

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkiye'deki *Rousettus aegyptiacus*'un Sitokrom
b Geninin Tespiti

Esra TOPAKTAŞ

OCAK 2014

Biyoloji Anabilim Dalında Esra TOPAKTAŞ tarafından hazırlanan “Türkiye’deki *Rousettusaegyptiacus*’un Sitokrom *b* geninin Tespiti” adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Yusuf MENEMEN

Üye(Danışman) : Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Üye : Doç. Dr. Hikmet Ün

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ *Rousettus aegyptiacus*'un SİTOKROM *b*

GENİNİN TESPİTİ

TOPAKTAŞ, Esra

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

OCAK 2014, 43 sayfa

Bu araştırma Türkiye'deki meyve yarasası *Rousettus aegyptiacus*'un yayılış gösterdiği Akdeniz Bölgesinden alınan 4 populasyondaki bireylerin sitokrom *b* geninin tespitine dayanmaktadır. Meyve yarasasının doğal habitatları incelenmiş ve bazı biyoekolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Yarasanın kulak dokusundan biopsi aparatı ile alınan 3 mm çapındaki parçadan DNA izolasyonu yapılmıştır. Böylece mitokondriyal sitokrom *b* geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve sekans ile çoğaltılarak, 350 baz çifti uzunluğunda dizin elde edilmiştir. Dört lokalite dikkate alındığında Harbiye ve Mersin lokalizasyonlarında değerlendirmeye alınan yarasaların analiz sonuçları birbirine benzerken Kilis ve Adana lokalizasyonundaki değerlendirmeye alınan yarasaların sonucu farklı bulunmuştur. Bu örneklerle ait sonuçlar diğer yarasa türleri ile % 72-99 arasında uyumlu bulunmuştur. Sonuçlar Gen Bankası verileriyle karşılaştırıldığında Harbiye, Mersin ve Kilis örneklerimizin sitokrom *b* geni dizinin *Rousettus aegyptiacus* kayıtlarıyla uyumlu gözükmezken Adana örneğimize ait sitokrom *b* geni dizini *Rousettus aegyptiacus* kayıtlarıyla % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meyve yarasası, Akdeniz Bölgesi, *Rousettus aegyptiacus*,

Sitokrom *b* geni, Türkiye

ABSTRACT

DETERMINING The CYTOCHROME *b* GENE of *Rousettus aegyptiacus* in TURKEY

TOPAKTAŞ, Esra

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

JUNUARY 2014, 43 pages

This study is based on the detection of cytochrome *b* gene of individuals from four populations of fruit bat, *Rousettus aegyptiacus* distributed in the Mediterranean Region. Natural habitat of fruit bat were investigated and some biological evaluation were carried out. DNA isolation was carried out in a piece of ear tissue which has 3 mm diameter of bat using by biopsy apparatus. Mitokondriyal sitokrom *b* gene was accrued with Polimeraz chain reaction and sekans, thus it was ensured index which lenght 350 pairs baz. When it was considered four locations, analysis results belong to bats in Harbiye and Mersin were similar, but analysis results belong to bats in Kilis and Adana were different. It was found that these results were consistent with other bat species by 72%-99%. When the reasons was compared with data of Gene Bank, sitokrom *b* gene index of samples in Harbiye, Mersin and Kilis wasn't consistent to data of *Rousettus aegyptiacus*, sitokrom *b* gene index of sample in Adana was similar to data *Rousettus aegyptiacus* by 99%.

Key Words: Fruit bat, Mediterranean Region, *Rousettus aegyptiacus*, Sitokrom *b* gene, Turkey

TEŞEKKÜR

Tezle ilgili alıŐmalarımnda her eŐit destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK'a teşekkür ederim. Tezle ilgili laboratuvar çalışmalarına imkân sunan Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı alıŐanları Veteriner Hekimler Dr. Orhan AYLAN, Doç. Dr. Hikmet ÜN, Dr. Nil ÜNAL ve Biyolog Selim TUNCER'e teşekkür ederim. Ayrıca Yüksek Lisans süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	3
1.1.1.Araştırma Bölgesinin İklim Özellikleri	6
1.1.2. Türün Genel Karakterleri	6
1.1.3.Moleküler Teknikler	10
1.1.3.1. Nükleik Asit Prob–Hibridizasyon (Nükleik Asit Melezlemesi) Yöntemi	10
1.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
1.1.3.3. PCR Reaksiyonunun Elementleri	14
1.1.4. Nükleik Asitlerin Elektroforezi	15
2.MATERYAL VE YÖNTEM	17
2.1.Kimyasal Maddeler ve Reagentler	19
2.2.Ekipmanlar	20
2.3.Örnekler	21
2.4. Nükleik Asit Eldesi	21

2.5. PCR Primerleri.....	22
2.6. Reverse Transcription Polymerase ChainReaction.....	22
2.7. Agoroz Jel Elektroforezi.....	24
2.8.Dizin Analizi.....	24
2.9.Genomik Dizin Analizi.....	25
2.10.Sonuçların Değerlendirilmesi.....	26
2.11.Saklama Koşulları.....	26
3. BULGULAR	27
3.1.Tür	27
3.2.Ayırıcı Özellikler.....	27
3.2.1. İncelenen Örneklerin Kayıt Yerleri.....	27
3.3. PCR Çalışmaları Sonuçlarının Yorumlanması.....	28
3.4.Genetik Analizler.....	30
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Yarasaların dünya üzerindeki yayılış alanları.....	4
1.2. <i>Rousetts aegyptiacus</i> 'un coğrafi yayılışı.....	5
1.3. Dış ve iç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği <i>Rousettus aegyptiacus</i> 'a ait bir baş iskeleti.....	8
1.4. (Devamı) Dış ve iç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği <i>Rousettus aegyptiacus</i> 'a ait baş iskeleti.....	9
1.5. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları.....	12
1.6. Agoroz jel elektroforezi.....	16
2.1. <i>Rousettus aegyptiacus</i> 'un Adana popülasyonuna ait bir bireyi.....	18
2.2. Çalışmanın yapıldığı Laminar Flow Kabin.....	19
2.3.Çalışmada kullanılan homojenizatör ve mikrosantrifüj	20
2.4. RNA eldeleri için kullanılan magNaPure Compact cihazı.....	21
3.1. <i>Rousettus aegyptiacus</i> 'un kayıt yerleri.....	28
3.2. Agoroz jelde Primer L ve Primer H setleriyle yürütülmüş reaksiyon görüntüsü	29
3.3. (devamı) Agoroz jelde Primer L ve Primer H setleriyle yürütülmüş reaksiyon Görüntüsü.....	30
3.4. <i>R.aegyptiacus</i> Cytochrom <i>b</i> geni dizinleri karşılaştırılması.....	32
3.5. Sitokrom <i>b</i> genine ait 350 bç'dekinükleotit değişiminin gösterimi.....	33
3.6. ABI PRISM 310 GeneticAnalyser ile elde edilen dizin analizine ait örnek.....	33
4.2. Doğal yaşam alanları tahrip edilmiş bir meyve yarasası popülasyonunun yerleşim biriminde sığınak olarak kullandığı bir bina.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.Çalışmada kullanılan örneklere ait etiket bilgileri.....	17
2.2. Analizlerde kullanılan primerler ve DNA dizileri.....	22
2.3. PCR’da kullanılan reagent ve kullanım miktarları.....	23
2.4. PCR basamaklarının sıcaklık, zaman ve döngü değerleri.....	23
2.5. DNA Dizin Analizi PCR basamaklarının sıcaklık, zaman ve döngü değerleri.	25
3.1. <i>R. aegyptiacus</i> Cytochrom <i>b</i> geni dizileri.....	31
4.1. <i>R.aegyptiacus</i> ’un genBank verileriyle karşılaştırılması.....	34

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bç	Baz çifti
M	Molar (Azı dişler)
μ	Mikro
dNTP	Deoksinükleotittri fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
KCL	Potasyum klorit
UV	Ultraviyole
°C	Santigrad derece
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
♀	Dişi
♂	Erkek
F	Forward
R	Reverse
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Mm	Milimolar
Ng	Nanogram

1.GİRİŞ

Memeliler sınıfı 29 ordo, 153 familya, 1229 cins ve 5416 tür ile temsil edilmektedir (Wilson ve Reader, 2005). Eli kanatlı anlamına gelen Chiroptera gerçek uçuş yapan memeli ordolarından biridir. Bu takım Megachiroptera (Büyük yarasalar) ve Microchiroptera (Küçük yarasalar) olmak üzere iki büyük alttakıma ayrılmaktadır. Bu alttakımlardan Megachiroptera alttakımı 1 familya (Pteropodidae), 42 cins ve 175 türe sahiptir. Microchiroptera alt takımı ise 17 familya, 160 cins ve 930 tür içermektedir.

Yarasaların uçuş özelliği kazandığı en eski fosil günümüzden 35 milyon yıl öncesine rastlayan Eosen alt devridir. Yarasaların %70'i böcek (insektivör), %23'ü meyve (frugivor), kalanı ise bazı omurgalı (carnivor), omurgasız hayvanlar, balıklar (psivor), nektar, bal özü ve kanla (sangivor) beslenmektedir (Allen, 1939; Yalden ve Morris, 1975; Nowak ve Paradiso, 1993).

Meyve yarasaları, olgunluk dönemleri geçmiş ve çürüme başlangıcındaki meyvelerin suyunu ağızda sıkıp emerek beslenirler. Böylece mikroorganizma bulaşmış meyveler adeta seçilerek yenir. Dünya üzerindeki 30 bitki türünün yayılışı sadece meyve yarasalarının yedikleri meyvelerin çekirdeklerinin uçuş anında toprağa bırakılması ile olmaktadır. Böcek ile beslenen yarasaların alaca karanlığından sabahın ilk saatlerine kadar başta sıtma amili sivrisinekler olmak üzere birçok böceği avlayarak beslenir.

Megachiroptera'nın tek bir familyası olan Pteropodidae 42 cinsle temsil edilmektedir. Bunlardan biri Etiyopik orjinli *Rousettus*'dur. Türkiye'de 36 yaras türünden biri olan *Rousettus aegyptiacus* meyve yarasasıdır.

Memeli hayvanlar üzerine taksonomik, sistematik, ekolojik, karyolojik ve zoocoğrafik birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen moleküler düzeydeki çalışmalar ancak son zamanlarda hız kazanmıştır. Bunun yanında yaras genetiği üzerinde de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak Türkiye'de yarasalarla ilgili moleküler araştırmalar oldukça sınırlıdır (Dilek, 2010).

Memelilerde sitokrom *b* geninin evrimi üzerinde ABD'de yapılan bir çalışmada 1140 bç 20 farklı memeli hayvanda çalışılarak filogenetik analiz sonuçları ve aminoasitler üzerindeki varyasyonlar karşılaştırılmıştır (Irwin ve ark.,1991).

Meyve yarasaları filogenisi üzerine ABD’de yapılan moleküler bir çalışmada 6 Microchiroptera ve 43 Megachiroptera alttakımlarına ait türler karşılaştırılmış ve populasyonlar arası farklılıklar değerlendirilmiştir (Giannini ve Simmons, 2003).

Mısır’da *Rousettus aegyptiacusaegyptiacus* ve *Rhinopoma hardwickei arabium* alttürleri arasında moleküler filogenetik ilişkiler araştırılmıştır (Ramadan, 2011).

Batı Hint Okyanusu’nda Madagaskar’dan 17 *Rousettus madagascariensis* ve Comoros’dan 8 *Rousettus obliviosus* ile ilgili sitokrom *b* geni çalışılarak bu yarasaların filogeni ve biyocoğrafyaları karşılaştırılmıştır (Goodman vd., 2010). Meyve yarasaları üzerinde bazı virüslerle moleküler araştırmalar yapılmıştır (Rector vd., 2006; Omatsu vd., 2008; Feldman vd., 2009; Towner vd., 2009; Kuzmin vd., 2010; Jánoska vd., 2011; Field vd., 2011; Reyes vd., 2011; Baker vd., 2012; Sasaki vd., 2012; Olival vd., 2013; Sendow vd., 2013; Peel vd., 2013). Diğer yandan bu türle ilgili olarak kolokasyon, kas gibi konularında moleküler olarak araştırıldığı görülmektedir (Jones ve Teeling, 2006; Shen vd., 2013).

