazlar'ın *E.concolor* ve *E. roumanicus*'un ayrımında önemli olmadığını bu iki türün ayrımının daha erken dönemde olduğunu ifade etmektedir. Bunun daha da desteklenebilmesi için daha önceki morfolojik çalışmalarda Kryštufek (2002)'nin önerdiği gibi Anadolu'da *E. roumanicus*'un olup olmadığının, eğer varsa bunların Trakya *E. roumanicus*'uyla ilişkilerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca Türkiye'den daha fazla bölgeden toplanacak *Erinaceus* örnekleri üzerinde yapılacak ve farklı mtDNA bölgeleri ve nükleer DNA kullanılarak da benzer tür ağaçlarının elde edilip edilemeyeceği test edilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye'nin 41 farklı lokalitesinden toplanan Türkiye *Erinaceus*'ları ile yapılan mtDNA sekans (tRNA-Thr, tRNA-Pro ve D-loop bölgesinin sol tarafı) analizleri sonucunda 26 haplotip elde edilmiştir. Bu haplotiplerden 6 *E. roumanicus* bireyi için 6 haplotip, 39 *E. concolor* bireyi için 20 haplotip bulunmuştur.

Yapılan filogenetik analizlerde elde edilen ağaçlarda iki soy hattı olduğu görülmüştür. Bu iki soy hattından *E. roumanicus*'u içeren haplotipler Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde, *E. concolor*'u içeren haplotipler Türkiye'nin Anadolu Bölgesi'nde dağılım göstermektedir. Anadolu'da *Erinaceus roumanicus*'a rastlanmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen verilerle ve gen bankası'nda depolanan ve dünyanın çeşitli yerlerinden elde edilmiş (Seddon ve ark., 2001, 2002) veriler beraber değerlendirilmiş ve büyük filogenetik analizleri yapılmıştır. Gen bankası sekansları Yunanistan, Türkiye, Avusturya, Macaristan, Ukrayna, Rusya, Estonya Hırvatistan, Gürcistan, Azerbaycan ve Ermenistan'dan örnekler içermektedir. Bu çalışmadaki örnekler ise Türkiye'nin Trakya Bölgesi ve Anadolu Bölgesi'nden örnekleri içermektedir. Elde edilen gen bankası verileri bu çalışmanın verileriyle beraber değerlendirilmiş ve bu çalışmada elde edilen bulgularla paralellik gösterdiği görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda elde edilen *E. concolor* kladları arasındaki ayrılık (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Seddon ve ark., 2001; Seddon ve ark., 2002; Berggren ve ark., 2005) bu çalışmadaki bulgularla da desteklenmiştir. Büyük filogenetik analiz sonucu elde edilen NJ, parsimoni, bayesian ağaçlarında iki ana soy hattı elde edilmiştir. Bu çalışma örneklerinden *E. roumanicus*'u içeren soy hattında, gen bankası haplotiplerinden Yunanistan, Türkiye'nin Trakya Bölgesi, Avusturya, Macaristan, Ukrayna, Rusya, Estonya ve Hırvatistan'dan örnekler bulunmaktadır. Bu çalışma örneklerinde *E. concolor*'u içeren soy hattında ise Gürcistan, Azerbaycan ve Ermenistan'dan gen bankası örnekleri bulunmaktadır.

Bu verilerden de anlaşılacağı üzere bu çalışmada elde edilen veriler Trakya ve Anadolu'daki *E. concolor* ayrımını desteklemektedir. Gen bankası haplotiplerinden Trakya'da bulunan *E. concolor* kladlarının *E. roumanicus*'la beraber bulunması daha önce yapılan bu *E. concolor* kladlarından bir kolun *E. roumanicus* olabileceği tahminini (Filippucci ve Simon, 1996; Schaschl ve ark., 2002) destekler bir bulgu olmuştur.

