

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE'DEKİ *Apodemus mystacinus* (MAMMALIA: RODENTIA)'UN
MTDNA (SİTOKROM *B* VE KONTROL BÖLGESİ) RFLP VE DNA DİZİ
ANALİZİ**

Gül OLGUN KARACAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE’DEKİ *Apodemus mystacinus* (MAMMALIA: RODENTIA)’UN MTDNA (SİTOKROM *B* VE KONTROL BÖLGESİ) RFLP VE DNA DİZİ ANALİZİ

GÜL OLGUN KARACAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Anadolu, Miosen ve Kuvaterner döneminde ortaya çıkan jeolojik ve iklimsel olaylar neticesinde populasyonlar arası farklılaşmaları sağlayacak çok sayıda kompartimana bölünmüştür. Bu tezin amacı, *Apodemus mystacinus* populasyonlarındaki tür içi genetik farklılaşmayı ve bu farklılaşmaya neden olan evrimsel süreçleri ortaya koymaktır.

Bu bağlamda Türkiye’de yayılış gösteren *A. mystacinus* populasyonları arasındaki genetik farklılaşmayı ortaya koymak için mtDNA bölgesine ait iki bölgenin (sitokrom *b* ve D-loop) PZR-RFLP ve dizi analizi çalışması yapılmıştır. Yapılan analizler doğrultusunda *A. mystacinus populasyonlarının* taksonomisi ve genetik yapısı ortaya konmuş ve istatistiksel filogenetik yöntemleri kullanılarak bu türün zaman içindeki farklılaşma nedenleri evrimsel ve ekolojik açıdan değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda *A.mystacinus* populasyonlarının 3 grup oluşturduğu ortaya koyulmuştur. Bu 3 grup; Grup 1: Ordu, Trabzon, Rize, Artvin, Erzincan, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Adana; Grup 2: Mersin, Konya, Burdur, Antalya ve Muğla; Grup 3: Kastamonu, Zonguldak, Düzce, Balıkesir, İzmir ve Aydın populasyonlarından oluşmaktadır. Bu 3 grup daha önce literatürde önerilen 3 alttürü işaret etmektedir. Populasyonlar arasındaki farklılaşmanın özellikle Pliyosen ve Pleistosen dönemindeki fay hareketlerine ve değişen iklimsel şartlara bağlı olarak ortaya çıkan coğrafi değişikliklerden kaynaklandığı tartışılmıştır.

Haziran 2013, 171 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Apodemus mystacinus*, mtDNA, RFLP, Türkiye, genetik varyasyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

MTDNA (CYTOCHROME *B* AND CONTROL REGION) RFLP AND DNA SEQUENCE ANALYSIS OF *Apodemus mystacinus* (MAMMALIA: RODENTIA) IN TURKEY

GÜL OLGUN KARACAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

As a result of geologic and climatic events during the Miocene and Quaternary, Anatolia was divided into lots of compartment causing differentiation among populations. The aim of this thesis, to determine the genetic differentiation within *Apodemus mystacinus* populations and the evolutionary processes that triggered this differentiation.

In accordance with this aim, genetic differentiation between *Apodemus mystacinus* populations distributed in Turkey were determined using mtDNA PCR-RFLP and sequence analysis of cytochrome *b* and D-loop. Analysis set out the taxonomy and the genetic structure of *A. mystacinus* populations and also the reasons of differentiations were evaluated in evolutionary and ecological terms over time.

As a result of this study, *A. mystacinus* populations included 3 groups as: Group 1: Ordu, Trabzon, Rize, Artvin, Erzincan, Adıyaman, Kahramanmaraş and Adana; Group 2: Mersin, Konya, Buyurdur, Antalya and Muğla; Group 3: Kastamonu, Zonguldak, Düzce, Balıkesir, İzmir and Aydın. These 3 groups are indicated the 3 subspecies suggested in literature before. Differentiation among populations, especially during the Pliocene and Pleistocene, which is caused by the geographical changes differentiating due to the fault movements and climatic conditions are discussed.

June 2013, 171 pages

Key Words: *Apodemus mystacinus*, mtDNA, RFLP, Türkiye, genetic variation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, attığım her adımda bana destek olan ve beni cesaretlendiren tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı); örnek temini ve teşhisinde yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK'a ve Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e; bu çalışmanın her aşamasında beni yönlendiren, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İrfan KANDEMİR ve Prof. Dr. Mustafa SÖZEN'e; konuyla ilgili görüşlerinden yararlandığım Dr. Utku PERKTAŞ ve Doç. Dr. Ferhat MATUR'a; çalışmalarında her ihtiyacım olduğunda yanımda bulunan, fikirleriyle bana destek veren arkadaşlarım Dilek BETEŞ, Arş. Gör. Ebru ÖZDEMİR, Yrd. Doç. Dr. Ayça ÖZKAN KOCA, F. Nilüfer TEKE, Arş. Gör. Dr. Pınar ÇAM ve Arş. Gör. Şafak BULUT'a; kapılarını bana her daim açık tutan Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'nda çalışan değerli arkadaşlarıma; manevi desteklerinin yanı sıra istatistik analizlerinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım arkadaşlarım Arş. Gör. İklim GEDİK BALAY ve Yrd. Doç. Dr. Nuri ÇELİK'e teşekkür ederim.

Bu güne kadar her konuda olduğu gibi doktora yapmam konusunda da beni yüreklendiren ve bugünlere gelmemde önemli payları olan canım annem Türköz OLGUN, babam Benzer OLGUN ve kardeşim Mustafa Kemal OLGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmam sırasında her daim yanımda olan ve birçok fedakarlık göstererek beni her konuda destekleyen sevgili eşim Sezer KARACAN'a en derin duygularım ile teşekkür ediyorum.

Sizlerin desteği ile bu çalışmayı gerçekleştirdim...

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğü tarafından 11B4240002 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Gül OLGUN KARACAN
Ankara, Haziran 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1 Ordo: Rodentia.....	7
2.2 Familia: Muridae (Fareler ve Sıçanlar).....	8
2.3 Genus: <i>Apodemus</i> Kaup, 1829.....	8
2.3.1 Species: <i>Apodemus mystacinus</i> Danford ve Alston, 1877.....	8
2.4 Genetik Çeşitliliğe (Polimorfizm) Neden Olan Mekanizmalar	12
2.4.1 Mutasyon ve Rekombinasyon	13
2.4.2 Genetik polimorfizmlerin popülasyona etkisi	18
2.5 Moleküler Belirteçler ve Kullanım Alanları.....	19
2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun prensipleri	21
2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun avantajları	26
2.5.3 PZR-RFLP metodu	27
2.5.4 DNA dizileme yöntemi	30
2.6 Genetik Çalışmalarda Kullanılan DNA Belirteçleri	34
2.6.1 Hayvan mitokondri DNA'sının (mtDNA) özellikleri	35
2.7 Popülasyon İçi ve Popülasyonlar Arası Genetik Çeşitliliğin Nedenleri	39
2.7.1 Genetik sürüklenme	39

2.7.2 Populasyon darboğazı.....	40
2.7.3 Kurucu etkisi	41
2.7.4 Doğal seçim	41
2.7.5 Eşeyssel seçim	41
2.7.6 İkincil temas.....	42
2.8 Filogenetik Bilgisayar Uygulamalarının Önemi.....	43
3. MATERYAL VE METOD.....	45
3.1 Materyal.....	45
3.2 DNA İzolasyonu.....	50
3.3 PZR-RFLP Çalışması	53
3.4 DNA Dizi Analizi.....	56
3.5 Filogenetik Analizler.....	57
3.5.1 PZR-RFLP değerlendirmesi için kullanılan filogenetik analizler	57
3.5.2 DNA dizi analizi değerlendirmesi için kullanılan filogenetik analizler.....	57
3.6 Genetik Çeşitlilik ve Populasyon Genetik Yapısı Analizleri.....	58
3.6.1 PZR-RFLP değerlendirmesi için kullanılan genetik çeşitlilik ve populasyon genetik yapısı analizleri.....	58
3.6.2 DNA dizi analizi değerlendirmesi için kullanılan genetik çeşitlilik ve populasyon genetik yapısı analizleri	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	61
4.1 PZR-RFLP Çalışması Bulguları.....	61
4.1.1 mtDNA Sitokrom <i>b</i> bölgesine ait PZR-RFLP çalışması.....	61
4.1.1.1 Sitokrom <i>b</i> bölgesi <i>Mbo</i> I kesim enzimi sonuçları.....	61
4.1.1.2 Sitokrom <i>b</i> bölgesi <i>Hae</i> III kesim enzimi sonuçları.....	63
4.1.1.2 Sitokrom <i>b</i> bölgesi <i>Rsa</i> I kesim enzimi sonuçları.....	64
4.1.1.3 Sitokrom <i>b</i> bölgesi PZR-RFLP sonuçlarının değerlendirilmesi	65

4.1.2 mtDNA D-loop bölgesine ait PZR-RFLP çalışması	66
4.1.2.1 D-loop bölgesi <i>MboI</i> kesim enzimi sonuçları	67
4.1.2.3 D-loop bölgesi <i>HinfI</i> kesim enzimi sonuçları	68
4.1.2.4 D-loop bölgesi PZR-RFLP sonuçlarının değerlendirilmesi	70
4.1.3 Sitokrom <i>b</i> ve D-loop bölgesi'nin beraber analizi	71
4.2 mtDNA Sitokrom <i>b</i> Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları	73
4.2.1 Sitokrom <i>b</i> bölgesi filogenetik analizi sonuçları	73
4.2.2 Sitokrom <i>b</i> bölgesi genetik çeşitlilik analizleri	82
4.3 mtDNA D-loop Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları	90
4.3.1 D-loop bölgesi filogenetik analizleri	90
4.3.2 D-loop bölgesi genetik çeşitlilik analizleri	98
4.4 mtDNA Sitokrom <i>b</i> ve D-loop Bölgelerinin Bitiştirilmesi Analizeri	106
4.5 Evrimsel Ayrılma Zamanları	108
5. TARTIŞMA	110
5.1 MtDNA Sitokrom <i>b</i> ve D-loop Bölgeleriyle Yapılan Analizlerin Karşılaştırılması	110
5.2 <i>A. mystacinus</i> Populasyonlarının Alttür Dağılımları	111
5.3 <i>A. mystacinus</i> Populasyonlarının Evrimi	113
5.3.1 Girit populasyonlarının durumu	115
5.3.2 <i>A. m. symrnensis</i> populasyonlarının durumu	115
5.3.3 Batı ve Doğu Karadeniz populasyonları arasındaki farklılaşma	115
5.3.4 Ege ve Güney Batı Anadolu populasyonları arasındaki farklılaşma	116
5.3.5 <i>A. m. euxinus</i> populasyonlarının durumu	117
6. SONUÇ	119
KAYNAKLAR	121
EKLER	136

EK 1 Sitokrom <i>b</i> bölgesinin <i>MboI</i> enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan her kesim tipi için <i>A. mystacinus</i> popülasyonlarına ait yaklaşık tanıma bölgeleri.....	134
EK 2 Sitokrom <i>b</i> bölgesinin <i>HaeIII</i> enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan her kesim tipi için <i>A. mystacinus</i> popülasyonlarına ait yaklaşık tanıma bölgeleri.....	136
EK 3 Sitokrom <i>b</i> bölgesinin <i>RsaI</i> enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan her kesim tipi için <i>A. mystacinus</i> popülasyonlarına ait yaklaşık tanıma bölgeleri.....	138
EK 4 Sitokrom <i>b</i> bölgesine ait haplotipler	140
EK 5 D-loop bölgesine ait haplotipler	156
EK 6 Kimura 2-parametresi (K2P) model alınarak gerçekleştirilen, bitleştirilmiş dizlere ait Neighbour Joining ağacı.....	166
EK 7 TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, bitleştirilmiş dizlere ait Maximum Parsimony ağacı	167
EK 8 HKY+G modeline göre oluşturulan, bitleştirilmiş dizlere ait Maximum Likelihood ağacı.....	168
ÖZGEÇMİŞ.....	169

KISALTMALAR

%	Yüzde
+	Artı
π	Nükleotid çeşitliliği
°C	Santigrat derece
2n	Diploid Kromozom Sayısı
α	Transisyon
β	Transversiyon
μ l	Mikro litre
A	Adenin
AIC	Akaike Information Criterion (Akaike Bilgi Kıstası)
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
BIC	Bayesian Information Criterion (Bayesian Bilgi Kıstası)
BPP	Bayesian Posterior Probabilities (Bayesian Ön Olasılıkları)
bç	Baz çifti
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleotid trifosfat
F _{ct}	Gruplar arası fiksasyon indeksi
F _{sc}	Grup için popülasyonlar arası fiksasyon indeksi
F _{st}	Gruplar arası popülasyonlar arası fiksasyon indeksi
F _{ST}	Genetik Farklılaşma
HKY+G	Gamma parametrelili Hasegawa, Kishino and Yano mutasyon modeli
G	Guanin
N _m	Gen Akışı
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MgCl ₂	Magnezyum diklorür
ML	Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood)
MP	Maksimum Tutumluluk (Maximum Parsimony)
mtDNA	Mitokondriyal DNA

nmol	Nano mol
NJ	Neighbour Joining
pmol	Pika mol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment of Length Polymorphism
T	Timin
TN93+G+I	Gamma ve invariable parametreli Tamura-Nei 1993 modeli
ti/tv	Transisyon/transversiyon
TBR	Tree-bisection-reconnection
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Ortalamalara Bağlı Ağırlıksız Çift Grup Metodu)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>A.mystacinus</i> 'un Palearktik Bölge'deki yayılış alanı.....	3
Şekil 2.1 <i>A. mystacinus</i> 'un Türkiye'deki yayılış alanı.....	9
Şekil 2.2 <i>A. mystacinus</i> 'un yaşam alanı.....	9
Şekil 2.3 <i>A. mystacinus</i> 'un post karakterleri.....	10
Şekil 2.4 <i>A. mystacinus</i> 'un Ardanuç'tan elde edilen erkek bireyinin karyotip zimogramı (Çolak vd. 2004).....	11
Şekil 2.5 <i>A. mystacinus</i> alttürlerinin tanımlanan tip yerlerine göre yayılış alanları.....	12
Şekil 2.6 Replikasyon mekanizması.....	13
Şekil 2.7 Nükleotid değişimleri	14
Şekil 2.8 Çerçeve kayması mutasyonları	15
Şekil 2.9 Slipped strand mispairing mutasyonu.....	15
Şekil 2.10 Transpozon elementleri.....	16
Şekil 2.11 Mitoz mekanizması.....	17
Şekil 2.12 Mayoz bölünme.....	17
Şekil 2.13 Mayoz sırasında meydana gelen parça değişimi (crossing over) olayı.....	18
Şekil 2.14 Rekombinant DNA teknolojisi.....	21
Şekil 2.15 Primer-kalıp bağlanması.....	22
Şekil 2.16 Denatürasyon.....	23
Şekil 2.17 Bağlanma.....	24
Şekil 2.18 Polimeraz enzimi bağlanması ve zincir uzaması.....	24
Şekil 2.19 Bir zincir reaksiyonu olan PZR.....	25
Şekil 2.20 Restriksiyon endonükleazlarla (<i>EcoRI</i>) DNA kesimi ve sonrasında oluşan yapışkan uçlar.....	27
Şekil 2.21 Geleneksel RFLP metodu.....	29
Şekil 2.22 PZR-RFLP metodu.....	29
Şekil 2.23 Deoksiriboz ve dideoksiriboz yapısındaki nükleotid.....	30
Şekil 2.24 Dört tip dNTP'nin formüsel görünümü.....	31
Şekil 2.25 ddNTP bağlanması sonucu duran DNA sentezi sonucunda oluşan fragmentler.....	31
Şekil 2.26 Sanger metodunun manuel uygulaması.....	32
Şekil 2.27 Otomatik DNA dizileme yöntemi.....	33
Şekil 2.28 Mitokondri ve plastid genomlarının karşılaştırmalı görüntüsü	34

Şekil 2.29 a. Mitokondrinin elektron mikroskobu görüntüsü ve şematik gösterimi	
b. Mitokondrinin enerji eldesi mekanizmasının şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.30 Mitokondriyal DNA yapısı ve içerdiği gen bölgeleri	
(Altukhov ve Salmenkova 2002).....	36
Şekil 2.31 Memelilerde mtDNA kontrol bölgesinin şematik diyagramı	
(Doda vd. 1981, Matson ve Baker 2001.....	37
Şekil 2.32 Populasyonların genetik çeşitliliğine etki eden unsurlar (Freeland 2005)....	43
Şekil 2.33 Filogenetik analizlerde kullanılan modeller (Simon vd. 2006).....	44
Şekil 3.1 Türkiye’den toplanan <i>A. mystacinus</i> ’a ait örneklem lokaliteleri.....	45
Şekil 3.2 Sitokrom <i>b</i> bölgesinin PZR amplifikasyonu sonucu ortaya	
çıkan jel görüntüsü.....	54
Şekil 3.3 D-loop bölgesinin PZR amplifikasyonu sonucu ortaya çıkan jel görüntüsü...55	
Şekil 4.1 mtDNA sitokrom <i>b</i> bölgesinin <i>MboI</i> kesimi	62
Şekil 4.2 mtDNA sitokrom <i>b</i> bölgesinin <i>HaeIII</i> kesimi	63
Şekil 4.3 mtDNA sitokrom <i>b</i> bölgesinin <i>RsaI</i> kesimi	64
Şekil 4.4 Sitokrom <i>b</i> bölgesi PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen UPGMA	
ağacı (Nei 1987) (%50’nin altındaki bootstrap değerleri gösterilmemiştir)....	65
Şekil 4.5 mtDNA D-loop bölgesinin <i>MboI</i> kesimi.....	67
Şekil 4.6 mtDNA D-loop bölgesinin <i>BfaI</i> kesimi.....	68
Şekil 4.7 mtDNA D-loop bölgesinin <i>HinfI</i> kesimi.....	69
Şekil 4.8 D-loop bölgesi PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen UPGMA ağacı.....	70
Şekil 4.9 mtDNA verilerinin bitleştirilmesiyle oluşturulan UPGMA ağacı.....	72
Şekil 4.10 Bitleştirilmiş verilere göre çizilen temel bileşenler analizi (PCA).....	73
Şekil 4.11 Sitokrom <i>b</i> bölgesinin filogenetik analizleri sonucu ortaya konulan gen	
ağaçlarındaki gruplara ait populasyonlar (Grup 1: turuncu, Grup 2:	
pembe ve Grup 3: mavi renkle gösterilmektedir)	76
Şekil 4.12 Kimura 2-parametresi (K2P) model alınarak gerçekleştirilen,	
Sitokrom <i>b</i> bölgesine ait Neighbour Joining ağacı (%50’nin altındaki	
bootstrap değerleri çöktürülmüştür).....	77
Şekil 4.13 TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, Sitokrom <i>b</i>	
bölgesine ait Maximum Parsimony ağacı (%50’nin altındaki bootstrap	
değerleri çöktürülmüştür).....	78

Şekil 4.14 TN93+G+I modeline göre oluşturulan, Sitokrom <i>b</i> bölgesine ait Maximum Likelihood ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür).....	79
Şekil 4.15 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, Sitokrom <i>b</i> bölgesine ait filogenetik ağaç (BPP-Bayesian posterior probability değerleri her dal için gösterilmektedir).....	80
Şekil 4.16 Sitokrom <i>b</i> bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı. Haplotipler arasındaki mutasyonlar (1'den fazla nükleotidde değişiklik gösterenler) dalların üzerine yerleştirilmiştir.....	81
Şekil 4.17 <i>A. mystacinus</i> 'a ait 1. Grup populasyonların sitokrom <i>b</i> bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	85
Şekil 4.18 <i>A. mystacinus</i> 'a ait 2. Grup populasyonların sitokrom <i>b</i> bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	85
Şekil 4.19 <i>A. mystacinus</i> 'a ait 3. Grup populasyonların sitokrom <i>b</i> bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	85
Şekil 4.20 <i>A. mystacinus</i> 'un 1. Grup populasyonlarında sitokrom <i>b</i> dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (F_{ST}) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği.....	87
Şekil 4.21 <i>A. mystacinus</i> 'un 2. Grup populasyonlarında sitokrom <i>b</i> dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (F_{ST}) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği.....	88
Şekil 4.22 <i>A. mystacinus</i> 'un 3. Grup populasyonlarında sitokrom <i>b</i> dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (F_{ST}) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği.....	88
Şekil 4.23 D-loop bölgesinin filogenetik analizleri sonucu ortaya konulan gen ağaçlarındaki gruplara ait populasyonlar (Grup 1: turuncu, Grup 2: pembe ve Grup 3: mavi renkle gösterilmektedir).....	92
Şekil 4.24 Kimura 2-parametresi (K2P) model alınarak gerçekleştirilen, D-loop bölgesine ait Neighbour Joining ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)	93
Şekil 4.25 TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, D-loop bölgesine ait Maximum Parsimony ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür).....	94
Şekil 4.26 HKY+G modeline göre oluşturulan, D-loop bölgesine ait Maximum Likelihood ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)...	95

Şekil 4.27 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, D-loop bölgesine ait filogenetik ağaç.....	96
Şekil 4.28 D-loop bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı. Haplotipler arasındaki mutasyonlar (1'den fazla nükleotidde değişiklik gösterenler) dalların üzerine yerleştirilmiştir.	97
Şekil 4.29 <i>A. mystacinus</i> 'a ait 1. Grup populasyonların D-loop bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	101
Şekil 4.30 <i>A. mystacinus</i> 'a ait 2. Grup populasyonların D-loop bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	101
Şekil 4.31 <i>A. mystacinus</i> 'a ait 3. Grup populasyonların D-loop bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri.....	101
Şekil 4.32 <i>A. mystacinus</i> 'un 1. Grup populasyonlarında D-loop dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (FST) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği.....	103
Şekil 4.33 <i>A. mystacinus</i> 'un 2. Grup populasyonlarında D-loop dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (FST) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği.....	104
Şekil 4.34 <i>A. mystacinus</i> 'un 3. Grup populasyonlarında D-loop dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (FST) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği.....	104
Şekil 4.35 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, mtDNA sitokrom <i>b</i> ve D-loop bölgelerinin beraber analiz edilmesiyle oluşturulan bitleştirilmiş filogenetik ağacı (concatenated phlogenetic tree).....	107
Şekil 4.36 Sitokrom <i>b</i> dizileri kullanılarak elde edilen moleküler tarihlleme analizi sonuçları (tüm sonuçlar Myö, milyon yıl önce, olarak verilmiştir).....	108
Şekil 5.1 Tez çalışması sonucu <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının oluşturduğu gruplar ve bunların dağılımı.....	110
Şekil 5.2 Miyosen döneminde Avrupa ile Anadolu arasındaki bağlantı (MT: Menderes-Toros Bloğu, Kırmızı sınırlar günümüzdeki sınırları göstermektedir).....	112
Şekil 5.3 Pliosen döneminde Anadolu İç Gölü ve buna bağlı Menderes ve Kızılırmak Nehirleri.....	115
Şekil 5.4 Pliosen sonlarında oluşumu tamamlanan Anadolu Diyagonali ve Toroslar arasındaki ilişkiyi kesen Seyhan Nehri.....	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Moleküler belirteçler ve uygulama alanları.....	20
Çizelge 3.1 Analizlerde kullanılan örnekler ve lokaliteleri.....	46
Çizelge 3.2 Dış grup olarak Türkiye’den kullanılan örnekler.....	49
Çizelge 3.3 Analizlerde kullanılan GeneBank örnekleri.....	49
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan örneklerin DNA miktar ve saflık analizleri.....	51
Çizelge 3.5 RFLP çalışması için çoğaltılan sitokrom <i>b</i> bölgesi’ne ait PZR protokolü.....	54
Çizelge 3.6 RFLP çalışması için çoğaltılan D-loop bölgesi’ne ait PZR protokolü.....	55
Çizelge 3.7 Kesim enzimleri ve çalışma koşulları.....	56
Çizelge 3.8 DNA dizi analizi çalışması için kullanılan D-loop bölgesi’ne ait PZR protokolü.....	57
Çizelge 4.1 Sitokrom <i>b</i> bölgesi <i>MboI</i> enzimi kesim tipleri.....	62
Çizelge 4.2 Sitokrom <i>b</i> bölgesi <i>HaeIII</i> enzimi kesim tipleri.....	64
Çizelge 4.3 Sitokrom <i>b</i> bölgesi <i>RsaI</i> enzimi kesim tipleri.....	65
Çizelge 4.4 Sitokrom <i>b</i> PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen genetik çeşitlilik değerleri.....	66
Çizelge 4.5 Sitokrom <i>b</i> PZR-RFLP sonucu elde edilen populasyonlar arası genetik farklılaşma (<i>Gst</i>) ve gen akışı (<i>Nm</i>) değerleri.....	66
Çizelge 4.6 D-loop bölgesi <i>HinfI</i> enzimi kesim tipleri.....	69
Çizelge 4.7 D-loop PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen genetik çeşitlilik değerleri (<i>Nei</i> 1987).....	71
Çizelge 4.8 D-loop PZR-RFLP sonucu elde edilen populasyonlar arası genetik farklılaşma (<i>Gst</i>) ve gen akışı (<i>Nm</i>) değerleri (<i>Nei</i> 1987)....	71
Çizelge 4.9 Dizi analizi çalışmalarında kullanılan türler ve bunlara ait örnek sayıları	73
Çizelge 4.10 Nükleotidler arasındaki transisyon ve transversiyon değişim oranları (koyu yazılan sayılar transisyon değişimlerini gösterirken italik yazılanlar transversiyon oranlarını göstermektedir.).....	74
Çizelge 4.11 Sitokrom <i>b</i> bölgesine göre elde edilen haplotipler ve bunların ait oldukları populasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde)	74
Çizelge 4.12 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının sitokrom <i>b</i> dizilerine ait genetik çeşitlilik değerleri.....	83

Çizelge 4.13 K2P modeli kullanılarak sitokrom <i>b</i> bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan, <i>A. mystacinus</i> populasyonları arasındaki mesafe değerleri.....	83
Çizelge 4.14 Sitokrom <i>b</i> bölgesinin AMOVA analizleri için kullanılan grup ve populasyonlar.....	83
Çizelge 4.15 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının sitokrom <i>b</i> bölgelerine ait Amova çizelgesi	84
Çizelge 4.16 <i>A. mystacinus</i> grupları arasındaki sitokrom <i>b</i> bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) ve gen akışı (Nm) değerleri (üst diyagonal: Nm , Alt diyagonal: F_{ST})	84
Çizelge 4.17 <i>A. mystacinus</i> gruplarının alt populasyonları arasındaki sitokrom <i>b</i> bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) değerleri.....	85
Çizelge 4.18 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının sitokrom <i>b</i> bölgesine bağlı uyumsuzluk analizi (mismatch distribution) sonuçları	85
Çizelge 4.19 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının sitokrom <i>b</i> bölgesine göre yapılan populasyon darboğazı analizleri.....	87
Çizelge 4.20 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının sitokrom <i>b</i> verilerine göre genetik ve coğrafi mesafelerini arasındaki ilişkinin hesaplandığı Mantel testi.....	88
Çizelge 4.21 D-loop bölgesi dizi analizi çalışmalarında kullanılan türler ve bunlara ait örnek sayıları	90
Çizelge 4.22 D-loop bölgesindeki nükleotidler arasındaki transisyon ve transversiyon değişim oranları	90
Çizelge 4.23 D-loop bölgesine göre elde edilen haplotipler, bunların ait oldukları populasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde)	91
Çizelge 4.24 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının D-loop dizilerine ait genetik çeşitlilik değerleri.....	99
Çizelge 4.25 K2P modeli kullanılarak D-loop bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan, <i>A. mystacinus</i> populasyonları arasındaki mesafe değerleri	99
Çizelge 4.26 D-loop bölgesinin AMOVA analizleri için kullanılan grup ve populasyonlar	99
Çizelge 4.27 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının D-loop bölgelerine ait AMOVA çizelgesi	100

Çizelge 4.28 <i>A. mystacinus</i> grupları arasındaki D-loop bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) ve gen akışı (Nm) değerleri (üst diyagonal: Nm, Alt diyagonal: F_{ST}).....	100
Çizelge 4.29 <i>A. mystacinus</i> gruplarının alt populasyonları arasındaki D-loop bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) değerleri.....	101
Çizelge 4.30 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının D-loop bölgesine bağlı uyumsuzluk analizi (mismatch distribution) sonuçları	101
Çizelge 4.31 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının D-loop bölgesine göre yapılan populasyon darboğazı analizleri.....	103
Çizelge 4.32 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının D-loop verilerine göre genetik ve coğrafi mesafeleri arasındaki ilişkinin hesaplandığı Mantel testi.....	104
Çizelge 4.33 Bitişik dizilerden elde edilen haplotipler ve bunların ait oldukları populasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde).....	106
Çizelge 5.1 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarında çalışılan gen bölgeleri arasındaki gamma şekil parametresi (α) ve T_i/T_v (R) oranları	111
Çizelge 5.2 <i>A. mystacinus</i> populasyonlarının yayılış gösterdiği bölgelere ait nükleotid çeşitlilikleri	114

1. GİRİŞ

Türkiye, Palearktık Bölge'de yer alan, Trakya bölgesi ile Avrupa'ya, Anadolu Yarımadası'yla da Asya'ya bağlantısı bulunan bir kara parçasıdır. Kıtalar arasında yer almasından dolayı birçok hayvan taksonunun bölgenin batısından doğusuna, kuzeyinden güneyine yayılımına izin veren bir geçiş bölgesi özelliği taşımaktadır (Kosswig 1955, Demirsoy 2002). Ayrıca sıradağlar (Anadolu Diyagonalı, Toroslar ve Kuzey Anadolu Dağları), Orta Anadolu Platosu, Marmara Denizi ve Orta Anadolu Göl Sistemi gibi geçmişten günümüze gen akışını engelleyen birçok bariyeri de içermektedir (Bilgin 2011). Birçok canlı grubunun evrimsel olarak farklılaşması, bu bariyerlerin etkisi ile gerçekleşmiş olup özellikle buzul ve buzul arası dönemlerde bu bariyerler, geçişleri büyük ölçüde engellediği için popülasyon farklılaşmalarına ya da yayılışların sınırlandırılmasına neden olmuştur (Demirsoy 2002). Türkiye ılıman bir iklime sahip olmasına rağmen, doğu-batı yönünde kuzey ve güney sahillerine paralel uzanan sıradağlar bir bölgeden diğerine iklimsel değişikliklere neden olmuştur (Yılmaz vd. 2010).

Pleistosen (1,7 - 0.01 Myö) ve Holosen dönemlerini (0,01 Myö - →) içeren Kuvaterner devirde meydana gelen iklimsel dalgalanmalar, birçok popülasyonun besin ihtiyaçları nedeniyle göç ederek yayılış alanlarını değiştirmelerine neden olup, bu yolla yeni popülasyonların oluşmasını sağlamıştır (Webb ve Bartlein 1992, Hewitt 1996, 1999, 2000). Buzul dönem sırasında Avrupa'nın güney bölgesi, ılıman türlerin hayatta kalabileceği bir bitki örtüsüyle kaplanmıştır ve bu bölgeler birçok popülasyon için sığınak olarak görev yapmıştır (Hewitt 1996, Taberlet vd. 1998). Türkiye (özellikle Anadolu), hem buzul hem de buzul arası dönemde birçok taksona besin ve sığınma imkanı sağlayan bu sığınaklardan biri olup topografik durumundan dolayı heterojen bir yapıdadır (Hewitt 1996, Çıplak vd. 2010). Anadolu'nun bu topografik yapısı, enlemsel yayılım için bir dağılım koridoru oluşturarak ve boylamsal göçler sırasında uygun habitatları sağlayarak Pleistosen döneminde taksonların hareketleri sırasında önemli bir rol oynamıştır (Çıplak 2004).

Türlerin günümüzdeki durumunu ve tür içi varyasyonlarını açıklamak için pleistosen döneminde gerçekleşen buzul olaylarını ve iklimsel dalgalanmaları göz önünde bulundurmak gerekmektedir (Deffontaine vd. 2005). Küçük memeliler üzerine yapılan son moleküler analizler varolan türlerin şu anki yayılışlarının oluşmasında son 10 milyon yılın (Üst Miyosen'den günümüze) çok önemli olduğunu ortaya koymuştur (Serizawa vd. 2000, Conroy ve Cook 2000, Michaux vd. 2002, 2003 ve 2004, Jaarola vd. 2004, Suzuki vd. 2003, 2004 ve 2008, Deffontaine vd. 2005, Macholan vd. 2007, Hürner vd. 2010). Çeşitli küçük memeli grupları içinde Muridae familyasına dahil olan orman faresi *Apodemus*, ılıman Avrasya'daki en yaygın kemirici olmakla beraber biyocoğrafik çalışmalar için en iyi örneklerden biridir (Suzuki vd. 2008).

Apodemus türleri, Palearktik bölgenin ılıman kısımlarındaki geniş yapraklı ağaçların hakim olduğu ormanlarda yaşarlar. Meşe palamutu, böcekler ve diğer küçük omurgalıları içeren orman kaynaklarına büyük ölçüde bağımlıdırlar (Serizawa vd. 2000). *Apodemus* üyeleri türe özgü sınırlı yayılış göstermekle beraber aynı ormanda sıklıkla iki veya daha fazla tür beraber yaşayabilmektedir (Suzuki vd. 2008). *Apodemus*'a ait 20'den fazla tür tanımlanmış olup bunların yarısı Asya'da yayılış gösterirken diğer yarısı Avrupa'da yayılış göstermektedir (Bellinvia vd. 1999, Serizawa vd. 2000, Bellinvia 2004). Bugüne kadar çalışılan taksonlar için 4 farklı soy ortaya konulmuştur: *Sylvaemus* (Ognev 1924) altcinsi (*A.sylvaticus*, *A.flavicollis*, *A.uralensis*, *A.mystacinus*, *A.fulvipectus*, *A.whitherbyi*, *A.alpicola*, *A.arianus*, *A.hyrceanicus*, *A.ponticus*, *A.rusipes*, *A.wardi*), *Apodemus* (Kaup 1829) altcinsi (*A.agrarius*, *A.chevrieri*, *A.speciosus*, *A.peninsulae*, *A.latorum*, *A.droco*, *A.semotus*), *Argenteus* altcinsi (*A.argenteus*) ve *Gurkha* altcinsi (*A.gurkha*) (Suzuki vd. 2008).

Kayalık faresi *Apodemus mystacinus* (Danford ve Alston 1877) Doğu Akdeniz'in kayalık bölgelerine özelleşmiştir. Kayalıklı ormanlık alanlar ve küçük çalılıklarla kaplı kayalık bölgelerde deniz seviyesinden 2700 m yüksekliğe kadar yaşarlar (Çolak vd. 2004). Yayılış alanı Balkan Yarımadasından (Eski Yugoslavya, Arnavutluk, Bulgaristan ve Yunanistan) Orta Doğu'ya (Türkiye, Transkafkasya, Suriye, Ürdün, Lübnan, İsrail ve Irak) uzanmaktadır (Vohralik vd. 2002) (Şekil 1). Doğu Akdeniz'deki bazı adalardan da kaydı verilmiştir (Storch 1977, Niethammer 1978).



Şekil 1.1 *A. mystacinus*'un Palearktik Bölge'deki yayılış alanı

Büyük vücut ölçüsü ve kürkünün koyu gri renklenmesi gibi farklı morfolojik karakterlerle Avrupa'daki diğer *Apodemus* türlerinden kolaylıkla ayrılabilir (Michaux vd. 2005). Bundan dolayı bazı yazarlar tarafından *Sylvaemus*'a dahil edilirken (Musser vd. 1996), bazıları da morfolojik, kromozomal ve genetik verilere dayanarak bu türün geçerliliği tartışmalı olan *Karstomys* altcinsine dahil olduğunu ileri sürmektedirler (Rietschel ve Storch 1974, Storch 1977, Martin vd. 2000, Filippucci vd. 2002).

A. mystacinus 'un atası olan *A. primaevus*, Miyosen'in sonundan itibaren (yaklaşık 5-7 Myö) Avrupa'da kendini göstermiştir (Michaux ve Posquiner 1974, Michaux vd. 1997). Ancak gerçek *A. mystacinus* Orta Pliyosen'de ortaya çıkmıştır (Martin-Suarez ve Mein 1998). Bu dönem sırasında diğer kemiricilerle rekabetten dolayı daha az yoğunlukta olsalar da, bu türler Avrupa boyunca geniş bir alanda yayılmışlardır (Michaux ve Posquiner 1974). Tür içinde öncelikle 2 alttür tanımlanmıştır: Balkan Yarımadası'nda yayılış gösteren (tip yeri: Parnas Dağları, Yunanistan) *A. m. epimelas* (Nehring 1902) ve Türkiye ve Orta Doğu'da yayılış gösteren (tip yeri: Bolkar Dağları, Türkiye) *A. m. mystacinus* (Danford ve Alston 1877). Bu sınıflandırma, Spitzenberger (1973) tarafından, morfolojik çalışmalar temel alınarak yapılmıştır. Storch (1977), Kuzey Avrasya'da yayılış gösteren *Apodemus* türlerinin sistematik revizyonunda, paleontolojik verilere dayanarak, *A. epimelas* ve *A. mystacinus* 'un 2 farklı tür olduğunu dikkate almıştır. Bu görüş Mezhzherin (1997) tarafından da kabul görmüştür. Filippucci vd.

(2002) tarafından yapılan allozim çalışmasında bu iki taksonun tür olarak değerlendirilebileceği ortaya konmuştur. Michaux vd. (2005) ise mitokondriyal ve nükleer genleri kullanarak yaptıkları genetik çalışmalarında *A. epimelas* ve *A. mystacinus* 'un 2 farklı soy olduklarını göstermişlerdir.

A. m. rhodius (Festa 1914) olarak adlandırılan diğer bir alttür ise Girit, Karpatlar ve Rodos Adaları'nda tanımlanmıştır. Ellerman (1948), yaptığı morfolojik çalışmalarla bu alttürün *A. m. mystacinus*'un sinonimi olduğunu söylemiştir. Vohralik vd. (2002) de Girit örneklerinin Asya popülasyonlarına benzer olduklarını ortaya koymuştur. Bu durum Çolak vd. (2004)'nin Doğramacı (1972)'nin örnekleriyle karşılaştırarak yaptıkları morfolojik çalışmalarla da desteklenmişse de Michaux vd. (2005), *A. m. rhodius*'un sadece Ege Adaları'nda değil Türkiye'nin Güney Batısı'nda da yayılış gösterdiğini öne sürmüştür. Olgun vd. (2009) tarafından Güney Batı Anadolu örneklerinin Türkiye'deki diğer popülasyonlardan farklılaştığını ortaya koyan RAPD çalışmasıyla da bu alttürün Türkiye'deki varlığı desteklenmiştir.

A. m. symrnensis'in Thomas (1903) tarafından Türkiye'nin batısından kaydı verilmiştir. Neuhaser (1936) bu alttürün Toroslar'da da yayılış gösterdiğini belirtmiş olsa da Ellerman (1948) yaptığı çalışmada bunun *A. m. mystacinus*'un sinonimi olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum Ellerman ve Morrison-Scott (1951)'un çalışmalarıyla da desteklenmiştir. Çolak vd. (2004), Doğramacı (1972)'nin örnekleriyle karşılaştırarak yaptıkları morfolojik çalışmalarında yine bu alttürün *A. m. mystacinus*'un sinonimi olduğunu ortaya koymuş olsalar da Çolak vd. (2007) tarafından esteraz enzimi varyasyonları kullanılarak yapılan allozim çalışması ve Olgun vd. (2009) tarafından yapılan RAPD çalışması Türkiye'nin batısında yayılış gösteren ve diğer *A. mystacinus* popülasyonlarından farklılaşan bir soyun olduğunu göstermiştir.

Türkiye'de yayılış gösterdiği düşünülen *A. m. euxinus* (Allen 1915), ilk olarak Altındere, Trabzon'dan kaydedilmiştir. Neuhaser (1936), bu alttürün sadece kayıt yerinden değil Artvin'den Soğukpınar (Bursa)'a kadar yayılış gösterdiğini ortaya koymuştur. Ellerman ve Morrison-Scott (1951), bu alttürün varlığını destekleseler de Vohralik vd. (2002) bunun geçerli bir alttür olmadığını ileri sürmüşlerdir. Çolak vd. (2004) tip yerinden alınan *A. m. euxinus* örneklerinin Türkiye'nin Güney Doğu'sundan

alınan örneklerle beraber kümелendiğini ancak *euxinus*'un daha koyu renklenmeye sahip olmasıyla diğer popülasyonlardan farklılaştığını ortaya koymuşlardır. Doğu Karadeniz ve Doğu-Güney Doğu popülasyonlarının benzerliği Olgun vd. (2009)'nin RAPD analizleri sonucuyla da desteklenmiştir. Ancak Çolak vd. (2007)'nin esteraz varyasyonlarını değerlendirdiği allozim çalışması, bu türün yayılış alanının Altındere'den Akçakoca (Bolu)'ya kadar uzandığı ve Ardanuç (Artvin) örneklerinin bunlardan farklılaştığını göstermiştir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde *A. mystacinus* alttürlerinin geçerliliği konusunda çelişkili sonuçlar olduğu görülmektedir. Özellikle morfolojik çalışmalar alttür varyasyonlarını ortaya koymakta yetersiz kalırken, moleküler çalışmaların soyları belirlemede daha etkin olduğu görülmektedir.

Son 3 milyon yıl içerisinde global iklim dalgalanmaları, buzul devirlerin oluşmasına öncülük etmiştir ve bunun kaçınılmaz bir sonucu olarak boreal, ılıman ve tropikal alanlarda yaşayan birçok organizmanın yayılış alanlarında büyük değişiklikler olmuştur (Hewitt 2000). Bu tarz bölgesel değişikliklerin genetik sonuçlarının olması beklenir ve moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, bu durumun araştırılabilmesi için en uygun belirteçleri ortaya koymuştur. Bir türün yayılış alanı boyunca genetik çeşitliliğini etkili bir şekilde ölçmek için önce allozimler, daha sonra RFLP belirteçleri ve son zamanlarda da mitokondriyal ve nükleer DNA fragmentleri kullanılmıştır.

DNA filogenileri, popülasyonların coğrafi yayılışları ile ilgili olan soylar, alttürler ve türleri ortaya koyabilmektedir (Hewitt 1996). Hayvan mitokondriyal DNA (mtDNA)'sı ve kodlanmayan nükleer gen bölgeleri filocoğrafik çalışmalarda kullanılarak, popülasyonların ve taksonların evrimini ve özellikle Pleistosen sırasındaki biyocoğrafik tarihinin anlaşılmasında yarar sağlamaktadırlar (Avice vd. 1998, Michaux vd. 2002, 2003 ve 2004, Jaarola vd. 2004, Suzuki vd. 2003, 2004 ve 2008, Hewitt 2004, Deffontaine 2005 ve 2009, Macholan vd. 2007, Hürner vd. 2010, Avice ve Tatarenkov 2012, Helvacı vd. 2012). mtDNA çalışmaları, tür içi evrimi, filogenetik bakış açısıyla anlamak için bilgi verici araçlardır. Aynı türden köken alan taksonların (konspesifik) hiyerarşik dallanmadan ziyade, anastomik (ortak atadan köken alıp ayrılan iki soyun

tekrar birleşmesi) dallanma göstermelerinden dolayı önceleri eşeyli üreyen organizmalarda filogeni oluşturmanın tür içi seviyede anlamsız olduğu düşünülmüştür (Avice 2000). Ancak mtDNA aktarımının maternal olması bu çalışmalardaki gen ağaçlarının hiyerarşik dallanma göstermesini sağlamıştır ve böylece bu genom kullanılarak filogenetik bakış açısıyla organizmanın kökeni değerlendirilebilmektedir (Avice 2000).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde *A. mystacinus* 'un alttürlerinin ayrımında çelişkiler olduğu ve özellikle alttürlerin yayılış gösterdiği öne sürülen bölgelerden yeterince örnek kullanılmadığı ya da örneklem sayısı yeterli olsa bile kullanılan yöntemlerin bunların ayrımını sağlamada yetersiz olduğu görülmektedir. Bu kapsam doğrultusunda bu çalışmanın amacı mtDNA gen bölgelerinin dizi analizleri ve PCR-RFLP metoduyla *A. mystacinus* populasyonlarında tür içi genetik farklılaşmayı etkileyen evrimsel süreçler değerlendirilerek populasyonların nasıl ve ne zaman farklılaştıkları araştırılıp *A. mystacinus* 'un taksonomik durumunu ortaya koymaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Regnum : Animalia

Classis : Mammalia

Subclassis : Eutheria

2.1 Ordo: Rodentia

Rodentia ordosu 29 familya, 400'ü aşkın cins ve 2800'ün üzerinde türüyle memeli sınıfının en büyük takımıdır (Ognev 1947, Wilson ve Reeder 1993). Antartika ve Kutuplar, Yeni Zelanda ve birkaç okyanus takımadası hariç tüm karalara yayılmışlardır. Bu hayvanlar kara, ağaç, toprak altı ve yarı sucul olarak çok farklı habitatlarda yayılış gösterebilirler. Çiğneme kasları ve kafa yapıları, kemiricileri sınıflandırmak için önemli kriterlerdir.

Rodentia takımını diğerlerinden ayıran en önemli diagnostik karakter, köpek dişleri ve ön azı dişlerinin kaybolması ile oluşan diestema boşluğudur. Kesiciler altta ve üstte tek bir çifte indirgenmiştir. Bu dişler, açık köklerden sürekli olarak gelişirler ve keski şeklinde bir kesici kısma sahiptirler. Alttaki kesiciler özellikle geriye doğru çenenin boğumlu bir kısmına ulaşınca kadar uzayan uzun bir oyuk içinde yer edinirler.

Bazı türlerde besinin toplanmasına yarayan yanak keseleri vardır. Mideleri basit, kör bağırsakları uzundur. Kuyrukları uzun, bazı türlerde pullarla örtülüdür. Toprak altında tüneller kazarak yaşayanlarda tırnaklar gelişmiştir. Gözler yaşam biçimine bağlı olarak farklı büyüklükte olabilirler. Toprak altında yaşayanlarda gözler küçülmüş hatta bazı türlerde körelerek deri altında kalmıştır. Gececil olanlarda ise oldukça büyüktür. Kulaklar da yaşam biçimine göre değişik şekiller gösterirler. Örneğin toprak altında ve suda yaşayanlarda oldukça küçülmüştür. Gebelik süreleri 14–170 gün arasında değişir. Çoğunluğu yılda birkaç defa doğururlar ve her defasında 1–18 yavru yaparlar. Küçük kemiriciler iki yıldan daha az yaşarlar.

2.2 Familia: Muridae (Fareler ve Sıçanlar)

Vücut büyüklüğü ev faresinden sıçan büyüklüğüne kadar değişir. Kuyruk uzun, bedeninin 2/3 kadarıdır. Kulaklar, gözler ve ardayaklar nispeten büyüktür. Molarlar daima köklü ve çiğneme yüzeylerinin üstü kabarık çıkıntılıdır. Kafatasında büyük infroorbital kanal bulunur. Beslenme, çok çeşitli olup tohum ve meyveleri tercih ederler. Kış uykusuna yatmazlar.

2.3 Genus: *Apodemus* Kaup, 1829

Apodemus cinsi, dişteki enamelın katlanma şekli, tutunucu özellikte olmayan kuyruk ve normal kafatası sayesinde karakterize edilmektedir. *Apodemus* cinsi türleri küçük ve orta büyüklükteki farelerdir. Büyük kulaklar ve gözlere sahiptir. Dorsalde belirgin sarıyla karışmış koyu kahverengi renkli kürk hakimdir. Ventral kürk rengi, kökü solgun gridir. Kürkleri genellikle yumuşaktır ve hiç dikenli değildir. *Apodemus* cinsi türlerinin diş formülleri $i \ 1/1 \ c \ 0/0 \ pm \ 3/3$ şeklinde olup 16 adet dişe sahiptirler. Kuyruk, ince kıllarla kaplıdır. Cinsin Türkiye’de yaşadığı bilinen altı türü mevcuttur. Bunlar *Apodemus mystacinus*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Apodemus uralensis* ve *Apodemus whitherbyi*’dir (Demirsoy 1996).

2.3.1 Species: *Apodemus mystacinus* Danford ve Alston, 1877

Doğu Akdeniz’in kayalık bölgelerine özelleşmiş bir kemirici türüdür. Türkiye’de sadece Anadolu’da yayılış göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *A. mystacinus*'un Türkiye'deki yayılış alanı

Ormanların içindeki ya da açık alanlarda bulunan kayalık bölgelerde yaşarlar (Doğramacı 1972), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *A. mystacinus*'un yaşam alanı

Dorsal kürk rengi, soluk griden kızılımsı griye doğru değişkenlik göstermektedir (Şekil 2.3). Yüz bölgesi bazı örneklerde biraz daha açıkken, geneli dorsal kürk rengine yakındır. Karın bölgesiyle, dorsal kısım arasında hat belirgindir. Kuyruk üst yüzeyi dorsalle, alt yüzeyi ise karın bölgesiyle uyumlu olup iki renklidir. Karın kürkü saf beyazdan koyu griye kadar varyasyon gösterir. Göğüs lekesi bulunmamaktadır. Ön ve ardayakların üst kısmı beyaz ince, sık kıllarla örtülüdür. Ayak tabanları çıplak, tabandan geri kalan kısım karın kürküne benzer (Doğramacı 1972, Demirsoy vd., 2006).



Şekil 2.3 *A. mystacinus*'un post karakterleri

A. mystacinus 'un diploid kromozom sayısı $2n = 48$, otozomal kol sayısı $NFa = 50$ ve $NF = 52$ 'dir (Çolak vd. 2004). 4 metasentrik ve 2 akrosentrik kromozoma sahip olup X kromozomu geniş akrosentrik, Y kromozomu ise orta büyüklükte akrosentriktir (Çolak vd. 2004) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 *A. mystacinus*'un Ardanuç'tan elde edilen erkek bireyinin karyotip zimogramı (Çolak vd. 2004)

Tür, 4 alttüre sahiptir. Bu alttürlerden: *A. m. mystacinus* Danford and Alston, 1877 Sebil'de, *A. m. smyrnensis* Thomas, 1903 Batı Türkiye'de, *A. m. rhodius* Festa, 1914 Rodos ve Girit Adaları'nda, *A. m. euxinus* Allen (1915), Türkiye'nin kuzeyinde Altındere (Trabzon)'de kaydedilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 *A. mystacinus* alttürlerinin tanımlanan tip yerlerine göre yayılış alanları

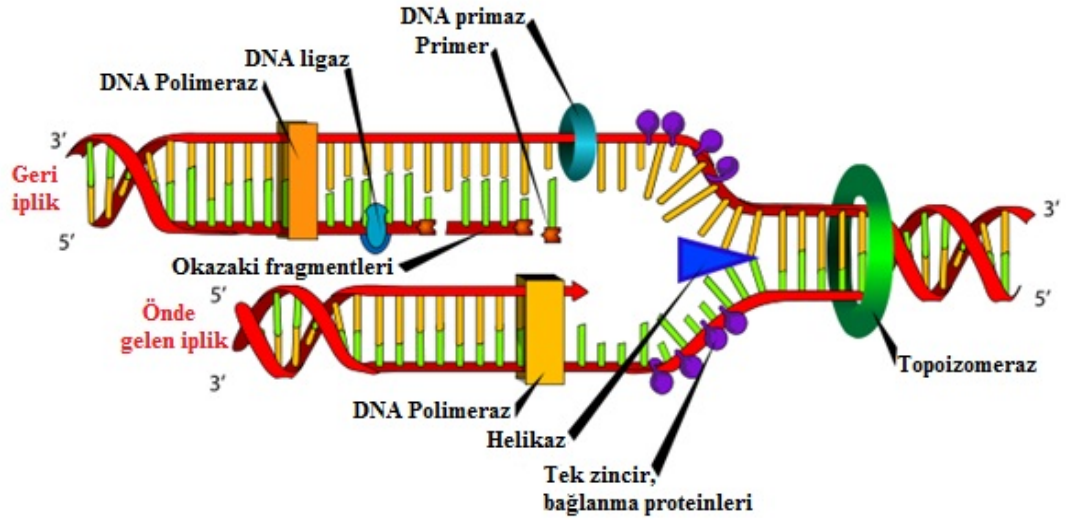
2.4 Genetik Çeşitliliğe (Polimorfizm) Neden Olan Mekanizmalar

Son 20 yıldır, moleküler biyoloji, ekolojik araştırmalarda köklü değişikliklere neden olmuştur. Bu süreç boyunca bireylerin, populasyonların ve türlerin genetik olarak tanımlanması için kullanılan metodlar neredeyse rutinleşmiş ve veri zenginliği oluşturarak bitkilerin, hayvanların, fungi, alg ve bakterilerin evrimi ve ekolojisi için etkileyici yeni yaklaşımlar sağlamıştır. Moleküler belirteçler, genetik farklılığın hesaplanması, birey hareketlerinin izlenmesi, inbreeding ölçümü, bireylerin tanımlanması, yeni türlerin belirlenmesi ve yayılışı etkileyen tarihsel olayların derinine inilmesini sağlayan araçlardır.