Türkiye’nin Akdeniz bölgesinde yaşayan *Rousettus aegyptiacus*’un taksonomik durumu, yayılışı, beslenme ve karyolojik verileri kaydedilmiştir (Albayrak vd., 2008).

Türkiye’nin değişik bölgelerinden alınan 3 tür mitokondriyal sitokrom *b* geni bakımından değerlendirilmiştir (Albayrak vd., 2011).

Albayrak vd., (2010) Türkiye’nin batı, orta ve kuzeydoğu bölgelerinden 8 yarasa türü ile ilgili genetik bazı çalışmalar yapmışlardır. Türkiye’de *Rousettus aegyptiacus*’un da dahil edildiği 8 yarasa türü üzerinde kuduz virüsü araştırması yapılmıştır (Ün vd., 2013).

Bu araştırmanın amacı Türkiye’de tek bir türle temsil edilen Mısır meyve yarasası *Rousettus aegyptiacus*’un sitokrom *b* genini tespit ederek türün sistematığıne katkı sağlamaktır.

1.1. Genel Bilgiler

M.Ö. 3. yüzyılda Aristo kalıtımın ruhsal veya psikolojik bir olay olmadığını, anne ve babadan fiziki yollarla aktarıldığını bildirmiş ve böylece kalıtımın doğasına işaret eden ilk kişi olmuştur (Karaçay, 2010). Aristo ile başlayan sistematikte esas olarak büyük ölçüde morfolojik karakter temeline dayanmaktadır. Ancak tür sınırlarının tanımlanmasında sadece morfolojik verilerin yeterli olmadığı değişik durumlar mevcuttur. Bu durumdaki sorunları ve sistematik problemleri çözmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sitogenetik çalışmalar, kimyasaliçerik çalışmaları ve farklı biyokimyasal belirteçlerin kullanıldığı izozim çalışmalarıdır. Sistematik problemlerin çözümündeki en son gelişmeler ise farklı DNA temelli belirteç sistemleriyle genotipin doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmesi üzerinde olmuştur. Bu DNA temelli farklı analizler, pek çok sorunun çözümünde umut verici görülmektedir. PCR bu analizlerin temelini oluşturmaktadır (Dilek, 2010).

Hayvan sistematiği amaçlı yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin filogenetik analizi farklı metotların kullanıldığı, değişik bilgisayar programlarıyla değerlendirilmektedir. Son yıllardaki çalışmalarda olduğu gibi sistematik veya farklı amaçlarla yapılan çalışmalarda birden fazla moleküler teknik kullanılması hayvanın tüm dizi analizinin mümkün olmadığı durumlarda daha anlamlıdır. Ayrıca çalışma, türlerin belirlenmesi amaçlı olduğunda bu karakterlerle morfolojik karakterlerin karşılaştırılmalı analizlerine gidilmesi daha değerli sonuçlar vermektedir. Değişik familyalara ait ve farklı özelliklere sahip birçok hayvan türünün genetik akrabalığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan birçok başarılı PCR çalışması vardır (Dilek 2010).

Belirteç sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, analık- babalık tayini, genetik varyasyonun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal (doğum öncesi) tanı, salgınlar ve ekolojide alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür çalışmalar direkt sistematik problemleri çözmeye yönelik olabileceği gibi bu sonuçlar bazen farklı alanlara da ışık tutabilmektedir. Örneğin; çalışmalar hayvan türlerinin genetik akrabalıklarının

belirlenmesi, popülasyonlararası ve populasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve buna benzer diğer durumları kapsamaktadır.

Genetik farklılıkları ortaya koymak için yapılan çalışmalar farklı coğrafik alanlarda yaşayan türlerin genetik özelliklerini aydınlatmaktadır. Yakın akraba türler içinde diploid kromozom numaraları farklı olabilmektedir. Bu nedenle karyotipik çalışmalar farklı türleri ortaya koymaktadır.

MtDNA nükleer genlere kıyasla yapısında daha fazla mutasyon barındırdığından populasyon içi ve populasyon arası genetik soyları ortaya koymak için kullanılan moleküler belirteçlerin en başında gelmektedir. Kullanılacak olan mtDNA bölgesi sitokrom *b* genidir. Bu bölge bir çok memeli türünde evrim çalışmalarında kullanılmıştır (Tougaard vd., 2008).

Hayvanlar alemi itibariyle memelilerin yarasaları esas alan sınıflandırması ve üzerinde araştırma yapılan türün sistematigi aşağıda verilmiştir.

Regnum (Alem): Animalia (Hayvanlar)

Phylum (Şube): Chordata (Kordalılar)

Classis (Sınıf): Mammalia (Memeliler)

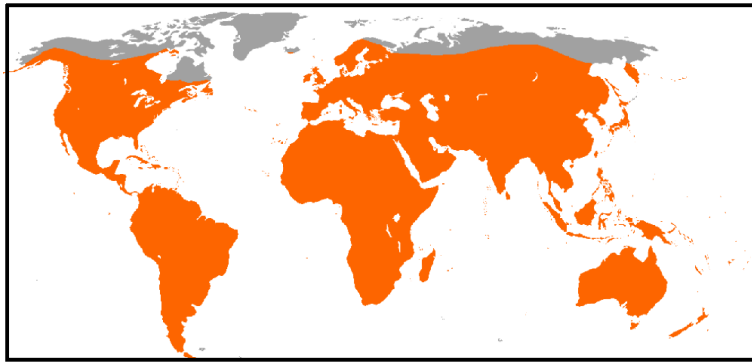
Ordo (Takım): Chiroptera (Yarasalar)

Familia (Aile): Pteropodidae

Genus (Cins): *Rousettus* Gray, 1821

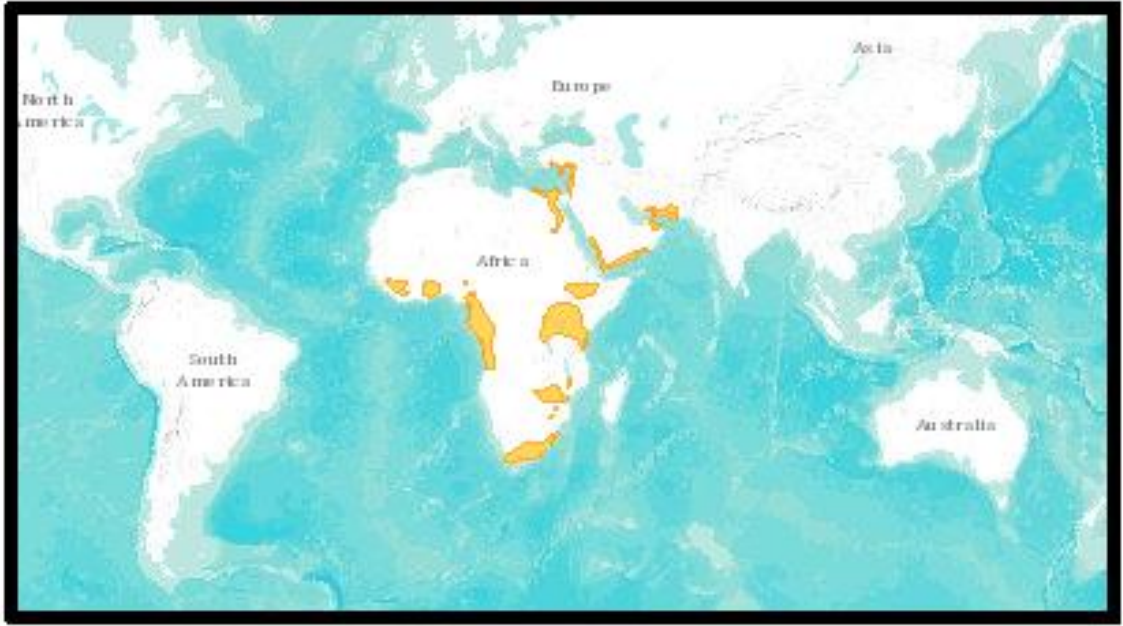
Species (Tür): *Rousettus aegyptiacus* (Geoffroy, 1810)

Yarasalar karasal ortamdaki hemen her çeşit ekosistemlerde varlıklarını sürdürmekte ve zoocoğrafik olarak geniş alanlarda yayılış göstermektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Yarasaların dünya üzerindeki yayılış alanları

Ellermann ve Morrison-Scot (1951)'e göre Palearktik bölgede *Rousettus* (Rousette meyve yarasası) cinsi 5 türle temsil edilmektedir. Bunlar, Kıbrıs, Filistin, Suriye, Mısır, Afrika'nın Etiyopya kısmı ve güneyde Angola'da yayılış gösteren *Rousettus aegyptiacus* (Geoffroy, 1810); Arabistan, Basra körfezindeki Kishim adası, Karaçi, Batı Hindistan'da yayılış gösteren *Rousettus arabicus* Anderson & de Winton, 1902; Kamboçya, Çin-Hindi, Sumatra, Java, Borneo ve Filipin adalarında yayılış gösteren *Rousettus amplexicaudatus* Geoffroy, 1810, Kumaon, Nepal, Rajputana, Burma, Hindistan, Çin-Hindi, Güney Çin ve Java'da yayılış gösteren *Rousettus leschenaultii* Desmarest, 1820 ve Seylan'da yayılış gösteren *Rousettus seminudus* Gray, 1870 türleridir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. *Rousettus aegyptiacus*'un coğrafi yayılışı

(<http://globalspecies.org/ntaxa/952344>)

1.1.1.Araştırma Bölgesinin İklim Özellikleri

Araştırmanın yapıldığı Akdeniz Bölgesi yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı geçen bir iklime sahiptir. En sıcak ay ortalaması 28-30 °C, en soğuk ay ortalaması 8-10 °C'dir. Ortalama yıllık sıcaklık 18 °C'dir. Kar yağışı ve don olayı çok nadir görülür. Türkiye'de Akdeniz iklimi esas karakterini Akdeniz Bölgesi'nde, Torosların denize bakan yamaçlarında 800-1000 metre yüksekliğe kadar olan alanlarda göstermektedir.

1.1.2.Türün Genel Karakterleri

Rousettus aegyptiacus büyük cüsseli olup önkolu 84-99 mm, kafatasının en büyük uzunluğu 41.4-45.5 mm'dir. Femurlar arası membranın içinden geçen kuyruk 5-6 mm kadardır. Kuyruk seyrek kıllı, burun kısmı siyahımsı ve çıplaktır. Kulaklar kısa ve uçları küt, kulağın dış kenar boyunca uçtan dibe kadar sıralanmış 10 adet kısa çizgi şeklinde enine katlanmalar vardır. Kulaklar siyahımsı kahverengi ve arka alt yarıları dışında çıplaktır. Kulak memesi belirgin fakat iyi gelişmemiştir(Akgöz, 2013). Ayaklar güçlü ilk ayak parmağının ardına bitişir ve gövdenin göğüs kısmından çıkar. Başparmak kuvvetli ve uzun, 2. parmak kanadın kenarından ucu çıkıntı yapan bir tırnağa sahiptir. Rostrum nispeten kısa, geniş ve zygomatik kavisler nispeten geniştir. Sagital çıkıntı kafatasında nispeten belirgindir. Üst iç kesiciler arasında küçük bir açıklık vardır. Köpek dişi kuvvetli, ilk üst premolar ve m² küçülmüştür. Alt kesiciler büyüklük bakımından eşit olup birbiri ve köpek dişleriyle temastadır. Alt kesici dişler aşınmadıkları zaman çatallıdır. Alt köpek dişi zayıf ve ikinci alt premolardan biraz yüksekcedir (Harrison ve Bates, 1991). Bu türün diş formülü: I²/2C¹/4 Pm³/3M³/3 = 34 (Miller, 1907). Kürk yumuşak, ince ve ipeğimsi yapıdadır. Erginlerde dorsal renk gri kahverengi, ventral renk ise erkekte boyun altı grimsi olmak üzere kirli deve tüyü renginde, dişide boyun altı sadece kirli deve tüyü renginde olup dorsal ve ventral erkekle aynı renk tonundadır(Albayrak vd., 2008).

Morfometrik veriler için bir örnekten dış ve iç karakter ölçüleri aşağıda belirtildiği gibi alınmaktadır (Albayrak, 2008) (Şekil 1.3.).

