

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’NİN KUZEYİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN YEDİUYUR,
Glis glis (Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia)
POPULASYONLARININ RAPD-PCR İLE ANALİZİ

Senem Esin SELÇUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2008

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE’NİN KUZEYİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN YEDİUYUR,
Glis glis (Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia)
POPULASYONLARININ RAPD-PCR İLE ANALİZİ

Senem Esin SELÇUK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK

Yediuyur, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia) yapraklarını döken ve karışık ormanlarda yaşayan küçük bir memeli hayvan türü olup Türkiye’nin kuzeyinde yayılış göstermektedir. Ancak son yıllarda habitat kaybı nedeniyle türün populasyonları arasındaki gen akışı kesintili hale gelmiştir. Türkiye’de *Glis glis*’in iki alt türü bulunmaktadır. Türün evrimsel özellikleri, Trakya ve Anadolu populasyonları arasındaki izolasyonunun önemi henüz ortaya konmamıştır. Bu çalışmanın amacı, türün genetik yapısını analiz ederek taksonomisine ve evrimine katkıda bulunmaktır. Bu çalışma ile *G. glis*’in Türkiye populasyonları ilk kez RAPD-PCR tekniğiyle analiz edildi. Türkiye’deki yedi lokaliteden toplam 40 bireyle çalışıldı. Kullanılan 20 primerin 12 tanesi sonuç vermiş olup 74 polimorfik RAPD bandı ortaya koydu. Çalışılan populasyonlar arasındaki genetik ilişkileri göstermek için Nei’nin genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamaları kullanıldı. Hesaplamalar POPGENE bilgisayar programıyla yapıldı. Hesaplanan ortalama genetik çeşitlilik değeri $H_t = 0,1480$, genetik farklılaşmayı gösteren G_{ST} değeri 0,6065 olarak hesaplandı. Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogramda, 2 küme görüldü. İlk küme Kırklareli ve Zonguldak populasyonlarından oluştu. İkinci küme ise iki alt kümeye ayrıldı; birinci altküme Ordu ve Giresun populasyonlarından, ikinci alt küme Trabzon, Rize ve Artvin populasyonlarından oluştu. Trakya ve Anadolu populasyonları karşılaştırıldığında, populasyonlar arası genetik benzerlik değeri 0,9319 olarak bulundu.

Eylül 2008, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Yediuyur, *Glis glis*, RAPD- PCR, evrim, Türkiye

ABSTRACT

Master Thesis

RAPD-PCR ANALYSIS OF POPULATIONS OF EDIBLE DORMOUSE,
Glis glis (Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia)
DISTRIBUTED IN NORTH OF TURKEY

Senem Esin SELCUK

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Reyhan COLAK

Edible dormouse, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia) is small arboreal mammals living in deciduous, mixed forests, distributed in North of Turkey. However, because of the loss of habitat, gene flow between the populations of this species are interrupted. There are two subspecies of *Glis glis* in Turkey. Furthermore, the evolutionary characteristics of this species and the importance of the isolation between Thrace and Anatolia population are not verified. There is no study at the level of DNA about the populations of *Glis glis*. The aim of this study is to contribute taxonomy and evolution of *G. glis*, analyzing its genetic structure. The Turkish populations of *Glis glis* is analyzed for the first time by using RAPD-PCR technique with this study. This study is conducted on 40 individual collected from the 7 localities of Turkey. 12 of the 20 RAPD markers tested yielded 74 polymorphic DNA bands. To show the genetic relation between the studied populations, genetic distance and similarity calculations of Nei were used. These calculations were done by using POPGENE software. The total genetic diversity and genetic differentiation values were calculated as $H_t = 0,1480$ and $G_{ST} = 0,6065$, respectively. Dendrogram constructed based on genetic distance data formed two clusters, first cluster included in Kırklareli and Zonguldak populations. Second cluster was divided into two subgroups, first subgroup contained Ordu and Giresun populations, and second subgroup was formed from Trabzon, Rize and Artvin populations. When the Thrace and Anatolia populations are compared, genetic similarity value was found as 0,9319.

September 2008, 70 pages

Key Words: Edible dormouse, *Glis glis*, RAPD- PCR, evolution, Turkey

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocam, danışmanım Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi), örneklerin temin edilmesini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK'a ve Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e, bilgilerini paylaştığım değerli hocam Doç. Dr. İrfan KANDEMİR'e, çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve yol gösteren arkadaşlarım Gül OLGUN'a ve Münir UÇAK'a, jel görüntüleme sistemlerini benimle paylaşan Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma özellikle Duygu ABBASOĞLU'na, her türlü laboratuvar ihtiyaçlarımı karşılayan ve kapılarını bana her daim açık tutan Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki hocalarım Araş. Gör. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ'a ve Araş. Gör. Sevgi ERTUĞRUL'a, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda çalışan sayın Devrim AYDIN'a ve Buket GÜLTEKİN'e ve benim için hiçbir fedakarlığı esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürler.

Bu çalışmada kullanılan örnekler kısmen TBAG-HD/5 105T018 no'lu TÜBİTAK projesinden sağlanmıştır.

Senem Esin SELÇUK

Ankara, Eylül 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Ordo: Rodentia (Kemiriciler).....	4
2.2 Familia: Gliridae (Muirhead, 1819) (Yediuyurlar).....	6
2.3 Species: <i>Glis glis</i> (Linnaeus, 1766) (Yediuyur).....	9
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	13
2.4.1 PCR nedir?.....	13
2.4.2 Enzim seçimi.....	18
2.4.2.1 Taq DNA polimeraz.....	19
2.4.2.2 Vent TM DNA polimeraz.....	20
2.4.2.3 <i>Pfu</i> DNA polimeraz.....	20
2.4.2.4 <i>Tth</i> DNA polimeraz.....	20
2.4.2.5 UITma TM DNA polimeraz.....	20
2.5 Diğer PCR Bileşenleri.....	21
2.5.1 Deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTPs).....	21
2.5.2 Tamponlar ve MgCl ₂	21
2.5.3 Kalıp DNA.....	22
2.6 PCR İnhibitörleri ve Aktivatörleri (Enhancerler).....	22
2.7 Genetik Marker (Belirteç) Nedir?.....	23
2.7.1 Genetik marker tipleri.....	24
2.8 RAPD-PCR.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1 Materyal.....	29
3.2 Yöntem.....	32

3.3 DNA İzolasyonu.....	32
3.4 DNA Miktarının Belirlenmesi.....	33
3.5 RAPD Primerleri.....	35
3.6 RAPD-PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu.....	37
3.7 Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.8 Jellerin Yorumlanması.....	38
3.9 Veri Analizleri.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4.1 İstatistik Analizi Sonuçları.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
<i>A</i>	Lokus başına ortalama allel sayısı
β ME	β Merkaptoetanol
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
C	Sitozin
cDNA	Komplementer DNA
C:IAA	Kloroform: İzooamil Alkol
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromid
D	Nei'nin genetik mesafe değeri
<i>D.</i>	<i>Dryomys</i>
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
dNTPs	Deoksiribonükleotit trifosfatlar
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Est-3	Esteraz 3
Est-4	Esteraz 4
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
F_{st}	Her bir alt popülasyonun toplam heterozigotluğa katkısı
<i>G.</i>	<i>Glis</i>
G	Guanin
G_{ST}	Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü
H	Nei'nin genetik çeşitliliği
HCl	Hidroklorik Asit
H_e	Beklenen heterozigotluk
H_I	Popülasyondaki bir bireyin gözlenen heterozigotluğu

H _o	Gözlenen heterozigotluk
H _S	Populasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu
H _T	Tüm populasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu
I	Shannon information indeksi
ISSR	Basit Ara Dizi Tekrarları
IUCN	Doğa ve Doğal Kaynakların Korunması için Uluslararası Birlik
KCl	Potasyum Klorür
<i>M.</i>	<i>Mus</i>
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
n	Ardışık nükleotit tekrar sayısı
Na	Gözlenen allel sayısı
NaCl	Sodyum Klorür
Ne	Etkili allel sayısı
Nm	Gen akışı
NaOH	Sodyum Hidroksit
OPA	Operon A
OPB	Operon B
OPD	Operon D
P	Polimorfik lokus
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RAPD-PCR	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSR	Basit Dizi Tekrarları
STR	Kısa Dizi Tekrarları

T	Timin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris Asetikasit EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>Tma</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
tRNA	Taşıyıcı RNA
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
UV	Ultra Viyole
YAC	Maya Yapay Kromozomu
Φ_{st}	Populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma değeri
bç	baz çifti
cm	santimetre
dk	dakika
gr	gram
m	metre
ml	mililitre
mt	mitokondriyal
M	molar
mM	milimolar
ng	nanogram
nm	nanometre
μ l	mikrolitre
μ M	mikromolar
μ mol	mikromol
pmol	pikomol
rpm	Dakikadaki dönüş hız birimi (revolution per minute)
sn	saniye
w/v	Ağırlık/Hacim
V	Hacim
°C	derece santigrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Glis glis</i>	9
Şekil 2.2 Istranca Ormanı'nda (Kırklareli) fındık ağacında yakalanmış bir <i>G. glis</i> örneği.....	10
Şekil 2.3 <i>G. glis</i> 'in yeryüzündeki dağılımı.....	12
Şekil 2.4 Üç basamaklı tipik bir ısı döngü profili.....	15
Şekil 2.5 Denaturasyon.....	16
Şekil 2.6 Bağlanma (Annealing).....	17
Şekil 2.7 Uzama (Extension).....	18
Şekil 3.1 <i>Glis</i> , <i>Dryomys</i> ve <i>Mus</i> örneklerinin toplandığı bölgelerin harita üzerinde gösterimi.....	31
Şekil 4.1.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-01 (5'- CAG GCC CTT C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	41
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-01 (5'- CAG GCC CTT C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	41
Şekil 4.2.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-02 (5'- TGC CGA GCT G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	42
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-02 (5'- TGC CGA GCT G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	42
Şekil 4.3.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-03 (5'- AGT CAG CCA C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	43
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-03 (5'- AGT CAG CCA C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	43

Şekil 4.4.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-04 (5'- AAT CGG GCT G -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	44
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-04 (5'- AAT CGG GCT G -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.5.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-08 (5'- GTG ACG TAG G -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	45
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-08 (5'- GTG ACG TAG G -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	45
Şekil 4.6.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-01 (5'- GTT TCG CTC C -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	46
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-01 (5'- GTT TCG CTC C -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	46
Şekil 4.7.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-02 (5'- TGA TCC CTGG -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	47
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-02 (5'- TGA TCC CTGG -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	47
Şekil 4.8.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-03 (5'- CAT CCC CCT G- 3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	48
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-03 (5'- CAT CCC CCT G-3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	48

Şekil 4. 9.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-04 (5'- GGA CTG GAG T -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	49
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-04 (5'- GGA CTG GAG T -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	49
Şekil 4.10.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-06 (5'- TGC TCT GCC C -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	50
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-06 (5'- TGC TCT GCC C -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	50
Şekil 4.11.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-02 (5'- GGA CCC AAC C -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	51
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-02 (5'- GGA CCC AAC C -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	51
Şekil 4.12.a. Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-04 (5'- TCT GGT GAG G -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	52
b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-04 (5'- TCT GGT GAG G -3')	
primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel	
üzerindeki görüntüsü.....	52
Şekil 4.13	Çalışılan tüm populasyonlara ait genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogram (Nei 1972).....55
Şekil 4.14	<i>G. glis</i> 'in Anadolu ve Trakya populasyonları ile dış gruplara ait genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogram (Nei 1972).....57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan <i>Glis glis</i> örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler.....	29
Çizelge 3.2 Çalışmada dış grup olarak kullanılan türlerin laboratuvar kayıt Numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler.....	31
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan <i>G. glis</i> 'ten elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları.....	33
Çizelge 3.4 Çalışmada dış grup olarak kullanılan <i>Dryomys nitedula</i> , <i>Dryomys laniger</i> ve <i>Mus macedonicus</i> 'dan elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları.....	35
Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler ve baz dizileri.....	36
Çizelge 3.6 Kaya and Neale (1995) tarafından uygulanan PCR döngü programı.....	37
Çizelge 3.7 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü programı.....	37
Çizelge 4.1 Tutarlı sonuç veren her bir primerden elde edilen polimorfik bant sayısı...	40
Çizelge 4.2 <i>G. glis</i> populasyonlarının genetik varyasyon analizleri (Nei 1987).....	54
Çizelge 4.3 <i>G. glis</i> alt populasyonlarında genetik farklılaşma analizi (Nei 1987).....	54
Çizelge 4.4 Tüm <i>G. glis</i> populasyonlarına ait genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamaları (Nei 1972).....	54
Çizelge 4.5 <i>G. glis</i> 'in Trakya ve Anadolu populasyonlarının genetik varyasyon analizleri (Nei 1987).....	56
Çizelge 4.6 <i>G. glis</i> 'in Trakya ve Anadolu populasyonları ile dış gruplara ait genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamaları (Nei 1972).....	56

1. GİRİŞ

Yediuyur, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) yapraklarını döken ve karışık ormanlarda yaşayan küçük bir memeli hayvan türüdür. Palearktik bölgede 10 alttürle temsil edilmektedir (Ognev 1947).

Türün dağılımı boyunca populasyonlar arasındaki coğrafik varyasyonun önemi alttür ya da tür seviyesinde farklılaşma bağlamında araştırılmamıştır. Rossolimo *et al.* (2001), türün yaşamına, yayılışına, morfolojik, ekolojik, davranışsal ve diğer özelliklerine açıklık getiren kapsamlı araştırmalar yapmıştır. Franco (1988), Asiago (İtalya) populasyonlarının biyometrisini ve taksonomisini, Peshev and Delov (1995b) Bulgaristan populasyonlarının metrik özelliklerindeki çeşitliliği, Doğramacı ve Tez (1991) Türkiye populasyonlarının morfometrik ve kromozomal özelliklerini, Ondrias (1966) güneydoğu Avrupa'daki alttürlerin dağılımını ve teşhisini yapmıştır. Daoud (1993) fosil *Glis* örneklerinin diş yapılarını karşılaştırmıştır. Peshev and Delov (1995a) Bulgaristan, Civitelli *et al.* (1995b) İtalya ve Türkiye, Graphodatsky and Fokin (1993) Rusya populasyonlarının karyotip çalışmalarını yapmışlardır. Elde edilen verilere ek olarak Zima *et al.* (1995) bütün karyotip verilerinin bir derlemesini yapmıştır. Filippucci and Kotsakis (1995) allozim varyasyonlarını ve genetik ilişkilerini, Hrabe (1969) ve Simson *et al.* (1995) phallus, baculum yapılarını ve bu yapılardaki varyasyonu, Kratochvil (1973) os ve glans penisin taksonomik önemini, karın anatomisini analiz etmişlerdir. Krattli and Haffner (1995) ayakların fonksiyonel morfolojisini ve histolojisini, Kulikov (1988) bıyıkların morfolojisini ve fonksiyonel önemini, Kryštufek (2004) Slovenya örneklerinin meme sayısındaki varyasyonu ve bu varyasyonun olası önemini değerlendirmiştir. Ayrıca Kryštufek (2001c), Kryštufek and M. Zavodnik (2003) ve Kryštufek *et al.* (2003) Slovenya populasyonlarının ekolojisini, vücut ağırlığındaki ve organ ağırlıklarındaki mevsimsel varyasyonu ve populasyon biyolojisindeki diğer özellikleri incelemişlerdir. Nowakowski (2001a) Polonya'nın kuzeydoğusunda ormanda bulunan yediuyurlarda günlük uyuşuklukla (daily torpor) ilgili gözlemlerini rapor etmiştir. Schlund (1997) yaş tayininde tibial uzunluğu kullanmıştır. Timm *et al.* (1998), doğu Baltık ve Miljutin (1998) Baltık rodentlerinin ekolojik durumlarını bir derlemede açıklamıştır. Kuzey İtalya (Cantini 1991, Paolucci *et*

al. 1993, Cresti *et al.* 1994, Scaravelli *et al.* 1995, Locatelli and Paolucci 1996a), orta İtalya (Cerone and Aloise 1994, Amori *et al.* 2002a) ve güney İtalya (Cagnin and Aloise 1995, Cagnin *et al.* 1996) populasyonlarının faunal çalışmaları kaydedilmiştir. Carpaneto and Cristaldi (1995) türün coğrafik dağılımı üzerindeki insan etkisini araştırmıştır. Türün Avrupa’da orta ve geç Pleistosen’de yaşadığına dair kayıtlar elde edilmiştir (Storch 1978a, Horacek 1986, Viriot *et al.* 1991, Capasso-Barbato and Gliozzi 2001, Kowalski 2001, Wilson and Reeder 2005).

Reyes *et al.* (1998) Fransa’da bir *G. glis* örneğinin mt DNA’sını izole ederek tam mitokondriyal genom dizisini çıkarmışlar (16,602 bp; 13 protein kodlayan gen, 2 rRNA ve 22 tRNA) ve dördü kemirici (*Glis glis*, sıçan, fare ve kobay) olmak üzere 23 tam mitokondriyal memeli genomunu dikkate alarak filogenetik ilişkilerini incelemişlerdir. Markov (2001), Bulgaristan’ın dağlık alanlarında yaşayan *G. glis* kafataslarında 12 nonmetrik özelliğin değişkenliğini araştırmıştır. Araştırmacı, Bulgaristan’daki altı yediuyur populasyonu arasında çok belirgin bir epigenetik farklılaşmanın bulunmadığını, populasyonların bu nonmetrik özellikler açısından benzer olduğunu bildirmiştir. Bieber (1998), orta Almanya’daki yediuyurların populasyon ekolojisi ve üremeleri üzerine çalışmalar yapmıştır. Malatesta *et al.* (2000), İtalya’daki *G. glis* örneklerinin nukleoluslarında hibernasyon sırasındaki yapısal ve moleküler modifikasyonları elektron mikroskobu ve immunositokimyasal olarak incelemişlerdir.

Glis glis, Türkiye’de Karadeniz, Marmara ve Trakya’da yayılış göstermektedir. Boğazlar bu türün yayılış alanını ikiye bölmektedir. Boğazların her iki tarafında, Trakya’da *G. glis pindicus* Ondrias, 1966 ve Anadolu’da *G. glis orientalis* (Nehring, 1903) olmak üzere iki alttür yaşamaktadır. Boğazlarla birlikte orman tahribatları da türün yaşadığı habitatları kesintili hale getirmektedir. Bu nedenle türün nesli tehlike altına girmiştir (2007 IUCN Kırmızı Listesi). Bütün bu etkiler türün farklı coğrafik alanlarda yaşayan populasyonları arasındaki gen akışını kesmekte ve dolayısıyla evrimleşme sürecini etkilemektedir. Böylece bu türün populasyon genetiği, sistematigi, ekolojisi ve biyolojisi üzerindeki çalışmalar önem kazanmaktadır.

Doğramacı ve Tez (1991), Türkiye’de *G. glis*’in karyolojik ve baculum özelliklerini incelemişler, Anadolu’da *G. g. orientalis* ve Trakya’da *G. g. pindicus* alttürlerinin bulunduğunu belirleyerek Trakya ve Anadolu populasyonlarının morfolojik olarak birbirinden ayrıldığını ortaya koymuşlardır.

Genç *G. g. orientalis* yediyuurlarının besin tüketimi ve vücut ağırlıklarındaki periyodik siklusları ortaya konulmuş, *G. g. orientalis*’in testis ve karaciğerinde hibernasyon sonucu oluşan değişiklikler histolojik olarak incelenmiş, laboratuvarındaki beslenme biyolojisi, üreme biyolojisi ve davranışları araştırılmış, değişen şartlarda tutulan *G. g. orientalis* örneklerinin hibernasyonu ve vücut ağırlığındaki değişiklikler, kafatası ve diş gelişimi üzerine araştırmalar yapılmıştır (Çolak vd. 1994, 1997, 1998, 2003, Kıvanç vd. 1995, Yiğit vd. 2001).

Çolak vd. (2006) tarafından yapılan bir proje çalışmasında Türkiye’de yayılış gösteren *Glis glis*’in allozim varyasyonları analiz edilmiştir. Allozim analizlerinde 17 enzim sistemine ait 28 lokus nişasta ve poliakrilamid jel elektroforezi tekniği ile incelenmiştir. Bu lokuslardan sadece Est-3 (3 allel) ve Est-4 (2 allel) lokuslarında polimorfizm belirlenmiştir. İncelenen lokuslara göre Anadolu ve Trakya populasyonlarının belirgin bir şekilde birbirinden ayrılmadığı görülmüştür.

