

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Apodemus sylvaticus (Linneaus, 1758)'un Sitokrom *b*

ve β -Aktin Genlerinin Tespiti

Tugba DİLEK

EYLÜL 2010

Biyoloji Anabilim Dalında Tugba Dilek tarafından hazırlanan *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758)'un Sitokrom *b* ve β -aktin genlerinin Tespiti adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

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. Nazife YİĞİT

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

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

Prof. Dr. İhsan ULUER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Apodemus sylvaticus (LINNAEUS, 1758)'UN SİTOKROM *b* ve β -AKTİN GENLERİNİN TESPİTİ

DİLEK, Tugba

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Eylül 2010, 43 sayfa

Bu araştırma Ağustos 2009 ve Eylül 2010 tarihleri arasında Kırıkkale ilinden alınan bir orman faresi, *Apodemus sylvaticus* örneğinin sitokrom *b* ve β -aktin genlerinin belirlenmesine dayanmaktadır. Kulak kepçesinden alınan doku örneğinin DNA izolasyonu yapılmış ve mitokondriyal sitokrom *b* ile β -aktin genleri Türkiye’de ilk defa Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılarak, sırasıyla 139 ve 154 baz çifti uzunluğunda dizin elde edilmiştir. Sitokrom *b* genine ait bazlardan Adenin % 25,89, Timin % 31,65, Guanin % 13,66 ve Sitozin % 28,05 olarak; β -aktin genine ait bazlardan Adenin % 22,07, Timin % 21,42, Guanin % 25,32 ve Sitozin % 31,16 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar GenBankası verileriyle karşılaştırılmış ve sitokrom *b* geni dizini *Apodemus*’un türleriyle % 96 oranında benzerlik gösterdiği; β -aktin gen dizini ise *Rattus norvegicus* ile % 96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Orman Faresi, *Apodemus sylvaticus*, Sitokrom *b* geni, β -aktin geni, Türkiye.

ABSTRACT

DETERMINING THE CYTOCHROME *b* and β -ACTIN GENES OF

Apodemus sylvaticus (LINNEAUS, 1758)

DİLEK, Tugba

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

2010, 43 pages

This study is based on determination of cytochrome *b* and β -actin genes of forest mouse, *Apodemus sylvaticus* from Kırıkkale Province between August 2009 and September 2010. The DNA isolation of tissue sample which was obtained from auricle was carried out and mitochondrial cytochrome *b* and β -actin genes was amplified via Polymerase Chain Reaction for the first time in Turkey and 139 and 154 base pair were obtained respectively. Adenine 25,89 %, thymine 31,65 %, guanine 13,66 % and cytosine 28,05 % belong to cytochrome *b* gene was determined and adenine 22,07 %, thymine 21,42 %, guanine 25,32 %, cytosine 31,16 % β -actin gene. Results were compared with that of Gene Bank and cytochrome *b* gene was resembles *Apodemus* species with 96 % ratio. But β -actin gene was also resemble *Rattus norvegicus* with 96 % ratio. Diagnostic characters and some habitat features were recorded.

Key words: Wood mouse, *Apodemus sylvaticus*, cytochrome *b* gene, β -actin gene, Turkey.

TEŞEKKÜR

Tezle ilgili alıŐmalarımnda destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK'a teşekkür ederim. Tezle ilgili laboratuvar imkânlarını bana sunan Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı veteriner hekimi Orhan AYLAN ve bu laboratuvarnda çalıŐmalarıma yardımcı olan Dr. Hikmet ÜN'e teşekkür ederim. Tezin yazım safhasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Tarkan YORULMAZ'a, Dr. Kubilay TOYRAN'a ve AraŐ. Gör. Serdar GÖZÜTOK'a da teşekkür ederim. Ayrıca Yüksek Lisans süresince maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

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. Kuramsal Temeller.....	4
1.1.1. Ordo: Rodentia (Kemiriciler).....	4
1.1.2. Familia: Muridae (Fareler ve Sıçanlar).....	5
1.1.3. Genus: <i>Apodemus</i> Kaup, 1829.....	5
1.1.4. Species: <i>Apodemus sylvaticus</i> Linnaeus, 1758.....	5
1.1.5. Moleküler Teknikler.....	6
1.1.5.1. Nükleik Asit Prob–Hibridizasyon Yöntemi.....	7
1.1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	7
1.1.5.3. Standart PCR Reaksiyonunun Elementleri.....	11
1.1.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Avantaj ve Dezavantajlar.....	12
1.1.6. Nükleik Asitlerin Elektroforezi.....	14
1.1.7. Sitokrom b ve β -Aktin Genleri.....	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Kimyasal Maddeler ve Reagentler.....	23
2.2. Ekipmanlar	24
2.3. Nükleik Asit (DNA) İzolasyonu.....	24
2.4. PCR Primerleri.....	25
2.5. PCR Amplifikasyonu.....	26
2.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	27
2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	28
2.8. Saklama Koşulları.....	28

2.9. DNA Dizin Analizi.....	28
2.10. Filogenetik Analizler.....	29
3. BULGULAR.....	31
3.1. Tür: <i>Apodemus sylvaticus</i> (Linnaeus, 1758) Orman faresi.....	31
3.2. Ayırıcı özellikler.....	31
3.3. Ölçüler.....	31
3.4. İncelenen Örnek ve Kayıt Yerleri.....	32
3.5. PCR Çalışmaları Sonuçlarının Yorumlanması.....	32
3.6. Genetik Analizler.....	33
3.7. DNA Dizin Analizi.....	36
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
KAYNAKLAR.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Polimeraz Zincir reaksiyonu basamakları.....	9
1.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	15
2.1. Kırıkkale ili Kırıkkale Üniversitesi yerleşkesinden yakalanan <i>Apodemus sylvaticus</i> (♂)'a ait bir müze örneği.....	18
2.2. İç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği <i>Apodemus sylvaticus</i> 'a ait baş iskeleti.....	21
2.3. Kulak kepçesinden doku örneğinin alınışı.....	23
3.1. Agaroz jelde Primer L ve Primer H setleriyle yürütülmüş reaksiyon görüntüsü.....	33
3.2. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ile Dizin Analizi Sonucu.....	34
3.3. Baz dizileriyle ilgili BioEdit yazılım sonuçları.....	35
3.4. Bazı türlerle yapılan karşılaştırmalarla ilgili sitokrom <i>b</i> genine ait BioEdit yazılım sonuçları.....	35
3.5. Bazı türlerle yapılan karşılaştırmalarla ilgili β -aktin genine ait BioEdit yazılım sonuçları.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Analizlerde kullanılan primerler ve DNA dizileri.....	26
2.2. PCR’da kullanılan reagent ve kullanım miktarları.....	26
2.3. PCR basamaklarının sıcaklık, zaman ve döngü değerleri.....	27
2.4. β -aktin geni için PCR’da kullanılan element ve miktarları.....	27
2.5. DNA Dizin Analizi PCR basamaklarının sıcaklık, zaman ve döngü değerleri.....	29
3.1. <i>Apodemus sylvaticus</i> ’a ait standart dış vücut ölçüleri.....	32