Avrupa'da bulunan üç refujal bölgeden iki ana *E. europaeus* kladının ve bir *E. concolor* kladının kuzeye yayıldığı belirtilmiştir (Santucci ve ark., 1998). Bir *E. concolor* kladının ise daha uzak başka bir refujdan yayıldığı düşünülmektedir (Santucci ve ark., 1998). Fakat bu refujun yeri tam olarak bilinmemektedir (Seddon ve ark., 2001). Kafkasya Sıradağları'nın kuzeyi ve güneyi arasındaki *E. concolor* haplotipleri arasındaki farklılıktan dolayı bu kayıp refuj bölgesinin Anadolu'da bir yer olabileceği (Seddon ve ark., 2002), buna ek olarak Trakya ve Anadolu, İsrail örnekleri arasındaki ayırmadan dolayı Boğazlar'ın bir ayrılma zonu olabileceği düşünülmüştür (Filippucci ve Simson 1996; Santucci ve ark. 1998; Berggren ve ark., 2005). Fakat bu çalışma ve daha önceki veriler (Suchentrunk ve ark., 1998; Seddon ve ark., 2001) bunun olamayacağını göstermiştir. İki *E. concolor* kladının yaklaşık olarak 2,2 milyon yıl önce oluştuğu tahmin edilmektedir (Seddon ve ark., 2001). Boğazlar'ın ise 7000 yıl önceye kadar bağlantılı olması (Göktaşan ve ark., 1997; Kerey ve ark., 2004) Anadolu'da muhtemel bir refuju ya da Boğazlar'ın bu kirpilerin ayırımında bir rolü olduğu fikrini çürütmektedir.

Bu çalışmada genel olarak farklı lokalitelerden bireyler seçilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda aynı lokaliteden daha fazla örnekle çalışmak, D-loop analizine ek olarak daha net bir sonuç elde etmek için sitokrom *b* bölgesi analizi ve nükleer DNA analizlerinin de yapılması gerekmektedir. Ayrıca Boğazlar'ın kuzey ve güneyindeki bölgelerden daha fazla örnekle çalışılması bu bölgedeki belirsizliğin açıklık kazanmasına yardımcı olacaktır.

7.KAYNAKLAR

- Akaike, H., 1974. A new look at statistical model identification. *IEEE Trans Auto Control*, 19, 716–723.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreiear, P.H., Smith, A.J., Staden R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465.
- Aquadro, C.F. ve Greenberg, B.D., 1983. Human mitochondrial variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from seven individuals. *Genetics*, 103, 287-312.
- Arslan, A., Zima J., Özparlak H., 2008. C-heterochromatin variation in the karyotype reflects species level distinction between *Erinaceus roumanicus* and *E. concolor* (Eulipotyphla: Erinaceidae) in Turkey. *Zootaxa*, 1-10.
- Attardi, G., 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme of genetic economy. *In genome evolution in procaryotes and eucaryotes* (Editörler: D.C: Reamey), 93s, Int. Rev. Cytol.
- Awasthi, M., Bhat, K.V., Anand, R.K., 1999. Allozymic Variation in Four Indian Species of Genus Mus: a Comparative Analysis. *J. Genet*, 78, 73-80.
- Bailey, G.N., Carter, P.L., Gamble, C.S. & Higgs, H.P., 1983. Asprochaliko and Kastritsa: further investigations of Palaeolithic settlement and economy in Epirus (North-West Greece). *Proc. Prehist. Soc.*, 49, 15–42.
- Bannikova, A.A., Kramerov, D.A., Vasilenko, V.N., Dzuev, R.I., Dolgov, V.A., 2003. DNA polymorphism of *Erinaceus* hedgehogs and *E. concolor* taxon (Insectivora, Erinaceidae). *Zoologicheskii Zhurnal*, 82, 70–80.
- Baret-Hamilton, G.E.H., 1900. *Erinaceus europaeus roumanicus*. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 356.
- Başbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D.L.J., 2000. *Phylogenetic Systematics a practical guide to theory and practice*. Önder Matbaa, 134s, Sivas.
- Bennet, E.T., 1835. Mammals of the neighbourhood of Teribzond and Erzurum. *Proc. Zool. Soc. London*, 3, 89-90.
- Berggren, K.T., Ellegren, H., Hewitt, G.M., Seddon, J.M., 2005. Understanding the phylogeographic patterns of European Hedgehogs, *Erinaceus concolor* and *Erinaceus europaeus* using the MHC. *Heredity*, 95, 84-90.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., Clayton, D.A., 1981. Sequence and gene organization of Mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26, 167-180.
- Brahim, I.O., Chatti, N., Britton- Davidian, J., Said, K., 2005. Origin and Evolution of the Robertsonian Populations of the House Mouse (Rodentia, Muridae) in Tunisia Based on Allozyme Studies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84, 515-21.
- Brown, W.H., 1985. The Mitochondrial genome of animals. *In Monographs in Evolutionary Biology: Molecular Evolutionary Genetics* (Editörler: R.J. MacIntyre), 95-130s, Plenum, New York.
- Cantatorre, P., and Saccone, C., 1987. Organisation, structure and evolution of mammalian mitochondrial genes. *Int. Rev. Cytol.* 108, 149-208.
- Chomyn, A., Mariottinim, P., Cleeterc, W.J., Racana, C.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F., Atardi, G.A., 1985. Six Unidentified Reading Frames of