Ardayak uzunluğu: Hafifçe bükülerek milimetrik cetvel üzerine bastırılan sağ ayak bileğinde, topuğun en ard noktası ile en uzun parmağın tırnak ucu arasındaki mesafe

Kulak uzunluğu: Kulak kepçesinin sivrilmiş en uç noktası ile metaus'un en alt noktası arasındaki mesafe

Önkol uzunluğu: Katlanmış halde duran kanatta ulna'nın en arka noktası ile radius'un bilekte en ön noktası arasındaki mesafe

Kafatasının en büyük uzunluğu (1): Kafatasının en arka noktasında vpremaxilla'nın en ön noktasında median hatta dik duran iki yüzey arasındaki mesafe

Condylöbasal uzunluk (2): Occipital condylölerin en ard noktalarını birleştiren hat ile kesiciler arasındaki premaxilla kemiklerinin en ön noktalarını birleştiren hat arasındaki en kısa mesafe

Zygomatik genişlik (3): Zygomatik kavislerin birbirinden en uzak noktada kalan iki dış noktası arasındaki en kısa mesafe

İnterorbital genişlik (4): Orbit çıkıntılarının önünde orbit çukurunun birbirlerine en yakın noktaları arasındaki mesafe

Postorbital genişlik (5): Orbit çukurlarının arkasında orbit çukurunun birbirlerine en yakın iki noktası arasındaki mesafe

Mastoid genişlik (6): Mastoid çıkıntılarının dış noktalarını birleştiren en kısamesafe

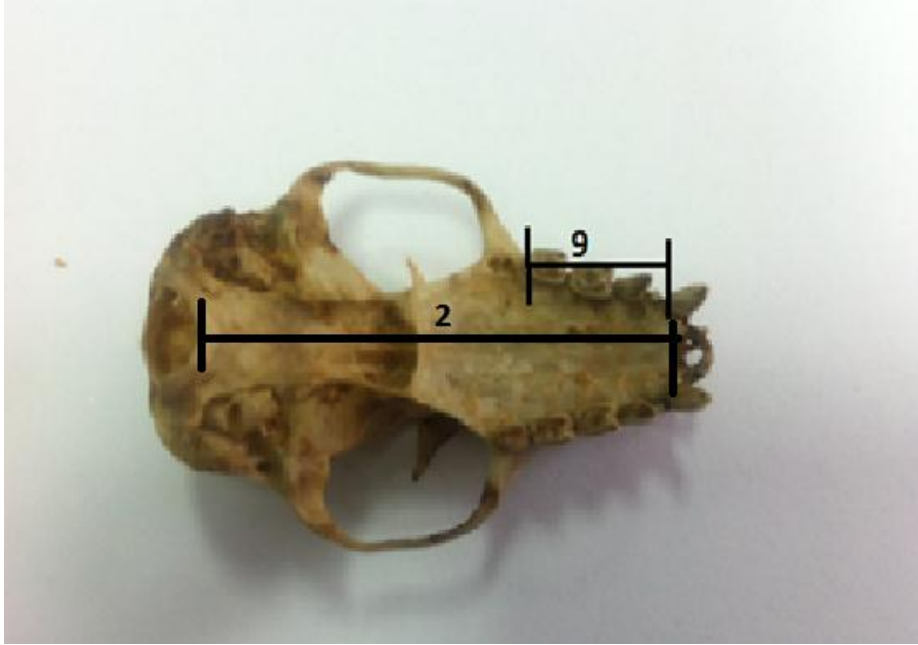
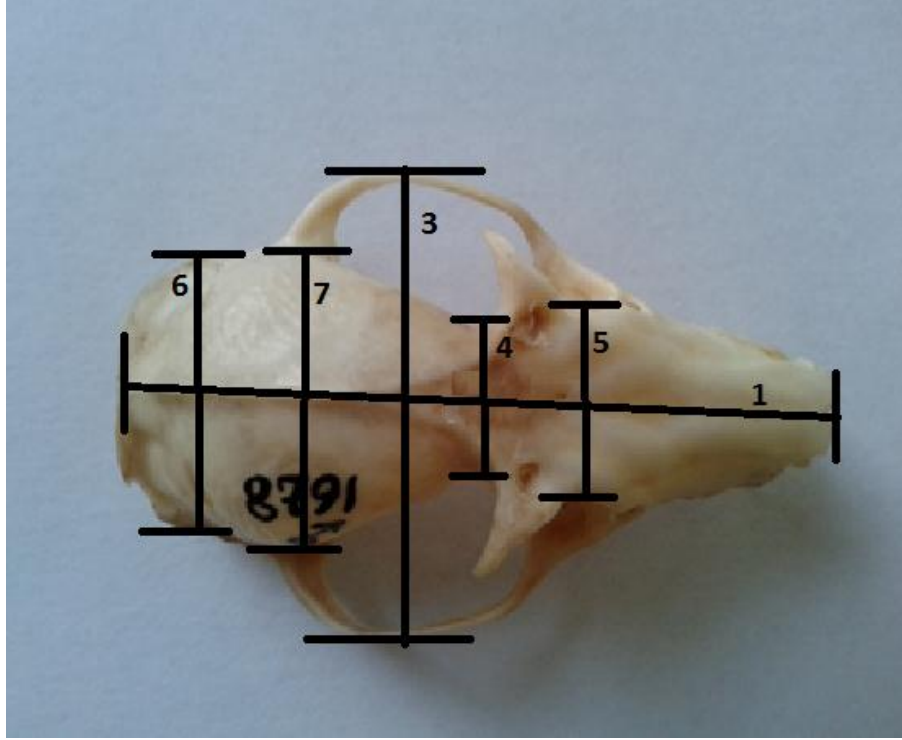
Beyin kapsülü genişliği (7): Orbit çukurlarının en arka noktası hizasında beyin kapsülünün bir yandan diğer yana olan en büyük genişliği

Kafatası yüksekliği (8): Bullae'ler ve en üst köpek dişinin ucuna temas eden bir yüzey ile beyin kapsülünün en üst noktasından geçen ve ilk yüzeye paralel yüzey arasındaki mesafe

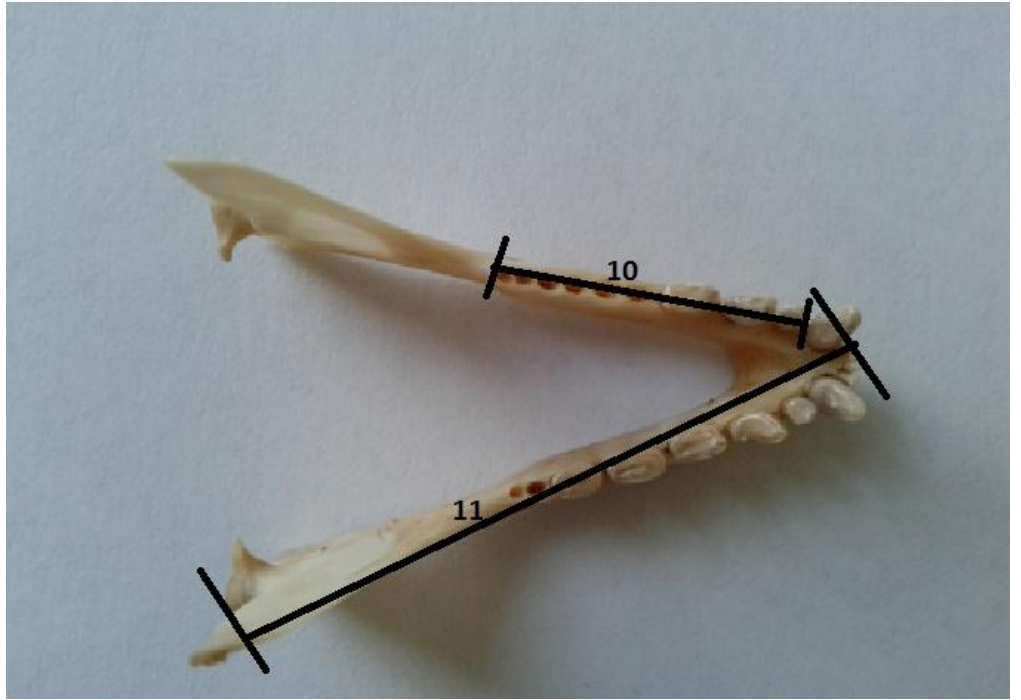
Üstçene diş dizisi uzunluğu (9): Sağ çene yarısında köpek dişinin en ön ve son molar tacının en arka noktası arasındaki en kısa mesafe

Altçene diş dizisi uzunluğu (10): Sağ çene yarısında köpek dişinin en ön ve son molar tacının en arka noktası arasındaki en kısa mesafe

Altçene uzunluğu (11): Sağ çene yarısında condyloid çıkıntısının en uç noktası ile öndeki kesici dişin en ileri noktası arasındaki en kısa mesafe



Şekil 1.3. Dış ve iç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği *Rousettus aegyptiacus*'a ait bir baş iskeleti



Şekil 1.4. (Devamı) Dış ve iç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği *Rousettus aegyptiacus*'a ait baş iskeleti

1.1.3.Moleküler Teknikler

Moleküler tanı yöntemlerinin temelini nükleik asit kimyası ve yapısal özelliklerinin tespitine yönelik çalışmalar oluşturmuştur. DNA ilk olarak 1870 yılında Friderich Miescher tarafından tanımlanmıştır. Phoebus Theodore Levene (1909) gen yapısında RNA/DNA ilişkisini göstermiş ve bu daha sonraki çalışmalara ışık tutmuştur. Kary B. Mullis (1986)'in *Thermus aquaticus*'dan izole edilen termostabil Taq DNA polimerazı, polimeraz zincir reaksiyonu ile başarı ile uygulaması, spesifik DNA dizilerinin in vitro şartlarda çoğaltılmasını mümkün hale getirmiştir (Durmaz, 2001) . Moleküler biyolojideki son teknolojik gelişmeler, özellikle *in vitro* şartlarda nükleik asit çoğaltılması ve tespitine imkân sağlayan yöntemler, genetik ve biyoteknoloji alanında önemli gelişmeler sağlamıştır. Böylece zararlılara, hastalıklara, herbisitlere ve çeşitli streslere dayanıklı ürün ve verim kalitesi artırılmıştır. Modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak, bir ya da birkaç genin aktarılması ile sadece genetik alanında değil tıptan mikrobiyolojiye, tarımda tohum saflığının belirlenmesinden taksonomi ve evolüsyon çalışmalarına kadar geniş bir alanda kullanım alanı bulan nükleik asit çoğaltma ve tespit yöntemleri genel anlamda iki farklı prensip üzerine oturtulmuştur (Arı, 2013). Bunlar; nükleik asit prob-hibridizasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleridir.

1.1.3.1.Nükleik Asit Prob–Hibridizasyon (Nükleik Asit Melezlemesi) Yöntemi

DNA molekülünün iki zincirinin birbirinin tamamlayıcısı olması nedeniyle DNA/DNA veya DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturması temeline dayanan bu yöntem, istenilen DNA parçalarının genomdaki yerlerinin saptanmasına olanak verdiği gibi bu parçaların nükleotid dizilerinin araştırılmasında da kullanılır. Materyaldeki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve böylece materyale ait hücre DNA'larındaki spesifik genlerin işaretli problemlerle ortaya konması amaçlanmaktadır.