Yukarıda verilen literatür özetinden de anlaşılacağı gibi, bugüne kadar Türkiye’deki *G. glis* populasyonları ile ilgili olarak DNA düzeyinde bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada Türkiye’deki *Glis* populasyonları arasındaki genetik ilişkilerin RAPD tekniği ile analizi amaçlanmaktadır. Bu multilokus tekniği genom içindeki genel polimorfizm hakkında bilgi vermekte ve çeşitli organizmalarda filogenetik çalışmalar için kullanılmaktadır (Welsh and McClelland 1990, Williams *et al.* 1990, Weishing *et al.* 1995, Vanacova *et al.* 1997). Ayrıca bu türün evrimsel özellikleri ve boğazların Trakya ve Anadolu populasyonları arasındaki izolasyondaki önemi henüz ortaya konmamıştır. Bu çalışmada *G. glis*’in Türkiye populasyonları ilk kez RAPD-PCR tekniği ile analiz edilecektir. Bu araştırmanın, türün taksonomisine ve evrimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Classis: Mammalia

Ordo: Rodentia

2.1 Ordo: Rodentia (Kemiriciler)

Rodentler (kemiriciler) paleontolojik verilere göre yaklaşık 55 milyon yıldır dünya üzerinde bulunmaktadır (Hartenberger 1985). Yaklaşık 30 familyada yer alan 2000'in üstünde türle memelilerin en geniş takımıdır. Ekolojik tercihleri son derece farklıdır. Bazı türler tüm yaşamını toprak altında geçirirken diğerleri nadir olarak yaşamını toprak altında geçirir. Bazı türler oldukça suculken diğerleri çöl yaşamı için özelleşmiştir (<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rodentia.html>, 2008).

En önemli özelliği dişlerin yapısıdır, dişler kemirme için oldukça özelleşmiştir. Bütün rodentler bir çift üst ve bir çift alt olmak üzere kesici (incisor) dişlere sahiptir, bu dişleri “diastema” adı verilen bir boşluk izler. Kesici dişler köksüzdür ve devamlı uzarlar. Ön ve yan yüzeyleri mine tabakasıyla örtülüken arka yüzeyleri mine tabakasıyla örtülü değildir. Kemirme esnasında bu kesici dişler birbirine sürtünür ve yumuşak tabakalarını kaybeder. Bu şekilde meydana gelen “kendi kendine keskinleştirme sistemi” rodentlerde çok etkili bir sistemdir. Kesici dişler çıkarılırsa yerlerine yenileri oluşmaz ve karşısındakiler sürekli büyüyerek canlının ölümüne neden olur. Bir ya da daha fazla sayıda molar veya premolar dişler bulunur. Alt ve üst çene ikiye bölündüğünde elde edilen dört parçanın her birinde birden fazla kesici diş bulunmaz. Ayrıca hiçbir rodente köpek (canine) dişi yoktur

(Demirsoy 1998, <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rodentia.html>, 2008).

Kuyrukları uzun, bazı türlerde pullarla örtülüdür. Toprak altında tünel kazarak yaşayanlarda tırnaklar gelişmiştir. Gözler yaşam biçimine bağlı olarak farklı büyüklükte olabilir. Toprak altında yaşayanlarda gözler küçülmüş hatta bazı türlerde körelerek deri

altında kalmıştır. Gececil (nokturnal) olanlarda ise oldukça büyüktür. Gözler başın yan tarafında yer aldığından hem önü hem de arkayı aynı şekilde görebilirler. Suda yaşayanlarda gözler başın üst kısmındadır. Kulaklar da yaşam biçimine göre değişik şekiller gösterir; toprak altında ve suda yaşayanlarda oldukça küçülmüştür. Türlerin çoğunda koku alma duyusu çok gelişmiştir. Bir kısmında ise, baş, burun, ön üyeler ve göğüs üzerindeki dokunma kılları nedeniyle, dokunma duyusu da iyi bir şekilde gelişmiştir. Büyük beyinleri az gelişmiştir; birçoğu ve özellikle sıçanlar vücut büyüklüğüyle doğru orantılı olarak artan bir öğrenme yeteneğine sahiptir (Demirsoy 1998).

Gebelik süreleri 16–170 gün arasında değişir. Yeniden gebe kaldıklarında da yavrularını emzirebilirler. Çoğalmaları birçok böcekten daha hızlıdır. Çoğunlukla yılda birkaç defa doğururlar ve her doğumda 1-18 yavru yaparlar (Demirsoy 1998).

Rodentler, insanların besinlerine, tahtadan, kâğıttan, deriden, kumaştan yapılmış malzemelere ve eşyalara, yeraltı telefon kablolarına, elektrik tellerinin yalıtım kaplamalarına ve diğer nesnelere keskin dişleriyle kemirerek zarar vermeleri ve bazı hastalıkları bulaştırmaları açısından zararlıdırlar. Örneğin, sıçan, fare ve sincaplar üzerinde yaşayan pireler, vebayı insanlara aşırlar. Ayrıca sıçanlar kuduz, trişin, kadınlarda düşüklere neden olan toksoplazma, lenf düğümlerinin şişmesine ve deri lezyonlarına neden olan tularemi, zehirlenme ya da kolera gibi kusma veya ishal belirtileri gösteren birçok hastalığın etkeni olan bakterileri taşırlar. Bunun yanı sıra, sıçanlar, idrarlarıyla kanamalı sarılık (lepto-sirosis) hastalığını da bulaştırırlar (Demirsoy 1998).

Çok eski zamanlardan beri, insanlar, fare etini ilaç olarak kullanmışlardır. Hatta günümüzde birçok Ortadoğu ve Balkan ülkesinde yeni doğmuş fare ve sıçan yavruları zeytinyağı içerisinde bir çeşit eritilip halk ilacı olarak hastalara yedirilmekte ya da yaralara sürülmektedir (kantarma yağı). Bazılarının kürkleri çok değerlidir. Bu nedenle dünyanın birçok bölgesine insanlar tarafından götürülmüşlerdir. Ayrıca rodentler deney hayvanları olarak da laboratuvarlarda önemli bir yer tutar. Örneğin tıbbi araştırmaların

ve buluşların %90'ı bu hayvanlarla yapılan denemelere dayanır. Çünkü bu canlılar laboratuvar koşullarına çok iyi uyum sağlarlar. Üremeleri çok hızlıdır ve hepsinden önemlisi yapıları insanlara çok benzer. Rodentler içerisinde de en çok sıçanlar, fareler ve kobaylar bu amaçla kullanılmaktadır. Rodentler, birçok yırtıcı hayvanın besinini oluşturmak suretiyle de doğal dengenin oluşmasında önemli rol oynarlar (Demirsoy 1998).

Sınıflandırılmasında masseter kasının konumlanması dikkate alınmaktadır ve buna göre 5 alt ordoya ayrılırlar:

- 1) Anomaluromorpha
- 2) Castorimorpha
- 3) Hystricomorpha
- 4) Myomorpha
- 5) Sciuromorpha*

*Gliridae familyası Sciuromorpha alt ordosunda yer alır

(<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/Rodentia.html>, 2008).

2.2 Familia: Gliridae (Muirhead, 1819) (Yediuyurlar)

Gliridae familyası daha önceden farklı taksonomistler tarafından Myoxidae ya da Muscardinidae olarak da adlandırılmaktaydı. Ayrıca *Myoxus glis* tür ismi kullanılmaktaydı. Daha sonra 1998 yılında Uluslararası Zooloji Nomenklatürü'nün almış olduğu kararla cins ismi değiştirilmiş ve *Glis glis* (Linnaeus, 1766) ismi kabul edilmiştir. Familyanın adı da Gliridae olmuştur. En çok dikkat çeken özellikleri hibernasyon olup isimleri Anglo- Norman dilinde “uykulu” anlamına gelen “dormeus” kelimesinden gelir. Daha sonradan “dormeus” ismi, İngilizce’de fare anlamına gelen kelimeye benzerliğinden dolayı “dormouse” olarak değiştirilmiştir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Dormouse>, 2008).

Genel görünüşleri sincaplara benzer; başları küçük ve öne doğru sivri; gözleri ve kulakları iri; vücutları uzun ve sık kıllı; kulakları çıplak ya da seyrek kıllı; kuyruklarının

yalnız yan taraflarında seyrek kıllar bulunabilmektedir. 6-19 cm vücut uzunluğunda ve 15-200 gr ağırlığındadırlar. Gün boyunca uyurlar, çoğu gece aktiftir (nokturnal). Kafataslarında infraorbital foramen küçük, bulla tympanica kuvvetli olarak ileriye çıkıktır; göz çukurları büyük; bazı yediuyurların dışındakilerin hepsinde processus angularis tek bir delik taşır. Tibia ve fibula tamamen kaynaşmıştır. Tırmanıcı ve tutunucu bacak tipine sahiptirler; özellikle ön üyeleri ile tırmanır. Farklı tonlardaki sesleri algılayabilmeleriyle mükemmel bir işitme duyu yetenekleri vardır. Türlerle ve yiyecek bulma durumlarına göre geniş ölçüde değişen küçük aile grupları halinde yaşarlar. Omnivordurlar, çilek, böğürtlen gibi küçük yumuşak meyvelerle, çiçekle, fındıkla ve böceklerle beslenirler. Diş formülü sincaplara benzer $1.0.1.3/1.0.1.3=20$ 'dir (Demirsoy 1998).

Yılda 1 ya da 2 kez doğurabilirler. 21–32 günlük bir gebelik periyodundan sonra ortalama 4 yavru doğururlar. Yavrular tüysüz doğar, savunmasızdır. Cinsel olgunluklarına ilk hibernasyona yattıktan sonra ulaşırlar.

Gliridae familyası, 3 alt familya, 10 cinsi içeren 34 türden oluşmuştur. Bilimsel sınıflandırılması aşağıda gösterildiği gibidir (Wilson and Reeder 2005):

Subordo: Sciuromorpha

Familia: Gliridae

Subfamilia: Graphiurinae (1cins, 14 tür)

Genus: *Graphiurus*

Species: *Graphiurus angolensis*

Species: *Graphiurus christyi*

Species: *Graphiurus crassicaudatus*

Species: *Graphiurus johnstoni*

Species: *Graphiurus kelleni*

Species: *Graphiurus lorraineus*

Species: *Graphiurus microtis*

Species: *Graphiurus monardi*

Species: *Graphiurus murinus*

Species: *Graphiurus nagtglasii*

Species: *Graphiurus ocularis*

Species: *Graphiurus platyops*

Species: *Graphiurus rupicola*

Species: *Graphiurus surdus*

Subfamilia: Leithiinae (5 cins, 11 tür)

Genus: *Muscardinus*

Species: *Muscardinus avellanarius*

Genus: *Dryomys*

Species: *Dryomys laniger*

Species: *Dryomys niethammeri*

Species: *Dryomys nitedula*

Genus: *Eliomys*

Species: *Eliomys melanurus*

Species: *Eliomys munbyanus*

Species: *Eliomys quercinus*

Genus: *Myomimus*

Species: *Myomimus personatus*

Species: *Myomimus roachi*

Species: *Myomimus setzeri*

Genus: *Selevinia*

Species: *Selevinia betpakdalaensis*

Subfamilia: Glirinae (2 cins, 2tür)

Genus: *Glirulus*

Species: *Glirulus japonicus*

Genus: *Glis*

Species: *Glis glis*

2.3 Species: *Glis glis* (Linnaeus, 1766) (Yediuyur)

En büyük uyur türüdür. Boyları 12-21 cm, kuyrukları 10-19 cm.; ağırlıkları 70-280 gr.'dır. Sırtı ve yanları grimsi kahverengiden kül rengine kadar metalik renkte; çok defa sarımsı tondadır. Kuyrukları uzun ve saçak şeklinde kılıdır. Gözlerinin çevresinde koyu bir halka vardır. Ayakları kısa ve çıplaktır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *Glis glis* (www.cometobg.com/viewtext.asp?id=2, 2008)

Ormanlarda, özellikle meşeliklerde ve kayın ormanlarında, parklarda, meyve bahçelerinde ve üzüm bağlarında yaşarlar; 2000 m.'ye kadar çıkabilirler (Şekil 2.2). Gececildirler. Toplu olarak yaşarlar; bulundukları yerlere çok bağlıdır. İyi tırmanır ve uzun mesafelere sıçrayabilirler. Birçok birey bir arada bulunur. Eylül-Ekim ayından Nisan-Mayıs ayına kadar bizzat kazdıkları toprak oyuklarında, kaya yarıklarında, ağaç kovuklarında ve binalarda kış uykusuna (Eylül-Mayıs aylarında) yatarlar. Kış uykusu için vücutlarında yağ biriktirirler. Bu sırada vücutları iki misli ağırlaşır. Yaz barınakları, genellikle ağaçların oyuklarında ve kuş yuvalarındadır. Yapay yuvalara, ancak doğal olarak barınacak yer olmadığı zaman yerleşirler. Meyveleri, tohumları, kabukları,

tomurcukları yerler ve ilave olarak bazen hayvansal besinleri alırlar. Gebelikleri 30 gün sürer. Hazirandan Eylüle kadar 3–10 kadar, tüysüz ve gözleri kapalı yavru meydana getirirler. Yavruların gözleri 21 gün sonra açılır ve bir ay sonra bağımsız olarak hareket ederler; 9 yıl kadar yaşarlar. Kapalı yerlerde beslenenler kendilerine özgü sesler çıkarırlar ve sıkıştırılınca ısırırlar. *Eliomys* türleri, siyah yüz bandına sahip olmalarıyla ve kuyruklarının üstünün siyah olmasıyla; sincaplar ise daha büyük ve başlarının daha iri olmalarıyla bu türden ayrılırlar (Demirsoy 1998).



Şekil 2.2 Istranca Ormanı'nda (Kırklareli) fındık ağacında yakalanmış bir *G. glis* örneği (Çolak vd. 2006)

G. glis'in 25 sinonimi olup aşağıdaki şekildedir (Thomas 1906, Ellerman 1941, Corbet 1978c):

abrutii Altobello, 1924

argenteus Zimmermann, 1953

avellanus (Owen, 1840)

caspicus Satunin, 1906

caspius (Satunin, 1905)
esculentus Blumenbach, 1779
germanicus Violani and Zava, 1995
giglis (Cuvier, 1832)
insularis Barrett-Hamilton, 1899
intermedius Altobello, 1920
italicus Barrett-Hamilton, 1898
martinoi Miri?, 1960
melonii Thomas, 1907
minutus Martino, 1930
orientalis (Nehring, 1903)
persicus (Erxleben, 1777)
petruccii Goodwin, 1939
pindicus Ondrias, 1966
postus Montagu, 1923
pyrenacius Cabrera, 1908
spoliatus Thomas, 1906
subalpinus Burg, 1920
tschetshenicus Satunin, 1920
vagneri Martino and Martino, 1941
vulgaris Oken, 1816

Avrupa, Türkiye'nin ve İran'ın kuzeyi, Kafkaslar, Türkmenistan'ın güneybatısı ve Rusya Federasyonu'nda yayılış göstermektedir (Şekil 2.3, Wilson and Reeder 2005).

G. glis'in Türkiye'de iki alt türü bulunmaktadır. Anadolu'da yaşayan alt türü olan *G. glis orientalis* (Nehring, 1903) Şile'nin Alemdağ ilçesinden, Trakya'da yaşayan alt türü olan *G. glis pindicus* Ondrias, 1966 Trakya'dan tanımlanmıştır. Marmara Bölgesi ve Kuzey Anadolu'da yaprak döken ormanlarda yayılış göstermektedir (Ognev 1947, Osborn 1964, Corbet 1978c, Kock 1990, Doğramacı ve Tez 1991, Kurtonur 1992). Ayrıca Thomas, 1906 *Glis glis spoliatus* alttürünü Trabzon'dan tanımlamıştır.



Şekil 2.3 *G. glis*'in yeryüzündeki dağılımı
(Kırmızı taralı alanlar yayılış alanlarını göstermektedir,
<http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/ema/>, 2008)

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2.4.1 PCR nedir?

PCR, genellikle dizisi bilinen DNA molekülünün iki bölgesi arasında uzanan spesifik bir bölgenin amplifikasyonuna izin veren invitro tekniktir. DNA'nın PCR amplifikasyonu amplimer olarak da bilinen oligonükleotit primerler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu primerler kısa, kalıp DNA molekülüyle komplementer olan tek iplikli DNA molekülleridir. Primerler, uygun reaksiyon koşulları altında, deoksिनükleotit trifosfatlar (dNTPs) varlığında, denature edilmiş tek iplikli DNA üzerinde uzanırlar ve DNA polimeraz aracılığıyla yeni DNA iplikleri sentezlenmesi sağlanır. Sentez sonunda elde edilen ürünler denature edilmiş DNA ipliğiyle komplementerdir. Bu aşamada yeni sentezlenmiş olan ipliklerden çift iplikli DNA molekülü meydana gelir. İplik sentezi, çift iplikli DNA'nın sıcaklık aracılığıyla denaturasyonu, karışma primerlerin bağlanması (annealing) ve enzim reaksiyonu için uygun sıcaklıkta DNA polimeraz ile primer uzamasıyla (extension) tekrarlanır. İplik sentezinin her bir tekrarı bir amplifikasyon döngüsünü oluşturur. Yeni sentezlenmiş her bir DNA molekülü, takip eden amplifikasyon döngüsü için kalıp DNA molekülü olarak iş görür ve bu sayede döngü ilerledikçe spesifik bir şekilde hedef DNA dizisi çoğaltılmış olur. DNA polimeraz yeni DNA ipliğinin sentezini tamamlayana kadar ya da bir sonraki döngünün başlamasıyla sentez kesilinceye kadar yeni DNA molekülünün sentezine devam eder. Hedef dizinin sentezlenmesi eksponansiyel olarak artar. Bu nedenle, amplifikasyon, hedef dizinin final kopya sayısı $(2^n - 2n)x$ formülüyle ifade edilir. Burada;

n: Döngü sayısını,

2n: 1. döngüden sonra elde edilen ilk ürünler ve 2. döngüden sonra elde edilen ikinci ürünleri

x: orijinal dizinin kopya sayısını ifade etmektedir.

Bütün imkanlar dahilinde her bir döngüde %100 verim sağlandığı varsayıldığında 20 döngüden sonra hedef DNA molekülünün 2^{20} katı amplifikasyon ürünü oluşacaktır. PCR sonunda, oligonükleotit primer dizilerini içeren hedef dizinin ürünleri (amplikon

olarak da bilinir) elde edilir. Son derece verimli olmasına rağmen, hedef dizinin eksponansiyel seviyedeki amplifikasyonu limitsiz bir yol değildir. Her bir döngüde yöntemin %100 verimli olmasını engelleyen birçok faktör vardır. Bu faktörlerin etkileri PCR'ın daha sonraki döngülerinde daha da belirginleşir. 25- 30 döngü sonrasında ki bu 10^6 kat amplifikasyona eşdeğerdir, ürün fazlalığından dolayı enzim miktarı sınırlandırılmış olur. Enzimin termal denaturasyonu da enzim aktivitesini sınırlandırır. PCR'daki uyuşmazlıkları en aza indirmek ve döngünün %100 verime ulaşması çok önemlidir (Newton and Graham 1994).