Genlerin fonksiyon ve yapıları türler arasında çeşitlilik gösterse de, aynı türün bireyleri arasında genellikle korunmuştur. Bu, aynı türe ait bireylerin genetik olarak benzer oldukları anlamına gelmemektedir. DNA dizilerinin hem kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerindeki varyasyonlar, iki bireyin kesinlikle aynı genoma sahip olmadığını göstermektedir. Bu durum, DNA replikasyonu (eşlenmesi) sırasında meydana gelen rekombinasyon, dublikasyon ve mutasyon olaylarıyla değişmesinden kaynaklanmaktadır. DNA çeşitliliğine neden olan bu mekanizmaların nasıl çalıştığı bilirse, genetik farklılaşmanın anlaşılması da kolaylaşacaktır (Freeland 2005).

2.4.1 Mutasyon ve Rekombinasyon

Genetik çeşitlilik iki süreçle ortaya çıkmaktadır: mutasyon ve rekombinasyon. Birçok mutasyon, bir DNA molekülü dizisinin yeni DNA ve RNA dizileri oluşturmak için kalıp görevi gördüğü DNA replikasyonu sırasında meydana gelmektedir. Ne çoğalma (üreme) ne de genetik ifade, replikasyon olmadan gerçekleşemez. Replikasyon sırasında çift zincirli DNA arasındaki hidrojen bağları kırılır, böylece oluşan iki ayrı DNA zinciri, yeni oluşacak DNA zincirinin sentezlenebilmesi için kalıp görevi görür. Yeni zincir sentezinin sadece 5'→3' yönde gerçekleşmesiyle replikasyon mekanizması karmaşık bir hal alır (Şekil 2.6)



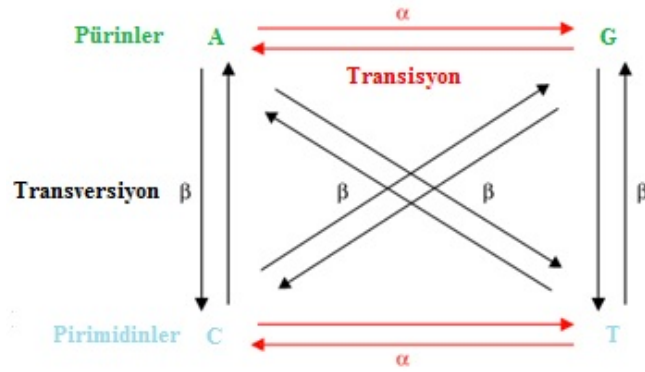
Şekil 2.6 Replikasyon mekanizması (<http://dna.microbiologyguide.com/526-biological-replication-dna-splitting/>)

Sentezlenme olayında DNA polimeraz denilen bir enzime ihtiyaç duyulur. Bu enzim, nükleotidleri kalıp zincir boyunca eşlenik dizilerine bağlamakla görevlidir (G ile C, A ile T veya RNA için A ile U). Bu süreç çift zincirli yeni DNA'nın oluşmasına kadar devam eder.

Replikasyon sırasında eğer bir nükleotid diğerinin yerine geçerse, bu durum “nükleotid değişimleri (substitutions)” olarak adlandırılan hataların oluşmasına neden olur. Bu değişimler 2 şekilde gerçekleşir: transisyon olayında pürinler (A ve G) veya pirimidinler

(C ve T) arasında değişiklikler olurken, transversiyon olayında ise bir pürin bir pirimidinle (veya tersi) yer değiştirir (Şekil 2.7).

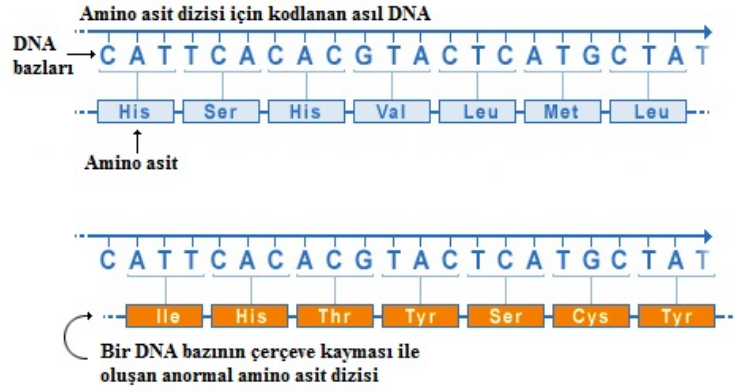
Genel olarak konuşmak gerekirse transisyonlara daha çok rastlanılmaktadır. Eğer bir değişim, kodlanan amino asidin değişikliğine neden olmuyorsa bu durum “sinonim değişimler” olarak adlandırılır. Tersisi olan “non-sinonim değişimler” ise farklı bir amino asidi kodlayan bir kodonu üreterek DNA fonksiyonunda değişikliklere neden olur.



Şekil 2.7 Nükleotid değişimleri (<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0005107.html>)

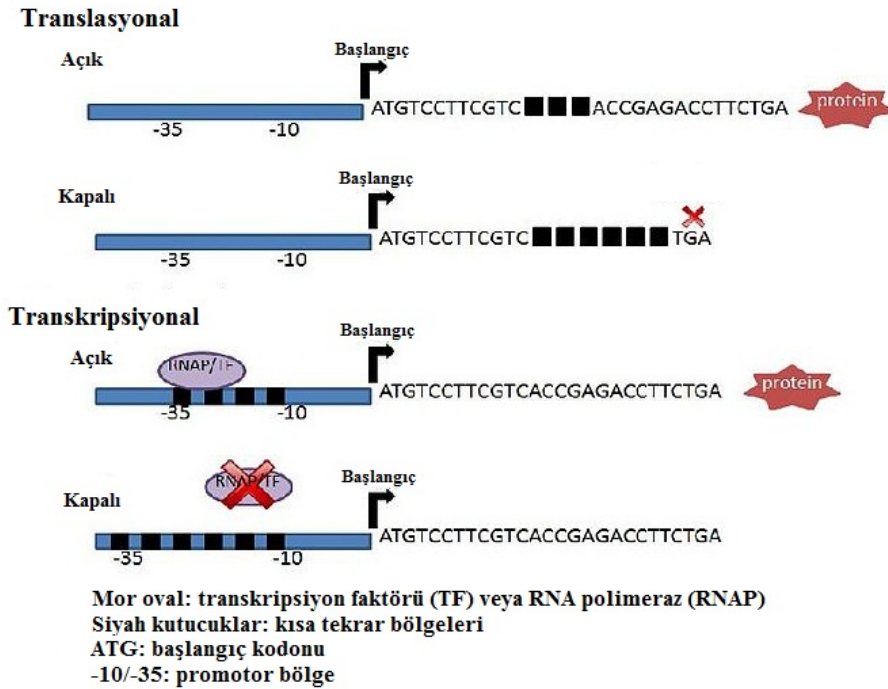
Tek nükleotid değişimleri genellikle fenotipik bir etkiye neden olmasa da son derece önem arz ederler. Örneğin insanlarda görülen orak hücre anemisi, glutamik asidin valinle yer değiştirmesine neden olan tek nükleotid değişimiyle meydana gelir ve mutasyon, homozigot olduğu durumlarda genellikle ölümcüldür.

DNA replikasyonu, bir dizide birden fazla nükleotidin eklendiği veya çıkarıldığı insersiyon ve delesyon (tamamı “indel” olarak bilinir) olarak adlandırılan hataları da içermektedir. Eğer bir indel, kodlanan bir bölgede gerçekleşirse, kendisinden sonra gelen bütün kodonların okunma sırası kayar ve “çerçeve kayması mutasyonları (frameshift)”nın gerçekleşmesine neden olur. Bu durum gerçekleşirse gen dizisi, fonksiyonunu tamamen kaybeder (Şekil 2.8).



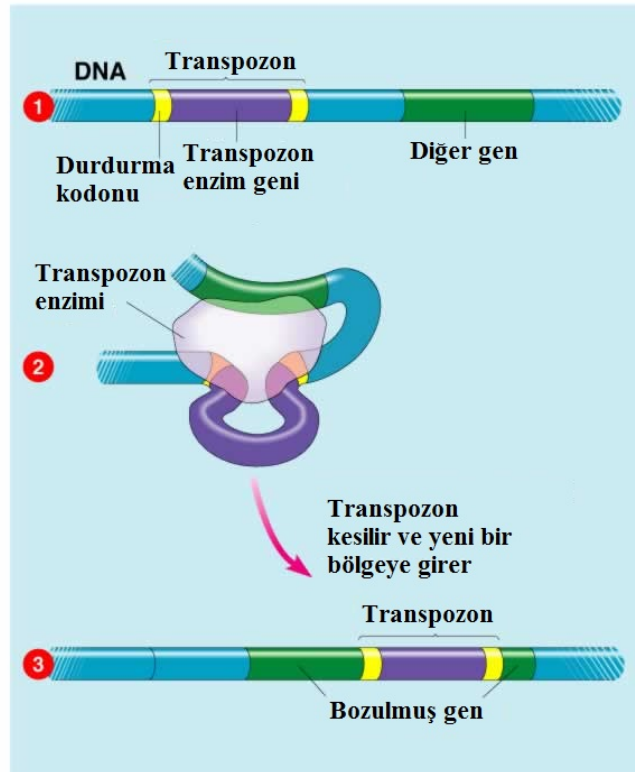
Şekil 2.8 Çerçeve kayması mutasyonları
(<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/frameshift>)

Replikasyon sırasında gerçekleşen bir diğer hata da “slipped strand mispairing” olarak adlandırılır. Bu durumda yeni oluşan DNA zinciri, kalıp DNA’dan farklı nükleotid dizilerini içerir. Eğer bu olay, mikrosatellit gibi tekrarlı dizilerin olduğu bölgelerde gerçekleşirse yeni oluşan zincir yerini kaybeder ve yanlış tekrarlar oluşur. Böylece oluşan yeni zincir, farklı sayıda tekrar içereceğinden kalıp zincirden daha uzun veya daha kısa olacaktır (Hancock 1999) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Slipped strand mispairing mutasyonu
(http://en.wikipedia.org/wiki/Phase_variation)

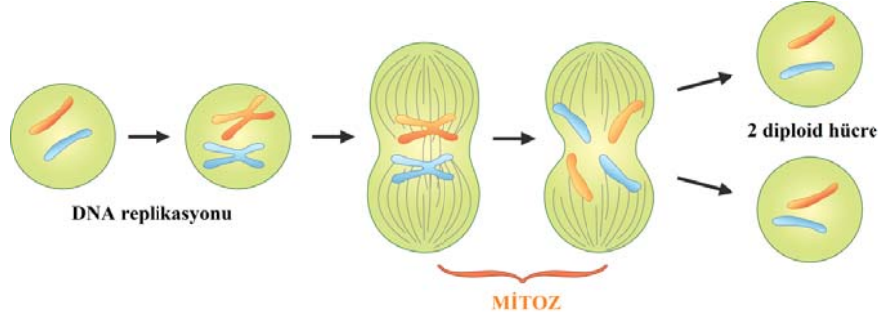
Mutasyonlar sadece bir veya birkaç nükleotid değişimiyle kısıtlandırılmamalıdır. 1940’larda Barbara McClintock, “hareketli elementler (transpozonlar)” olarak adlandırılan genetik değişiklikleri keşfetmiştir. Bunlar, genom içerisinde birkaç bölgeye hareket edebilen dizilerdir. Bu elementler sadece yer değiştirmekle kalmaz, kendileriyle beraber bir veya birkaç geni de taşıyarak onların da yer değiştirmesine neden olurlar. Böylece genler veya kromozomlar arasında geniş ölçekte bir yeniden düzenlenme gerçekleşmiş olur. Transpozon elementleri diğer genlerin arasına girip onların fonksiyonlarını bozabilirler ve hatta replikasyon sırasında kendilerini çoğaltıp genom içindeki sayılarını arttırabilirler (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Transpozon elementleri (<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl17.html>)

DNA dizilerini değiştiren diğer bir anahtar süreç de “rekombinasyon (yeniden düzenlenme)”dur. Birçok birey hayatına tek bir hücre olarak başlar ve bu hücre, organizmanın büyümesi ve gelişmesi sırasında birçok kez replikasyona uğrar. Bu tip bir replikasyon işleminin gerçekleşmesiyle hücrenin çoğalması, “mitoz” olarak bilinir ve mitoz geçirecek olan hücre, bireyin tüm kromozom takımının 2 katını içerir. Diğer bir

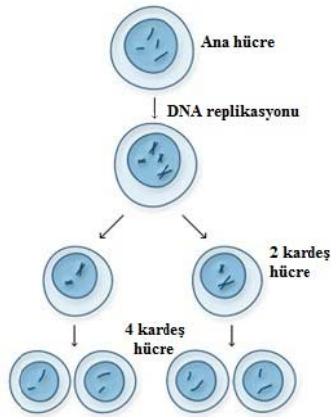
deyişle yavru hücre, ana hücre ile aynı sayıda ve aynı yapıda kromozomlara sahiptir. Mitoz, somatik hücrelerde (vücut hücreleri) düzenli olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Mitoz mekanizması

(<http://moodleshare.org/mod/book/view.php?id=2118&chapterid=266>)

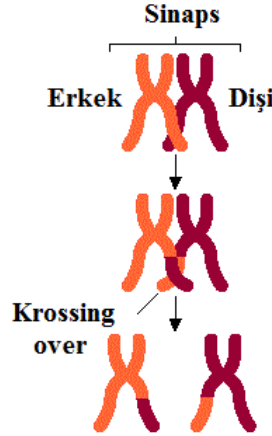
Mitoz bölünme normal vücut gelişimi için gerekli olsa da üreme hücrelerini oluşturmak için kullanılırsa zorluklara yol açabilir. Eşeyssel üreme tipik olarak, yumurta ve sperm hücrelerinin bir embriyo oluşturmak için bir araya gelmesiyle gerçekleşir. Eğer yumurta ve sperm hücreleri mitoz sonucu üretilmiş olsaydı, her ebeveynden aldıkları kromozom takımının tamamına sahip olacakları için oluşacak embriyo, normalden 2 katı fazla kromozom takımını taşırdı ve bu sayı her nesilde 2 katı artacağı için her bireydeki DNA miktarının fazlalığından dolayı sistem işlev yapamayacak hale gelirdi. Mayoz olarak adlandırılan ve sadece eşey hücrelerini oluşturmak için (yumurta, sperm, polen ve spor) gerçekleşen mekanizma ile bu durum atlatılabilmıştır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Mayoz bölünme

(<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/meiosis.html>)

Diploit türlerde ($2n$ kromozom takımına sahip) mayoz, kromozom takımının sadece bir setini taşıyan (n) gametlerin oluşmasını sağlar ve bu gametler birleştiklerinde diploit ($2n$) embriyoyu oluştururlar. Mayoz sırasında homolog kromozomlar (biri anneden diğeri de babadan gelen eş kromozomlar) arasında gerçekleşen parça değişimi (crossing over), rekombinasyona neden olur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Mayoz sırasında meydana gelen parça değişimi (crossing over) olayı
(http://www.phschool.com/science/biology_place/labbench/lab3/crossovr.html)

Bu olay, tek bir kromozom boyunca genlerin yeni kombinasyonlarını ortaya çıkartarak eşeyli üreyen taksonlarda genetik çeşitliliğe katkı sağlayan çok önemli bir mekanizmadır (Freeland 2005).

2.4.2 Genetik polimorfizmlerin popülasyona etkisi

1960'ların başına kadar birçok biyolog, genetik mutasyonların bireyin uyum gücünü arttırdığına veya azalttığına inanıp, bir popülasyonda gerçekleşen mutasyonları doğal seçilimin bir sonucu olarak görmüşlerdir (Freeland 2005). Bu bakış açısı "seçilimci (selectionist)" olarak adlandırılmaktadır. Ancak bazı araştırmacılar 1960'da allozim verilerini kullanarak doğal popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin yüksek seviyelerde olduğunu ortaya koyunca, doğal seçilimin bir popülasyonda bu kadar farklı genotipleri oluşturmasının mantıklı bir açıklaması olmadığını düşünerek, seçilimci teoriyi çok da akla yatkın bulmamışlardır. Bu sıralarda "Moleküler Biyolojinin Nötral Teorisi" şekillenmeye başlamıştır (Kimura 1968). Bu görüşe göre bazı mutasyonlar seçici bir

avantaja veya dezavantaja sahip olsalar bile çoğu, organizmanın uyumuna ya çok az etkisi olan ya da hiç etkisi olmayacak şekilde nötral veya nötrale yakındır. Nötralist bakış açısına göre genetik polimorfizmlerin büyük bir kısmı şans eseri ortaya çıkar ve rastgele gerçekleşen süreçlerin bir sonucu olarak popülasyon içinde devam eder ya da kaybolur.

Seçilimciler ve nötralistler arasındaki uzlaşmazlık devam etse de, genetik çalışmalardan elde edilen verilerin artmasıyla moleküler değişikliklerin hem rastgele hem de seçici süreçlerin etkisinde olduğu yadsınamaz bir gerçektir (Freeland 2005). Sonuç olarak iyi desteklenmiş birçok moleküler evrim ve popülasyon genetiği teorileri, hem nötralist hem de seçilimci teorilerin elementlerini içinde barındırmaktadır (Li ve Graur 1991).

2.5 Moleküler Belirteçler ve Kullanım Alanları

Biyologlar, amino asit dizilerini ve DNA ile RNA'daki nükleotid dizilerini okumak için yeni metodlar geliştirdiklerinden beri, filogenileri belirlemek için yeni bir çok teknik kullanılmaya başlanmıştır (Freeman ve Herron 2009).

Sistematikçiler türler arasındaki filogenetik ayrımları yapabilmek için protein ve nükleik asitlerin karşılaştırmalarını kullanmaktadırlar. Bu protein ve nükleik asitler, belirteç olarak adlandırılırlar. Belirteçler genel olarak protein belirteçler (izoenzimler) ve moleküler belirteçler (RAPD, RFLP, AFLP, SSR vb.) olarak iki grup altında toplanabilir. Moleküler belirteçler ise hibridizasyona dayalı belirteçler, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı belirteçler ve ESTler (Expressed Sequence Tags) olarak gruplandırılır. Moleküler ve genetik anlamıyla belirteç, bir DNA parçasını ifade eder. Son 10 yıldır moleküler belirteçler hayvan genetiğinde, DNA seviyesindeki polimorfizmleri ortaya çıkarmak için anahtar rol oynamışlardır (Vignal vd. 2002) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Moleküler belirteçler ve uygulama alanları

Varyasyon tipi	Polimorfizmin Nedeni	Belirleme Yöntemi	Uygulama Alanları
RFLP (Restriction Fragment of Length Polymorphism)	Kesim bölgelerindeki nükleotid farklılıkları	Restriksiyon enzimleriyle çift zincirli DNA'nın kesimi; elektroforez; bir DNA probu veya EtBr boyama ile fragmentlerin Southern Blotting yapılarak görüntülenmesi. PZR ile çoğaltılan gen bölgesinin doğrudan kesilerek Agaroz jelde EtBr ile boyanıp yürütülmesi.	Populasyon genetiği, filogeni, sistematik, genetik haritalama, QTL.
Minisatellit (varying number of tandem repeats- VNTR)	DNA dizisinde rastgele tekrarlanan 10-100 nükleotid uzunluğunda bölgeler	Restriksiyon enzimleriyle DNA'nın kesimi; tekrarlanan bölgeye tamamlayıcı bir DNA probu ile Southern Blotting.	Populasyon genetiği, tek lokus polimorfizmleri, bireysel genotiplerin tanımlanması, pedigree analizleri.
Mikrosatellit (basit tandem tekrarlar-STR)	DNA dizisinde rastgele tekrarlanan 1-6 nükleotid uzunluğunda bölgeler	Tekrarlı bölgelerin yanındaki dizilere özgü primer ile PZR amplifikasyonu; çoğaltılan fragmentlerin elektroforezi.	Populasyon genetiği, evrimsel, demografik ve ekolojik genetik, genetik haritalama.
RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	Primerlerin bağlandığı bölgelerdeki nükleotid farklılıkları	Rastgele seçilen 1-10 baz uzunluğundaki primerler ile DNA segmentlerinin PZR ile çoğaltılması; çoğaltılan fragmentlerin elektroforezi.	Populasyon genetiği, filogeni sistematik, genetik haritalama, QTL.
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	Restriksiyon ve yakınındaki bölgelerdeki nükleotid farklılıkları	Sık ve nadir restriksiyon bölgelerinin 2 enzimle kesimi; nükleotid adaptörlerin ligazla bağlanması; seçici PZR amplifikasyonu; elektroforez.	Populasyon genetiği, tek lokus polimorfizmleri, bireysel genotiplerin tanımlanması, pedigree analizleri, QTL.
SNP (Tek nükleotid polimorfizmi)	Bir DNA dizisindeki tek nükleotid değişimleri	PZR ile çoğaltılan fragmentlerin dizilenmesi; işaretli varyantların tespiti için PZR ürünlerinin mikroarray ile hibridasyonu; kritik sıcaklıklarda PZR ürünlerinin denatürasyonu ve heterodubleks analizleri vs.	Evrimsel ve populasyon genetiği, genetik haritalama, hastalık tanımlanması.

Belirteçlerin kullanım amaçları çok çeşitli olmakla beraber şu şekilde sıralanabilir:

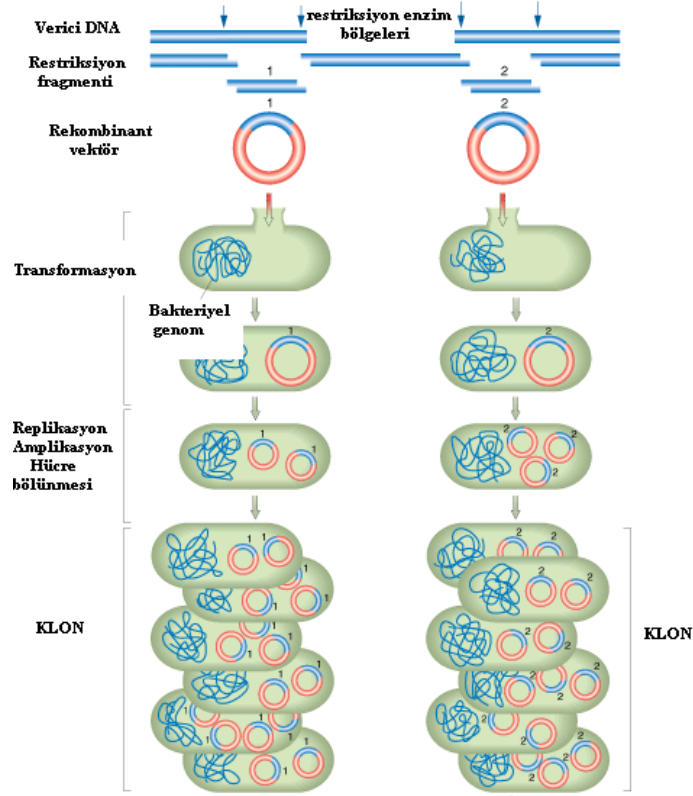
- Genetik haritaların hazırlanması
- Genetik parmak izi analizleri
- Doğrudan gen etiketlenmesi
- Genlerin klonlanması
- Genom analizleri ve organizasyonları
- Evrimsel gelişim
- Kromozomların yeniden yapılandırılması çalışmaları
- Genetik kaynakların ve çeşitlerin korunması çalışmaları
- Genetik varyasyon çalışmaları

- Populasyonlar arası genetik mesafenin veya filogenetik benzerliğin hesaplanması

Şu anda en yaygın olarak kullanılan dört temel moleküler belirteç bulunmaktadır. Bunlar RFLP, RAPD, AFLP ve Mikrosatellit (ya da SSR-simple sequence repeats-, STR –short tandem repeats-)’dir.

2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu’nun prensipleri

Rekombinant DNA teknolojisi, 1970’li yılların başında biyoloji bilimi için bir araç olarak geliştirilmiştir (Arnheim ve Erlich 1992). Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin birleştirilerek yeni bir kombinasyonun oluşturulmasını ifade eder. Bu teknikteki temel işlemler bir dizi basamağı içerir. Doku ya da hücrelerden izole edilen DNA moleküllerinin, restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşturulan parçaları, vektör ya da taşıyıcı bir molekül ile birleştirilir. Kendi DNA’sı ile birlikte üzerinde yabancı DNA molekülü taşıyan vektörün oluşturduğu rekombinant DNA molekülü, bir konakçı hücreye aktarılır ve burada kendini konakçı hücre DNA’sı ile birlikte eşleyerek kopyalarını yavru hücreye aktarır. Klonlanmış DNA, konakçı hücrelerden izole edilip incelenebilmektedir (Şekil 2.14).

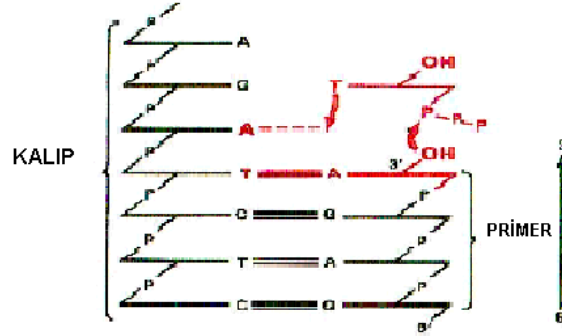


Şekil 2.14 Rekombinant DNA teknolojisi
(<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>)

1984 yılında bilim adamları in-vivo koşullar yerine in-vitro koşullarda çoğaltmaya bağlı olarak bir DNA amplifikasyonu prosedürü geliştirmişlerdir. PZR yani Polimeraz Zincir Reaksiyonu olarak bildirilen bu methodla basit bir enzimatik reaksiyonda, kompleks bir DNA kalıbından, çok miktarda spesifik bir DNA fragmenti oluşturulabilmektedir (Arnheim ve Erlich, 1992). PZR aracılığı ile gerçekleştirilen gen amplifikasyonu, klonlama, analiz ve nükleik asit modifikasyonları için kullanılan prosedürleri kolaylaştırarak, moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim ve adli vakalar gibi birçok disiplinde uygulanma olanağı bulmuştur.

PZR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilere ihtiyaç vardır. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır (Arnheim ve Erlich 1992). Oligonükleotidler, DNA polimeraz enzimi tarafından katalize edilen bir seri DNA sentez reaksiyonlarında primer olarak görev yaparlar (Şekil 2.15). Bu

oligonükleotidlerin baz dizileri birbirlerinden farklı olup her bir oligonükleotid, kalıp görevi gören çift sarmal DNA molekülünün tek sarmalına tamamlayıcıdır. İki oligonükleotid primere ilaveten, reaksiyonda bir ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve 4 dNTP molekülü yer alır.



Şekil 2.15 Primer-kalıp bağlanması

(<http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Slides/DNA%20Synthesis/Template%20Primer.JPG>)

PZR reaksiyonunda üç temel basamak mevcuttur. Bunlar sırasıyla: Denatürasyon, Bağlanma (Annealing) ve Uzama (Extension) aşamalarıdır.

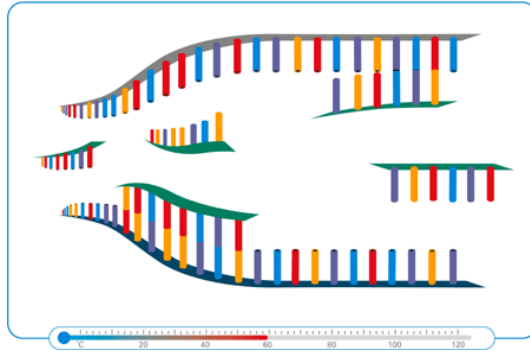
1. Denatürasyon: Çift zincirli DNA'nın tek zincir haline getirildiği basamaktır (Şekil 2.16). Buna göre ilk adımda, çoğaltılacak olan DNA, denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. İki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz ve 4 adet dNTP'den oluşan reaksiyon karışımı içinde bulunan DNA, 90–95°C'de 5 dakika süreyle ısıtılarak denatüre edilir.



Şekil 2.16 Denatürasyon

(<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>)

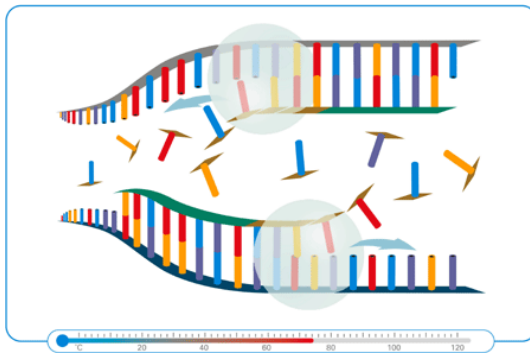
2. Bağlanma (Annealing): Primerlerin bağlandığı basamaktır (Şekil 2.17). Sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler, 15–30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir. Çoğaltılacak olan DNA bölgesinin uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanarak kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası görevi yaparlar.



Şekil 2.17 Bağlanma

(<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>)

3. Uzama (Extension): DNA Polimeraz enzimi tarafından zincir uzamasının gerçekleştirildiği basamaktır (Şekil 2.18). DNA sentezi 65 ila 75°C arasında gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

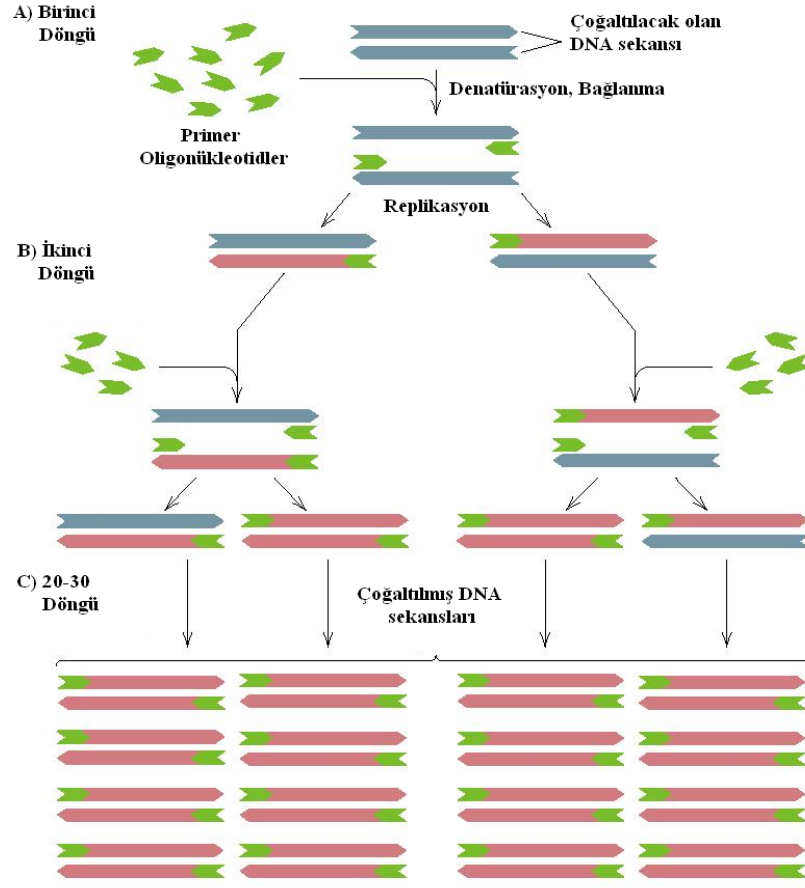


Şekil 2.18 Polimeraz enzimi bağlanması ve zincir uzaması

(<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>)

PZR reaksiyonlarında önceden polimeraz enzimi olarak *E.coli*'nin DNA Polimeraz I enziminin Klenow Fragmenti kullanılmaktaydı (Arnheim ve Erlich 1992). Klenow Fragmenti sıcaklığa dayanıklı olmadığından, her PZR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden enzim ekleme zorunluluğu duyulmaktaydı. Bu durumun üstesinden gelebilmek için sıcak su kaynaklarında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden DNA Polimeraz enzimi izole edilmiştir. *Thermus aquaticus*'dan sıcağa dayanıklı DNA Polimeraz enziminin izolasyonu, primer bağlanması ve uzatılmasının yüksek sıcaklıklarda uygulanmasına izin vermiştir. Böylece hedef olmayan sekanslarda, yanlış bağlanmalar azalmıştır. Bu enzimin bulunmasının diğer bir avantajı da sıcaklığı kontrol edilebilen otomatik PZR makinelerinin kullanılabilmesine olanak sağlamasıdır.

PZR, bir zincir reaksiyonudur, çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkmaktadır ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4–5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. 20–30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1.000.000 kez artış olur. İşlem, ısı döngücüsü (thermocycler) denilen makinelerde, döngü sayısı ve sıcaklıkları önceden belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Bir zincir reaksiyonu olan PZR
<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>

2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun avantajları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu üç şekilde karakterize edilebilir: seçicilik, duyarlılık ve hız. PZR ile yapılan klonlama işlemi, konakçı hücre ile yapılan klonlama işleminden daha avantajlıdır. PZR reaksiyonu hızlıdır ve konakçı ile yapılan klonlama işlemi haftalar alırken, PZR ile yapılan klonlama işlemi birkaç saat içinde tamamlanabilmektedir. PZR primerleri, bilgisayar program destekli aletlerde oluşturulabildiği gibi, ticari olarak sentezlettilmesi de ekonomiktir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çok hassastır ve çok küçük miktarlardaki DNA örneği veya ham, işlenmemiş hücre lizatları da mükemmel kalıplar olarak iş görmektedir.

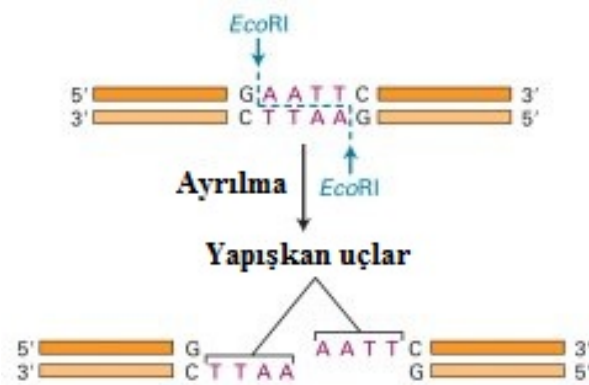
Bu avantajları ile PZR yönteminin çok geniş kullanım alanları mevcut olmakla beraber çeşitli PZR yöntemleri de bulunur. Bu yöntemler, kullanılan belirtece göre adlandırılmaktadır.

2.5.3 PZR-RFLP metodu

Restriksiyon enzimleri, *E. coli* suşunun λ fajıyla enfekte olması üzerine Verner Arber tarafından 1979'da keşfedilmişlerdir (Altukhov ve Salmenkova 2002). Arber, bakteri içindeki faj DNA'sının kesildiğini ve fajın enfekte özelliğini kaybettiğini göstermiştir. Daha sonra, sadece fajın değil bir bakteri hücrelerine giren herhangi bir yabancı DNA'nın da bu şekilde nötralize edildiği bulunmuştur. Kesim, "restriksiyon endonükleazlar" denilen özelleşmiş enzimlerle gerçekleştirilmektedir.

Bu enzimler kendi DNA'larına kayıtsız oldukları için, bu olgu bir hücre koruma mekanizması olarak iş görmektedir. Sorun şu ki neden restriksiyon endonükleazlar kendi DNA'ları yerine yabancı DNA'ları keserler? Restriksiyon endonükleazların sadece tanıma bölgeleriyle tepki verdikleri bulunmuştur.

Restriksiyon endonükleazlarla DNA kesimi, çift zincirli DNA'nın kırılmasıyla biri diğerinden birkaç nükleotid daha uzun olan "yapışkan" uçlu DNA fragmentlerinin (parçalarının) oluşmasına neden olur (Şekil 2.20).

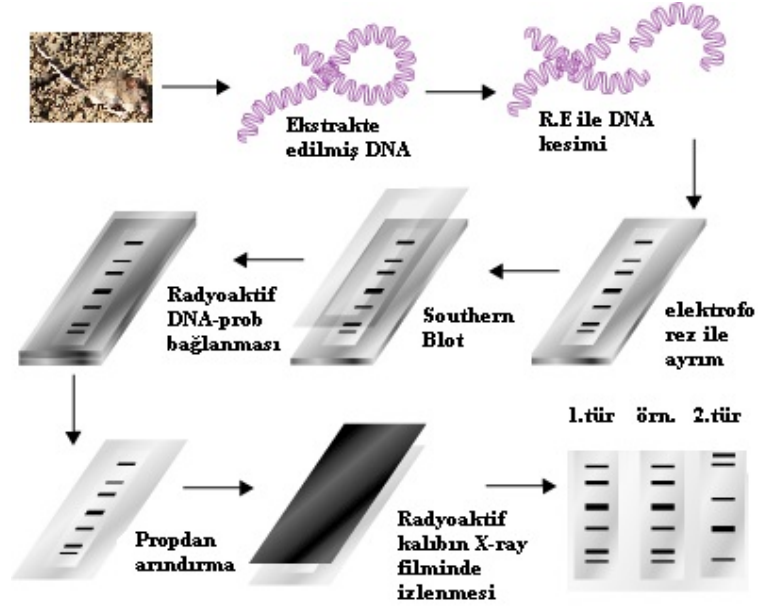


Şekil 2.20 Restriksiyon endonükleazlarla (*EcoRI*) DNA kesimi ve sonrasında oluşan yapışkan uçlar (<http://symposcium.com/2012/07/19/qa-why-do-bacteria-have-restriction-enzymes/>)

Bir parçanın yapışkan ucu, diğer parçanın sonuna eklenebilecek şekilde hazırdır. Bu durum, farklı kaynaktan elde edilen DNA moleküllerinin birleştirilmesiyle ortaya çıkan “Rekombinant DNA teknolojisi”nin temelini oluşturmaktadır.

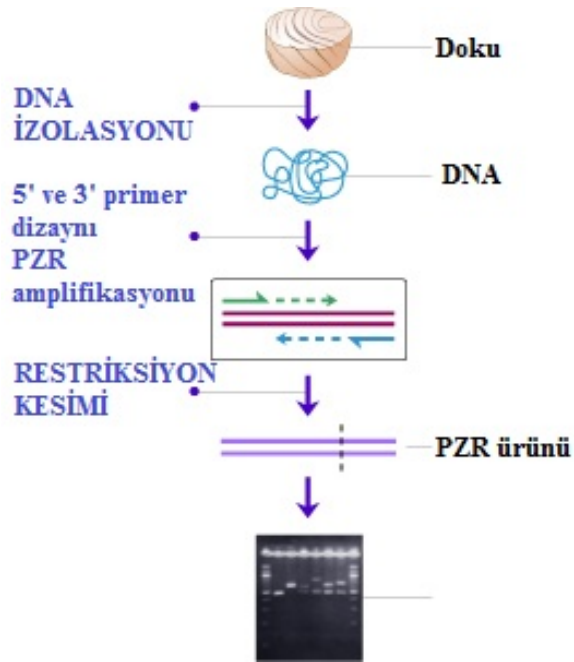
Günümüzde farklı tanıma ve kesim bölgelerine sahip birkaç yüzden fazla restriksiyon enzimi tanımlanmıştır (Vogel ve Motulsky 1997). Restriksiyon endonükleazlar klonlama sonrası gen ifadesi çalışmaları, DNA polimorfizmlerini belirleme gibi farklı deneysel amaçlar için kullanılmaktadır. DNA polimorfizmlerini belirlemek için kullanılan metod “RFLP” olarak tanımlanmaktadır. Burada DNA fragmentleri, basit genetik belirteçler olarak kullanılır.

RFLP analizleri, ya tüm bir genom (nükleer veya organel) veya DNA’nın belirli bir parçası üzerine uygulanabilir (Freeland 2005). Geleneksel metotta DNA, bir veya daha fazla enzimle kesilip oluşan fragmentler jel üzerinde koşturulur (Şekil 2.21). Bunlar hepsi prob olarak adlandırılan, floresan veya radyoaktifle işaretli bir dizinin çok miktarda tek zincirli kopyasını içeren bir sıvı solüsyondaki membran üzerine transfer edilir. Tek zincirli problar kendisine eşlenik diziyi içeren bantlarla hibridize olurlar ve bu bantlar floresan veya radyoaktif işaretlerinden tanınabilirler. Bant sayısı, araştırılan gen bölgesine ve kesim için kullanılan enzime bağlıdır. Örneğin, tütün kloroplast DNA’sının AluI kesimiyle 341 bant oluşurken, EcoRV ile ancak 36 bant ortaya çıkmıştır (Shinozaki vd. 1986). Aynı enzimler insan mitokondriyal DNA’sında sırasıyla 64 ve 3 bant oluşturmuştur (Anderson vd. 1981). Bireyler arasındaki işaretli bantların sayı ve miktarının karşılaştırılmasıyla toplam genetik benzerlik hesaplanabilmektedir. Bu metod nispeten büyük miktardaki DNA’ların görüntülenmesi için kullanışlıdır fakat oldukça külfetli ve zaman alıcıdır (Freeland 2005).



Şekil 2.21 Geleneksel RFLP metodu (<http://www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and-nutraceuticals/>)

RFLP oluşturmada daha basit bir metod ise öncelikle DNA'nın belirli bir bölgesini PZR ile çoğaltmak ve daha sonra bu ürünleri restriksiyon enzimleriyle kesmektir. Bu fragmentler yüksek çözünürlüklü bir jelde (agaroz veya poliakrilamid) koşturulduktan sonra görüntülenebilir (Şekil 2.22).

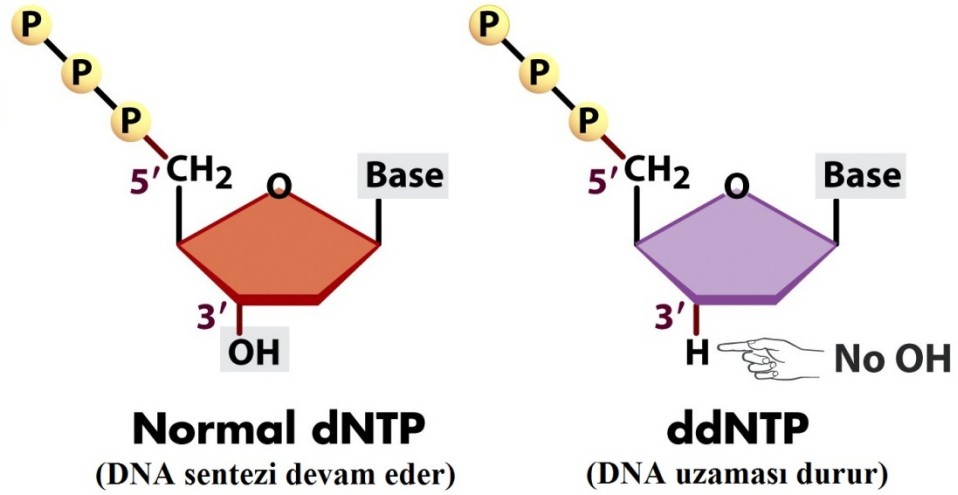


Şekil 2.22 PZR-RFLP metodu (http://www.seafoodid.com/pcr_rflp.html)

2.5.4 DNA dizileme yöntemi

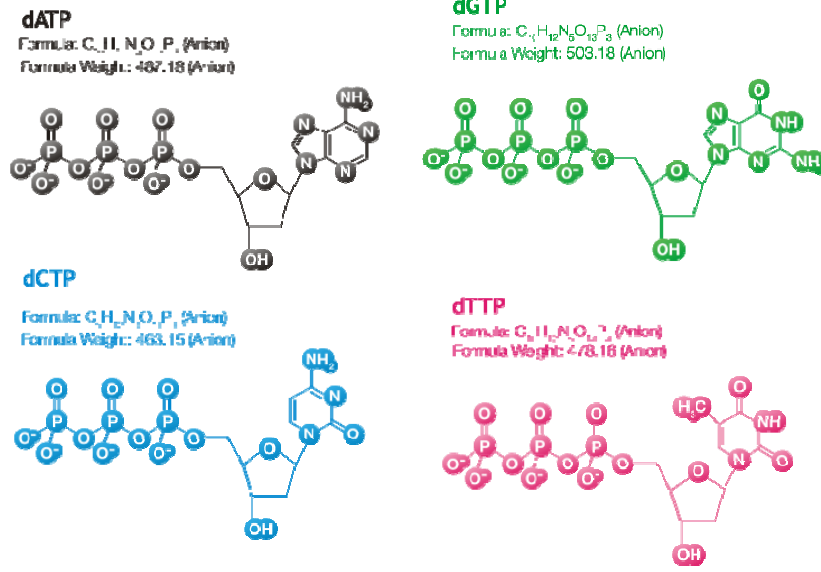
DNA dizilemedeki en yaygın yöntem, 1970'lerin ortalarında Frederick Sanger tarafından geliştirilen "Sanger yöntemi"dir. Bu protokol bir anlamda PZR'ye benzer olarak tek nükleotidlerle beraber DNA polimeraz enzimi kullanılıp DNA'nın tek zincirinin sentezini içermektedir.

İlk olarak diziler, kalıp DNA boyunca sadece tek yönde oluşturulsun diye, sentez için bir başlangıç noktası olarak tek bir primer kullanılır. İkinci olarak, deoksiriboz yerine dideoksiriboz şekeri içeren nükleotidler reaksiyona katılır. Dideoksiriboz, deoksiribozun 3'-OH grubunu kaybetmiş halidir (Şekil 2.23) ve bu olmadan bir sonraki mükleotid, uzayan DNA zincirine eklenemez, böylece ne zaman dideoksiribozlu bir nükleotid reaksiyona katılırsa sentez sonlanacaktır.



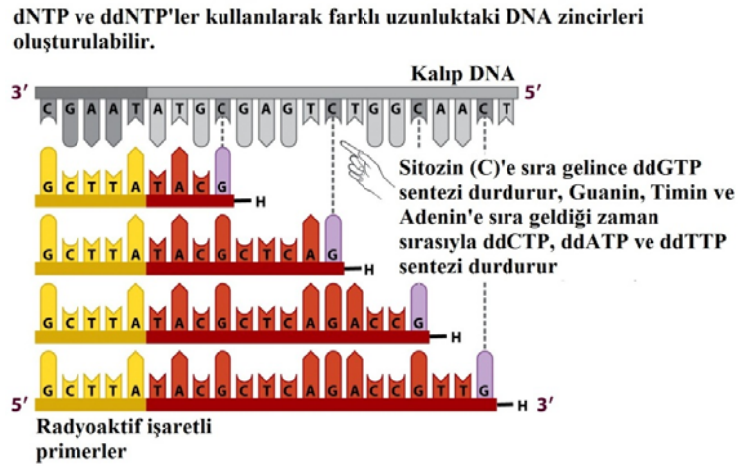
Şekil 2.23 Deoksiriboz ve dideoksiriboz yapısındaki nükleotid
(<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/techniques.htm>)

Sanger dizileme, 4 ayrı reaksiyonda devam eder. Her reaksiyon tüpünde primer bağlı tek zincirli DNA örneği bulunur. Bir sonraki adımda tüplere DNA polimeraz ve 4 tip dNTP (deoksiribonükleotid trifosfat- dATP, dGTP, dTTP, dCTP) ilave edilir (Şekil 2.24).



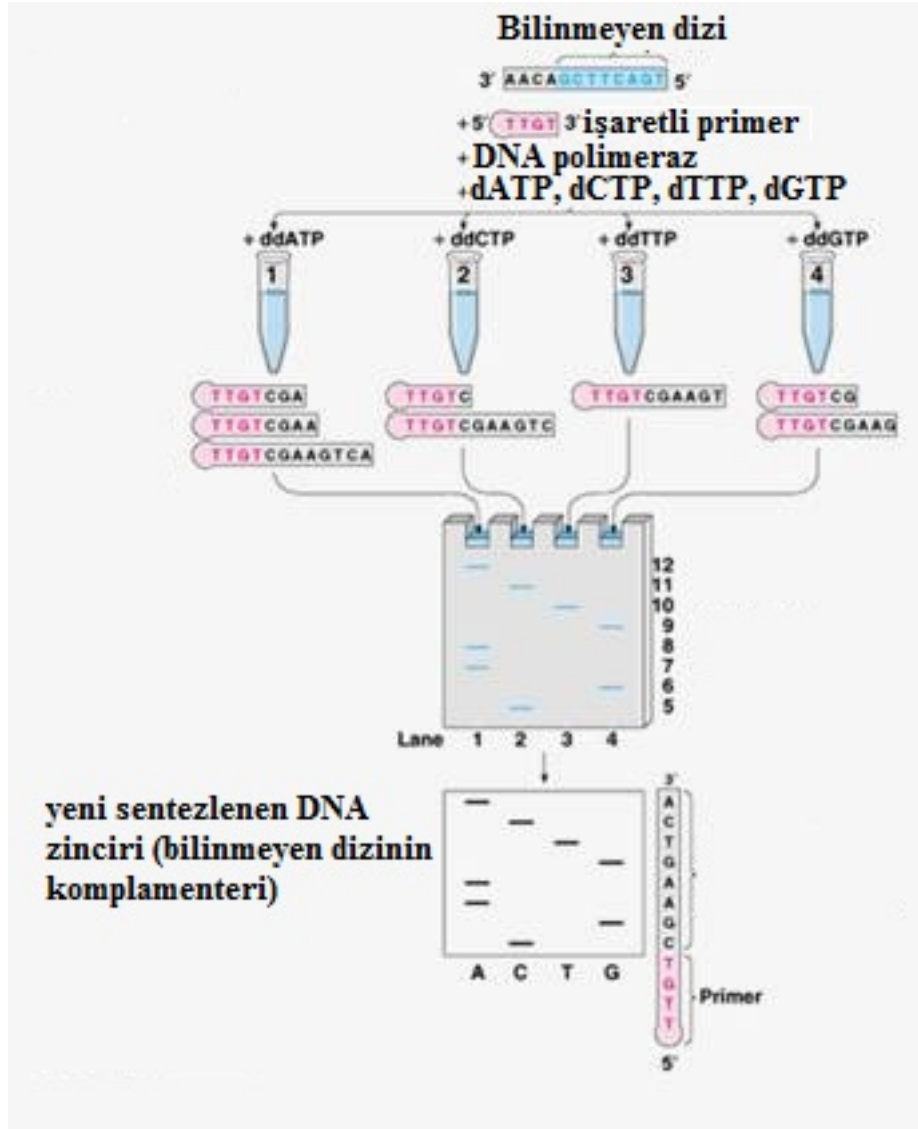
Şekil 2.24 Dört tip dNTP'nin formüsel görünümü (<http://www.medibena.at/80mm-dntp-mix-20mm-each-02-31.html>)

Ayrıca her tüpe ddNTP (dideoksinükleotid trifosfat- ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP)'lerden bir tanesi az miktarda ilave edilir. dNTP'lerden biri ya da primer, daha sonra dizi analizini yapabilmek için radyoaktiviteyle işaretlenir. Her tüpe DNA polimeraz konularak primer, kalıp zincirin tamamlayıcısını oluşturacak şekilde 5'→ 3' yönünde uzatılır. DNA sentezi gerçekleşirken polimeraz, uzayan zincire dNTP yerine ara sıra ddNTP katar. Dideoksinükleotid yapısında 3'-OH bulunmadığı için diğer nükleotid ile 3' bağı yapamaz ve DNA sentezi durur (Şekil 2.25).