Nükleik asit amplifikasyon teknolojisi, nükleik asit teknolojisinin en kompleks ve duyarlı olanıdır. Hedef DNA'yı çoğaltmak için enzim kullanılır ve teorik olarak pratikte her zaman mümkün olmamakla birlikte bir kopya DNA'yı

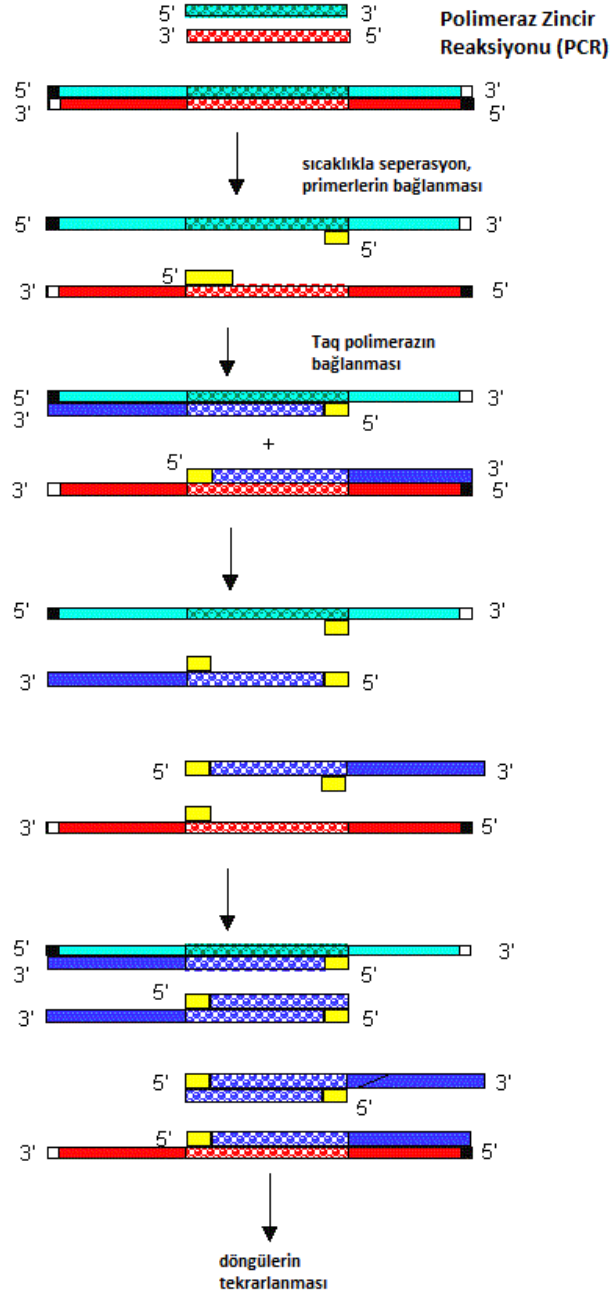
tanımlayabilir. Nükleik asit amplifikasyon testlerinin çoğunda, ortaya çıkan ampliconu tespit için nükleik asit probları ve agaroz jelde ampliconların boyanarak gösterilmesi yoluna gidilmektedir.

Nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin, prob hibridizasyon testlerine göre, en önemli avantajı daha analitik olmalarıdır. Her türlü materyalin örnek olarak değerlendirilebildiği, hedef genlerin veya nükleik asitlerin in vitro şartlarda çoğaltılabilmesi ve tanımlanmasına imkan sağlayan bu yöntemler, normal gen yapısının analizinin yanı sıra genlerdeki inversiyon, delesyon veya nokta mutasyonların gösterilebilmesine de yardımcı olmaktadır.

1.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İn vitro koşullarda DNA çoğaltılmasının çeşitli nedenleri arasında başlıcaları; özgün bir DNA parçasının bol olarak elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde etmek amacıyla gen aktarımı için kullanılmasıdır. PCR yöntemleri genetik modifiyen ürünlerin rutin olarak saptanmasında, genellikle, en güvenilir hassas yöntem olarak kabul edilmektedir (Holts-Jensen vd.,2003, Yuan vd., 2006). PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezine dayanan in vitro bir yöntemdir. PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. PCR analizi; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim ve adli vakalar gibi pek çok disiplinde uygulama olanağı bulmuştur.

PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir ve bu bilgiler, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezlenmesi için kullanılır. Bu primerler çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz (Taq polimerase), çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar (Şekil 1.5.) (White 1993).



Şekil 1.5. Polimeraz Zincir reaksiyonu basamakları

İn vivo şartlarda DNA replikasyonu esnasında enzimler ilk olarak DNA'nın çift zincirli hale geçişini sağlar. Daha sonra RNA polimeraz sentezlenir ve replikasyon başlangıç bölgesinde, tek zincirli hale dönüştürülmüş DNA zincirlerinden birisine komplementer RNA'nın oluşumu sağlanır. Bu DNA/RNA heterodubleksi DNA polimerazın bağlanması için bir başlatıcı bölge rolü oynar.

Böylece DNA'nın komplementeri sentezlenir. PCR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng kadar) içeren örnek, çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki hedef çift sarmal DNA'nın, tek sarmal DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon). Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşıtı, 20-30 baz çifti (bç) uzunluğundaki sentetik oligonükleotit diziler, RNA/DNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi tek sarmal DNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (annealing). Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her tek sarmal DNA zincirinin komplementeri oluşturulur (extension). Böylece iki adet çift sarmal DNA oluşur. Oluşan çift sarmal DNA'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir.

PCR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir yöntemdir. Bunlar;

1. Denatürasyon: Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96°C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır.

2. Bağlanma (Annealing): Örnek, birkaç dakika 30-60°C' de tutularak, primerin (spesifik sentetik oligonükleotitler) tek sarmal DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır.

3. Uzama (Extension): Polimeraz enzimi yardımı ile tek sarmal DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5' → 3' yönde uzatılmasıdır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), in vitro şartlarda DNA sentezinin önemli bir tekniğidir. DNA'nın özel bölgelerinin büyük miktarları, sekans ve uzunluk belirlenmesinde, toplam kısmın küçük bir miktarından sentez edilebilir. PCR, spesifik ilgi çekici DNA çoğaltılması için çabuk, hassas ve ucuz bir yöntemdir. Bu teknik moleküler biyolojiyi kökünden değiştirmekte ve tıp ve doğa bilimlerinin her bir alanında kullanılmaktadır.

PCR'in en önemli avantajı 25 baz çiftinden 10.000 baz çiftine kadar olan spesifik DNA dizilerini amplifiye edebilme özelliğine sahip olmasıdır. Primer spesifik hedef dizileri kullanmaktadır. Buna ilaveten PCR oldukça hızlıdır; bir DNA

parçası sadece üç saat içerisinde milyon defa kopyalanabilir. PCR'ın dezavantajları, yanlış negatif ve pozitif sonuç verme ihtimaline sahip olmasıdır.

1.1.3.3. PCR Reaksiyonunun Elementleri

PCR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, Isıya dayalı (termostabil) DNA polimeraz, primerler, dNTP substratı, MgCl₂ tamponu ve tuzdur.

1) Polimeraz; Genellikle ısıya dayanıklı DNA polimeraz olarak Taq polimeraz kullanılır. Sonuç olarak bu enzimin maksimum aktivitesi için çoğu standart PCR ürünleri optimize edilir. Bununla birlikte Taq polimeraz bazı uygulamalar için idealden daha düşük bazı özellikler göstermektedir. Bunlardan ilki, bu enzim 3'→5' endonükleaz aktivitesi eksikliğinden dolayı oldukça yüksek hatalı değerlendirilmektedir (Saiki vd., 1988). İkinci olarak bu enzim sekans için DNA'nın hazırlanmasına engel olabildiğinden uzun ürün kopyalanması yetersiz bulunmaktadır.

2) Kalıp DNA; PCR'ın önemli özelliklerinden biri de göreceli olarak saf olmayan DNA'nın oldukça küçük miktarlarıyla çalışılabilmesidir.

3) dNTP Substrat; PCR'da her bir dNTP konsantrasyonu 200 µM'yi aşmamalıdır. Substratın bu miktarı DNA'nın 12,5 µg sentezine yeterlidir.

4) Magnezyum Konsantrasyonu; Magnezyum iyonu bütün DNA polimerazlar için kofaktör olarak gerekmektedir. Bundan başka magnezyum iyon konsantrasyonu şunları etkileyebilmektedir;

a) Primer bağlanması

b) Hedef ve ürünler için ayrılma aşamasının sıcaklığı

c) Ürünlerin özgülüğü

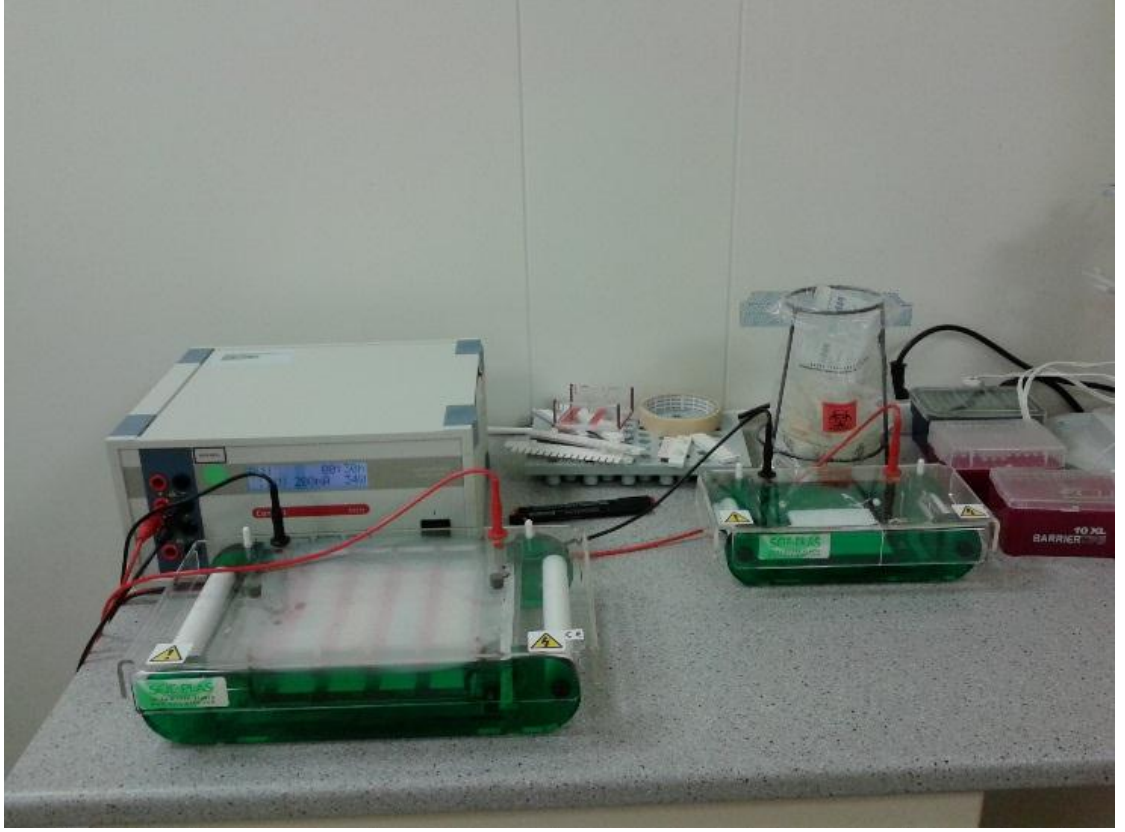
d) Enzim uygunluğu ve istenmeyen primer-dimer hatasının oluşumu. Çoğu kalıp DNA'da verimli ve tam bir amplifikasyon için magnezyum iyon konsantrasyonunun optimizasyonu gereklidir.

5) Tampon ve tuz; PCR için standart tampon 10-50 mM Tris-HCl'dir. Çoğu termofilik polimerazlar için optimum pH 8-9 arasındadır.

Çoğu reaksiyonda kullanılan tuz potasyum ya da sodyumdur. Doğru primer bağlanmasını kolaylaştırmak için genellikle K^+ (Na^+) eklenmektedir. Taq polimeraz için, konsantrasyon genellikle 50 mM kullanılmakta, 50 mM'den daha yüksek tek değerlikli iyon konsantrasyonu polimeraz aktivitesini durdurmaktadır (Innis vd., 1988).