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bç	Baz çifti
M	Molar (Azı dişler)
μ	Mikro
μ l	Mikrolitre
dNTP	Deoksi nükleotit tri fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
KCL	Potasyum klorit
UV	Ultraviyole
°C	Santigrad derece
β	Beta
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
♂	Erkek
F	Forward
R	Reverse
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
α	Alfa
β	Beta
mM	Milimolar
ng	Nanogram

1.GİRİŞ

Rodentia (Kemiriciler), Mammalia (Memeliler) sınıfının 2.277 türle temsil edilen en zengin takımıdır. Rodentia'nın Sciuromorpha, Castorimorpha, Myomorpha, Anomaluromorpha ve Hystricomorpha olmak üzere beş alttakımı vardır. Bu alttakımlardan Myomorpha, 326 cins ve 1569 tür kapsamaktadır. Myomorpha'nın Muroidea süperfamilyası, 6 familya; Platacanthomyidae, Spalacidae, Calomyscidae, Nesomyidae, Cricetidae, Muridae ile temsil edilmekte olup toplam 310 cins ve 1518 türe sahiptir. Muridae familyası 150 cins ve 730 türle 6 familyanın en çok tür içeren grubudur. Muridae familyası 6 altfamilyaya sahip olup Murinae altfamilyasının cinslerinden biri olan *Apodemus* cinsi 21 tür içermektedir. Bu türler; *A. agrarius*, *A. alpicola*, *A. argenteus*, *A. chevrieri*, *A. draco*, *A. epimelas*, *A. flavicollis*, *A. fulvipectus*, *A. gurkha*, *A. hyrcanicus*, *A. latronum*, *A. mystacinus*, *A. pallipes*, *A. peninsulae*, *A. ponticus*, *A. rusiges*, *A. semotus*, *A. speciosus*, *A. sylvaticus*, *A. uralensis*, *A. witherbyi*'dir (Wilson ve Reeder 2005).

Ellerman ve Morrison-Scott (1951) *Sylvaemus* Ognev, 1924; *Nemomys* Thomas, 1924; *Alsomys* Dukelski, 1928 ve *Pertomys* Martino, 1934 cinslerini *Apodemus* Kaup 1829 cinsine sinonim yapmıştır. Zimmermann (1962) *Apodemus*'un 3 altcinsinden bahsetmiş *Apodemus* altcinsi içinde *A. agrarius*'u; *Sylvaemus*'un içinde ise *A. mystacinus*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. uralensis*' i ve *Alsomys* içinde de *A. speciosus*, *A. latronum*, *A. peninsulae*, *A. gurkha*, *A. draco* ve *A. geisha*'yı değerlendirmiştir. Corbet (1978) *Nemomys* cinsinin *Sylvaemus* cinsiyle aynı olduğuna işaret ederek *Sylvaemus*, *Alsomys* ve *Pertomys* cinslerini *Apodemus*' a sinonim yapmıştır. Neithammer (1978) *Apodemus mystacinus*'u *Sylvaemus* altcinsinden alarak *Karstomys* altcinsine dahil etmiştir.

Musser vd. (1996) *Apodemus* cinsinin *Sylvaemus*, *Nemomys*, *Alsomys*, *Petromys* ve *Karstomys* altcinsileriyle temsil edildiklerini rapor etmiş ve *Apodemus* türlerini üç gruba ayırmıştır. *Apodemus* grubuna *Apodemus agrarius*, *A. chevrieri*, *A. speciosus*, *A. peninsulae*, *A. latronum*, *A. draco*, *A. semotus*, *A. gurkha*'yı; *Sylvaemus* grubuna *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. uralensis*, *A. mystacinus*, *A. fulvipectus*, *A. hermonensis*, *A. alpicola*, *A. arianus*, *A. hyrcanicus*, *A. ponticus*, *A. rusiges*, *A. wardi*'yi ve *Argenteus* grubuna *A. argenteus*'u dahil etmiştir. Ribozomal

DNA'daki kesim bölgelerinin çalışmaları *Apodemus*'un bazı türleri; *A. sylvaticus* ve *A. flavicollis* arasında yakın bağlantı olduğunu ve diğer bazı türlerle; *A. semotus*, *A. agrarius*, *A. argenteus*, *A. speciosus*, *A. peninsulae* ile uzaktan akraba olduğuna işaret etmektedir (Suzuki vd., 1990).

Muridae familyasının Türkiye'de beş cinsine ait 11 türü bulunmaktadır (Kurtonur vd., 1996). Bu cinslerden biri olan *Apodemus* 4 tür; *Apodemus agrarius* (Palas, 1771), *A. flavicollis* (Melchior, 1834), *A. mystacinus* (Danford ve Alston, 1877), *A. sylvaticus* (Linnaeus, 1758) ile temsil edilmektedir (Ellerman ve Morrison-Scott 1951, Corbet 1978 ve Kurtonur vd., 1996). Ayrıca Batı Anadolu'da yapılan morfolojik ve elektroforetik çalışmalar sonucunda *A. uralensis* (Pallas, 1811), *A. hermonensis* (Filippucci vd., 1989) ve *A. ponticus* (Wilson vd., 1993) türlerinin de Türkiye'den kayıtları verilmiştir (Filippucci vd., 1996).

Apodemus Kaup, 1829 cinsi Palearktik bölgenin ılıman alanlarında geniş bir yayılış alanına sahiptir (Filippucci vd., 2002).

Filippucci vd. (1996) Batı Anadolu *Sylvaemus* altcinsine ait *Apodemus mystacinus*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. hermonensis* ve *A. uralensis* türlerini morfolojik ve elektroforetik yönden incelemiş *A. sylvaticus*'un sınırlı yayılış alanından bahsetmiş ve *A. hermonensis*'in Türkiye'den ilk defa kaydını vermiştir.

Reutter vd. (1999) Avrupa'nın çeşitli bölgelerinden *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* ve *A. alpicola* türlerinden toplam 108 kafatası örneğini türlerin birbirinden ayrılmasını sağlayacak morfolojik karakterleri belirlemek amacıyla incelemişler ve araştırmacılar türün orijinal tespitini molar çıkıntı morfolojisine, vücut orantısına, kürk renklenmesine ve allozim analizlerine dayandırmışlardır.

Frynta vd. (2001) Türkiye ve İran'daki *A. uralensis*, *A. arianus*, *A. flavicollis* ve *A. cf. hyrcanicus*'un diskriminat analizine dayanarak *A. hermonensis*'i *A. arianus*'a, *A. uralensis*'i de *A. microps*'a sinonim yapmıştır.

Michaux vd. (2002) Avrupa'nın 40 farklı lokalitesinden aldıkları *Apodemus sylvaticus*, *A. mystacinus*, *A. flavicollis* ve *A. uralensis* örneklerinin sitokrom b geni analizini gerçekleştirmişlerdir.

Krystufek ve Francky (2005) Türkiye ve Yunanistan'daki *A. iconicus*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* ve *A. epimelas*'ın morfolojik kimliğinin tespitiyle birlikte kısmi sitokrom b genini analiz etmişler, Rodos ve Bozcada örneklerinin

Anadolu'daki *A. iconicus* ile amino asit dizisi açısından %100 ve nükleotit açısından %98 benzerlik olduğunu bulmuşlardır.