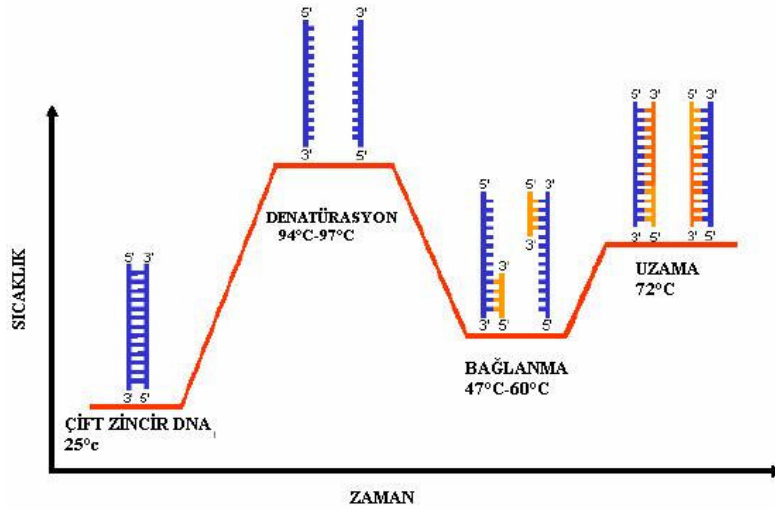
Tipik bir PCR reaksiyonunun temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılacak DNA, uygun tampon çözeltisi, termostabil DNA polimeraz, deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTPs), $MgCl_2$ ve primerlerden oluşmaktadır. PCR için gerekli olan çeşitli ayıraçlar (reagent) ve donanım birçok ticari firmadan temin edilebilir. Kalıp DNA molekülü, araştırmacılar veya klinisyenler tarafından sağlanabildiği gibi ticari yollarla genomik DNA'lar, genomik kütüphaneler, cDNA kütüphaneleri ve RNA'lardan temin edilebilir. Oligonükleotit primerler çoğu laboratuvarında rutin olarak sentezlenebildiği gibi ticari olarak da satın alınabilir. Tamponlar, $MgCl_2$ ve dNTP'ler gibi diğer PCR bileşenleri araştırmacılar tarafından hazırlanabildiği gibi firmalardan da temin edilebilir. Sıcaklığa dayanabilirlik aralığı geniş olan DNA polimerazları birçok firmadan temin etmek mümkündür (Newton and Graham 1994).

PCR, DNA sekansındaki spesifik bazların tespit edilmesinde yeni yollar bulmak için büyük çaba harcayan Karry Mullis tarafından 1985'te keşfedilmiştir. PCR'ı keşfetmesinden ötürü Dr. Mullis'e 1993 yılında Kimya dalında Nobel ödülü verilmiştir. PCR amplifikasyonunun orijinal protokollerinde oligonükleotit uzamasını katalizlemek için *E. coli* DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti kullanılmıştır. Ancak bu enzim PCR'ın denaturasyon basamağı boyunca termal olarak inaktif durumda olduğundan araştırmacılar amplifikasyonun her döngüsünde taze enzim çözeltisini eklemek zorunda kalmıştır. Bu durum özellikle bu tekniği otomatize hale getirmedeki teşebbüslerde ciddi bir sınırlandırmaya neden olmuştur. Klenow enziminin kullanılması kısa fragmentli DNA dizilerinin (<200bp) amplifikasyonunda iyi sonuçlar verirken daha büyük ampikonlar için iyi sonuçlar vermemektedir. Çoğunlukla verimi düşük olup elde edilen

amplikonlar boyut bakımından heterojenite göstermiştir. Bu durumun büyük olasılıkla Klenow enziminin katalitik olarak aktif olması için düşük bağlanma (annealing) ve uzama (extension) sıcaklığının (37°C) gerekli olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. PCR tekniğinin erken zamanlarındaki diğer ciddi bir sınırlama ise her bir PCR döngüsü için gereken özel sıcaklıkta örneklerin su banyoları ya da ısıtma blokları arasında elle transfer edilmesi olmuştur (Newton and Graham 1994).

İki ciddi teknolojik ilerleme PCR'ı araştırma ve klinik laboratuvarlarda anahtar yöntem haline getirmiştir; termostabil DNA polimerazların kullanılması ve PCR'ın otomasyonunu sağlayan çok çeşitli basit termal cykler (termal döngücü)lerin geliştirilmesi.

Günümüzde ısı döngülü cihazlar çoğu firmadan temin edilebilmektedir. Döngü içerisindeki tüm örnek pozisyonları için tekrarlanabilir ve hatasız ısı kontrolüyle birlikte tamamen otomatik kullanımı sağlayan kullanımı kolay bilgisayar programları mevcuttur. PCR'da uygulanan ısı döngü profili Şekil 2.4'te gösterilmektedir. Başarılı bir PCR için sıcaklık döngüsü parametreleri kritik öneme sahiptir (Newton and Graham 1994).

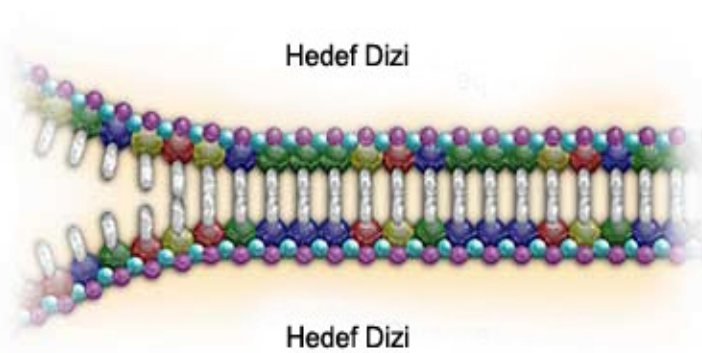


Şekil 2.4 Üç basamaklı tipik bir ısı döngü profili (www.genetiklab.com, 2008)

Tipik bir PCR döngüsü 3 aşamadan oluşmaktadır: denaturasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve primerlerin uzaması (extension). PCR’da sıcaklık ve zamana bağlı parametreler ise aşağıda gösterildiği gibidir:

- 1) Denaturasyon
- 2) Primerlerin bağlanması (annealing)
- 3) Primerlerin uzaması (extension)
- 4) Döngü sayısı
- 5) Döngünün süresi

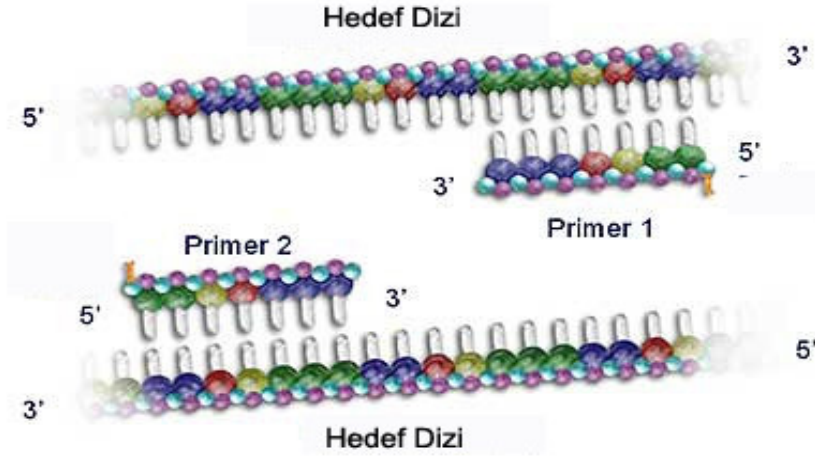
1) Denaturasyon: İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır (Şekil 2.5). Kalıp DNA’nın başlangıç denaturasyon sıcaklığı 95–100°C olup tüm genomik DNA’nın tamamen denature olması için yeterlidir. Isı düşürüldükten sonra primerler bağlanır. DNA’nın termal hasarı PCR sırasında artan bir nükleotit parçalanmasına yol açar ve hatasız bir sonuç isteniyorsa yüksek sıcaklıklardan kaçınılmalıdır. PCR boyunca denaturasyonun 92–95°C arasında 15–60 sn kadar uygulanması yeterlidir (Newton and Graham 1994, 0<http://www.genetiklab.com>, 208).



Şekil 2.5 Denaturasyon

(<http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/roche/roche7.html>, 2008)

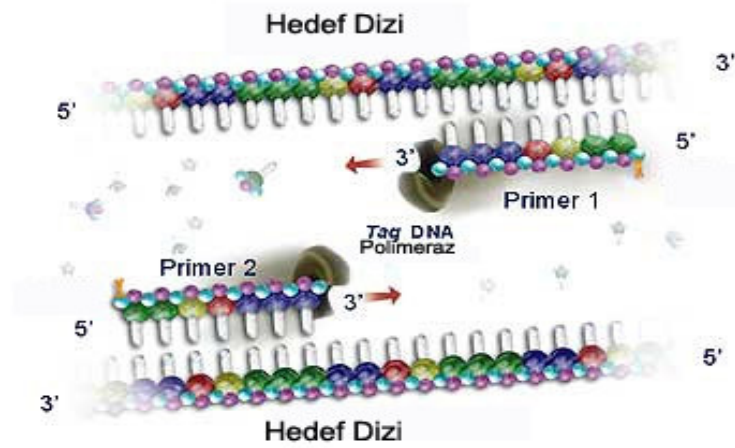
2) Primerlerin bağlanması (Annealing): Denaturasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotit primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi tamamlayıcıları olan bölgelere bağlanırlar (Şekil 2.6). Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleştirilir (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir) (Newton and Graham 1994, <http://www.genetiklab.com>, 2008).



Şekil 2.6 Bağlanma (Annealing)

(<http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/roche/roche7.html>, 2008)

3) Primer uzaması (Extension): Son aşamada ısı 72°C'ye kadar artırılarak DNA polimeraz enziminin komplementer (tamamlayıcı) DNA zincirini uzatması sağlanır (Şekil 2.7). Bu sıcaklık *Taq* DNA polimeraz için en uygun sıcaklıktır. Eğer uzun diziye sahip ampliconlar çoğaltılacaksa bağlanma basamağının süresi artırılabilir. Fakat PCR zamanlarının 2 dk'ya kadar olması genellikle yeterlidir. Tüm ürünlerin tamamen uzadığını garanti etmek amacıyla final döngüsünün uzama zamanı daha uzun tutulmaktadır (10 dk'ya kadar) (Newton and Graham 1994, <http://www.genetiklab.com>, 2008).



Şekil 2.7 Uzama (Extension)

(<http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/roche/roche7.html>, 2008)

4) Döngü sayısı: Genellikle 25–35 arasındadır. Artan döngü sayısı ile birlikte istenmeyen ürünlerin miktarlarında artış gözlemlemek, fakat istenilen üründe hiç artış gözlemleyememek olasıdır. Bundan dolayı 40 döngüden fazla olan reaksiyonları görmek alışılmış bir durum değildir.

5) Döngü süresi: Termal döngüdeki döngü süresi bir sıcaklıktan diğerine değişir ve kullanılan ekipman tipine bağlıdır.

2.4.2 Enzim seçimi

PCR için termostabil DNA polimerazların kullanılması büyük bir teknolojik ilerleme olup araştırma ve klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Termostabil enzimler kullanılmadan önce *E. coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti ve T4 DNA polimeraz enzimi gibi sıcaklığa stabil olmayan enzimler kullanılmaktaydı. Bu enzimlerin taze çözeltilerinin her bir PCR döngüsüne eklenmesi gerekiyordu. Buna karşın termostabil enzimler PCR reaksiyonunun ileri aşamalarında reaksiyona eklenmesine gerek kalmaksızın sadece amplifikasyon yolunun başında eklenmektedir.

DNA polimeraz enzimi, yeni komplementer ipliğin sentezi için orijinal ipliklerden birini kalıp olarak kullanarak deoksiribonükleotit trifosfatlardan (dNTPs) uzun polinükleotit zincirinin sentezini katalizler. Polimerizasyon daima deoksiribonükleotit trifosfatın 5' α fosfatından büyüyen/sentezi yapılan DNA ipliğinin 3' hidroksil grubuna doğru olduğu için DNA sentezi daima 5'→3' yönünde ilerler. Sentezde kullanılan dNTP'ler (deoksiribonükleotit trifosfatlar) deoksiadenozin trifosfat (dATP), deoksisitidin trifosfat (dCTP), deoksiguanozin trifosfat (dGTP) ve deoksitimidin trifosfat (dTTP)'tan oluşmaktadır.

2.4.2.1 *Taq* DNA polimeraz

Thermus aquaticus (*Taq*)'tan elde edilen bu termostabil DNA polimeraz enzimi PCR'da en yaygın olarak kullanılan enzimdir. Cetus Corporation Şirketi, *Taq* DNA polimeraz enziminin doğal ve rekombinant formunun patentini almış ve PCR yönteminden dolayı ödüllendirilmiştir. Ancak birçok firma tarafından *Taq* DNA polimerazı temin etmek mümkündür. *Taq* DNA polimeraz, 70- 80°C'de optimal uzama oranına (dakikada 35-100 nükleotit) sahiptir (Newton and Graham 1994).

Taq DNA polimeraz 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Enzim, *E.coli*'de klonlanabilir ve modifiye halinin ekspresyonu yapılabilir (Amplitaq®, Perkin-Elmer Corp.). Amplitaq®, *Taq* DNA polimerazla aynı özelliklere sahiptir. Ancak *E. coli*'de (*E. coli*, Amplitaq®'ın ekspresyonu ve üretilmesi için kullanılmaktadır) bulunan homolog DNA sekanslarını kapsayan bakteriyel hedeflerin PCR'ı yapılabileceğinden dolayı Amplitaq® tercih edilmemektedir. Ayrıca Amplitaq®'ın N ucundan 289 aminoasitlik kısmının delesyona uğramış modifiye versiyonu (Stoffel fragment) bulunmaktadır (Newton and Graham 1994).

2.4.2.2 VentTM DNA polimeraz

VentTM DNA polimeraz ilk defa *Thermococcus litoralis* adı verilen 98°C'nin üstündeki okyanus katmanlarında yaşayan termofilik bir arkebakteriden izole edilmiştir. Enzim 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (Newton and Graham 1994).

2.4.2.3 Pfu DNA polimeraz

Bu polimeraz denizlerde yaşayan hipertermofilik bir arkebakteri olan *Pyrococcus furiosus* (Pfu)'den izole edilmiştir. 3'→5' proofreading (okuduğu hataları düzeltme) ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (Newton and Graham 1994).

2.4.2.4 Tth DNA polimeraz

Thermus thermophilus (Tth)'dan beş DNA polimeraz izole edilmiştir ve bunlardan ikisinin PCR için verimli olduğu bulunmuştur. Rekombinant Tth DNA polimeraz, *T. thermophilus*'taki DNA polimeraz geninin modifiye bir formunun *E. coli*'de ekspresyonunun yapılmasıyla elde edilen termostabil bir polimerazdır. 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi vardır (Newton and Graham 1994).

2.4.2.5 UITmaTM DNA polimeraz

UITmaTM DNA polimeraz, *Thermotoga maritima* DNA polimeraz geninin modifiye edilmiş rekombinant formundan elde edilen bir enzimdir. *T. maritima* (Tma), hipertermofilik, Gr⁻ öbakteridir ve ilk defa İtalya'nın jeotermal deniz katmanlarından izole edilmiştir. Tma, doğal olarak 90°C'nin üstündeki sıcaklıklarda yaşar. Bu polimeraz enzimi 3'→5' ekzonükleaz proofreading aktivitesine sahiptir (Newton and Graham 1994).

2.5 Diğer PCR Bileşenleri

2.5.1 Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTPs)

Yüksek saflıktaki dNTP'ler her bir nükleotit için ayrı ayrı stok solusyonlar halinde ya da 4 nükleotit karışımı olacak şekilde birkaç firmadan temin edilebilir. Günümüzde çoğu stok solusyonlar NaOH ile pH = 7,5'e ayarlanmış durumdadır dNTP'lerin en uygun konsantrasyonu ,

1. MgCl₂ konsantrasyonuna,
2. Reaksiyon süresine,
3. Primer konsantrasyonuna,
4. Çoğalan ürünlerin uzunluğuna,
5. Döngü sayısına bağlıdır.

PCR'ın optimizasyonu için en iyi dNTP konsantrasyonunun önceden aşağı yukarı belirlenmesi gerekir (Newton and Graham 1994).

2.5.2 Tamponlar ve MgCl₂

PCR için birkaç tampon bulunmaktadır. *Taq* DNA polimeraz ile en yaygın olarak kullanılan tamponun 10 kat konsantre formu aşağıda adı geçen komponentleri içermektedir ve bu maddeler kullanılmadan önce 1:10 (V/ V) oranında seyreltilmelidir:

- 100 mM Tris- HCl, pH= 8,3 (oda sıcaklığında)
- 500 mM KCl
- 15 mM MgCl₂
- % 0,1 (w/v) jelatin

Diğer termostabil polimerazlarla kullanılan tampon içerikleri farklı olabilir, ancak genellikle çoğu firma söz konusu enzimlerin kullanımı için 10x tampon sağlamaktadır. Final reaksiyon karışımında MgCl₂ konsantrasyonu değişiklik gösterebilir; uygun

MgCl₂ konsantrasyonu aralığı genellikle 0,5- 5,0 mM'dir. dNTP bağlanması için gerekli olan Mg⁺² iyonları dNTP'lerle çözünebilir bir form oluşturur. Ayrıca Mg⁺² iyonları polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın erime sıcaklığı ile primer/ örnek etkileşimlerini artırır. MgCl₂ konsantrasyonu PCR'ın spesifikliğı ve verimi üzerinde önemli rol oynar. Genellikle 1,0- 1,5 mM değerindeki MgCl₂ konsantrasyonları en uygun olanlardır, fakat bazı durumlarda farklı miktarlardaki Mg⁺² konsantrasyonunun denenmesi gerekebilir. Genellikle yetersiz Mg⁺² konsantrasyonu ürün miktarında düşüklüğe neden olabilir ve spesifik olmayan ürünlerin birikimiyle sonuçlanabilir (Newton and Graham 1994).

2.5.3 Kalıp DNA

Kalıp DNA genellikle araştırmacılar ve klinisyenler tarafından sağlanmaktadır. Ancak fazla miktarda genomik DNA, genomik kütüphaneler (lambda, kosmid ya da YAC vektörleri) ve cDNA kütüphanelerinden ticari yollarla elde edilebilir.

2.6 PCR İnhibitörleri ve Aktivatörleri (Enhancerler)

PCR, çok farklı maddelerle inhibe ya da aktive edilebilir. PCR inhibisyonuna pek çok madde neden olabilir. Burada sadece PCR çalışmalarında sıklıkla karşılaşılanlar üzerine odaklanılmıştır. Bu faktörler biyolojik örneklerin, DNA'yı ekstrakte etmede kullanılan metotların ve ayıraçların doğasından kaynaklanabilir. PCR için hayvan dokularından vücut sıvılarına, bakteriyel örneklerden adli, arkeolojik materyallere ve bitki dokularına kadar çok farklı tipte biyolojik örnekler kullanılmaktadır. İnsan DNA'sı tipik olarak periferik kan hücrelerinden, ürik, fekal örneklerden, hücre sürüntülerinden (smear), saç köklerinden, semenden, serebrospinal sıvıdan, biyopsi materyalinden, amniyotik sıvıdan, plasenta ve koryonik villuslardan elde edilmektedir. Bu kaynaklara ilaveten DNA bazı hayvanlarda kuyruk kısımlarından ve kuşlarda tüy köklerinden ekstrakte edilebilir. Bunların çoğu tespit edilmemiş inhibitör maddeler içermektedir ve PCR inhibisyonunun oluşmaması için gerekli olan kontroller yapılmalıdır (Newton and Graham 1994).

DNA ekstraksiyon metotları farklı biyolojik örnek grupları için oldukça farklı olabilir ve bu durum ekstraksiyon prosedüründe farklı inhibitör ajanların üstesinden gelmede zorluklara neden olabilir. Farklı kaynaklardan DNA 'nın ekstraksiyonunda rutin olarak hücre lizisi ve denaturasyonu için deterjanlar kullanılır. Sıklıkla noniyonik deterjanlar (Triton X100, Tween 20, Nonidet P40) kullanılır ve bu deterjanların %5'e kadar olan konsantrasyonları genellikle PCR'ı inhibe etmez. Diğer yönden, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik deterjanların sadece oldukça düşük konsantrasyonları tolere edilebilir. Bu nedenle PCR'dan önce fenol ekstraksiyonu ve DNA'nın etanol presipitasyonu ile SDS uzaklaştırılmalıdır. SDS'in düşük konsantrasyonlarının (0,01 gibi) inhibitör etkileri mevcut noniyonik deterjanların kullanılmasıyla önlenabilir (Newton and Graham 1994).

Çoğu deterjan ekstraksiyon prosedürü proteinaz K varlığında uygulanır. *Taq* DNA polimeraz, proteaz kesimlemesine duyarlıdır ve bu nedenle proteinaz K ortamdan uzaklaştırılmalı ya da inaktive edilmelidir. 95°C'deki termal denaturasyon bunu başarmak için yeterli olmaktadır. Genellikle fenol ekstraksiyonu ile sıcaklık muamelesi de proteinaz K'yı denature etmek için yeterlidir (Newton and Graham 1994).