1.1.4. Nükleik Asitlerin Elektroforezi

Nükleik asitlerin incelenmesinde en etkin tekniklerden olan elektroforez; farklı uzunluklardaki DNA ve RNA zincirlerine ait parçaları birbirinden ayırmaktadır. Genel olarak, elektroforez bir karışımdaki molekülleri, bir elektrik alanın etkisiyle hareket etmelerini sağlayarak ayırmaktadır. Numune, gözenekli bir maddenin (bir filtre kağıdı parçası ya da yarı katı jel) üzerine konup, elektrik geçiren bir çözeltinin içine yerleştirilir. Eğer iki molekül yaklaşık aynı kütle ve biçime sahipse, net yükü en fazla olan, zıt polaritedeki elektroda doğru daha hızlı hareket eder. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrıştırılması için kullanılan en etkili yöntem agaroz jel elektroforezidir. Agaroz D ve L galaktozun α - (1→3) ve β - (1→4) glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan linear polimerdir. Bu polimer elektroforez işleminde örneklerin yüklendiği ortam olarak görev yapıp, elektrikli alanın etkisiyle moleküllerin ayrılmasına olanak verir. Agaroz jel elektroforezi DNA analiz ve seperasyonunun genel ve kolay yolu olarak; jelde DNA'nın görülebilmesi, miktarının belirlenmesi ve özel bantların izole edilmesi amacını oluşturmaktadır. DNA moleküllerinin agaroz jelde göç hızını; DNA'nın moleküler büyüklüğü, kullanılan agaroz konsantrasyonu, DNA'nın konformasyonu, elektroforez tamponu ve jelde Etidium Bromide'in yapısı, uygulanan voltaj ve agarozun tipi etkilemektedir. Kullanılan Etidium Bromide boyası DNA'nın UV ışık altında görünür olmasını sağlamaktadır. Genellikle agaroz jel % 0,7-% 2 arasında yapılmakta ve 0,2-10 kilobaz arasında DNA fragmentini separe edebilmektedir (Şekil 1.6.) (Sambrook ve Russel 2001).



Şekil 1.6. Agaroz Jel Elektroforezi

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu araştırma meyve yarasası, *Rousettus aegyptiacus*'un sitokrom *b* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılması, agaroz jel elektroforez ile görüntülenmesi ve DNA Dizin Analizine dayanmaktadır. Bu araştırma ile ilgili olarak Temmuz 2012 ila Kasım 2013 tarihlerinde Hatay, Kilis, Kahramanmaraş, Adana, Mersin ve Antalya illerinde arazi çalışmaları yapılmıştır. Hatay'dan 1977, Mersin'den 2000, Kilis'ten 2006 ve Adana'dan 2003 yılına ait koleksiyon örnekleriyle 2013 yılında Adana'dan alınan örneğin kulak dokusu numuneleri kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Çalışmada 2012 yılında dört popülasyonu (Harbiye, Mersin, Kilis, Adana) temsil eden birer örnek kullanılmış ancak Adana örneğinden sonuç alınamamıştır. Bu sebeple 2013 yılında Adana'dan elde edilen taze doku örneği çalışılmış ve sonuçlar alınarak kaydedilmiştir (Şekil 2.1.). mtDNA'da sitokrom *b*'nin dizi analizi ve RFLP belirteci (PCR analizi) kullanılarak popülasyonlar arası varyasyon olup olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan örneklere ait etiket bilgileri

Alınan il	Örnek no	Tür Adı
Hatay	İ. ALBAYRAK (♀, 7773)	<i>Rousettus aegyptiacus</i>
Kilis	İ. ALBAYRAK (♀, 7829)	<i>Rousettus aegyptiacus</i>
Adana	İ. ALBAYRAK (♂, 1933)	<i>Rousettus aegyptiacus</i>
Mersin	İ. ALBAYRAK (♀, 2010)	<i>Rousettus aegyptiacus</i>
Adana	İ. ALBAYRAK (?, ?)	<i>Rousettus aegyptiacus</i>



Şekil 2.1. *Rousettus aegyptiacus*'un Adana popülasyonuna ait bir bireyi

Yayıliş alanındaki farklı lokal popülasyonlar arası ve popülasyonlar içi varyasyon olup olmadığına bakılmıştır. Elde edilen sonuçlarla değeriendirmeye gidilmiştir.

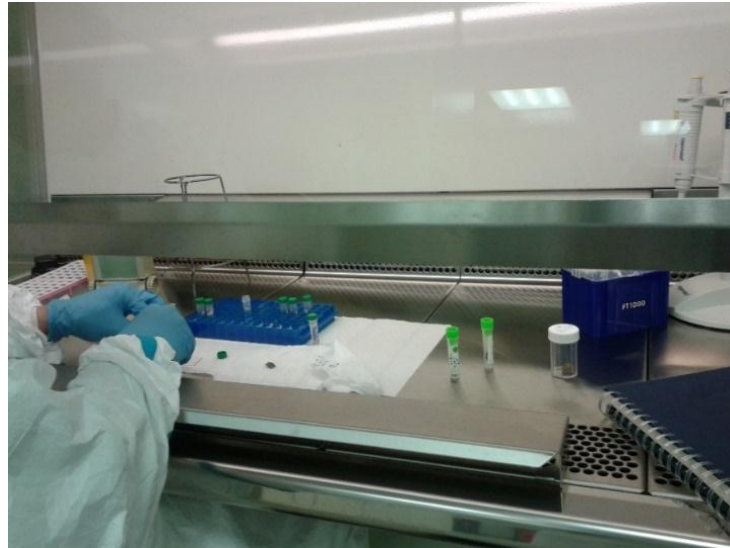
Çalışmada toplam 4 yarasadan alınan kulak doku örnekleri kullanılmış ve sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

- Arazi çalışması
- DNA izolasyonu
- DNA miktar ve saflık tayini
- Mt-cyt b bölgelerinin PCR ile çoğaltılması
- Çoğaltılan bölgelerin dizi analizi
- Agaroz jel elektroforezi ile örneklerin elektrik akımında yürütülmesi
- Oluşan bantların analizi

2.1. Kimyasal Maddeler ve Reagentler

Araştırmada kullanılan materyal aşağıda verilmiştir (şekil 2.2.).

- Steril Distile Su (DNase, RNase, Pyrogen yönünden temiz ultrapuregrade)
- Tris Borat EDTA (TBE) buffer, 10X (109 gTris Base MW=121,1; 55 g Borik asit MW=61,83; 9,3 g EDTA MW=292,25; Steril Distile Su ile 1 litreye tamamlanır)
- DNA yükleme tamponu, 5 X (%02 bromophenolblue, %02 xilenecyanole, %12,5 ficol) veya kullanıma hazır ticari ürün.
- DNA merdiveni
- Agarose (moleküler biyolojik grade, % 2)
- Ethidiumbromide (1/10.000 kullanılır)
- Polaroid 667 film
- Primerler
- PCR Kit :SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq, İnvitogen, ABD
- NucleicAcidIsolation Kit I - Large Volume kiti, Roche, Almanya



şekil 2.2. Çalışmanın yapıldığı Laminar Flow Kabin

2.2. Ekipmanlar

Araştırmada aşağıdaki ekipmanlar kullanılmıştır (Şekil 2.3.).

- Otomatik pipetler (10, 100, 200, 1000 µl)
- Otomatik pipet uçları (10, 100, 200, 1000 µl) (DNase, RNase, Pyrogen yönünden - temiz, filtreli)
- 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml eppendorf tüp (DNase, RNase, Pyrogen yönünden temiz)
- 15 ml ve 50 ml santrifüj tüpleri
- Tek Kullanımlık Pipetler (1, 5, 10 ml)
- Derin Dondurucu (-20°C ve -80°C)
- Buzdolabı
- Thermalcycler
- Mikrosantrifüj
- Elektroforez Sistemi
- UV transilluminatör
- Polaroid fotoğraf makinesi
- Vorteks
- Biyolojik Güvenlik Kabini
- Mikrodalga Fırın
- Hassas Terazi
- Eldiven, Maske, Laboratuar Giysisi



Şekil 2.3. Çalışmada kullanılan homojenizatör ve mikrosantrifüj

2.3. Örnekler

Elde edilen meyve yarasası örneklerinden alınan numuneler testte kullanılmaya kadar -80°C de muhafaza edildi.

2.4. Nükleik Asit eldesi

Total nükleik asit Roche firması tarafından üretilen Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume kiti ve MagNa Pure Compact cihazı kullanılarak elde edildi (Şekil 2.4). DNA konsantrasyonu NanoDrop 2000 (NanoDrop, ABD) spektrofotometre ile ölçülerek konsantrasyon nükleaz yönünden temiz su ile 100 picogram / μl oranına ayarlandı.



Şekil 2.4. RNA eldesi için kullanılan MagNa Pure Compact cihazı

2.5. PCR Primerleri

Bu araştırmada Cytochrom *b* geni DNA dizin amaçlı Irwin vd., (1991) tarafından kullanılan ve aşağıda tablo halinde gösterilen primer setlerinin sentezleri yapılmıştır (Çizelge 2.2.). Primerler saklama sulandırması olarak 100 picomol / µl oranında ve çalışma sulandırması olarak 20 picomol / µl oranında seyreltme (dilue edilerek) ile -20°C de saklanmıştır.

Çizelge 2.2. Analizlerde kullanılan primerler ve DNA dizileri (Irwin ve ark., 1991)

Primer	DNA Dizini
L14724 (I.set) B	5' – CGAGATCTGAAAAACCATCGTTG-3'
H15915 (I.set) R	5' –GGAATTCATCTCTCCGGTTTACAAGAC-3'
L14841 (II.set)	5' – AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA -3'
H15149 (II.set)	5' – AAAGTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA -3'

2.6. Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

Cytochrome *b* genine yönelik RT-PCR amplifikasyonu Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq kiti (Invitrogen) kullanılarak 25 µl hacimde gerçekleştirildi (Çizelge 2.3.). Kısaca, 2 µg total nükleik asit, 2X Reaction Miksi, primerler L ve H 15 pmol, ve Enzyme Miksinden oluşan reaksiyon miksine eklendi. (2). 1000baz çifti büyüklüğündeki amplifiye rnler QiaQuick® Gel Extraction Kit (Qiagen) ile saflaştırıldı.

Çizelge 2.3. PCR’da kullanılan reagent ve kullanım miktarları

Element	Kullanılan Miktar (μL)
2X Buffer	12.5
PrimerL14724, H15915(I.set)	8.25
PrimerL14841,H15149(II.set)	1
dH ₂ O	1
Taq DNA Polimeraz	0.25
DNA	2
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

Kullanılan primer, distile su, polimeraz enzimi, hedef DNA ve tampon çözeltilerden eppendorf tüpe karışım hazırlanıp ve PCR Thermalcycler (PTC100 MJ Research, ABD) cihazına konulmuştur. PCR basamaklarında, Martin vd., (2000) tarafından belirtilen sıcaklık, zaman ve döngü sayıları Thermalcycler ayarlanarak kaydedilmiş ve çalıştırılmıştır (Çizelge 2.4.). Amplifikasyon 94°C de 2 dak; daha sonra 40 siklus 94°C de 1 dak, 52°C de 1 dak, 72°C de 2 dak; ve sonra 72°C de 15 dak şeklinde gerçekleştirildi.

Çizelge 2.4. PCR basamaklarının sıcaklık, zaman ve döngü değerleri (Martin vd., 2000)

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	1 dakika	40
Bağlanma	52°C	1 dakika	40
Uzama	72°C	2 dakika	40
Son Uzama	72°C	15 dakika	1

2.7. Agaroz Jel Elektrofrez

Çoğaltılan nükleik asitlerin gösterilmesinde kullanılan geleneksel metot agaroz veya poliakrilamid jel elektrofrezini takiben etidyum bromürle boyanan jeldeki bantların gözlenmesidir.

Thermocyclerden alınan tüpler, arzulanan büyüklükteki amplifikasyonun tespiti için %2 Agaroz içinde elektrofrez tabi tutulmuştur. Bu amaçla 0,5 gr agaroz tartılarak, erlenmayere konulmuştur ve 25 ml TBE buffer içinde karıştırılarak alev üzerinde veya mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Hazırlanan agaroz içerisine son sulandırma 1/10 000 olacak şekilde ethidiumbromide ilave edilmiştir. Agaroz sıcaklığı yaklaşık 40 °C'ye düşüncüye kadar oda ısısında bekletildikten sonra horizontal minigel elektrofrez tankı haznesine dökülerek yüzey üzerinde homojen dağılımı sağlanmıştır. 8 veya 12 gözlü tarak şablonlar agaroz içerisine konularak örneklerin konulacağı gözler açılmıştır. Agaroz katılaştıktan sonra örnekler açılan gözler içerisine yükleme tamponu (loadingbuffer) ile karıştırılarak konulmuştur. Her elektrofrez işlemi için 100 bç DNA merdiveni bir göze konulmuştur. 4 V/cm güçte elektrik akımı uygulanmıştır.