Apodemus cinsi Batı Avrupa orman faresinin taksonomisi; 1980'lerin sonlarında oldukça fazla yapılan allozim elektroforetik analizlerin uygulanmasıyla yeniden değerlendirilmeye başlanmıştır (Filippucci vd. 1989, Mezhzherin ve Zagorodnyuk, 1989). Bununla birlikte, *Apodemus* cinsinin evrimsel süreci paleontolojik (Michaux & Pasquier 1974; Michaux vd. 1997) ve moleküler filogenetik (Serizawa vd., 2000; Michaux vd., 2002) çalışmalarla ayrıntılı şekilde araştırılmıştır.

Yorulmaz ve Albayrak (2009) Türkiye'deki *Apodemus* cinsine ait *A. sylvaticus*, *A. hermonensis*, *A. mystacinus* türlerinin morfometrik analizleri ve karyotiplerine dayanarak Filippucci vd. (1996) ve Frynta vd. (2001) ve Macholan vd. (2001)'nin Batı Karadeniz'de Zonguldak ili içinde sınırlı bir yayılış alanına sahip olduğunu ileri sürdükleri *A. sylvaticus*'u Orta Anadolu'da Kırıkkale ilinden de kaydetmişlerdir.

Taksonomik problemlerin çözümünde geleneksel yaklaşımlarla birlikte kullanılan moleküler kaynaklı metotlar türlerin durumları ve evrimsel süreçleri açısından bilgi sağlamaktadır. Bu araştırmanın amacı sitokrom b geni ile *A. sylvaticus*'un taksonomik durumunu incelemek ve tür problemi olan *A. hermonensis* ile karşılaştırmaktır.

1.1. Kuramsal Temeller

Araştırmaya konu olan orman faresinin ait olduğu sistematik aşağıda verilmiştir.

Regnum (Alem): Animalia (Hayvanlar)

Phylum (Şube): Chordata (Kordalılar)

Classis (Sınıf): Mammalia (Memeliler)

Ordo (Takım): Rodentia (Kemiriciler)

Familia (Aile): Muridae (Fareler ve Sıçanlar)

Genus (Cins): *Apodemus*

Species (Tür): *Apodemus sylvaticus*

1.1.1. Ordo: Rodentia (Kemiriciler)

Memeliler içinde en fazla türle temsil edilen Rodentia (Kemiriciler) tüm memeli türlerinin yarısına sahiptir. Kemiricilerde üst ve alt kesici dişleri kemirmeye uygun özellikte olup dişlerin dış yüzeyi sert mine tabakasıyla örtülü olduğundan iç yüzey daha serttir. Kesici dişler köksüz olup sürekli olarak büyür. Köpek dişleri ve premolarları olmadığından çenede diestema adı verilen uzunca boşluklar bulunur. Kemiriciler otçul ve etçil olarak beslenir. Bazı türlerde besini depo etmeye yarayan yanak keseleri bulunur. Ağız, yutak ve yemek borusundan sonra basit bir mide ve bağırsaklar ile sindirim kanalı son bulur. Kemiricilerde kör bağırsak uzundur. Nispeten uzun kuyrukları olup bazen tüylerle kaplıdır. İşleve bağlı olarak gözler farklı büyüklükte olup çoğunlukla koku alma duyusu gelişmiştir. Aynı zamanda dokunma kılları dokunma duyusu için gelişmiştir (Kuru, 1994).

Kloak yoktur, ürogenital ve anal açıklıkları ayrıdır. Gebelik süresi 16-170 gün arasında değişen bu hayvanlarda meme sayısı 2-18 arasında değişir. Çoğunluğu yılda birden fazla doğum yapar ve bir batında 1-18 yavru verirler. Küçük kemiricilerin ömür uzunluğu genellikle iki yıl kadardır (Kuru, 1994).

1.1.2. Familia: Muridae (Fareler ve Sıçanlar)

Memelilerin en kalabalık familyasını oluştururlar. Diğer kemiricilerden daha uzun kuyruklara sahiptirler. Kuyrukları kıl yerine pul ile kaplıdır. Kulağın kepçe kısmı büyük, ağız-burun kısmı sivrice ve gözleri nispeten büyüktür. Postta kıllar düz ve genelde arkaya yatıktır (Demirsoy, 2003).

Kıllar kısa, kalın, yumuşak ve serttir. Kuyruk uzunluğu genellikle vücuttan daha uzun, çıplak ve üzeri pullarla örtülüdür. Ön üyeler 4 parmaklı olup tırmanıcı olanlarda, başparmakta tutunma kabarcıkları bulunur. Arka üyeler 5 parmaklıdır. Kulakları genellikle uzundur. Bitkisel ve hayvansal besinlerle beslenirler. Üreme potansiyelleri çok yüksek olup, çevre koşullarına en iyi şekilde uyabilen memelilerdir (Kuru, 1994).

1.1.3. Genus: *Apodemus* Kaup, 1829

Bu türün ayırıcı özelliği olarak baş-beden; 6-15, kuyruk; 7-14 cm. ağırlıkları, 15-20 gramdır. Gözler büyük ve hafifçe ileriye çıkık; kulakları başın üzerini aşar, kuyruk uzun, arka ayaklar nispeten ince ve uzundur. *Apodemus* cinsi üyeleri iyi tırmanır ve uzun mesafelere sıçrayabilirler. Genellikle geceleri faaldirler. Azı dişleri köklü olup çiğneme yüzeyi üzerinde mine örtülü çıkıntılar vardır. Dişileri 6-8 adet memeye sahiptir. Besinleri genellikle tohum olup böcek, salyangoz ve bazı omurgalılar besin diyeti içinde yer almaktadır (Demirsoy, 2003).

1.1.4. Species: *Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758

Orman faresi, *Apodemus sylvaticus*, Batı Paleartik bölgede yaygın olarak bulunan ve biyolojisi iyi bilinen kemirici türlerinden biridir. Tüm Avrupa'da 30'dan fazla alttürü rapor edilmiştir (Flowerdew vd., 1985).

Orman faresi baş-beden: 8-10, kuyrukları 7-11 cm; ağırlıkları 14-30 gramdır. Kulakları büyük ve çıplak; gözleri iri; burunları sivridir. Kuyrukları hemen hemen vücut uzunluğundadır. Kromozom sayıları 2n: 48'dir. Sırt kısımları grimsi

kahverengi; sırtın orta kısmı genellikle koyulaşmış; karın kısmı beyazımsı gümüş grisidir. Gerdanda daha dar ve uzunca sarımsı kahverengi bir benek bulunur. Şayet bu benek varsa vücudun alt kısmına doğru uzayabilir; fakat hiçbir zaman kapalı bir boyun bandı oluşturmaz. Kuyruk üstte, sırtın ortası gibi koyu renkli ve altta açık tondadır. Yılda 3-4 olmak üzere, her batında 3-9 yavru verir. Zemini nispeten çıplak ormanlarda, tarlalarda, bahçelerde ve steplerde, bazen de kışın tesadüfen binalarda bulunurlar. Besin olarak yağlı ve nişastalı tohumları tercih ederler. Bazen omurgasız hayvanları da yerler ve kış uykusuna yatmazlar (Demirsoy, 2003).