PCR'ın verimliliğini ve spesifikliğini artırmak için reaksiyona bazı maddeler eklendiği kaydedilmiştir (Dimetilsülfoksit, formamid, tetrametil amonyum bromid, Tween® 20 gibi). Ancak olası pek çok açıklama ileri sürülmesine rağmen bu maddelerin reaksiyondaki rolü belirlenememiştir. Bütün bu maddelerin başlıca dezavantajı tek başlarına PCR'ın başarısını garanti edememesidir (Newton and Graham 1994).

2.7 Genetik Marker (Belirteç) Nedir?

Bir bireyi ya da ona ait karakteristik bir özelliği deneysel olarak belirleyici kılan bir allel, jeldeki bir bant ya da bir özellik genetik marker olarak tanımlanabilir. Genetik markerler bir bireyin genotip ve/veya fenotipinin diğer bireylerin genotip ve/veya fenotipinden ayırt edilmesini sağlayan özelliklerini belirlerler. Morfolojik markerler, protein markerleri ve DNA markerleri genetik markerleri oluşturur.

2.7.1 Genetik marker tipleri

1) Morfolojik Markerler: Tek bir lokus tarafından kontrol edilen morfolojik özellikler, eğer bulundukları çevrede ekspresyonları tekrarlanıyorsa birer genetik marker olarak kullanılabilir. Sayılarının az oluşu yanında çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmeleri nedeniyle fazla kullanılmamaktadırlar (Yeşbek 2005).

Çoğunlukla dominant özelliktedirler; yani sadece dominant fenotipi (AA ve Aa) resesif fenotipten ayırabilirler. Heterozigot dominant fenotipi (Aa), homozigot fenotipten (AA) ayıramazlar. Avantajları analizlerinin kolay olmasıdır (Yeşbek 2005).

2) Protein Markerler: Proteinlerin ve enzimlerin (örneğin; izoenzimler, alloenzimler) elektroforez ile jelde koşması aracılığıyla elde edilirler. İzoenzim; farklı genler tarafından üretilen; ancak birbirine çok benzeyen protein formlarını ifade eder. Populasyonlar arası tanımlama yapmak, biyosistemik analizlere yardımcı olmak, türlerin filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmak, genetik çeşitlilik hakkındaki bilgileri arttırarak evrime destek sağlamak konularında yardımcı olurlar. DNA'nın üçüncü kuşak kopyası olduklarından genetik bilgilere çok yakındır. Bu yüzden protein markerlerinin kullanımı, genotipler arası farkların gösterilmesinde oldukça güçlü ve ucuza malolan tekniklerdir (Sammour 1991).

Allozim ise aynı genin farklı protein formlarını ifade etmektedir. Allozim markerleri Mendel kalıtımı ve kodominant ekspresyon gösterirler. Ayrıca allozim analizi oldukça hızlı ve ucuzdur. Ancak sadece kodlaması yapılan ve soluble proteinlerin teşhis edilebilmesi, az sayıdaki markerin kullanılmasının genomun büyük kısımlarının incelenmesinde yetersiz kalması, dokular ya da gelişim aşamaları sırasında nadiren meydana gelen farklılıklar ve deneysel metotların laboratuvarıdan laboratuvara standardize edilmesindeki zorluklar allozim analizini sınırlandırmaktadır (Lee *et al.* 2002).

3) DNA Markerleri: Farklı genotiplere ait farklı nükleotit dizilişindeki farklılığı değişik şekillerde ortaya koyan markerlerdir. DNA markerleri ile yapılan çalışmalar protein markerlere ve morfolojik özelliklere göre yapılan çalışmalardan daha kesin sonuçlara ulaşılmasını sağlar. Bunun sebebi; morfolojik özelliklerin ve protein markerlerinin çevresel faktörlerden etkilenmeleri, sayıca az oluşları ve farklı gelişim evrelerinde farklılıklar göstermeleridir. DNA markerleri ise çevre şartlarından etkilenmezler, gelişimin herhangi bir devresinde yapılabilir ve üstelik bütün genom boyunca sınırsız sayıda var olma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca DNA'yı elde etmek için az miktarda doku yeterli olmaktadır. Bu markerler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir. Türlerin taksonomik tanımlaması yapıp, filogenetik ilişkileri ortaya konabilir (Lowe *et al.* 1996). Soyağacı analizlerinde, bağlantı haritalamalarında ve seleksiyon programlarında kullanılabilir. DNA polimorfizmi, klasik morfolojik veya biyokimyasal markerlerden daha fazladır. Bu markerler kullanılarak çaprazlamaları oldukça zor olan türlerin kromozom haritalamaları yapılabilir.

Genetik analizlerde kullanabilmek için, kullanışlı özellikte olan çok sayıda teknik bulunmaktadır. İlk moleküler marker kuşağı olan RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) DNA- DNA hibridizasyon temeline dayanan, yavaş ve yüksek maliyetli bir tekniktir. DNA fragmentlerinin çoğaltılmasını sağlayan PCR yöntemine dayanan ikinci kuşak moleküler markerlerinin oluşturulması sağlanmıştır. Yaygın olarak kullanılan PCR temelli teknikler AFLP, STR (SSR), RFLP, ISSR ve RAPD'dir (Yeşbek 2005).

a) AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism): Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi de denilen bu teknik PCR ve RFLP tekniklerinin temel prensiplerine dayanır (Vos *et al.* 1995). A ve B bireylerine ait iki DNA parçasının arasındaki herhangi bir farklılık bu teknik ile belirlenebilir.

b) STR (Short Tandem Repeat): Kısa dizi tekrarları SSR (Simple Strand Repeat: basit dizi tekrarları) ya da mikrosatellitler olarak da adlandırılmaktadır. Mantar, bitki, hayvan ve insan genomu gibi ökaryot genomlar boyunca ardışık olarak tekrarlanan, 2-6

nükleotitlik, yüksek varyasyona sahip DNA dizileridir. Mikrosatellitler; tekli, üçlü ve dördümlü tekrar grupları içermektedir. Bu gruplar (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. STR'ler haritalama ve genotiplemede çok iyi çalışmıştır. Kodominant olmaları ve PCR kolaylığına sahip olmaları da kullanım oranlarını artırmaktadır (Yeşbek 2005).

c) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi olarak bilinir. Bir türün iki veya daha fazla bireyine ait genomik DNA'sının, spesifik restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek oluşturulmuş DNA parçalarının uzunlukları arasındaki değişkenliklerdir (Yeşbek 2005). RFLP'ler filogenetik ağaçların kurulmasında, özellikle bağlantı kurmada ve genomik haritaları geliştirmede yaygın olarak kullanılmıştır (Arslan 2004).

d) ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat Amplification): Basit ara dizi tekrarları olarak da bilinir. ISSR marker sistemi mikrosatellit lokusları arasındaki polimorfizmin belirlenmesini sağlar (Li-Wang *et al.* 2008).

e) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak da bilinir. RAPD yöntemi, tek, kısa ve rastgele oligonükleotid primerler kullanarak DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem duyarlı, hızlı ve çok sayıda örneğe uygulanabilen bir tekniktir. Bu primerler genetik işaretleyici olarak ve özgün nükleotid dizi bilgilerine gerek duymadan polimorfizmi belirlemede kullanılabilir (Babaoğlu vd. 2004).

2.8 RAPD- PCR

RAPD- PCR; rastgele nükleotit dizisine sahip kısa (10 nükleotit) oligonükleotit primerleri ve PCR prosedürleri kullanılarak herhangi bir DNA parçasını çoğaltan yöntemdir. Aslında izoenzim ve RFLP analizlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. RAPD, RFLP markerlerine değerli bir alternatif sunar (Waugh and Powell 1992).

RAPD polimorfizmi, hedef DNA dizisindeki primer bağlanma bölgesinin değişmesiyle ortaya çıkar. Tek bir primer kullanılır ve bu primerler ile uygun termostabil DNA polimerazın varlığında sentez gerçekleştirilir. PCR ürünleri agaroz jel ya da poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılır (Yeşbek 2005).

Bu yöntemin avantajları arasında, çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az iş gücü gerektirmesi ve az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması gelmektedir. RAPD markerleri dominant markerlerdir. Bireyler arasındaki polimorfizm belirli bantların varlığı ya da yokluğuna bakılarak tespit edilir. Polimorfizm oranı yüksektir. Otomasyona uygundur. Güvenirliliğinin ve tekrarlanabilirliğinin sınırlı olması ve dominant olarak kalıtılan bir marker olması dezavantajlarıdır (Yeşbek 2005).

RAPD- PCR populasyon içi polimorfizm ve ayrılma, populasyon tarihi ve coğrafyası, allopatrik tür ve populasyon sınırlarındaki hibridizasyon, yabani ve evcil formlar arasındaki ilişkilerin araştırılması çalışmalarında, tür, alttür ve populasyonların izole olmasına neden olan kriterlerin ve bu kriterlerle ilgili problemlerin belirlenmesinde (Grechko 2002), polimorfizmin elde edilmesiyle genetik haritaların ve parmak izinin yapılmasında (Newton and Graham 1994) kullanılabilir. Bu teknikle, genom boyunca dağılan birbirinden bağımsız birçok lokus incelenebilir. Çoğu durumda RAPD markerleri birbiriyle yakın ilişkili türlerdeki gizli genetik varyasyonu tespit edebilmektedir (Spiridonova *et al.* 2005).

Ayrıca populasyon genetiği ve filogenilerin inşa edilmesinde kullanılabilir. Ama filogenetik bağlamda kullanılması geniş ölçüde kabul görmemektedir. Bazı yazarlar (Borowsky *et al.* 1995) RAPD markerlerinin yeterli miktarda filogenetik bilgiyi içerdiğini, ancak bu markerlerden filogeni bilgisinin çıkarılmasının kolay olmadığını ve elde edilen verilerin yorumlanmasının çoğu durumda zor olduğunu ileri sürmektedir. Bundan başka Heun and Helentjaris (1993) RAPD markerlerindeki mevcut varyasyonların tanıma bölgesindeki nokta mutasyonlardan değil de daha çok PCR ürünleri ve primerler arasındaki rekabetten kaynaklanabileceğini ileri sürmektedir (Landry and Lapointe 1996).

Grechko (2002) ise, RAPD markerleriyle elde edilen sonuçların doğruluğundan şüphe duyulmasını artifakt bantların varlığına bağlamıştır. Bu nedenle RAPD verilerinin değerlendirilmesinde dikkatli düşünmenin gerekli olduğunu gösteren bakış açıları aşağıda yer almaktadır:

- 1) Aynı büyüklükteki fragmentler farklı lokuslardan transkribe olmuş olabilir ya da tam tersine farklı büyüklükteki fragmentler aslında homolog lokuslara işaret ediyor olabilir.
- 2) Ortolog fragmentler hibridizasyon ile belirlenebilir ancak pek çok çalışmada doğrulanamaz. Küçük agaroz jellerdeki zayıf bant çözünürlüğü bir banttaki ortolog olmayan fragmentlerin lokasyonuna karşılık gelebilir.
- 3) Primer ya da PCR ürünündeki sekonder yapı konformasyonu nedeniyle artifakt bantların görülmesi engellenemez. Bu durum farklı dizilere sahip eşit büyüklükteki fragmentleri içeren bir bandın gözlemlenmesiyle doğrulanmıştır. Bazı araştırmacılar bunun nedenini ilk olarak artifakt bantların görülmesinin DNA ve primerin özelliklerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu nedenle uygun metotlar kullanılarak kontrol edilmelidir. İkinci olarak, kopyalanan DNA'nın kısmen transkribe olmuş dizisinin sekonder yapı formasyonu ve denaturasyon/renaturasyon esnasında tek DNA zincirleri arasındaki rastgele etkileşimler, bir alandaki bir primerle birlik oluşturan bölgelerin varlığı artifakt fragmentleri oluşturabilir bu nedenle deneyin tekrarlanmasıyla aynı sonuçlar elde edilemeyebilir. Uygun primerlerin seçilmesiyle deney tekrarlanabilir ve yanlış bant hesaplamalarının üstesinden gelinebilir. Ancak, diğer yönden bu prosesler olası değilse bunların sözkonusu DNA'nın spesifik özelliklerini yansıttığı düşünülür ve anlamlı karakterler olarak sayılabilir (Grechko 2002).

Grechko (2002), RAPD markerlerinin moleküler genetiğin kullanışlı bir aracı olmayı sürdürdüğünü ancak RAPD verilerinin daha dikkatli ele alınması ve yorumlanması gerektiğini ileri sürmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Omurgalı Hayvan Sistematiği laboratuvarında yürütüldü. Türkiye’deki yedi lokaliteden toplanan 40 *Glis glis*, Trakya’dan bir lokaliteye ait üç *Mus macedonicus*, bir lokaliteye ait iki *Dryomys nitedula* ve yine bir lokaliteye ait bir *Dryomys laniger* örneği bu çalışmada kullanıldı. Bu canlı örnekler laboratuvarında uygun koşullarda tahnit edilip kas, karaciğer, kalp, böbrek dokuları alındı. Örnekler ait dokular -86°C’de, postlar ise Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Müzesi’nde muhafaza altına alındı. Çalışmada *G. glis*’le aynı familyada yer alan *D. nitedula* ve *D. laniger* ile Muridae familyasından *M. macedonicus* dış grup olarak kullanıldı. Çeşitli bölgelerden toplanan *Glis glis* örnekleri Çizelge 3.1’de, kullanılan dış gruplar Çizelge 3.2’de, örneklerin toplandığı lokaliteleri gösteren harita Şekil 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Glis glis* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler

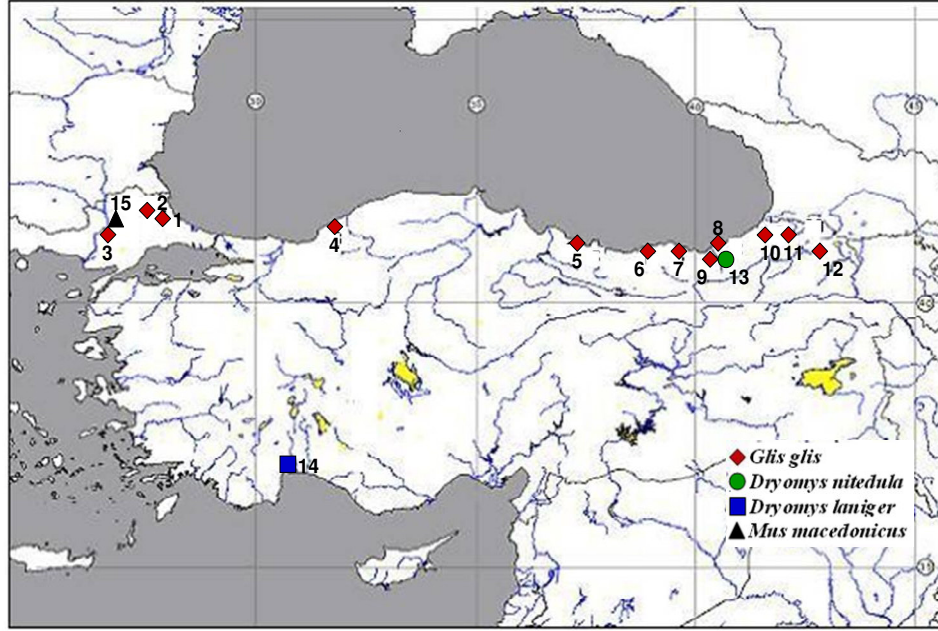
Sıra No	Kayıt No	Tür İsmi	Lokalite
1	5140	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
2	5141	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
3	5142	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
4	5143	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
5	5144	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
6	5145	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
7	5146	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
8	5147	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
9	5148	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
10	5149	<i>Glis glis</i>	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ
11	5468	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ
12	5469	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ
13	5474	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ
14	5480	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Glis glis* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler (devamı)

15	5482	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ
16	5483	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ
17	3852	<i>Glis glis</i>	Dereköy- KIRKLARELİ
18	5613	<i>Glis glis</i>	EDİRNE
19	5241	<i>Glis glis</i>	ZONGULDAK
20	5242	<i>Glis glis</i>	ZONGULDAK
21	5243	<i>Glis glis</i>	ZONGULDAK
22	5244	<i>Glis glis</i>	ZONGULDAK
23	5319	<i>Glis glis</i>	Ünye-ORDU
24	5320	<i>Glis glis</i>	Ünye-ORDU
25	5321	<i>Glis glis</i>	Ünye-ORDU
26	5351	<i>Glis glis</i>	Ünye-ORDU
27	5305	<i>Glis glis</i>	Görele-GİRESUN
28	2326	<i>Glis glis</i>	Maçka- TRABZON
29	5133	<i>Glis glis</i>	Maçka - TRABZON
30	5135	<i>Glis glis</i>	Maçka - TRABZON
31	5139	<i>Glis glis</i>	Maçka - TRABZON
32	5329	<i>Glis glis</i>	Çayeli- RİZE
33	5346	<i>Glis glis</i>	Çayeli- RİZE
34	5356	<i>Glis glis</i>	Çayeli- RİZE
35	5715	<i>Glis glis</i>	İkizdere- RİZE
36	5376	<i>Glis glis</i>	Borçka- ARTVİN
37	5428	<i>Glis glis</i>	Borçka- ARTVİN
38	5708	<i>Glis glis</i>	Şavşat- ARTVİN
39	5709	<i>Glis glis</i>	Şavşat- ARTVİN
40	5284	<i>Glis glis</i>	Posof- ARDAHAN

Çizelge 3.2 Çalışmada dış grup olarak kullanılan türlerin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler

Sıra No	Kayıt No	Tür İsmi	Bölge
1	5400	<i>Dryomys nitedula</i>	Çamlıhemşin- RİZE
2	5404	<i>Dryomys nitedula</i>	Çamlıhemşin- RİZE
3	5631	<i>Dryomys laniger</i>	Elmalı- ANTALYA
4	5460	<i>Mus macedonicus</i>	EDİRNE
5	5462	<i>Mus macedonicus</i>	EDİRNE
6	5466	<i>Mus macedonicus</i>	EDİRNE



Şekil 3.1 *Glis*, *Dryomys* ve *Mus* örneklerinin toplandığı bölgelerin harita üzerinde gösterimi

1-12: *Glis glis* (1:Istranca Ormanı/ Kırklareli, 2: Dereköy/ Kırklareli, 3: Edirne, 4: Zonguldak, 5: Ünye/ Ordu, 6: Görele/ Giresun, 7:Maçka/ Trabzon, 8: Çayeli/ Rize, 9: İkizdere/ Rize, 10: Borçka/ Artvin, 11: Şavşat/ Artvin, 12: Posof/ Ardahan), 13: *Dryomys nitedula* (Çamlıhemşin/ Rize), 14: *Dryomys laniger* (Elmalı/ Antalya), 15: *Mus macedonicus* (Edirne)

3.2 Yöntem

Eppendorf tüplere konularak -86°C’de saklanan 40 *Glis* örneğinin 39’unun böbrek ve birinin karaciğer dokusu DNA izolasyonunda kullanıldı. Tüm dokular izole edildikten sonra RAPD-PCR yöntemi ile amplifiye edilen DNA örnekleri, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu.

3.3 DNA İzolasyonu

On beş popülasyondan alınan *G. glis*, *D. nitedula*, *D. laniger* ve *M. macedonicus* örneklerinin böbrek ve karaciğer dokusundan DNA izole edildi. Bu işlemde daha önceden Doyle and Doyle (1991) ile Padmalatha and Prasad (2006)’ın DNA izolasyon metodunun kombine edilmesiyle ve uyarlanmasıyla elde edilen CTAB DNA izolasyonu kullanıldı. Yöntem aşağıda belirtildiği gibi sırasıyla uygulandı:

Küçük parçalara ayrılan doku örnekleri eppendorf tüpüne konulduktan sonra üzerine 300 µl CTAB (Kloroform, Tris-HCl, EDTA, NaCl) tamponu eklenip mümkün olduğu kadar homojen bir sıvı elde edinceye kadar tek kullanımlık havaneli ile ezildi. Homojenata sırasıyla 300 µl CTAB ve 50 µl βME (β-Merkapto etanol) eklenip eppendorf tüpü hafifçe karıştırıldı. Karışım 65°C’lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi. 500 µl C: IAA (Kloroform: izoamil alkol) (24:1) ilave edilip karışım süte benzer bir kıvama gelinceye kadar hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm’de +4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen dokuların içinde olduğu eppendorf tüpleri, aynı eğik açıda olacak şekilde buza yerleştirildi. DNA üstteki sıvı tabakada olacağından üst faz pipetle çekilerek ayrı bir eppendorf tüpüne konuldu. 500 µl -20°C’de soğutulmuş izopropanol tüplere eklendi ve yavaşça karıştırıldıktan sonra -80°C’de 30 dk bekletildi. Daha sonra 13000 rpm’de +4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alındıktan sonra kalan pellet 2 kere %70’lik, 1 kere de %100’lük etil alkol ile yıkandı. Eppendorf tüpündeki pelletler laminar flow kabinde en az 1 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA’nın üzerine 200 µl TE (Tris-EDTA) tamponu ilave edilerek DNA’nın çözünmesi sağlandı. Elde edilen DNA örnekleri -20°C’de muhafaza edildi.