2.8. Dizin Analizi

PCR ile pozitif tespit edilen örneklerin DNA Dizin Analizi (DNA Sequencing) yapılmıştır. Dizin analizi BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), L14724, H15915 veya L14841,H15149primerler ve ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) kullanılarak yapıldı. PCR ürünleri agaroz jel üzerinde ticari kit DyeEx 2.0 Nucleospin nucleotide removal kit (Qiagen) kullanılarak saflaştırılmıştır. Dizin analizinde üretici firmaların kullanım uyarıları dikkate alındı ve analiz gerçekleştirildi.

Saflaştırılan PCR ürünlerin DNA dizin analizlerinin tespiti için ticari kit (BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, ABD) kullanılmıştır (bu işlemde üretici firmanın kullanım tavsiye ettiği kullanım prosedürü uygulanmıştır). Kullanıma hazır kit reagentinden 8 µl, her bir primerden 1 µl (3.2picomol), PCR ürününden 5 µl ve distile su 6 µl olmak üzere toplam 20 µl

hacminde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon PCR Thermalcycler (PTC100 MJ Research, ABD) cihazında üretici firmanın tavsiye ettiği döngü ve derecelerde gerçekleşmiştir (Çizelge 2.5.).Gerçekleşen reaksiyonlar ticari bir kit (DyeEx 2.0 Nucleospin, QiagenGmbH, Hilden, Germany) ile nükleotidlerinden uzaklaştırılarak saflaştırılmıştır.Saflaştırılan örnekler ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, Foster City, USA) otomatik DNA Analiz cihazı kullanılarak DNA dizinleri elde edilmiştir.

Çizelge 2.5. DNA Dizin Analizi PCR basamaklarının sıcaklık, zaman ve döngü değerleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1. aşama	94°C	1 dakika	25
2. aşama	50°C	1 dakika	
3. aşama	60°C	4 dakika	

2.9. Genomik Dizin Analizi

Dizinler CLC Main Workbench programı kullanılarak analiz edildi ve filogenetik ağaç hazırlandı. Filogenetik ağaç hazırlanmasında neighbour-joining yöntemi kullanıldı. Filogenetik gruplamanın güvenilirliği 100 tekrar ile bootstrapping kullanılmak sureti ile değerlendirildi.

Elde edilen dizinler (Sequences) BioEdit yazılımı (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) kullanılarak incelenmiş ve ClustalX1.83 yazılımı ile alignment işlemleri gerçekleştirilmiştir (Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F andHiggins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nuc Acids Res* 1997; 25: 4876-4882). Elde edilen dizinleri karşılaştırmak için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>ve http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=

megaBlast & PAGE_TYPE=BlastSearch& SHOW_DEFAULTS=on &
LINK_LOC=blasthome internet bağlantıları kullanılmıştır.

2.10. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar UV transillumunatör üzerinde değerlendirilerek fotoğrafları çekilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda beklenen pozitiflik için, L14724R ve L14841R primer çifti için yaklaşık 100 bç, H15915B ve H15149 primer çifti için yaklaşık 1000 bç bölgelerinde spesifik bantlar görülmüş ve polaroid fotoğrafı çekilerek kayıt altına alınmıştır.

2.11. Saklama Koşulları

Kimyasal maddeler ve reagentler üretici firmaların tavsiye ettiği kullanma talimatlarına göre muhafaza edilir. Hazırlanan mixler muhafaza edilmelidir. PCR ürünleri -20⁰C de derin dondurucularda muhafaza edilmelidir.

3.BULGULAR

3.1. Tür: *Rousettus aegyptiacus* (Geoffroy, 1810) Akdeniz Meyve Yarasası

1810. *Pteropus egyptiacus* Geoffroy, Ann. Mus. Hist. Nat., Paris, 15:96. Baskı hatalı; Description de l’Egypte Hist. Nat., 2:134’ de *aegyptiacus* olarak düzeltilmiştir.

Tip yeri: Büyük piramit, Giza, Mısır

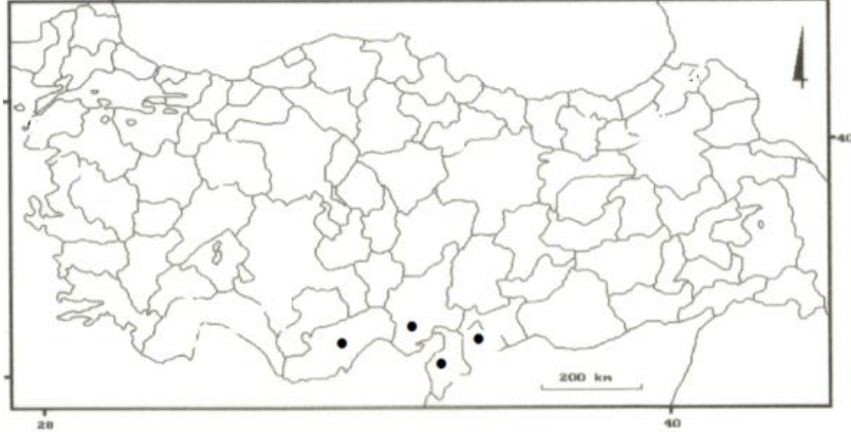
1902. *Rousettus aegyptiacus*, Anderson and de Winton, Zool. Egypt, Mam., London, 84.

3.2. Ayırıcı özellikler

Premaxilla iyi gelişmiş ve önde uçlar birbirine temas eder, occipital bölge dar, ön kol uzunluğu 87.0-93.6 mm; kafatasının en büyük uzunluğu 41.3-44.8 mm; condylobasal uzunluk 41.2-43.7 mm; zygomatik genişlik 26.0-28.7 mm; üst çene diş dizisi uzunluğu 16.1-17.1 mm; altçene diş dizisi uzunluğu 17.1-18.8 mm (Albayrak ve ark., 2008).

3.2.1. İncelenen örneklerin kayıt yeri

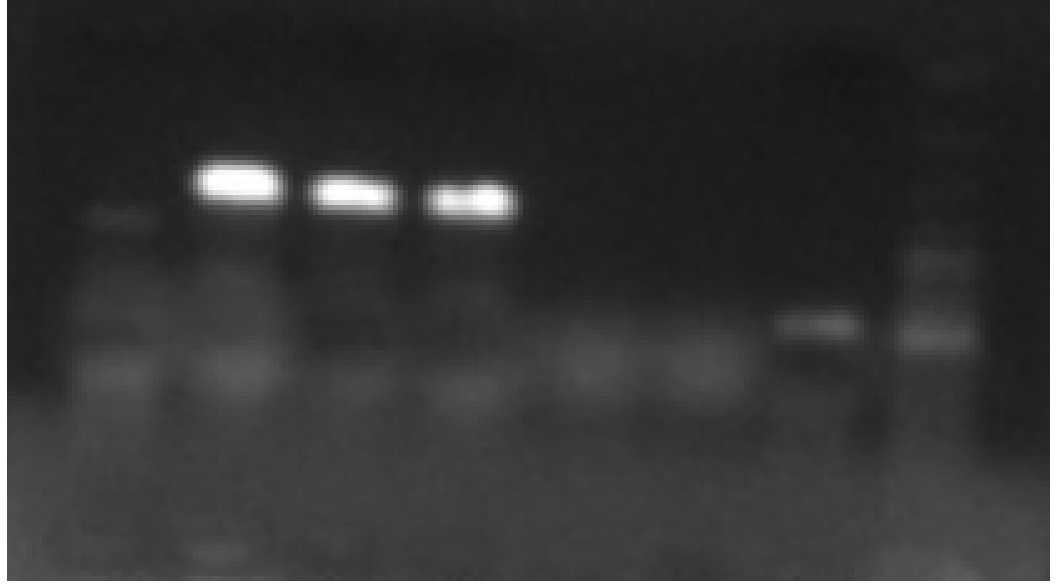
Hatay, Harbiye mağarası, 1 (♀, 02.05.1977), Kilis, 1 (♀, 11.07.2006), Adana 2 (♂, 14.03.2003; ? 13.11.2013), Mersin, 1 (♀, 22.04.2000) (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. *Rousettus aegyptiacus*'un kayıt yerleri

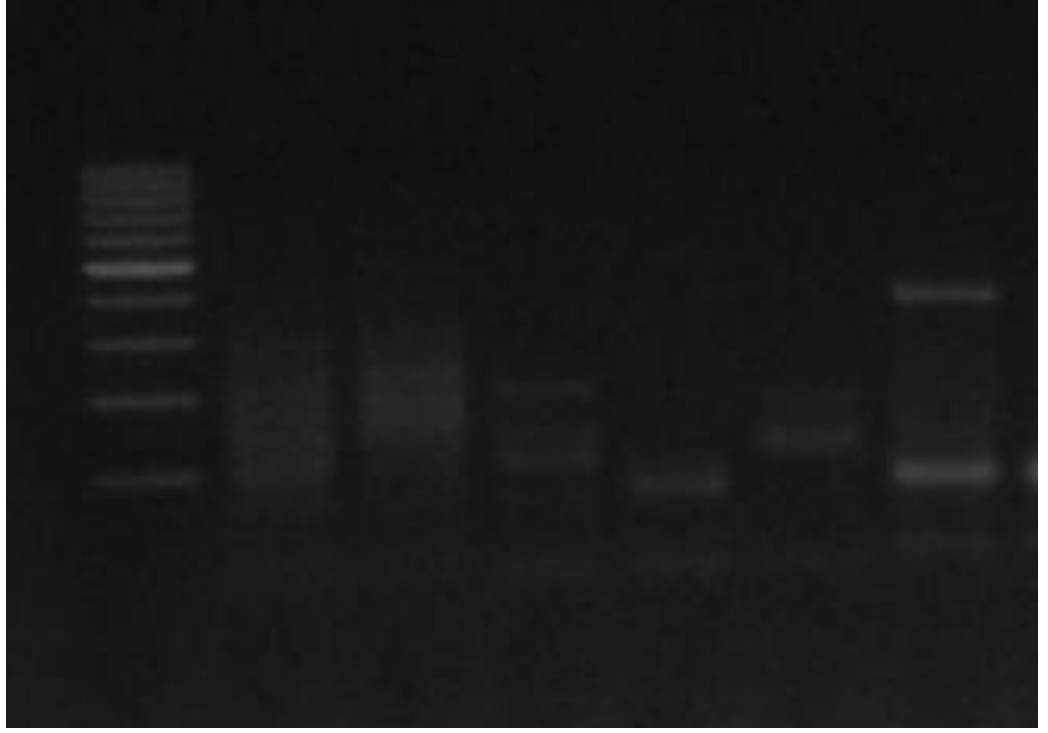
3.3. PCR Çalışmaları Sonuçlarının Yorumlanması

PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünler %2 agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuçlar UV transillumunatör üzerinde değerlendirilerek fotoğrafları çekilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda beklenen pozitiflik için, L14724 ve L14841 primer çifti için yaklaşık 100 bç, H15915ve H15149 primer çifti için yaklaşık 1000 bç bölgelerinde spesifik bantların şekillenmiş olduğu görülmüştür. Sonuçlar polaroid fotoğraf çekilerek kayıt altına alınmıştır (Şekil 3.2.). Elde edilen ürünler DNA Dizin Analizi testinde kullanılmıştır.



e4 e3 e2 e1 NK NK BTV MWM

Şekil 3.2. Agaroz jelde Primer L ve Primer H setleriyle yürütülmüş reaksiyon görüntüsü (e4: *R.aegyptiacus*(Adana), e3: *R.aegyptiacus* (Mersin), e2: *R.aegyptiacus* (Kilis),e1: *R.aegyptiacus* (Harbiye),NK: Negatif kontrol MWM: DNA merdiveni).