Kafatası karakterleri: *A. mystacinus* ve *A. flavicollis*'ten daha küçük kafatası ölçülerine sahiptir. Genel olarak *A. flavicollis*'e benzer fakat kafatası hafifçe daha şişmiş ve düzgün, hiç köşeli değildir. Keskin foramin oldukça konik ön ekstremitelerle dardır. Timpanik bullae dikkat çekici şekilde küçük ve *A. flavicollis*'in kemiksi işitsel yapısı daha küçük ve daha az şişmiştir.

Dişler: Dişler kafatası büyüklüğüne bağımlı olarak küçüktür, *A. mystacinus* ve *A. flavicollis*'den üst yanakları daha küçüktür. Azıların boğumlu yapısı *A. flavicollis*'e benzerdir (Harrison, 1991).

1.1.5. Moleküler Teknikler

Moleküler biyolojideki son teknolojik gelişmeler, özellikle *in vitro* şartlarda nükleik asit çoğaltılması ve tespitine imkân sağlayan yöntemler, genetik ve biyoteknoloji alanında önemli gelişmeler sağlamıştır. Sadece genetik alanında değil tıptan mikrobiyolojiye, tarımda tohum saflığının belirlenmesinden sistematik ve evölüsyon çalışmalarına kadar geniş bir alanda kullanım alanı bulan nükleik asit çoğaltma ve tespit yöntemleri genel anlamda iki farklı prensip üzerine oturtulmuştur. Bunlar; nükleik asit prob-hibridizasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleridir.

1.1.5.1. Nükleik Asit Prob–Hibridizasyon Yöntemi

Nükleik asit prob-hibridizasyon yöntemi moleküler yöntemlerin en eski ve basit olanıdır. Örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve böylece örneğe ait hücre DNA'larındaki spesifik genlerin işaretli problarla 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 imkân sağlayan bu yöntemler, normal gen yapısının analizinin yanı sıra genlerdeki inversiyon, delesyon veya nokta mutasyonların gösterilebilmesine de yardımcı olmaktadır.

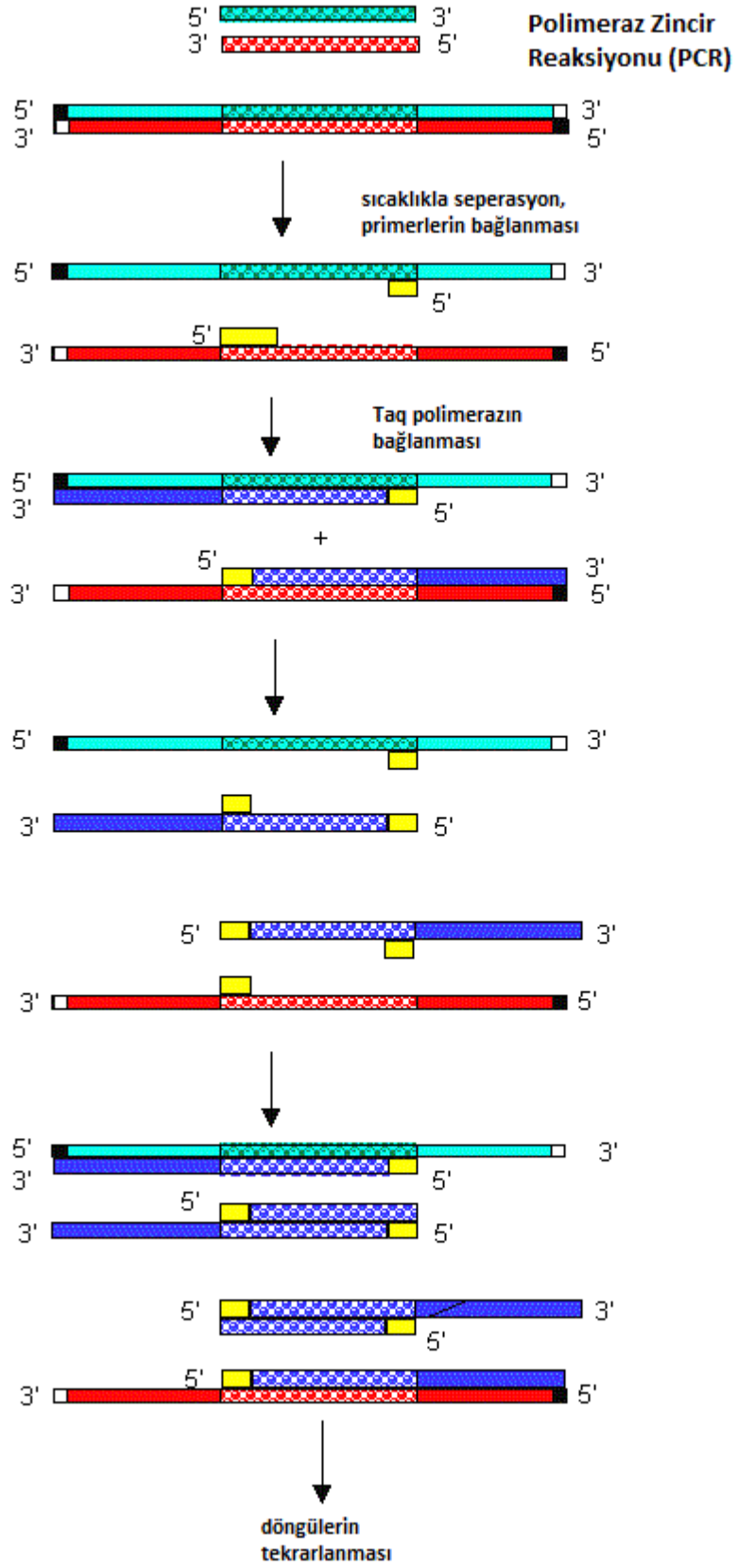
Moleküler tanı yöntemlerinin temelini nükleik asit kimyası ve yapısal özelliklerinin tespitine yönelik çalışmalar oluşturmuştur. DNA ilk olarak 1870 yılında Friderich Miescher tarafından tanımlanmıştır. Phoebus Theodore Levene (1909) gen yapısında RNA/DNA ilişkisini göstermiş ve bu daha sonraki çalışmalara 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).

1.1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur. PCR

analizi; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim ve adli vakalar gibi pek çok disiplinde uygulama olanağı bulmuştur.

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. 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 polymerase), çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları (Anonim, 2010a)

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 diğeri 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.

PCR yönteminin kullanım alanları aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
- 2) Prenatal (doğum öncesi) tanıda,
- 3) Klinik örneklerde patojen (hastalık yapabilecek) organizmaların saptanması,
- 4) Adli tıpta,

- 5) Onkogenesinin(kanser yapan hücrelerin oluşum evresi) araştırılmasında,
- 6) "Probe"(sonda) oluşturulmasında; klonlamada; gen tanımlaması araştırmalarında,
- 7) DNA dizi analizinde; büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
- 8) Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- 9) Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlatılmasında,
- 10) "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) analizinde,
- 11) In vitro fertilization (canlı hücre dışında gerçekleşen sperm yumurta birleşmesi) yapılan tek hücrede, implantasyon (döl tutma) öncesi genetik testlerin yapılmasında ve implantasyonun gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğumunun sağlanması sırasında,
- 12) DNA-Protein interaksiyonunun (etkileşiminin) araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir.