İzolasyonda kullanılan çözeltiler:

CTAB Buffer

CTAB : 2 gr

Tris-HCl : 1 M pH: 8.0

EDTA : 0.5 M pH: 8.0

NaCl : 5 M

TE Buffer pH: 8.0

Tris Base çözeltisi (1M) : 1 ml

EDTA (0,5 M) : 20 µl

Tris Base : 1M pH: 8.0

EDTA : 0.5M pH: 8.0

NaCl : 5M

3.4 DNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin spektrofotometre (Agilent 2100 Bioanalyser NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ile ölçümü yapıldı. Bu ölçümden alınan DNA miktarı ve saflığı sonuçlarının tamamı Çizelge 3.3-3.4’de verilmektedir. Dokulardan izole edilen DNA miktarları 337,96 ng/µl ile 3609,34 ng/µl arasında değiştiği saptandı. DNA örnekleri çalışma boyunca -20°C’de saklandı.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *G. glis*’ten elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları

Sıra No	Kayıt No	Lokalite	ng/ µl *	260/ 280 **
1	5140	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	872,48	2,04
2	5141	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	337,96	2,12
3	5142	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	1028,31	2,05
4	5143	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	1466,39	1,93
5	5144	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	369,11	2,11
6	5145	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	888,54	2,01
7	5146	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	644,06	2,07
8	5147	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	469,00	2,10

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *G. glis*'ten elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları (devamı)

9	5148	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	909,98	1,96
10	5149	Istranca Ormanı- KIRKLARELİ	931,05	2,01
11	5468	Dereköy- KIRKLARELİ	515,21	2,04
12	5469	Dereköy- KIRKLARELİ	2364,58	2,04
13	5474	Dereköy- KIRKLARELİ	1538,37	2,03
14	5480	Dereköy- KIRKLARELİ	450,67	2,08
15	5482	Dereköy- KIRKLARELİ	905,99	2,00
16	5483	Dereköy- KIRKLARELİ	1173,90	2,02
17	3852	Dereköy- KIRKLARELİ	1329,44	1,97
18	5613	EDİRNE	2066,68	1,96
19	5241	ZONGULDAK	576,09	1,99
20	5242	ZONGULDAK	773,51	1,93
21	5243	ZONGULDAK	1027,62	1,95
22	5244	ZONGULDAK	1173,79	1,91
23	5319	Ünye-ORDU	1282,31	1,93
24	5320	Ünye-ORDU	985,17	1,97
25	5321	Ünye-ORDU	1129,38	1,89
26	5351	Ünye-ORDU	700,25	1,89
27	5305	Görece-GİRESUN	1660,83	1,96
28	2326	Maçka- TRABZON	1672,28	1,96
29	5133	Maçka - TRABZON	979,79	2,00
30	5135	Maçka- TRABZON	773,05	1,97
31	5139	Maçka - TRABZON	924,39	2,05
32	5329	Çayeli- RİZE	1112,60	1,89
33	5346	Çayeli- RİZE	1655,24	1,99
34	5356	Çayeli- RİZE	1189,46	1,98
35	5715	İkizdere- RİZE	1561,10	1,98
36	5376	Borçka- ARTVİN	2095,70	2,01
37	5428	Borçka- ARTVİN	672,17	1,96
38	5708	Şavşat- ARTVİN	3609,34	2,02
39	5709	Şavşat- ARTVİN	1255,90	1,94
40	5284	Posof- ARDAHAN	1020,63	1,92

Çizelge 3.4 Çalışmada dış grup olarak kullanılan *Dryomys nitedula*, *Dryomys laniger* ve *Mus macedonicus*'dan elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları

Sıra No	Kayıt No	Tür Adı	Lokalite	ng/ µl *	260/ 280 **
1	5400	<i>D. nitedula</i>	Çamlıhemşin- RİZE	563,38	2,02
2	5404	<i>D. nitedula</i>	Çamlıhemşin- RİZE	493,57	2,04
3	5631	<i>D. laniger</i>	Elmalı- ANTALYA	630,61	1,99
4	5460	<i>Mus</i>	EDİRNE	729,42	1,99
5	5462	<i>Mus</i>	EDİRNE	728,73	2,00
6	5466	<i>Mus</i>	EDİRNE	978,18	2,01

* : 1 µl'deki ng cinsinden DNA miktarı

** : Spektrofotometrede 260/280nm'de okutulan DNA'nın saflık derecesi

3.5 RAPD Primerleri

Çalışmada kullanılan RAPD primerleri, rastgele seçilmiş 10 bazlık primerlerdir. Araştırmada kullanılan 20 primer; OPA, OPB ve OPD serisi primerleridir (Thermo Electron). Primerler G+C içeriği %60–70 olacak şekilde seçildi. Çalışmadaki 40 örneğin tamamı aşağıdaki çizelgede baz dizileri verilen primerler ile tarandı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer	Sekans
OPA-01	5' - CAG GCC CTT C- 3'
OPA-02	5' - TGC CGA GCT G- 3'
OPA-03	5' - AGT CAG CCA C- 3'
OPA-04	5' - AAT CGG GCT G- 3'
OPA-05	5' - AGG GGT CTT G- 3'
OPA-06	5' - GTT CCC TGA C- 3'
OPA-07	5' - GAA ACG GGT G- 3'
OPA-08	5' - GTG ACG TAG G- 3'
OPB-01	5' - GTT TCG CTC C- 3'
OPB-02	5' - TGA TCC CTG G- 3'
OPB-03	5' - CAT CCC CCT G- 3'
OPB-04	5' - GGA CTG GAG T- 3'
OPB-05	5' - TGC GCC CTT C- 3'
OPB-06	5' - TGC TCT GCC C- 3'
OPD-01	5' - ACC GCG AAG G- 3'
OPD-02	5' - GGA CCC AAC C- 3'
OPD-03	5' - GTC GCC GTC A- 3'
OPD-04	5' - TCT GGT GAG G- 3'
OPD-05	5' - TGA GCG GAC A- 3'
OPD-06	5' - ACC TGA ACG G- 3'

3.6 RAPD-PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu

Bu çalışmada PCR amplifikasyonunda daha önceden Kaya and Neale (1995) (Çizelge 3.6) tarafından uygulanan PCR döngü programının, bazı değişikliklerle laboratuvar koşullarına uyarlanan şekli kullanıldı. Çalışmada kullanılan PCR döngü programı Çizelge 3.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.6 Kaya and Neale (1995) tarafından uygulanan PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	95°C	1 dakika	1
Denaturasyon	94°C	1 dakika	40
Bağlanma	37°C	1 dakika	
Uzama	72°C	2 dakika	
Son Uzama	72°C	15 dakika	

Çizelge 3.7 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	95°C	1 dakika	1
Denaturasyon	94°C	1 dakika	45
Bağlanma	36°C	2 dakika	
Uzama	72°C	2 dakika	
Son Uzama	72°C	15 dakika	1

PCR optimizasyonu için herhangi bir yöntem denenmemiş olup laboratuvarında daha önceden optimize edilmiş olan yöntem kullanıldı. Bu çalışma için daha önce optimize edilen yöntemdeki reaksiyon karışımı aşağıda belirtilen miktarlarda aynen uygulandı. Çalışmada kullanılan reaksiyon karışımı; 1µl DNA örneği; 2.5µl tampon (Fermentas, Ukrayna); 0.3µl (100 ünite) *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas, Ukrayna); 4µl deoksinükleotit trifosfat karışımı (herbir nükleotitten 200µM); 1.5µl 2mM MgCl₂; 1µl (1pmol) primer (Operon Technologies, USA) den oluşmaktadır.

3.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri 5 µl yükleme tamponuyla (%40'lık süroz, xylene cyanol FF ve Bromophenol Blue) karıştırılarak %1,7'lik agaroz jelde yürütüldü. Jeller 1X TAE (Trisma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA) tamponunda 100 Voltta 3 saat yürütüldükten sonra 5µg/ml'lik etidyum bromid solusyonu ile 30 dakika boyandı ve UV ışığı altında (KODAK Jel Görüntüleme Sistemi) görüntülendi.

3.8 Jellerin Yorumlanması

Amplifikasyon ürünleri görsel olarak değerlendirildi. Tüm bantlar değerlendirmeye alınmıştır. RAPD bantlarının büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100–3000 baz çifti arasındaki bantları içeren DNA standartı (Generuler™ 100 base pair DNA Ladder, MBI Fermentas) kullanıldı.

Çalışılan örneklerde bantlar var olma ve olmama durumuna göre değerlendirildi. Var olan her bir haploit bant için “1” rakamı, olmayan bant için ise “0” rakamı kullanıldı.

3.9 Veri Analizleri

Veri dosyaları POPGENE (Yeh *et al.* 1997)'de analiz edilecek şekilde hazırlandı.

Her populasyon için gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), Nei'nin genetik çeşitliliği (1972) (H) ve Shannon information indeksi (I) hesaplandı. Ek olarak popülasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu (H_s) ve tüm popülasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu (H_T) Hardy-Weinberg beklentilerine göre hesaplandı.

Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü (G_{ST}) Nei (1987)'ye göre hesaplandı. $N_m = 0,5(1 - G_{ST}) / G_{ST}$ formülü kullanılarak her lokus için nesil başına göçlerin ortalama sayısını ve lokuslar arasındaki ortalama değeri hesaplamak için G_{ST} tahminleri kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

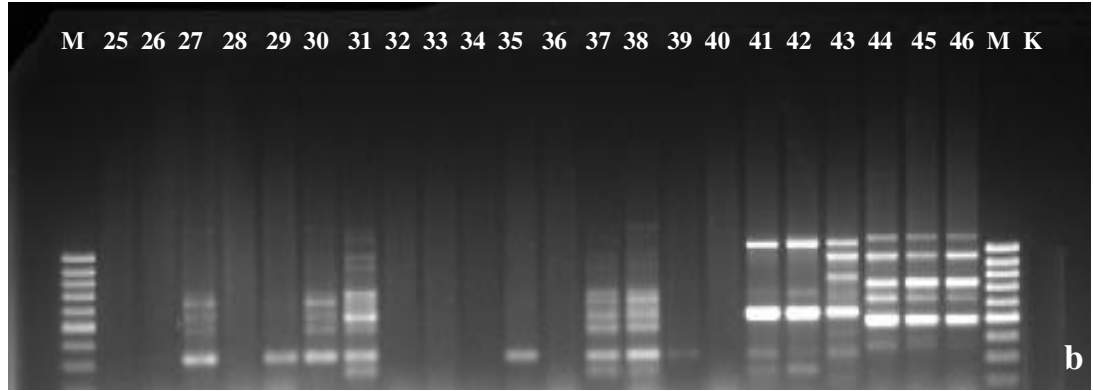
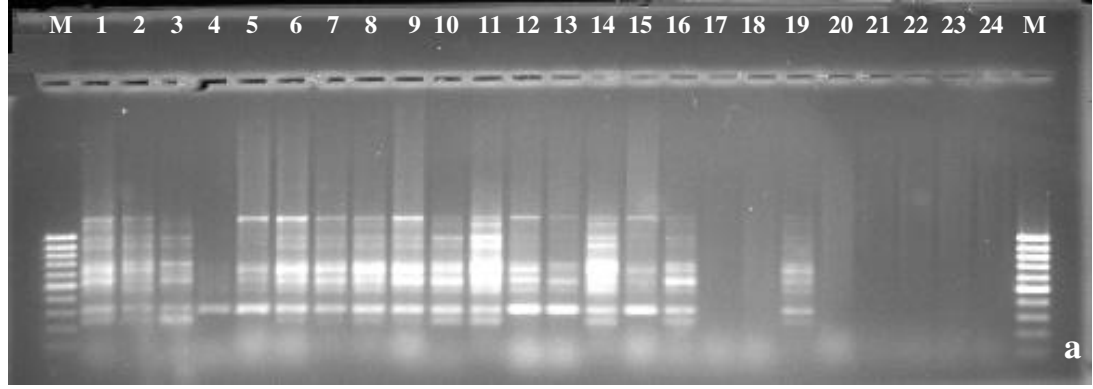
Çalışmada kullanılan 40 örnekten beşi hiçbir PCR’da sonuç vermedi. Sonuç vermeyen örneklerin laboratuvar kayıt numaraları 5613, 5244, 5321, 5329, 5284 olup, bu örneklerin agaroz jellerdeki yükleme sırasının, sırasıyla 18, 22, 25, 32 ve 40 olduğu saptandı.

PCR işleminde kullanılan. 20 RAPD primerinin 12 tanesinden tutarlı sonuçlar alındı. Denenen fakat *Glis* örneklerinde tutarlı sonuç vermeyen RAPD primerlerinin OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPB-05, OPD-01, OPD-03, OPD-05, OPD-06 olduğu görüldü. Bu 12 RAPD markerinden sonuç veren tüm örnekler için elde edilen polimorfik bant sayısı 169, sadece *Glis* örnekleri için elde edilen polimorfik bant sayısı ise 74 olarak kaydedildi. Tüm örnekler ve *Glis* örnekleri için tutarlı sonuç veren her bir primerden elde edilen polimorfik bant sayısı Çizelge 4.1’de gösterilmektedir. Tüm örnekler için polimorfik bant sayısı en düşük olarak OPB-01 ve OPD-04 primerlerinde (8 tane), en yüksek olarak ise OPB-06 primerinde (23 tane) elde edildi. Sadece *Glis* örnekleri incelendiğinde polimorfik bant sayısı en düşük olarak OPB-01 primerinde (3 tane) en yüksek ise OPA-01 ve OPD-02 primerlerinde (11 tane) elde edildi.

Çalışılan 12 primer ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1.a,b-4.12.a,b’de gösterilmektedir. Agaroz jel görüntülerinde PCR’da sonuç vermeyen örnekler açık olarak görülmekle birlikte bu örnekler değerlendirmeye alınmadı. Jel görüntülerindeki bantlar var-yok (1/0) analizi ile değerlendirildi. Değerlendirilen bantların POPGENE Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis, Version 1.31 (Yeh *et al.*1997) programıyla analizleri yapıldı.

Çizelge 4.1 Tutarlı sonuç veren her bir primerden elde edilen polimorfik bant sayısı

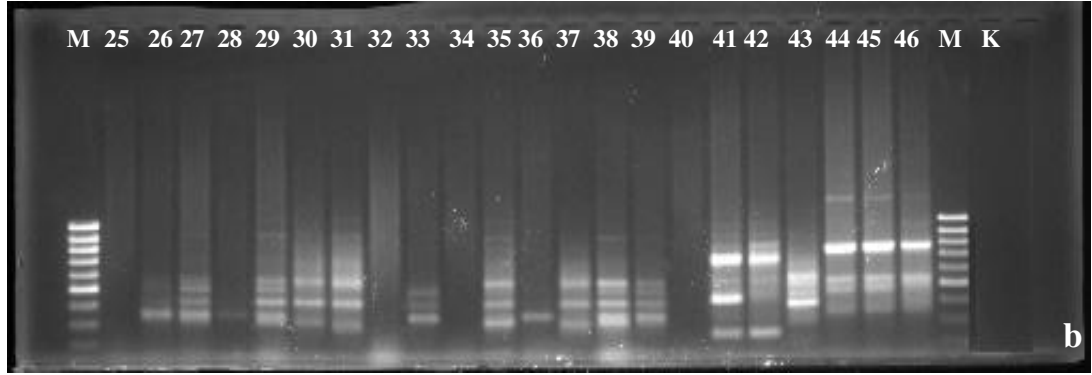
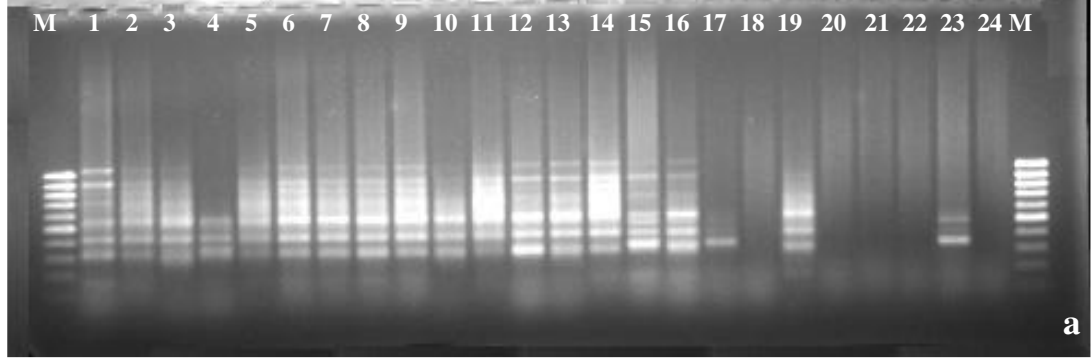
Primer	Sekans	<i>G. glis</i> örnekleri için polimorfik bantların sayısı	Tüm örnekler için polimorfik bantların sayısı
OPA-01	5'-CAG GCC CTT C- 3'	11	16
OPA-02	5'-TGC CGA GCT G- 3'	7	16
OPA-03	5'-AGT CAG CCA C-3'	8	13
OPA-04	5'-AAT CGG GCT G-3'	6	14
OPA-08	5'-GTG ACG TAG G-3'	5	9
OPB-01	5'-GTT TCG CTC C-3'	3	8
OPB-02	5'-TGA TCC CTG G-3'	9	19
OPB-03	5'-CAT CCC CCT G-3'	8	11
OPB-04	5'-GGA CTG GAG T-3'	9	13
OPB-06	5'-TGC TCT GCC C-3'	10	23
OPD-02	5'-GGA CCC AAC C-3'	11	19
OPD-04	5'-TCT GGT GAG G-3'	5	8



Şekil 4.1.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-01 (5'- CAG GCC CTT C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

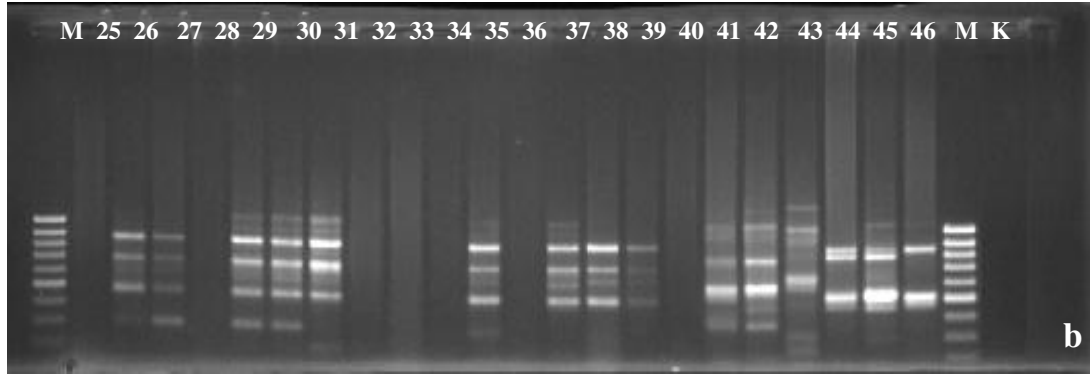
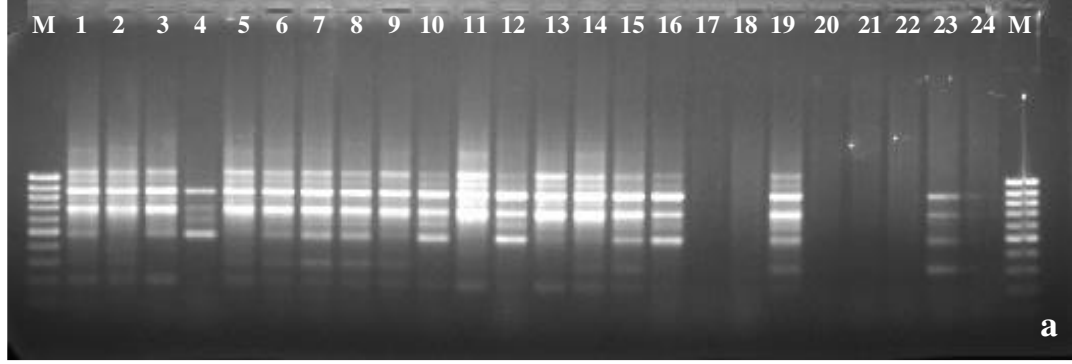
(b) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görece/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.3.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-03 (5'- AGT CAG CCA C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