MWM NK NK NK NK NK e1

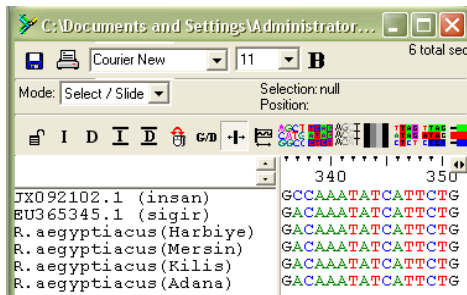
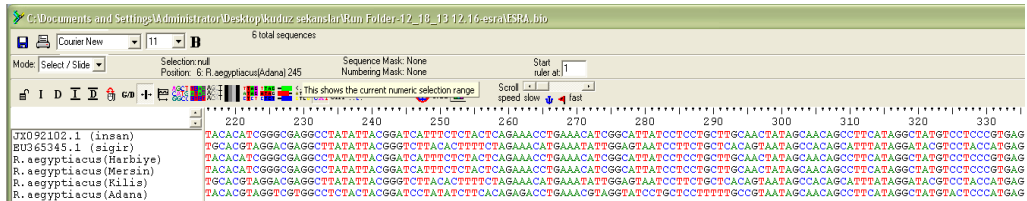
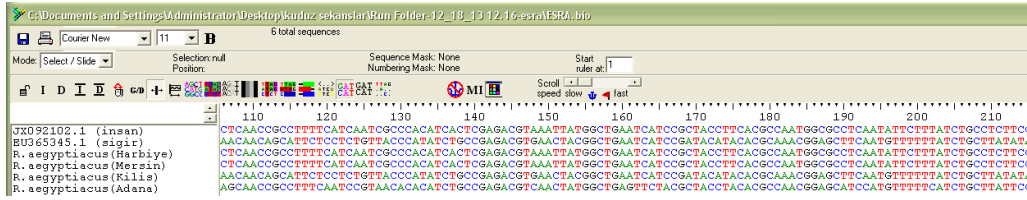
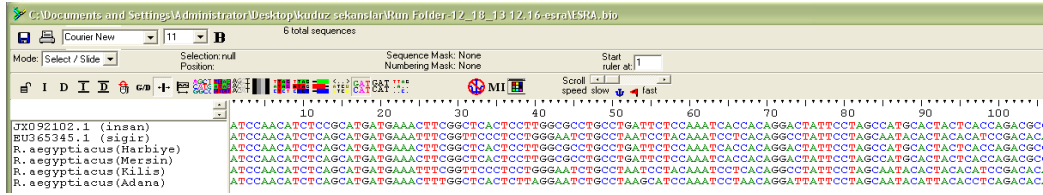
Şekil 3.3. (devamı) Agaroz jelde Primer L ve Primer H setleriyle yürütülmüş reaksiyon görüntüsü (MWM: DNA merdiveni, NK: Negatif kontrol, e1: *R.aegyptiacus* (Adana))

3.4. Genetik Analizler

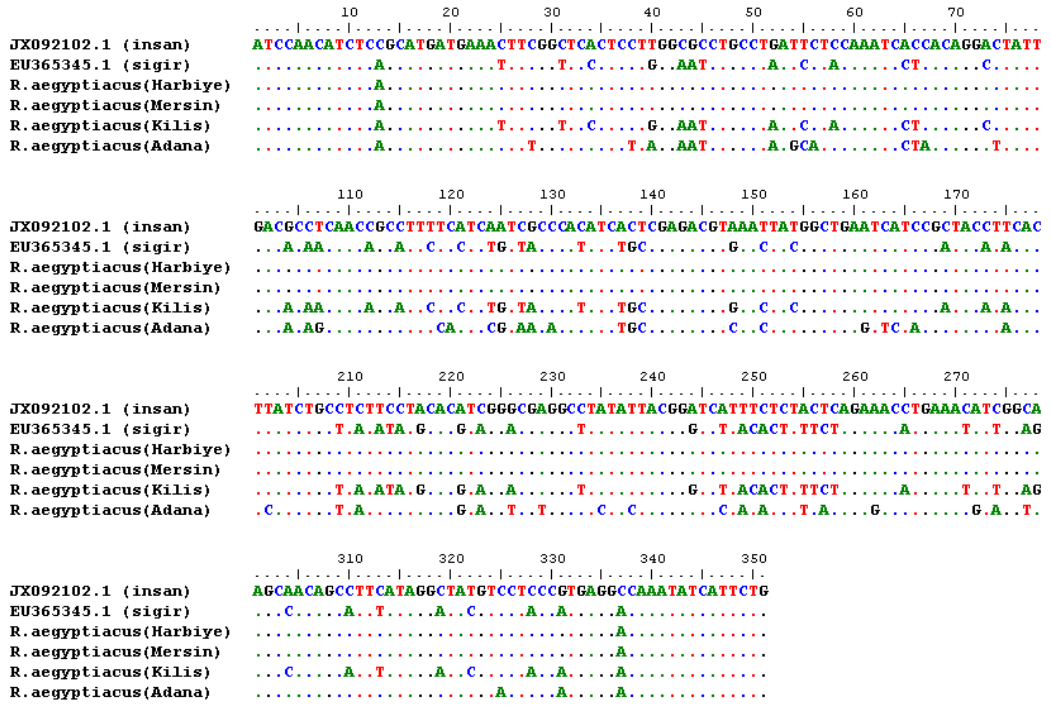
Çalışmada elde edilen yaklaşık 350 bp uzunluğundaki dizin elde edilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1.*R.aegyptiacus* Cytochrom *b* geni dizinleri

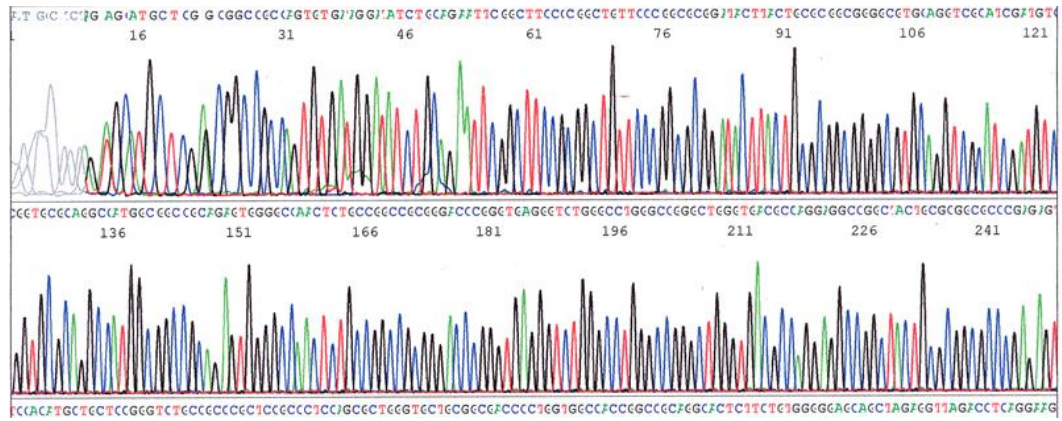
Tür	Dizin
<i>R.aegyptiacus</i> (Harbiye)	ATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTCGGCTCACTCCTTGGCGCCTGCCTGATTC TCCAAATCACCACAGGACTATTCTAG CCATGCACTACTCACCAGACGCCTCAACCGCCTTTTCATC AATCGCCCACATCACTCGAGACGTAAATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAC GCCAATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGC CTCTTCCTACACATCGGGCGAIGGCCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAA CCTGAAACATCGGCATTATCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGC TATGTCCTCCCGTGAGGACAAATATCATTCTG
<i>R.aegyptiacus</i> (Mersin)	ATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTCGGCTCACTCCTTGGCGCCTGCCTGATTC TCCAAATCACCACAGGACTATTCTAGCCATGCACTACTCACCAGACGCCTCAAC CGCCTTTTCATCAATCGCCCACATCACTCGAGACGTAAATTATGGCTGAATCATCC GCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCTACACATC GGGCGAGGCCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCA TTATCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCCTCCCGTGA GGACAAATATCATTCTG
<i>R.aegyptiacus</i> (Kilis)	ATCCAACATCTCAGCATGATGAAATTTTCGGTTCCCTCCTGGGAATCTGCCTAATCC TACAAATCCTCACAGGCCTATTCTAGCAATACTACACATCCGACACAACAAC AGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCC GATACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTTTATCTGCTTATATATGCACGTA GGACGAGGCTTATATTACGGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAG TAATCCTTCTGCTCACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGATACGTCCTACCATGA GGACAAATATCATTCTG
<i>R.aegyptiacus</i> (Adana)	ATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCACTCTTAGGAATCTGCCTAAGC ATCCAAATCCTAACAGGATTAT TCCTAGCAATACATTACACCTCAGACACAGCAACCGCCTTTCAATCCGTAACACA CATCTGCCGAGACGTCAACTATGGC TGAGTTCTACGCTACCTACACGCCAACGGAGCATCCATGTTTTTTCATCTGCTTATT CCTACACGTAGGTCGTGGCCTCTA CTACGGATCCTATATCTTCACAGAGACCTGAAACGTAGGTATCCTGCTCCTTTTTG CCGTAATAGCAACAGCCTTCATAG GCTATGTA CTCCCATGAGGACAAATATCATTCTG



Şekil 3.4. *R. aegyptiacus* Cytochrom *b* geni dizinleri karşılaştırması



Şekil 3.5. Sitokrom *b* genine ait 350 bç'deki nükleotit değişiminin gösterimi



Şekil 3.6. ABI PRISM 310 Genetic Analyser ile elde edilen dizin analizine ait bir örnek

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye'nin Akdeniz şeridinde yayılış gösterdiği bilinen *Rousettus aegyptiacus*'un dört farklı popülasyonundan alınan örneklerindördüne (Harbiye, Mersin, Kilis, Adana)ait sitokrom *b* geni dizini farklı oranlarda bazı yarasa türleri ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *R.aegyptiacus* 'un genBank verileriyle karşılaştırılması

Çalışılan tür	Örneğin alındığı il	Benzerlik oranı	Benzediği tür	Örneğe ait gen bankası numarası
<i>R.aegyptiacus</i>	Hatay	% 78	<i>Eumops patagonicus</i>	JQ731833.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Hatay	% 77	<i>Hipposiderus sp.</i>	EU434948.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Hatay	% 77	<i>Emballonura beccarii</i>	EF635546.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Mersin	%78	<i>Eumops patagonicus</i>	JQ31833.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Mersin	% 77	<i>Hipposiderus sp.</i>	EU434948.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Mersin	% 77	<i>Emballonura beccarii</i>	EF635537.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Mersin	% 72	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	EU084886.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Kilis	% 83	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	KC684545.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Kilis	% 83	<i>Platyrrhinus aurarius</i>	FJ154129.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Kilis	% 83	<i>Vampyroides caraccidi</i>	HQ637416.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Adana	% 99	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	KF498638.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Adana	% 99	<i>Rousettus leschenaultii</i>	KC702803.1
<i>R.aegyptiacus</i>	Adana	% 93	<i>Rousettus madagascariensis</i>	GU228639.1

Sitokrom *b* genini tespit etmek amacıyla bu çalışmada koleksiyondan alınan dörtvilayete ait örnekler için iki (I. ve II.) primer seti kullanılmıştır. Adana dışında kalan illere ait örneklerden I. Primer çiftinden daha iyi sonuç alınmasından dolayı elde edilen veriler gen bankası ile karşılaştırılmış Hatay iline ait örnek % 78 Megachiroptera mensubu aynı familyadan *Eumops patagonicus*, % 77 Microchiroptera mensubu Hipposideridae familyasından *Hipposiderus sp.* ve % 77 Emballonuridae familyasından *Emballonura beccarii* türleri ile; Mersin iline ait

örnek % 78 Megachiroptera mensubu aynı familyadan *Eumops patagonicus*, % 77 Microchiroptera mensubu Hipposideridae familyasından *Hipposiderus sp.*, % 77 Emballonuridae familyasından *Emballonura beccarii* % 72 Vespertilionidae familyasından *Pipistrellus pipistrellus* türleri ile; Kilis iline ait örnek Microchiroptera mensubu Vespertilionidae familyasından % 83 *Pipistrellus kuhlii*, % 83 Phyllostomidae familyasından *Platyrrhinus aurarius* ve % 83 Phyllostomidae familyasından *Vampyroides caraccidi* türleri ile benzerlik göstermiştir.

Adana örneği yenilenerek tekrar iki primer seti ile çalışılmış ve I. Primer seti daha iyi sonuç vermesinden dolayı değerlendirilmeye alınmış ve Adana iline ait örnek % 99 Megachiroptera mensubu aynı familyadan *Rousettus aegyptiacus*, % 99 *Rousettus leschenaultii* ve % 93 *Rousettus madagascariensis* türleri ile benzerlik göstermektedir.

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar sitokrom *b* geni açısından Irwin vd., (1991) tarafından elde edilen bulgularla uyumlu görünmektedir.