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.

1.1.5.3. Standart PCR Reaksiyonunun Elementleri

Standart PCR reaksiyonu parçaları şunlardır; Isıya dayalı (termostabil) DNA polimeraz, kalıp DNA, 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., 1998). 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. Her termofilik polimeraz için Mg⁺⁺ optimal konsantrasyonu Tablo 1'de verilmiştir. Bunlar reaksiyonda Mg iyon konsantrasyonu optimizasyonu için başlangıç noktası olarak görev yapmaktadır.

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).

1.1.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Avantaj ve Dezavantajları

PCR'ın 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.

Tüm tedbirlere rağmen amplifikasyonda karşılaşılabilecek muhtemel problemler ve çözümleri:

1. Oldukça uzun, beklenmeyen ürünlerin varlığında;
 - a. Bağlanma süresi düşürülür, ısısı artırılır,
 - b. Uzama süre ve ısısı düşürülür,
 - c. $MgCl_2$ sabit tutularak KCl konsantrasyonu 2 kata kadar artırılır,
 - d. $MgCl_2$ konsantrasyonu 3-4,5 mM'a kadar çıkartılır, dNTP konsantrasyonu sabit tutulur,
 - e. Daha az primer kullanılır,
 - f. Daha az kalıp DNA kullanılır,
 - g. Taq DNA polimeraz miktarı azaltılır.

Bunların hiçbirisi işe yaramazsa sistem gözden geçirilir, primerler değiştirilir, yukarıdaki tedbirlerden bir veya birkaçı birlikte denenir.

2. Çok kısa, beklenmedik ürünlerin varlığında;
 - a. Bağlanma ısısı yükseltilir,
 - b. Bağlanma süresi artırılır,
 - c. Uzama süresi uzatılır,
 - d. Uzama ısısı 74-78°C' ye çıkartılır,
 - e. KCl konsantrasyonu 0,7-0,8 oranında düşürülür,
 - f. $MgCl_2$ konsantrasyonu 3-4,5 mM'a kadar çıkartılır, ancak dNTP sabit tutulur,
 - g. Daha az primer kullanılır,
 - h. Daha az kalıp DNA kullanılır
 - i. Taq DNA polimeraz miktarı azaltılır.

Yukarıdakilerden hiçbirisi çalışmaz ise sistem ve primerler gözden geçirilir.

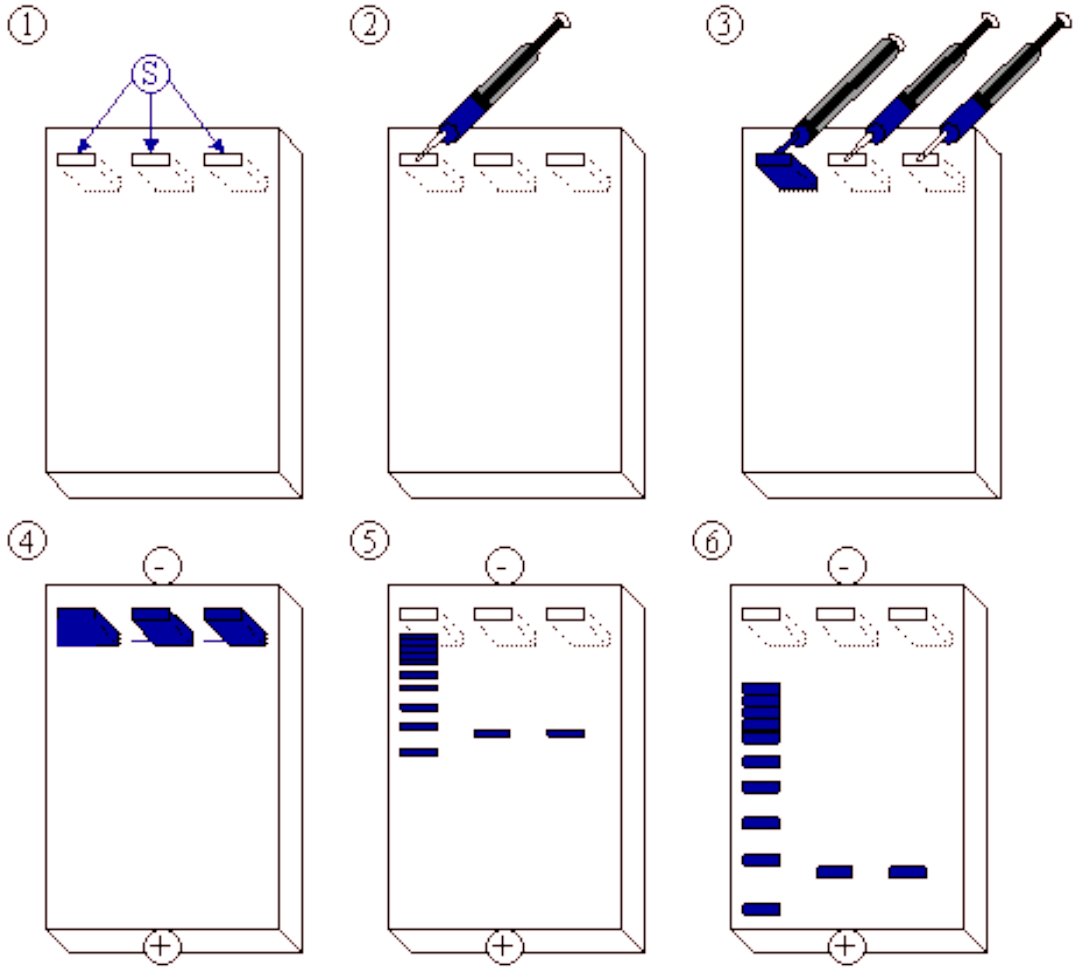
3. Reaksiyon önceden çalıştığı halde daha sonra çalışmamaya başlarsa;
 - a. Reaksiyon tüpündeki maddelerin doğru miktarda ve eksiksiz olup olmadığı kontrol edilir,
 - b. dNTP solüsyonu değiştirilir,
 - c. Primerleri yeni alınmış ise kontrolleri yapılmalıdır,
 - d. Primerlerin miktarı artırılır,
 - e. Hedef molekülün miktarı artırılır,
 - f. Bağlanma ısısı 6-10°C düşürülerek tekrar çalışılır.

4. PCR ürünleri zayıf ise;
 - a. Bağlanma ısısı kademeli olarak düşürülür,
 - b. Primerlerin miktarı artırılır,
 - c. Kalıbın miktarı artırılır,
 - d. Taq DNA polimeraz miktarı artırılır,
 - e. Hedef ürün 1000 baz çiftinden büyükse KCl konsantrasyonu yükseltilir, büyükse düşürülür.
5. Uzun ürünler zayıf görünüyorsa;
 - a. KCl, 0,7-0,8 oranında azaltılır,
 - b. MgCl₂, 3-4,5 mM'a getirilir,
 - c. Denatürasyon süresi uzatılır,
 - d. Bağlanma süresi uzatılır,
 - e. Bağlanma ısısı azaltılır,
 - f. Uzama süre ve ısısı yükseltilir,
 - g. Zayıf lokusun primerleri artırılır.