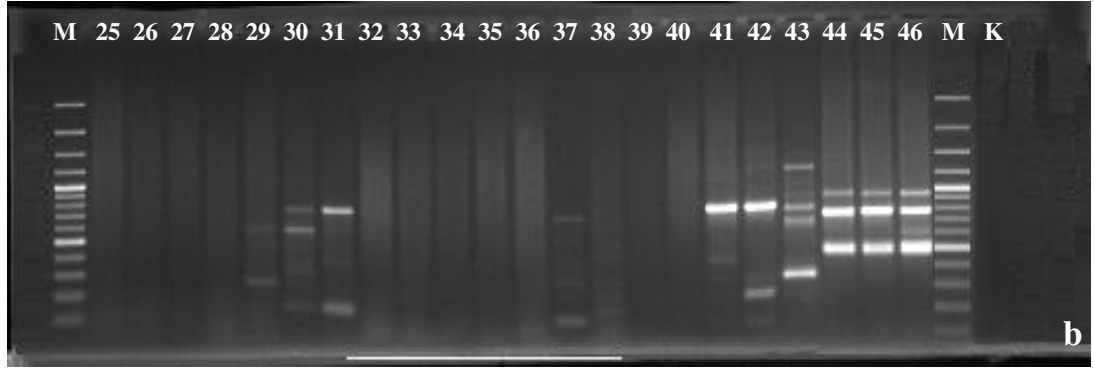
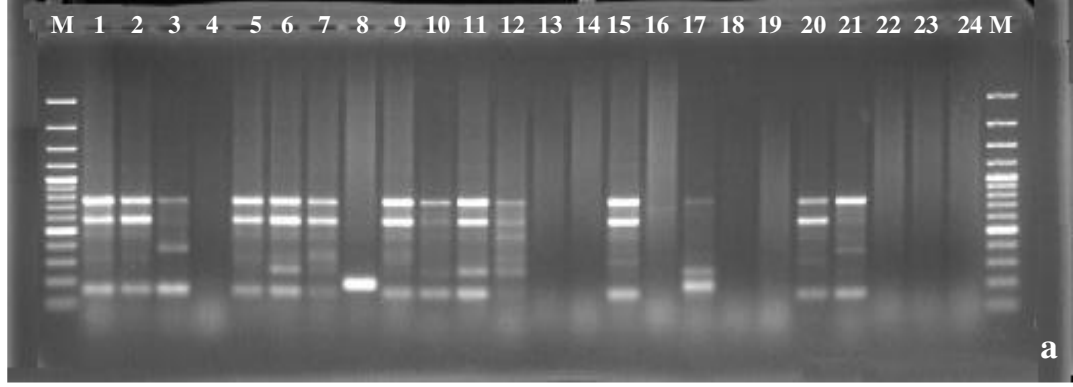
(b) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görece/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.4.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-04 (5'- AAT CGG GCT G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

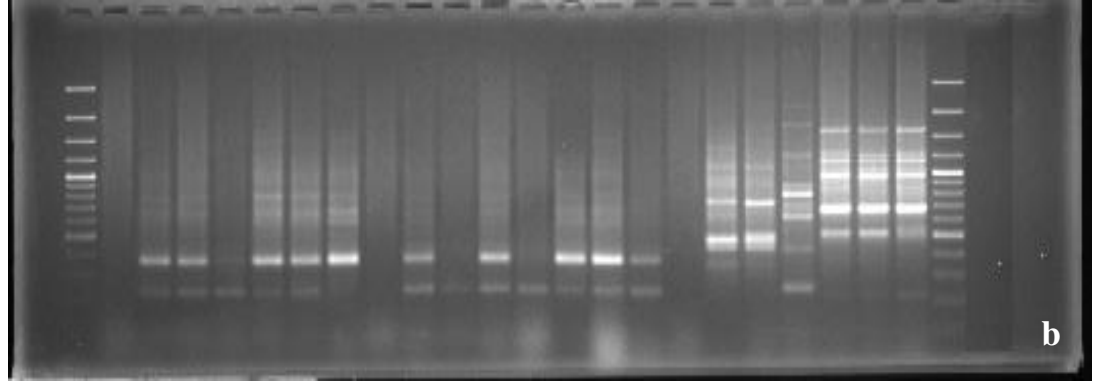
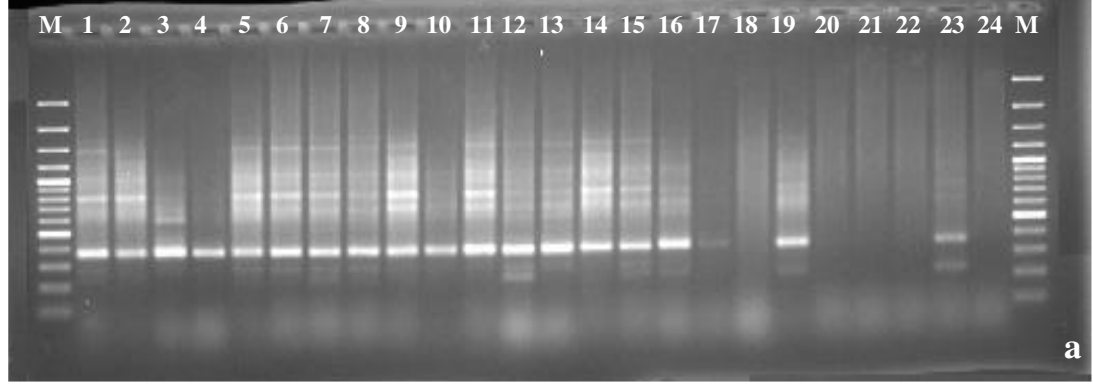
(b) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görece/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.5.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-08 (5'- GTG ACG TAG G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istanca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

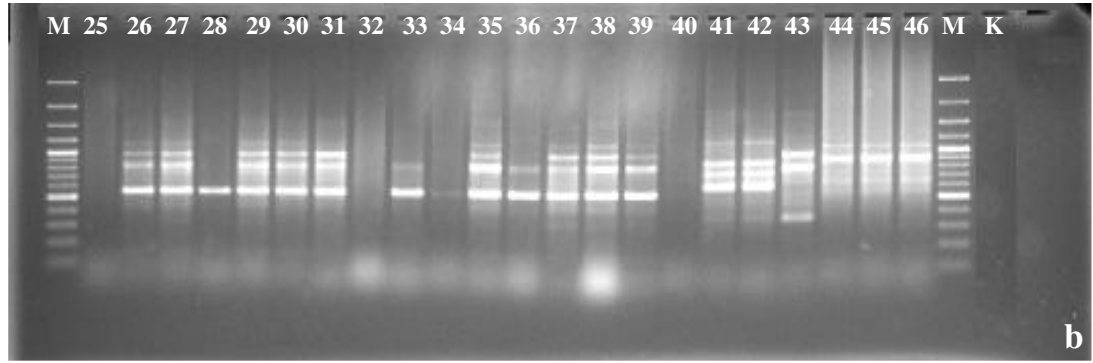
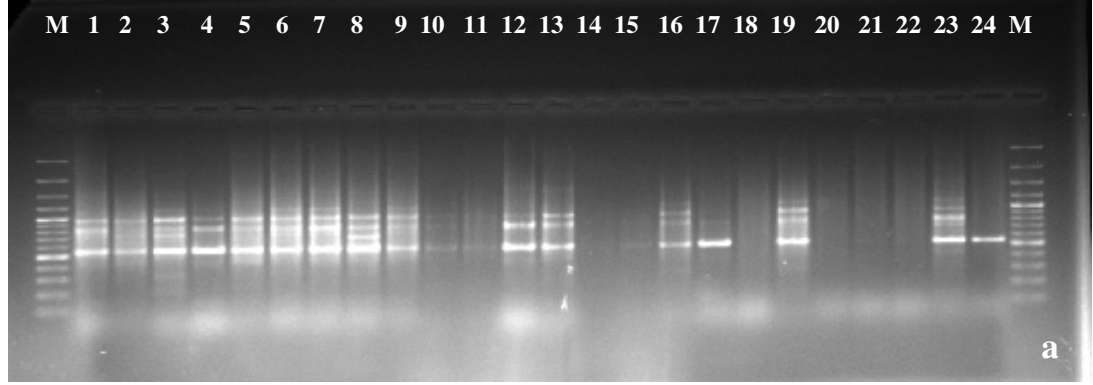
(b) M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görele/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.7.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-02 (5'- TGA TCC CTG G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

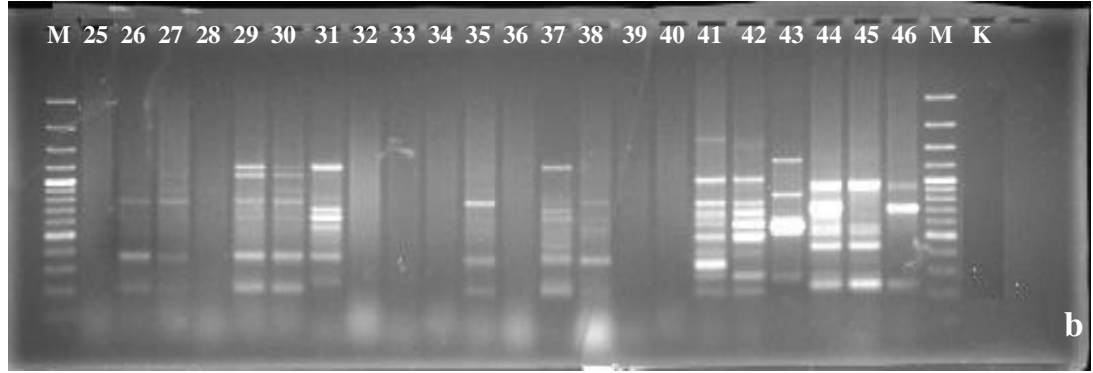
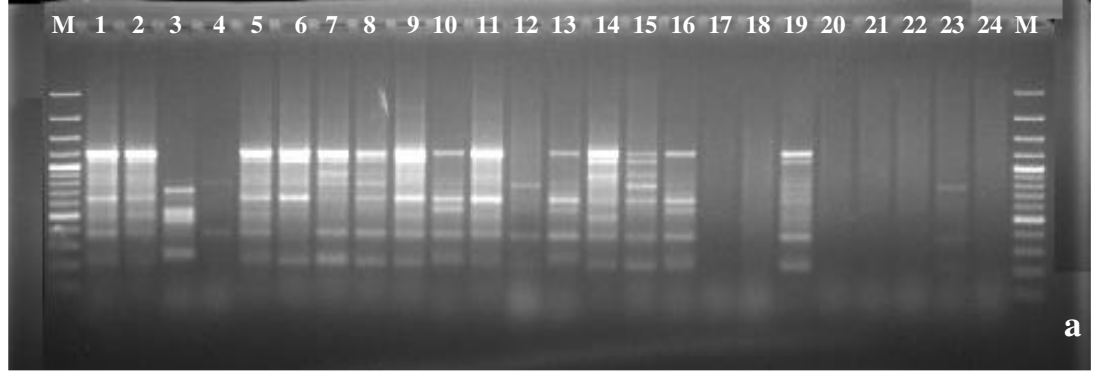
(b) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görele/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.8.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-03 (5'- CAT CCC CCT G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

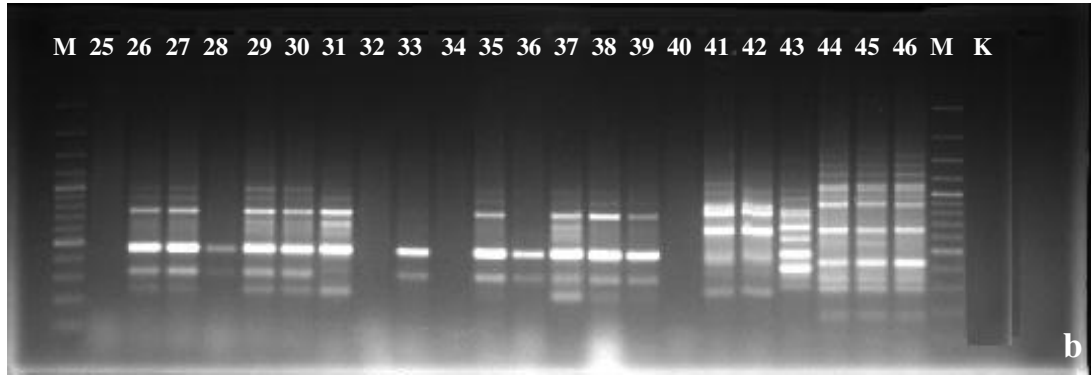
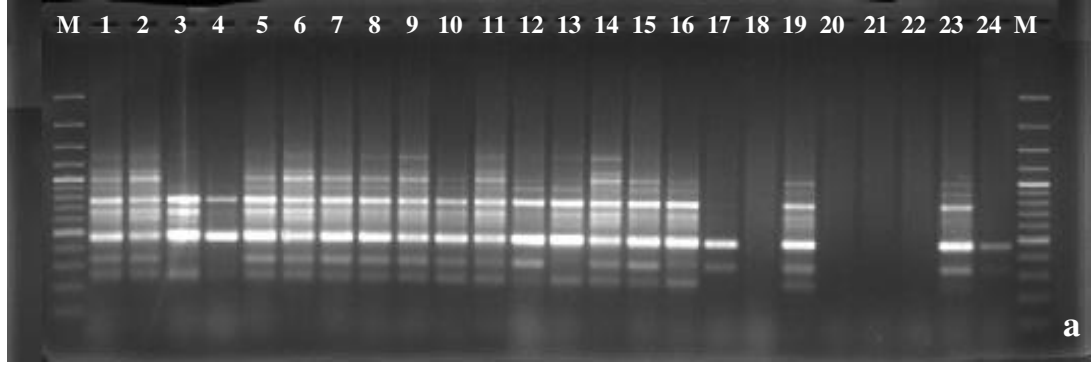
(b) M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görele/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.9.a.,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-04 (5'- GGA CTG GAG T -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

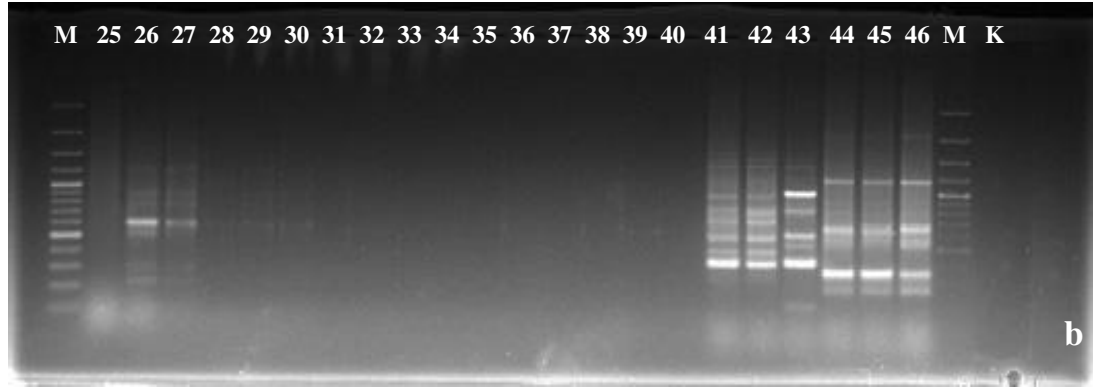
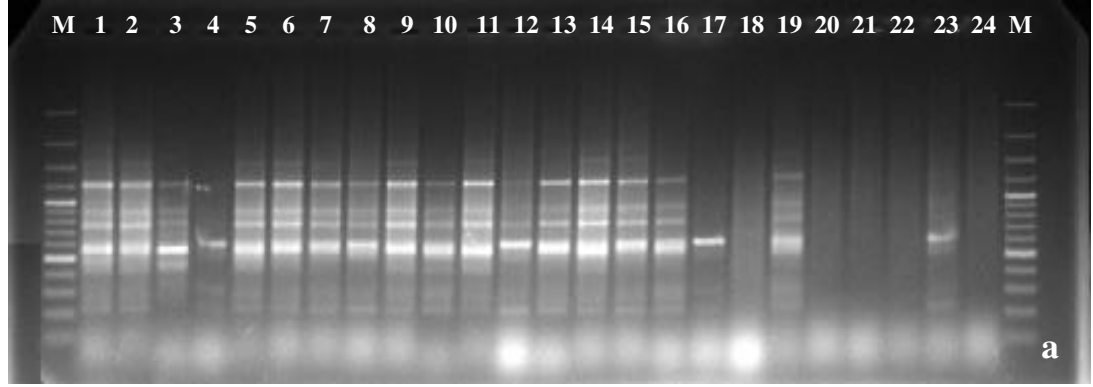
(b) M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görece/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.11.a,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-02 (5'- GGA CCC AAC C -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istanca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

(b) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görele/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol



Şekil 4.12.a,b. Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-04 (5'- TCT GGT GAG G -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

(a) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1-10: *Glis glis*- Istranca Ormanı/ Kırklareli, 11-17: *Glis glis*- Dereköy/ Kırklareli, 18: *Glis glis*- Edirne, 19-22: *Glis glis*- Zonguldak, 23-24: *Glis glis*- Ünye/ Ordu

(b) M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 25-26: *Glis glis*- Ünye/ Ordu, 27: *Glis glis*- Görele/ Giresun, 28-31: *Glis glis*-Maçka/ Trabzon, 32-34: *Glis glis*- Çayeli/ Rize, 35: *Glis glis*- İkizdere/Rize, 36-37: *Glis glis*- Borçka/ Artvin, 38-39: *Glis glis*- Şavşat/ Artvin, 40: *Glis glis*- Posof/ Ardahan, 41-42: *Dryomys nitedula*- Çamlıhemşin/ Rize, 43: *Dryomys laniger*- Elmalı/ Antalya, 44-46: *Mus macedonicus*- Edirne, K: Negatif kontrol

4.1 İstatistik Analizi Sonuçları

İstatistik analizi için POPGENE Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis, Version 1.31 (Yeh *et al.* 1997) programı kullanıldı. Bu programlar ile yapılan analizler şunlardır:

Na : Her örnek için gözlenen allel sayısı

Ne : Etkili allel sayısı

Nm : Gen akışı

H : Nei'nin genetik çeşitliliği (1987)

I : Shannon information indeksi

H_I : Populasyondaki bir bireyin gözlenen heterozigotluğu

H_S : Populasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu

H_T : Tüm populasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu

G_{ST} : Alt populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü

D : Nei'nin genetik mesafe değeri (1972)

G. glis populasyonlarının POPGENE programı ile yapılan genetik varyasyon (Nei 1987) analizleri Çizelge 4.2'de, genetik farklılaşma (Nei 1987) değerleri Çizelge 4.3'te, genetik mesafe ve genetik benzerlik (Nei 1972) hesaplamaları Çizelge 4.4'te, tüm populasyonlar arasındaki genetik mesafe verilerine göre elde edilen dendrogram (Nei 1972) ise Şekil 4.13'te verilmektedir.