Şekil 2.25 ddNTP bağlanması sonucu duran DNA sentezi sonucunda oluşan fragmentler (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/techniques.htm>)

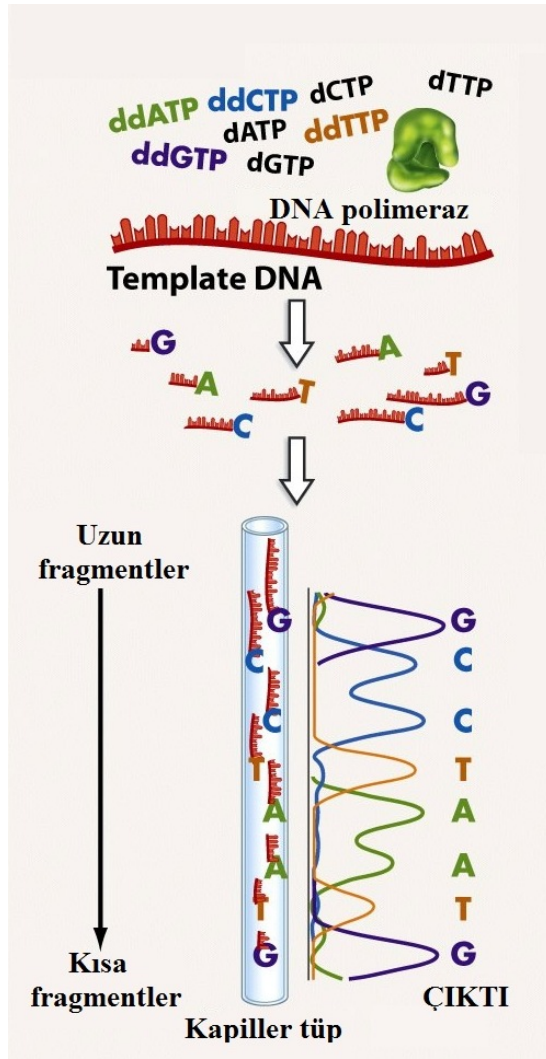
Manuel dizilemede her bir reaksiyon tüpündeki DNA parçaları jel elektroforezinde yan yana yüklenerek ayrıştırılır. Bantlar gümüş boyama ya da radyoaktif işaretleyicilerin kullanılmasıyla otoradyografi tekniği uygulanarak görüntülenir. Aşağıdan yukarı doğru okunan nükleotid dizisi kalıba tamamlayıcı olan DNA zincirinin 5'→ 3' yönündeki dizisine karşılık gelir (Şekil 2.26).



Şekil 2.26 Sanger metodunun manuel uygulaması
(http://www.genome.ou.edu/3653/Lecture20-10_11_06.html)

DNA dizi analizi büyük çaptaki genom dizisi projelerinde otomatik hale gelmiştir ve bu sistemde günde yüzbinlerce nükleotid dizisini belirleyebilen makineler kullanılmaktadır. Bu işlemde, dört dideoksinükleotid analoglarından her biri farklı

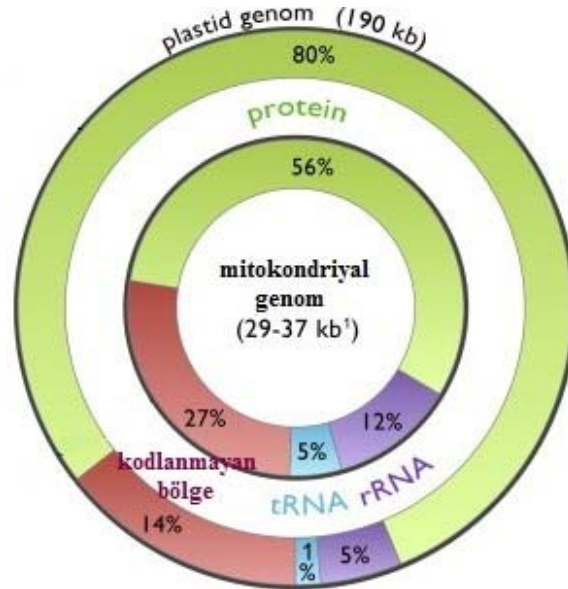
floresan boya ile işaretlenir. Genel olarak Guanin (G) için siyah, Adenin (A) için yeşil, Timin (T) için kırmızı ve Sitozin (C) için mavi renkli işaretleyiciler kullanılmaktadır. Tüm işaretli ddNTP'ler tek bir tüpe ilave edilir ve primerler DNA polimerazla uzatıldıktan sonra reaksiyona katılmayan primer, ddNTP gibi reaksiyon artıklarının uzaklaştırılması amacıyla "etanol presipitasyon" tekniği uygulanarak dizi reaksiyon ürünleri pürifiye edilmektedir (saflaştırma). Bu teknikle reaksiyon ürünleri aynı DNA izolasyonunda olduğu gibi tuzlar (Na asetat-EDTA) ve alkol ile pellet halinde çöktürülmektedir. Pelletler, formamid içeren bir solüsyonda çözünerek dizileme cihazına yüklenir ve okuma gerçekleştirilir. Sonuçta her biri bir nükleotide karşılık gelen renkli pikler elde edilmektedir (Şekil 2.27).



Şekil 2.27 Otomatik DNA dizileme yöntemi
(<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/techniques.htm>)

2.6 Genetik Çalışmalarda Kullanılan DNA Belirteçleri

Eşeyli üreyen organizmaların yavruları her ebeveynden yaklaşık olarak DNA'nın yarısını miras alırlar. Diploid organizmalarda nükleer genomdaki her lokusta bir allel anneden diğeri ise babadan kalıtılmaktadır. Bu durum "biparental kalıtım" olarak adlandırılır. Ancak eşeyli üreyen organizmalarda bile her iki bireyden de DNA'nın tamamı kalıtılmaz. Mitokondri ve plastid genomları, "uniparental kalıtım"ı olan iki önemli istisnai organeldir. Bunların ikisi de hücre çekirdeğinin dışında bulunurlar. Mitokondri, hem hayvan hem de bitki hücrelerinde yer alırken, plastidler sadece bitki hücrelerinde bulunan organellerdir. Organeller tipik olarak süper-halkasal çift zincirli DNA içerirler ve bu genomlar, nükleer genomdan daha küçüktürler (Şekil 2.28).

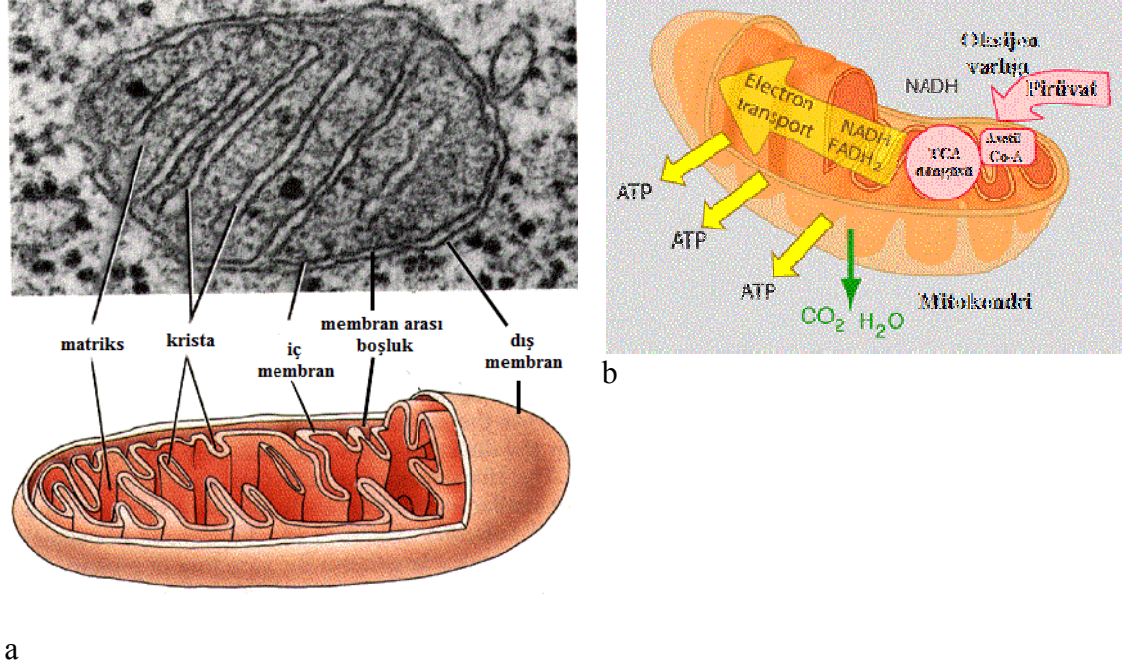


Şekil 2.28 Mitokondri ve plastid genomlarının karşılaştırmalı görüntüsü (Smith vd. 2012)

Örneğin yaklaşık olarak 15000-17000 baz çifti uzunluğundaki memeli mitokondri genomu, hayvan nükleer genomundan 10000 kat daha küçüktür. Organel genomları her ne kadar küçük olsalar da hücre içindeki sayıları fazladır. Her insan hücresi normalde 100-10000 mitokondri içerir. Organel genomlarından elde edilen moleküler belirteçler, özellikle hayvan mitokondriyal DNA'sının kullanımı, nükleer genomda bulunmayan özelliklerinden dolayı ekoloji ve populasyon genetiği çalışmalarında son derece popüler hale gelmiştir (Freeland 2005).

2.6.1 Hayvan mitokondri DNA'sının (mtDNA) özellikleri

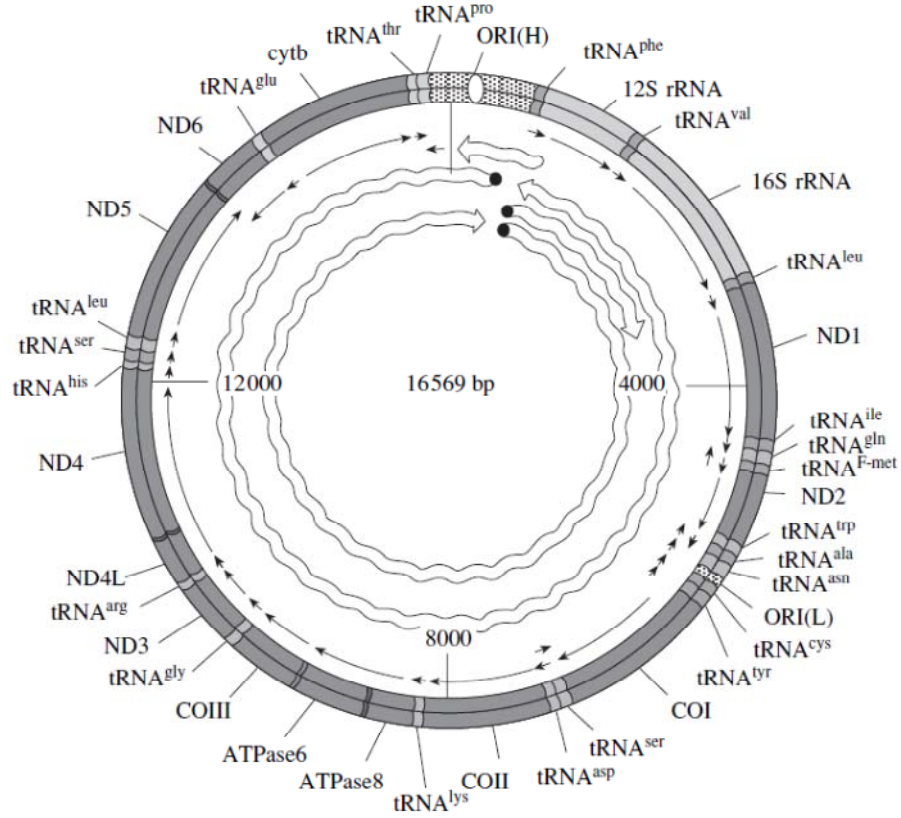
Mitokondri, besinden enerji eldesi sürecinde hücresel solunumda birincil olarak görevli organeldir (Şekil 2.29).



Şekil 2.29 a. Mitokondrinin elektron mikroskobu görüntüsü ve şematik gösterimi (<http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/mito.htm>),

b. Mitokondrinin enerji eldesi mekanizmasının şematik gösterimi (<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase>)

Hayvan mtDNA'sı 13 protein kodlayan gen, 22 tRNA ve 2 rRNA geni içermektedir. Ayrıca replikasyon ve transkripsiyonun başlangıcında görevli bir kontrol bölgesi (control region-D-loop) vardır (Şekil 2.30). Çoğu bölge eşsizdir (örneğin tekrarlı diziler içermez) ve genlerin arasında veya transkribe edilen genlerin içinde boş diziler olduğunu gösteren çok az kanıt vardır. Farklı hayvan türlerinde mitokondriyal genlerde bazı yeni düzenlenmeler olsa da, tüm yapı, büyüklüğü ve genlerin dizilişi nispeten korunmuştur. Birçok hayvanda mtDNA maternal (anneden) kalıtılır, bunun anlamı mtDNA'nın yavruya anneden geçmesidir. Ancak bazı çalışmalar maternal kalıtımda istisnai durumlar olabileceğini göstermiştir. Farelerde (Gyllensten ve Wilson 1987), kuşlarda (Kvist vd. 2003) ve insanlarda (Shwartz ve Vissing 2002), mtDNA'nın yavruya babadan geçtiği paternal sızıntılar olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 2.30 Mitokondriyal DNA yapısı ve içerdiği gen bölgeleri (Altukhov ve Salmenkova 2002)

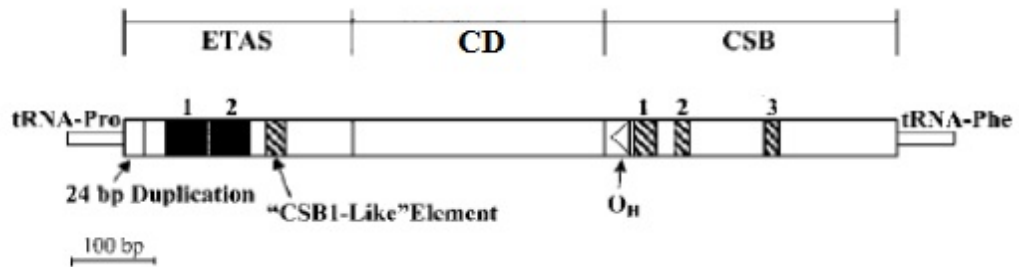
Midye türlerinin çoğunda hem maternal hem de paternal kalıtım gözlenmiş olup, bu çalışmalara göre mtDNA, dişi bireye tamamen anneden ancak erkek bireye hem anneden hem de babadan geçmektedir. Yani erkek bireyler klasik bir “heteroplazmi” (tek bir bireyde mtDNA’nın birden fazla çeşidinin bulunması) örneği sergilemiş olurlar (Freeland 2005). Ayrıca bu durum mtDNA’daki rekombinasyonu da kanıtlamaktadır (Ladovkakis ve Zauris 2001, Burzynski vd. 2003, Shao vd. 2005, Guo vd.. 2006). Heteroplazminin varlığı insan mtDNA’sı üzerine yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (Bromham vd. 2003).

Bunların dışında mtDNA’nın “yalancı gen (pseudogen)” içerdiği de ortaya konmuştur. Mitokondriyal gen kopyaları hücre çekirdeğine geçer ve pseudogen halini alır (ya da tam tersi) (Zhang ve Hewitt 1996, Bensasson vd. 2001, Thalman vd. 2004, Dubey vd. 2009). Bu problemin üstesinden gelebilmek için mitokondriyonun uzun bir bölgesinin

gen dizilerini çıkarmak veya mtDNA'nın halkasal yapısını kullanarak molekül geçişini test etmek için akılcı, uzun PCR stratejileri kullanmak gerekmektedir (Thalman vd. 2004).

Bütün bu aksiliklerine rağmen, hayvan populasyon genetiği çalışmalarında mtDNA'nın sıklıkla tercih edilmesinin birçok nedeni vardır (Freeland 2005). Bunların ilki, mtDNA'nın çalışılması nispeten kolaydır. Küçük olması ve gen dizilişinin korunması çok çeşitli omurgalı ve omurgasızlarda mitokondriyal bölgelerin çoğaltılmasını sağlayacak evrensel primerlerin oluşturulmasına avantaj sağlamıştır. Bunun anlamı, türe özgü başlangıç primerine ihtiyaç duymadan bu evrensel primerlerin kullanılabilmesidir.

İkinci olarak, gen dizilişi korunmuş olsa da toplam mutasyon oranı mtDNA'da yüksektir (Avisé 2000). Memeli mtDNA'sındaki sinonim değişimlerin oranı yılda $5,7 \times 10^{-8}$ olarak hesaplanmıştır (Brown vd. 1982). Bu bulgu, protein kodlayan nükleer genin değişim hızından 10 kat daha fazladır (Brown vd. 1979). Özellikle kontrol bölgesi (D-loop-Diplacement loop), birçok taksonda daha hızlı değişime uğramaktadır. Bu bölge mitokondriyal genomdaki asıl kodlanmayan bölgedir. Kodlanmayan yapısından dolayı mitokondriyal genomun geri kalan kısmından 10 kat daha fazla değişim hızına sahip, yüksek derecede çeşitlilik gösteren bir bölgedir (Greenberg vd. 1983, Freeland 2005). Bölge boyunca değişim oranı sabit değildir. Memeli kontrol bölgesinde hem baz dizilişi hem de çeşitlilik oranı bakımından 3 farklı kısım tanımlanmıştır. Bunlar: ETAS (the extended termination-associated), CD (central domain) ve CSB (conserved sequence block) (Sbisa vd. 1997) (Şekil 2.31).



Şekil 2.31 Memelilerde mtDNA kontrol bölgesinin şematik diyagramı (Doda vd. 1981, Matson ve Baker 2001)

ETAS ve CSB bölgeleri daha hızlı değişim gösteren bölgelerken, CD çok uzak taksonlar arasında bile çok korunmuş bir bölgedir (Bellinvia 2004). Farklı değişim oranları içermesinden dolayı kontrol bölgesi, populasyon analizleri (ETAS ve CSB bölgeleri kullanılarak), hem türler arası hem de tür içi filogenetik çalışmalar (tüm kontrol bölgesi) ve tüm ailesel seviyedeki çalışmalar (CD bölgesi kullanılarak) için iyi bir adaydır (Matson ve Baker 2001).

mtDNA'daki yüksek mutasyon oranının nedeninin metabolik solunum ürünlerinin birikimi ve nükleer DNA'ya oranla tamir mekanizmasının çok iyi olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wilson vd. 1985). mtDNA'da transisyon mutasyonlar fazladır (Brown vd. 1982). Mitokondriyal genlerin daha hızlı evrimi, özellikle sinonim bölgelerde nükleer genlerden daha fazla nükleotid değişimi gösterdikleri anlamına gelmektedir (Goto ve Kimura 2001, Overton ve Rhoads 2004). Mitokondriyal ve nükleer genler arasındaki filogenetik yaklaşımları etkileyen bir diğer temel farklılık ise mtDNA'nın daha fazla nükleotid kompozisyonu eğiliminde olmasıdır ki özellikle böceklerdeki A+T eğilimi çok yüksek seviyede fazladır (Simon vd. 1994).

Nedeni ne olursa olsun, bu yüksek mutasyon oranı, mtDNA'nın nispeten yüksek seviyelerde çeşitlilik göstermesini ve böylece populasyon içi ve populasyonlar arası genetik soyların ortaya konulmasını sağlamaktadır (Avice 2000, Freeland 2005).

mtDNA'nın nükleer genlere göre tercih edilmesinin diğer bir sebebi ise, bazı istisnai durumlar hariç mtDNA maternal kalıtıldığından dolayı rekombinasyonun olmamasıdır (Birky 2001). Böylece nükleer genlere göre mitokondriyal soyların tanımlanması daha kolay olmuştur. Çünkü eşeyli üreyen organizmaların gen havuzlarında iki bireyin rekombinasyona uğramış genleri birikmektedir. mtDNA'nın etkili klonal kalıtımı, bireysel soyların zaman içindeki takibini kolaylaştırır ve filocoğrafya çalışmalarında mtDNA dizilerinin daha fazla kullanılmasını elverişli kılar (Freeland 2005).

Son olarak mtDNA'nın haploid olması ve tek ebeveynden kalıtılması, diploid nükleer DNA'nın populasyon miktarının çeyreği kadar etkili olmasına sebebiyet verir. Bu durum mtDNA'nın darboğaz gibi demografik olaylara daha duyarlı olmasına neden olur

(Freeland 2005). Darboğaz olayı, hastalık veya katastrofik durumlar gibi populasyon miktarının geçici olarak azaldığı durumlarda meydana gelir. Populasyon kendini çabuk toparlarsa bile, nükleer genotiplerle karşılaştırıldığında hayatta kalan mitokondri haplotip sayısı nispeten daha az olacaktır. Böylece populasyon üzerine darboğaz etkisinin anlaşılması, mtDNA ile daha kolaylaşacaktır.

Son 3 milyon yıl içerisinde global iklim dalgalanmaları buzul devirlerin oluşmasına öncülük etmiştir. Bunun kaçınılmaz bir sonucu olarak boreal, ılıman ve tropikal alanlarda yaşayan birçok organizmanın yayılış alanlarında büyük değişiklikler olmuştur. Bu tarz alan değişikliklerinin genetik sonuçlarının olması beklenir ve gelişen DNA teknolojisi bu durumun araştırılabilmesi için en uygun belirteçleri üretir (Hewitt 2000). Populasyonların, türlerin ve toplulukların şu anki genetik yapısı özellikle Kuvaterner buzul dönemi sırasında oluşmuştur. Hayvan mtDNA'sı sayılan bütün bu özelliklerinden dolayı Kuvaterner dönem ve filocoğrafik çalışmalarda tercih edilmektedir (Hewitt 2004, Vidya vd. 2009).

2.7 Populasyon İçi ve Populasyonlar Arası Genetik Çeşitliliğin Nedenleri

Genetik çeşitlilik, birçok faktörden etkilenir ve böylece populasyonlar arasında önemli farklılıklar ortaya koyar (Freeland 2005). Genetik sürüklenme, populasyon darboğazı, doğal seçilim ve eşeysel seçilim genetik çeşitliliğe neden olan başlıca faktörlerdir. Ancak bu faktörler, genetik çeşitliliğe beraber etki edebildiklerinden dolayı, iki populasyon farklılaştığı zaman hangi faktörün doğrudan etkili olduğu belirlenemeyebilir.

2.7.1 Genetik sürüklenme

Genetik sürüklenme, bir nesilden diğerine populasyonların allel frekanslarını şans eseri değiştiren bir süreçtir. Bu durum, populasyondaki üreme başarısındaki çeşitlilikle, bazı bireylerin diğerlerinden daha fazla yavrulaması sonucu ortaya çıkar. Sonuç olarak tüm alleller hayatta kalmaz ve böylece allel frekansları bir nesilden diğerine dalgalanma gösterir. Genetik sürüklenme allel frekanslarını rastgele gerçekleştiren olaylar sonucu

değiştirdiği için bu farklılaşmalar, non-adaptif (uyumsuz olmayan) evrimsel değişiklikler düzeyinde gerçekleşir (Freeland 2005). Genetik sürüklenme, küçük populasyonlarda daha etkilidir. Seçilim etkisi olmadığı durumda sürüklenme, kısa bir zaman diliminde ya her alleli sabitler ya da yok olmaya iter. Böylece genetik çeşitlilik artmış olur.

Genetik sürüklenme nispeten geniş populasyonları etkilese de etkinin gerçekleşebilmesi için daha çok zamana ihtiyaç vardır. Sürüklenme populasyon genetiğinde etkili bir güçtür ve bir populasyonun genetik yapısının en önemli teorik ölçümlerinin temelini oluşturur ki bu da “etkili populasyon büyüklüğüdür (N_e)” (Freeland 2005). Bir populasyonun temel ölçüsü onun büyüklüğüdür. Basit bir şekilde düşünülürse büyük populasyonların hayatta kalma şansı, küçük populasyonlara göre daha fazladır. Bu nedenle Dünya Koruma Örgütü (World Conservation Union-IUCN), populasyon miktarını, çeşitliliğin bir anahtarı olarak görür ve kullanır. Buna göre eğer bir populasyonda yetişkin birey sayısı 50’den az ise o populasyon kritik derecede tehlike altındadır. Basit bir şekilde, belirli bir populasyondaki birey sayısı populasyon miktarını temsil etmektedir (N_c -Census population size). Populasyon genetiği bakış açısında konuyla ilgili uygun bir ölçüm olan N_e kullanılmaktadır. Bir populasyonun N_e değeri, genetik sürüklenmenin ardından gerçekleşen genetik çeşitliliğin oranını verir ve bu oran bir populasyonun N_e değeriyle ters orantılıdır.

2.7.2 Populasyon darboğazı

Bir populasyondaki birey sayısı, kısa bir süre için azaldığı zaman sadece çok nadir olan allellerin, sürüklenme yüzünden kaybolma eğilimi altında olduğu gösterilmiştir (1981, 1982). Bu durum “darboğaz (bottleneck)” olarak adlandırılır. Genetik çeşitlilik ölçümleri düzenli bir azalma göstermediği için darboğazın tespiti biraz kafa karıştırıcıdır (Freeland 2005).

Darboğazdan sonra allel çeşitliliğinin azalması beklenen heterozigotluk (H_e) değerini düşürür. Çünkü Hardy-Weinberg eşitliği altında daha az allel, beklenen heterozigotluğu düşürme eğiliminde olacaktır. Aynı zamanda gözlenen heterozigotluk (H_o) artışı, populasyonların maruz kaldığı son darboğaz için kullanışlı bir gösterge olabilir (Luikart ve Cornvet 1998).

2.7.3 Kurucu etkisi

Yeni bölgelere giden veya götürülen bir grup kurucu birey tarafından kurulan ilk populasyon genellikle küçüktür. Yeni populasyondaki allel frekanslarının sadece şans eseri kaynak populasyondan farklı olması olasıdır. Bu olay bir darboğaz tipi olan “kurucu etkisi” olarak adlandırılır. Küçük bir organizma grubu tarafından yeni bir populasyonun kurulması tipik olarak sadece yeni bir populasyonun oluşumunu değil, aynı zamanda yeni ve eski populasyon arasındaki farklılıkların ani evrimini de ifade etmektedir (Freeman ve Herron 2009).

2.7.4 Doğal seçim

Charles Darwin'in doğal seçim yoluyla evrim teorisi, bir türün adaptasyonu ile açıklanmıştır. Adaptasyonlar, organizmalara, besin bulma veya predatörlerden kaçma gibi avantajlar sağlayarak, onların buldukları ortamlardaki kaynakları en iyi şekilde kullanmalarını sağlar (Baker 2005). Kaynaklar kısıtlıysa adaptasyonlar, organizmanın doğurganlığını artırma eğilimindedir ve bu adaptasyonlar tür içerisinde yaygınlaşır. Diğer taraftan çevresel şartlar değiştiği zaman, seçim baskısı ortaya çıkar. Bunun bir sonucu olarak, türler zaman içerisinde oldukça farklı özellikler edinebilirler ve bunlar daha sonra farklı taksonomik türler içerisinde soylara ayrılabilirler.

Genetik çeşitlilik, doğal seçimden etkilenir. Bu süreç, bir populasyondaki genetik olarak farklılaşmış bireyler veya genotiplerin kademeli olarak çoğalması sonucu ortaya çıkar (Li 1997). Doğal seçim, tüm genetik çeşitliliği arttıran ya da azaltan farklı yollarla allel frekanslarını değiştirir.

2.7.5 Eşeyssel seçim

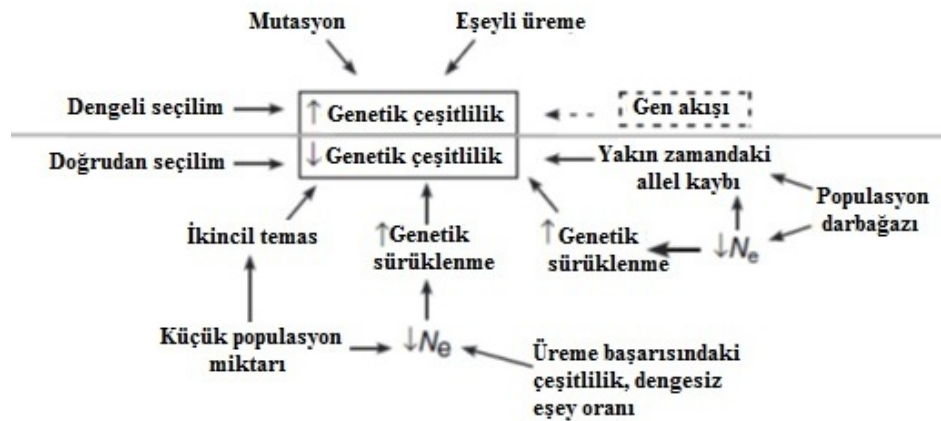
Doğal seçilimin bir şekli olan eşeyssel seçim, bireyler arasında eş edinebilme yeteneğindeki farklılığın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Populasyon genetiği çalışmaları, eşeyli üreyen populasyonlarda, eşey tercihi ya da eşey edinilmesi yollarında meydana gelen değişimlerin, hızlı bir şekilde atasal populasyondan farklılaşmalara

neden olabileceğini göstermiştir (Fisher 1958, Lande 1981, 1982, Higashi vd. 1999). Burada anahtar öneme sahip olan nokta, eşeyssel seçilimin doğrudan gen akışını etkilemesi ve etkin bir şekilde farklılaşmaya neden olmasıdır (Freeman ve Herron 2009). Ayrıca eşeyssel seçilim, eş seçimi ile ilişkili karakterler üzerine etkili olduğundan, eşeyssel seçilimdeki değişiklikler, populasyonların izole olmasına ve hızlı farklılaşmasına neden olabilir (Freeman ve Herron 2009).

2.7.6 İkincil temas

Yakın zamanda ayrılmış populasyonlar, tekrar bir araya gelip çiftleştikleri zaman “ikincil temas” meydana gelmiş olur. İkincil temas, populasyon içindeki allel frekansını değiştirmez fakat tüm lokuslardaki homozigot allel oranını artırarak bireysel genetik çeşitlilik seviyelerini azaltır. Böylece ikincil temas “ H_e ” değerini etkilemese de populasyonun genetik çeşitliliğini azaltacaktır (H_o değeri bu etkiyi göstermektedir) (Freeland 2005). Bu olay populasyonların uyum düzeylerini azaltacağından artan ölüm oranları, genetik çeşitlilik ölçümlerini azaltmaktadır.

Genetik çeşitlilik, populasyonların genetik analizlerinin en önemli konusudur. Populasyonların genetik çeşitliliğine etki eden unsurlar şekil 2.32’de şematik olarak gösterilmiştir.

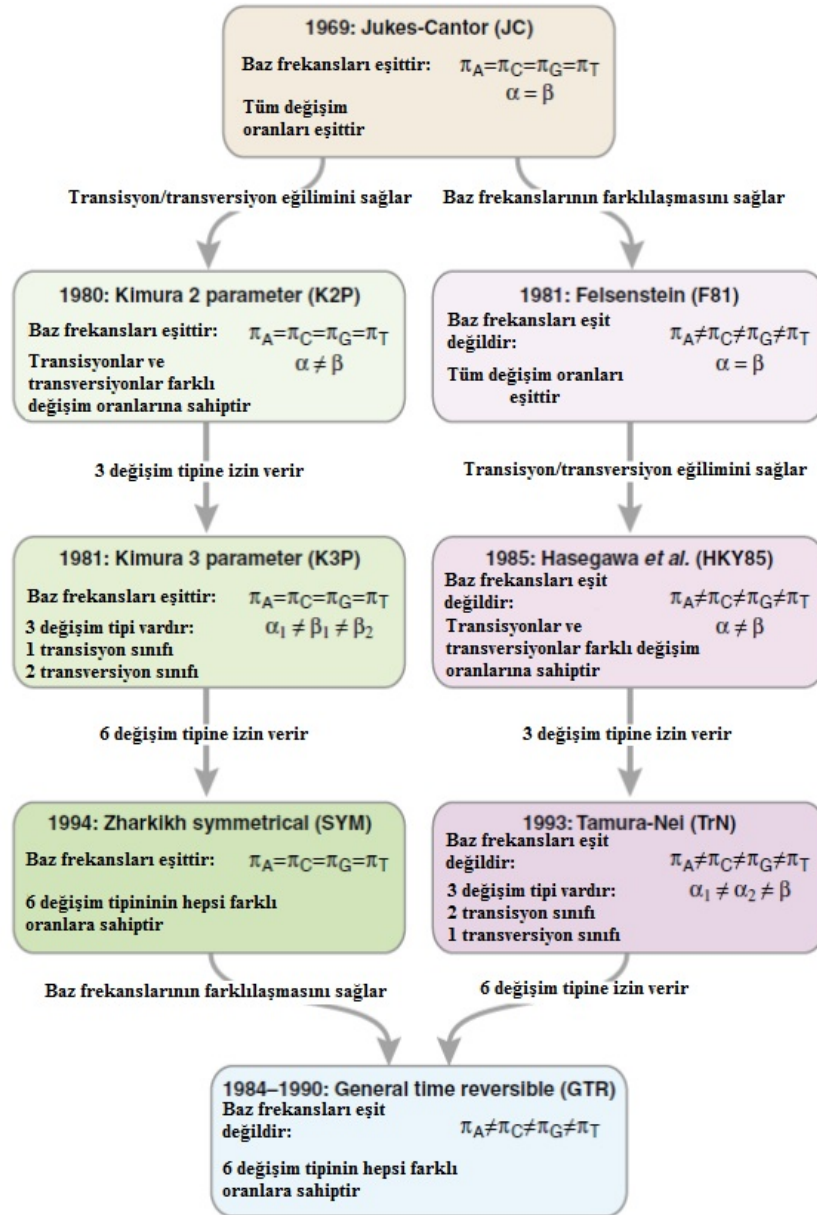


Şekil 2.32 Populasyonların genetik çeşitliliğine etki eden unsurlar (Freeland 2005)

2.8 Filogenetik Bilgisayar Uygulamalarının Önemi

Kullanıcı dostu ağaç oluşturma programlarının varlığı, birçok sistematikçi tarafından uygulanan filogenetik metodları da etkilemiştir (Simon vd. 2006). DNA dizilerinin evrim mekanizmaları öğrenildikçe “Maximum olasılık (ML)” gibi model tabanlı değerler kullanılmaya başlanmıştır. Deneysel çalışan bilim insanları ve teorisyenler, realistik modeller arttıkça, uygun moleküler evrimsel özelliklerin önemini anlamışlardır (Swafford vd. 1996) (Şekil 2.33). 1980’lerde ve 1990’larda ML uygulayan ağaç oluşturma programları, model tabanlı analizleri kolaylaştırmıştır (örneğin, Felstentein 1981, Swafford 1998, Yang 1997). “MrBayes” programının ilk versiyonu 2001 yılında uygulanmaya başlamıştır (Huelsenbeck vd. 2001). Bu programlar, realistik modellerin oluşturulmasını ve bunlar arasından uygun modellerin seçilmesini sağlayarak dikkatleri sistematikçilerin en aktif konusu haline gelen evrimsel modellemeler üzerine çekmiştir (Posada ve Buckley 2004, Sullivan ve Joyce 2005).

“Modeltest” gibi kullanıcı dostu programlar (Posada ve Crandall 1998), model seçimini kolaylaştırmıştır. 1996 ve 2001 yılları arasında bilgisayar ve algoritmalar hız kazandıkça likelihood, tercih edilen bir model olmuştur. “Bayesian filogenetik analizleri” (Huelsenbeck vd. 2001, Larget ve Simon 1999, Yang ve Rannala 1997), MrBayes programının uygun hale getirilmesiyle iyice benimsenmiştir (Huelsenbeck ve Imenov 2002). Leache ve Reeder (2002), geniş bir mitokondriyal veri seti kullanarak parsimony, likelihood ve Bayesian filogenetik analizlerini ilk defa karşılaştırıp bu prosedürleri kıyaslayarak tartışmışlardır.



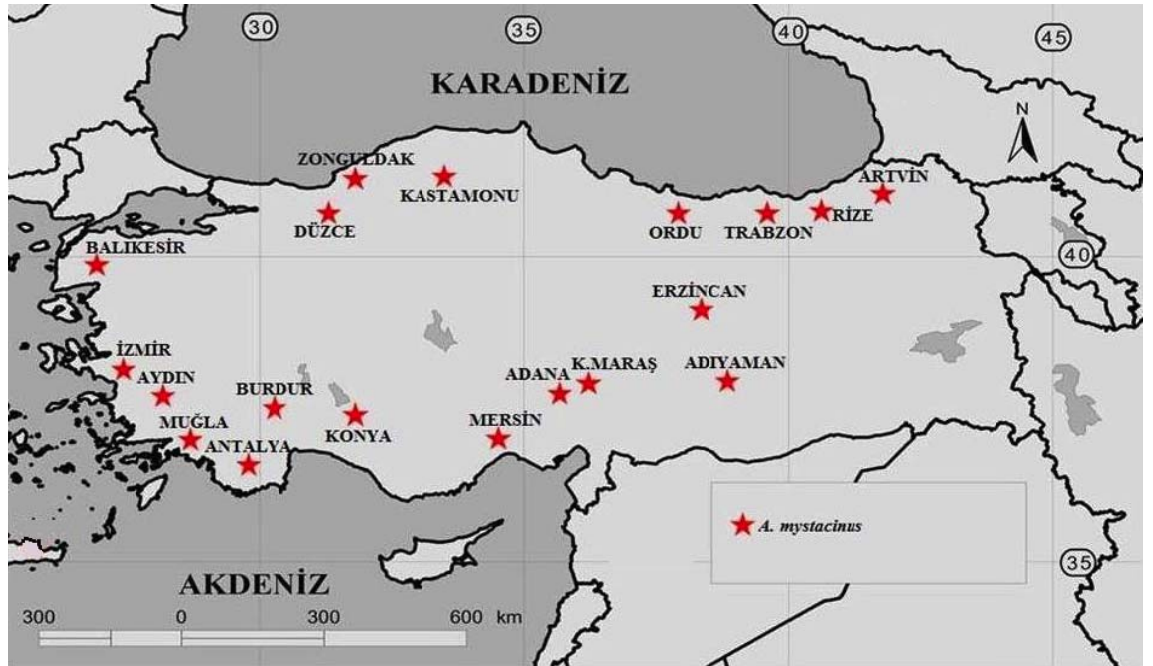
Şekil 2.33 Filogenetik analizlerde kullanılan modeller (Simon vd. 2006)

Bugün analiz edilenden daha çok nükleotid dizi verileri toplanmaktadır. Sürekli daha iyi evrim modelleri geliştirilmektedir. Ancak hala şu anki kompleks modelleri birleştiren Bayesian ağaç oluşturan ve hızlı ML programlarının çok sayıda taksonla başa çıkıp çıkamayacağı kesin değildir (Simon vd. 2006).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Omurgalı Hayvan Sistematigi laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada, Türkiye’deki 19 lokaliteden Prof. Dr.ERCÜMENT ÇOLAK tarafından toplanıp ve teşhisleri yapılan *Apodemus mystacinus* örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada PZR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri uygulanmış olup bu yöntemler için kullanılan örnek sayıları her yöntem için farklılık göstermektedir. Bu nedenle analizlerde kullanılan örnek sayıları ve bunlara ait lokaliteler, çizelge 3.1’de “*” sembolüyle her yöntem için ayrıca belirtilmiştir. Analizlerde ayrıca GeneBank’tan elde edilen *A. mystacinus* örnekleri de yer almaktadır (Çizelge 3.3). Örneklem yerleri şekil 3.1’de harita üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Türkiye’den toplanan *A. mystacinus*’a ait örneklem lokaliteleri

Çizelge 3.1 Analizlerde kullanılan örnekler ve lokaliteleri

	Müze no	Lokalite	RFLP	Sitokrom <i>b</i>	D-loop	Concatenate
1	2300	Ardanuç-ARTVİN	*	*	*	*
2	2306	Ardanuç-ARTVİN	*	*	*	*
3	2307	Ardanuç-ARTVİN	*	*	*	*
4	3345	Ardanuç-ARTVİN	*	*	*	*
5	5368	Cankurtaran Geçidi-ARTVİN	*	*	*	*
6	5369	Cankurtaran Geçidi-ARTVİN	*	*	*	*
7	5370	Cankurtaran Geçidi-ARTVİN	*	*	*	*
8	5410	Cankurtaran Geçidi-ARTVİN	*	*	*	*
9	5707	Hopa-ARTVİN	*	*	*	*
10	5385	Çamlıhemşin-RİZE	*	*	*	*
11	5386	Çamlıhemşin-RİZE	*	*	*	*
12	5387	Çamlıhemşin-RİZE	*	*	*	*
13	5405	Çamlıhemşin-RİZE	*	*	*	*
14	5406	Çamlıhemşin-RİZE	*	*	*	*
15	5407	Çamlıhemşin-RİZE	*			
16	3343	Sümela-TRABZON	*			
17	5125	Sümela-TRABZON	*	*	*	*
18	3797	Sürmene-TRABZON	*	*	*	*
19	3798	Sürmene-TRABZON	*			
20	3361	Meryem Ana-TRABZON	*	*	*	*
21	3362	Meryem Ana-TRABZON	*	*	*	*
22	5127	Gürgentepe-ORDU	*	*	*	*
23	5128	Gürgentepe-ORDU	*	*	*	*
24	6860	KASTAMONU	*	*	*	*
25	5203	ZONGULDAK	*	*	*	*
26	5204	ZONGULDAK	*	*	*	*
27	5205	ZONGULDAK	*	*	*	*
28	5206	ZONGULDAK	*	*	*	*
29	5207	ZONGULDAK	*		*	
30	5208	ZONGULDAK	*	*	*	*
31	5209	ZONGULDAK	*	*	*	*
32	5210	ZONGULDAK	*	*		
33	3702	Akkaya-Akçakoca-DÜZCE	*	*	*	*
34	4962	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
35	6664	Kaz Dağı-BALIKESİR	*			
36	6665	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
37	6666	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
38	6671	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
39	6672	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
40	6673	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*

Çizelge 3.1 Analizlerde kullanılan örnekler ve lokaliteleri (devam)

Müze no	Lokalite	RFLP	Sitokrom <i>b</i>	D-loop	Concatenate	
41	6674	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
42	6677	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
43	6678	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
44	6679	Kaz Dağı-BALIKESİR	*			
45	6680	Kaz Dağı-BALIKESİR	*	*	*	*
46	2540	Kemalpaşa-İZMİR	*	*	*	*
47	2589	Kemalpaşa-İZMİR	*	*	*	*
48	2590	Kemalpaşa-İZMİR	*	*	*	*
49	2594	Feslek-Buharkent-AYDIN	*	*	*	*
50	2595	Feslek-Buharkent-AYDIN	*			
51	5500	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
52	5502	Köyceğiz-MUĞLA	*			
53	5503	Köyceğiz-MUĞLA	*			
54	5506	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
55	5508	Köyceğiz-MUĞLA	*			
56	5510	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
57	5511	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
58	5512	Köyceğiz-MUĞLA	*			
59	5516	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
60	5521	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
61	5522	Köyceğiz-MUĞLA	*	*	*	*
62	2607	BURDUR	*	*	*	*
63	2410	Akseki-ANTALYA	*	*		
64	2411	Akseki-ANTALYA	*	*		
65	2460	Akseki-ANTALYA	*	*		
66	2469	Akseki-ANTALYA	*		*	
67	2840	Akseki-ANTALYA	*			
68	5750	Akseki-ANTALYA	*	*	*	*
69	5760	Çıgılıkara milli parkı-Elmalı-ANTALYA	*		*	
70	5761	Çıgılıkara milli parkı-Elmalı-ANTALYA	*	*	*	*
71	5762	Çıgılıkara milli parkı-Elmalı-ANTALYA	*		*	
72	2177	Sebil Yaylası-MERSİN	*			
73	2188	Sebil Yaylası-MERSİN	*		*	
74	2189	Sebil-MERSİN	*	*	*	*
75	2190	Sebil-MERSİN	*			
76	2191	Sebil-MERSİN	*			
77	2193	Sebil-MERSİN	*	*	*	*
78	2194	Sebil-MERSİN	*	*	*	*

Çizelge 3.1 Analizlerde kullanılan örnekler ve lokaliteleri (devam)

	Müze no	Lokalite	RFLP	Sitokrom <i>b</i>	D-loop	Concatenate
79	2882	Sebil-MERSİN	*	*		
80	5955	Feke-ADANA	*	*	*	*
81	5956	Feke-ADANA	*	*	*	*
82	5957	Feke-ADANA	*	*	*	*
83	5958	Feke-ADANA	*	*	*	*
84	5959	Feke-ADANA	*			
85	6000	Feke-ADANA	*	*	*	*
86	6001	Feke-ADANA	*	*	*	*
87	3636	Göksun-K. MARAŞ	*			
88	6531	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
89	6532	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
90	6533	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
91	6534	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
92	6535	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
93	6536	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
94	6539	Püren Geçidi-K. MARAŞ	*	*	*	*
95	5266	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
96	5267	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
97	5268	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
98	5269	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
99	5270	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
100	5276	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
101	5277	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
102	5280	Kemaliye-ERZİNCAN	*	*	*	*
103	5281	Kemaliye-ERZİNCAN	*			
104	2566	Beyşehir-KONYA	*		*	
105	2567	Beyşehir-KONYA	*	*	*	*
106	2568	Beyşehir-KONYA	*	*		
107	6708	Nemrut-ADIYAMAN	*	*	*	*
108	6709	Nemrut-ADIYAMAN	*	*	*	*

Analizlerde dış grup olarak *Apodemus witherbyi*, *Apodemus uralensis*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Mus musculus* ve *Rattus norvegicus* örnekleri kullanılmıştır. Bu örnekler gerek halihazırda müzede bulunanlardan (Çizelge 3.2) gerekse GeneBank'dan elde edilen örneklerden (Çizelge 3.3) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Dış grup olarak Türkiye'den kullanılan örnekler

	Müze no	Tür	Lokalite	Sitokrom <i>b</i>	D-loop	Concatenate
1	2135	<i>A. uralensis</i>	Maçka-TRABZON	*	*	*
2	2136	<i>A. uralensis</i>	Maçka-TRABZON	*	*	*
3	5278	<i>A. uralensis</i>	Posof-ARDAHAN	*	*	*
4	2853	<i>A. witherbyi</i>	Kemalpaşa-İZMİR	*		
5	2862	<i>A. witherbyi</i>	ANKARA	*	*	*
6	2863	<i>A. witherbyi</i>	ANKARA	*	*	*
7	2869	<i>A. witherbyi</i>	Yeşilköy-KONYA	*		

Çizelge 3.3 Analizlerde kullanılan GeneBank örnekleri

	Tür	Lokalite	Sitokrom <i>b</i> Accession no	D-loop Accession no	Concatenate
1	<i>A. mystacinus</i>	ARTVİN	AJ748239	AY623066	*
2	<i>A. mystacinus</i>	ANTALYA	AJ748225	AY623067	*
3	<i>A. mystacinus</i>	ANTALYA	AJ748226	AY623076	*
4	<i>A. mystacinus</i>	GÜRCİSTAN	AJ748240	AY623083	*
5	<i>A. mystacinus</i>	SURİYE	AJ311146	AY623065	
6	<i>A. mystacinus</i>	SURİYE	AJ748238	AY623078	
7	<i>A. mystacinus</i>	GİRİT	AJ748232	AY623074	
8	<i>A. mystacinus</i>	GİRİT	AJ748233	AY623075	*
9	<i>A. mystacinus</i>	GİRİT	AJ748234	AY623072	*
10	<i>A. mystacinus</i>	GİRİT	AJ748235	AY623073	*
11	<i>A. epimelas</i>	YUNANİSTAN	AJ748228	AY623064	
12	<i>A. epimelas</i>	YUNANİSTAN	AJ748230	AY623069	*
13	<i>A. epimelas</i>	BULGARİSTAN	AJ748227	AY623063	*
14	<i>A. witherbyi</i>			AY588263	
15	<i>A. witherbyi</i>			AY588260	
16	<i>A. flavicollis</i>		JX457732	AY588253	
17	<i>A. flavicollis</i>		JX457730	AY588264	
18	<i>A. sylvaticus</i>		JX457738	AY588252	
19	<i>A. sylvaticus</i>		JX457736	AY588255	
20	<i>M. musculus</i>		JX457718	KC139204	
21	<i>M. musculus</i>		JX457720	KC139206	
22	<i>R. norvegicus</i>		AB746363	HQ655913	
23	<i>R. norvegicus</i>		AB746365	HQ655915	

3.2 DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında tüm örneklerin böbrek dokuları kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon prosedürü Doyle ve Doyle (1991)'un CTAB DNA izolasyonu uyarlanarak modifiye edilmiştir. Protokol basamakları aşağıda verilmiştir:

- Küçük parçalara ayrılan doku örnekleri ependorf 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 ependorf tüp 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 ependorf tüpleri, aynı eğik açıda olacak şekilde buza yerleştirildi. DNA üstteki sıvı tabakada olacağından üst faz pipetle çekildi ve ayrı bir ependorf tüpüne konuldu.
- 500 µl -20°C'de soğutulmuş izopropanol tüplere eklendi ve tüpler yavaşça karıştırıldı. -80°C'de 30 dk bekletildi.
- Daha sonra 13.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet 2 kere %70, 1 kere de %100'lük etil alkol ile yıkandı.
- Ependorf tüpündeki pelletler laminar flow kabinde en az 1 saat kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan DNA'nın üzerine 100 µl TE (Tris-EDTA) tamponu ilave edilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

İzole edilen DNA örneklerinin spektrofotometre (Agilent 2100 Bioanalyser NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer) ile ölçümü yapılmıştır. Bir böbreğin yarısından izole edilen DNA miktarları 329 ng/µl ile 5891 ng/µl arasında, saflıkları ise 1,89 ile 2,305 arasındadır (Çizelge 3.4). DNA örnekleri çalışma boyunca -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan örneklerin DNA miktar ve saflık analizleri

#	Müze no	Lokalite	Nükleik asit miktarı	Ünite	260/280	260/230	Örnek tipi
1	2300	Artvin	1987,3	ng/µl	2,05	2,24	DNA
2	2306	Artvin	2204,8	ng/µl	2,01	2,14	DNA
3	2307	Artvin	3303	ng/µl	2,02	2,15	DNA
4	3345	Artvin	1785,5	ng/µl	2,02	2,26	DNA
5	5368	Artvin	1351	ng/µl	2,02	2,14	DNA
6	5369	Artvin	1397,5	ng/µl	2,02	2,21	DNA
7	5370	Artvin	4660,2	ng/µl	2,01	2,18	DNA
8	5410	Artvin	1307,6	ng/µl	1,99	2,14	DNA
9	5707	Artvin	1411,3	ng/µl	2,01	2,18	DNA
10	5385	Rize	2633,1	ng/µl	1,99	2,03	DNA
11	5386	Rize	4638,9	ng/µl	2,01	2,21	DNA
12	5387	Rize	842,3	ng/µl	2,01	2,25	DNA
13	5405	Rize	566,9	ng/µl	2,02	2,25	DNA
14	5406	Rize	329,5	ng/µl	2,01	2,23	DNA
15	5407	Rize	1226	ng/µl	2,02	2,08	DNA
16	3343	Trabzon	1356,4	ng/µl	2,03	2,26	DNA
17	5125	Trabzon	3256,4	ng/µl	2,04	2,19	DNA
18	3797	Trabzon	1735	ng/µl	2,01	2,19	DNA
19	3798	Trabzon	892,7	ng/µl	2	2,25	DNA
20	3361	Trabzon	2594,6	ng/µl	2,02	2,22	DNA
21	3362	Trabzon	1789,7	ng/µl	2,04	2,26	DNA
22	5127	Ordu	1421,1	ng/µl	2,01	2,09	DNA
23	5128	Ordu	1849,9	ng/µl	2,05	2,21	DNA
24	6860	Kastamonu	2125,3	ng/µl	1,98	2,13	DNA
25	5203	Zonguldak	1141,2	ng/µl	2,01	2,25	DNA
26	5204	Zonguldak	1326,2	ng/µl	2,02	2,24	DNA
27	5205	Zonguldak	3497,7	ng/µl	2,01	2,13	DNA
28	5206	Zonguldak	4480,1	ng/µl	2,04	2,21	DNA
29	5207	Zonguldak	1669,6	ng/µl	2,03	2,21	DNA
30	5208	Zonguldak	3300,8	ng/µl	2,04	2,22	DNA
31	5209	Zonguldak	1332	ng/µl	2,04	2,2	DNA
32	5210	Zonguldak	1794,1	ng/µl	2,09	2,66	DNA
33	3702	Düzce	2078,6	ng/µl	2,05	2,23	DNA
34	4962	Balıkesir	2488,6	ng/µl	2,01	2,16	DNA
35	6664	Balıkesir	753	ng/µl	2,36	-0,81	DNA
36	6665	Balıkesir	2505,8	ng/µl	2	2,17	DNA
37	6666	Balıkesir	2300,7	ng/µl	2,04	2,18	DNA
38	6671	Balıkesir	2495,2	ng/µl	2	2,08	DNA
39	6672	Balıkesir	2441,9	ng/µl	2,03	2,15	DNA
40	6673	Balıkesir	2135	ng/µl	2,02	2,18	DNA

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan örneklerin DNA miktar ve saflık analizleri (devam)