1.1.6. Nükleik Asitlerin Elektrofrez

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 ayırıştırılmaktadır. Numune, gözenekli bir maddenin (bir filtre kâğıdı 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 ayırıştırılması 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 1.2).



Şekil 1.2. Agaroz Jel Elektroforezi (Anonim, 2010b)

M.Ö. 3. yüzyılda Aristo ile başlayan sistematik temel olarak büyük ölçüde morfolojik karakter temeline dayanmaktadır. Bu geleneksel yaklaşımlar bazı değişimlerle günümüzde de halen kullanılmaktadır. 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, kimyasal içerik 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.

PCR 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, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tür çalışmalar direk sistematik problemleri çözmeye yönelik olabileceği gibi bu sonuçlar bazen farklı alanlarda da kullanılabilir. Örneğin çalışmalar hayvan türlerinin genetik akrabalıklarının belirlenmesi, populasyonlar arası ve populasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve buna benzer diğer durumları kapsamaktadır.

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.

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.

1.1.7. Sitokrom b ve β -Aktin Genleri

Sitokrom b geni hücre açısından çok önemli bir yapı taşıdır. Sitokrom b, transmembran ana alt birimidir, yaklaşık olarak 400 amino asitten oluşur. Ökaryotlar ve aerobik Prokaryotlarda mitokondri olarak Sitokrom b solunum zinciri kompleksinin bir parçasıdır. Bu kompleksler elektron taşınması ile ATP jenerasyonuna katılırlar ve böylece hücre içinde hayati bir rol oynamaktadırlar. Yaygın olarak populasyon genetiği ve filogenetik çalışmalar için kullanılan mtDNA bölgesidir (Anonim, 2010c). Canlılarda bu gene ait DNA dizini incelenerek değişim ve farklılaşmalar ortaya konulmaktadır (Irwin vd., 1991). DNA-temelli yaklaşımlar giderek biyolojik çeşitlilik survey çalışmalarında daha yaygın olarak kullanılmaktadırlar, Sitokrom b geni ile yapılan çalışmalar ise her gün daha çok önem kazanmaktadır (Mayer vd., 2007).

Aktinler tüm ökaryotlarda bulunan son derece korunmuş proteinlerin oluşturduğu bir gruptur. Amino asit dizisi temelinde 6 farklı memeli aktin belirlendi: iskelet kası, kalp kası, 2 düz kas aktini ve sitoplazmik β - aktin ve γ -aktin. Korunmuş proteinlerin oluşturması nedeni ile populasyon genetiği ve filogenetik çalışmalar için kullanılmaktadır (Nudel vd., 1983; Anonim, 2010d). β -aktin yaygın olarak sitoplazmik sitoskeletal bir protein olarak incelenmiştir, hücre içi hareketlerde önemli rol oynar. Aynı zamanda nüklear bir proteindir (Hu vd., 2004).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu araştırma Kırıkkale ilinden 12 Ağustos 2009 tarihlerinde yakalanan *Apodemus sylvaticus* örneğinin sitokrom *b* ve β -aktin genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılması, agaroz jel elektroforez ile görüntülenmesi ve DNA Dizin Analizine dayanmaktadır. Araştırma Kırıkkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Omurgalı Hayvanlar Laboratuvarı ve Ankara Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarında yürütülmüştür.

Örnek yakalamak için hem ölü hem de canlı kapanlara fıstıkla çiğnenmiş ekmek içi yem olarak konmuştur. Yakalanan örnek laboratuvara getirilerek dört dış standart ölçüsü ve ağırlığı kaydedilerek standart müze örneği tipinde doldurulmuştur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kırıkkale ili Kırıkkale Üniversitesi yerleşkesinden yakalanan *Apodemus sylvaticus* (♂, No:1731)'a ait bir müze örneği

Dış karakter ölçüleri cetvelle, iç karakter ölçüleri 0.05 mm'ye kadar hassas bir kumpasla aşağıda açıklandığı şekilde alınmıştır (Şekil 2.2).

Tümboy: Sırt üstü milimetrik bir cetvel üzerine yatırılan örneğin burun ucundan kuyruğun etli olan kısmının sonuna kadar olan mesafe.

Kuyruk uzunluğu: İlk kuyruk omurunun başlangıcından kuyruğun etli kısmının sonuna kadar olan mesafe.

Ardayak uzunluğu: Topuğun en arka noktasından en uzun parmağın tırnak ucuna kadar olan mesafe.

Kulak uzunluğu: Dış kulak kanalı önündeki en alt noktadan kulak kepçesinin tepe noktası arasındaki mesafe.

Condylbasal uzunluk (1): Occipital condyllerin en ard noktalarını birleştiren hat ile kesiciler arasındaki premaxilla kemiklerinin en ön noktalarını birleştiren hat arasındaki en kısa mesafe.

Basal uzunluk (2): Foramen magnumun alt ön noktası ile premaksilla kemiğinin kesici dişlerin ard noktalarındaki en ileri noktası arasındaki mesafe.

Basilar uzunluk (3): Foramen magnumun ventralindeki en ön nokta ile üst kesici alveollerinin en ard noktalarını birleştiren doğru arasındaki en kısa mesafe.

Condylbasilar uzunluk (4): Occipital condyllerin en ard noktalarını birleştiren hat ile üst kesici alveollerinin en ard noktalarını birleştiren doğru arasındaki en kısa mesafe.

Occipitonasal uzunluk (5): Occipital kemiğin en ard noktası ile nasallerin en uç noktalarını birleştiren en kısa mesafe.

Diastema uzunluğu (6): Sol üst kesici dişin molar alveolünün en ard noktası ile birinci sol üst molar alveolünün en ön noktası arasındaki mesafe.

Foramen incisiva uzunluğu (7): Foramen incisiva'nın ön noktalarını birleştiren doğru ile ard noktalarını birleştiren doğru arasındaki mesafe.

Nasal uzunluk (8): Nasal kemiklerin en ön noktası ile nasofrontal dikişin ortasından geçen düzlem arasındaki mesafe.

Üst molar alveol uzunluğu (9): Sol M³ alveolünün en ard noktası ile M¹ alveolünün en ön noktası arasındaki mesafe.

Üst molar uzunluğu (10): Sol M³'ün en ard noktası ile M¹'in en ön noktası arasındaki mesafe.

Bullae uzunluğu (11): Bullaenin en uzak iki noktası arasındaki mesafe.

İnterorbital genişlik (12): Frontal kemiklerin orbitler arasında en çok daraldığı yerlerdeki başın median hattına dik olan hattın genişliği.

Occipital genişlik (13): Occipital kemiğin lateral yüzeylerde meydana getirdiği iki çıkıntı arasındaki mesafe.

Nasal genişlik (14): Nasal kemiklerin en geniş yerinin uzunluğu.

Damak uzunluğu (15): Üst kesici alveollerinin en ard noktaları ile M³ hizasında damağın oluşturduğu kavisin en ön noktasını birleştiren doğrunun uzunluğu.

Rostrum genişliği (16): Rostrumun en geniş yerinin uzunluğu.