Nei (1987)'ye göre *G. glis* populasyonları için hesaplanan ortalama genetik çeşitlilik değeri $H = 0,1480$ (polimorfik lokus yüzdesi, $\%P = 43,79$) (Çizelge 4.2), genetik farklılaşmayı gösteren G_{ST} değeri 0,6065 ve populasyonlar arasındaki gen akışını ifade eden N_m değeri 0,3244 olarak hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2 *G. glis* populasyonlarının genetik varyasyon analizleri (Nei 1987)

Lokalite	Örnek Sayısı	Na	Ne	H	I	P	%P
KIRKLARELİ	16	1,3787	1,1553	0,1003	0,1602	64	37,87
ZONGULDAK	1	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0	0,00
ORDU	2	1,1181	1,1056	0,0556	0,0783	17	10,06
GİRESUN	1	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0	0,00
TRABZON	3	1,2547	1,1801	0,1048	0,1531	41	24,26
RİZE	2	1,0855	1,0789	0,0409	0,0574	13	7,69
ARTVİN	3	1,2360	1,1876	0,1035	0,1486	38	22,49
Ortalama	28	1,4379	1,2491	0,1480	0,2237	74	43,79

Çizelge 4.3 *G. glis* alt populasyonlarında genetik farklılaşma analizi (Nei 1987)

Örnek Sayısı	Ht	Hs	Gst	Nm
28	0,1480	0,0582	0,6065	0,3244

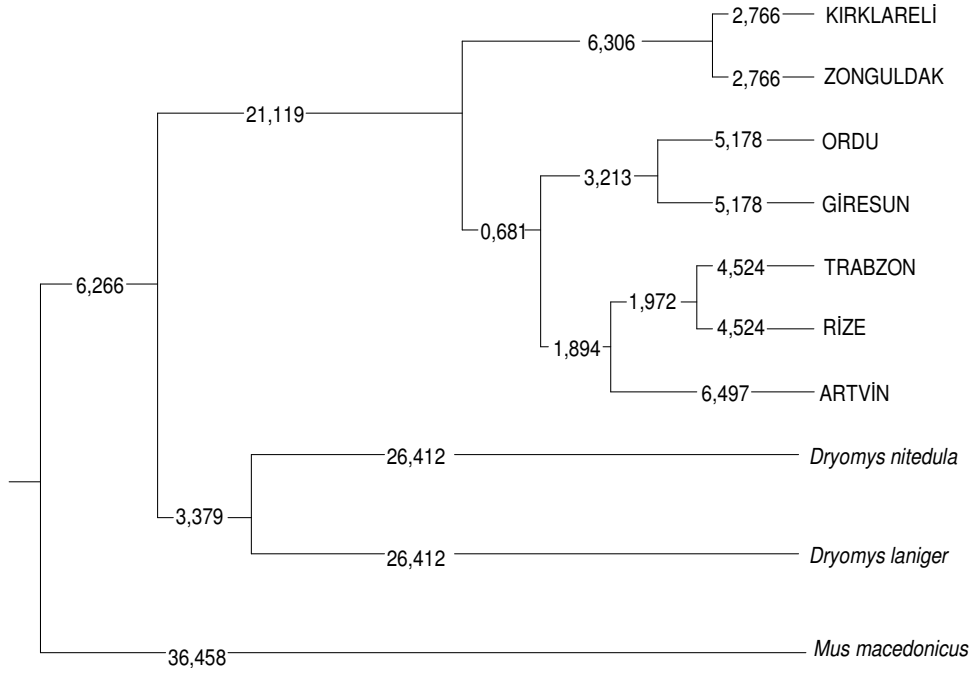
Nei (1972)'ye göre hesaplanan genetik mesafe değerlerine göre birbirine en yakın populasyonlar Kırklareli ve Zonguldak ($D= 0,0553$), birbirine en uzak populasyonlar ise Zonguldak ve Rize ($D= 0,2713$)'dir. Genetik benzerlik verileri ile genetik mesafe değerleri birbiriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Zonguldak ve Rize populasyonları en az benzerlik gösteren populasyonlar olup(0,7624), Zonguldak ve Kırklareli populasyonları en çok benzerlik gösteren populasyonlardır (0,9462) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Tüm *G. glis* populasyonlarına ait genetik mesafe (alt diyagonal) ve genetik benzerlik (üst diyagonal) hesaplamaları (Nei 1972)

1:Kırklareli, 2: Zonguldak, 3: Ordu, 4: Giresun, 5: Trabzon, 6: Rize, 7: Artvin

	1	2	3	4	5	6	7
1	0	0,9462	0,8097	0,8602	0,9175	0,7876	0,8423
2	0,0553	0	0,7981	0,8575	0,8997	0,7624	0,8185
3	0,2111	0,2255	0	0,9016	0,8190	0,8519	0,8428
4	0,1506	0,1538	0,1036	0	0,8676	0,8359	0,8566
5	0,0861	0,1057	0,1996	0,1420	0	0,8733	0,9135
6	0,2387	0,2713	0,1603	0,1792	0,1355	0	0,8830
7	0,1716	0,2003	0,1710	0,1548	0,0905	0,1244	0

Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogramda, 2 küme oluştu; ilk küme Kırklareli ve Zonguldak populasyonlarından oluşmaktadır. İkinci küme ise iki alt kümeye ayrılıp birinci altküme Ordu ve Giresun populasyonlarını, ikinci alt küme ise Trabzon, Rize ve Artvin populasyonlarını kapsamaktadır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Çalışılan tüm populasyonlara ait genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogram (Nei 1972)

Bu çalışmada ayrıca Trakya (Kırklareli) ve kuzey Anadolu populasyonları (Zonguldak, Ordu, Giresun, Trabzon, Artvin, Rize) bu bölgelerde yayılış gösteren alttürleri karşılaştırmak için analiz edildi. *G. glis*'in Anadolu ve Trakya populasyonlarının genetik varyasyon (Nei 1987) analizleri Çizelge 4.5'te, genetik mesafe ve genetik benzerlik (Nei 1972) analizleri Çizelge 4.6'da, tüm populasyonlar arasında genetik mesafe verilerine göre elde edilen dendrogram (Nei 1972) ise Şekil 4.14'te gösterilmektedir.

G. glis'in Anadolu ve Trakya populasyonları için Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik farklılaşma değerleri; Trakya populasyonu için $H = 0,1003$ ve %P: polimorfik lokus yüzdesi= 37,87, Anadolu populasyonu için $H = 0,1479$ ve %P: polimorfik lokus yüzdesi= 40,24 olarak hesaplandı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 *G. glis*'in Trakya ve Anadolu populasyonlarının genetik varyasyon analizleri (Nei 1987)

Lokalite	Örnek Sayısı	Na	Ne	H	I	P	%P
TRAKYA	16	1,3787	1,1553	0,1003	0,1602	64	37,87
ANADOLU	12	1,4024	1,2566	0,1479	0,2194	68	40,24
Ortalama	28	1,4379	1,2491	0,1480	0,2237	74	43,79

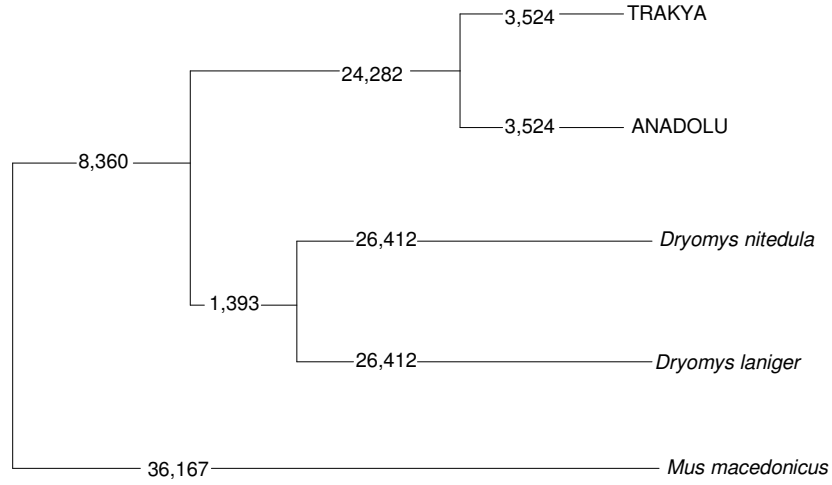
Ayrıca Nei (1972)'ye göre Trakya ve Anadolu populasyonları arasındaki genetik mesafe değeri $D = 0,0705$ olarak hesaplandı. Trakya, Anadolu ve dış grupların birbirleriyle olan genetik mesafe ve genetik benzerlik değerlerini gösteren bulgular Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.6 *G. glis*'in Trakya ve Anadolu populasyonları ile dış gruplara ait genetik mesafe (alt diyagonal) ve genetik benzerlik (üst diyagonal) hesaplamaları (Nei 1972)

1:Trakya, 2: Anadolu , 3:Rize (*D. nitedula*), 4:Antalya (*D. laniger*), 5: Edirne (*M. macedonicus*) (3., 4. ve 5. populasyonlar dış grup olarak kullanıldı).

	1	2	3	4	5
1	0	0,9319	0,5623	0,5291	0,4616
2	0,0705	0	0,6100	0,5958	0,5310
3	0,5757	0,4943	0	0,5896	0,4703
4	0,6366	0,5179	0,5283	0	0,4805
5	0,7730	0,6329	0,7545	0,7330	0

G. glis'in Trakya ve Anadolu populasyonları ile tüm dış gruplar arasındaki genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogramda ise aynı şekilde iki alt küme oluştu. İlk kümede *G. glis*'in Trakya ve Anadolu populasyonlarından oluşan alt küme ile Rize (*D. nitedula*) ve Antalya (*D. laniger*) populasyonlarından oluşan alt küme yer aldı. İki alt kümeden oluşan bu kümeye Edirne (*M. macedonicus*) populasyonu bağlandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 *G. glis*'in Anadolu ve Trakya populasyonları ile dış gruplara ait genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogram (Nei 1972)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

G. glis'in, Trakya'da *G. glis pindicus* ve Anadolu'da *G. glis orientalis* alttürleri yaşamaktadır. Doğramacı ve Tez (1991) postlar üzerinde yaptıkları araştırmada iki alttürün belirgin bir şekilde birbirlerinden ayrıldığını kaydetmişlerdir. Doğramacı ve Tez (1991) 17 karakter ölçüsünden condylobasal/diastema ve occipitonasal uzunluk/zygomatik genişlik oranlarının Trakya ve Anadolu populasyonları arasında ayırıcı olduğunu belirtmişlerdir. Çolak vd. (2006) yaptıkları proje çalışmasında 33 morfometrik karakterden 14 karakterin Trakya ve Anadolu populasyonları arasında ayırıcı özellikte olduğunu saptamışlardır. Bu da Trakya'daki *G. g. pindicus*'un Anadolu'daki *G. g. orientalis*'ten morfometrik karakterlere göre ayrıldığını ortaya koymaktadır. RAPD genetik belirteci kullanılarak yapılan bu çalışmada ise Trakya ve Anadolu populasyonları arasında morfolojik farklara kıyasla daha düşük genetik mesafe değeri (0,0705) elde edildi.

Çolak vd. (2006)'nin Türkiye'deki *G. glis* örnekleri üzerinde yaptıkları allozim analizlerinde toplam 17 enzim sistemine ait 28 lokus incelenmiştir. Bu lokuslardan sadece iki lokus (Est-3 ve Est-4) polimorfik özellik gösterirken, diğer 26 lokus monomorfik özellikte bulunmuştur. Polimorfik lokuslardaki allel frekansları bakımından Trakya ve Anadolu populasyonları arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu çalışmada ise, 12 primer ile yapılan RAPD çalışmasından elde edilen verilerle Trakya ve Anadolu populasyonları arasındaki genetik benzerlik değeri yüksek (0,9319) bulundu.

Çolak vd. (2006)'nin çalışmasında, genetik mesafe değerlerine dayanılarak oluşturulan dendrograma göre Rize ve Kırklareli örnekleri aynı kümede yer alırken, Zonguldak tek başına bir dal oluşturmıştır. Bu çalışmada ise, genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendrogramda, başlıca 2 küme oluştu; ilk kümede Kırklareli ve Zonguldak populasyonları yer alırken, ikinci küme, iki alt kümeye ayrıldı; birinci altküme Ordu ve Giresun populasyonlarından oluştu, ikinci alt kümede Rize populasyonu Trabzon ve Artvin populasyonları ile kümelendi. Bunun sebebinin iki

farklı yöntemin kullanılması, incelenen lokusların ve birey sayılarındaki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çolak vd. (2006)'nin çalışmasında, gerek morfometrik gerekse allozim analizleri sonucu oluşturulan filogenetik ağaçlar az da olsa birbirlerine benzemektedirler. Bu çalışmada elde edilen ağaç ise bir dereceye kadar allozim verileri ile elde edilen ağaca benzemektedir. Her ikisinde de, farklı bir alttürü temsil eden Trakya örnekleri Anadolu populasyonları ile kümelenmektedir. Bu çalışmada Kırklareli örneklerinin Rize yerine Zonguldak ile kümelenmesi incelenen polimorfik lokusların özelliğinden ve iki lokalitenin birbirine yakın olmasından kaynaklanabilir. Bu sonuçlar, incelenen lokuslara göre iki alttürü birbirinden tam olarak ayırmamaktadır. Boğazlar (10–15 bin yıl önce ayrılmış), coğrafik bir bariyer oluşturmaya rağmen, boğazların her iki tarafındaki populasyonların morfolojik farklılaşması dikkate alındığında genetik farklılaşmanın daha az olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar morfolojik ve morfometrik sonuçlarla çelişmektedir. Morfolojik ve morfometrik farklılaşmalar türlerin yaşadığı çevresel şartlardan etkilenmiş olabilir. Benzer şekilde (Filippucci and Kotsakis 1995), Gliridae (Myoxidae) içindeki filogenetik ilişkilerin inşa edilmesinde morfolojik ve genetik veriler arasında gözlenen tutarsızlıkların, familyanın eski orijinli olmasından ve cinslerin ayrımından kaynaklanabileceği kaydedilmiştir.

Filippucci and Kotsakis (1995)'in Myoxidae familyası cinslerinin biyokimyasal sistematığı ve evrimi üzerine yaptıkları allozim çalışmasında, *Myoxus glis* (*Glis glis*) için analiz edilen 42 lokustan 25'ini (%59) monomorfik bulmuşlardır. En yüksek polimorfik lokus sayısı Kuzey İtalya populasyonundan elde edilirken (14 lokus), en düşük Türkiye (Trakya) populasyonunda (3 lokus) elde edilmiştir. Çolak vd. (2006)'nin çalışmasında ise Anadolu ve Trakya populasyonlarında 28 lokustan sadece 2 lokus polimorfik bulunmuştur. Bu tez çalışmasında ise *G. glis* populasyonlarında polimorfik lokus sayısı 74'tür. Bu da genetik varyasyonu belirlemek için RAPD analizinin allozimlere göre daha avantajlı bir teknik olduğunu göstermektedir.

Filippucci and Kotsakis (1995) *Myoxus glis*'in 5 İtalya ve 1 Trakya popülasyonunun allozim analizi sonucu elde ettikleri genetik varyasyon değerlerini; beklenen heterozigotluk, $H_e = 0,050$, gözlenen heterozigotluk, $H_o = 0,040$, lokus başına ortalama allel sayısı, $A = 1,154$, polimorfik lokusların oranı $\%P1 = 0,151$ ve $\%P5 = 0,131$ olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında ise, popülasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu, $H_s = 0,0582$; tüm popülasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu, $H_T = 0,1480$; her örnek için gözlenen allel sayısı, $N_a = 1,4379$; etkili allel sayısı, $N_e = 1,2491$; polimorfik lokusların oranı, $\%P = 0,4370$ olarak bulundu. Buna göre, bu çalışmada elde edilen genetik varyasyon değerleri allozim verilerinden elde edilenlere kıyasla daha yüksek bulundu.

Karasal memelilerde RAPD tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar sınırlıdır ve RAPD analizi için farklı indeksler (similarity, dissimilarity) kullanılmıştır. RAPD analizi için standart bir prosedürün olmaması, diğer çalışmalarla karşılaştırmaları zorlaştırır. Almeida *et al.* (2000) *Nectomys squamipes* (Rodentia) popülasyonlarının RAPD analizi çalışmasında, inceledikleri 5 popülasyon arasında, D indeksini kullanarak, D değerlerini 0,118–0,128 arasında bulmuşlar ve önemli genetik farklılaşma ($F_{st} = 0,17$; $\Phi_{st} = 0,14$) tespit ederken, gen akışının ($N_m = 1,25$) genetik sürüklenmenin üstesinden gelmek için yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında G_{ST} (alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü $= 0,6065$) değeri yüksek, gen akışı ($N_m = 0,3244$) değeri ise nisbeten düşük bulundu.

Atopkin *et al.* (2007), *Apodemus agrarius*'un (Rodentia) genetik varyasyonu ve farklılaşması konusunda yaptıkları RAPD-PCR analizinde Avrupa-Siberian ve Uzak Doğu-Çin grubu olmak üzere iki büyük izolatu karşılaştırmışlardır. İki grubun polimorfik RAPD lokuslarının frekansında farklılıklar bulunmuştur, fakat bunlar arasında fikse olmuş farklılıklar tespit edilmemiştir ve kullanılan istatistik metodlarının hiçbirisi iki grubu birbirinden ayırmamıştır. Araştırmacılar, bu yüzden *Apodemus agrarius*'un iki grubunun genetik izolasyonunun tam olmadığını belirtmişlerdir. Bu sonucun türün doğudan batıya son yayılımı ve bunu takibeden ayrılma hipotezini desteklediğini ileri sürmüşlerdir. Hem Çolak vd. (2006)'nin çalışmasında hem de bu çalışmada *G. glis*'in Trakya ve Anadolu popülasyonları oluşturulan dendrogramlarda

tam olarak ayrılmamıştır. Bu da *Apodemus agrarius*'ta olduğu gibi *G. glis*'te de populasyonlar arasında genetik izolasyonun tam olmadığını göstermektedir. Ayrıca Trakya ve Anadolu populasyonlarının genetik benzerlik değerlerinin ($I=0,9319$) karşılaştırılması da bu durumu desteklemektedir.

Sonuç olarak, *G. glis*'in kuzey Anadolu ve Trakya'da yayılış gösteren populasyonları üzerinde yapılan morfometrik, allozim ve karyolojik çalışmalara göre, morfolojik farklılaşmaların belirgin olduğu, buna karşın incelenen moleküler lokuslara göre belirgin bir farklılığın olmadığı, evrimsel değişikliklerin az olduğu görülmektedir.

Bu türün başlıca yaşama alanı olarak karışık ormanlar gibi spesifik habitat gereksinimi vardır. Bu yüzden ormanların doğal veya insan etkisiyle parçalı hale getirilmesi, populasyonun altyapılanmasına ve böylece populasyonlar arasında kesintili yayılışa sebep olabilir. Farklı büyüklükte, farklı coğrafik mesafelerde, doğal veya insan etkileri ile tahribat sonucu kesintiye uğramış ormanlarda yaşayan *Glis glis* populasyonlarındaki genetik varyasyonları belirlemek bu tür üzerindeki evrimsel etkilerin anlaşılmasında yararlı olacaktır.

Otoyollar, tarla vb zirai alanlar, barajlar ve demiryolları gibi insan yapımı habitatlar birçok türün hareketini sınırlayabilir, bu yüzden bunlar bazı türlerin davranış ve yayılış biçimini etkileyen “bariyer etkisi” yaratabilir. Bugün habitat tahribatı, yaşayan bitki ve hayvanlar için en ciddi tehditlerden biri olarak düşünülebilir.

Habitat tahribatının en önemli negatif sonuçları:

1. Etkili populasyon büyüklüğündeki gerileme, soyiçi üremeyi artırarak genetik çeşitliliği azaltır.
2. Demografik populasyon dinamikleri ve türün global tükenme riskini artırabilen katastrofik etkiler lokal tükenme riskini artırır.
3. Bireylerin göç yeteneğinde azalma ve buna bağlı olarak kolonize ve yeniden kolonize olma yeteneğinde kayıplar olabilir.

Habitat tahribatının etkisi çalışılan türe bağlıdır ve davranış, dağılım biyolojisi ve habitat gereksinimleri gibi faktörlerden etkilenir. Ülkemizde de kuzey Anadolu’da yapılmakta olan otoyollar ve barajların etkisi zamanla diğer birçok canlı kadar *Glis glis*’te de populasyonun genetik yapısında değişikliğe yol açabilir. Bu tez çalışmasında G_{ST} (alt populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü =0,6065) değeri yüksek, gen akışı ($N_m=0,3244$) değeri ise nisbeten düşük bulundu.

Bu yüzden moleküler tekniklerle kısa sürede belirlenebilen genetik varyasyon çalışmaları ile bunun takip edilmesi ve genetik çeşitliliğin sürdürülebilmesi için önlemler alınması gerekir.