- Human Mitochondrial DNA Encode Components Of The Respiratory-Chain NADH Dehydrogenase. *Nature*, 314, 592-597.
- Chomyn, A., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle R.F., Attardi, G., 1986. URF6, Last Unidentified Reading Frame Of Human mtDNA, Codes For An NADH Dehydrogenase Subunit. *Science*, 234, 614-618.
- Clayton, D.A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28, 693-705.
- Clayton, D.A., 1984. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann. Rev. Biochem*, 53, 573-594.
- Corbet, G.B., 1978. *The Mammals of the Palearctic Region: A Taxonomic Review*. Brit. Mus. Nat. Hist., Cornell University Pres, 314s, London.
- Cyrek, C., Nadachowski, A., Madeyska, T., Bochenski, Z., Tomek, T., Wojtal, P., Miekina, B., Lipecki, G., Garapich, A., Rzebik-Kowalska, B., Stworzewicz, E., Wolsan, M., Godawa, J., Kosciow, R., Fostowicz-Frelik, L. & Szyndlar, Z. 2000. Excavation in the Deszczowa cave (Kroczyckie Rocks, Cze[^]stochowa Upland, central Poland). *Folia Quaternaria*, 71, 5–84.
- Dulic, B., Triticovic, N., 1979. On Some Mammals from the central adriatic and South Adriatic Islands. *Acta. Biol. Pirir. Ist.*, 43, 15-35.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Farris, J.S., 1973. A probability model for inferring evolutionary trees. *Systematic Zoology*, 22, 250-256.
- Felsenstein, J., 1973. Maksimum Likelihood and minumum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Zoology*, 22, 240-249.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Filippucci, M.G., Simson. S., 1996. Allozyme Variation and Divergence in Erinaceidae (Mammalia, Insectivora). *Israel Journal of Zoology*, 42, 335-345.
- Giagia, E.B., 1977. Cytotaxonomical Study Of Eastern European Hedgehog *Erinaceus concolor* in Greece. *Dissortation Univ. Patras Greece.*, 1-163.
- Giagia, E.B., Ondrias, Y.C., 1980. Karyological Analysis of Eastern European Hedgehog *Erinaceus concolor* (Mammalia: Insectivora) in Greece. *Mammalia*, 44 (1), 59-71.
- Giagia-Athanasopoulou, E.B., Markakis, G., 1996. Multivariate analysis of morphometric character in the Eastern hedgehog *Erinaceus concolor* from Greece and adjacent areas. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 61, 129-139.
- Gökaşan, E., Demirbağ, E., Oktay, F.Y., Ecevitoglu, B., Şimşek, M., Yüce, H., 1997. On the origin of the Bosphorus. *Marine Geology*, 140, 183-199.
- Gündüz, İ., Doğramacı, S., 1993. Türkiye *Erinaceus concolor* (Mammalia: Insectivora) Türünün Taksonomisi ve Yayılışı. *Doğa-Tr. 1. of Zoology*, 17, 267-288.
- Gündüz, İ., Tez, C., Malikov, V., Vaziri, A., Polyakov, A.V., Searle, J.B., 2000. Mitochondrial DNA and chromosomal studies of wild mice (Mus) from Turkey and Iran. *Heredity*. 84, 458-467.
- Hall, B.G., 2007. *Phylogenetic Trees Made Easy*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 179s, USA.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the Human-ape splitting by a molecular clock of mithochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22, 160-174.