Palatinal uzunluk (17): Üst kesici alveollerinin en ard noktaları ile M³ hizasında damağın oluşturduğu kavisin en ön noktası arasındaki mesafe.

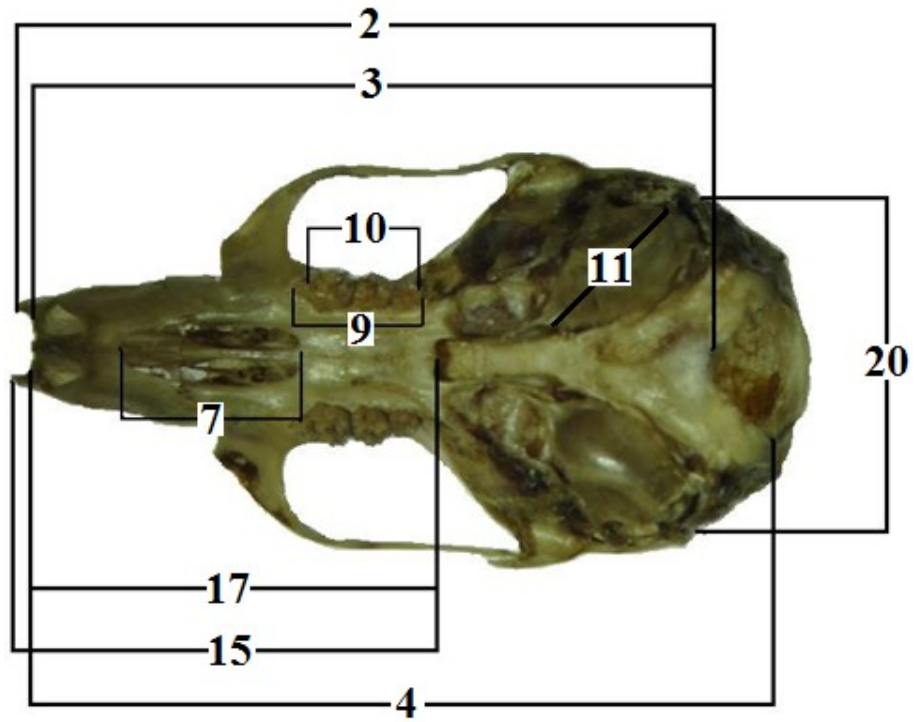
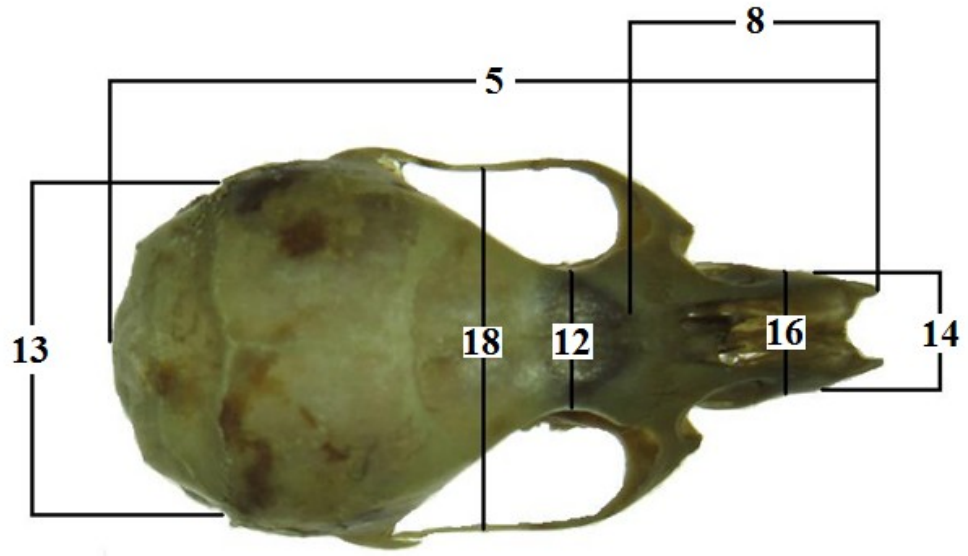
Zygomatic genişlik (18): Başın median hattına dik olacak şekilde zygomatik kavislerin en dış noktaları arasındaki mesafe.

Bullaeli beyin kapsülü yüksekliği (19): Bullaenin en alt noktasından geçen düzlem ile beyin kapsülünün en üst noktası arasındaki mesafe.

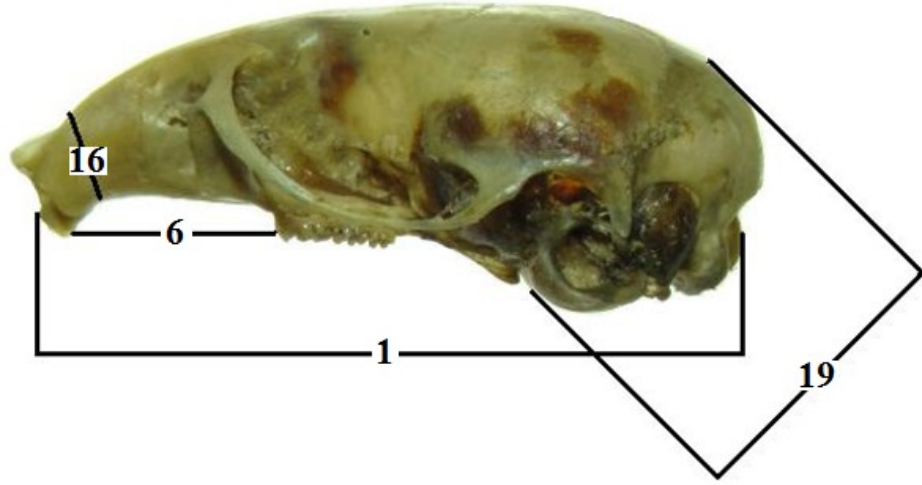
Beyin kapsülü genişliği (20): Parietal kemiklerin laterale doğru yaptığı çıkıntılar arasındaki mesafe.

Alt molar alveol uzunluğu (21): Sol M₃ alveolünün en ard noktası ile M₁ alveolünün en ön noktası arasındaki mesafe.

Altçene uzunluğu (22): Sol alt kesici dişlerin iç alveol kenarı ile condyloid çıkıntının en ard noktası arasındaki mesafe.