Protein elektroforezi çalışmaları bu türde genetik varyasyonun oldukça düşük olduğunu göstermiştir (Filippucci and Kotsakis 1995, Çolak vd. 2006). Bu çalışmadaki RAPD verilerine göre, şimdilik *Glis* populasyonları arasında gen akışı olduğu görülse de kesintiye uğramalarının üzerinden geçen zamana bağlı olarak, zamanla altpopulasyonların gelişebileceği söylenebilir. Populasyon yoğunluğuna ve genetik sürüklenmeye bağlı olarak bu populasyonlar farklı şekilde evrimleşebilir.

Bu çalışma Türkiye populasyonlarında gerçekleştirilmiş DNA düzeyindeki ilk genetik çalışmadır. Sonuç olarak, *G. glis*’in kuzey Anadolu’da yayılış gösteren populasyonları arasında genetik farklılaşmaların belirgin olduğu buna karşın populasyonların genetik farklılıkları ile coğrafik mesafeler arasında belirgin bir ilişkinin olmadığı söylenebilir. Çok daha kesin sonuca ulaşabilmek için örnek sayısını artırmak ve daha fazla polimorfik lokus incelemek gerekmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda, DNA düzeyinde diğer moleküler teknikleri uygulayarak ileri çalışmaların yapılmasıyla türün evrimine ve populasyon genetiğine katkılar sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Almeida, F.C., Moreira, M.A.M., Bonvicino, C.R. and Cerqueira, R. 2000. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. Genetics and Molecular Biology, 23, 4, 793-797.
- Amori, G. 1996. *Glis glis*. In: IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species, <www.iucnredlist.org>. Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Amori, G., Corsetti, L. and Esposito, C. 2002a. Mammiferi dei Monti Lepini. Quaderni di Conservazione della Natura, 11: 1-210.
- Anonim. 2008. www.genetiklab.com/ Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Anonymous. 2008. Web Sitesi: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rodentia.html> Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Anonymous. 2008. Web Sitesi: <http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/ema/> Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Anonymous. 2008. Web Sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dormouse> Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Anonymous. 2008. Web Sitesi: <http://www.pharmaceuticaltechnology.com/projects/roche/roche7.html> Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Anonymous. 2008. Web Sitesi: www.cometobg.com/viewtext.asp?id=2 Eriřim Tarihi: 18.08.2008.
- Arslan, E. 2004. RAPD-PCR Yöntemiyle Türkiye'deki *Hyacinthella* Schur (Liliaceae) Türleri Arasındaki Polimorfizm ve Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dergisi, Sayı 23, sayfa 27-32.
- Atopkin, D.M., Bogdanov, A.S. and Chelomina, G.N. 2007. Genetic Variation and Differentiation in Striped Field Mouse *Apodemus agrarius* Inferred from RAPD-PCR Analysis. Russian Journal of Genetics, Vol. 43, No. 6, pp. 665-676.
- Babaoğlu, S., Açıık, L., Çelebi, A. and Adıgüzel, N. 2004. Molecular Analysis of Turkish *Alyssum* L. (Brassicaceae) Species By RAPD-PCR and SDS-PAGE Methods. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 17 (3):25-33.
- Bieber, C. 1998. Population dynamics, sexual activity, and reproduction failure in the fat dormouse (*Myoxus glis*). J. Zool. Lond., 244:223-229.
- Borowsky, R.L., McClelland, M., Cheng, R. and Welsh, J. 1995. Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates: the *Xiphophorus* model. Mol. Biol. Evol., 12: 1022-1032.
- Cagnin, M. and Aloise, G. 1995. Current status of myoxidae (Mammalia: Rodentia) in Calabria (Southern Italy). Pp. 169-180, in Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Myoxidae) (M: G: Filippucci, ed.). Hystrix, n.s., 6(1-2) (1994):1-340.

- Cagnin, M., Aloise, G., Garofalo, G., Milazzo, C. and Cristaldi, M. 1996. Les Communautés de petits mammifères terrestres de trois- Fiumare- de la Calabre (Italie du Sud). *Vie Milieu*, 46(3/4):319-326.
- Cantini, M. 1991. Comunità di piccoli Mammiferi (Mammalia: Insectivora, Rodentia, Carnivora) nell'Alto Lario Orientale (Lombardia, Italia) valutazioni della qualità ambientale. *II Naturalista Valtellinese- Atti Mus. Civ. Stor. Nat. Morbegno*, 2:71-98.
- Capasso-Barbato, L. and Gliozzi, E. 2001. Late Pleistocene micromammal association from Praia a Mare (Calabria, Southern Italy): Palaeoclimatological and biochronological implications. *Bollettino della Società Palaeontologica Italiana*, 40(2):159-166.
- Carpaneto, G.M. and Cristaldi, M. 1995. Dormice and man: A review of past and present relations. Pp. 303-330, in *Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Myoxidae)* (M. G. Filippucci, ed.). *Hystrix*, n.s., 6(1-2) (1994):1-340.
- Cerone, G. and Aloise, G. 1994. La fauna a micromammiferi del comprensorio di Muro Lucano (Potenza, Italia). *Hystrix*, n.s., 5 (1-2) (1993):110-115.
- Civitelli, M.V., Filippucci, M.G., Kurtonur, C. and Özkan, B. 1995b. Chromosome analysis of the three species of Myoxidae. Pp. 117-126, in *Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Mammalia)* (M. G. Filippucci, ed.). *Hystrix*, n.s., 6 (1-2): 1-340.
- Corbet, G. B. 1978c. The mammals of the Palaearctic region: A taxonomic review. *British Museum (Natural History)*, London, 314 pp.
- Cresti, M., Marini, S., Rinetti, L. and Zangirolami, A. 1994. Indagine sul popolamento di micromammiferi nell'Alto Luinese (Varese). *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano*, 133(13):153-183.
- Çolak, E., Yiğit, N. and Verimli, R. 1994. Periodic Cycles in Food Intake and Body Weight of Juvenile Dormice, *Glis glis orientalis* (Nehring, 1903) (Rodentia: Gliridae), in *Northern Anatolia Turkish J. of Zoology*, 18: 241 - 244.
- Çolak, E., Yiğit, N., Kıvanç, E. ve Sözen, M. 1997. Türkiye'deki *Glis glis orientalis* (Nehring, 1903) (Rodentia: Gliridae) in Üreme Biyolojisi. *Türk. J. Zool.*, 21: 375 -380.
- Çolak, E., Yiğit, N., Sözen, M. ve Özkurt, Ş. 1998. Hibernation and Body Weight in Dormice, *Glis glis orientalis* (Nehring, 1903) (Rodentia: Gliridae), Maintained under Uncontrolled Conditions. *Türk. J. Zool.*, 22: 1-7.
- Çolak, E., Yiğit, N., Sözen, M. and Özkurt, Ş. 2003. Data to the Cranial and Tooth Development of *Glis glis orientalis* Nehring, 1903 (Rodentia: Gliridae). *Acta Zool. Hung.* 49 (Suppl.1): 33-38.
- Çolak, R., Çolak, E., Kankılıç, T. ve Olgun, G. 2006. Türkiye'de Yayılış Gösteren *Glis glis*'te Allozim Varyasyonları Tübitak projesi kesin raporu (No: TBAG-HD/5 105T018).
- Daoud, A. 1993. Evolution of Gliridae (Rodentia, Mammalia) in the Pliocene and Quaternary of Poland. *Acta Zoologica Cracoviensia*. 36(2): 199-231.
- Demirsoy, A. 1998. Yaşamın Temel Kuralları Cilt III / Kısım II Dördüncü Baskı.

- Doğramacı, S. ve Tez, C. 1991. Türkiye *Glis glis* (Mammalia: Rodentia) türünün coğrafik varyasyonları ve karyolojik özellikleri. Turkish Journal of Zoology, 15: 275–288.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12 (1): 13-15.
- Ellerman, J.R. 1941. The families and genera of living rodents Vol. 1. Rodents other than Muridae. Trustees of the British Museum (Natural History), London, 690 pp.
- Filippucci, M.G. and Kotsakis, T. 1995. Biochemical Systematics and Evolution of Myoxidae. Proc. II Conf. on Dormice. Hystrix, (n.s.) 6 (1-2) pp. 77-97.
- Franco, D. 1988. Habit, biometry and taxonomy of the dormouse (*Glis glis*, Linnaeus, 1766) of the Asiago Plateau. Lavori, Societa Veneziana di Scienze Naturali, 13: 135-142.
- Graphodatsky, A.S. and Fokin, I.M. 1993. Comparative cytogenetics of Gliridae. Zoologicheskii Zhurnal, 72 (11): 104- 113.
- Grechko, V.V. 2002. Molecular DNA Markers in Phylogeny and Systematics. Russian Journal of Genetics, Vol. 38, No. 8, pp. 851-868. Translated from Genetika, Vol. 38, No. 8, pp. 1013-1033.
- Hartenberger, J.L. 1985. The order Rodentia: major questions on their evolutionary origin, relationships and suprefamilial systematics. Pp. 1–32 in W. P. Luckett and J.-L. Hartenberger, eds. Evolutionary relationships among rodents. A multidisciplinary analysis. Plenum Press, New York and London.
- Heun, M. and Helentjaris, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids corn. Theor. Appl. Genet., 85: 961- 968.
- Horacek, I. 1986. Fossil records and chronological status of dormice in Czechoslovakia. Part 1: *Glis glis*, *Eliomys quercinus*. Folia Musei Rerum Naturalium Bohemiae Occidentalis, Zoologica, 24:49-59.
- Hrabe, V. 1969. Der Bau des Glans penis bei vier Schlaferarten (Gliridae, Rodentia). Zoologické Listy, 18 (4): 317-334.
- Kaya, Z. and Neale, D.B. 1995. Linkage Map Based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in *Pinus brutia*. Silvae Genetica, 44, 110-116.
- Kıvanç, E., Verimli, R., Çolak, E. and Yiğit, N. 1995. Effect of Hibernation on Testis and Liver of Turkish Dormice, *Glis glis orientalis* (Nehring, 1903), Turkish J. of Zoology, 19: 187-190.
- Kock, D. 1990. Notes on mammals (Insectivora, Rodentia) taken by the tawny owl, *Strix aluco*, in NW Turkey. Zoology in the Middle East, 4: 5–9.
- Kowalski, K. 2001. Pleistocene rodents of Europe. Folia Quaternaria, 72:3-389.
- Kratochvil, J. 1973. Männliche Sexualorgane und System der Gliridae (Rodentia). Acta Scientiarum Naturalium, Academiae Scientiarum Bohemoslovaceae (Brno), 7:1-52.

- Krattli, H. and Haffner, M. 1995. Funktionelle grobmorphologische und histologische Untersuchungen am Integument der Füsse des Siebenschläfer *Glis glis* (Linnaeus, 1766). Säugetierkundliche Mitteilungen, 36(2): 62-81.
- Kryštufek, B. 2001c. Compartmentalization of body of a Fat Dormouse *Glis glis*. Trakya University Journal of Research B, 2(2): 95-106.
- Kryštufek, B. and Zavodnik, M. 2003. Autumn population density of the edible dormouse (*Glis glis*) in the mixed montane forest of central Slovenia over 33 years. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae (Supplement 1), 49:99-108.
- Kryštufek, B., Hudoklin, A. and Pavlin, D. 2003. Population biology of the edible dormouse *Glis glis* in a mixed montane forest in central Slovenia over three years. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae (Supplement 1), 49:85-97.
- Kryštufek, B. 2004. Nipples in the edible dormice *Glis glis*. Folia Zoologica, 53 (1): 107-111.
- Kulikov, V.F. 1988. Morphology and functional significance of the vibrissae apparatus of certain rodents. Pp. 69-80, in Ekologo- funktsionalnaya morfologiya kozhnogo pokrova mlekopitayushchikh (Ecological and functional morphology of mammalian skin) (V. E. Sokolov and R. P. Zhenevskaya, eds.). Nauka, Moscow, 205 pp.
- Kurtonur, C. 1992. First specimens of *Glis glis* L. 1776 from Turkish Thrace (Mammalia: Rodentia: Gliridae). Senckenbergiana Biologica, 7: 1-6.
- Linnaeus, C. 1766. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. 12th ed., 1 (1):87.
- Landry, P. and Lapointe, F. 1996. RAPD problems in phylogenetics. Zool. Scripta, 25(4): 283-290.
- Lee, S.-W., Ledig, T. and Johnson, D.R. 2002. Genetic Variation at Allozyme and RAPD Markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. American Journal of Botany, 89 (4): 566- 577.
- Li-Wang, L., Li-Ping, Z., Yi-Qin, G., Ming-Xia, W., Li-Ming, C., Jin-Lan, Y., Yan, W., Fan-Min, Y. and Long-Zhi, W. 2008. DNA Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of Late- bolting Radish Cultivars with RAPD, ISSR and SRAP Markers. Scientia Horticulturae, 116: 240-247.
- Locatelli, R. and Paolucci, P. 1996a. Micromammiferi della foresta demaniale de Cadino. Natura Alpina, 46 (4): 1-68.
- Lowe, A.J., Hanotte, O. and Guarino, L. 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: The Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Plant Genetic Resources Newsletter, 107: 50-54.
- Malatesta, M., Gazzanelli, G., Battistelli, S., Martin T.E., Amalric, F. and Fakan, S. 2000. Nucleoli undergo structural and molecular modifications during hibernation. Chromosoma, 109:506-513.

- Markov, G.G. 2001. Microgeographical non-metrical cranial diversity of the fat dormouse (*Glis glis* L.). Trakya Univ. J. Sci. Res. Series B, 2(2):115-119.
- Muirhead, L. 1819. Mazology. Pp. 393-486 [pls. 353-358], in the Edinburgh encyclopaedia, (D. Brewster, ed.). Fourth ed. William Blackwood, Edinburgh, 13:1-744, pls. 347-371, 1830.
- Miljutin, A. 1998. Ecological strategies of the Baltic Rodents Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, 52(1/2):20-30.
- Nehring, A. 1903. *Muscardinus avellanarius* and *Myoxus glis orientalis*, Nov. Subsp., aus Kleinasien. Sitzb. Ges. Naturf. Frde, 4:187-188.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance Between Populations. American Naturalist, 106:283-292.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Uni. Press, New York.
- Newton, C.R. and Graham, A. 1994. PCR, 1st Edition, Bios Scientific Publishers Limited, pp. 1-20. UK.
- Nowakowski, W. 2001a. Daily torpor in the edible dormouse *Glis glis*. Trakya University Journal of Scientific Research B, 2(2):109-110.
- Ognev, S. I. 1947. Mammals of the USSR and adjacent countries. Vol. 5, Moscov – Leningrad.
- Osborn, D. J. 1964. The Hare, Porcupine, Beaver, Squirrels, Jerboas and Dormice of Turkey. Mammalia, 28: 573-592.
- Ondrias, J. C. 1966. The taxonomy and geographical distribution of the rodents of Greece. Säugetierkundlicheeteilungen, 14, sonderheft, 1: 1-136.
- Padmalatha, K. and Prasad, M.N.V. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. African Journal of Biotechnology, 5 (3): 230-234.
- Paolucci, P., Bon, M., De Battisti, R., Mezzavilla, F. and Vernier, E. 1993. Distribuzione di alcuni mammiferi in Veneto. Supplemento alle Ricerchedi Biologia della Selvaggina, 31:415-424.
- Peshev, D. and Delov, V. 1995a. Chromosome study of three species of dormice from Bulgaria. Pp. 151-153, in Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Myoxidae) M. G. Filippucci, ed.). Hystrix, n.s., 6 (1-2): 1-340.
- Peshev, D. and Delov, V. 1995b. Craniological study and subspecific status of three species of dormice from Bulgaria. Pp. 225-230, in Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Myoxidae) M. G. Filippucci, ed.). Hystrix, n.s., 6 (1-2): 1-340.
- Reyes, A., Pesole, G. and Saccone, C. 1998. Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Fat Dormouse, *Glis glis*: Further Evidence of Rodent Paraphyly. Mol. Biol. Evol, 15 (5): 499-505.

- Rossolimo, O.L., Potapova, E.G., Pavlinov, I.Ya., Kruskop, S.V. and Voltzit, O.V. 2001. Dormice (Myoxidae) of the World. Sbornik Trudov Zoologicheskogo Muzeya MGU 42: 1-232 (in Russian with English summary).
- Sammour, R.H. 1991. Using electrophoretic techniques in varietal identification, biosystematic analysis, phylogenetic relations and genetic resources management. Journal of Islamic Academy of Sciences, 4:3; 221-226.
- Schlund, W. 1997. Die Tibiälänge als Maß für Körpergröße und als Hilfsmittel zur Altersbestimmung bei Siebenschäfern (*Myoxus glis* L.). Zeitschrift für Säugetierkunde, 62: 187-190.
- Simson, S., Ferrucci, L., Kurtonur, C., Özkan, B. and Filippucci, M.G. 1995. Phalli and bacula of European dormice: Description and comparison. Pp. 231-244., in Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Myoxidae) (M. G. Filippucci, ed.). Hystrix, n.s., 6 (1-2):1-340.
- Scaravelli, D., Casini, L. and Matteucci, C. 1995. Dormice distribution in Romagna region (Italy). Pp. 195-198, in Proceedings of II Conference on Dormice (Rodentia, Myoxidae) (M. G. Filippucci, ed.). Hystrix, n.s., 6 (1-2):1-340.
- Spiridonova, L.N., Chelomina, G.N., Starikov, V.P., Korablev, V.P., Zvirka, M.V. and Lyapunova, E.A. 2005. RAPD-PCR Analysis of Ground Squirrels from the Tobol-Ishim Interfluvium: Evidence for Hybridization between Ground Squirrel Species *Spermophilus major* and *S. erythrogenys*. Russian Journal of Molecular Genetics, Vol: 41, No: 9, pp. 991-1001.
- Storch, G. 1978a. Familie Gliridae Thomas, 1897- Schlafer. Pp. 201-280, in Handbuch der Säugetiere Europas (H. J. Niethammer and F. Krapps, eds.). Akademische Verlagsgesellschaft (Wiesbaden), 1:1-476.
- Thomas, D. J. 1906. Three new Palaearctic Mammals. Ann. Mag. N.H., 18: 220-221.
- Timm, U., Pilats, V. and Balciuskas, L. 1998. Mammals of the East Baltic. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, 52 (594/595):1-9.
- Vanacova, S., Tachezy, J., Kulda, J. and Flegr, J. 1997. Characterization of Trichomonad species and strains by PCR fingerprinting. Journal of Eukaryotic Microbiology, 44: 545-552.
- Viriot, L., Zany, D., Chaline, J., Courant, F., Brunet-Lecomte, P. and Simone, S. 1991. Compléments aux faunes de rongeurs des gisements d'Aldene (Cessero, Hérault), de la grotte du Prince (Grimaldi, Ligurie) et de l'Observatoire (Monaco). Bulletin du Musée d'Anthropologie Préhistorique de Monaco, 34:7-16.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, Vol. 23, No. 21, 4407-4414.
- Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotech., 10; 186-191.

- Weishing, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA isolation and purification. In: DNA Fingerprinting in plants and fungi, pp 44-59. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res., 18(24):7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535.
- Wilson, D.E. and Reeder, D.M. 2005. Mammal Species of the World. Johns Hopkins University Press 2142 pages.
- Yeşbek, A. 2005. Hacettepe Üniversitesi Proteomik ve Genomik Dersi Final Ödevi (Genetik Markerler veUygulama Alanları) Notları.
- Yiğit, N., Çolak, E., Sözen, M., Özkurt, Ş. and Verimli, R. 2001. Observations on the feeding biology and behaviour of the Fat Dormouse, *Glis glis orientalis* (Nehring,1903) (Mammalia: Rodentia) in captivity. Zoology in The Middle East, 22:17-24.
- Yeh, C.F., Yang, R. and Boyle, T. 1997. POPGENE Version 1.31. Windows-based Software for Population Genetics Analysis.
- Zima, J., Macholan, M. and Filippucci, M.G. 1995. Chromosomal variation and systematics of myoxids. Pp. 63-76, in Proceedings of II Conference of Dormice (Rodentia, Myoxidae) (M. G. Filippucci, ed.). Hystrix, n.s., 6 (1-2): 1-340.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Senem Esin SELÇUK

Doğum yeri : Ankara

Doğum Tarihi: 01.01. 1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (1997–1999)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001–2005)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Eylül 2005- Ekim 2008)

Kongre : VIII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Poster Sunumu (Ekim 2008)