- Hauffe, H.C., Fraguedakis – Tsolis, S., Mirol, P.M., Searle, J.B., 2002. Studies of Mitochondrial DNA, Allozyme and Morphometric Variation in a House Hybrid Zone, *Genet. Res. Camb.*, 80, 117-29.
- Haynes, S., Jaarola, M., Searle, J.B., 2003. Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Mol. Ecol.*, 12, 951-956.
- Hewitt, G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn Soc.* 68, 87–112.
- Hillis, D., Mortiz, C., 1990. An overview of application of molecular systematics. In *Molecular Systematics* (Editörler: D.M. Hillis ve C. Mortiz), 502-515s, Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- http://www.turkcebilgi.com/uploads/media/harita/turkiye_haritasi.gif (15.05.09).
- Huelsenbeck, J.P., Rannala, B., 1997. Maximum likelihood estimation of phylogeny using stratigraphic data. *Paleobiology*, 23, 174–180.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755. (doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754)
- Hutterer, R., 1993. Order Insectivora. In *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference*. (Editörler: D.E. Wilson and D.M. Reeder), Smithsonian Institution Press, 2. Baskı, 69-130s, Washington, D.C.
- Hutterer, R., 2005. Order Erinaceomorpha. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. (Editörler: D.E. Wilson and D.M. Reeder), The Johns Hopkins University Press, 212-219s, London.
- Irvin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1991. Evolution of the Cytochrome *b* Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128-44.
- Karataş, A., Gharkheloo, M.M. & Kankılıç, T., 2007. Cranial features and karyotypes of two hedgehogs (Insectivora: Erinaceidae) from Iran. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 36, 419-423.
- Kerey, I.E., Meriç, E., Tunoğlu, C., Gilber, K., Brenner, R.L., Doğan, A.U., 2004. Black Sea Marmara Sea Quaternary connections: new data from the Bosphorus, Istanbul, Turkey. *Palaeoecology*, 204, 277-295.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide substitutions. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 454–458.
- Koumouzelis, M., Ginter, B., Kolzowski, J.K., Pawlikowski, M., Bar-Yosef, O., Albert, R.M., Litynska-Zajac, M., Stworzewicz, E., Wojtal, P., Lipecki, G., Tomek, T. & Bochenski, Z.M., 2001. The early upper palaeolithic in Greece: the excavations in Klisoura cave. *J. Archaeol. Sci.*, 28, 515–539.
- Kral, B., 1966. Karyological Analysis of Two European Species of the Genus *Erinaceus*, *Zool. Listy.*, 15 (4), 239-252.
- Kratochvil, J., 1966. Zur frage der Verbreitung des Igels (*Erinaceus*) in der CSSR, *Zool. Listy.*, 15 (4), 291-304.
- Kratochvil, J., 1975. Zur kenntnis der Igel del Gattung *Erinaceus* in der ÈSSR (Insectivore, Mamm.). *Zool. Listy*, 2, 297-312.
- Krettek, A., Gullberg A., Arnason, U., 1995. "Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA molecule of the hedgehog, *Erinaceus europaeus*, and the phylogenetic position of the Lipotyphla. *J. Mol. Evol.*, 41 (69), 52-957.

- Kryštufek, B., 1983. The Distribution of Hedgehog (*Erinaceus* L., 1758. Insectivora, Mammalia) in Western Yugoslavia. *Biosystematika.*, 9 (1), 71-79.
- Kryštufek, B., 2002. Cranial variability in the Eastern hedgehog *Erinaceus concolor* (Mammalia: Insectivora). *Journal of Zoology London*, 258, 365–373.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452. (doi: 10.1093/btp187.)
- MacPhee, R.D.E., Novacek, M.J., 1993. Definition and relationships of Lipotyphla. *Mammal Phylogeny: placentals*. (Editörler: F.S. Szalay, M.J. Novacek ve M.C. McKenna), Springer- Verlag, 13-31s, New York.
- Maddison, D.R., Madson, W.P., 2000. MacClade. 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Manceau, V., Despres, L., Bouvet, J., Taberlet, P., 1999. Systematics of the genus *Capra* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13, 504–510.
- Mandahl, N., 1978, Variation in C-stained chromosome regions in European hedgehogs (Insectivora, Mammalia). *Hereditas*, 89, 107-128.
- Martin, W., 1838. Description of a new Hedgehog (*Erinaceus concolor*). From Trebizond. *Proc. Soc. London.*, 57, 102-103.
- Martino, V.E., 1930. Notes on the ecology of some mammals from Yugoslavia. *Zap. Russ. Naush. Inst. Belgrade*, 2, 53-65.
- Mau, B., Newton, M., 1997. phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *J. Comp. Graph, Stat*, 6, 122-131.
- Mau, B., Newton, M., Larget, B., 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55, 1-12.
- Miller, G.S., 1912. *Catalogue of the Mammals of Western Europe (Europe exclusive of Russia) in the collection of the British Museum*. British Museum (Nat. Hist.), 1019s, London.
- Mitchell-Jones, A.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Kryštufek, B., Reijnders, P.J.H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralík, V., Zima, J., 1999. *Atlas of European mammals*. Poyser Natural History - Academic Press, 496s, London.
- Moritz, C., Dowling T.E. ve Brown, W.H., 1987. Evolution of animal mitochondria: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18, 209-292.
- Nachman, M.W., Boyer, S.N., Searle, J.B., Aquando, C.F., 1994. Mitochondrial DNA Variation and the Evolution of Robertsonian Chromosomal Races of House Mice *Mus domesticus*. *Genetics*, 136, 1105-20.
- Nagamine, C.M., Boursot, P., Lau, Y.F.C., Moriwaki, K., 1994. Evolution of the Y Chromosome in the Wild Mouse. *Genetics in Wild Mice* (Editörler: K. Moriwaki ve ark.), Japan Sci. Soc. Pres., 41-55s, Tokyo/S. Karger, Basel.
- Nei, M., Li, W.–H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Pres, New York.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.
- Payne, S., 1975. Faunal change at Franchthi Cave from 20,000 B.C. to 3000 B.C. In *Archaeozoological studies*. (Editör: A.T. Clason), North- Holland Publishing, 120–131s, Amsterdam.

- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A. and Saccone, C., 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, 48, 427–434.
- Posada, D. and Crandall, K. A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9), 817-818.
- Rannala, B., Yang, Z.H., 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.*, 43, 304-311.
- Reeve, N., 1994. *Hedgehogs*. T&AD Poyser Ltd. (Natural History), 266s, London.
- Roderic, D.M., Holmes, E.C., 2006. *Molecular Evolution: A phylogenetic Approach*. Blackwell Publishing, 346s, UK.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Santucci, F., Emerson, B.C., Hewitt, G.M., 1998. Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular Ecology*, 7, 1163-1172.
- Schaschl, H., Lymberakis, P., Suchentrunk, F., 2002. On Allozyme and cyt-b Gene Characteristics of Cretan hedgehogs, *Erinaceus concolor nesiotus* Bate, 1906. *Mamm. biol.*, 67, 257-267.
- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt, G.M., 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *Erinaceus concolor* : Pleistocenerefugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology*, 10, 2187-2198.
- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt G.M., 2002. Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *J. Evol. Biol.*, 15, 463-467.
- Sommer, R.S., 2007. When east met west: the sub-fossil footprints of the west European hedgehog and the northern white-breasted hedgehog during the Late Quaternary in Europe. *Journal of Zoology*, 273, 82-89.
- Suchentrunk, F., Haiden, A., Hartl, G.B., 1998. On Biochemical Genetic Variability and Divergence of the two Hedgehog Species *Erinaceus europaeus* and *Erinaceus concolor* in central Europe. *Z. Saugetierkunde*, 63, 257-265.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., 1990. Phylogeny reconstruction. In *Molecular Systematics* (Editörler: D.M. Hillis ve C. Mortiz), 411-501s, Sinauer, Sunderland, Massachusetts methods), version 4 beta 10. Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Symeonidis, N., Bachmayer, F. & Zapfe, H., 1980. Ergebnisse weiterer Grabungen in der Höhle von Vraona (Attika, Griechenland). *Annales gaeologiques pays helleniques Athaenes*, 30, 291–299.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Yamagata, T., Namikawa, T., 1999. Sequence variation and evolution of the mitochondrial DNA control region in the musk shrew, *Suncus murinus*. *Genes. Genet. Syst.*, 74, 257-266.

Wettstein, O., 1942. Bemerkungen über einige Sauger des griechisch-kleinasiatischen Raumes. Sitzungsberichte österr. Acad. Wiss. Mathem. Naturwiss. Kl, 175, 357-362.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu Tiryaki
Doğum Yeri : Samsun
Doğum Tarihi : 17/09/1982
Medeni Hali : Bekar
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Atatürk Anadolu Lisesi (Samsun) 1996-2000
Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi (İzmir) 2001-2006

Çalıştığı Kurum ve Yılı :

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2007-halen devam etmekte).

İletişim Bilgileri :

Atatürk Bulv. Denizevleri Mah. Kalamış Sok. Belde Apt. 2/4 Atakum/ SAMSUN
Tel: 0 362 437 25 38/ 0 533 432 25 85