#	Müze no	Lokalite	Nükleik asit miktarı	Ünite	260/280	260/230	Örnek tipi
41	6674	Balıkesir	3626,1	ng/µl	1,99	2,17	DNA
42	6677	Balıkesir	3151,5	ng/µl	1,99	2,22	DNA
43	6678	Balıkesir	3336,1	ng/µl	2,02	2,2	DNA
44	6679	Balıkesir	2524,1	ng/µl	1,98	2,14	DNA
45	6680	Balıkesir	1820,9	ng/µl	2,02	2,27	DNA
46	2540	İzmir	2320,4	ng/µl	2,02	2,18	DNA
47	2589	İzmir	1635,4	ng/µl	2,02	2,25	DNA
48	2590	İzmir	553,4	ng/µl	2,02	2,29	DNA
49	2594	Aydın	1934,1	ng/µl	2,02	2,22	DNA
50	2595	Aydın	950,1	ng/µl	2,17	0,93	DNA
51	5500	Muğla	2280,8	ng/µl	2	2,14	DNA
52	5502	Muğla	3819,2	ng/µl	2,02	2,15	DNA
53	5503	Muğla	2696,6	ng/µl	2,02	2,12	DNA
54	5506	Muğla	608,8	ng/µl	2	2,24	DNA
55	5508	Muğla	3591,5	ng/µl	2,03	2,16	DNA
56	5510	Muğla	858,3	ng/µl	1,99	2,15	DNA
57	5511	Muğla	3618,8	ng/µl	2,05	2,26	DNA
58	5512	Muğla	1970,9	ng/µl	2,03	2,21	DNA
59	5516	Muğla	5891,4	ng/µl	1,98	2,15	DNA
60	5521	Muğla	2748,9	ng/µl	2,01	2,16	DNA
61	5522	Muğla	2144,3	ng/µl	2,01	2,13	DNA
62	2607	Burdur	1995,7	ng/µl	2,04	2,22	DNA
63	2410	Antalya	1693,6	ng/µl	2,04	2,25	DNA
64	2411	Antalya	1282,5	ng/µl	2,04	2,24	DNA
65	2460	Antalya	1932,3	ng/µl	2,03	2,26	DNA
66	2469	Antalya	1227,1	ng/µl	2,03	2,27	DNA
67	2840	Antalya	1004,7	ng/µl	2,01	2,22	DNA
68	5750	Antalya	1045,7	ng/µl	2,04	1,99	DNA
69	5760	Antalya	414,7	ng/µl	2,08	2,13	DNA
70	5761	Antalya	1107,1	ng/µl	1,78	1,28	DNA
71	5762	Antalya	608,6	ng/µl	2,06	2,12	DNA
72	2177	Mersin	2018,5	ng/µl	2,03	2,15	DNA
73	2188	Mersin	226,9	ng/µl	1,89	2,06	DNA
74	2189	Mersin	1253	ng/µl	2,01	2,25	DNA
75	2190	Mersin	1709	ng/µl	2,02	2,23	DNA
76	2191	Mersin	1441,2	ng/µl	2	2,25	DNA
77	2193	Mersin	3170	ng/µl	2,01	2,18	DNA
78	2194	Mersin	1197,9	ng/µl	2,04	2,21	DNA
79	2882	Mersin	2841,6	ng/µl	2,02	2,21	DNA
80	5955	Adana	2907,7	ng/µl	2,01	2,11	DNA

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan örneklerin DNA miktar ve saflık analizleri (devam)

#	Müze no	Lokalite	Nükleik asit miktarı	Ünite	260/280	260/230	Örnek tipi
81	5956	Adana	2412,7	ng/µl	2,04	2,16	DNA
82	5957	Adana	1804	ng/µl	2,08	2,16	DNA
83	5958	Adana	2874,7	ng/µl	2,01	1,88	DNA
84	5959	Adana	2521,7	ng/µl	2,04	2,09	DNA
85	6000	Adana	1697,6	ng/µl	2,05	2,18	DNA
86	6001	Adana	2910,8	ng/µl	2,02	2,15	DNA
87	3636	Maraş	2041,7	ng/µl	2,01	2,2	DNA
88	6531	Maraş	2662,2	ng/µl	1,99	2,14	DNA
89	6532	Maraş	3650,4	ng/µl	2,04	2,14	DNA
90	6533	Maraş	3372,1	ng/µl	2,01	2,17	DNA
91	6534	Maraş	1947,5	ng/µl	2,05	2,2	DNA
92	6535	Maraş	2363,2	ng/µl	2,07	2,14	DNA
93	6536	Maraş	2522	ng/µl	2,03	2,09	DNA
94	6539	Maraş	2677,8	ng/µl	1,98	1,59	DNA
95	5266	Erzincan	1475,5	ng/µl	2,04	2,24	DNA
96	5267	Erzincan	2720,8	ng/µl	2,02	2,14	DNA
97	5268	Erzincan	2562,3	ng/µl	2,02	2,02	DNA
98	5269	Erzincan	1609,7	ng/µl	2,05	2,21	DNA
99	5270	Erzincan	1398,6	ng/µl	2	2,17	DNA
100	5276	Erzincan	1145,6	ng/µl	2,03	2,29	DNA
101	5277	Erzincan	2405,6	ng/µl	2,01	2,22	DNA
102	5280	Erzincan	2192,7	ng/µl	2,02	2,09	DNA
103	5281	Erzincan	1421,2	ng/µl	2,01	2,24	DNA
104	2566	Konya	1966,4	ng/µl	2,03	2,23	DNA
105	2567	Konya	1287,8	ng/µl	2,03	2,24	DNA
106	2568	Konya	1484,2	ng/µl	2,03	2,2	DNA
107	6708	ADİYAMAN	1895,7	ng/µl	2,01	2,14	DNA
108	6709	ADİYAMAN	1793,6	ng/µl	2	2,12	DNA

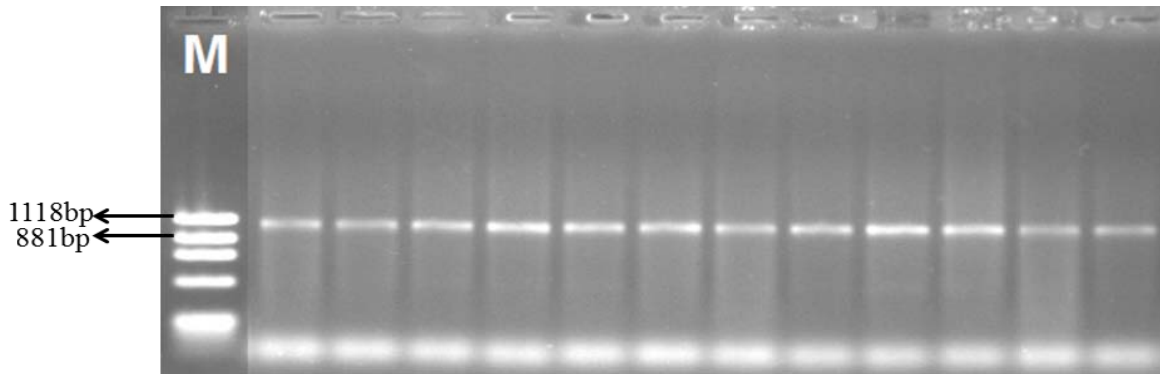
3.3 PZR-RFLP Çalışması

Tez çalışmasında mtDNA'nın sitokrom *b* ve D-loop bölgesi PZR işlemi ile çoğaltılarak restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesime tabi tutulmuştur. PZR-RFLP çalışması için çizelge 3.2'de verilen tüm örnekler her iki mtDNA bölgesinin çoğaltılması ve kesimi için kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirebilmek için 25 µl reaksiyon karışımı, DNA (200 ng/µl) örneklerinden 1 µl, 2,5 µl tampon (750 mM Tris-HCl pH: 8,8, 200 mM (NH₄)₂ SO₄; Fermentas), 0,3 µl Taq DNA polimeraz (100 unite,

Fermentas), her molekülden 200 µM içeren dNTP karışımından 4 µl, 2 mM MgCl₂'den 1.5 µl ve 1 µl primer (1pmol, Thermo Electron) eklenerek hazırlanmıştır. Sitokrom *b* bölgesini çoğaltabilmek için L14724a(5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATC GTTG-3') ve H15915a(5'-AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC-3') (Irwin vd. 1991) primer çifti kullanılmış ve bu bölgenin yaklaşık 1100 bp'lik kısmı çoğaltılmıştır. Bu bölgenin çoğaltılması için uygulanan PZR protokolü Çizelge 3.5'de gösterilmektedir. PZR sonucu çoğalan sitokrom *b* gen bölgesi %1'lik agaroz jel üzerinde 1 X TAE tamponunda 70 volt ile yürütülmüştür. Jel EtBr ile boyanarak görüntülenmiştir. Bu işlem sonucu oluşan bölgenin bazı örneklere ait jel görüntüsü şekil 3.2'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.5 RFLP çalışması için çoğaltılan sitokrom *b* bölgesi'ne ait PZR protokolü

Ön Denatürasyon	94°C	5 dakika
35 döngü	93°C	1 dakika
	46°C	1 dakika
	65°C	1 dakika 30 sn
Son uzama	65°C	10 dakika



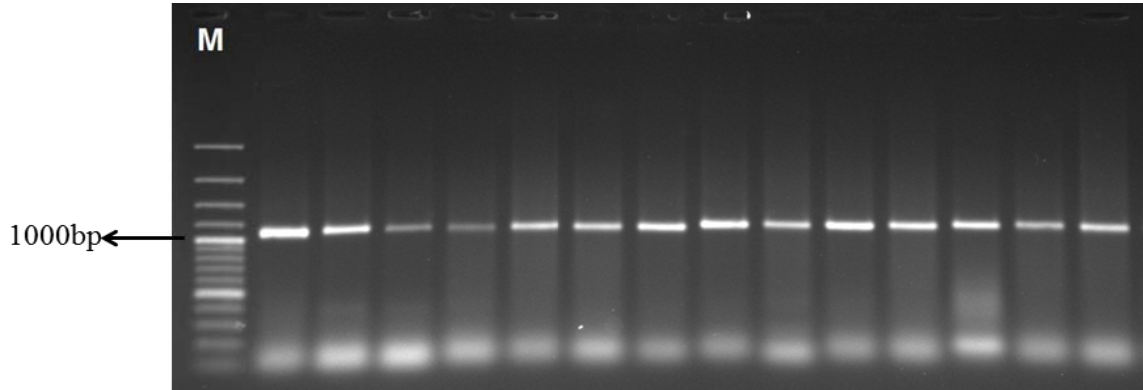
Şekil 3.2 Sitokrom *b* bölgesinin PZR amplifikasyonu sonucu ortaya çıkan jel görüntüsü

D-loop bölgesi ise yaklaşık 1100 bp'lik bölgesi L15926 (5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAACC-3') ve HN00651 (5'-

TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACCT-3') (Matson ve Baker 2001) primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu bölgenin çoğaltılması için uygulanan PZR protokolü çizelge 3.6'da gösterilmektedir. PZR sonucu çoğalan D-loop bölgesi %1'lik agaroz jel üzerinde 1 X TAE tamponunda 70 volt ile yürütülmüştür. Jel EtBr ile boyanarak görüntülenmiştir. Bu işlem sonucu oluşan bölgenin bazı örneklere ait jel görüntüsü şekil 3.3'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.6 RFLP çalışması için çoğaltılan D-loop bölgesi'ne ait PZR protokolü

	95°C	30 saniye
40 döngü	45°C	1 dakika
	65°C	1 dakika
Son uzama	65°C	7 dakika



Şekil 3.3 D-loop bölgesinin PZR amplifikasyonu sonucu ortaya çıkan jel görüntüsü

Çoğaltılan her iki mtDNA bölgesine ait birer örneğin dizi analizi yapıldıktan sonra gen bölgelerinin hangi enzimlerle kesilebileceğini belirlemek için NEBcutter Version 2.0 (Vincze vd. 2003) programı kullanılmıştır. Buna göre Sitokrom *b*, *HaeIII*, *MboI*, *RsaI*, *HinfI*, *BamHI* ve *TaqI* enzimleri; D-loop bölgesi ise *MboI*, *HinfI*, *TaqI*, *BfaI* ve *NdeI* enzimleri kullanılarak kesime uğratılmıştır.

Her enzimin kendi çalışma koşullarına göre 5µl'lik PCR ürünü, 5 u reaksiyon enzimiyle kesilmiştir. Kesim fragmentleri %2'lik agaroz jelde 100V'da 2,5 saat koşturulmuştur.

Elektroforez ve jel tamponu olarak 1 X TAE kullanılmıştır. Jel, EtBr ile 20 dakika boyunca boyandıktan sonra görüntülenmiştir. Çalışmada kullanılan enzimlerin kesim bölgeleri ve reaksiyon şartları çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Kesim enzimleri ve çalışma koşulları

Kesim Enzimi	Katalog No	Tanıma Bölgesi	Reaksiyon Derecesi	Reaksiyon Süresi
BamHI	# ER0051	5'...G↓G A T C C...3'	37°C	16 saat
		3'...C C T A G↑G...5'		
BfaI	# FD1764	5'...C↓T A G...3'	37°C	15 dakika
		3'...G A T↑C...5'		
HaeIII	# FD0154	5'...G G↓C C...3'	37°C	15 dakika
		3'...C C↑G G...5'		
HinfI	# FD0804	5'...G↓A N T C...3'	37°C	15 dakika
		3'...C T N A↑G...5'		
MboI	# ER0812	5'...↓G A T C ...3'	37°C	16 saat
		3'... C T A G↑...5'		
NdeI	# FD0583	5'...C A↓T A T G...3'	37°C	15 dakika
		3'...G T A T↑A C...5'		
RsaI	# ER1122	5'...G T↓A C...3'	37°C	16 saat
		3'...C A↑T G...5'		
TaqI	# ER0671	5'...T↓C G A...3'	65°C	16 saat
		3'...A G C↑T...5'		

3.4 DNA Dizi Analizi

Çalışmada mtDNA'nın iki gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bunlardan ilki sitokrom *b* genidir. İlgili gen bölgesini çoğaltabilmek için L14724a (5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3') ve H15915a (5'-AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC-3') (Irwin vd. 1991) primer çifti kullanılmıştır. Çoğaltma işleminde kullanılan PZR protokolü Çizelge 3.3’de gösterildiği gibidir.

Seçilen diğer bir mtDNA gen bölgesi D-loop olarak da adlandırılan kontrol bölgesidir. Kontrol bölgesini çoğaltmak için Primer 1 (5'-ATAAACATTACTCTGGTCTTGTAAC-3') ve 2 bi (5'-

CACAGTTATGGAAGTCTTGG-3') (Michaux vd. 2005) primer çifti kullanılmıştır. Çoğaltma işleminde kullanılan PZR protokolü Çizelge 3.8'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.8 DNA dizi analizi çalışması için kullanılan D-loop bölgesi'ne ait PZR protokolü

31 döngü	95°C	30 saniye
	50°C	1 dakika
	72°C	1 dakika
Son uzama	72°C	15 dakika

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda istenilen gen bölgesinin başarı ile çoğaltıldığı örneklerin dizi analizleri (sekanslarının elde edilmesi) GENOKS (Ankara) firması tarafından yapılmıştır.

3.5 Filogenetik Analizler

3.5.1 PZR-RFLP değerlendirmesi için kullanılan filogenetik analizler

PZR-RFLP analizinde tüm örnekler için çalışılan bütün belirteçlere ait bantlar, var olma ve olmama durumlarına göre değerlendirilmiştir. Var olan her bir haploit bant için "1" rakamı, olmayan bant için ise "0" rakamı kullanılmıştır.

Populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koyan UPGMA ağacı POPGENE (Yeh vd. 1997) ile oluşturulmuş olup TFPGA 3.1 (Miller 1997) programı ise bootstrap yöntemiyle güven aralığı tahmini yapmak için kullanılmıştır. NTSYS-pc v. 2.2 (Rohlf, 2008) ve SPSS 20 (Armonk, NY: IBM Corp.) yazılım programları temel bileşenler analizini (PCA-Principal component analyses) oluşturmak için kullanılmıştır.

3.5.2 DNA dizi analizi değerlendirmesi için kullanılan filogenetik analizler

Dizi analizi sonucu elde edilen kromatogram dosyaları CHROMAS Lite 2.01

(www.technelysium.com.au) ile fasta formatına çevrilmiş olup hizalama ve budama işlemleri BIOEDIT 7.1.3 (Hall 1999) programı ile gerçekleştirilmiştir. MtDNA analizlerinde tüm örneklerin her iki gen bölgesine ait diziler arasındaki nükleotid farklılıkları karşılaştırılmıştır. Bu nükleotid farklılıklarına göre DNASP 5.0 (Rozas vd. 2003) programı ile özgün haplotipler tespit edilip filogenetik ağaçlar, bu haplotiplere göre oluşturulmuştur. Populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyan dendrogramlar, (1) neighbour-joining (NJ), (2) maximum parsimony (MP) ve (3) maximum likelihood (ML) metodları kullanılarak oluşturulmuştur. Bütün analizler MEGA 5 (Tamura vd. 2011) programı ile gerçekleştirilmiştir. NJ analizleri farklı değişim oranlarına sahip substitüsyonları değerlendirebilmek için Kimura 2-parametresi (K2P) (Kimura, 1980) model alınarak gerçekleştirilmiştir. MP ağacı, heuristic search algoritması olan ağacı ikiye bölüp yeniden bağlama (TBR, tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulmuştur. ML analizler için en uygun mutasyon modelini belirlemede MEGA programı kullanılmıştır. Hem AIC (Akaike Information Criterion) hem de BIC (Bayesian Information Criterion) kriterleri değerlendirilerek her gen bölgesi için uygun mutasyon modeli belirlenmiştir. Ağaçların güvenilirliğini ortaya koymak için her metotta 1000 tekrarlı bootstrap analizi uygulanmıştır (Felsenstein 1985). Çalışmada filogeni oluşturmak için kullanılan bir diğer yöntem de Bayesian yaklaşımdır (Yang ve Rannala 1997, Huelsenbeck vd. 2001). Markov Chain Monte Carlo (MCMC) temelli Bayesian filogenetik analizi BEAST 1.7.5 (Drummond vd. 2012) programı kullanılarak 5 zincirli 1000000 tekrarla gerçekleştirilmiştir. Ağaçlar 5000 zincirde bir örneklenerek toplamda 10000 ağaç elde edilmiştir. Ayrıca çalışılan mtDNA bölgelerine ait haplotipler arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek için NETWORK (Bendelt vd. 1999) programı kullanılmıştır.

3.6 Genetik Çeşitlilik ve Populasyon Genetik Yapısı Analizleri

3.6.1 PZR-RFLP değerlendirmesi için kullanılan genetik çeşitlilik ve populasyon genetik yapısı analizleri

Populasyonlar arası genetik çeşitliliği ortaya koymak için POPGENE (Yeh vd. 1997) programı kullanılmıştır. Her örnek için gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), Nei'nin genetik çeşitliliği (1987) (H) ve Shanon information indeksi (I) hesaplanmıştır.

Ek olarak popülasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu (H_S) ve tüm popülasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu (H_T) Hardy-Weinberg beklentilerine göre hesaplanmıştır. Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü (G_{ST}) Nei (1987)'ye göre hesaplanmıştır. $N_m = 0,5(1 - G_{ST}) / G_{ST}$ formülü kullanılarak her lokus için nesil başına göçlerin ortalama sayısını ve lokuslar arasındaki ortalama değeri hesaplamak için G_{ST} değeri kullanılmıştır.

3.6.2 DNA dizi analizi değerlendirilmesi için kullanılan genetik çeşitlilik ve popülasyon genetik yapısı analizleri

Haplotip (h) ve nükleotid (π) çeşitliliği (Nei 1987) ile dizilerdeki ayırıcı bölgeler ortaya konulmuştur. Bu analizler DNASP 5.10.1 (Rozas vd. 2009) programı kullanılarak filogenetik analizler sonucu ortaya konan gruplar için ayrı ayrı yapılmıştır.

Moleküler varyans analizlerinin (AMOVA) ortaya koyduğu toplam genetik varyasyon; gruplar arası (F_{SC}), grup içindeki popülasyonlar arası (F_{ST}) ve popülasyon içi (F_{CT}) seviyelerde hesaplanmıştır. Bu parametrelerin anlamlılığı 1000 permütasyonlu mesafe matrisiyle ortaya konmuştur. Popülasyonlar üzerinde seçilimin etkili olup olmadığını yani popülasyonların nötraliteden uzaklaşıp uzaklaşmadığını ortaya koymak için Tajima'nın D (Tajima 1989) ve F_u 'nun F_s (F_u 1997) değerleri kullanılmıştır. Bu istatistik veriler aynı zamanda popülasyon büyümesi ve darboğazı ile ilgili de bilgiler vermektedir. AMOVA, nötralite ve alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma (F_{ST}) analizlerinin hepsi ARLEQUIN version 3.5 (Excoffier ve Lischer 2010) programı ile hesaplanmıştır. Ayrıca DNASP 5.10.1 (Rozas vd. 2003) programı kullanılarak gruplar arası gen akışı (N_m) ve genetik farklılaşma değerleri (F_{ST}) (Hudson vd. 1992) belirlenmiştir.

Bireyler arasındaki ikili uyumsuzluk dağılımı (mismatch distribution) analizleri ile incelenen popülasyonlardaki farklı filogruplar arasında tarihsel demografi ortaya konmuştur (Harpending 1994). Bu analizde ani dağılımlar tek modellenen kalıplar ortaya koyarken, çok modellenen dağılımlar demografik istikrarla ilişkilendirilip değerlendirilmektedir (Slatkin ve Hudson 1991). Uyumsuzluk dağılımı analizi, popülasyon büyümesi-düşüşü modeli (growth-decline model) altında DNASP 5.10.1 (Rozas vd. 2009) programıyla gerçekleştirilmiştir. Bu modelde mutasyon oranına bağlı

olarak populasyon genişleme zamanını hesaplamak için Tau (τ) = $2ut$ (u: mutasyon oranı; t: populasyon büyümesinden itibaren geçen nesil süresi) formülü kullanılmıştır (Rogers ve Harpending 1992). Populasyon büyümesiyle ilgili Tajima'nın D ve Fu'nun Fs istatistiklerinin yanında değişkenlik katsayı (CV) ve raggadness istatistiği (r) (Harpending 1994) de hesaplanmıştır.

Populasyonlar arası genetik mesafenin coğrafi mesafe ile olan ilişkisini belirleyebilmek için Mantel testi yapılmıştır. Bu testte genetik mesafe matrisi için F_{ST} değerleri, coğrafi mesafe matrisi için ise Google Earth kullanılarak kuşbakışı km cinsinden değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar için anlamlılık derecesi 1000'li permütasyonla ortaya konulmuştur. Mantel test analizleri IBD 1.52 (Bohonak 2002) programı ile gerçekleştirilmiştir.

Populasyonlar arasındaki farklılaşma zamanlarını belirlemek için “sıkı saat (strict clock)” yaklaşımıyla BEAST 1.7.5 (Drummond vd. 2012) programı kullanılmıştır. Sitokrom *b* veri setindeki nükleotid değişim oranları 1 milyon yılda %2 olacak şekilde belirlenmiştir (Ferris vd. 1983). Bu analizler için kullanılmış olan parametreler, BEAUti ile yapılmış olup nükleotid değişim modeli olarak TN93+G+I, başlangıç ağacı olarak “durağan büyüklük” (ayrıca Yule process seçilerek de aynı analizler denenmiştir) ve kalibrasyon noktası olarak Mus/Rattus ayrımı (12 Myö) (Jaeger vd. 1986, Jacobs vd. 1990, Jacobs ve Downs 1994) seçilmiştir. Analizler 50 milyon tekrarlı gerçekleştirilmiş olup, 5000 zincirde bir örneklem elde edilmiştir. Bu sonuçlar Tracer v.1.5'de değerlendirilmiş ve TreeAnnotator v.1.7.5 kullanılarak ilk 5000 ağaç çökertilmiştir. Sonuç olarak evrimsel ayrılma zamanlarını ortaya koyan ağaç, FigTree v.1.3.1 (Rambaut ve Drummond 2010) programıyla görüntülenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 PZR-RFLP Çalışması Bulguları

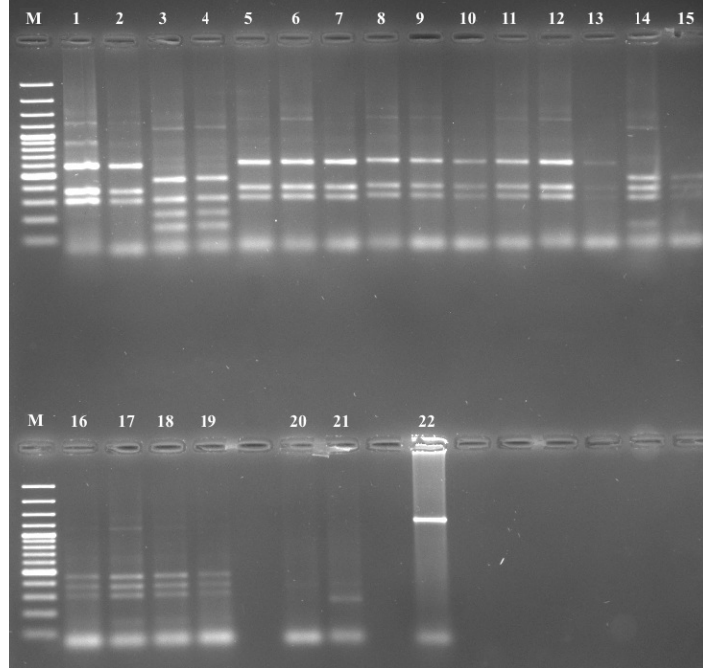
PZR-RFLP analizleri için *A. mystacinus* 'a ait Türkiye'deki 19 lokaliteden elde edilen toplam 108 birey çalışılmıştır. Dış grup olarak *Sylvaemus* alt cinsine ait 12 birey kullanılmıştır. mtDNA sitokrom *b* ve D-loop bölgelerinin yaklaşık olarak 1100 bç'lik kısımları çoğaltılarak kesim enzimlerine tabi tutulmuştur.

4.1.1 mtDNA Sitokrom *b* bölgesine ait PZR-RFLP çalışması

Sitokrom *b* bölgesinin kesimi için kullanılan 6 kesim enziminden (*Hae*III, *Mbo*I, *Rsa*I, *Hinf*I, *Bam*HI ve *Taq*I) 3 tanesi çalışılan populasyonlar arasında farklı bant profilleri ortaya koyarken diğer enzimler farklılık göstermemiştir. Bu kesim enzimleri *Mbo*I, *Hae*III ve *Rsa*I'dir.

4.1.1.1 Sitokrom *b* bölgesi *Mbo*I kesim enzimi sonuçları

*Mbo*I enzimi ile kesim sonucu, populasyonlar arası farklılık gösteren bant profilleri şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 mtDNA sitokrom *b* bölgesinin *Mbo*I kesimi

(M: Marker-100bp DNA Ladder, 1. Ordu, 2. Trabzon, 3. Rize, 4. Artvin, 5. Erzincan, 6. K.Maraş, 7. Adıyaman, 8. Adana, 9. Muğla, 10. Burdur, 11. Konya, 12. Antalya, 13. Mersin, 14. Kastamonu, 15. Zonguldak, 16. Düzce, 17. Balıkesir, 18. İzmir, 19. Aydın, 20. *A. uralensis*, 21. *A. witherbyi*, 22. Sitokrom *b* PZR ürünü; Populasyon içi varyasyon olmadığı için her populasyondan temsili bir örnek kullanılmıştır.)

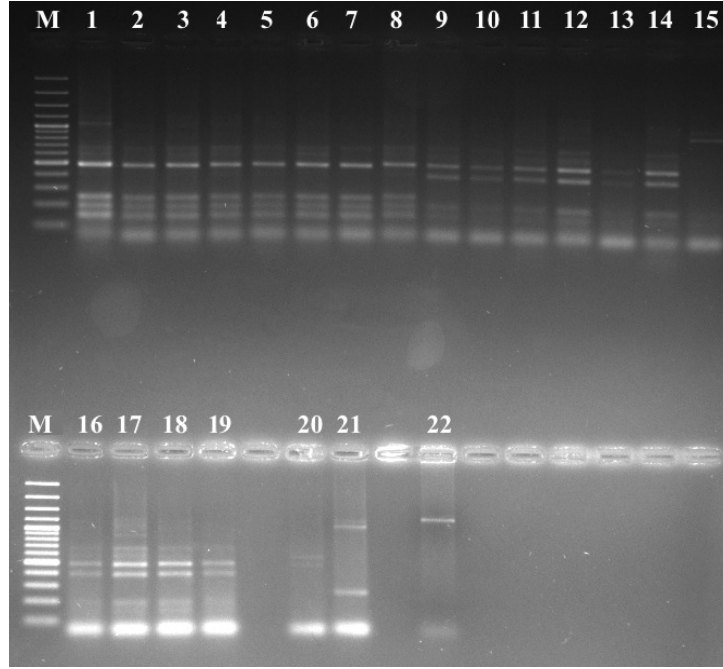
Buna göre enzimin *A. mystacinus* populasyonları içinde 3 ayrı kesim tipi sergilediği görülmektedir (Çizelge 4.1). *Mbo*I kesim enziminin *A. mystacinus* 'a ait sitokrom *b* dizilerindeki yaklaşık tanıma bölgeleri her kesim tipi için EK 1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Sitokrom *b* bölgesi *Mbo*I enzimi kesim tipleri

Gen Bölgesi	Enzim	Kesim Tipi	Populasyonlar
Sitokrom <i>b</i>	<i>Mbo</i> I	I. Tip	Rize Artvin
		II. Tip	Ordu Trabzon Erzincan K.Maraş Adıyaman Adana Muğla Burdur Konya Antalya Mersin
		III. Tip	Kastamonu Zonguldak Düzce Balıkesir İzmir Aydın

4.1.1.2 Sitokrom b bölgesi HaeIII kesim enzimi sonuçları

HaeIII ile kesimi sonucu, populasyonlar arası farklılık gösteren bant profilleri Şekil 4.2’de gösterilmektedir.



Şekil 4.2 mtDNA sitokrom *b* bölgesinin *HaeIII* kesimi

(M: Marker-100bp DNA Ladder, 1. Ordu, 2. Trabzon, 3. Rize, 4. Artvin, 5. Erzincan, 6. K.Maraş, 7. Adıyaman, 8. Adana, 9. Muğla, 10. Burdur, 11. Konya, 12. Antalya, 13. Mersin, 14. Kastamonu, 15. Zonguldak, 16. Düzce, 17. Balıkesir, 18. İzmir, 19. Aydın, 20. *A. uralensis*, 21. *A. witherbyi*, 22. Sitokrom *b* PZR ürünü; Populasyon içi varyasyon olmadığı için her populasyondan temsili bir örnek kullanılmıştır.)

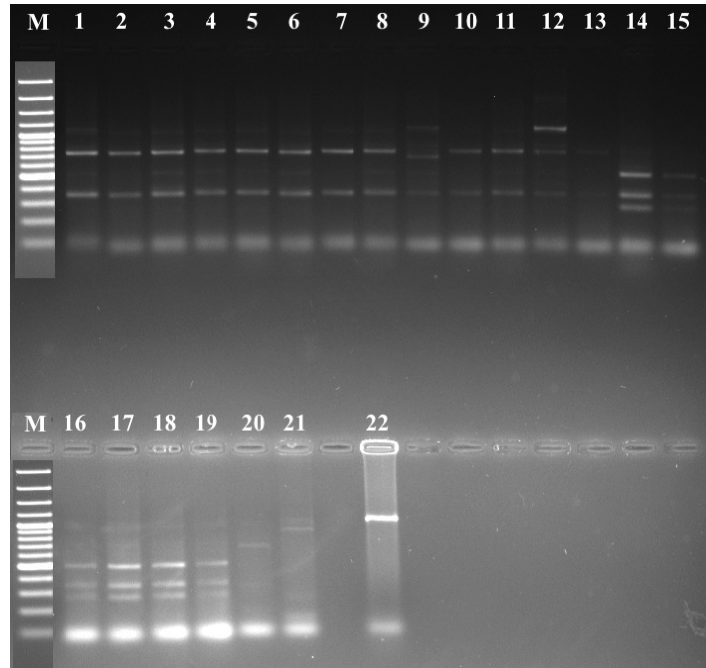
Buna göre enzimin *A. mystacinus* populasyonları içinde 4 ayrı kesim tipi sergilediği görülmektedir (Çizelge 4.2). *HaeIII* kesim enziminin *A.mystacinus* 'a ait sitokrom *b* dizilerindeki yaklaşık tanıma bölgeleri her kesim tipi için EK 2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Sitokrom *b* bölgesi *Hae*III enzimi kesim tipleri

Gen Bölgesi	Enzim	Kesim Tipi	Populasyonlar
Sitokrom <i>b</i>	<i>Hae</i> III	I. Tip	Ordu Erzincan Trabzon K.Maraş Rize Adıyaman Artvin Adana
		II. Tip	Muğla Antalya Burdur Mersin Konya
		III. Tip	Zonguldak
		IV. Tip	Kastamonu İzmir Düzce Aydın Balıkesir

4.1.1.2 Sitokrom *b* bölgesi *Rsa*I kesim enzimi sonuçları

*Rsa*I enzimi ile kesimi sonucu, populasyonlar arası farklılık gösteren bant profilleri Şekil 4.3’de gösterilmektedir.



Şekil 4.3 mtDNA sitokrom *b* bölgesinin *Rsa*I kesimi

(M: Marker-100bp DNA Ladder, 1. Ordu, 2. Trabzon, 3. Rize, 4. Artvin, 5. Erzincan, 6. K.Maraş, 7. Adıyaman, 8. Adana, 9. Muğla, 10. Burdur, 11. Konya, 12. Antalya, 13. Mersin, 14. Kastamonu, 15. Zonguldak, 16. Düzce, 17. Balıkesir, 18. İzmir, 19. Aydın, 20. *A. uralensis*, 21. *A. witherbyi*, 22. Sitokrom *b* PZR ürünü; Populasyon içi varyasyon olmadığı için her populasyondan temsili bir örnek kullanılmıştır.)

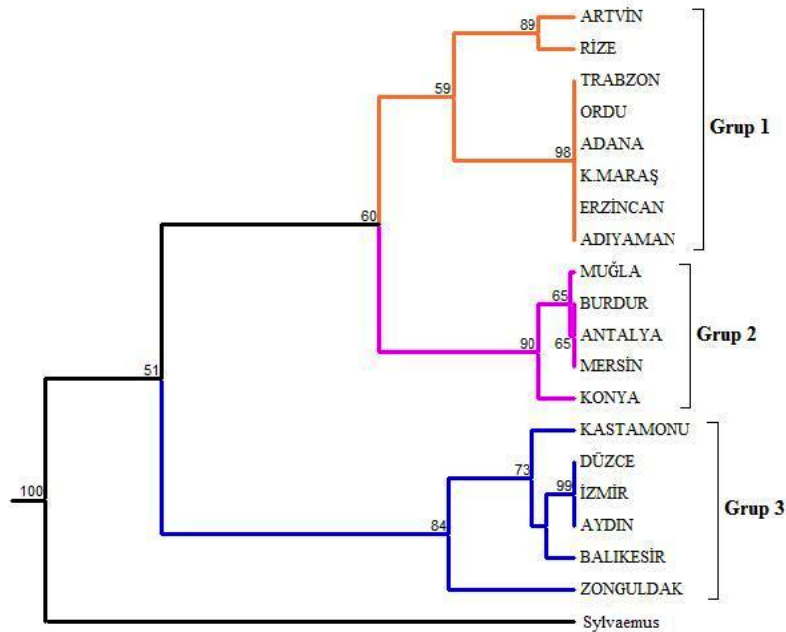
Buna göre enzimin *A. mystacinus* populasyonları içinde 2 ayrı kesim tipi sergilediği görülmektedir (Çizelge 4.3). *RsaI* kesim enziminin *A. mystacinus* 'a ait sitokrom *b* dizilerindeki yaklaşık tanıma bölgeleri her kesim tipi için EK 3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Sitokrom *b* bölgesi *RsaI* enzimi kesim tipleri

Gen Bölgesi	Enzim	Kesim Tipi	Populasyonlar
Sitokrom <i>b</i>	<i>RsaI</i>	I. Tip	Ordu Adana Trabzon Muğla Rize Burdur Artvin Konya Erzincan Antalya K.Maraş Mersin Adıyaman
		II. Tip	Zonguldak Balıkesir Kastamonu İzmir Düzce Aydın

4.1.1.3 Sitokrom *b* bölgesi PZR-RFLP sonuçlarının değerlendirilmesi

Sitokrom *b* bölgesi PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesiminden sonra agaroz jelde elde edilen fragmentlerle yapılan var-yok analizi sonucunda oluşturulan UPGMA dendrogramında *A. mystacinus* populasyonları 3 gruba ayrılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Sitokrom *b* bölgesi PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen UPGMA ağacı (Nei 1987) (%50'nin altındaki bootstrap değerleri gösterilmemiştir)

Oluşan dendrograma göre 1. grupta Ordu-Rize-Artvin-Erzincan-Maraş-Adıyaman-Adana popülasyonları yer alırken, 2. grubu oluşturan Muğla-Burdur-Konya-Antalya-Mersin popülasyonları bunlara daha yakın kümelenmiştir (BS: %60). Kastamonu-Zonguldak-Düzce-Balıkesir-İzmir-Aydın popülasyonlarından oluşan 3. grup, diğerlerinden ayrı kümelenmiştir (BS: %51).

Popülasyon içindeki en yüksek genetik çeşitlilik 3. Grup popülasyonlarında görülmüştür ($H=0,133$; $P=\%40,91$). Bunu sırasıyla 1. ve 2. gruplar izlemiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Sitokrom *b* PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen genetik çeşitlilik değerleri (Nei 1987)

Popülasyonlar	Örnek Sayısı	Na	Ne	H	I	P
Grup 1	49	1,2273	1,1134	0,075	0,1161	22,73
Grup 2	32	1,1364	1,0331	0,0255	0,0446	13,64
Grup 3	27	1,4091	1,2165	0,133	0,2023	40,91

Popülasyonlar arası genetik farklılaşma en yüksek 1. ve 3. gruplar arasında olup ($Gst=0,952$) buna paralel olarak gen akışının en düşük olduğu popülasyonlar yine 1. ve 3. gruplardır ($Nm=0,0252$) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Sitokrom *b* PZR-RFLP sonucu elde edilen popülasyonlar arası genetik farklılaşma (Gst) ve gen akışı (Nm) değerleri (Nei 1987)

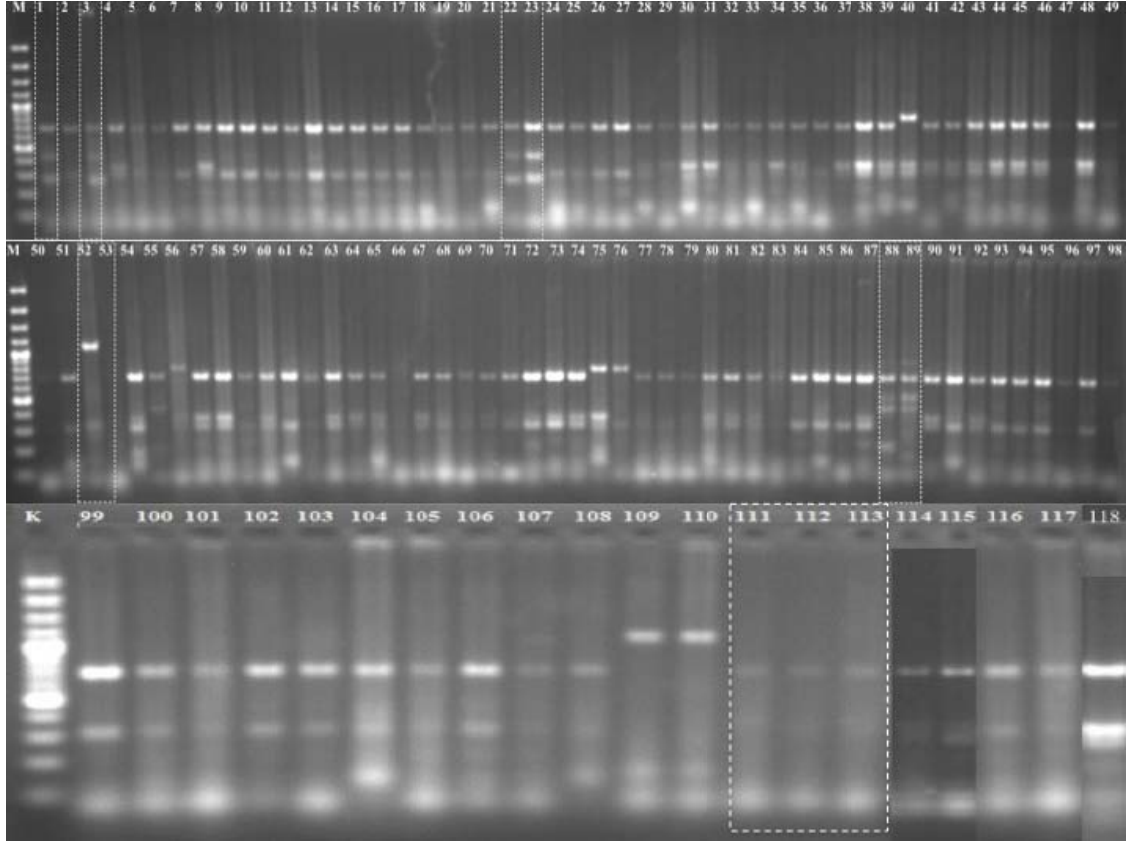
Popülasyonlar	Gst	Nm
Grup 1 - Grup 2	0.9311	0.0370
Grup 1 - Grup 3	0.9520	0.0252
Grup 2 - Grup 3	0.9348	0.0349

4.1.2 mtDNA D-loop bölgesine ait PZR-RFLP çalışması

D-loop bölgesinin kesimi için kullanılan 5 kesim enziminden (*MboI*, *HinfI*, *TaqI*, *BfaI* ve *NdeI*) 3 tanesi çalışılan popülasyonlar arasında farklı bant profilleri ortaya koyarken diğerleri farklılık göstermemiştir. Popülasyonlar arası farklılık gösteren kesim enzimleri, *MboI*, *BfaI* ve *HinfI*'dir.

4.1.2.1 D-loop bölgesi *Mbo*I kesim enzimi sonuçları

*Mbo*I enzimi ile kesim sonucu gerek populasyon içi örnekler arası gerekse populasyonlar arası farklılık gösteren bant profillerine rastlanmıştır. Buna göre tüm örneklere ait kesim profilleri Şekil 4.5’de gösterilmektedir.

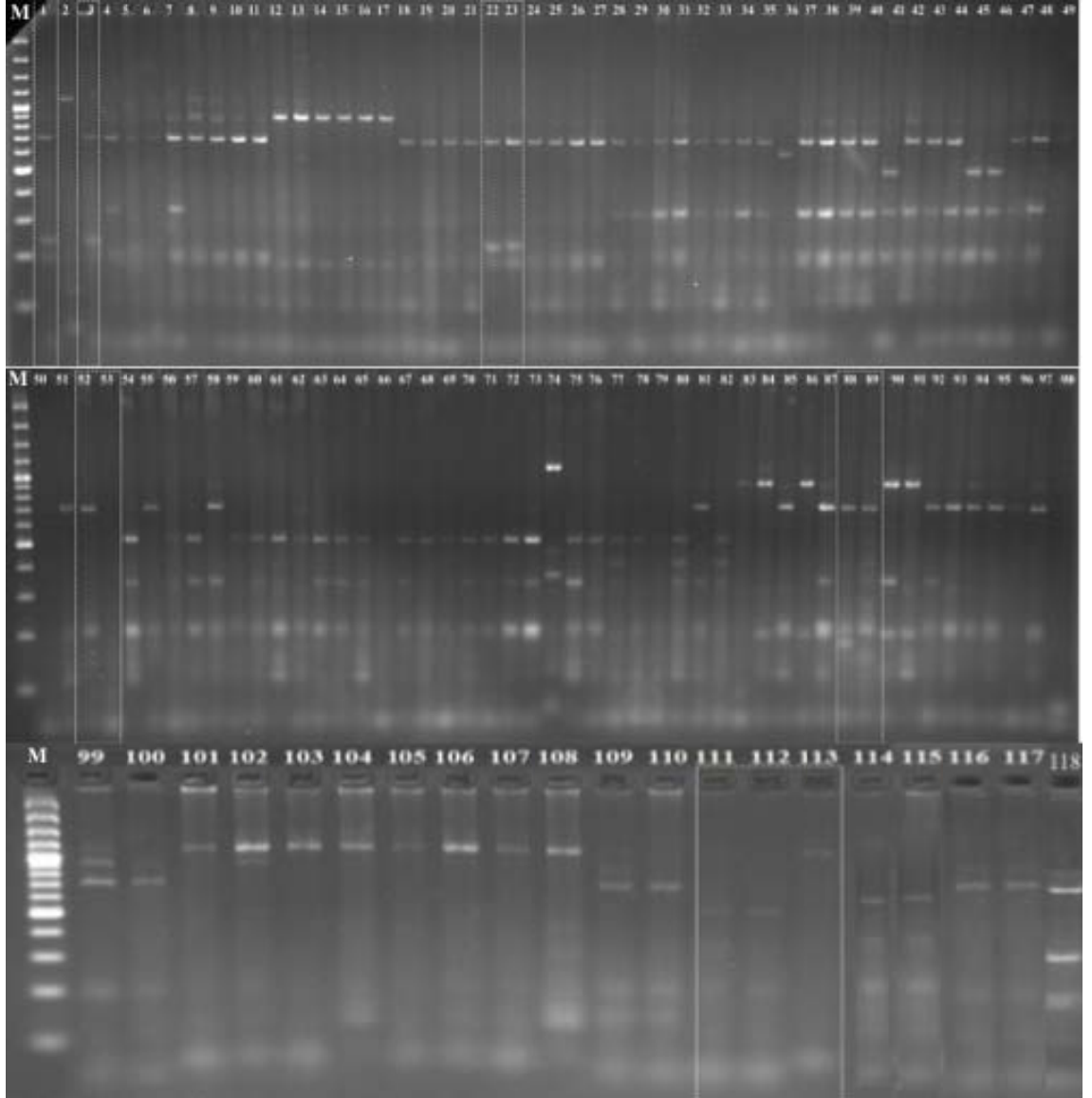


Şekil 4.5 mtDNA D-loop bölgesinin *Mbo*I kesimi

(M: Marker-100bp DNA Ladder, 1-11: Artvin, 12-17: Rize, 18-25: Trabzon, 26-27: Ordu, 28-35: Zonguldak, 36: Düzce, 37-48: Balıkesir, 49-52: İzmir, 53-54: Aydın, 55-66: Muğla, 67: Burdur, 68-76: Antalya, 77-84: Mersin, 85-93: Adana, 94-101: K.Maraş, 102-110: Erzincan, 111-112: Ankara, 113-116: Konya, 117: Adıyaman, 118: Kastamonu. Kutucuk içine alınan örnekler, dış grup olarak kullanılan *Sylvaemus* örnekleridir)

4.1.2.2 D-loop bölgesi *Bfa*I kesim enzimi sonuçları

*Bfa*I enzimi ile kesim sonucu gerek populasyon içi örnekler arası gerekse populasyonlar arası farklılık gösteren bant profillerine rastlanmıştır. Buna göre tüm örneklere ait kesim profilleri Şekil 4.6’da gösterilmektedir.

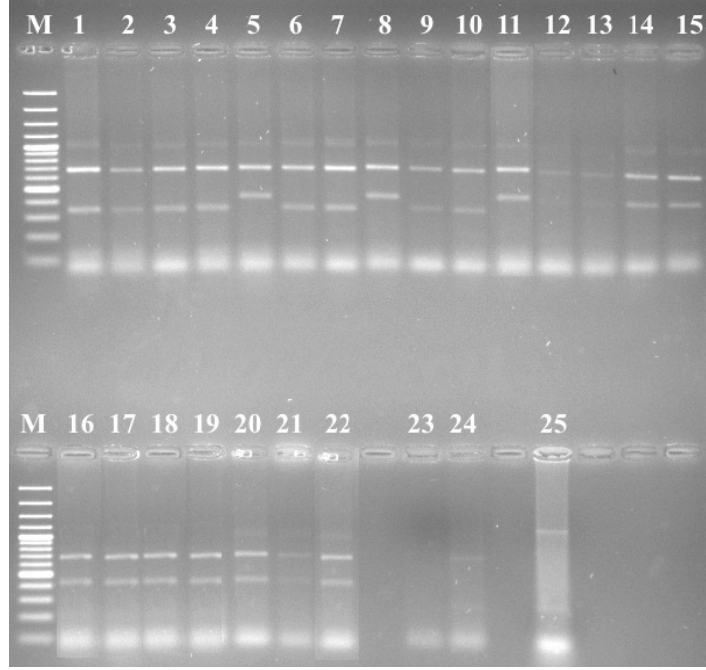


Şekil 4.6 mtDNA D-loop bölgesinin *BfaI* kesimi

(M: Marker-100bp DNA Ladder, 1-11: Artvin, 12-17: Rize, 18-25: Trabzon, 26-27: Ordu, 28-35: Zonguldak, 36: Düzce, 37-48: Balıkesir, 49-52: İzmir, 53-54: Aydın, 55-66: Muğla, 67: Burdur, 68-76: Antalya, 77-84: Mersin, 85-93: Adana, 94-101: K.Maraş, 102-110: Erzincan, 111-112: Ankara, 113-116: Konya, 117: Adıyaman, 118: Kastamonu. Kutucuk içine alınan örnekler, dış grup olarak kullanılan *Sylvaemus* örnekleridir)

4.1.2.3 D-loop bölgesi *HinfI* kesim enzimi sonuçları

HinfI enzimi ile kesim sonucu populasyonlar arası farklılık gösteren bant profilleri Şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7 mtDNA D-loop bölgesinin *HinfI* kesimi

(M: Marker-100bp DNA Ladder, 1. Ordu, 2. Trabzon, 3. Rize, 4. Artvin, 5-6: Erzincan, 7-8: K.Maraş, 9. Adıyaman, 10-11: Adana, 12. Muğla, 13. Burdur, 14. Konya, 15. Antalya, 16. Mersin, 17. Kastamonu, 18. Zonguldak, 19. Düzce, 20. Balıkesir, 21. İzmir, 22. Aydın, 23. *A. uralensis*, 24. *A. witherbyi*, 25. D-loop PZR ürünü)

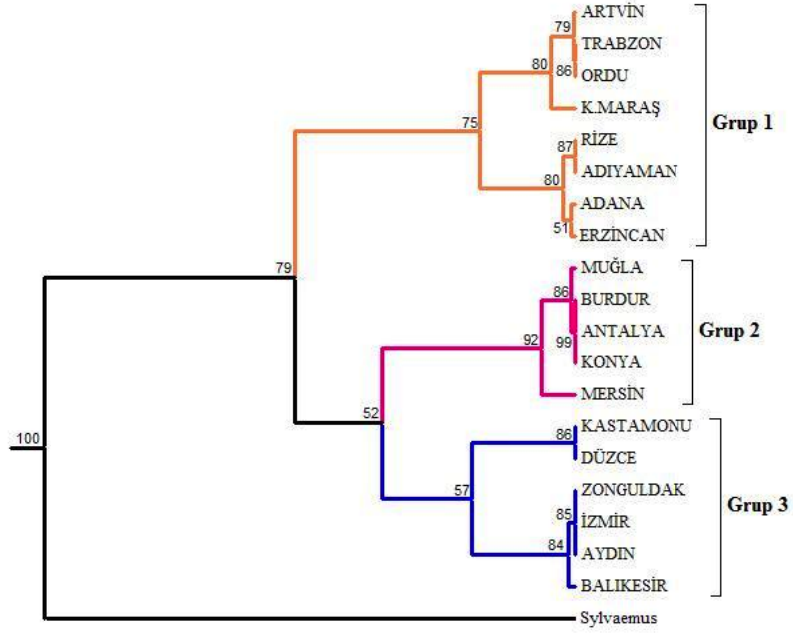
Buna göre enzimin *A. mystacinus* populasyonları içinde 2 ayrı kesim tipi sergilediği görülmektedir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 D-loop bölgesi *HinfI* enzimi kesim tipleri

mtDNA Bölgesi	Enzim	Kesim Tipi	Populasyonlar	
D-loop	<i>HinfI</i>	I. Tip	Ordu	Erzincan
			Trabzon	K.Maraş
			Rize	Adıyaman
			Artvin	Adana
		II. Tip	Zonguldak	Burdur
			Kastamonu	Konya
			Düzce	Antalya
			Balıkesir	Mersin
			İzmir	Erzincan
			Aydın	K.Maraş
			Muğla	Adana

4.1.2.4 D-loop bölgesi PZR-RFLP sonuçlarının değerlendirilmesi

D-loop bölgesinin PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesiminden sonra agaroz jelde elde edilen fragmentlerle yapılan var-yok analizi sonucunda oluşturulan UPGMA dendrogramında *A. mystacinus* populasyonları 3 gruba ayrılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 D-loop bölgesi PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen UPGMA ağacı (Nei 1987)

Oluşan dendrograma göre 1. grupta Ordu-Rize-Artvin-Erzincan-Maraş-Adıyaman-Adana populasyonları yer alırken, 2. grubu oluşturan Muğla-Burdur-Konya-Antalya-Mersin populasyonları, Kastamonu-Zonguldak-Düzce-Balıkesir-İzmir-Aydın populasyonlarından oluşan 3. grupta daha yakın kümelenmiştir (BS: %52). 1. grup, bu iki gruptan %79 bootstrap değeriyle ayrılmıştır.