Mümkün olduğu kadar uzun baz çifti ile yapılan araştırma sonuçları sitokrom *b* geni ile elde edilecek sonuçları daha kesin olarak ortaya koymaktadır. Bu araştırma ile biyolojik çeşitliliğin Türkiye için en önemli elemanlarından biri olan Mısır meyve yarasasının korunması ve bu suretle sahip olduğu gen kaynağının varlığının sürdürülebilmesinin sağlanması gerekmektedir. Bunun birinci şartı yaşam ortamlarının tahrip edilmemesi ve iri vücutları ile her zaman göz önünde olan ve savunmasız kalan bu türün ulusal ve uluslararası mevzuatlar çerçevesinde korunmasının sağlanmasıdır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Doğal yaşam alanları tahrip edilmiş bir meyve yarasası populasyonunun yerleşim biriminde sığınak olarak kullandığı bir bina.

Moleküler seviyedeki bu araştırma sonuçları ile türün populasyonlarındaki farklılık düzeyleri daha iyi takip edilebilecektir. Böylece tür koruma eylem planları bu özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilecektir.

KAYNAKLAR

- Aellen, V., Contribution a l' etüde de la faune d'Afghanistan 9. Chiropteres, Rev. Suisse Zool. 66 : 353- 386, 1939.
- Akgöz, Ş., Türkiye'deki Meyve Yararası *Rousettus aegyptiacus* (Geoffroy, 1810) ve Yayılışı (Mammalia: Chiroptera). Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 1999.
- Anonim, 2013.(employees.csbsju.edu/.../dna/oldnalanguage.html)(Erişim tarihi: 10.10.2013).
- Albayrak, İ., Aşan, N., Yorulmaz, T., The Natural History of the Egyptian Fruit Bat, *Rousettus aegyptiacus*, in Turkey (Mammalia: Chiroptera). Turkish Journal Zoology. 32: 11-18, 2008.
- Albayrak, İ., Ün, H., Aşan, N., Ünal, N., Müller, T., Freuling, C., Aylan, O., Phylogenetic relationships of tree bat species from Turkey. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 22: 49-53, 2011.
- Arı, Ş., DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 101-120. Ed: by G.Temizkan ve N. Arda. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), Nobel Matbaacılık, 2013.
- Baker, K.S., Todd, S., Marsh, G., Fernandez-Loras, A., Suu-Ire, R., Wood, J.K.N., Wang, L.F., Murcia, P.R., Cunningham, A.A., Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. Journal of General Virology. 93: 850-856, 2012.
- Bartlett, S.N., McDoough, M.M., Ammerman, L.K. Molecular systematics of bonneted bats (Molssidae: Eumops) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. J. Mammal. 94 (4): 867-880, 2013.

- Colgan, D.J. Soheili, S., Evolutionary Lineages in Emballonura and Mosia Bats (Mammalia: Microchiroptera) from the Southwestern Pacific. Pac. Sci. 62 (2) : 219-232, 2008.
- Dilek, T., *Apodemus sylvaticus* (Linneaus, 1758)'un Sitokrom *b* ve β -Aktin Genlerinin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2010.
- Durmaz, R., Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapları Ltd. Şti., İstanbul, 2001.
- Fieldman, K.S., Foord, A., Heine, H.G., Smith, I.L., Boyd, V., Marsh, G.A., Wood, J.L.N., Cunningham, A.A., Wang, L.F., Design and Evolotion of consensus PCR assays for henipaviruses. 161 (1): 52-7, 2009.
- Field, H., Jong, C., Melville, D., Smith, C., Smith, I., Broos, A., Kung, Y., McLaughlin, A., Zeddeman, A., Hendra Virus Infection Dynamics in Australian Fruit Bats. 6: 1-6, 2011.
- Gerstein, A.S., Molecular Biology Problem Solver a Laboratory Guide. Wiley-Iiss, Canada, 2001.
- Giannini, N.P., Simmons, N.B., A Phylogeny of megachiropteran bats (Mammalia: Chiroptera: Pteropodidae) based on direct optimization analysis of one nuclear and four mitochondrial genes. Cladistics. 19: 496-511, 2003.
- Goodman, S.M., Chan, L.C., Nowak, M.D., Yoder, A.D., Phylogeny and biogeography of western Indian Ocean *Rousettus* (Chiropreta: Pteropodidae). Journal of Mammalogy. 91(3): 593-606, 2010.
- Harrison, D.L., Bates, P.J.J., The Mammals of Arabia. Harrison Zoological Museum Publication, England, 1991.
- Henderson, D.S., Methods in Molecular Biology DNA Repair Protocols Mammalian Systems. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.

- Holts-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A., Berdal, K.G., PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanalytical Chemistry*. 375: 985- 993, 2003.
- Hulva, P., Benda, P., Hanak, V., Evin, A., Horacek, I., New mitochondrial lineages within the *Pipistrellus pipistrellus* complex from Mediterranean Europe. *Folia Zool. Brno*. 56 (4) : 378- 388, 2007.
- Ibanez , C., Garcia-Mударra, J.L. Ruedi, M., Stadelmann, B., Juste, J., The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta. Chiropt*. 8 (2) : 277- 297, 2006.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press, 1988.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., Evolution of the Cytochrome *b* Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*. 32: 128-144, 1991.
- Jánoska, M., Vidovszky, M., Molnár, V., Liptovszky, M., Harrach, B., Benkò, M., Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *The Veterinary Journal*. 189: 118-121, 2011.
- Jones, G., Teeling, E.C., The evolution of echolocation in bats. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 149-156, 2006.
- Karaçay, B., Yaşamın Sırrı DNA. TÜBİTAK Sistem Ofset Basım Yayın Sanayi Ticaret Ltd. Şti., Ankara, 2010.
- Kuzmin, I.V., Niezgod, M., Franka, R., Agwanda, B., Markotter, W., Breiman, R.F., Shieh, W., Zaki, S.R., Rupprecht, C.E., Marburg Virus in Fruit Bat. *EID Journal*. 16 (2): 352- 354, 2010.

- Martin, Y., Gerlach, G., Schlötterer, C., Meyer, A.,. Molecular phylogeny of European Muroid Rodents based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Pylogenetics and Evolution*. 16 (1): 37-47, 2000.
- Memish, Z.A., Mishra, N., Olival, K.J., Fagbo, S.F., Kapoor, V., Eptstein, J.H., Alhakeem, R., Durosinsloun, A., Al Asmari, M., Islam, A., Kapor, A., Briese, T., Daszak, P., Al Rabeeah, A.A.,Lipkin, W.I., Middle East respiratory syndrome caronavirus in bats, saudi arabia. *Emerging Infect. Dis.* 19 (11) : 1819- 1823, 2013.
- Miller,G.S., *The Families and Gener of Bats*. Washington Government Printing Office, 1907.
- Nowak, R.M., Paradiso, J.L., *Walker's Mammals of the World*. Volume I. 4th edition. The Johns Hopkins University Press, London, 1983.
- Olival, K.J., Islam, A., Yu, M., Antony, S.J., Epstein, J.H., Khan, S.U., Crameri, G., Wang, L., Lipkin, W.I., Luby, S.P., Daszak, P., Ebola Virus Antibodies in Fruit Bats, Bangladesh. *EID Journal*. 19: 270-273, 2013.
- Omatsu, T., Bak, E., Ishii, Y., Kyuwa, S., Tohya, Y., Akashi, H., Yoshikawa, Y., *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 124: 169-176, 2008.
- Peel, A.J., Sargan, D.R. Baker, K.S., Hayman, D.T.S., Barr, J.A., Crameri, G., Suu-ire, R., Broder, C.C., Lembo, T., Wang, L., Fooks, A.R., Rossiter, S.J., Wood, J.L.N., Cunningham, A.A., Continent-wide panmixia of an African fruit bat facilitates transmission of potentially zoonotic viruses. *Nature Communications* 4. doi: 10.1038/ncomms3770, 2013.
- Ramadan, A.M.A., *Molecular Phylogenetic Relationship Between and Within the Fruit Bat (*Rousettus aegyptiacus*) and the Lesser Tailed Bat (*Rhinopoma hardwickei*) Deduced From RAPD-PCR Analysis*. *Journal of American Science*. 7 (10); 678-687, 2011.

- Rector, A., Mostmans, S., Van Doorslaer, K., McKnight, CA., Maes, RK., Wise, AG., Kiupel, M., Van Ranst, M., Genetic characterization of the first chiropteran papillomavirus, isolated from a basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit bat: The *Rousettus aegyptiacus* papillomavirus type 1. *Veterinary Microbiology*. 117 (2-4): 267-275, 2006.
- Reyes, A.W.B., Rovira, H.G., Masangkay, J.S., Ramirez, T.J., Yoshikawa, Y., Baticados, W.N., Polymerase Chain Reaction Assay and Conventional Isolation of *Salmonella* spp. From Phillippine Bats. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39 (1): 947, 2011.
- Sambrook, J., Russel, D.W., *Molecular Cloning a laboratory manual*. Agarose gel electrophoresis. Sambrook and Russell ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- Saiki, R.K., Gelfrand, D.H., Stollels, E., *et al* (1998). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. In: <http://sunsite.berkeley.edu/cgibinebind2html/PCR/009>.
- Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Sawa, H., Nakamura, I., Kimura, T., Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia. *Virology Journal*. 9: 37, 2012.
- Sendow, I., Ratnawati, A., Taylor, T., AbdulAdjit, R.M., Saepulloh, M., Barr, J., Wong, F., Daniels, P., Field, H., Nipah Virus in the Fruit Bat *Pteropuswampyrus* in Sumatera, Indonesia. 8: 1-6, 2013.
- Shen, B., Han, X., Jones, G., Rossiter, S.J., Zhang, S., Adaptive evolution of the myo6 gene in old world fruit bats (family: pteropodidae). *PloS One*. 8 (4) : e62307, 2013.

- Sun, K., Feng, J., Zhag, Z., Xu L., Liu Y., Cryptic diversity in Chinese rhinolophids and hipposideris (Chiroptera: Rhinolophidae and Hipposideridae). *Mammalia*. 73 : 135- 141, 2009.
- Surzycki, S., Basic techniques in molecular biology. PCR analysis. Springer Berlin Heidelberg, USA, 2000.
- Taugard, C., Renvoisè, E., Petitjean, A., Quèrè, J., New Insight into the Colonization Processes of Common Voles: Inferences from Molecular and Fossil Evidence. *PLoSone*, 3 (10) : 1-10, 2008.
- Towner, J.S., Amman, B.R., Sealy, T.K., Carroll, S.A.R., Comer, J.A., Kemp, A., Swanepoel, R., Paddock, C.D., Balinandi, S., Khristova, M.L., Formenty, P.B.H., Albarino, C.G., Miller, D.M., Reed, Z.D., Kayiwa, J.T., Mills, J.N., Cannon, D.L., Greer, P.W., Byaruhanga, E., Farnon, E.C., Atimmedi, P., Okware, S., Katongole-Mbidde, E., Downing, R., Tappero, J.W., Zaki, S.R., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., Rollin, P.E., Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLOSPATHOGENES*. 5: 1-9, 2009.
- Ün, H., Albayrak, İ., Tuncer, S., Ünal, N., Aylan, O., 2013. Yarasalarda Kuduz ve Kuduz Benzeri Viruslar. 66-68. Ed: İ. Albayrak. Türkiye Yarasaları Sempozyum I, DSİ 25. Bölge Müdürlüğü, Balıkesir 2013.
- Velazco, P.M, Patterson, B.D., Phylogenetics and biogeography of the broad-nosed bats, genus *Platyrrhinus* (Chiroptera : Phyllostomidae) . *Mol. Phylogenet.* 49 (3) : 749- 759, 2008.
- Velazco, P.M, Simmons, N.B., Systematics and Taxonomy of Great Striped-Faced Bats of the Genus *Wampyroides* Thomas, 1900 (Chiroptera: Phyllostomidae). *Am. Mus. Novit.* 3710: 1-35, 2011.
- White, B.A., Methods in Molecular Biology PCR protocols current methods and applications. Humana Press, Inc, Totowa, New Jersey, 1993.

Wilson, D. E., Reeder, D.M., Mammal Species of the World A Taxonomic and Geographic Reference. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005.

Yalden, B.W., Morris, P.A., The Lives of Bats. David & Charles Limited, Canada, 1975.

Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N., Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics. doi: 10.1186/1471-2105-7-85, 2006.