Populasyon içindeki en yüksek genetik çeşitlilik 1. Grup populasyonlarında görülmüştür (H= 0,0931; P=% 28,57). Bunu sırasıyla 2. ve 3. gruplar izlemiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 D-loop PZR-RFLP çalışması sonucu elde edilen genetik çeşitlilik değerleri (Nei 1987)

Populasyonlar	Örnek Sayısı	Na	Ne	H	I	P
Grup 1	49	1,2857	1,1565	0,0931	0,1413	28,57
Grup 2	32	1,2857	1,1129	0,0713	0,1125	28,57
Grup 3	27	1,3333	1,0845	0,0619	0,1064	33,33

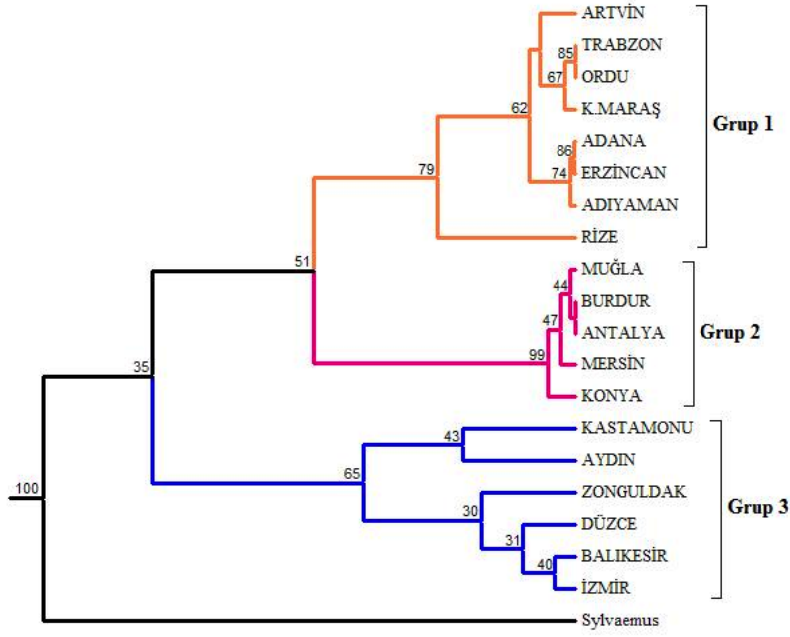
Populasyonlar arası genetik farklılaşma en yüksek 1. ve 3. gruplar arasında olup ($G_{st}=0,8288$) buna paralel olarak gen akışının en düşük olduğu populasyonlar yine 1. ve 3. gruplardır ($N_m=0,1033$) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 D-loop PZR-RFLP sonucu elde edilen populasyonlar arası genetik farklılaşma (G_{st}) ve gen akışı (N_m) değerleri (Nei 1987)

Populasyonlar	G_{st}	N_m
Grup 1-Grup 2	0,79	0,1329
Grup 1-Grup 3	0,8288	0,1033
Grup 2-Grup 3	0,7936	0,13

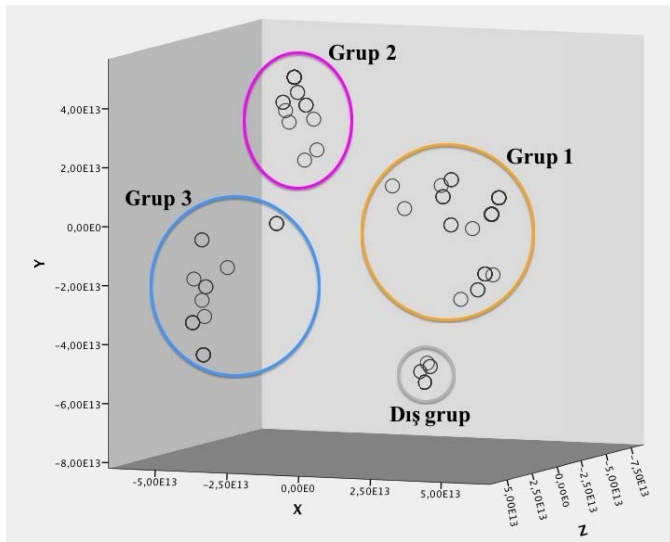
4.1.3 Sitokrom *b* ve D-loop bölgesi'nin beraber analizi

Sitokrom *b* ve D-loop bölgesine ait kesim fragmentlerinin beraber yorumlandığı analiz sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramına göre (Şekil 4.9) oluşan 3 gruptan ilkinde Ordu-Rize-Artvin-Erzincan-Maraş-Adıyaman-Adana populasyonları (1. Grup) yer alırken, 2. grubu oluşturan Muğla-Burdur-Konya-Antalya-Mersin populasyonları bunlara yakın kümelenmiştir (BS: %51). 3. grubu oluşturan Kastamonu-Zonguldak-Düzce-Balıkesir-İzmir-Aydın populasyonları ise bu iki gruba dışarıdan bağlanmış olsa da bu bağlantı, çok düşük bootstrap değeriyle desteklenmiştir (BS:%35).



Şekil 4.9 mtDNA verilerinin bitiştirilmesiyle oluşturulan UPGMA ağacı (Nei 1987)

mtDNA'nın her iki bölgesinin bitiştirilmesiyle ortaya konulan temel bileşenler analizine göre (PCA) yine bu 3 grubun ayrımı açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Bitiştirilmiş verilere göre çizilen temel bileşenler analizi (PCA)

4.2 mtDNA Sitokrom *b* Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları

4.2.1 Sitokrom *b* bölgesi filogenetik analizi sonuçları

Bu tez çalışmasında toplam 95 *A. mystacinus* örneği analizlerde kullanılmıştır. Bu örneklerden 85 tanesi (Çizelge 3.1), dizileme yapılan 108 *A. mystacinus* örneğinden elde edilmiş olup, 10 örnek ise GeneBank'tan elde edilen *A. mystacinus*'a ait dizileri içermektedir (Çizelge 3.3). Dış grup olarak Türkiye'den kullanılan örnekler (Çizelge 3.2) analize eklenmiştir. Buna göre analizlerde kullanılan türler ve bunlara ait toplam örnek sayıları Çizelge 4.9'da gösterilmektedir. Tüm örneklerin hizalama ve budama işlemleri sonrasında sitokrom *b* bölgesine ait 896 baz çifti (bç) uzunluğundaki bölge analiz edilmiştir.

Çizelge 4.9 Dizi analizi çalışmalarında kullanılan türler ve bunlara ait örnek sayıları

TÜR	ÖRNEK SAYISI
<i>A. mystacinus</i>	95
<i>A. epimelas</i>	3
<i>A. uralensis</i>	3
<i>A. witherbyi</i>	3
<i>A. flavicollis</i>	2
<i>A. sylvaticus</i>	2
<i>Mus musculus</i>	2
<i>Rattus norvegicus</i>	2

A. mystacinus'a ait diziler, A-T bakımından zengin olup %31,16 Adenin ve %29,95 oranında Timin içermektedir. Bununla beraber Guanin ve Sitozin oranları sırasıyla %26,32 ve %12,57'dir. Toplam transisyon/transversiyon oranı (R) 6,816 olarak hesaplanmış olup tüm nükleotidlerin yer değişim oranları çizelge 4.10'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.10 Nükleotidler arasındaki transisyon ve transversiyon değişim oranları (koyu yazılan sayılar transisyon değişimlerini gösterirken italik yazılanlar transversiyon oranlarını göstermektedir.)

Nükleotid	A	T	C	G
A	*	<i>1,92</i>	<i>1,68</i>	8,44
T	<i>1,99</i>	*	27,06	<i>0,8</i>
C	<i>1,99</i>	30,8	*	<i>0,8</i>
G	20,91	<i>1,92</i>	<i>1,68</i>	*

Analiz edilen 95 *A. mystacinus* bireyine ait toplam 56 haplotip elde edilmiş olup, *A. mystacinus* ve dış grup olarak kullanılan diğer bireylere ait haplotipler çizelge 4.11’de gösterilmektedir. Haplotip dizileri EK 4’de yer almaktadır.

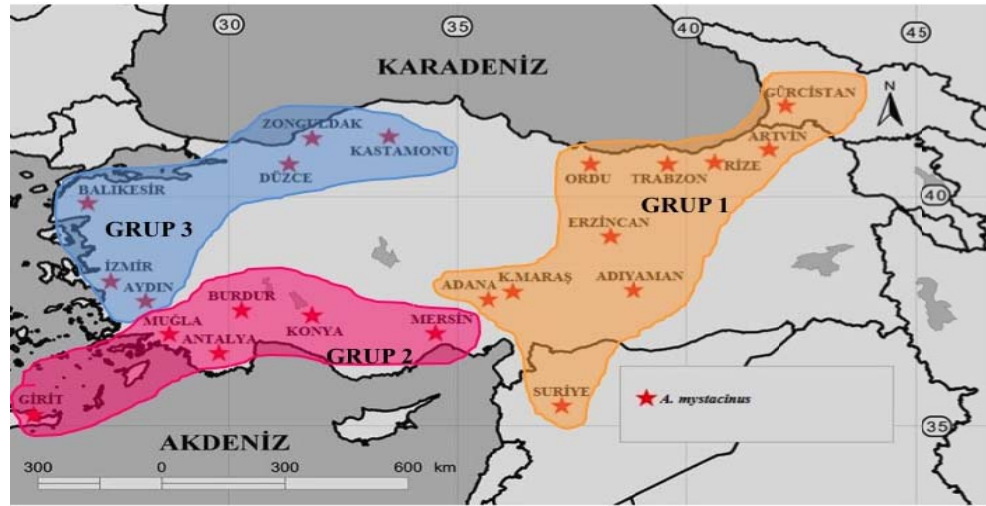
Çizelge 4.11 Sitokrom *b* bölgesine göre elde edilen haplotipler ve bunların ait oldukları popülasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde)

Popülasyon	Birey Sayısı	Haplotip
Ordu	2	Hap01 (1), Hap02 (1)
Trabzon	4	Hap03 (1), Hap04 (3)
Rize	5	Hap05 (3), Hap06 (2)
Artvin	10	Hap07 (1), Hap08 (1) Hap09 (1), Hap10 (1) Hap11 (3), Hap12 (2) Hap13 (1)
Gürcistan	1	Hap14 (1)
Erzincan	8	Hap15 (4), Hap16 (4)
Kahramanmaraş	7	Hap15 (2), Hap17 (3) Hap18 (2)
Adıyaman	2	Hap19 (1), Hap20 (1)
Adana	6	Hap15 (2), Hap21 (3) Hap22 (1)
Suriye	2	Hap23 (2)

Çizelge 4.11 Sitokrom *b* bölgesine göre elde edilen haplotipler ve bunların ait oldukları popülasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde) (devam)

Popülasyon	Birey Sayısı	Haplotip
Muğla	7	Hap24 (1), Hap25 (1) Hap26 (1), Hap27 (1) Hap28 (1), Hap29 (1) Hap30 (1)
Burdur	1	Hap31 (1)
Konya	2	Hap32 (1), Hap33 (1)
Antalya	7	Hap34 (1), Hap35 (1) Hap36 (1), Hap37 (1) Hap38 (1), Hap39 (1) Hap40 (1)
Mersin	4	Hap34 (2), Hap41 (1) Hap42 (1)
Girit	4	Hap43 (1), Hap44 (1) Hap45 (1), Hap46 (1)
Kastamonu	1	Hap47 (1)
Zonguldak	7	Hap48 (7)
Balıkesir	10	Hap47 (4), Hap50 (1) Hap51 (1), Hap52 (3) Hap53 (1)
Düzce	1	Hap49 (1)
İzmir	2	Hap49 (1), Hap54 (1) Hap55 (1)
Aydın	1	Hap56 (1)
<i>A. epimelas</i>	3	Hap57 (1), Hap58 (1) Hap59 (1)
<i>A. uralensis</i>	3	Hap60 (1), Hap61 (1) Hap62 (1)
<i>A. witherbyi</i>	3	Hap63 (2), Hap64 (1) Hap65 (1)
<i>A. flavicollis</i>	2	Hap66 (1), Hap67 (1)
<i>A. sylvaticus</i>	2	Hap68 (1), Hap69 (1)
<i>Mus musculus</i>	2	Hap70 (1), Hap71 (1)
<i>Rattus norvegicus</i>	2	Hap72 (1), Hap73 (1)

Sitokrom *b* bölgesi dizilerinden elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koyabilmek için Neighbour joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri kullanılmıştır. Tüm filogenetik analizlere göre *A. mystacinus* populasyonlarının 3 gruba ayrıldığı ortaya konulmuştur. Gruplar içindeki populasyonların birbirleriyle ilişkileri her filogenetik ağaçta farklılık göstermektedir. Grup 1 Doğu Karadeniz, Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu populasyonları ile birlikte Gürcistan ve Suriye populasyonlarını da içermektedir. 2. Grup populasyonları, Akdeniz populasyonlarıyla birlikte Girit örneklerini de içermektedir. Grup 3 ise Batı Karadeniz ve Ege Bölgesi populasyonlarından oluşmaktadır (Şekil 4.11).



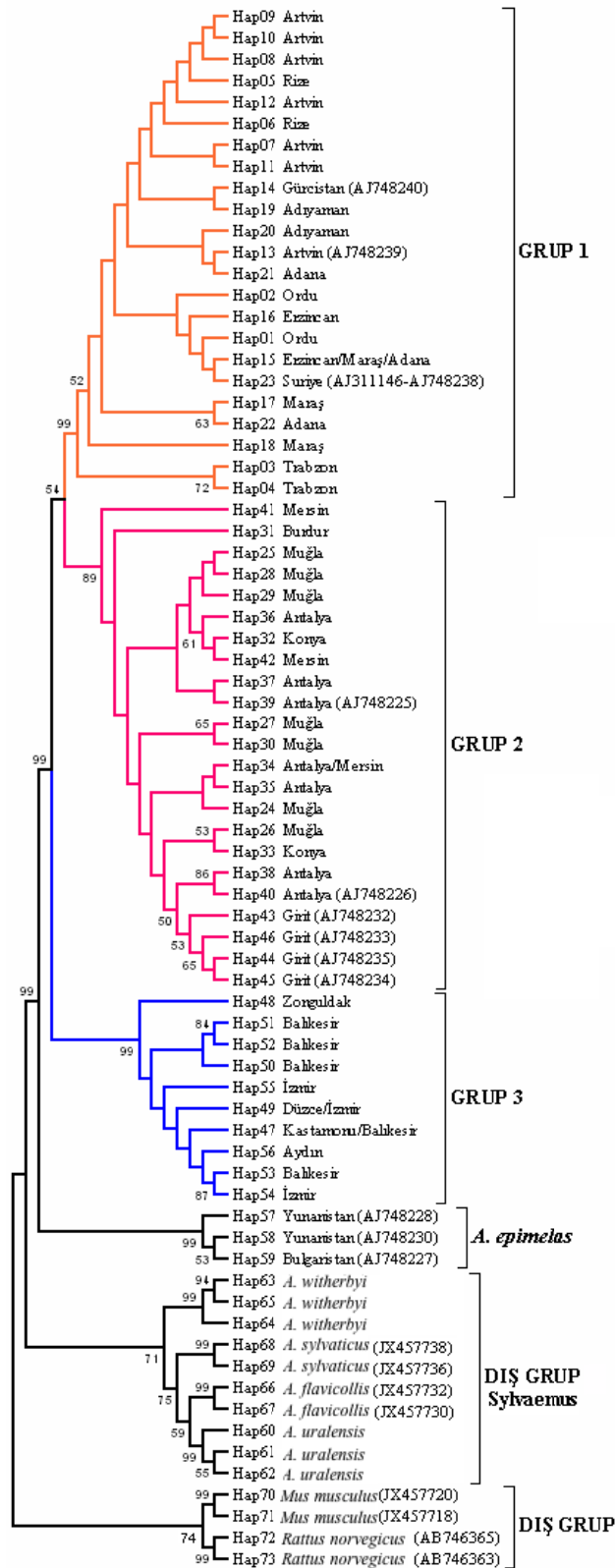
Şekil 4.11 Sitokrom *b* bölgesinin filogenetik analizleri sonucu ortaya konulan gen ağaçlarındaki gruplara ait populasyonlar (Grup 1: turuncu, Grup 2: pembe ve Grup 3: mavi renkle gösterilmektedir)

NJ ağacında bu 3 grup içinde 1. ve 2. Gruplar birbirine yakın çıkarken Batı Karadeniz ve Ege Bölgesi populasyonlarının yer aldığı 3. Grup %99 güvenirlilikle bu 2 gruptan ayrılmıştır (Şekil 4.12).

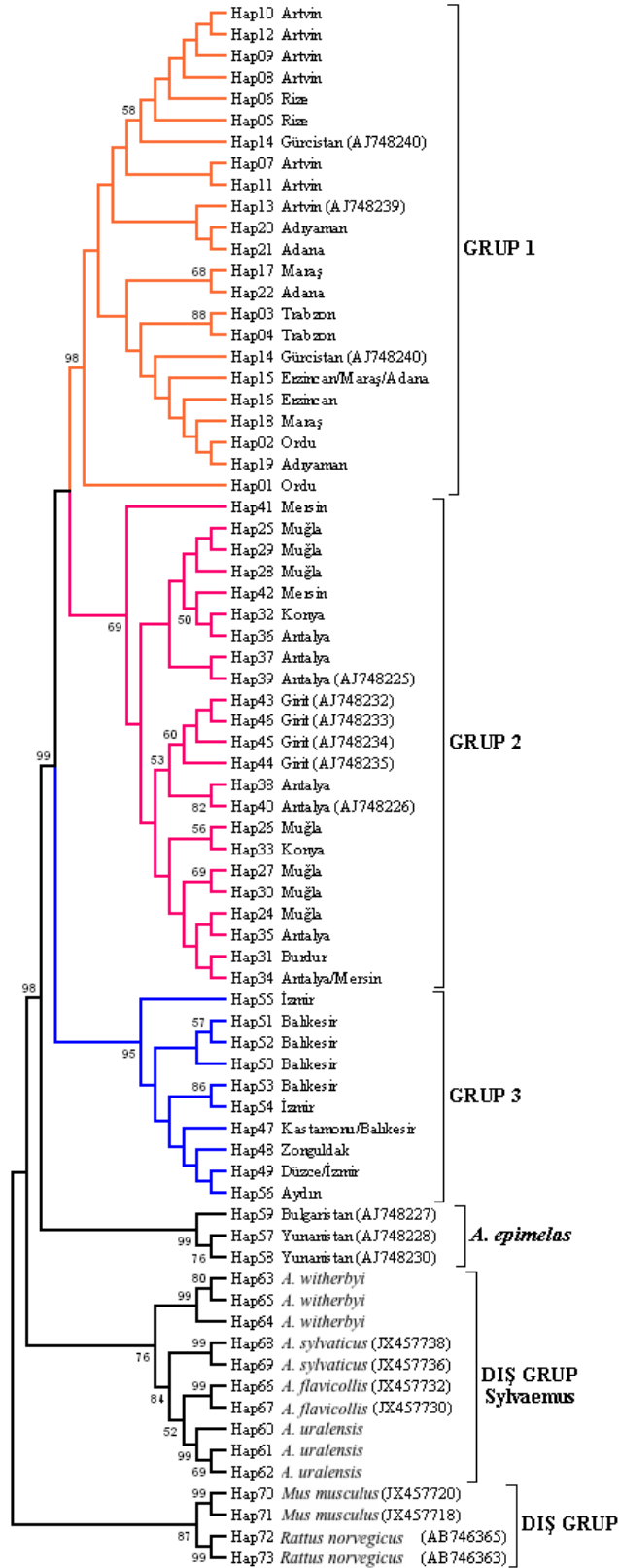
MP ağacında Grup 1 ve Grup 2 arasındaki ayrım %50'nin altında güvenirlilikle desteklenmektedir. Bununla beraber 3. Grup populasyonları %99 bootstrap değeriyle bu 2 gruptan ayrılmıştır (Şekil 4.13).

ML ağacı oluşturulurken en uygun model olan TN93+G+I kullanılmıştır. Buna göre, 1. ve 2. Gruplar birbirlerine diğer filogenetik ağaçlara göre daha yüksek güvenilirlikle bağlanırken (%55) 3. Grup popülasyonlarının ayrımı diğer ağaçlarla aynı güvenilirlikte olmuştur (Şekil 4.14).

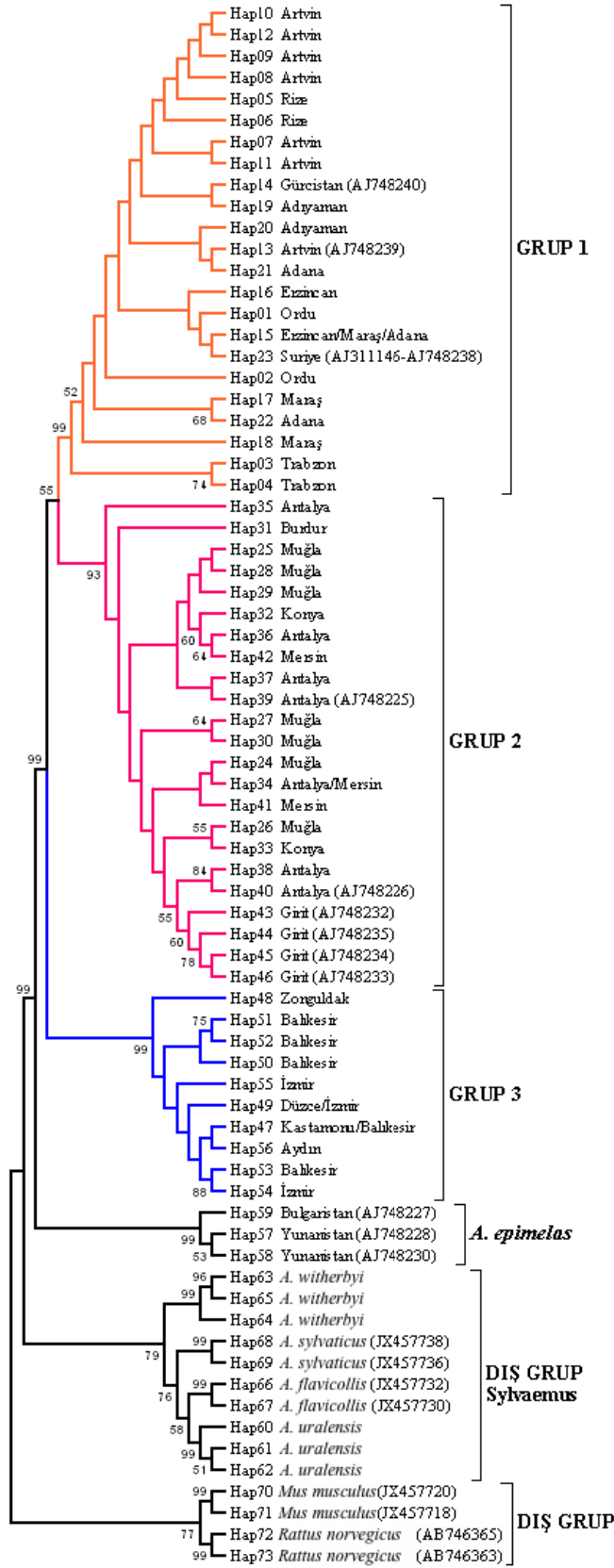
Bayesian yaklaşımı Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritması kullanılarak TN93+G+I modeline göre oluşturulmuştur. Bu analiz sonucu ortaya çıkan filogenetik ağacın yapısı MJ, MP ve ML ağaçlarının sonuçlarıyla örtüşmektedir. 1. ve 2. Grup popülasyonları arasındaki Bayesian ardıl olasılık değeri (BPP) düşükken (BPP=0,49), 3. Grup popülasyonların diğer gruplarla ilişkisini ortaya koyan ardıl olasılık değeri yüksektir (BPP=1) (Şekil 4.15).



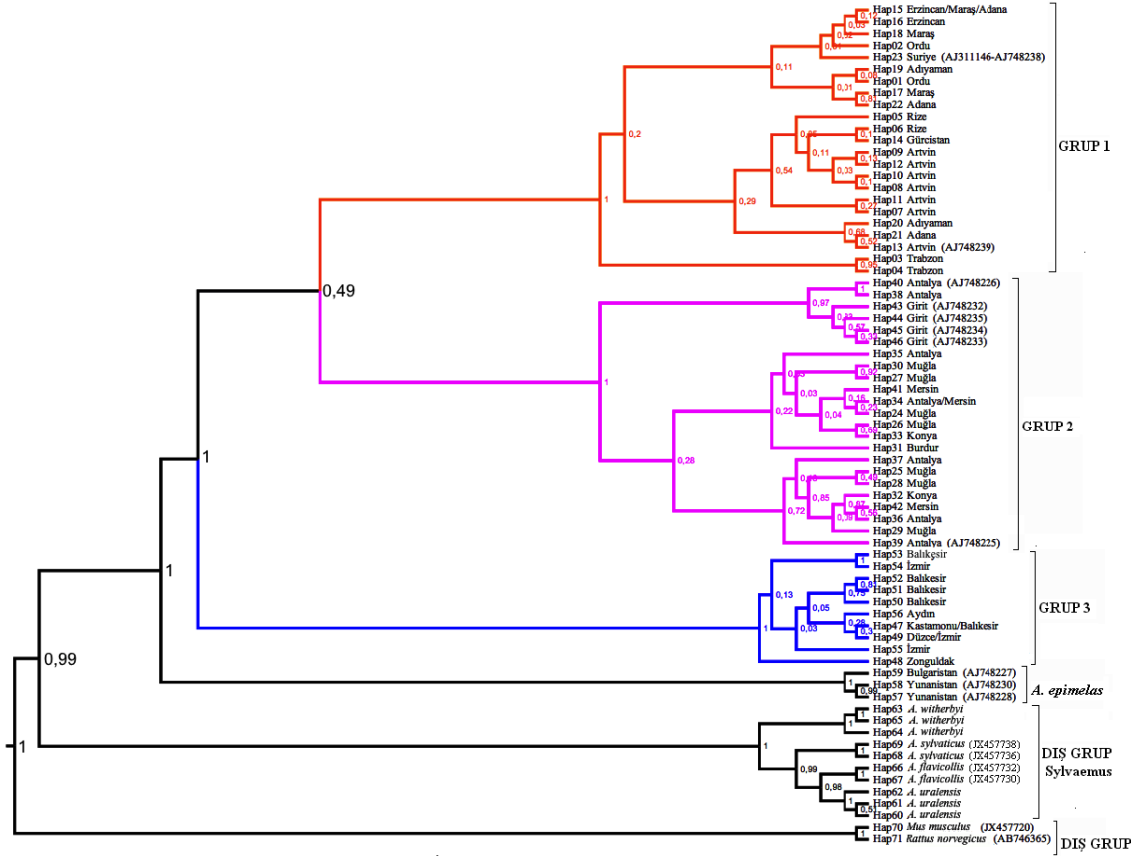
Şekil 4.12 Kimura 2-parametresi (K2P) model alınarak gerçekleştirilen, Sitokrom *b* bölgesine ait Neighbour Joining ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)



Şekil 4.13 TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, Sitokrom *b* bölgesine ait Maximum Parsimony ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)

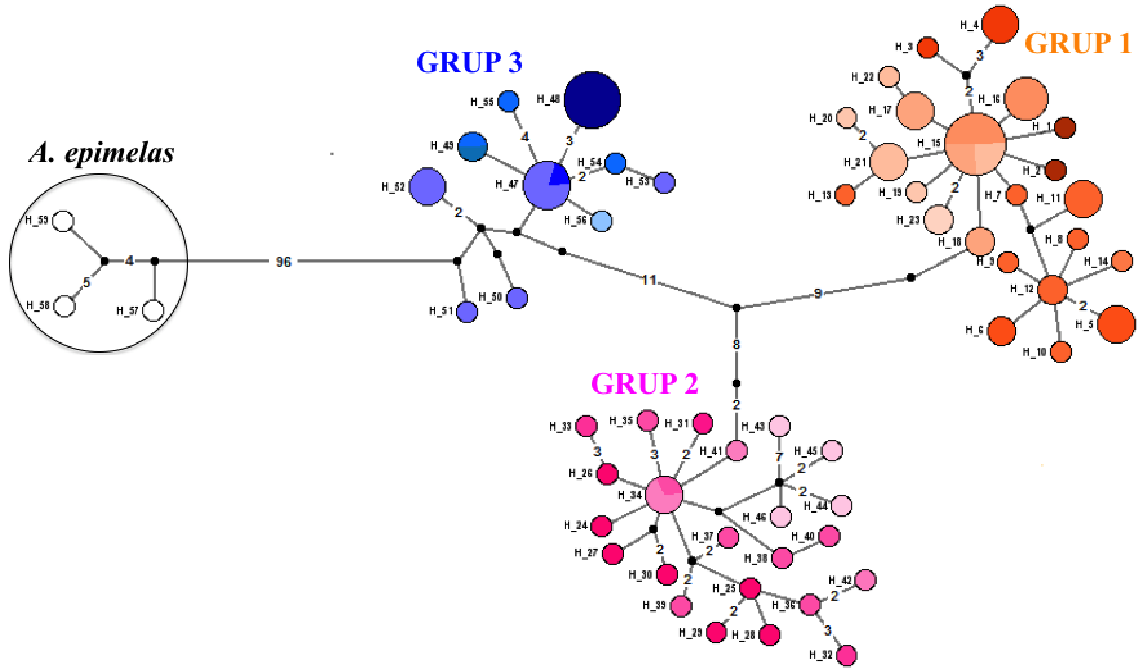


Şekil 4.14 TN93+G+I modeline göre oluşturulan, Sitokrom *b* bölgesine ait Maximum Likelihood ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)



Şekil 4.15 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, Sitokrom *b* bölgesine ait filogenetik ağaç (BPP-Bayesian posterior probability değerleri her dal için gösterilmektedir)

Haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı filogenetik analizler sonucu ortaya çıkan grupları ve bunlar arasındaki ilişkileri desteklemiştir (Şekil 4.16). *A. mystacinus* populasyonlarına en yakın dış grup olarak *A. epimelas* belirlenmiş olup median-joining analizleri sadece bu dış grup kullanılarak oluşturulmuştur. Analiz sonucuna göre 19 mutasyonluk farkla en az nükleotid değişimi 1. ve 2. Grup populasyonları arasında görülmüştür. Bununla beraber en fazla nükleotid değişimi 21 olarak bulunmuş olup bu değişim 2. ve 3. Grup populasyonları arasındadır. Gruplar arasında paylaşılan haplotip bulunmamaktadır.



Şekil 4.16 Sitokrom *b* bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı. Haplotipler arasındaki mutasyonlar (1'den fazla nükleotidde değişiklik gösterenler) dalların üzerine yerleştirilmiştir

4.2.2 Sitokrom *b* bölgesi genetik çeşitlilik analizleri

Populasyon içindeki en yüksek haplotip sayısı Grup 1 ve 2'dedir ($H_s = 23$). Bununla beraber haplotip çeşitliliği Güney Anadolu ve Girit populasyonlarını içeren 2. Grupta en yüksek seviyede olup ($h = 0,99$), Batı Karadeniz ve Ege populasyonlarını içeren 3. Grupta en düşük seviyededir ($h = 0,86$). Diziler arasındaki ayırdedici bölge sayısı 46 nükleotid değişimiyle en fazla Grup 2'de görülmektedir. Genel olarak nükleotid çeşitliliği en fazla Grup 2 ($\pi = 0,006$) en az da Grup 1'de ($\pi = 0,0039$) olup tüm gruplarda örnek sayısından bağımsız olarak düşük seviyededir. Tüm haplotip ve nükleotid çeşitliliğine ait bilgiler çizelge 4.12'de her grup için ayrı ayrı gösterilmektedir.

Çizelge 4.12 *A. mystacinus* populasyonlarının sitokrom *b* dizilerine ait genetik çeşitlilik değerleri

Populasyonlar	Örnek sayısı	Haplotip sayısı (Hs)	Ayırıcı bölge	Parsimony informative	Nükleotid çeşitliliği (π)	Haplotip çeşitliliği (h)
Grup 1	47	23	28	18	0,0039	0,95
Grup 2	25	23	46	10	0,006	0,99
Grup 3	23	10	19	10	0,0041	0,86

Populasyonlar arasındaki mesafe değerleri Kimura-2-Parametresi'ne (K2P) göre hesaplanmıştır (Çizelge 4.13). Buna göre en yüksek mesafe değeri 2. ve 3. Grup populasyonları arasında hesaplanırken (% 3,1), en az mesafe değeri 1. ve 2. Grup populasyonları arasında (%2,8) bulunmuştur.

Çizelge 4.13 K2P modeli kullanılarak sitokrom *b* bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan, *A. mystacinus* populasyonları arasındaki mesafe değerleri

Populasyon		Mesafe (%-K2P)
Grup 1	Grup 2	2,8
Grup 1	Grup 3	2,9
Grup 2	Grup 3	3,1

Sitokrom *b* bölgesine ait genetik varyasyon oranını açıklayabilmek için *A. mystacinus* populasyonları arasında Moleküler varyans analizi (AMOVA) yapılmıştır. AMOVA analizi için filogenetik analizlerde ortaya çıkan 3 grup ve bu gruplara ait alt populasyonlar kullanılmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 Sitokrom *b* bölgesinin AMOVA analizleri için kullanılan grup ve populasyonlar

Grup	Populasyon
GRUP 1	Doğu Karadeniz (DK)
	Doğu Anadolu (DA)
	Güney Doğu Anadolu (GDA)
GRUP 2	Güney Batı Anadolu (GBA)
	Güney Anadolu (GUN)
GRUP 3	Batı Karadeniz (BK)
	Batı Anadolu (BA)

Toplam varyasyonun %82,3'ü gruplar arası ilişkileri açıklamıştır ($F_{CT} = 0,823$; $P = 0,007$). Grup içerisindeki popülasyonların, *A. mystacinus* 'un genetik varyasyonunun sadece %3,84'lük bir kısmını açıklayabilmesine rağmen bu değere ait fiksasyon indeksi anlamlı bulunmuştur ($F_{SC} = 0,216$; $P < 0,001$). AMOVA analizlerine ait sonuçlar çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çizelge 4.15 *A. mystacinus* popülasyonlarının sitokrom *b* bölgelerine ait AMOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	SD*	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyasyon oranı (%)
Gruplar arası	2	638,278	10,426 Va	82,3
Grup içindeki popülasyonlar arası	4	32,535	0,486 Vb	3,84
Popülasyon içi	88	154,524	1,755 Vc	13,86
Toplam	94	825,337	12,667	
Fiksasyon İndeksleri				
F_{SC} (Vb)	0,216	($P < 0,001$)		
F_{ST} (Vc)	0,861	($P < 0,001$)		
F_{CT} (Va)	0,823	($P = 0,007$)		

*SD: serbestlik derecesi

AMOVA'ya bağlı genetik farklılaşma analizleri, en yüksek genetik farklılaşmanın 1. ve 3. Grup popülasyonları arasında olduğunu ortaya koymuştur ($F_{ST} = 0,857$). Bu popülasyonlar arası gen akışı da oldukça düşük bulunmuştur ($N_m = 0,10$). Bununla beraber en düşük genetik farklılaşma Grup 1 ve Grup 2 arasında çıkarken ($F_{ST} = 0,818$) bunlara ait gen akışı değeri çok yüksek bulunmasa da ($N_m = 0,11$) Grup 1 ve Grup 3 arasındaki gen akışından daha yüksektir ($N_m = 0,08$). Gruplar arasındaki genetik farklılaşma değerleri çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16 *A. mystacinus* grupları arasındaki sitokrom *b* bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) ve gen akışı (N_m) değerleri (üst diyagonal: N_m , Alt diyagonal: F_{ST})

Popülasyon	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Grup 1	*	0,11	0,08
Grup 2	0,818	*	0,10
Grup 3	0,857	0,830	*

A. mystacinus gruplarına ait populasyonlar arası genetik farklılaşma analizlerine göre, en yüksek farklılaşma Doğu Anadolu ve Batı Karadeniz populasyonları arasındayken ($F_{ST} = 0,958$), en düşük genetik farklılaşma ise Güney Batı Anadolu ve Güney Anadolu populasyonları ($F_{ST} = 0,021$) arasında hesaplanmıştır (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17 *A. mystacinus* gruplarının alt populasyonları arasındaki sitokrom *b* bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) değerleri

	GRUP 1			GRUP 2		GRUP 3		
	Populasyon	DK	DA	GDA	GBA	GUN	BK	BA
GRUP 1	DK	*						
	DA	0,278	*					
	GDA	0,238	0,157	*				
GRUP 2	GBA	0,811	0,848	0,857	*			
	GUN	0,815	0,853	0,858	0,021	*		
GRUP 3	BK	0,864	0,958	0,93	0,859	0,865	*	
	BA	0,844	0,898	0,893	0,833	0,839	0,413	*

Populasyonların geçen zamandaki durumlarını, darboğaz etkisinde olup olmadığı ya da eğer genişleme olmuşsa bunun hangi zamanda gerçekleştiğini ortaya koymak için yapılan uyumsuzluk dağılımı (mismatch distribution) analizlerine ait veriler Çizelge 4.18’de, oluşan 3 *A. mystacinus* grubu için ayrı ayrı verilmiştir.

Çizelge 4.18 *A. mystacinus* populasyonlarının sitokrom *b* bölgesine bağlı uyumsuzluk analizi (mismatch distribution) sonuçları

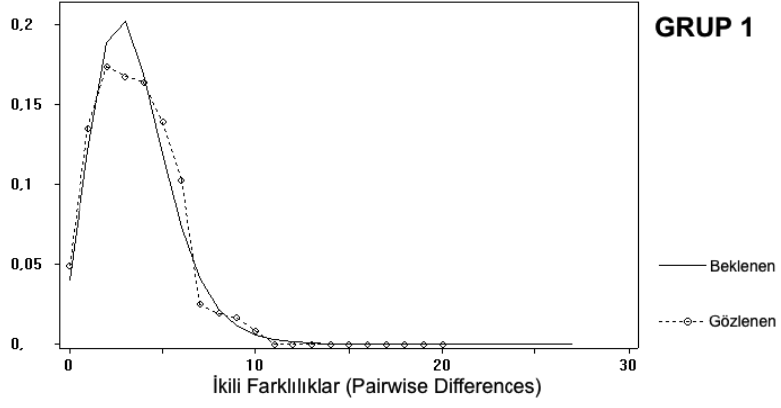
Populasyon	Tau (τ)	CV	r
GRUP 1	2,55	0,602	0,017
GRUP 2	4,07	0,501	0,018
GRUP 3	2,57	0,61	0,073

τ : mutasyon zamanına göre populasyon büyümesinin ölçütü

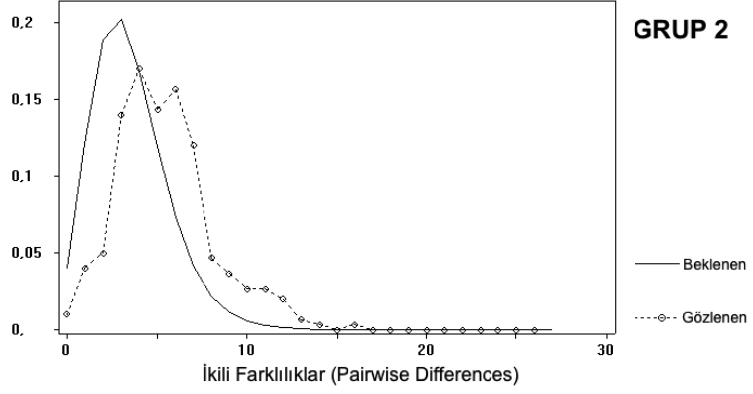
CV: coefficient of variance-değişkenlik katsayısı

r: raggadness statistics-düzensizlik analizi

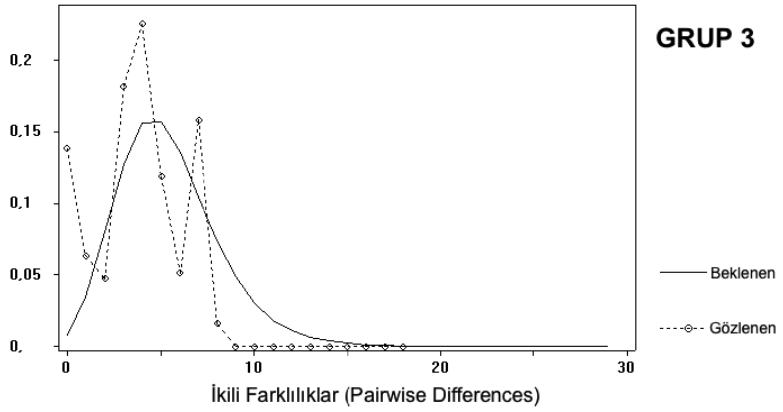
Bu sonuçlar doğrultusunda populasyon büyümesi-düşüşü modeli altında uyumsuzluk dağılımı grafikleri ortaya konmuştur. Şekil 4.17-4.19 her grup için ayrı ayrı oluşturulan grafikleri ortaya koymaktadır.



Şekil 4.17 *A. mystacinus*'a ait 1. Grup populasyonların sitokrom *b* bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri



Şekil 4.18 *A. mystacinus*'a ait 2. Grup populasyonların sitokrom *b* bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri



Şekil 4.19 *A. mystacinus*'a ait 3. Grup populasyonların sitokrom *b* bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri

Uyumsuzluk dağılımı analizleri, 1. ve 2. Grup populasyonların ani dağılımları ortaya koyan tek modelli kalıplar oluşturduğunu göstermektedir. Bu populasyonlara ait değişkenlik katsayı (CV) ve r değerlerinin düşük bulunması da ani dağılım teorisini desteklemektedir. “Tau (τ) = 2ut” formülüyle hesaplanan populasyon genişlemesi zamanlarına göre 1. Gruba dahil olan populasyonların 142.300 yıl önce, 2. Gruba dahil populasyonların ise bundan 227.120 yıl önce ani bir genişlemeye maruz kaldığı ortaya çıkmaktadır.

3. Grup populasyonlarında görülen çok modelli dağılım yapısı, sabit populasyon büyüklüğüyle ilişkilendirilmektedir. Bu durum, yüksek seviyede çıkan değişkenlik katsayısı ve r değerleriyle de desteklenmektedir.

Bu analizlerle beraber populasyonun darboğazda olup olmadığını ortaya koyan Tajima'nın D ve Fu'nun Fs hesaplamaları da yapılmıştır (Çizelge 4.19). buna göre Tajima'nın D'si ve Fu'nun Fs'si Grup 1 ve Grup 2 için anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu iki populasyon için her iki değer de yüksek derecede negatif çıktığından bu populasyonların genişlediği ve darboğaz etkisinde olmadığı söylenebilmektedir. 3. Grup populasyonları ise bu değerler bakımından negatif sonuçlar verse de bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tajima $P = 0,15$; Fu $P = 0,261$).

Çizelge 4.19 *A. mystacinus* populasyonlarının sitokrom *b* bölgesine göre yapılan populasyon darboğazı analizleri

Analizler	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3
Tajima'nın D testi			
Örnek sayısı	47	25	23
D	-1,487	-2,126	-1,002
P	0,043	0,009	0,15
Fu'nun Fs testi			
Örnek sayısı	47	25	23
Fs	-13,142	-19,264	-1,403
P	0	0	0,261

Populasyonlar arası genetik farklılaşmanın coğrafi mesafe ile olan ilişkisini belirleyebilmek için yapılan Mantel testine ait sonuçlar çizelge 4.20'de her grup için ayrı ayrı gösterilmiştir.

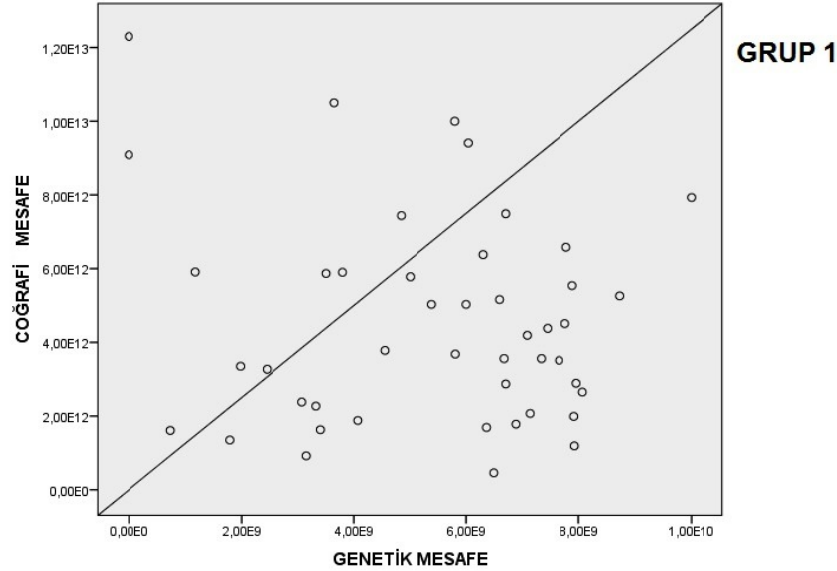
Çizelge 4.20 *A. mystacinus* populasyonlarının sitokrom *b* verilerine göre genetik ve coğrafi mesafelerini arasındaki ilişkinin hesaplandığı Mantel testi

Populasyon	R ²	P
GRUP 1	0,0174	0,29
GRUP 2	0,0021	0,491
GRUP 3	0,162	0,021

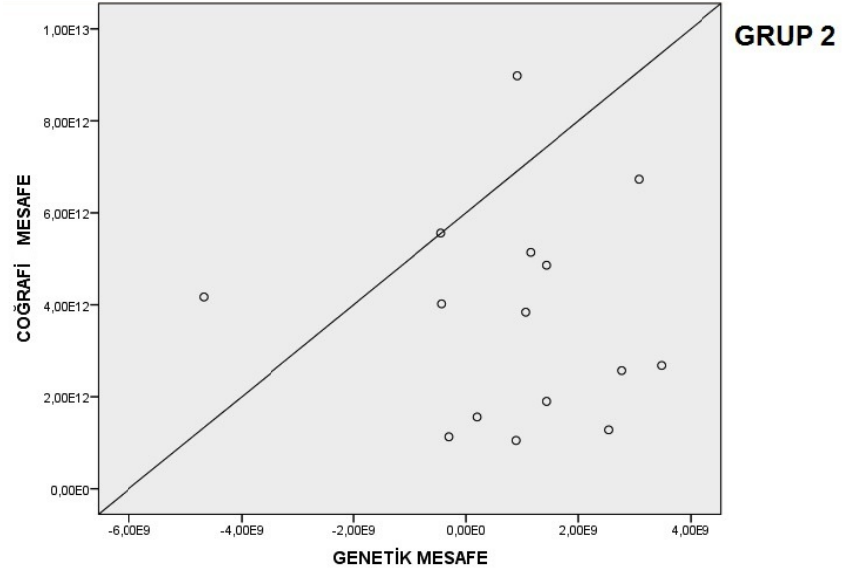
R² : Anlamlılık yüzdesi

P : Anlamlılık derecesi

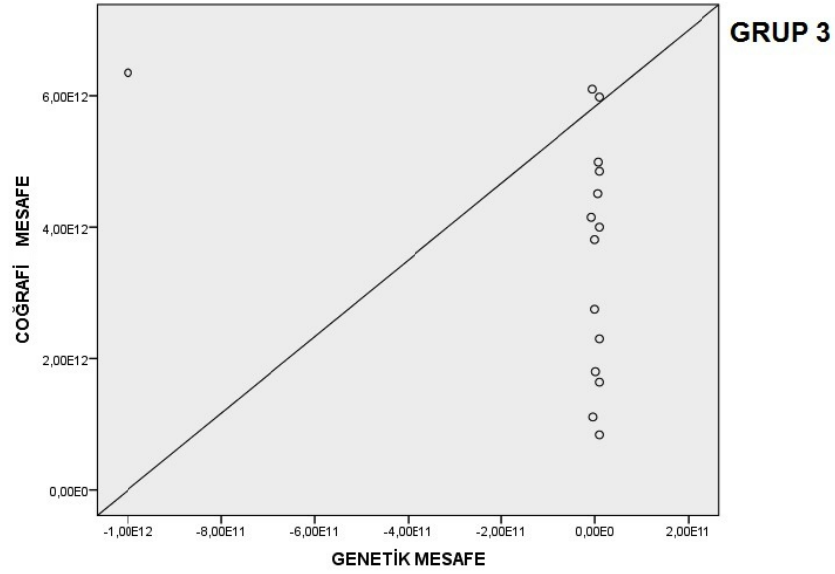
Mantel testi sonuçlarına göre 1. ve 2. Grup populasyonların bu analiz için anlamlı olmadığı ortaya konmuştur. Buna bağlı olarak populasyonlar için anlamlılık yüzdesi (R²) çok düşük olup bu sonuçlara bağlı regresyon eğrileri Şekil 4.20 ve 4.21’de verilmiştir. Regresyon eğrileri bu gruplar için genetik ve coğrafi mesafe arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur. 3. Grup populasyonlardan, genetik ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkinin açıklanması için anlamlı sonuçlar elde edilse de (P<0,05), bu sonuçlar aradaki ilişkinin ancak %16’sını açıklamak için yeterli olmuştur (R² = 0,162). 3. Gruba ait regresyon analizinin dağılım grafiği de bu sonucu göstermektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.20 *A. mystacinus*’un 1. Grup populasyonlarında sitokrom *b* dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (F_{ST}) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği



Şekil 4.21 *A. mystacinus*'un 2. Grup populasyonlarında sitokrom *b* dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (F_{ST}) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği



Şekil 4.22 *A. mystacinus*'un 3. Grup populasyonlarında sitokrom *b* dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (F_{ST}) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği

4.3 mtDNA D-loop Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları

4.3.1 D-loop bölgesi filogenetik analizleri

Bu tez çalışmasında toplam 95 *A. mystacinus* örneği analizlerde kullanılmıştır. Bu örneklerden 85 tanesi (Çizelge 3.1), dizileme yapılan 108 *A. mystacinus* örneğinden elde edilmiş olup, 10 örnek ise GeneBank'tan elde edilen *A. mystacinus*'a ait dizileri içermektedir (Çizelge 3.3). Dış grup olarak Türkiye'den kullanılan örnekler (Çizelge 3.2) analize eklenmiştir. Buna göre analizlerde kullanılan türler ve bunlara ait toplam örnek sayıları çizelge 4.21'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.21 D-loop bölgesi dizi analizi çalışmalarında kullanılan türler ve bunlara ait örnek sayıları

TÜR	ÖRNEK SAYISI
<i>A. mystacinus</i>	95
<i>A. epimelas</i>	3
<i>A. uralensis</i>	3
<i>A. witherbyi</i>	3
<i>A. flavicollis</i>	2
<i>A. sylvaticus</i>	2
<i>Mus musculus</i>	2
<i>Rattus norvegicus</i>	2

A. mystacinus 'a ait diziler, A-T bakımından zengin olup %31,41 Adenin ve %32,73 oranında Timin içermektedir. Bununla beraber Guanin ve Sitozin oranları sırasıyla %23,00 ve %12,86'dır. Toplam transisyon/transversiyon oranı (R) 4,742 olarak hesaplanmış olup tüm nükleotidlerin yer değişim oranları çizelge 4.22'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.22 D-loop bölgesindeki nükleotidler arasındaki transisyon ve transversiyon değişim oranları

Nükleotid	A	T	C	G
A	*	2,71	1,9	10,65
T	2,06	*	19,31	1,06
C	2,06	27,49	*	1,06
G	26,01	2,71	1,9	*

Analiz edilen 95 *A. mystacinus* bireyine ait toplam 44 haplotip elde edilmiş olup, *A. mystacinus* ve dış grup olarak kullanılan diğer bireylere ait haplotipler çizelge 4.23’de gösterilmektedir. Haplotip dizileri EK 5’de yer almaktadır.

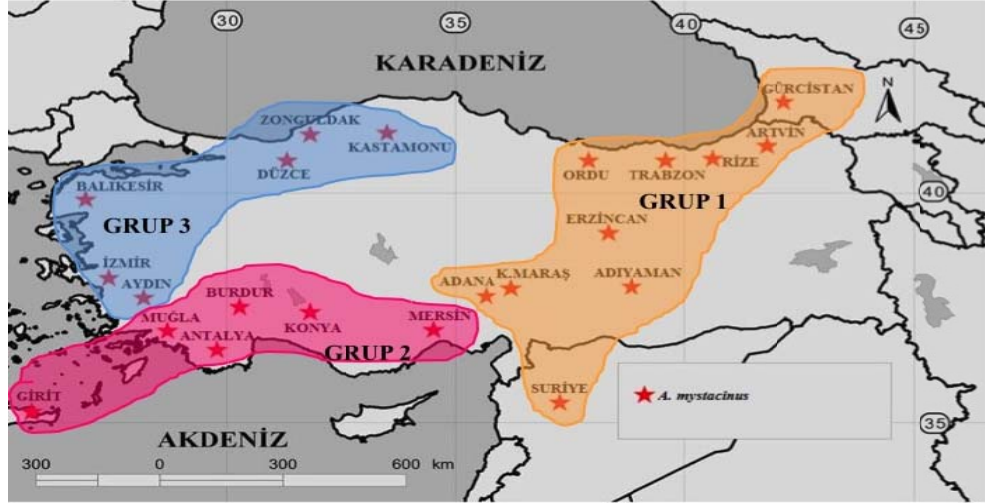
Çizelge 4.23 D-loop bölgesine göre elde edilen haplotipler, bunların ait oldukları popülasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde)

Populasyon	Birey Sayısı	Haplotip
Ordu	2	Hap01 (2)
Trabzon	4	Hap01 (4)
Rize	5	Hap02 (4), Hap03 (1)
Artvin	10	Hap01 (1), Hap02 (3) Hap04 (1), Hap05 (1) Hap06 (2), Hap07 (1) Hap08 (1)
Gürcistan	1	Hap09 (1)
Erzincan	8	Hap01 (3), Hap08 (3) Hap10 (1), Hap11 (1)
Kahramanmaraş	7	Hap01 (2), Hap12 (3) Hap13 (1), Hap14 (1)
Adıyaman	2	Hap01 (1), Hap12 (1)
Adana	6	Hap01 (2), Hap12 (1) Hap15 (3)
Suriye	2	Hap16 (1), Hap17 (1)
Muğla	7	Hap18 (1), Hap19 (1) Hap20 (1), Hap21 (1) Hap22 (1), Hap23 (2)
Burdur	1	Hap24 (1)
Konya	2	Hap25 (1), Hap26 (1)
Antalya	7	Hap18 (2), Hap22 (1) Hap27 (1), Hap28 (1) Hap29 (1), Hap30 (1)
Mersin	4	Hap22 (1), Hap30 (1) Hap31 (2)
Girit	4	Hap32 (2), Hap33 (2)
Kastamonu	1	Hap34 (1)
Zonguldak	7	Hap34 (7)

Çizelge 4.23 D-loop bölgesine göre elde edilen haplotipler, bunların ait oldukları populasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde) (devam)

Populasyon	Birey Sayısı	Haplotip
Balıkesir	10	Hap36 (1), Hap37 (1)
		Hap38 (3), Hap39 (2)
		Hap40 (2), Hap41 (1)
Düzce	1	Hap35 (1)
İzmir	2	Hap39 (1), Hap42 (1)
		Hap43 (1)
Aydın	1	Hap44 (1)
<i>A. epimelas</i>	3	Hap45 (1), Hap46 (1)
		Hap47 (1)
<i>A. uralensis</i>	3	Hap48 (1), Hap49 (1)
		Hap50 (1)
<i>A. witherbyi</i>	4	Hap51 (1), Hap52 (1)
		Hap53 (1), Hap54 (1)
<i>A. flavicollis</i>	2	Hap55 (2)
<i>A. sylvaticus</i>	2	Hap56 (1), Hap57 (1)
<i>Mus musculus</i>	2	Hap58 (1), Hap59 (1)
<i>Rattus norvegicus</i>	2	Hap60 (1)

D-loop bölgesi dizilerinden elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koyabilmek için Neighbour joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri kullanılmıştır. Tüm filogenetik analizlere göre *A. mystacinus* populasyonlarının 3 gruba ayrıldığı ortaya konulmuştur. Gruplar içindeki populasyonların birbirleriyle ilişkileri her filogenetik ağaçta farklılık göstermektedir. Grup 1 Doğu Karadeniz, Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu populasyonları ile birlikte Gürcistan ve Suriye populasyonlarını da içermektedir. 2. Grup populasyonları, Akdeniz populasyonlarıyla birlikte Girit örneklerini de içermektedir. Grup 3 ise Batı Karadeniz ve Ege Bölgesi populasyonlarından oluşmaktadır (Şekil 4.23).



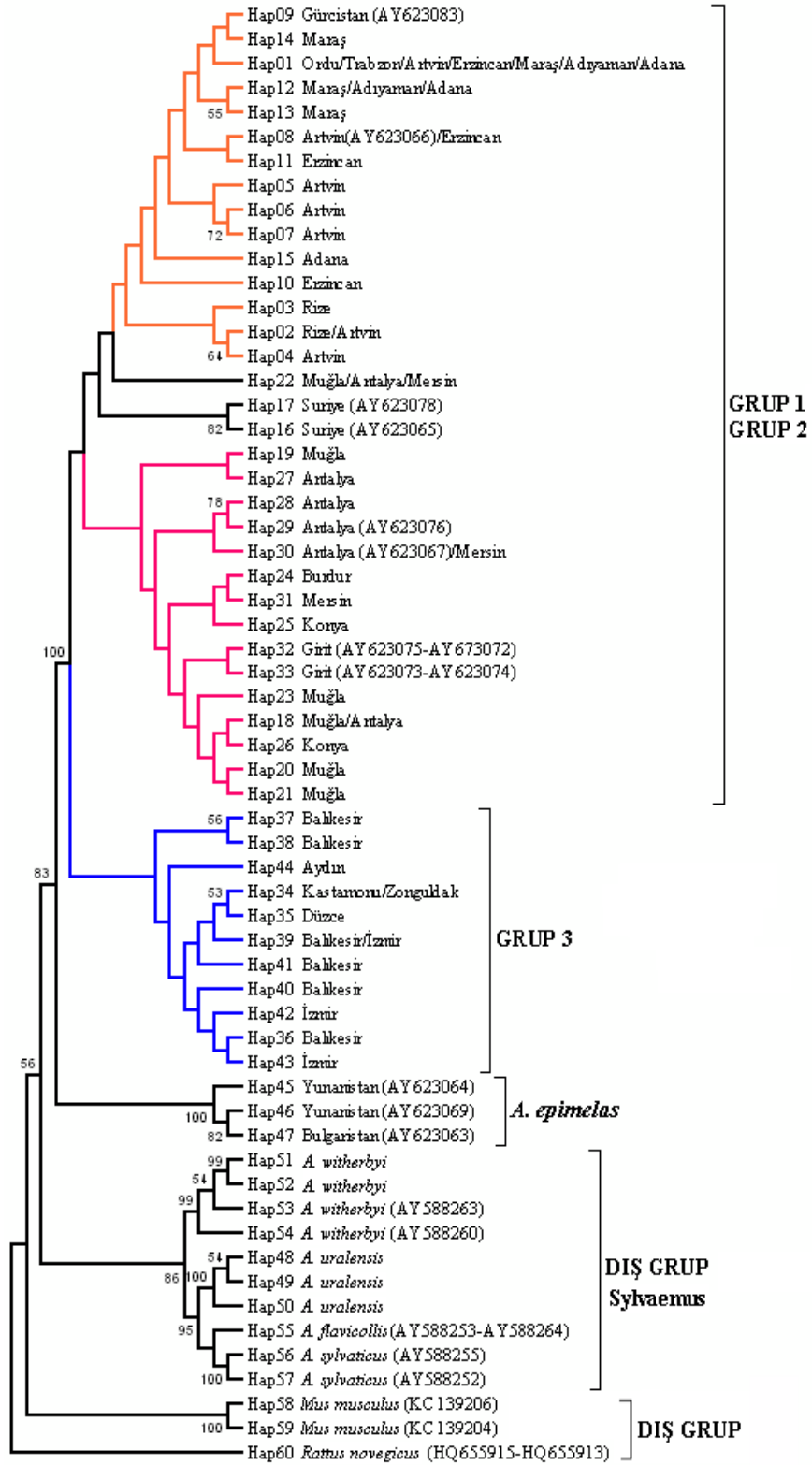
Şekil 4.23 D-loop bölgesinin filogenetik analizleri sonucu ortaya konulan gen ağaçlarındaki gruplara ait popülasyonlar (Grup 1: turuncu, Grup 2: pembe ve Grup 3: mavi renkle gösterilmektedir)

NJ ağacında bu 3 grup içinde 1. ve 2. Gruplar iç içe çıkarken, Batı Karadeniz ve Ege Bölgesi popülasyonlarının yer aldığı 3. Grup %100 güvenirlilikle bu 2 gruptan ayrılmıştır (Şekil 4.24).

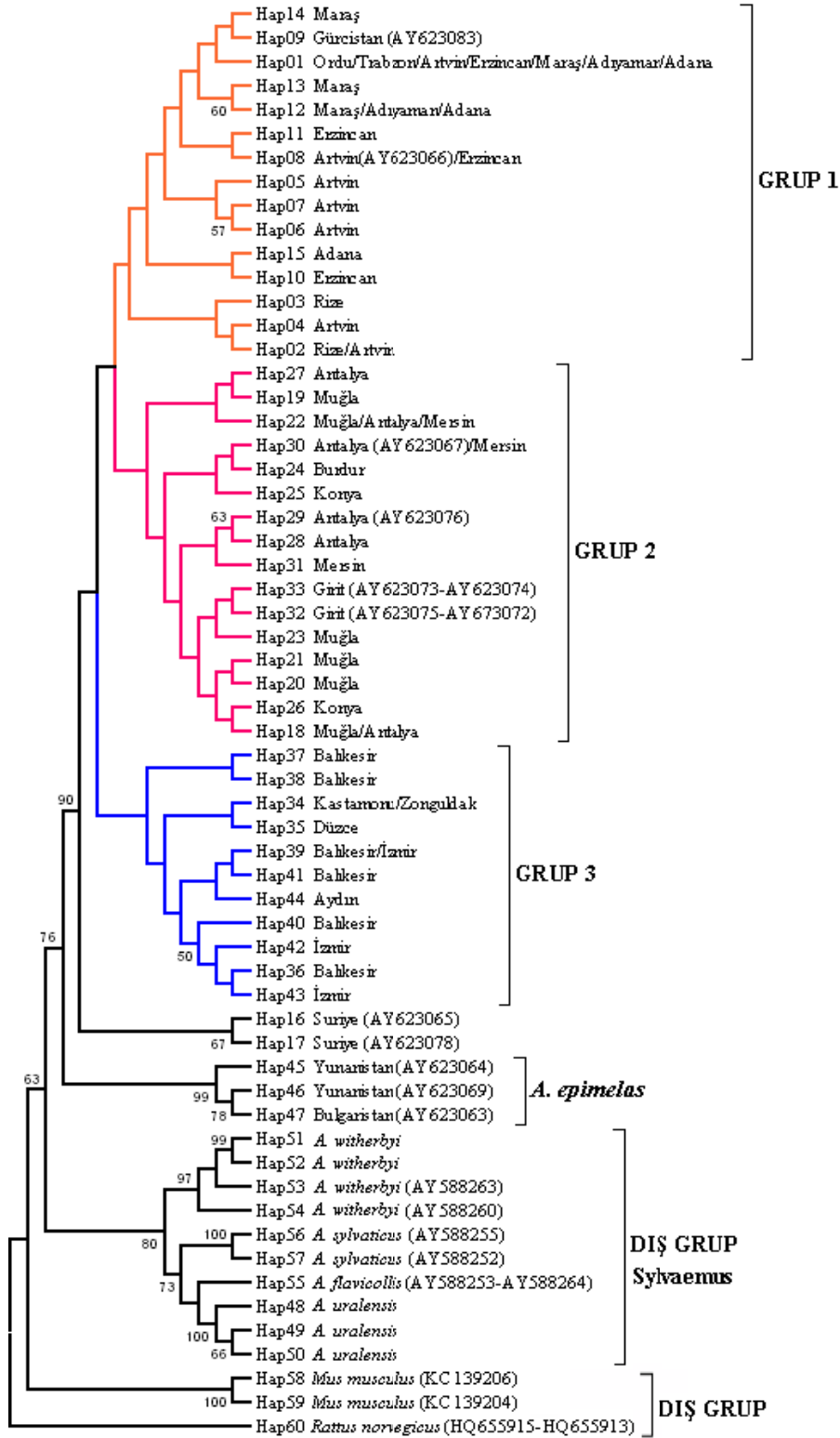
MP ağacında Grup 1, Grup 2 ve 3. Grup arasındaki ayrım %50'nin altında güvenirlilikle desteklense de bu 3 grup birbirlerinden ayrı çıkmıştır (Şekil 4.25).

ML ağacı oluşturulurken en uygun model olan HKY+G kullanılmıştır. Buna göre, 1. ve 2. Gruplar birbirlerine %50'nin altında güvenirlilikle bağlanırken, 3. Grup popülasyonları %91 güvenirlilikle bu 2 gruptan ayrılmıştır (Şekil 4.26).

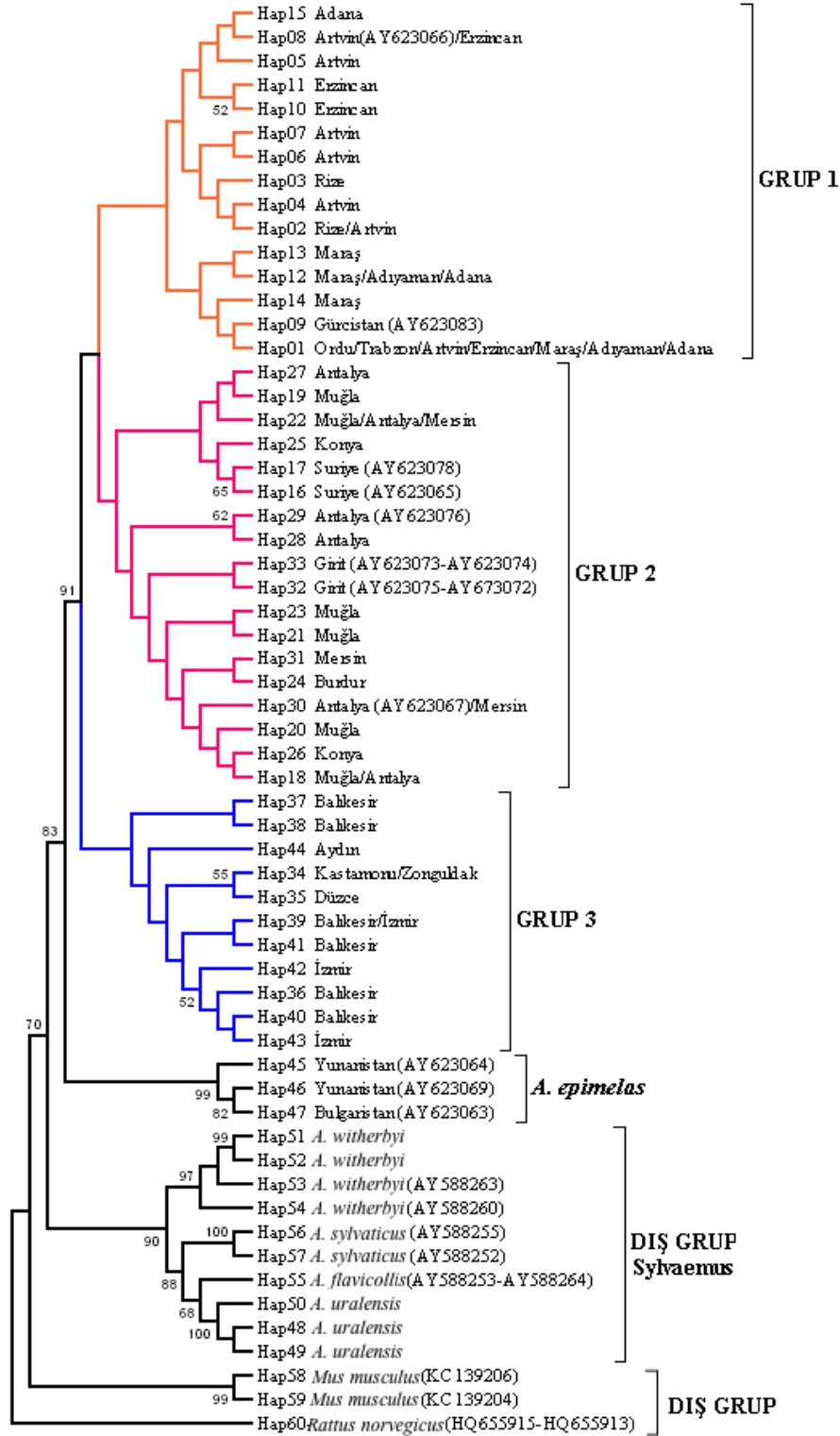
Bayesian yaklaşımı Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritması kullanılarak HKY+G modeline göre oluşturulmuştur. Bu analiz sonucu ortaya çıkan filogenetik ağacın yapısı MP ve ML ağaçlarının sonuçlarıyla örtüşmektedir. 1. ve 2. Grup popülasyonları arasındaki Bayesian ardıl olasılık değeri nispeten düşükken (0,66), 3. Grup popülasyonların diğer gruplarla ilişkisini ortaya koyan ön olasılık değeri yüksektir (BPP=1), (Şekil 4.27).



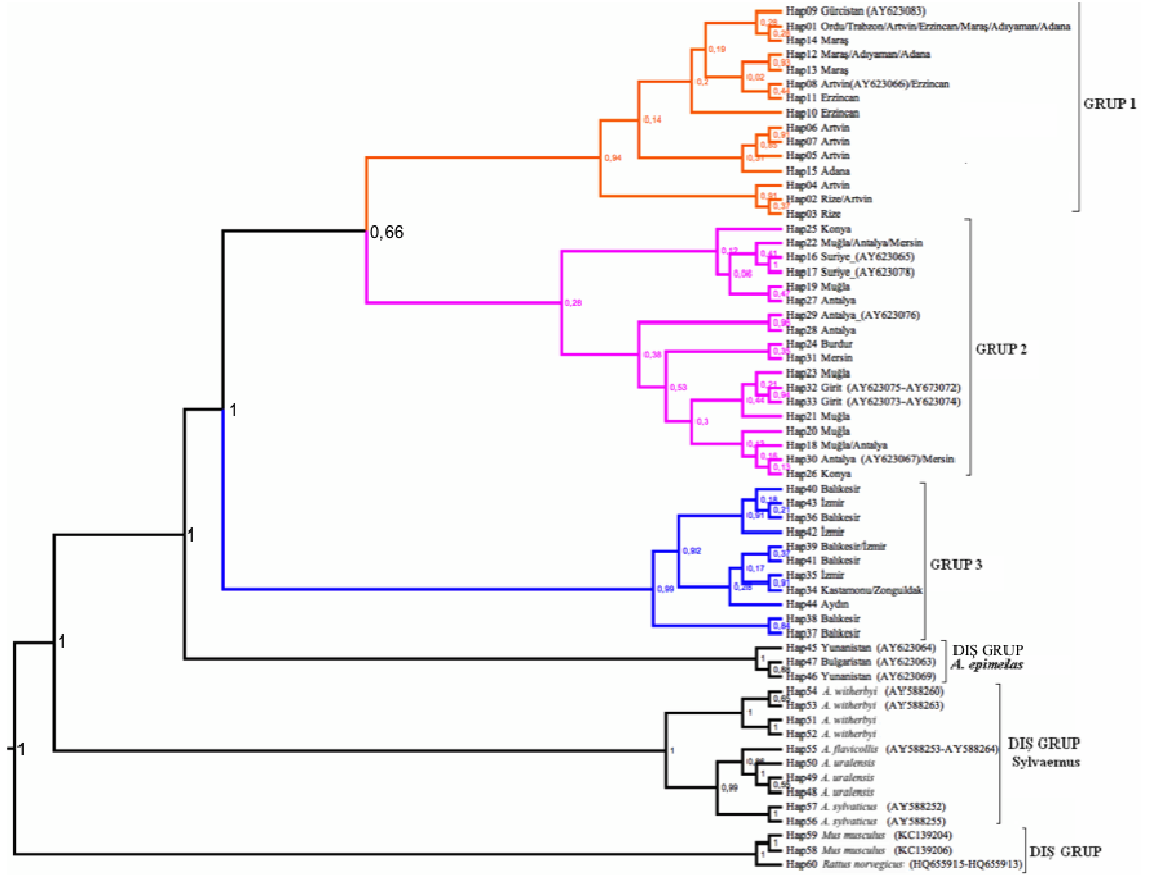
Şekil 4.24 Kimura 2-parametresi (K2P) model alınarak gerçekleştirilen, D-loop bölgesine ait Neighbour Joining ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)



Şekil 4.25 TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, D-loop bölgesine ait Maximum Parsimony ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)

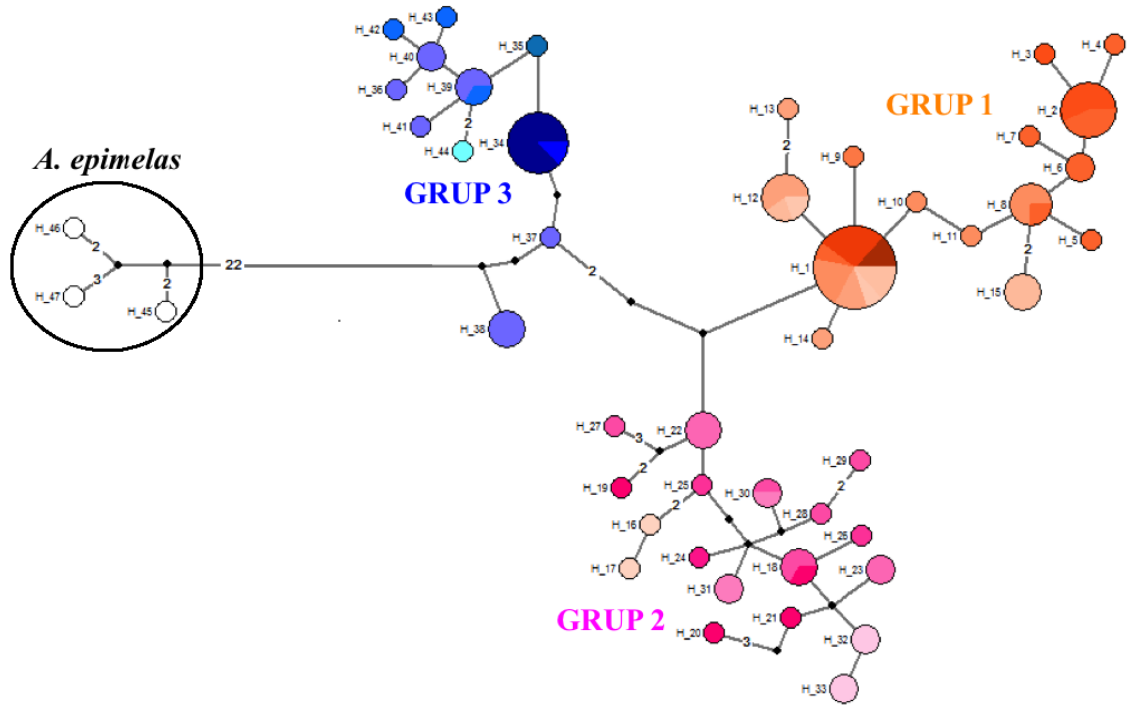


Şekil 4.26 HKY+G modeline göre oluşturulan, D-loop bölgesine ait Maximum Likelihood ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)



Şekil 4.27 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, D-loop bölgesine ait filogenetik ağaç

Haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı filogenetik analizler sonucu ortaya çıkan grupları ve bunlar arasındaki ilişkileri desteklemiştir (Şekil 4.28). *A. mystacinus* populasyonlarına en yakın dış grup olarak *A. epimelas* belirlenmiş olup median-joining analizleri sadece bu dış grup kullanılarak oluşturulmuştur. Analiz sonucuna göre gruplar arasındaki nükleotid değişimleri az olmakla beraber 3. Grup populasyonların diğerlerinden en fazla nükleotid değişimiyle (3 nükleotid değişimi) farklılaştığı ortaya konmuştur. Gruplar arasında paylaşılan haplotip bulunmamaktadır.



Şekil 4.28 D-loop bölgesine ait haplotip verilerine göre oluşturulan median-joining ağacı. Haplotipler arasındaki mutasyonlar (1'den fazla nükleotidde değişiklik gösterenler) dalların üzerine yerleştirilmiştir.

4.3.2 D-loop bölgesi genetik çeşitlilik analizleri

Populasyon içindeki en yüksek haplotip sayısı Grup 1'dedir ($H_s = 17$). Bununla beraber haplotip çeşitliliği Güney Anadolu ve Girit populasyonlarını içeren 2. Grupta en yüksek seviyede olup ($h = 0,963$), Batı Karadeniz ve Ege populasyonlarını içeren 3. Grupta en düşük seviyededir ($h = 0,861$). Diziler arasındaki ayırdedici bölge sayısı 24 nükleotid değişimiyle en fazla Grup 2'de görülmektedir. Genel olarak nükleotid çeşitliliği en fazla Grup 2 ($\pi = 0,008$) en az da Grup 1'de ($\pi = 0,04$) olup tüm gruplarda örnek sayısından bağımsız olarak düşük seviyededir. Tüm haplotip ve nükleotid bilgileri çizelge 4.24'de her grup için ayrı ayrı gösterilmektedir.

Çizelge 4.24 *A. mystacinus* populasyonlarının D-loop dizilerine ait genetik çeşitlilik değerleri

Gruplar	Örnek sayısı	Haplotip sayısı (Hs)	Ayrırcı bölge	Parsimony informative	Nükleotid çeşitliliği (π)	Haplotip çeşitliliği (h)
Grup 1	47	17	17	12	0,004	0,864
Grup 2	25	16	24	13	0,008	0,963
Grup 3	23	11	12	7	0,006	0,861

Populasyonlar arasındaki mesafe değerleri Kimura-2-Parametresi'ne (K2P) göre hesaplanmıştır (Çizelge 4.25). Buna göre en yüksek mesafe değeri 2. ve 3. Grup populasyonları arasında hesaplanırken (% 2,1), en az mesafe değeri 1. ve 2. Grup populasyonları arasında (%1,7) bulunmuştur.

Çizelge 4.25 K2P modeli kullanılarak D-loop bölgesindeki dizi farklılıklarına göre hesaplanan, *A. mystacinus* populasyonları arasındaki mesafe değerleri

Populasyon		Mesafe (%K2P)
Grup 1	Grup 2	1,7
Grup 1	Grup 3	1,8
Grup 2	Grup 3	2,1

D-loop bölgesine ait genetik varyasyon oranını açıklayabilmek için *A.mystacinus* populasyonları arasında Moleküler varyans analizi (AMOVA) yapılmıştır. AMOVA analizi için filogenetik analizlerde ortaya çıkan 3 grup ve bu gruplara ait alt populasyonlar kullanılmıştır (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26 D-loop bölgesinin AMOVA analizleri için kullanılan grup ve populasyonlar

Grup	Populasyon
GRUP 1	Doğu Karadeniz (DK)
	Doğu Anadolu (DA)
	Güney Doğu Anadolu (GDA)
GRUP 2	Güney Batı Anadolu (GBA)
	Güney Anadolu (GUN)
GRUP 3	Batı Karadeniz (BK)
	Batı Anadolu (BA)

Toplam varyasyonun %57,56'sı gruplar arası ilişkileri açıklamıştır ($F_{CT} = 0,575$; $P < 0,001$). Grup içerisindeki popülasyonların, *A. mystacinus* 'un genetik varyasyonunun sadece %7,6'lık bir kısmını açıklayabilmesine rağmen bu değere ait fiksasyon indeksi anlamlı bulunmuştur ($F_{SC} = 0,179$; $P < 0,001$). AMOVA analizlerine ait sonuçlar çizelge 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.27 *A. mystacinus* popülasyonlarının D-loop bölgelerine ait AMOVA çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	SD*	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyasyon oranı
Gruplar arası	2	159,263	2,471 Va	57,56
Grup içindeki popülasyonlar arası	4	23,107	0,326 Vb	7,6
Popülasyon içi	88	131,63	1,495 Vc	34,84
Toplam	94	3,14	4,293	
Fiksasyon İndeksleri				
F_{SC} (Vb)	0,179	($P < 0,001$)		
F_{ST} (Vc)	0,651	($P < 0,001$)		
F_{CT} (Va)	0,575	($P < 0,001$)		

*SD: serbestlik derecesi

AMOVA'ya bağlı genetik farklılaşma analizleri, en yüksek genetik farklılaşmanın 1. ve 3. Grup popülasyonları arasında olduğunu ortaya koymuştur. Bu popülasyonlar arası gen akışı da diğerlerine oranla düşük bulunmuştur ($N_m = 0,27$). Bununla beraber en düşük genetik farklılaşma Grup 1 ve Grup 2 arasında çıkarken ($F_{ST} = 0,493$) bunlara ait gen akışı değeri çok yüksek bulunmasa da Grup 1 ve Grup 3 arasındaki gen akışından daha yüksektir. Gruplar arasındaki genetik farklılaşma ve gen akışı değerleri çizelge 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4.28 *A. mystacinus* grupları arasındaki D-loop bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) ve gen akışı (N_m) değerleri (üst diyagonal: N_m , Alt diyagonal: F_{ST})

Popülasyon	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3
GRUP 1	*	0,51	0,27
GRUP 2	0,493	*	0,36
GRUP 3	0,652	0,584	*

A. mystacinus gruplarına ait populasyonlar arası genetik farklılaşma analizlerine göre, en yüksek farklılaşma Doğu Anadolu ve Batı Karadeniz populasyonları arasındayken ($F_{ST} = 0,887$), en düşük genetik farklılaşma ise Güney Doğu Anadolu ve Doğu Anadolu populasyonları ($F_{ST} = 0,042$) arasında hesaplanmıştır (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.29 *A. mystacinus* gruplarının alt populasyonları arasındaki D-loop bölgesine ait genetik farklılaşma (F_{ST}) değerleri

	GRUP 1			GRUP 2		GRUP 3	
Populasyon	DK	DA	GDA	GBA	GUN	BK	BA
GRUP 1	DK	*					
	DA	0,161	*				
	GDA	0,169	0,042	*			
GRUP 2	GBA	0,662	0,641	0,56	*		
	GUN	0,598	0,559	0,496	0,083	*	
GRUP 3	BK	0,808	0,887	0,717	0,766	0,717	*
	BA	0,679	0,664	0,585	0,636	0,593	0,416

Populasyonların geçen zamandaki durumlarını, darboğaz etkisinde olup olmadığı ya da eğer genişleme olmuşsa bunun hangi zamanda gerçekleştiğini ortaya koymak için yapılan uyumsuzluk dağılımı (mismatch distribution) analizlerine ait veriler Çizelge 4.30'da, oluşan 3 *A. mystacinus* grubu için ayrı ayrı verilmiştir.

Çizelge 4.30 *A. mystacinus* populasyonlarının D-loop bölgesine bağlı uyumsuzluk analizi (mismatch distribution) sonuçları

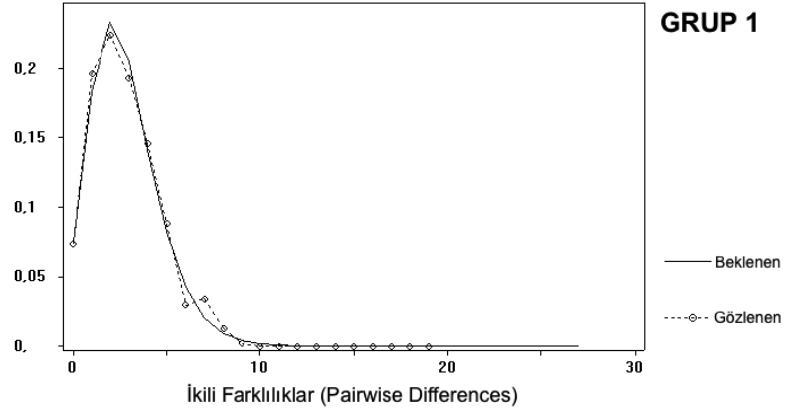
Populasyon	Tau (τ)	CV	r
GRUP 1	2,045	0,659	0,026
GRUP 2	4,773	0,436	0,035
GRUP 3	2,862	0,576	0,123

τ : mutasyon zamanına göre populasyon büyümesinin ölçütü

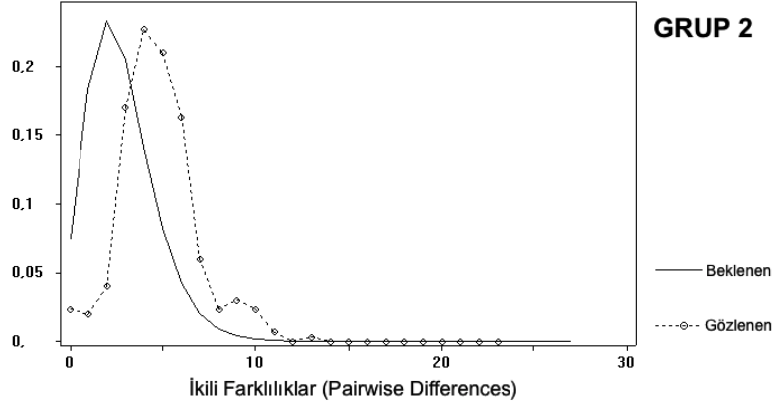
CV: coefficient of variance-değişkenlik katsayısı

r: ragadness statistics-düzensizlik analizi

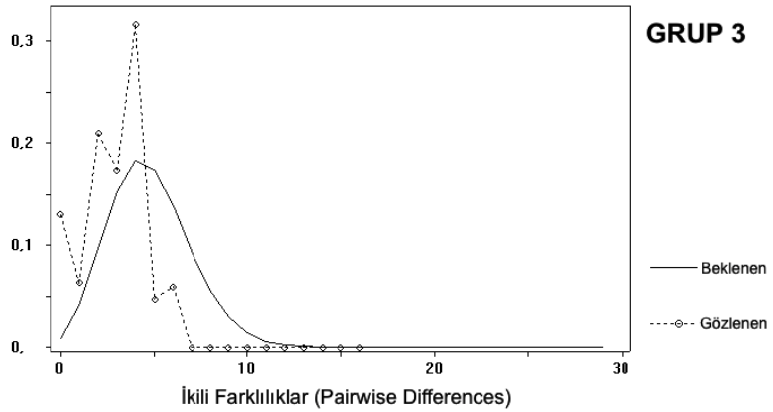
Bu sonuçlar doğrultusunda populasyon büyümesi-düşüşü modeli altında uyumsuzluk dağılımı grafikleri ortaya konmuştur. şekil 4.29-4.31 her grup için ayrı ayrı oluşturulan grafikleri ortaya koymaktadır.



Şekil 4.29 *A. mystacinus*'a ait 1. Grup populasyonların D-loop bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri



Şekil 4.30 *A. mystacinus*'a ait 2. Grup populasyonların D-loop bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri



Şekil 4.31 *A. mystacinus*'a ait 3. Grup populasyonların D-loop bölgesine göre oluşturulan uyumsuzluk dağılımı grafikleri

Uyumsuzluk dağılımı analizleri, 1. ve 2. Grup populasyonların ani dağılımlarını ortaya koyan tek modellenli kalıplar oluşturduğunu göstermektedir. Bu populasyonlara ait r değerlerinin düşük bulunması da ani dağılım teorisini desteklemektedir.

3. Grup populasyonlarında görülen çok modellenli dağılım yapısı, sabit populasyon büyüklüğüyle ilişkilendirilmektedir. Bu durum, yüksek seviyede çıkan r değerleriyle desteklense de, değişkenlik katsayısı beklenmedik şekilde yüksek çıkmıştır.

Bu analizlerle beraber populasyonun darboğazda olup olmadığını ortaya koyan Tajima'nın D ve F_u 'nun F_s hesaplamaları da yapılmıştır (Çizelge 4.31). Buna göre Tajima'nın D 'si 3 grup için de anlamsız bulunmuştur ($P>0,05$). Ancak F_u 'nun F_s hesaplamaları bu 3 populasyon için de anlamlı sonuçlar vermiş ($P<0,05$) ve negatif değerlerde sonuçlar ortaya koymuştur. Bu çelişkili durum Tajima'nın D istatistiği hesaplamaları yapılırken nükleotid çeşitliliği gösteren bölgelerin önem arz etmesinden ve bu bölgelerin D-loop dizilerindeki azlığından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4.31 *A. mystacinus* populasyonlarının D-loop bölgesine göre yapılan populasyon darboğazı analizleri

Analizler	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3
Tajima'nın D testi			
Örnek sayısı	47	25	23
D	-0.87169	-0.91525	-0.41537
P	0,201	0,198	0,394
Fu'nun FS testi			
Örnek sayısı	23	23	10
Fs	-10,97561	-11,06469	-4,66226
P	0	0	0,007

Populasyonlar arası D-loop dizilerine ait genetik mesafenin (F_{ST}) coğrafi mesafe ile olan ilişkisini belirleyebilmek için yapılan Mantel testine ait sonuçlar çizelge 4.32'de her grup için ayrı ayrı gösterilmiştir.

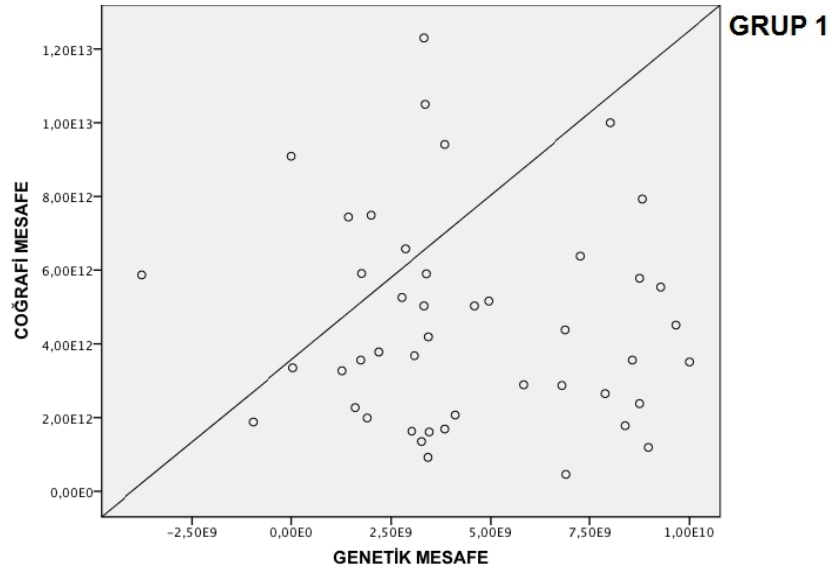
Çizelge 4.32 A. *mystacinus* populasyonlarının D-loop verilerine göre genetik ve coğrafi mesafeleri arasındaki ilişkinin hesaplandığı Mantel testi

Populasyon	R ²	P
GRUP 1	0,0072	0,401
GRUP 2	0,0352	0,443
GRUP 3	0,0027	0,572

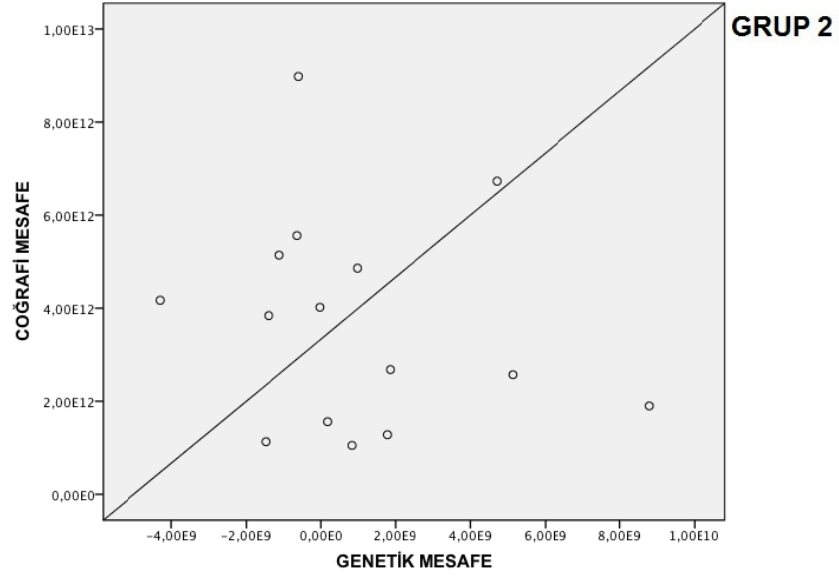
R² : Anlamlılık yüzdesi

P : Anlamlılık derecesi

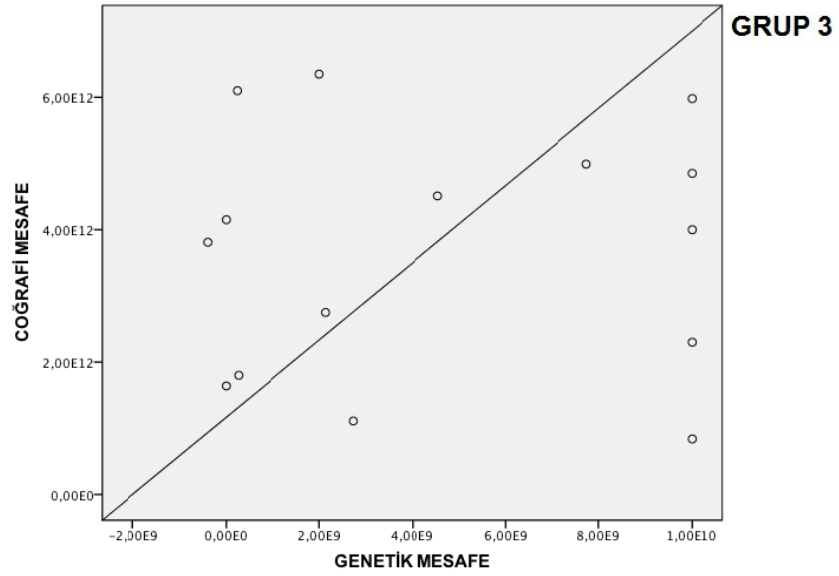
Mantel testi sonuçlarına göre her 3 gruba ait anlamlılık derecesi ($P > 0,05$) yüksek çıktığından gruplar için genetik farklılaşma ve coğrafi mesafe arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlara göre oluşturulan regresyon eğrileri şekil 4.32-4.34 arasında her grup için ayrı ayrı verilmiştir.



Şekil 4.32 A. *mystacinus*'un 1. Grup populasyonlarında D-loop dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (FST) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği



Şekil 4.33 *A. mystacinus*'un 2. Grup populasyonlarında D-loop dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (FST) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği



Şekil 4.34 *A. mystacinus*'un 3. Grup populasyonlarında D-loop dizilerinden elde edilen genetik farklılaşma (FST) ve coğrafi mesafe arasındaki ilişkiyi gösteren dağılım grafiği

4.4 mtDNA Sitokrom *b* ve D-loop Bölgelerinin Bitiştirilmesi Analizi

A. mystacinus 'a ait 84 ortak diziden (Çizelge 3.1) elde edilen her iki mtDNA bölgesinin kullanılmasıyla ortaya çıkan 1355 bç'lik dizilerin filogenetik analizleri yapılmıştır. Ayrıca dış grup olarak *A. epimelas*, *A. uralensis* ve *A. witherbyi* örnekleri de analizlerde kullanılmıştır (Çizelge 3.2 ve 3.3). Bitişik (concatenate) dizilerden elde edilen haplotipler çizelge 4.33'de verilmiştir.

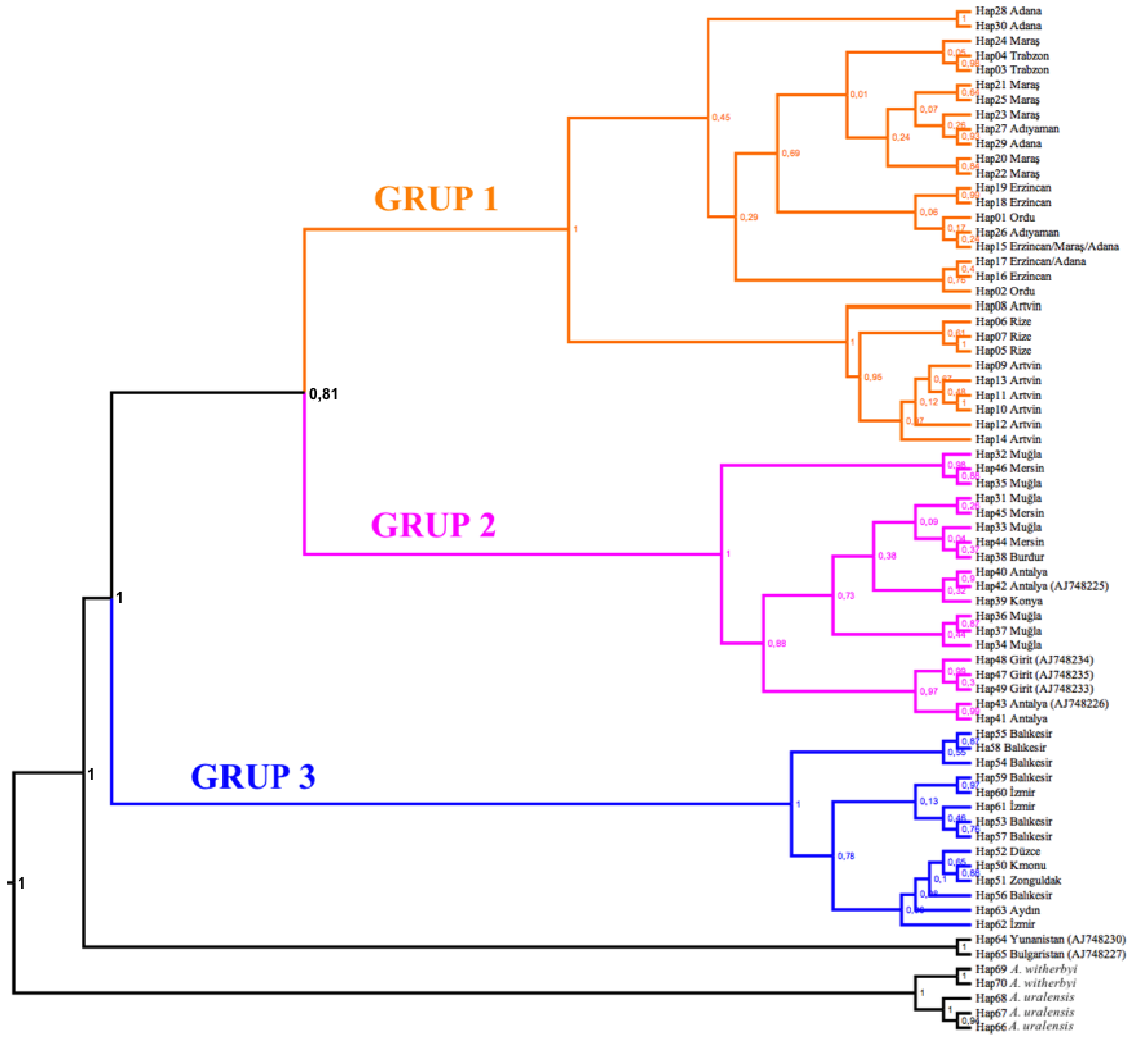
Çizelge 4.33 Bitişik dizilerden elde edilen haplotipler ve bunların ait oldukları popülasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde)

Populasyon	Birey Sayısı	Haplotip
Ordu	2	Hap01 (1), Hap02 (1)
Trabzon	4	Hap03 (1), Hap04 (3)
Rize	5	Hap05 (2), Hap06 (2) Hap07 (1)
Artvin	9	Hap08 (1), Hap09 (1) Hap10 (1), Hap11 (1) Hap12 (3), Hap13 (1) Hap14 (1)
Erzincan	8	Hap15 (1), Hap16 (1) Hap17 (2), Hap18 (1) Hap19 (3)
Kahramanmaraş	7	Hap15 (1), Hap20 (1) Hap21 (1), Hap22 (1) Hap23 (1), Hap24 (1) Hap25 (1)
Adıyaman	2	Hap26 (1), Hap27 (1)
Adana	6	Hap15 (1), Hap17 (1) Hap28 (2), Hap29 (1) Hap30 (1)
Muğla	7	Hap31 (1), Hap32 (1) Hap33 (1), Hap34 (1) Hap35 (1), Hap36 (1) Hap37 (1)
Burdur	1	Hap38 (1)
Konya	1	Hap39 (1)

Çizelge 4.33 Bitişik dizilerden elde edilen haplotipler ve bunların ait oldukları popülasyonlardaki görülme sıklıkları (parantez içinde) (devam)

Popülasyon	Birey Sayısı	Haplotip
Antalya	4	Hap40 (1), Hap41 (1) Hap42 (1), Hap43 (1)
Mersin	3	Hap44 (2), Hap45 (1) Hap46 (1)
Girit	3	Hap47 (1), Hap48 (1) Hap49 (1)
Kastamonu	1	Hap50 (1)
Zonguldak	7	Hap51 (7)
Düzce	1	Hap52 (1)
Balıkesir	10	Hap53 (1), Hap54 (1) Hap55 (2), Hap56 (2) Hap57 (2), Hap58 (1) Hap59 (1)
İzmir	2	Hap60 (1), Hap61 (1) Hap62 (1)
Aydın	1	Hap63 (1)
<i>A. epimelas</i>	3	Hap64 (1), Hap65 (1)
<i>A. uralensis</i>	3	Hap66 (1), Hap67 (1) Hap68 (1)
<i>A. witherbyi</i>	3	Hap69 (1), Hap70 (1)

Bitişik dizilerden elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koyabilmek için Neighbour joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) ve Bayesian analizleri kullanılmıştır. Tüm filogenetik analizlere göre *A. mystacinus* popülasyonlarının 3 gruba ayrıldığı ortaya konmuş olup ortaya çıkan sonuçlar hem sitokrom *b* hem de D-loop bölgesiyle yapılan filogenetik analizleri desteklemektedir. Bununla beraber gruplar arasında elde edilen bootstrap değerlerinin daha güvenilir olduğu görülmektedir. Bitiştirilmiş mtDNA dizilerinden elde edilen Bayesian ağacı Şekil 4.35’de gösterilmiştir. Bunun yanında NJ ağacı EK 6’da, MP ağacı EK 7’de ve ML ağacı ise EK 8’de verilmiştir.



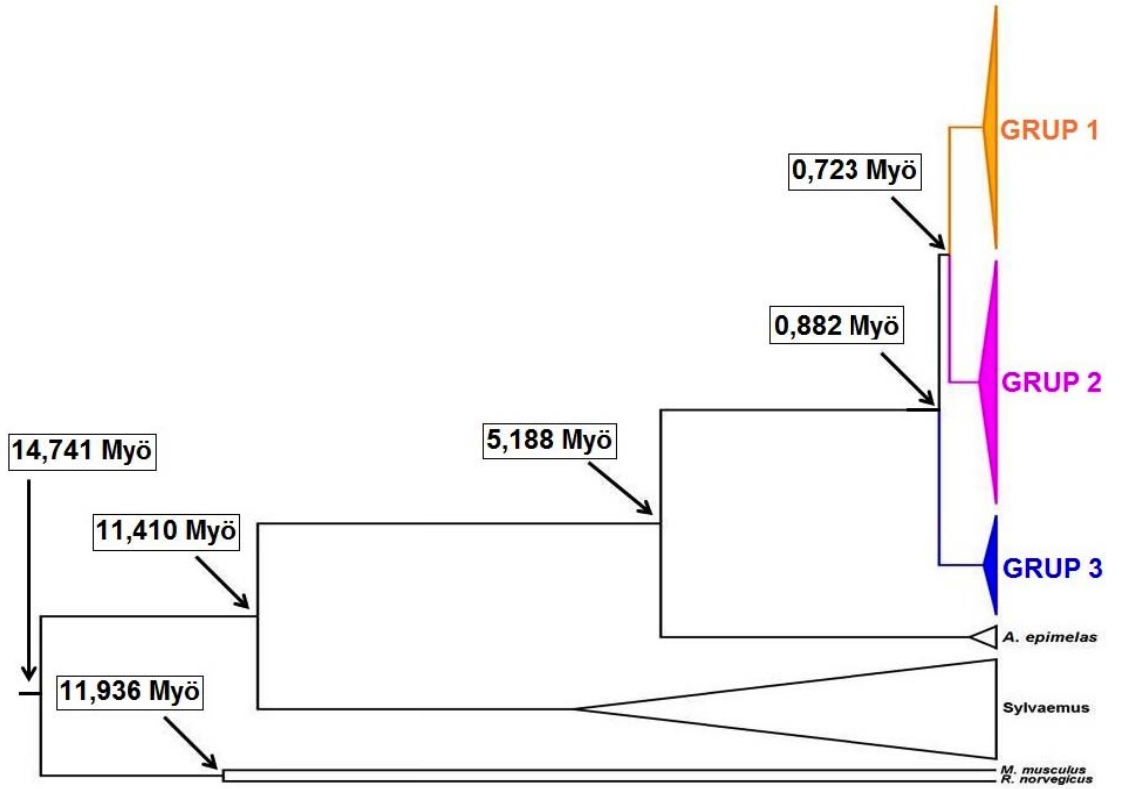
Şekil 4.35 Bayesian MCMC yöntemi kullanılarak oluşturulan, mtDNA sitokrom *b* ve D-loop bölgelerinin beraber analiz edilmesiyle oluşturulan bitleştirilmiş filogenetik ağacı (concatenated phlogenetic tree)

4.5 Evrimsel Ayrılma Zamanları

Sitokrom *b* dizilerinin milyon yılda %2 farklılaşma oranlarına göre oluşturulan moleküler tarihlendirme analizleri şekil 4.36’da ağaç üzerinde gösterilmiştir. Buna göre *A. mystacinus* populasyonları içinde oluşan 3 gruptan ilk farklılaşmanın 3. Grup olduğu görülmektedir (0,882 Myö). Bununla beraber 1. ve 2. Gruplar arasında günümüzden 0,723 Myö bir farklılaşmanın gerçekleştiği göze çarpmaktadır. Tüm bu sonuçlar *A. mystacinus* populasyonları arasında gen akışının Orta Pleistosen (Ionian ve Calabrian dönemleri 0,126-1,806 Myö) döneminde nispeten kesildiğini ortaya koymaktadır.

A. mystacinus populasyonlarına en yakın tür olan *A. epimelas*'ın Pliosen döneminde (2,588-5,332 Myö) *A. mystacinus* 'dan farklılaştığı ortaya konmuştur.

Oluşturulan evrimsel ağaç sonuçlarına göre, *Sylvaemus* alt cinsine dahil olan türlerinin, *A. mystacinus* ve *A. epimelas*'dan yaklaşık 11 milyon yıl önce (Miocene dönemi) farklılaştığı ortaya konulmuştur. Bu durum, *mystacinus* ve *epimelas*'ın *Sylvaemus*'dan farklı bir alt cins olan *Karstomys*'e dahil olabileceği konusundaki fikirleri desteklemektedir.



Şekil 4.36 Sitokrom *b* dizileri kullanılarak elde edilen moleküler tarihleme analizi sonuçları (tüm sonuçlar Myö, milyon yıl önce, olarak verilmiştir)

5. TARTIŞMA

5.1 MtDNA Sitokrom *b* ve D-loop Bölgeleriyle Yapılan Analizlerin Karşılaştırılması

Bu çalışmada *A. mystacinus* populasyonları arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek için mtDNA'nın hem sitokrom *b* hem de D-loop bölgesi kullanılmıştır. Bu bölgelerin evrimi, bu 2 mtDNA bölgesi üzerinde rol oynayan farklı seçim kısıtlamaları tarafından kontrol edilmektedir (Kumar 1996, Randi vd. 2001). Özellikle D-loop bölgesinde korunmuş fonksiyonel motiflerin olması (Sbisa vd. 1997, Randi ve Lucchini 1998) ve sitokrom *b*'nin protein kodlayan yapısı (Moore ve DeFilippis 1997), bu genlerin evrim oranlarını değiştirmektedir. Sitokrom *b* bölgesi protein kodladığı için daha korunmuş bir yapıya sahipken, D-loop, tamir mekanizmasının olmayışı ve kodlanmayan doğasından dolayı daha hızlı evrimleşme oranına sahiptir. Bununla beraber genler üzerinde farklı değişim oranlarına sahip bölgeler de bulunmaktadır ve korunmuş genlerde bulunan bu bölgelerdeki varyasyonların, hızlı evrimleşen genlerdekinden daha da yüksek olduğu ortaya koyulmuştur (Kumar 1996).

Bu tez çalışmasında kullanılan 2 mtDNA bölgesi, yukarıda belirtilen özellikleri doğrultusunda nükleotidlerin değişim oranlarına göre karşılaştırılmıştır (Çizelge 5.1). Buna göre gamma şekil parametresini gösteren “ α ” değerleri her iki gen bölgesi üzerinde farklı değişim oranlarına sahip bölgeler olduğunu ortaya koymaktadır (Kumar 1996'ya göre, $\alpha \leq 1$: gen üzerindeki bir çok bölgenin düşük, bazı bölgelerin de yüksek oranda değişim olduğuna; $\alpha > 1$: gen üzerinde eşit veya düşük oranda değişim olduğuna işaret etmektedir). Bununla beraber protein kodlayan genlerde 3. kodon pozisyonunda daha fazla transisyonal değişimlere rastlandığından (Irwin vd. 1991) sitokrom *b* bölgesindeki transisyon/transversiyon oranının (R) (6,816), D-loop bölgesindekinden (4,742) daha fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.1 *A. mystacinus* populasyonlarında çalışılan gen bölgeleri arasındaki gamma şekil parametresi (α) ve T_i/T_v (R) oranları

	Gamma şekil parametresi (α)			T_i/T_v (R)		
	1. ve 2. baz	3. baz	Toplam	1. ve 2. baz	3. baz	Toplam
Sitokrom <i>b</i>	0,36	200	0,164	6,124	527,085	6,816
D-loop	-	-	0,21	-	-	4,742

T_i : transisyon

T_v : transversiyon

D-loop bölgesinde R değeri sitokrom *b* bölgesine oranla daha düşüktür. Bu durum D-loop bölgesinin daha fazla transversiyon biriktirdiğini ortaya koymaktadır. Transversiyonlar genomda daha yavaş biriktiklerinden dolayı nispeten daha uzak taksonları ayırmada filogenetik belirteçler olarak kullanılabilir (Lockhart vd. 1995, Randi ve Lucchini 1998, Kimball vd. 1999, Randi vd. 2001). Bu tez çalışmasındaki sonuçlar, *A. mystacinus* populasyonları arasındaki farklılaşmaların ortaya konulmasında transisyonların etkili olduğunu göstermektedir. Nitekim, daha yüksek transisyon oranına sahip sitokrom *b* gen bölgesine göre yapılan filogenetik analizler, *A. mystacinus* populasyonları arasındaki ayrımı D-loop bölgesine oranla daha yüksek güvenilirlikle net bir şekilde ortaya koyarken; D-loop bölgesine göre yapılan filogenetik analizler populasyonlar arasında daha az nükleotid farklılığı ortaya koymuştur (Şekil 4.28). Özellikle D-loop dizileri kullanılarak, Neighbour Joining yaklaşımıyla çizilen filogenetik ağaç 1. ve 2. Grup populasyonlarını ayırmada yeterli olmamıştır (Şekil 4.24). Bu sonuçlar doğrultusunda tür içi filogeninin belirlenmesinde sitokrom *b* gibi daha korunmuş ve daha yüksek transisyon oranına sahip gen bölgelerinin kullanılmasının daha yararlı olabileceğini ortaya koyulmuştur.

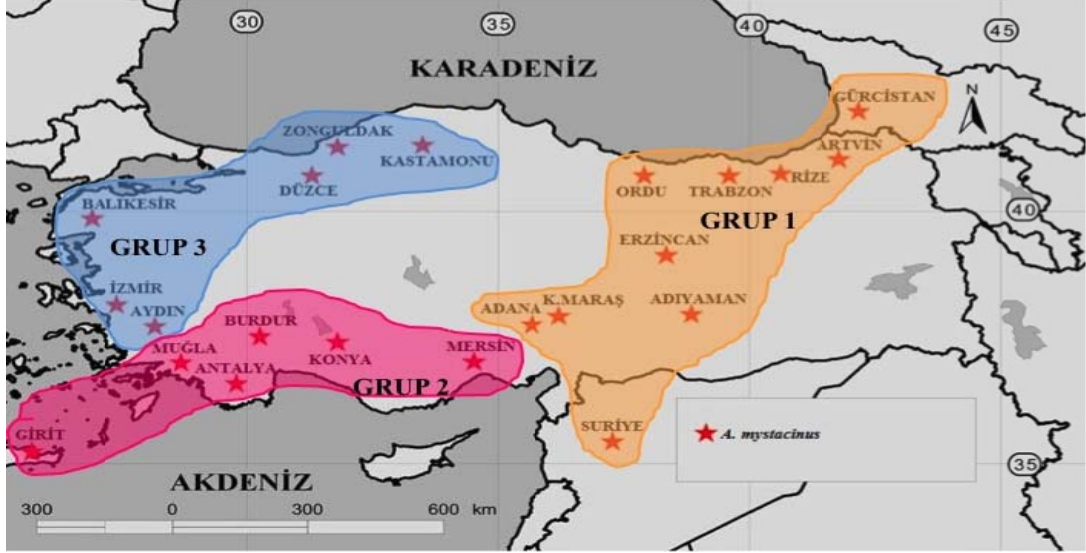
5.2 *A. mystacinus* Populasyonlarının Alttür Dağılımları

Bu tez çalışmasında ortaya konan mtDNA sitokrom *b* ve D-loop bölgelerine ait dizi analizi sonuçları, aynı bölgelerin PZR-RFLP çalışmalarına ait sonuçları destekler niteliktedir. Buna göre *A. mystacinus* populasyonlarının 3 grup oluşturduğu ortaya koyulmuştur. Bu 3 grup;

Grup 1: Ordu, Trabzon, Rize, Artvin, Gürcistan, Erzincan, Adıyaman, Kahramanmaraş, Adana ve Suriye

Grup 2: Mersin, Konya, Burdur, Antalya, Muğla ve Girit

Grup 3: Kastamonu, Zonguldak, Düzce, Balıkesir, İzmir ve Aydın popülasyonlarından oluşmaktadır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Tez çalışması sonucu *A. mystacinus* popülasyonlarının oluşturduğu gruplar ve bunların dağılımı

A. mystacinus 'la ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalar, 4 alttür üzerinden tartışmalı olarak devam etmiştir. Tip yeri Altındere-Trabzon olan *A. m. euxinus* (Allen 1915) üzerine yapılan morfolojik çalışmalar, bu alttürün Artvin-Bursa arasında yayılış gösterdiğini (Neuhaser 1936, Ellerman ve Morrison-Scott 1951) hatta *A. m. mystacinus*'un sinonimi olduğunu (Vohralik vd. 2002) ortaya koymaktadır. Bununla beraber yapılan esteraz analizi çalışması bu popülasyonların Trabzon-Bursa arasında yayılış gösterdiğini ve Artvin popülasyonlarının bunlardan farklılaştığını ortaya koymuştur (Çolak vd. 2007). Bu tez çalışmasında Doğu Karadeniz, Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu popülasyonlarının bir arada kümelenmesi (GRUP 1), *A. m. euxinus*'un bu bölgelerdeki varlığını ortaya koyarak Çolak vd. (2004) ve Olgun vd. (2009)'nin çalışmalarını desteklemiştir.

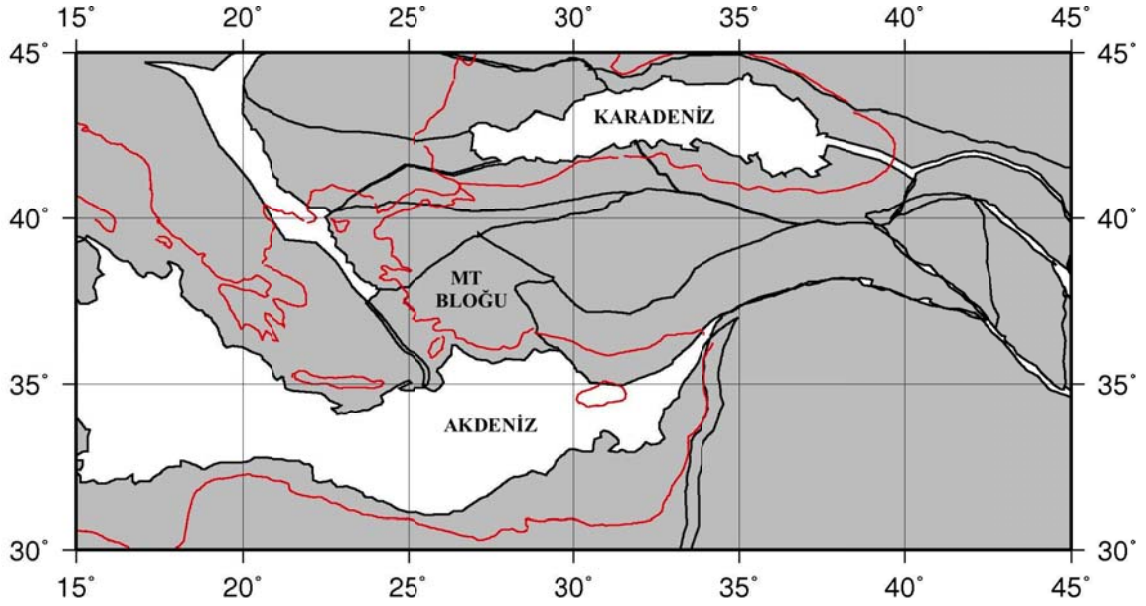
A. mystacinus 'un tip yerini (Sebil-Mersin) de içeren popülasyonlardan oluşan GRUP 2, GRUP 1 popülasyonlarına yakın olmakla beraber bunlardan ayrı bir kümelendirilmiştir. Bu grup içindeki popülasyonlar arasında yer alan Girit örneklerinin kimi yazarlara göre *A. m. rhodius* (Festa 1914) olduğu öne sürülmüştür (Michaux vd. 2005, Olgun vd. 2009). Ancak bu tez çalışması sonuçlarına göre bu bölgelerde yer alan popülasyonların diğer Akdeniz örnekleriyle (Antalya, Burdur, Konya, Mersin) beraber kümelendiği ve *rhodius*'un *A. m. mystacinus*'un sinonimi olduğu ortaya koyularak yapılan morfolojik çalışmaları (Ellerman 1948, Vohralik vd. 2002, Çolak vd. 2004) destekleyen bir sonuç elde edilmiştir.

Türkiye'nin batısında yayılış gösterdiği öne sürülen *A. m. symrnensis* (Thomas 1903)'in geçerliliği, kimi yazarlar tarafından morfolojik çalışmalarıyla desteklenmese de (Ellerman 1948, Ellerman ve Morrison-Scott 1951, Çolak vd. 2004) esteraz (Çolak vd. 2007) ve RAPD çalışmalarıyla (Olgun vd. 2009) bu bölgede ayrı bir soyun olduğu ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında Batı Karadeniz ve Ege Bölgesi'nde yayılış gösteren popülasyonlar bir arada kümelendirilmiş ve diğer gruplardan daha yüksek oranda genetik farklılaşma göstererek ayrılmıştır (GRUP 3). Morfolojik anlamda olmasa da bu popülasyonların genetik olarak farklılaştığı ortaya konulmuştur.

5.3 *A. mystacinus* Popülasyonlarının Evrimi

Günümüzde *A. mystacinus* popülasyonları, Anadolu'nun tamamında, Gürcistan ve İsrail'e uzanan bir coğrafyada, deniz seviyesinden 2700 m yüksekliğe kadar ulaşan kayalık bölgelerde yayılış göstermektedir (Demirsoy 1996, Demirsoy vd. 2006). *A. mystacinus* 'a ait Miyosen dönemiyle tarihlenen fosil kayıtları, bu türün atasal kökeninin Avrupa olduğunu (*A. primaevus*) (Michaux ve Posquiner 1974, Michaux vd. 1997), gerçek *A. mystacinus* 'un ise Orta Pliyosen'de *A. primaevus* olarak kendini gösterdiğini (Martin-Suarez ve Mein 1998) ortaya koymuştur. Avrupa'da yayılış gösteren tür, günümüze kadar farklılaşmış ve *A. epimelas* (Nehring 1902) olarak adlandırılmıştır. Bu durumda Miyosen döneminden itibaren Avrupa'da ortaya çıkan atasal soyun Anadolu'ya giriş yaptığı ve Anadolu ile Avrupa arasındaki bağlantının kesilmesiyle birlikte bu iki alanda allopatrik olarak farklılaştığı sonucu ortaya

çıkılmaktadır. Evrimsel ayrılma zamanı hesaplamaları, *A. epimelas* ve *A. mystacinus* 'un bundan yaklaşık 5 Myö Pliyosen döneminde farklılaştığını ortaya koymaktadır. Bu tarihe kadarki Miyosen dönemi boyunca Avrupa ile Anadolu arasındaki kara bağlantısı Güney Batı Anadolu kıyılarından sağlanmaktaydı (Ocean Drilling Stratigraphic Network, Hay vd. 1999), (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Miyosen döneminde Avrupa ile Anadolu arasındaki bağlantı (MT: Menderes-Toros Bloğu, Kırmızı sınırlar günümüzdeki sınırları göstermektedir)

Bu tez çalışmasında *A. mystacinus* popülasyonlarının yayılış gösterdiği bölgelerdeki nükleotid çeşitliliği incelendiğinde, çeşitliliğin en fazla Güney Batı popülasyonlarında (Mersin-Girit) olduğu görülmektedir (Çizelge 5.2). Bu durum Anadolu'da yayılış gösteren *A. mystacinus* popülasyonlarının gen kaynağının Miyosen döneminde Avrupa ile bağlantı kurduğu Güney Batı Anadolu bölgesi olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 5.2 *A. mystacinus* popülasyonlarının yayılış gösterdiği bölgelere ait nükleotid çeşitlilikleri

mtDNA	Nükleotid çeşitliliği (π)						
	Doğu Karadeniz	Doğu Anadolu	Güneydoğu Anadolu	Güneybatı Anadolu	Akdeniz	Batı Karadeniz	Ege
Sitokrom <i>b</i>	4,437	0,571	1,897	5,855	4,989	1,389	3,615
D-loop	2,212	1,536	3,551	4,145	4,879	0,222	3,275

5.3.1 Girit populasyonlarının durumu

Girit, Anadolu'ya Üst Miyosen (Messinian, 7,2-5,3 Myö) dönemi boyunca bağlı olup Erken Pliosen (5,3-3,6 Myö) döneminin başlamasıyla Anadolu'dan izole olmuş ve daha sonraki periyotlarda da Avrupa kıtası ile ilişkisi kesilmiştir (Kayan 1999, Anastasakis vd. 2006). Bu paleocoğrafik verilere göre Girit populasyonlarının Anadolu'da yayılış gösteren örneklerden farklılaşması beklenirken, bu çalışmadaki filogenetik analizler Güney Batı Anadolu ve Girit populasyonlarının beraber kümелendiğini ortaya koymaktadır. Bu durum Pleistosen dönemindeki (2,6-0,01 Myö) iklimsel dalgalanmalarla denizin alçalıp yükselmesine bağlı olarak Girit'in Anadolu'yla arasında kara bağlantısı kurmaya devam ettiğine işaret edebilir (Michaux vd. 2005, Çıplak vd. 2010). Bu durum Girit ve Anadolu populasyonları arasında gen alış verişi olduğunu da göstermektedir.

5.3.2 *A. m. symrnensis* populasyonlarının durumu

Güney Batı Anadolu'dan giriş yapan *A. mystacinus*'un atasal populasyonları, Ege Bölgesi'nden Batı Karadeniz'e kadar yayılarak bu bölgede *A. m. symrnensis* alttürüne farklılaşmıştır. Bu alttürü ait populasyonlar, diğer *mystacinus* populasyonlarından daha erken zamanda farklılaşmış (0,822 Myö) ve yapılan uyumsuzluk analizlerine göre bu zaman boyunca dengeli populasyon yapısına ulaşmış oldukları görülmektedir (Şekil 4.19 ve 4.31). Bu durumda *A. m. symrnensis* populasyonlarıyla diğer *mystacinus* populasyonları arasındaki gen akışının giderek azaldığı ve belki de ileride bu populasyonların darboğaza girecekleri düşünülebilir.

5.3.3 Batı ve Doğu Karadeniz populasyonları arasındaki farklılaşma

Hem Ege Bölgesi hem de Batı Karadeniz'de yayılış gösteren *symrnensis* populasyonlarıyla Doğu Karadeniz'de yayılış gösteren *euxinus* populasyonları arasındaki ayrımı sağlayan en önemli faktörün Sinop ve Samsun arasında denize dökülen, Pliyosen döneminde (5,3-2,6 Myö) Orta Anadolu'daki büyük iç gölle ilişkisi olduğu ortaya konulan (Demirsoy 2002) Kızılırmak Nehri'nin bu bölgede meydana getirmiş olduğu Kızılırmak Deltası olabileceği düşünülmektedir (Şekil 5.3). Kuvaterner

içinde meydana gelen tektonik hareketler ve buzul ya da buzul arası dönemdeki deniz seviyesindeki değişiklikler deltanın oluşumunda etkili olmuş olup delta oluşumu Holosen’de büyük bir hızla devam etmiştir (Turoğlu 2010). Karadeniz’deki bölgesel farklılaşmanın varlığı, buradaki ormanlarda yaşayan *Glis* (edible dormouse) populasyonlarıyla yapılan genetik ve morfometrik çalışmalarla da desteklenmektedir (Selçuk vd. 2012, Helvacı vd. 2012). *C. glareolus* (kızıl sırtlı orman faresi) üzerine Çolak vd.’nin 2010 yılında tamamladıkları bir çalışma da Kızılırmak Deltası’nın Doğu ve Batı Karadeniz’de yayılış gösteren populasyonlar arasında ayırıcı bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Gvodzig vd. (2010), ağaç kurbağası ile yaptıkları çalışmada Kuzey Batı Türkiye’nin ayrı bir sığınak olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla beraber Karadeniz Bölgesi’nde farklı mikrorefüj alanlarının bulunduğu, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Fritz vd. 2009).



Şekil 5.3 Pliosen döneminde Anadolu İç Gölü ve buna bağlı Menderes ve Kızılırmak Nehirleri

5.3.4 Ege ve Güney Batı Anadolu populasyonları arasındaki farklılaşma

Symrnensis populasyonlarının *mystacinus* populasyonlarından farklılaştığı diğer bir bölge de Menderes-Toros Bloğu’nun bulunduğu bölgedir (Şekil 5.2). Miyosen

döneminden (23 Myö) itibaren Anadolu'nun Güney Batısı'nda yer alan Menderes Toros Bloğu, Arap ve Alanya masifinin kuzeye doğru hareketlerinin hızlanmasına bağlı olarak hareketlenerek Anadolu'nun diğer bölgelerinden izole olmaya başlamıştır (Quannell 1984, Waldron 1984, Hrbek vd. 2004). Böylece bölgenin Güney Batı kısmındaki faunal elemanlar da izole olmuştur (Hrbek vd. 2004). Ege Bölgesi'nin güneybatı sahilleri ve grabenler, Pliosen (5,3-2,6 Myö) dönemi boyunca Akdeniz altında kalmış, Pleistosen (2,6-0,01 Myö) döneminde de bölge, deniz seviyesinin altına çökmüştür (Görür vd. 1995). Bu dönemde Güney Batı Anadolu'dan Anadolu'ya giriş yapan *mystacinus* populasyonlarının, Ege Bölgesi'ne ve Batı Karadeniz'e kadar uzanan bir bölgede izole olarak Güney populasyonlarından ayrıldığı ve gen akışının kesildiği söylenebilir. Bölgede *mystacinus*'un yayılış gösterdiği alanların sular altında kalması, populasyonların bu bölgede denize dik uzanan yükseltilere yerleşmelerini ve buralarda farklılaşmalarını sağlamış olabilir. Pleistosen boyunca yağışların arttığı buzul dönemlerde denizlerdeki su seviyesinin azalmasıyla beraber nehirlere su sevki ve nehirlerdeki akıntı hızı artmıştır (Demirsoy 2002). Bu bağlamda bölgede aktif olan faylanma hareketleriyle yönlendirilen ve grabenlerin oluşumunda etkili olan (Woodward 2009) ve de gen akışını kesen faktörlerden biri de Büyük Menderes Nehri olabilir (Şekil 5.3).

5.3.5 A. m. euxinus populasyonlarının durumu

Bu tez çalışmasında kullanılan *euxinus*'a ait Feke-Adana örnekleri Dibe Dağı'nın, Göksun-Maraş örnekleri ise Binboğa Dağı'nın kayalık bölgelerinden elde edilmiştir. A. m. *mystacinus*'a ait Sebil-Mersin populasyonları ise Toros Dağları'ndan yakalanmıştır. Aynı dağ sırası üzerinde olup da 0,720 Myö farklılaşan bu populasyonları ayırabilecek en önemli faktörün, bu dağların kırıldığı kısımdan denize dökülen Seyhan Nehri olabileceği düşünülebilir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 Pliosen sonlarında oluşumu tamamlanan Anadolu Diyagonali ve Toroslar arasındaki ilişkiyi kesen Seyhan Nehri

Çukurova üzerine yapılan çalışmalar, bu bölgede Toroslar'a ait aşınan yüzeylerin 1,3-0,609 Myö'ne ait kalıntılarının olduğunu göstermektedir (Erol 2003). Bu iki popülasyonun farklılaşması tam da bu zaman aralığına denk gelmektedir. Bu bölgeden Anadolu Diyagonali boyunca Doğu Karadeniz Bölgesi'ne kadar yayılmış gösteren ve farklılaşan *mystacinus* popülasyonları, *A. m. euxinus* olarak adlandırılmıştır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında mtDNA sitokrom *b* ve D-loop bölgelerinin PZR-RFLP ve DNA dizi analizleri yapılarak, *A. mystacinus* içindeki farklı alttürler arasındaki ilişki belirlenmiştir. Buna göre Anadolu'da *A. m. mystacinus*, *A. m. symrnensis* ve *A. m. euxinus* olarak adlandırılan 3 alttürün geçerliliği desteklenmiştir. Bununla beraber Türkiye'nin güneybatı bölgesinde ve Girit adasında yayılış gösterdiği düşünülen *A. m. rhodius*'un, *A. m. mystacinus*'un sinonimi olduğu ortaya konmuştur. Biyocoğrafik açıdan bakıldığında *A. mystacinus*'un kökeninin Avrupa'da yayılış gösteren *A. epimelas* olduğu ve bu iki türün Pliosen dönemindeki kıtasal hareketlerin bir sonucu olarak, Yunanistan'ın Anadolu'dan ayrılmasıyla farklılaştığı düşünülmektedir.

Anadolu'da yayılış gösteren *A. mystacinus* populasyonlarının ise Pliosen dönemindeki iklimsel dalgalanmalardan etkilenen akarsuların, bu türün yayılış alanları olan dağ yamaçlarındaki kayalık bölgeleri aşındırmasıyla ortaya çıkan, dağ sıraları arasındaki izolasyonlarla birbirlerinden ayrılmış olabilecekleri ortaya konmuştur. Bu izolasyon çok yakın zamanda gerçekleştiğinden henüz populasyonların türleşmesinden bahsedilemez fakat özellikle *symrnensis* populasyonlarının dengeli dağılım modeli düşünüldüğünde bunların daha yalıtılmış ve türleşmeye yatkın olabilecekleri düşünülebilir.

Çalışmada İç Anadolu populasyonlarının eksikliği alttürler arasındaki geçiş bölgeleri (örn: Ege-İç Anadolu bağlantısıyla bunların Güney ve Doğu populasyonları arasındaki ilişkileri) hakkındaki yorumları kısıtlamaktadır. Ayrıca alttürlerin ayrıldığı bölgeler arasından daha fazla lokaliteden örnek temin edilmeli ve varsa hibrit bölgeler ortaya konulmalıdır.

Bu tez çalışmasında RFLP belirteçlerinin alttürleri belirlemede en az dizi analizi kadar etkili olabildiği de ortaya konmuştur. Özellikle sitokrom *b* bölgesinin kesimi için kullanılan *HaeIII* enzimi 3 alttüre özgü (Zonguldak populasyonu hariç) farklı kesim profilleri sergilemiştir. Bu enzimin *A. mystacinus* alttürlerini ayırmada bir belirteç olarak kullanılabilmesi düşünülebilir.

mtDNA, hızlı değişim oranından dolayı çok yakın zamanda ayrılmış populasyonları belirlemede uygun bir araç olarak gözükse de daha yavaş evrimleşme oranına sahip diğer gen bölgelerinin (örn nükleer genler) kullanılması *A. mystacinus* taksonomisi ve evrimiyle ilgili daha derin analiz ve yorumların yapılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonymous. 2013. <http://dna.microbiologyguide.com/526-biological-replication-dna-splitting>. Erişim Tarihi: 13/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0005107.html>
Erişim Tarihi: 13/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/frameshift>. Erişim Tarihi: 13/04/2013
- Anonymous. 2013. http://en.wikipedia.org/wiki/Phase_variation. Erişim Tarihi: 15/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://moodleshare.org/mod/book/view.php?id=2118&chapterid=266>.
Erişim Tarihi: 15/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/meiosis.html>. Erişim Tarihi: 15/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.phschool.com/science/biologyplace/labbench/lab3/crossover.html>. Erişim Tarihi: 15/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>. Erişim Tarihi: 15/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Slides/DNA%20Synthesis/Template%20>. Erişim Tarihi: 15/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>. Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://symposcium.com/2012/07/19/qa-why-do-bacteria-have-restriction-enzymes/>. Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and-nutraceuticals/>. Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous. 2013. http://www.seafoodid.com/pcr_rflp.html. Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/techniques.html>.
Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://www.medibena.at/80mm-dntp-mix-20mm-each-02-31.html>.
Erişim Tarihi: 16/04/2013

- Anonymous. 2013. http://www.genome.ou.edu/3653/Lecture20-10_11_06.html. Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous.2013.<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105579031200231X>. Erişim Tarihi: 16/04/2013
- Anonymous. 2013. <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/mito.html>. Erişim Tarihi: 17/04/2013
- Anonymous.2013.<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase>. Erişim Tarihi: 17/04/2013
- Altukhov, Y.P. and Salmenkova, E.A. 2002. DNA Polymorphism in Population Genetics, Russian Journal of Genetics, 38, 989–1008.
- Anastasakis, G., Piper, D.J.W., Dermitzakis, M.D. and Karakitsios, V. 2006. Upper Cenozoic stratigraphy and palaeogeographic evolution of Myrtoon and adjacent basins. Aegean Sea, Greece. Marine and Petroleum Geology, 23, 353–369.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., DeBruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., vd. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290, 457-465.
- Arnheim, N. and Erlich, H. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. Annual Review of Biochemistry, 61, 131 – 56.
- Awise, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.
- Awise, J.C. and A. Tatarenkov. 2012. Allard’s argument versus Baker’s contention for the adaptive significance of selfing in a hermaphroditic fish. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, 18862-18867.
- Awise, J.C., Walker, D. and Johns, G.C. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 265, 1707–1712.
- Baker, J. M. 2005. Adaptive speciation: the role of natural selection in mechanisms of geographic and non-geographic speciation. Studies in History and Philosophy of Science. 36, 303–326
- Bellinvia, E. 2004. A phylogenetic study of the genus *Apodemus* by sequencing the mitochondrial DNA control region. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 42, 289–297.

- Bellinvia, E., Munclinger, P. and Flegr, J. 1999. Application of the RAPD technique for a study of the phylogenetic relationships among eight species of the Genus *Apodemus*. *Folia Zoologica*, 48, 241–248.
- Bendelt, H., Froster, P. and Rohl, A. 1999. Median joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L. and Hewitt, G. M. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 314-321.
- Bilgin, R. 2011. Back to the Suture: The distribution of genetic diversity in and around Anatolia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 4080-4103.
- Birky, C. W. J. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Reviews of Genetics*, 35, 125–48.
- Bohonak, A.J. 2002. IBD (Isolation By Distance): A program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93, 153-154.
- Bromham, L., Eyre-Walker, A., Smith, N. H., Maynard, S. J. 2003. Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondria in humans. *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 2–4.
- Brown, W. M., George, M. and Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76, 1967-1971.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. and Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18, 225-239.
- Burzynski, A., Zbawicka, M., Skibinski, D. O. F. and Wenne, R. 2003. Evidence for recombination of mtDNA in the marine mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 388-392.
- Çıplak, B. 2004. Systematics, phylogeny and biogeography of *Anterastes* (Orthoptera, Tettigoniidae, Tettigoniinae): evolution within a refugium. *Zoologica Scripta*, 33, 19–44.
- Çıplak, B., Heler, K.G. and Willemse, F. 2010. Phylogeny and biogeography of the genus *Eupholidoptera* (Orthoptera, Tettigoniidae): morphological speciation in correlation with geographical evolution of East Mediterranean. *Systematic Entomology*, 35(4), 722-738.
- Çolak, E., Yiğit, N., Çolak, R., Sözen, M., Özkurt, Ş. and Kankılıç, T. 2004. Taxonomic Status and Distribution of *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. 28, 285-294.

- Çolak, R., Kandemir, İ., Çolak, E. ve Yiğit, N. 2007. Esterase Variation in Rocky Mouse, *Apodemus mystacinus* (Danford and alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 59 (1), 47-52
- Çolak, R., Kandemir, İ., Çolak, E. Kankılıç, T. Ve Olgun Karacan, G. 2012. Kuzey Anadolu'da Yayılış Gösteren *Clethrionomys glareolus* (Mammalia: Rodentia) Populasyonlarında RAPD ve mt DNA (Sitokrom b ve Kontrol Bölgesi) Analizi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. BAPRO: 09B4240001.
- Conroy, C.J. and J.A. Cook. 2000. Phylogeography of a post-glacial colonizer: *Microtus longicaudus* (Muridae: Rodentia). *Molecular Ecology*, 9,165-175.
- Deffontaine, V., Ledevin, R., Fontaine, M.C., Quéré, J-P., Renaud, S., Libois, R. and Michaux, J.R., 2009. Relict bank vole lineage highlights the biogeographic history of the Pyrenean region in Europe. *Molecular Ecology*, 18, 2489–2502.
- Deffontaine, V., Libois, R. and Kotlik, P., 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: Evidence of Central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, 14, 1727–1739.
- Demirsoy A. 1996. Türkiye Omurgalıları, Memeliler. ISBN: 975-7746-24-X. METEKSAN
- Demirsoy, A. 2002. Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası. ISBN: 975-7746-33-9. METEKSAN
- Demirsoy, A., Yiğit, N., Çolak, E., Sözen, M. and Karatas, A. 2006. Rodents of Türkiye. Meteksan Ankara.
- Doğramacı, S. 1972. Türkiye *Apodemus* (Mammalia: Rodentia)'larının Taksonomik Durumları. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi.
- Doda, J.N., Wright, C.T. and Clayton D.A. 1981. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 78: 6116–6120.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (1), 13-15.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. and Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.

- Dubey, S., Michaux, J., Br nner, H., Hutterer, R. and Vogel, P. 2009. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-b pseudogene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 633–641.
- Ellerman, J. R. 1948. Key to The Rodents of Southwest Asia in the British Museum Collection. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 118, 765-816.
- Ellerman, J. R. and Morrison-Scott, T.C.S. 1951. Checklist of Palaearctic and Indian Mammals 1758-1946. British Museum of Natural History, London.
- Erol, O. 2003. Ceyhan Deltasının Jeomorfolojik Evrimi. *Ege Coĝrafya Dergisi*, 12, 59-81.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Ferris, S.D., Sage, R.D., Prager, E.M., et al., Mitochondrial DNA Evolution in Mice, *Genetics*, 1983, vol. 105, pp. 681–721.
- Filippucci, M.G., Macholan, M. and Michaux, J.R. 2002. Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae, Rodentia). *Biological Journal of the Linnean Society*, 75, 395-419.
- Fisher, R.A. 1958. *The Genetical Theory of Natural Selection*. New York: Dover.
- Freeman, S. and Herron, J. C. 2009. *Evrimsel Analiz*. ISBN: 978-605-5829-53-7. Palme Yayıncılık.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. ISBN-13 978-0-470-09061-8 (HB).
- Fritz, U., Ayaz, D., Hunds rfer, A.K., Kotenko, T., Guicking, D., Wink, M., Tok, C.V.,  i ek, K. and Buschbom, J. 2009. Mitochondrial diversity of European pond turtles (*Emys orbicularis*) in Anatolia and Ponto-Capian Region: Multiple old refuges, hotspot of extant diversification and critically endangered endemics. *Organisms, Diversity and Evolution*, 9, 100-114.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-25.

- Görür, N., Sakıncı, M., Barka, A. and Akkök, R. 1995. Miocene to Pliocene palaeogeographic evolution of Turkey and its surroundings. *Journal of Human evolution*, 28, 309-324.
- Goto, S. G., Kimura, M. T. 2001. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18, 404–22.
- Greenberg, B.D., Newbold, J.E. and Sugino, A. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, 21:33-49.
- Guo, X., Liu, S. J., Liu, Y. 2006. Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics*, 172, 1745–49.
- Gvozdik, V., Moravec, J., Klütsch, C. and Kotlik, P. 2010. Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55, 1146–1166.
- Gyllensten, U. and Wilson, A.C. 1987. Interspecific mitochondrial DNA transfer and the colonization of Scandinavia by mice. *Genetical Research Cambridge*, 49, 25-29.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment, editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D. B. & Schlotterer, eds), pp. 1-9. Oxford University Press, Oxford.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591–600.
- Hay, W.W., DeConto, R., Wold, C.N., Wilson, K.M., Voigt, S., Schulz, M., Wold-Rossby, A., Dullo, W.-C., Ronov, A.B., Balukhovskiy, A.N. and Soeding, E. 1999. Alternative global cretaceous paleogeography. In: Barrera, E., Johnson, C. (Eds.), *The Evolution of Cretaceous Ocean/Climate Systems*. Geological Society of America Special Paper, 332, 1–47.
- Helvacı, Z., Renaud, S., Ledevin, R., Adriaens, D., Michaux, J., Çolak, R., Kankiliç, T., Kandemir, İ., Yiğit, N., and Çolak, E. 2012. Morphometric and genetic structure of the edible dormouse (*Glis glis*): a consequence of forest fragmentation in Turkey. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107, 611–623.

- Hewitt, G. 1996. Some genetic consequence of ice ages, and their role in diverging and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 247–276.
- Hewitt, G. 1999. Post-glacial re-colonisation of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 87–112.
- Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.
- Hewitt, G.M. 2004. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1, 4.
- Higashi, M., Takimoto, G. and Yamamura, N. 1999. Sympatric speciation by sexual selection. *Nature*, 402, 523-526.
- Hrbek, T., Stolting, K.N., Bardakci, F., Kucuk, F. and Rudolf, H. 2004. Wildekamp and Axel Meyer Plate tectonics and biogeographical patterns of the Pseudophoxinus (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 297–308
- Hudson, R.R., Slatkin, M. and Maddison, W.P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132, 583-589.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. and Bollback, J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310--2314.
- Huelsenbeck, J.P. and Imennov, N.S. 2002. Geographic origin of human mitochondrial DNA: accommodating phylogenetic uncertainty and model comparison. *Systematical Biology*, 51, 155–65.
- Hurner, H., Krystufek, B., Sara, M., Ribas, A., Ruch, T., Sommer, R. 2010. Mitochondrial phylogeography of the edible dormouse (*Glis glis*) in the western Palearctic region. *Journal of Mammalogy*, 91(1),233–242.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome-B Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128–144.
- Jaarola, M., Martinkova, N., Gündüz, İ., Brunhoff, C., Zima, J., Nadachowski, A. vd. 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 647–663
- Jacobs, L.L. and Downs, W.R. 1994. The evolution of murine rodents in Asia. In: Tomida Y, Li C, Setoguchi T, eds. *Rodent and lagomorph families of Asian origin and diversification*. Tokyo: National Science Museum, 149–156.

- Jacobs, L.L., Flynn, L.J., Downs, W.R. and Barry, J.C. 1990. Quo vadis Antemus? The Siwalik muroid record. In: Linday, E.H., Fahlbusch, V., Mein, P., eds. European mammal chronology. New York: Plenum Press, 573–586.
- Jaeger, J.J., Tong, H. and Denys, C. 1986. The age of the *Mus-Rattus* divergence – paleontological data compared with the molecular clock. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Series II* 302, 917–922.
- Kayan, I. 1999. Holocene stratigraphy and geomorphological evolution of the Aegean coastal plains of Anatolia. *Quaternary Science Review*, 18, 541–548.
- Kimball, R.T., Braun, E.L., Zwartjes, P.W., Crowe, T.M. and Ligon, J.D. 1999. A molecular phylogeny of the pheasants and partridges suggests these lineages are polyphyletic. *Journal of Molecular Evolution*, 11, 38–54.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624–626.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Kosswig, C. 1955. Zoogeography of the Near East. *Systematical Zoology*, 4, 49–73.
- Kumar, S. 1996. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 584–593.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A. A. and Orell, M. 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Molecular Biology and Evolution*, 20, 243–247.
- Ladoukakis, E. D. and Zouros, E. 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1168–1175.
- Lande, R. 1981. Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 78, 3721–3725.
- Lande, R. 1982. Rapid origin of sexual isolation and character divergence in a cline. *Evolution*, 36, 213–223.
- Larget, B. and Simon, D. L. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 16, 750–59.
- Leache, A. and Reeder, T. 2002. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Systematic Biology*. 51, 44–68.
- Li, W.H. 1997. Molecular evolution. Sinauer, Sunderland, Mass.

- Li, W.H. and Graur, D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lockhart, P.J., Penny, D. and Meyer, A. 1995. Testing the phylogeny of swordtail fishes using split decomposition and spectral analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 666–674.
- Luikart, G. and Cornuet, J. M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 13, 523-530.
- Macholan, M., Munclinger, P., Sugerkova, M., Dufkova, P., Bimova, B., Bozikova, E., Zima, J., Pialek, J. 2007. Genetic Analysis Of Autosomal And X-Linked Markers Across A Mouse Hybrid Zone. *Evolution*, 61 (4), 746–771.
- Martin Suárez, E. and Mein, P. 1998. Revision of the genera *Parapodemus*, *Apodemus*, *Rhagamys* and *Rhagapodemus* (Rodentia, Mammalia). *Geobios*, 31, 87–97.
- Martin, Y., Gerlach, G., Schloetterer, C. and Meyer, A. 2000. Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 37–47.
- Matson, C.W. and Baker, R.J. 2001. DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Control Region of Red-Backed Voles (*Clethrionomys*). *Molecular Biology and Evolution*, 18(8), 1494–1501.
- Mezhzherin, S. V. 1997. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Palearctic mice (Rodentia, Muridae). *Genetika*, 33, 78-86 (in Russian, with a summary in English).
- Michaux, J. R., Filippucci, M-G. and Libois, R. 2004. Phylo- geographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 188–198.
- Michaux, J. and Pasquier, L. 1974. Dynamique des populations de mulots (Rodentia, *Apodemus*) en Europe durant le Quaternaire. *Premières Données Bulletins Société Géologique France*, 7, 431– 439.
- Michaux, J. R., Chevret, P., Filippucci, M. G. and Macholán, M. 2002. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome b and 12S rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23, 123–136.

- Michaux, J. R., Magnanou, E., Paradis, E., Nieberding, C. and Libois, R. M. 2003. Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Molecular Ecology*, 12, 685–697.
- Michaux, J., Aguilar, J.P., Montuire, S., Wolff, A. and Legendre, S. 1997. Les Murinae (Rodentia, Mammalia) néogènes du Sud de la France: évolution et paléoenvironnements. *Geobios*, 20, 379–385.
- Michaux, J., Bellinvia, E. and Lymberakis, P. 2005. Taxonomy, evolutionary history and biogeography of the broad-toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*) in the eastern Mediterranean area based on mitochondrial and nuclear genes. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85, 53–63.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis. Version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Moore, W.S. and DeFilippis, V.R. 1997. The window of taxonomic resolution for avian phylogenies based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. In “Avian Molecular Evolution and Systematics” (D. P. Mindell, Ed.), pp. 83–119, Academic Press, San Diego.
- Musser, G.G., Brothers, E.M., Carleton, M.D. and Hutterer, R. 1996. Taxonomy and distributional records of Oriental and European *Apodemus*, with a review of the *Apodemus Sylvaemus* problem. *Bonner Zoologische Beiträge*, 46, 143–190.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Uni. Press, New York.
- Neuhauser, G. 1936. Die muriden von Kleinasien. *Zeitschrift Fur Säugetierkunde-International Journal Of Mammalian Biology*, 11, 161-236.
- Neuhauser, G., 1936. Die Muriden von Kleinasien. *Zeit Säuget*, 11, 161–236.
- Niethammer, J. 1978. *Apodemus mystacinus* (Danford et Alston 1877) – Felsenmaus. In: Niethammer, J., Krapp, F., eds. *Handbuch der Säugetiere Europas*, Bd I. Wiesbaden: Akademische Verlagsgesellschaft, 306–324.
- Olgun, G., Çolak, R., Kandemir, İ., Çolak, E. and Yiğit, N. 2009. Genetic variation in Rocky Mouse, *Apodemus mystacinus* (Danford & Alston 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 61(2), 123-129.

- Overton, L. C., Rhoads, D. D. 2004. Molecular phylogenetic relationships based on mitochondrial and nuclear gene sequences for the Todies (Todus, Todidae) of the Caribbean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 524–38.
- Posada, D. and Buckley, T.R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematical Biology*, 53, 793–808.
- Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817–18.
- Quennell, A.M. 1984. The western Arabia rift system. In: Dixon, J.E., Robertson, A.H.F. (Eds.), *The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean*. Geological Society Special Publication No. 17. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 775–778.
- Rambaut, A. and Drummond, A. 2010. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, United Kingdom [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>].
- Randi, E. and Lucchini, V. 1998. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *Journal of Molecular Evolution*, 47, 449–462.
- Randi, E., Lucchini, V., Hennache, A., Kimball, R.T., Braun, E.L. and Ligon J.D. 2001. Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region and Cytochrome b Genes and the Inference of Phylogenetic Relationships in the Avian Genus *Lophura* (Galliformes) *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 06.
- Rietschel, S. and Storch, G. 1974. Außergewöhnlich erhaltene Waldmause (*Apodemus atavus* Heller, 1936) aus dem ober Pliozan von Willerhausen am Harz. *Senckenberg Lethaea*, 54, 491–519.
- Rogers, A.R. and Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552–569.
- Rohlf, F.J. 2008. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.
- Rozas, J. 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537*. Humana Press, NJ, USA.

- Sbisa, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. and Saccone, C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205, 125–140.
- Schwartz, M. and Vissing, J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 347: 576-580.
- Selçuk, S. E., Çolak, R., Olgun Karacan, G., Çolak, E. 2012. Population Structure of Edible Dormouse, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) in Turkey, Inferred from RAPD-PCR. *Acta Zoologica Bulgarica*, 64 (1), 77-83.
- Serizawa, K., Suzuki, H. and Tsuchiya, K. 2000. A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochemicals Genetics*, 38, 27– 41.
- Shao, R., Mitani, H., Barker, S. C., Takahashi, M., Fukunaga, M. 2005. Novel mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter mtDNA recombination in the chigger mite, *Leptotrombidium pallidum*. *Journal of Molecular Evolution*, 60, 764–73.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, N., Hayashida, T., Matsubayashi, N., Zaita, J., Chunwongse, J., Obokata, K., Yamaguchi-Shinozaki, C. vd. 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO Journal* 5, 2043-2049.
- Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B. and Beckenbach, A. T. 2006. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolutionary Systematics*, 37:545–79
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87, 651–701.
- Slatkin, M. and Hudson, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555–562.
- Smith, D.R., Hua, J., Lee, R.W. and Keeling, P.J. 2012. Relative rates of evolution among the three genetic compartments of the red alga *Porphyra* differ from those of green plants and do not correlate with genome architecture. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65 (1): 339-345.
- Spitzenberger, F. 1973. Zur Kleinsäugerfauna West-Anatoliens, Teil II. In: Felten, H.,

- Spitzenberger, F., Storch, G., eds. *Senckenbergiana Biologia*, 54, 227–290.
- Storch, G. 1977. Die Ausbreitung der Felsenmaus (*Apodemus mystacinus*): Zur Problematik der Inselbesiedlung und Tiergeographie der Ägäis. *Natur und Museum*, 107, 174–182.
- Sullivan, J. and Joyce, P. 2005. Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology and Evolutionary Systematics*. 36, 445–66.
- Suzuki, H., Filippucci, M.G., Chelomina, G.N., Sato, J.J., Serizawa, K., Nevo, E. 2008. A biogeographic view of *Apodemus* in Asia and Europe inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Biochemical Genetics*, 46, 329–346.
- Suzuki, H., Sato, J.J., Tsuchiya, K., Luo, J., Zhang, Y-P., Wang, Y-X., Jiang, X-L. 2003. Molecular phylogeny of wood mice (*Apodemus*, Muridae) in East Asia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 469–481.
- Suzuki, H., Shimada, T., Terashima, M., Tsuchiya, K. and Aplin, K. 2004. Temporal, spatial, and ecological modes of evolution of Eurasian *Mus* based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics of Evolution*, 33, 626–646.
- Swofford, D.L. 1993/1998. PAUP[®]: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sunderland, MA: Sinauer.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J and Hillis, D.M. 1996. Phylogenetic inference. In *Molecular Systematics*, ed. Hillis, D.M., Moritz, C.M., Mable, B.K. pp. 407–514. Sunderland, MA: Sinauer.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G. and Cosson, J. F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7, 453–464.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 597-601.
- Thalman, O., Hebler, J., Poinar, H. N., Paabo, S. and Vigilant, L. 2004. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Molecular Ecology*, 13, 321-335.

- Turoğlu, H. 2010. Kızılırmak Deltası ve yakın çevresinin jeomorfolojik özellikleri ve insan yaşamındaki etkileri. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Anadolu Araştırmaları XIX/1–2006, 99–111. İstanbul.
- Vidya, T.N.C, Sukumar, R. and Melnick, D.J. 2009. Range-wide mtDNA phylogeography yields insights into the origins of Asian elephants. *Proceedings of the Royal Society B*, 276, 893–902.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., et al. 2002. A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection and Evolution*, 34, 275–305.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31, 3688-3691.
- Vogel, F. and Motulsky, A.G., 1997. *Human Genetics: Problems and Approaches*, Berlin: Springer-Verlag, 3rd ed.
- Vohralik, V., Frynta, D., Mikulova, P., Benda, P. and Nova, P. 2002. Multivariate morphometrics of *Apodemus mystacinus* in the Near east and its divergence from European *A. m. epimelas* (Mammalia: Rodentia). *Israel Journal of Zoology*, 48, 135-148.
- Waldron, J.W.F. 1984. Structural history of the Antalya complex in the Isparta angle, southwest Turkey. In: Dixon, J.E., Robertson, T. Hrbek et al. / *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32 (2004) 297–308 307 308 T. Hrbek et al. / *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32 (2004) 297–308 A.H.F. (Eds.), *The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean*. Geological Society Special Publication No. 17. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 273–286.
- Webb, T., III and Bartlein, P.J. 1992, Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses, *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 23, 141-173.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D. and Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26, 375-400.
- Wilson, D.E. and Reeder, D.M. 1993. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic reference*. 2nd Edition. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Woodward, J. 2009. *The Physical Geography of the Mediterranean* Oxford University Press Inc., New York.

- Yang, Z. 1997. PAML: a program for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications of the Biosciences*, 13, 555–56.
- Yang, Z. and Rannala, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 717–724.
- Yeh, F.C.; Yang, R.C., Boyle, T., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1997. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*.
- Yılmaz, T., Aydoğdu, M. and Beyarslan, A. 2010. The distribution of Euphorinae wasps (Hymenoptera: Braconidae) in Turkey, with phytogeographical notes. *Turkish Journal of Zoology*, 34, 181-194.
- Zhang, D-X., Hewitt, G. M. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*. 11, 247–51.

EKLER

- EK 1** Sitokrom *b* bölgesinin *MboI* enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan her kesim tipi için *A. mystacinus* populasyonlarına ait yaklaşık tanıma bölgeleri
- EK 2** Sitokrom *b* bölgesinin *HaeIII* enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan her kesim tipi için *A. mystacinus* populasyonlarına ait yaklaşık tanıma bölgeleri
- EK 3** Sitokrom *b* bölgesinin *RsaI* enzimiyle kesimi sonucu ortaya çıkan her kesim tipi için *A. mystacinus* populasyonlarına ait yaklaşık tanıma bölgeleri
- EK 4** Sitokrom *b* bölgesine ait haplotipler
- EK 5** D-loop bölgesine ait haplotipler
- EK 6** Kimura 2-parametresi (K2P) model alınarak gerçekleştirilen, bitleştirilmiş dizlere ait Neighbour Joining ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)
- EK 7** TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, bitleştirilmiş dizlere ait Maximum Parsimony ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)
- EK 8** HKY+G modeline göre oluşturulan, bitleştirilmiş dizlere ait Maximum Likelihood ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)


```
          610          620          630          640          650          660          670          680          690          700
1.Kesim tipi  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
2.Kesim tipi  AAAATCCCATTCCACCCATACTATAACAATTAAGATATCCTAGGTATTCTCTTGATAATTATATT-CCTAATAACCCTAGTCCTATTCTTCCTGACCTT
3.Kesim tipi  AAAATCCCATTCCACCCGTACTATAACAATTAAGATATCCTAGGTATTCTCTTGATAATTATATT-CCTAATAACCCTAGTCCTATTCTTCCTGACCTT

          710          720          730          740          750          760          770          780          790          800
1.Kesim tipi  TTAGGAGATCCAGACAACACTACACACCGGCCAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTGCTTACGCAATCCTACGTT
2.Kesim tipi  TTAGGAGATCCAGACAACACTACACACCGGCCAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTGCTTACGCAATCCTACGTT
3.Kesim tipi  TTAGGAGATCCAGACAACACTACACACCGAGCTAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTGCTTACGCAATCCTACGTT

          810          820          830          840          850          860          870          880          890          900
1.Kesim tipi  CAATCCCAACAAACTAGGTGGAGTCCTAGCCCTCATTCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTCCATTACTCCATACATCCCAACAACGAAGTATAAT
2.Kesim tipi  CAATCCCAACAAACTAGGTGGAGTCCTAGCCCTCATTCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTCCATTACTCCATACATCCCAACAACGAAGTATAAT
3.Kesim tipi  CAATCCCAACAAACTAGGTGGAGTCCTAGCCCTCATTCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTACCATTACTCCATACATCCCAACAACGAAGTATAAT

          910          920          930          940          950          960          970          980          990          1000
1.Kesim tipi  CTTTCGTCCAATTACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGTAACCTATTTATCCTAACTTGAATTGGTGGCCAACCAGTTGAACACCCCTTTATTATC
2.Kesim tipi  CTTTCGTCCAATTACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGTAACCTATTTATCCTAACTTGAATTGGTGGCCAACCAGTTGAACACCCCTTTATTATC
3.Kesim tipi  TTTTCGTCCAATCACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGTAACCTATTTATCCTAACTTGAATTGGTGGCCAACCAGTTGAACACCCCTTTATTATC

          1010         1020         1030         1040         1050         1060         1070
1.Kesim tipi  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
2.Kesim tipi  ATCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTACTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCTATCTCAGGGATTATCG
3.Kesim tipi  ATCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTATTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCCATCTCAGGGATTATCG
```


510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
1.Kesim tipi TCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATCACCGCCCTAGTTATTGTCCATCTATTATTTCTTCACGAAACCGGATCTAATAACCCAACTGGCCTGAA
2.Kesim tipi TCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATCTACTGCCCTAGTTATTGTCCATCTACTATTTCTCCACGAAACCGGATCTAATAACCCAACTGGCCTAAA
3.Kesim tipi TCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATCACCGCCCTAGTTATTGTCCATCTACTATTCCTTCACGAAACCGGATCTAATAACCCAACTGGCTTAAA
4.Kesim tipi TCGCATTCCACTTTATTCTCCCATTTATTATCACCGCCCTAGTTATTGTCCATCTACTATTCCTTCACGAAACCGGATCTAATAACCCAACTGGCCTAAA

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
1.Kesim tipi TTCAGACGCCGACAAAATCCCATTCACCCATACTATAACAATTAAGATATCTAGGTATTCTCTTGATAATTATATTCCTAATAACCCTAGTCTTATTC
2.Kesim tipi TTCAGACGCCGACAAAATCCCATTCACCCATACTATAACAATTAAGATATCTAGGTATTCTATTGATAATTATATTCCTAATAACCCTAGTCTTATTC
3.Kesim tipi TTCAGACGCTGACAAAATCCCATTCACCCGTACTATAACAATTAAGATATCTAGGTATTCTCTTGATAATTATATTCCTAATAACCCTAGTCTTATTC
4.Kesim tipi TTCAGACGCTGACAAAATCCCATTCACCCGTACTATAACAATTAAGATATCTAGGTATTCTCTTGATAATTATATTCCTAATAACCCTAGTCTTATTC

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
1.Kesim tipi TTCCCTGACCTTTTAGGAGACCCAGACAACCTACACACCGGCCAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTTGCCTACG
2.Kesim tipi TTCCCTGACCTTTTAGGAGACCCAGACAACCTACACACCAGCCAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTTGCCTACG
3.Kesim tipi TTCCCTGACCTTTTAGGAGATCCAGACAACCTACACACCAGCTAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTTGCCTACG
4.Kesim tipi TTCCCTGACCTTTTAGGAGATCCAGACAACCTACACACCAGCTAACCCCTAAATACCCACCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTTGCCTACG

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
1.Kesim tipi CAATCCTACGTTCAATCCCCAACAACTAGGTGGAGTCTTAGCCCTCATCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTCCCATTACTCCATACATCCCAACA
2.Kesim tipi CAATCCTACGTTCAATCCCCAACAACTAGGTGGAGTCTTAGCCCTCATCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTCCCATTACTCCATACATCCCAACA
3.Kesim tipi CAATCCTACGTTCAATCCCCAACAACTAGGTGGAGTCTTAGCCCTCATCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTACCATTACTCCATACATCCCAACA
4.Kesim tipi CAATCCTACGTTCAATCCCCAACAACTAGGTGGAGTCTTAGCCCTCATCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTACCATTACTCCATACATCCCAACA

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
1.Kesim tipi ACGAAGTATAATCTTTTCGTCCAATCACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTATTTATCCCTAAGTGAATGGTGGCCAACCAGTTGAACAC
2.Kesim tipi ACGAAGTATAATTTTCGTCCAATCACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTATTTATCCCTAAGTGAATGGTGGCCAACCAGTTGAACAC
3.Kesim tipi ACGAAGTATAATTTTCGTCCAATCACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTATTTATCCCTAAGTGAATGGTGGCCAACCAGTTGAACAC
4.Kesim tipi ACGAAGTATAATTTTCGTCCAATCACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTATTTATCCCTAAGTGAATGGTGGCCAACCAGTTGAACAC

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
1.Kesim tipi CCCTTTATTATCATCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTACTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCTATCTCAGGGATTATCG
2.Kesim tipi CCCTTATTATCATCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTACTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCTATCTCAGGGATTATCG
3.Kesim tipi CCCTTATTATCATCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTACTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCTATCTCAGGGATTATCG
4.Kesim tipi CCCTTATTATCATCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTACTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCTATCTCAGGGATTATCG


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1.Kesim tipi TAGGAGATCCAGACAACACTACACACCGCCAACCCCTAAATACCCACCCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTTGCTTACGCAATCCTACGTTTC
2.Kesim tipi TAGGAGATCCAGACAACACTACACACCGCTAACCCCTAAATACCCACCCACATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTTGCCTACGCAATCCTACGTTTC

          810          820          830          840          850          860          870          880          890          900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1.Kesim tipi AATCCCAACAACACTAGGTGGAGTCCCTAGCCCTCATTCTATCAATCCTTATTCTAGCTCTTCTCCCATTACTCCATACATCCCAACAACGAAGTATAATC
2.Kesim tipi AATCCCAACAACACTAGGTGGAGTCCCTAGCCCTCATTCTATCAATCCTAATCCTAGCTCTTCTACCATTACTCCATACATCCCAACAACGAAGTATAATT

          910          920          930          940          950          960          970          980          990          1000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1.Kesim tipi TTTCGTCCAATTACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTATTTATCCTAACTTGAATTGGTGGCCAACCAGTTGAACACCCCTTTATTATCA
2.Kesim tipi TTTCGTCCAATCACACAAACACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTATTTATCCTAACTTGAATTGGTGGCCAACCAGTTGAACACCCCTTTATTATCA

          1010         1020         1030         1040         1050         1060
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1.Kesim tipi TCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTACTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCTATCTCAGGGATTATCG
2.Kesim tipi TCGGCCAACTTGCTTCAATTAGCTATTTCTCTATTATCCTAATTATAATACCCATCTCAGGGATTATCG

```


Hap08-Artvin		
Hap09-ArtvinC.....		
Hap10-Artvin		
Hap11-Artvin		
Hap12-Artvin		
Hap13-Artvin (AJ748239)		
Hap14-Gürcistan (AJ748240)		
Hap15-Erzincan/Maraş/Adana		
Hap16-Erzincan		
Hap17-Maraş		
Hap18-Maraş		
Hap19-Adıyaman		
Hap20-Adıyaman		
Hap21-Adana		
Hap22-Adana		
Hap23-Suriye (AJ311146-AJ74823)		
Hap24-Muğla	C.....	C.....
Hap25-Muğla	C.....	C.....
Hap26-Muğla	C.....	C.....
Hap27-Muğla	C.....	C.....
Hap28-Muğla	C.....	C.....
Hap29-Muğla	C.....	C.....
Hap30-Muğla	C.....	C.....
Hap31-Burdur	C.....	C.....
Hap32-Konya		T.....C.....
Hap33-Konya	C.....	C.....
Hap34-Antalya/Mersin	C.....	C.....
Hap35-Antalya	C.....	C.....
Hap36-Antalya	C.....	C.....
Hap37-Antalya	C.....	C.....
Hap38-Antalya	C.....	C.....
Hap39-Antalya (AJ748225)	C.....	C.....
Hap40-Antalya (AJ748226)	C.....	C.....
Hap41-Mersin	C.....	C.....
Hap42-Mersin	C.....	C.....
Hap43-Girit (AJ748232)	C.....	C.....
Hap44-Girit (AJ748235)	C.....	C.....
Hap45-Girit (AJ748234)	C.....	C.....
Hap46-Girit (AJ748233)C.....	C.....	C.....
Hap47-Kastamonu/Balıkesir		C.....
Hap48-Zonguldak		C.....
Hap49-Düzce/İzmir		C.....
Hap50-Balıkesir		C.....
Hap51-Balıkesir	T.....	C.....
Hap52-Balıkesir		C.....
Hap53-Balıkesir		C.....

Hap54-İzmirC.....
Hap55-İzmirC.....
Hap56-AydınC.....
Hap57-Yunanistan (AJ748228)	...C.....C..C.....T.....A...T...T.....C..T.
Hap58-Yunanistan (AJ748230)	...C.....C..C.....T.....A...T...T.....C..T.
Hap59-Bulgaristan (AJ748227)C..C.....T.....A...T...T.....C..T.
Hap60-A. uralensisC..T.....C.....T.....G.....CA.G...A.....C..A.....C.....
Hap61-A. uralensisC..T.....C.....T.....G.....A.G...A.....C..A.....C.....
Hap62-A. uralensisC..T.....C.....T.....G.....CA.G...A.....C..A.....C.....
Hap63-A. witherbyiT.....C.....C.....T.....CA...T..A..T.....A.....C..T.
Hap64-A. witherbyiT.....C.....C.....T.....CA...T..A..T.....A.....C..T.
Hap65-A. witherbyiT.....C.....C.....T.....CA...T..A..T.....A.....C..T.
Hap66-A. flavicollisC..T.....T...C..C.....T..T.....T.....A.....C..A.....C.....
Hap67-A. flavicollisC..T.....T...C..C.....T..T.....T.....A.....C..A.....C.....
Hap68-A. sylvaticusT...G..C...C.....T..T..C.....T.....A...T..A.....C..A.....T.
Hap69-A. sylvaticusT...G..C...C.....T..T..C.....T.....A...T..A.....C..A.....T.
Hap70-Mus musculus (JX457720)C.....C.....G..T.....A.....A.....C..A.....T.
Hap71-Mus musculus (JX457718)C.....C.....G..T.....A.....A.....A.....T.....T.
Hap72-Rattus norvegicus (AB746)	..C.....C..C..C..C.....C.....CC.....C...C..A.....
Hap73-Rattus norvegicus (AB746)	..C.....C..C..C..C.....C.....CC.....C...C..A.....

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300

Hap01-Ordu	TCTGTTTATTCTCCATGTAGGACGAGGAATGTACTATGGATCCTACATGTTTCATAGAAACATGAAACATTGGAATTATTCTACTATTCGCAGTTATAGC
Hap02-OrduA.....C.....
Hap03-TrabzonC.....
Hap04-TrabzonC.....
Hap05-RizeC.....
Hap06-RizeC.....
Hap07-ArtvinC.....
Hap08-ArtvinC.....
Hap09-ArtvinC.....
Hap10-ArtvinC.....
Hap11-ArtvinG.....C.....
Hap12-ArtvinC.....
Hap13-Artvin (AJ748239)C.....
Hap14-Gürcistan (AJ748240)C.....
Hap15-Erzincan/Maraş/AdanaC.....
Hap16-ErzincanC.....
Hap17-MaraşC.....
Hap18-MaraşC.....
Hap19-AdıyamanC.....
Hap20-AdıyamanC.....A.....
Hap21-AdanaC.....

Hap36-Antalya
 Hap37-AntalyaG.....
 Hap38-AntalyaG.....
 Hap39-Antalya (AJ748225) C.....G.....
 Hap40-Antalya (AJ748226)G.....
 Hap41-MersinG.....
 Hap42-Mersin
 Hap43-Girit (AJ748232)G.....T.....
 Hap44-Girit (AJ748235)G.....
 Hap45-Girit (AJ748234)G.....
 Hap46-Girit (AJ748233)G.....
 Hap47-Kastamonu/BalıkesirA.....C.....
 Hap48-ZonguldakA.....C.....
 Hap49-Düzce/IzmirA.....C.....
 Hap50-BalıkesirA.....C.....
 Hap51-BalıkesirA.....C.....C.....
 Hap52-BalıkesirA.....C.....
 Hap53-BalıkesirA.....C.....
 Hap54-İzmirA.....C.....
 Hap55-İzmirA.....C.....
 Hap56-AydınA.....C.....
 Hap57-Yunanistan (AJ748228)C.....C.....C.....T.....T.....T.....A...
 Hap58-Yunanistan (AJ748230)C.....C.....A.....C.....G.....T.....GT.....T.....A...
 Hap59-Bulgaristan (AJ748227)C.....C.....A.....C.....T.....T.....C.....T.....A...
 Hap60-A. uralensis C.....C.....A.....C.....C.....A.....C.....C.....CT.AC.....A.....T.....A..T
 Hap61-A. uralensis C.....C.....A.....C.....C.....A.....C.....C.....CT.AC.....A.....T.....A..T
 Hap62-A. uralensis C.....C.....A.....C.....C.....A.....C.....C.....CT.AC.....A.....T.....A..T
 Hap63-A. witherbyiC.....T.....A.....C.....T.....C.....AC.....C.....T.....T
 Hap64-A. witherbyiC.....T.....A.....C.....T.....C.....AC.....C.....T.....T
 Hap65-A. witherbyiC.....T.....A.....C.....T.....C.....AC.....C.....T.....T
 Hap66-A. flavicollis C.....C.....T.....C.....G.....A.....C.....A.....A.....T.....C.....A..T
 Hap67-A. flavicollis C.....C.....T.....C.....G.....A.....C.....A.....A.....T.....C.....A..T
 Hap68-A. sylvaticus C.....C.....A.....T.....A.....C.....T.....AC.....A.....C.....A..T
 Hap69-A. sylvaticus C.....C.....A.....T.....A.....C.....T.....AC.....G.....A.....T.....C.....A..T
 Hap70-Mus musculus (JX457720) C.....C.....C.....A.....A.....C.....T.....C.....T.....C.....CC.....C.....T.....A..A
 Hap71-Mus musculus (JX457718) C.....C.....C.....A.....A.....C.....T.....C.....T.....C.....CC.....C.....T.....A..A
 Hap72-Rattus norvegicus (AB746) A..T.....C.....G.....C.....C.....A.....A.....C.....T.....C.....C.....A.....T.....C.....T.....G..T
 Hap73-Rattus norvegicus (AB746) A..T.....C.....G.....C.....C.....A.....A.....C.....T.....C.....A.....T.....C.....T.....G..T

Hap24-MuğlaT.....A.....A.....
Hap25-MuğlaT.....A.....A.....
Hap26-MuğlaT.....A.....A.....
Hap27-MuğlaT.....A.....A.....
Hap28-MuğlaT.....A.....A.....
Hap29-MuğlaT.....A.....A.....A.....
Hap30-MuğlaT.....A.....G.....A.....
Hap31-BurdurT.....A.....A.....
Hap32-KonyaC.....T.....A.....A.....
Hap33-KonyaT.....A.....A.....A.....
Hap34-Antalya/MersinT.....A.....A.....
Hap35-AntalyaT.....A.....A.....
Hap36-AntalyaT.....A.....A.....
Hap37-AntalyaT.....A.....A.....
Hap38-AntalyaT.....A.....C.....A.....
Hap39-Antalya (AJ748225)T.....A.....T.....A.....
Hap40-Antalya (AJ748226)T.....A.....A.....C.....A.....
Hap41-MersinT.....A.....A.....
Hap42-MersinT.....A.....C.....A.....
Hap43-Girit (AJ748232)T.....A.....A.....
Hap44-Girit (AJ748235)T.....A.....A.....
Hap45-Girit (AJ748234)T.....A.....A.....
Hap46-Girit (AJ748233)T.....A.....A.....
Hap47-Kastamonu/BalıkesirT.....A.....
Hap48-ZonguldakT.....A.....
Hap49-Düzce/İzmirT.....A.....
Hap50-BalıkesirT.....A.....
Hap51-BalıkesirT.....A.....
Hap52-BalıkesirC.....T.....A.....
Hap53-BalıkesirT.....A.....
Hap54-İzmirN.....T.....A.....
Hap55-İzmirT.....A.....
Hap56-AydınC.....T.....A.....
Hap57-Yunanistan (AJ748228)A.....TA.....A.....G.....TA.....T.....A.....T.....T.....T.....A.....
Hap58-Yunanistan (AJ748230)C.....A.....TA.....A.....G.....TA.....T.....A.....T.....T.....T.....A.....
Hap59-Bulgaristan (AJ748227)A.....TA.....A.....G.....T.....T.....A.....T.....T.....T.....A.....
Hap60-A. uralensisC.....T.....AG.....A.....AA.....A.....CTC.....T.....G.....T.....A.....T.....AC.....C.....G.....T.....T.....C.....
Hap61-A. uralensisC.....T.....AG.....A.....AA.....A.....CTC.....G.....T.....G.....C.....A.....T.....AC.....C.....G.....T.....T.....C.....
Hap62-A. uralensisC.....T.....AG.....A.....AA.....A.....CTC.....T.....G.....T.....T.....A.....T.....AC.....C.....T.....T.....C.....
Hap63-A. witherbyiC.....C.....T.....G.....G.....A.....A.....CT.....T.....C.....A.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....
Hap64-A. witherbyiC.....C.....T.....G.....G.....A.....A.....CT.....T.....C.....A.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....
Hap65-A. witherbyiC.....C.....T.....G.....G.....A.....A.....CT.....T.....C.....A.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....
Hap66-A. flavicollisC.....T.....AG.....A.....A.....A.....G.....GTC.....T.....T.....C.....A.....C.....T.....G.....T.....T.....T.....
Hap67-A. flavicollisC.....T.....AG.....A.....A.....A.....G.....GTC.....T.....T.....C.....A.....C.....T.....G.....T.....T.....T.....
Hap68-A. sylvaticus	T.....C.....T.....G.....A.....AA.....A.....G.....TCC.....TT.....T.....T.....A.....AC.....C.....G.....T.....T.....T.....
Hap69-A. sylvaticus	T.....C.....T.....G.....A.....AA.....A.....G.....TCC.....TT.....T.....T.....A.....AC.....C.....G.....T.....T.....T.....

Hap03-TrabzonC.....
Hap04-TrabzonC.....
Hap05-RizeT.....
Hap06-RizeT.....
Hap07-Artvin
Hap08-ArtvinA.....T.....
Hap09-ArtvinT.....
Hap10-ArtvinT.....
Hap11-ArtvinT.....
Hap12-ArtvinT.....
Hap13-Artvin (AJ748239)T.....
Hap14-Gürcistan (AJ748240)T.....
Hap15-Erzincan/Maraş/Adana
Hap16-Erzincan
Hap17-Maraş
Hap18-MaraşA.....
Hap19-Adıyaman
Hap20-AdıyamanC.....T.....
Hap21-AdanaT.....
Hap22-Adana
Hap23-Suriye (AJ311146-AJ74823)
Hap24-MuğlaA.....A.....T.....C.....G...
Hap25-MuğlaA.....A.....T.....C.....G...
Hap26-MuğlaA.....A.....T.....C.....G...
Hap27-MuğlaA.....G.....T.....C.....G...
Hap28-MuğlaA.....A.....T.....C.....G...
Hap29-MuğlaA.....A.....T.....C.....G...
Hap30-MuğlaA.....G.....T.....C.....G...
Hap31-BurdurA.....A.....T.....C.....G...
Hap32-KonyaA.....A.....T.....C.....G...
Hap33-KonyaA.....A.....T.....C.....G...
Hap34-Antalya/MersinA.....A.....T.....C.....G...
Hap35-AntalyaA.....A.....T.....C.....G...
Hap36-AntalyaA.....A.....T.....C.....G...
Hap37-AntalyaA.....A.....C.....T.....C.....G...
Hap38-AntalyaA.....A.....T.....C.....G...
Hap39-Antalya (AJ748225)A.....A.....T.....C.....G...
Hap40-Antalya (AJ748226)A.....A.....T.....C.....G...
Hap41-MersinA.....A.....T.....C.....G...
Hap42-MersinA.....A.....T.....C.....G...
Hap43-Girit (AJ748232)A.....A.....A.....C.....T.....C.....GCT..
Hap44-Girit (AJ748235)A.....A.....T.....C.....G...
Hap45-Girit (AJ748234)A.....A.....T.....C.....G...
Hap46-Girit (AJ748233)A.....A.....T.....C.....G...
Hap47-Kastamonu/BalıkesirA.....A.....T.....C.....
Hap48-ZonguldakA.....A.....T.....C.....

Hap49-Düzce/İzmirA.....A.....T.....C.....
 Hap50-BalıkesirA.....A.....T.....C.....
 Hap51-BalıkesirA.....A.....T.....C.....
 Hap52-BalıkesirA.....A.....T.....C.....
 Hap53-BalıkesirA.....C.A.....T.....C.....
 Hap54-İzmirA.....A.....T.....C.....
 Hap55-İzmirA.....A.....T.....C.....
 Hap56-AydınA.....A.....T.....C.....
 Hap57-Yunanistan (AJ748228)TT.A..C....G...T.A..T...A..CT.A.....T..A.....T..C...A..C.....T..
 Hap58-Yunanistan (AJ748230)TT.A..C....G...T.A..T...A..CT.A.....T..A.....T..C...A..C.....T..
 Hap59-Bulgaristan (AJ748227)TT.A..C....G...T.A..T...A..CT.A.....T..A.....T..C...A..C.....T..
 Hap60-A. uralensisT..A..C.....T.....T.....C..AT.A.....T.....C.....A.....T..CC...A..C.....C..C.....C..
 Hap61-A. uralensisT..A..C.....T.....T.....C..AT.A.....T.....C.....A.....T..CC...A..C.....C..C.....C..
 Hap62-A. uralensisT..A..C.....T.....T.....C..AT.A.....T.....C.....A.....T..CC...A..C.....C..C.....C..
 Hap63-A. witherbyiA..C.....T.....T.....T.A..T...T..T.....C..A.....T..CC.C.A.....A.....C..T...TC..
 Hap64-A. witherbyiA..C.....T.....T.....T.A..T...T..T.....C..A.....T..CC.G.A.....A.....C..T...TC..
 Hap65-A. witherbyiA..C.....T.....T.....T.A..T...T..T.....C..A.....T..CC.G.A.....A.....C..T...TC..
 Hap66-A. flavicollisA..T...T.....T.....C..AT.A.....C..A..C..C..TA.....C..CC...A..C.....C..T...C..
 Hap67-A. flavicollisA..T...T.....T.....C..AT.A.....C..C..C..TA.....C..CC...A..C.....C..T...C..
 Hap68-A. sylvaticusA.....T.A..TT...C..AT.A.....C.....C..T..A.....C.....A..C..C.....C..T...C..
 Hap69-A. sylvaticusA.....T.A..TT...C..AT.A.....C.....C..T..A.....C.....A..C..C.....C..T...C..
 Hap70-Mus musculus (JX457720)T.A..CT...T...A..TT...C..AA.A..T..C..T...C..AA.G.....CC...A..C..C.....C.....TTT
 Hap71-Mus musculus (JX457718)T.A..CT...T...A..TT...C..AA.A..T..C..T...C..AA.G.....CC...A..C..C.....C.....TTT
 Hap72-Rattus norvegicus (AB746)A..CT.....A..T...CT.C..A.....C..G...T..AA.....C..CT..CA..C..C.....C..C...TC..
 Hap73-Rattus norvegicus (AB746)A..CT.....A..T...CT.C..A.....C..G...T..AA.....C..CT..CA..C..C.....C..C...TC..

EK 5 D-loop bölgesine ait haplotipler

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Hap01-Ordu/Trabzon/Artvin/Erzi	ATTTATAAAGTACAT	-AGTACATA--	TATGTATATAGTACAT	TAAATTATTT	ACCCTAGCATATA	AAGCAAGTAAATAT	GAATTAATGTATT	AGGAT---		
Hap02-Rize/Artvin										
Hap03-Rize									A	
Hap04-Artvin										
Hap05-Artvin										
Hap06-Artvin								T		
Hap07-Artvin										
Hap08-Artvin (AY623066) /Erzinca										
Hap09-Gürcistan_ (AY623083)										
Hap10-Erzincan							G			
Hap11-Erzincan							G			
Hap12-Maraş/Adıyaman/Adana										
Hap13-Maraş										
Hap14-Maraş			G							
Hap15-Adana										
Hap16-Suriye_ (AY623065)									A	C
Hap17-Suriye_ (AY623078)									A	C
Hap18-Muğla/Antalya						G				
Hap19-Muğla									C	A
Hap20-Muğla		A				G				
Hap21-Muğla						G				
Hap22-Muğla/Antalya/Mersin										
Hap23-Muğla						G			A	A
Hap24-Burdur										
Hap25-Konya										
Hap26-Konya						G				
Hap27-Antalya									C	A
Hap28-Antalya								C		
Hap29-Antalya_ (AY623076)					G					
Hap30-Antalya_ (AY623067) /Mersi						G				
Hap31-Mersin										
Hap32-Girit_ (AY623075-AY673072)						G				
Hap33-Girit_ (AY623073-AY623074)						G				
Hap34-Kastamonu/Zonguldak								G		
Hap35-Düzce								G		
Hap36-Balıkesir										
Hap37-Balıkesir										
Hap38-Balıkesir										
Hap39-Balıkesir/İzmir								G		
Hap40-Balıkesir										
Hap41-Balıkesir										
Hap42-İzmir										

```

Hap43-Izmir .....A..C---
Hap44-Aydn .....A....---
Hap45-Yunanistan_(AY623064) .....T.....-AA...AA.....-AT.....TCT.C.A..C---
Hap46-Yunanistan_(AY623069) ..C..C.T.....-AA...AA.....-AT.....TCT.C.A..C---
Hap47-Bulgaristan_(AY623063) .....C.T.....-AA...AA.....-AT.....TCTC..A..C---
Hap48-A._uralensis .....TA..C.....T.T.....T--.....A.T.....-A.G.....ACGATTA
Hap49-A._uralensis .....TA..C.....T.T.....T--.....A.T.....-A.G.....ACGATTA
Hap50-A._uralensis .....TA..C.....T.T.....C--.....A.T.....-A.G.....AAGATTA
Hap51-A._witherbyi GG.CC..TCC.T...T.T..A..C--.....C.....A.T.....-T..C.....C---
Hap52-A._witherbyi GG.C...GCC.....T...A..C--.....C.....A.T.....-T..C.....C---
Hap53-A._witherbyi_(AY588263) .....T.....T.T.....C--.....C.....A.T.....-..C.....C---
Hap54-A._witherbyi_(AY588260) .....T.....T.T.....C--.....C.....A.T..T.....-T..C.....---
Hap55-A._flavicollis_(AY588253) .....A.CC.....T.T.....T--.....A.T.....-CT...C...T...AC-ACTT
Hap56-A._sylvaticus_(AY588255) .....C.T.....T.A.....C--.....A.T.....-C...-ACT...C...CATGAC--
Hap57-A._sylvaticus_(AY588252) .....C.T.....T.A.....C--.....A.T.....-C...-ATT..C...C...CATGAC--
Hap58-Mus_musculus_(KC139206) .....C.T.....AC.....T--.....C.....C.....T..A.....C...A...C...T.C.A.TC---
Hap59-Mus_musculus_(KC139204) .....C.T.....AC.....T--.....C.....C.....T..A.....C...A...C...T.C.A.TC---
Hap60-Rattus_norvegicus_(HQ655) .A.G...T..G...T.AA...T--.....C.....C...A.....T...TATAT.TC...AT.....C---

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
Hap01-Ordu/Trabzon/Artvin/Erzi ATAAATTATTTA--TCCCCATAAACTTTTATAA-AACATGACTATTAT-TTAATTACATAT--AATTAATGCTTGAAGGACATATCTGTGTATATCATA
Hap02-Rize/Artvin .....T.....-.....-.....
Hap03-Rize .....T.....-.....-.....
Hap04-Artvin .....GT.....-.....-.....
Hap05-Artvin .....C.....-A..C.....-.....-.....
Hap06-Artvin .....-.....A..C.....-.....-.....
Hap07-Artvin .....C--.....A..C.....-.....-.....
Hap08-Artvin(AY623066)/Erzinca .....-.....C.....-.....-.....
Hap09-Gürcistan_(AY623083) .....-C.....-.....-.....
Hap10-Erzincan .....-.....T.....-.....-.....
Hap11-Erzincan .....-.....C.....-.....-.....
Hap12-Maraş/Adıyaman/Adana .....-.....G-.....-.....-.....
Hap13-Maraş .....-.....G-.....-.....-.....
Hap14-Maraş .....-.....-.....-.....-.....
Hap15-Adana .....-.....T..C..C.....-.....-.....
Hap16-Suriye_(AY623065) .....C...A-.....T..C.....-.....-.....A.....
Hap17-Suriye_(AY623078) .....C...A-.....T..C.....-.....-.....A.....
Hap18-Muğla/Antalya .....CC.C..A-.....T.....-C.....-.....A.....
Hap19-Muğla .....C...A-.....TC.....-C.....-.....
Hap20-Muğla .....C.C..A-.....T..C..C.....-CC.....-.....A.....
Hap21-Muğla .....C.C..A-.....T..C.....-C.....-.....A.....
Hap22-Muğla/Antalya/Mersin .....C...A-.....T.....-.....-.....
Hap23-Muğla .....C.C..A-.....T.....-.....-.....A.....
Hap24-Burdur .....C.C..A-.....C.....-C.....-.....A.....
Hap25-Konya .....-.....-.....-.....-.....

```



```

Hap55-A._flavicollis_(AY588253) .....CT.....A.....A.....A.....
Hap56-A._sylvaticus_(AY588255) .....CT.....A.....A.....A.....
Hap57-A._sylvaticus_(AY588252) .....CT.....A.....A.....A.....
Hap58-Mus_musculus_(KC139206) .....AC.....A.....A.....A.....
Hap59-Mus_musculus_(KC139204) .....AC.....A.....A.....A.....
Hap60-Rattus_norvegicus_(HQ655) .....CT.....A.....TG.....A.....C.A.T.....T.A.....

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
Hap01-Ordu/Trabzon/Artvin/Erzi CTTATGCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAAACTTGGGGGTGACTATAATGAAACTTTATCAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATAGAATGCGT
Hap02-Rize/Artvin .....
Hap03-Rize .....
Hap04-Artvin .....
Hap05-Artvin .....
Hap06-Artvin .....
Hap07-Artvin .....
Hap08-Artvin (AY623066) /Erzinca .....
Hap09-Gürcistan_(AY623083) .....
Hap10-Erzincan .....
Hap11-Erzincan .....
Hap12-Maraş/Adıyaman/Adana .....
Hap13-Maraş .....C.....G.....
Hap14-Maraş .....
Hap15-Adana .....C.....
Hap16-Suriye_(AY623065) .....
Hap17-Suriye_(AY623078) .....T.....
Hap18-Muğla/Antalya .....
Hap19-Muğla .....
Hap20-Muğla .....
Hap21-Muğla .....
Hap22-Muğla/Antalya/Mersin .....
Hap23-Muğla .....
Hap24-Burdur .....
Hap25-Konya .....
Hap26-Konya .....
Hap27-Antalya .....
Hap28-Antalya .....
Hap29-Antalya_(AY623076) .....
Hap30-Antalya_(AY623067) /Mersi .....
Hap31-Mersin .....
Hap32-Girit_(AY623075-AY673072) .....
Hap33-Girit_(AY623073-AY623074) .....
Hap34-Kastamonu/Zonguldak .....
Hap35-Düzce .....
Hap36-Balıkesir .....
Hap37-Balıkesir .....

```

```

Hap38-Balıkesir .....
Hap39-Balıkesir/İzmir .....
Hap40-Balıkesir .....
Hap41-Balıkesir .....
Hap42-İzmir .....
Hap43-İzmir .....
Hap44-Aydın .....
Hap45-Yunanistan_(AY623064) .GA.....AG.....C.....A.....T.....
Hap46-Yunanistan_(AY623069) TGA.....AG.....C.....A.....T.....
Hap47-Bulgaristan_(AY623063) TGA.....AG.....C.....A.....T.....
Hap48-A._uralensis .....C.....AG..A.C.....A.....CA.....
Hap49-A._uralensis .....C.....AG..A.C.....A.....CA.....
Hap50-A._uralensis .....C.....AG..A.C.....A.....CA.....
Hap51-A._witherbyi .....C.....AG.....G.....A.....CA.....
Hap52-A._witherbyi .....C.....AG.....G.....A.....CA.....
Hap53-A._witherbyi_(AY588263) ..-.....C.....AG.....G.....A.....CA.....
Hap54-A._witherbyi_(AY588260) ..-.....C.....AG.....G.....A.....CA.....
Hap55-A._flavicollis_(AY588253) ..-.....C.....AG..A.C.....A.....CA.....
Hap56-A._sylvaticus_(AY588255) ..-.....C.....AG..ATC.....A.....CA.....
Hap57-A._sylvaticus_(AY588252) ..-.....C.....AG..ATC.....A.....CA.....
Hap58-Mus_musculus_(KC139206) .A-.....T.....AG..A.C.....A.....CA.....
Hap59-Mus_musculus_(KC139204) .A-.....T.....AG..A.C.....A.....CA.....
Hap60-Rattus_norvegicus_(HQ655) TC-G.C.....TCGT.C.....C.....C.....CA.T..GT.

```

410 420 430 440 450 460

```

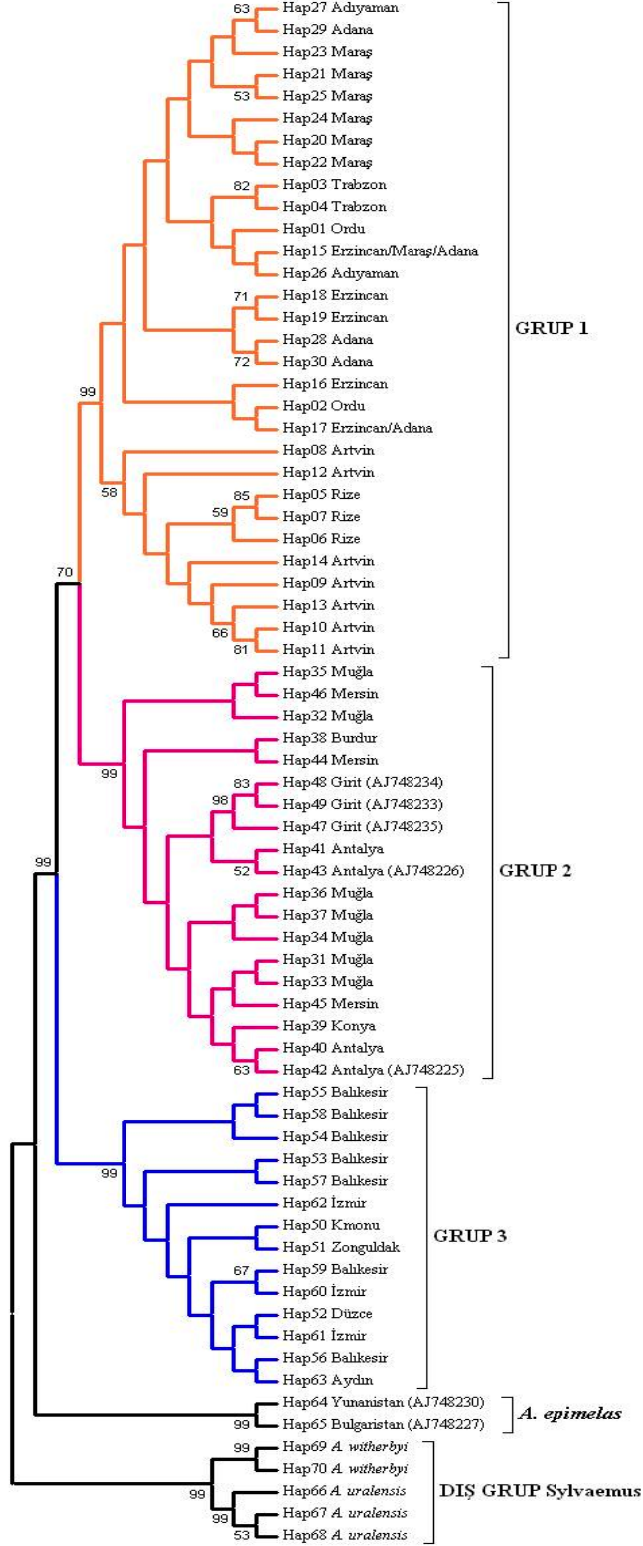
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|..
Hap01-Ordu/Trabzon/Artvin/Erzi TATCGCCCATACGTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGTA-CGGGTCTAATCAGCCAAGA
Hap02-Rize/Artvin .....-.....
Hap03-Rize .....-.....
Hap04-Artvin .....-.....
Hap05-Artvin .....-.....
Hap06-Artvin .....-.....
Hap07-Artvin .....-.....
Hap08-Artvin(AY623066)/Erzinca .....-.....
Hap09-Gürcistan_(AY623083) .....-.....
Hap10-Erzincan .....-.....
Hap11-Erzincan .....-.....
Hap12-Maraş/Adıyaman/Adana .....-.....
Hap13-Maraş .....-.....
Hap14-Maraş .....-.....
Hap15-Adana .....-.....
Hap16-Suriye_(AY623065) .....-.....
Hap17-Suriye_(AY623078) .....-.....
Hap18-Muğla/Antalya .....-.....
Hap19-Muğla .....-.....
Hap20-Muğla .....-.....

```

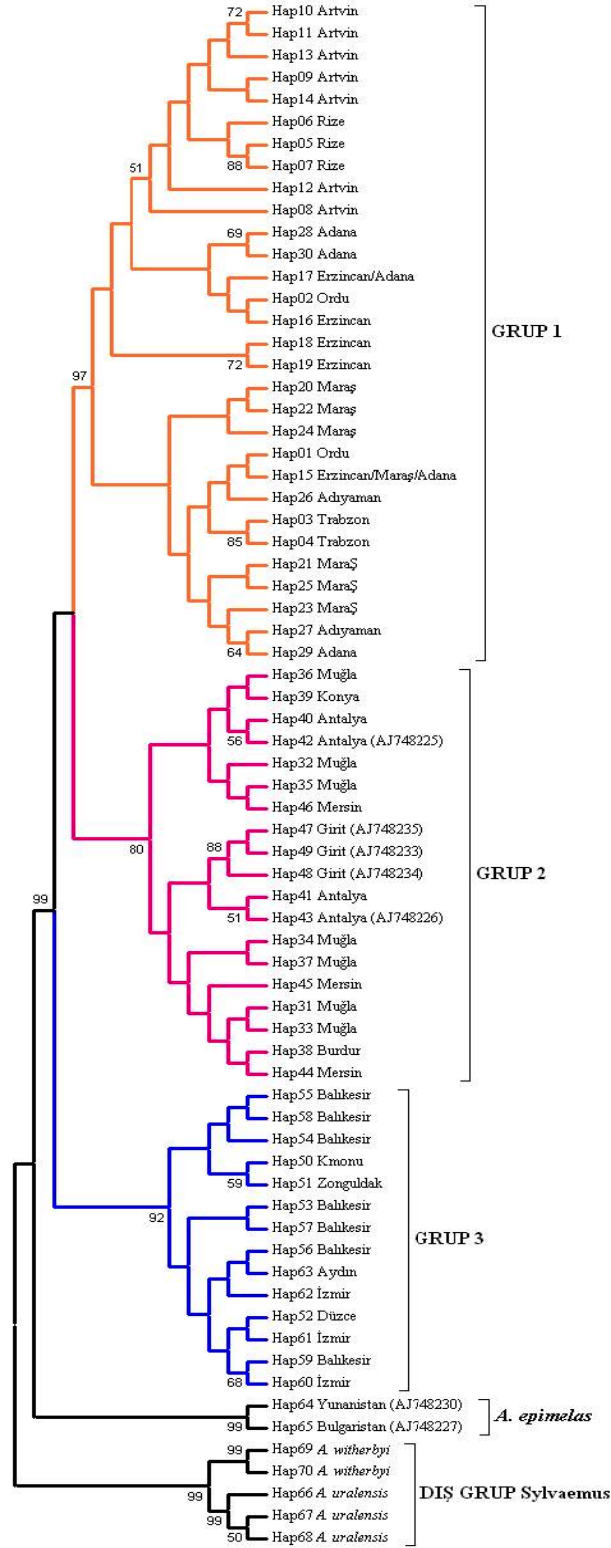
Hap21-Muğla-
Hap22-Muğla/Antalya/Mersin-
Hap23-Muğla-
Hap24-BurdurA.....-
Hap25-Konya-
Hap26-Konya-
Hap27-Antalya-
Hap28-Antalya-
Hap29-Antalya_ (AY623076)-
Hap30-Antalya_ (AY623067) /Mersi-
Hap31-Mersin-
Hap32-Girit_ (AY623075-AY673072)-
Hap33-Girit_ (AY623073-AY623074)-
Hap34-Kastamonu/Zonguldak-
Hap35-Düzce-
Hap36-Balıkesir-
Hap37-Balıkesir-
Hap38-Balıkesir-
Hap39-Balıkesir/İzmir-
Hap40-Balıkesir-
Hap41-Balıkesir-
Hap42-İzmir-
Hap43-İzmir-
Hap44-Aydın-
Hap45-Yunanistan_ (AY623064)-
Hap46-Yunanistan_ (AY623069)T.....-
Hap47-Bulgaristan_ (AY623063)-
Hap48-A._uralensis-
Hap49-A._uralensis-
Hap50-A._uralensis-
Hap51-A._witherbyi-
Hap52-A._witherbyi-
Hap53-A._witherbyi_ (AY588263)C.....-
Hap54-A._witherbyi_ (AY588260)-
Hap55-A._flavicolllis_ (AY588253)-
Hap56-A._sylvaticus_ (AY588255)-
Hap57-A._sylvaticus_ (AY588252)-
Hap58-Mus_musculus_ (KC139206)T.....C.TG
Hap59-Mus_musculus_ (KC139204)T.....C.TG
Hap60-Rattus_norvegicus_ (HQ655)	C.....T.....A.....C.TG

EK 6 Kimura 2-parametresi (K2P) dizlere ait Neighbour Joining ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)

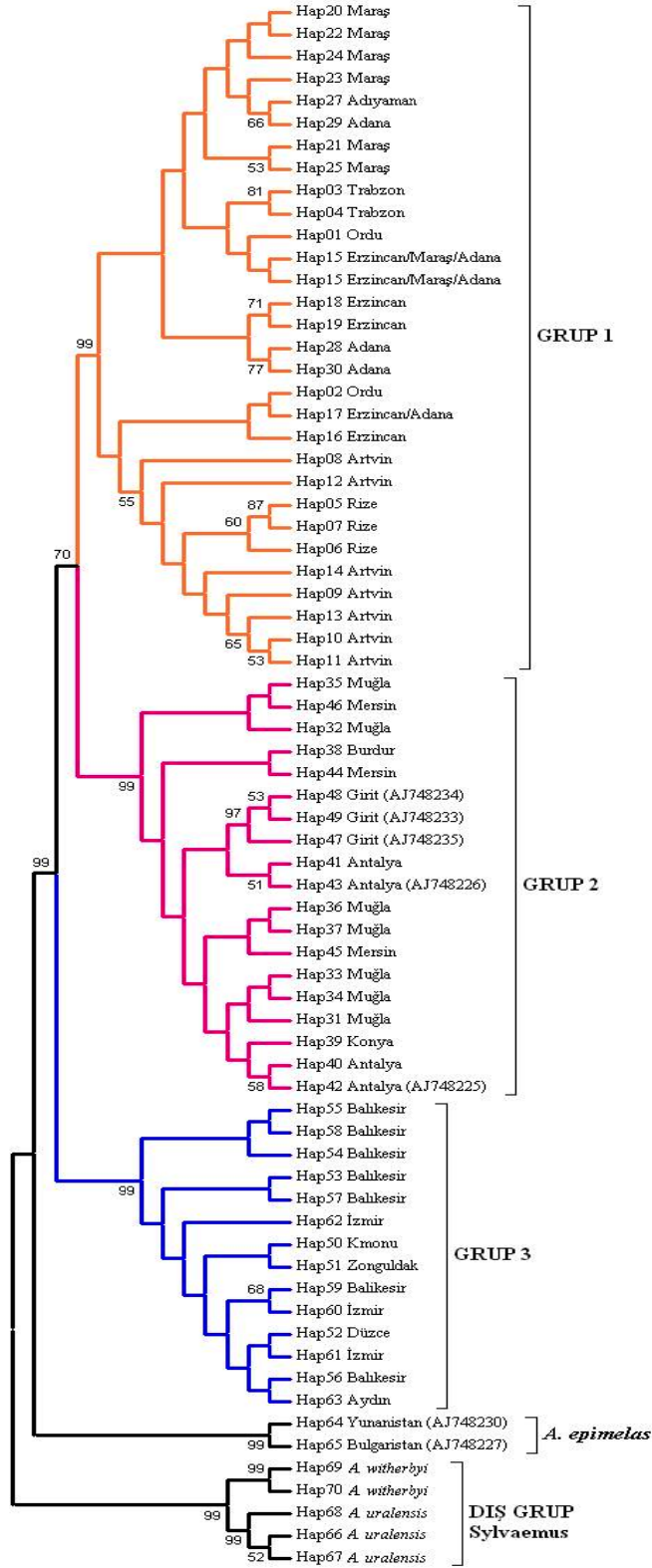
tirilen, bitleştirilmiş ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri



EK 7 TBR (tree bisection-reconnection) yoluyla oluşturulan, bitleştirilmiş dizlere ait Maximum Parsimony ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)



EK 8 HKY+G modeline göre oluşturulan, bitleştirilmiş dizilere ait Maximum Likelihood ağacı (%50'nin altındaki bootstrap değerleri çöktürülmüştür)



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gül OLGUN KARACAN

Doğum Yeri: : Kırıkkale

Doğum Tarihi : 05/04/1982

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ayrancı Lisesi (2000)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2006)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009 Şubat-Ağustos)

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2009 Ağustos- halen)

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

OLGUN, G., ÇOLAK, R., KANDEMİR, İ., ÇOLAK, E., YİĞİT, N. Genetic Variation in Rocky Mouse, *Apodemus mystacinus* (Danford & Alston 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey, Inferred from RAPDs. *Acta Zoologica Bulgarica*, 61(2): 123-129 (2009) **(SCI-Exp)**

ÜSTÜNBAŞ, S., ÇOLAK, R., OLGUN KARACAN, G., ÇOLAK, E. RAPD-PCR Analysis of Water Vole *Arvicola amphibius* (Linnaeus, 1758) (Mammalia: Rodentia) Distributed in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(13):1673-1677 (2011) **(SCI-Exp)**

SELÇUK, S. E., ÇOLAK, R., **OLGUN KARACAN, G.**, ÇOLAK, E. Population Structure of Edible Dormouse, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) in Turkey, Inferred from RAPD-PCR. *Acta Zool. Bulg.*, 64 (1): 77-83 (2012) (**SCI-Exp**)

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

ÇOLAK, R., **OLGUN, G.**, KANDEMİR, İ., ÇOLAK, E., YİĞİT, N. 2007. “Genetic Variation in Rocky Mouse, *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey”. FEBS2007 Congress, Molecular Machines, Vienna, Austria, FEBS JOURNAL, 274 (Suppl. 1): 274 (**SCI**)

ÇOLAK, R., **OLGUN, G.**, KANDEMİR, İ., YİĞİT, N., ÇOLAK, E. 2009. RAPD-PCR analysis of the genus *Apodemus* KAUP, 1829 (Mammalia:Rodentia) in Turkey. 34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, JUL 04-09, 2009 Prague, CZECH REPUBLIC. FEBS JOURNAL, 276 (Suppl. 1): 100 (**SCI**)

TUNA, S., **OLGUN, G.**, ÇOLAK, R. 2009, Electrophoretic analysis of esterase and superoxide dismutase enzymes of the wheat bug, *Eurygaster maura* (Heteroptera: Scutellaridae) populations in the Central Anatolia. 34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, JUL 04-09, 2009 Prague, CZECH REPUBLIC. FEBS JOURNAL, 276 (Suppl. 1):115 (**SCI**)

ÇOLAK, R., KANKILIÇ, T., **OLGUN, G.**, KANDEMİR, İ., ÇOLAK, E. 2008. “Türkiye’de Yayılış Gösteren *Glis glis* ’te Allozim Varyasyonları” 19. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2008. Özet Kitabı s. 492. Trabzon. (Poster)

ÇOLAK, R., KANDEMİR, İ., **OLGUN, G.**, KANKILIÇ, T., ÇOLAK, E., YİĞİT, N., ÖZKURT, Ş. Ö. 2008 “Kuzey Anadolu Bölgesinde Yayılış Gösteren *Clethrionomys Tisellius*, 1850 (Mammalia: Rodentia) Cinsinde Allozim Varyasyonları ve Genetik Farklılaşmalar” 19. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2008. Özet Kitabı s. 492. Trabzon. (Poster)

OLGUN, G., ÇOLAK, R., KANDEMİR, İ., ÇOLAK, E., YİĞİT, N. 2008 “Türkiye'deki *Apodemus* Kaup 1829 (Mammalia: Rodentia) Cinsinin RAPD-PCR ile Analizi” 19. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2008. Özet Kitabı s. 492. Trabzon. (Poster)

ÜSTÜNBAŞ, S. ÇOLAK, R., **OLGUN, G.**, ÇOLAK, E. 2008. “Batı Türkiye’de Yayılış Gösteren Su Sıçanı, *Arvicola terrestris* (Linnaeus, 1758) (Mammalia: Rodentia) Populasyonlarının RAPD-PCR ile Analizi”. VIII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Özet kitabı (P:17) s.121. 20-23 Ekim 2008, Girne/KKTC. (Poster)

SELÇUK, S. E., ÇOLAK, R., **OLGUN, G.**, ÇOLAK, E. 2008. “Türkiye’de Yayılış Gösteren Yediyur, *Glis glis* (Linnaeus, 1766) (RODENTIA: GLIRIDAE) Populasyonlarının RAPD-PCR ile Analizi” VIII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Özet kitabı (P:19) s.122. 20-23 Ekim 2008, Girne/KKTC. (Poster)

GÜNDURU, U., ÇOLAK, R., **OLGUN, G.**, ÇOLAK, E. 2008. “Batı Karadeniz ve Trakya’da Yayılış Gösteren *Mus* L., 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsinin Allozim Varyasyonları”. VIII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Özet kitabı (P:19) s.123. 20-23 Ekim 2008, Girne/KKTC. (Poster)

BETEŞ, D., ÇOLAK, R., **OLGUN, G.**, KANDEMİR, İ., KANKILIÇ, T., ÇOLAK, E. 2010. “Kuzey Anadolu’da Yayılış Gösteren *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) (Mammalia: Rodentia)’un RAPD-PCR Analizi” 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 21-25 Haziran 2010. Özet Kitabı s. 50-51. Denizli

BETEŞ, D., ÇOLAK, R., **OLGUN KARACAN, G.**, KANDEMİR, İ., KANKILIÇ, T., ÇOLAK, E. 2012. “Kuzey Anadolu’da Yayılış Gösteren *Myodes glareolus* (Mammalia: Rodentia)’un RAPD-PCR Analizi” 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 3-7 Eylül 2012. Özet Kitabı PI 013, s. 1438. İzmir.

OLGUN KARACAN, G., ÇOLAK, R., ÇOLAK, E. 2012. “Türkiye’de Yayılış Gösteren *Apodemus mystacinus* (Mammalia: Rodentia) Populasyonlarının mtDNA PCR-RFLP Analizi” 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 3-7 Eylül 2012. Özet Kitabı SI 012, s. 327-328. İzmir.