Şekil 2.2. İç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği *Apodemus sylvaticus*'a ait baş iskeleti



Şekil 2.2. (Devamı) İç karakter ölçülerinin alınışının gösterildiği *Apodemus sylvaticus*'a ait baş iskeleti

Kırıkkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Koleksiyonunda bulunan *Apodemus sylvaticus* örneği çalışmada kullanılmıştır. Bu örneğe ait kulak dokusundan 3 mm biopsi alma aparatı kullanılarak doku örnekleri alınmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kulak kepçesinden doku örneğinin alınışı

2.1. Kimyasal Maddeler ve Reagentler

- Steril Distile Su (DNase, RNase, Pyrogen yönünden temiz ultrapure grade)
- Tris Borat EDTA (TBE) buffer, 10X (109 g Tris 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 bromophenol blue, %02 xylene cyanole, %12,5 ficol) veya kullanıma hazır ticari ürün.
- DNA merdiveni
- Agarose (moleküler biyolojik grade, % 2)
- Ethidium bromide (1/10.000 kullanılır)
- Polaroid 667 film
- Primerler
- PCR Kit :Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq, İnvitrogen, ABD
- DNA İzolasyon Kit : DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Almanya

2.2. Ekipmanlar

- 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
- Thermal cycler
- Mikrosantrifüj
- Elektroforez Sistemi
- UV transilluminatör
- Polaroid fotoğraf makinesi
- Vorteks
- Biyolojik Güvenlik Kabini
- Mikrodalga Fırın
- Hassas Terazi
- Eldiven, Maske, Laboratuvar Giysisi

2.3. Nükleik Asit (DNA) İzolasyonu

Nükleik Asit (DNA) izolasyonu amacı ile ticari kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. 3 mm uçlu biopsi alma alparatı ile örneklenen karaciğer ve kas dokuları -20 °C'de bekletilmiştir. Çalışma günü -20 °C'de bekletilen karaciğer ve kas dokusu olarak örneklenen biopsi materyali çalışılacak ortam olan laminar flow kabin içerisine alınmıştır. İki adet 2 ml vida kapaklı tüp numaralandırılmıştır. Her bir örnek 2.0 ml vida kapaklı homojenizasyon tüpüne ayrı ayrı konularak üzerine 180 µl ATL buffer ilave edilmiştir. Üzerlerine 20 µl proteinase K ilave edilerek tüpler 15 saniye vorteks edilmiştir. Hemen sonra 56°C çalkalamalı kuru blok ısıtıcıda dokular tamamı ile çözülene kadar inkubasyon işlemi

uygulanmıştır. İnkubasyon süresi sonunda 15 saniye vorteks edilen tüplerin içerisine 200 µl buffer AL ilave edilerek tüpler tekrar 15 saniye vorteks edilmiştir. Tüp içerisinde bulunan karışım (400 µl) 2 ml DNeasy Mini spin kolonu içerisine konularak 6000 x g (8000 rpm) ayarında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüp tabanında bulunan süzöntü dökülerek DNeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml tüpe konulmuştur. Kolon içerisine 500 µl buffer AW1 ilave edilerek 6000 x g (8000 rpm) ayarında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüp tabanında bulunan süzöntü dökülerek DNeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml tüpe konulmuştur. Kolon içerisine 500 µl buffer AW2 ilave edilerek 20,000 x g (14,000 rpm) ayarında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda 2 ml tüp atılarak DNeasy Mini spin kolonu yeni bir 1,5 ml tüpe konulmuştur. Kolon içerisine 200 µl AE buffer ilave edilerek oda ısısında 1 dakika inkubasyonu takiben 6000 x g (8000 rpm) ayarında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüp tabanında bulunan süzöntü Nükleik Asit (DNA) içermektedir. DNA konsantrasyonu NanoDrop 2000 (NanoDrop, ABD) spektrofotometre ile ölçülerek konsantrasyon 100 picogram / µl oranına ayarlanmıştır. Elde edilen DNA testte kullanılmaya kadar -80 °C’de saklanılmıştır.

2.4. PCR Primerleri

Bu araştırmada sitokrom *b* geni DNA dizin amaçlı Yvanne vd. (2000) tarafından kullanılan ve aşağıda tablo halinde gösterilen primer setlerinin sentezleri yaptırılmıştır (Çizelge 2.1). Primerler saklama sulandırması olarak 100 picomol / µl oranında ve çalışma sulandırması olarak 20 picomol / µl oranında dilue edilerek -20 °C’de saklanılmıştır.

Çizelge 2.1. Analizlerde kullanılan primerler ve DNA dizileri

Primer	DNA Dizini
L14115	(5' - AAT GAC ATG AAA CAT CGT TG -3')
H15288	(5'- ACA AGA CCA GAG TAA TGT TTA TAC TAT C -3')
L14648	(5'- TGA ATY TGA GGR GGC TTC TCA GTA -3')
H14742	(5'- GGG TTG TTD GAT CCW GTT TC-3')
B-aktin F	üniversal
B- aktin R	üniversal

2.5. PCR Amplifikasyonu

PCR, genetik materyallerin saptanmasında kullanılan moleküler tabanlı, nükleik asit çoğaltma esaslı bir yöntemdir.

Sitokrom b ve β -aktin genlerine yönelik PCR amplifikasyonu için ticari kit (Super Script III One Step RT-PCR Kit With Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyon toplam 25 μ l hacimde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. PCR'da kullanılan reagent ve kullanım miktarları

Element	Kullanılan Miktar (μ L)
2X Buffer	12,5
Primer L14115, H15288 veya β -aktin F	1
Primer L14648,H14742 veya β -aktin R	1
dH ₂ O	5,3
Taq DNA Polimeraz	0,2
DNA	5
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 2.3).

Çizelge 2.3. 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	
Bağlanma	52 °C	1 dakika	40
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son Uzama	72 °C	15 dakika	1

B-aktin geni sekansı için izole edilen DNA'dan PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 25 µL reaksiyon hacmi içeren element miktarları tabloda belirtilmiştir(Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. β-aktin geni için PCR'da kullanılan element ve miktarları

Element	Kullanılan Miktar (µL)
2X Buffer	12,5
β Aktin Primer I	1
β Aktin Primer II	1
dH ₂ O	8,3
Taq DNA Polimeraz	0,2
DNA	2
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Thermocyclerden alınan tüpler, arzulanan büyüklükteki amplifikasyonun tespiti için % 2 Agaroz içinde elektroforeze tabi tutulmuştur. Bu amaçla 0,5 g agaroz tartılarak, erlenmayere konulmuştur ve 25 ml TBE buffer içinde karıştırılarak alev üzerinde veya mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Hazırlanan agaroz içerisine son sulandırması 1/10 000 olacak şekilde ethidium bromide ilave edilmiştir. Agaroz sıcaklığı yaklaşık 40 °C'ye düşünceye kadar oda ısısında bekletildikten sonra horizontal minigel elektroforez 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 (loading buffer) ile karıştırılarak konulmuştur. Her elektroforez işlemi için 100 bç DNA merdiveni bir göze konulmuştur. 4 V/cm güçte elektrik akımı uygulanmıştır.

2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar UV transillumunator üzerinde değerlendirilerek fotoğraflama yapılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda beklenen pozitiflik için, L14115 ve L14648 primer çifti için yaklaşık 100 b, H15288 ve H14742 primer çifti için yaklaşık 1000 b ve β -aktin F ve β -aktin R primer çifti için 100 b bölgelerinde spesifik bantların şekillenmesi beklenir. Sonuçlar polaroid fotoğraf çekilerek kayıt altına alınmıştır.

2.8. Saklama Koşulları

Kimyasal maddeler ve reagentler üretici firmaların tavsiye ettiği kullanma talimatlarına göre muhafaza edilir. Hazırlanan mixler muhafaza edilmemelidir. PCR rnleri -20 C'de derin dondurucularda muhafaza edilmelidir.

2.9. DNA Dizin Analizi

PCR ile pozitif tespit edilen örneklerin DNA Dizin Analizi (DNA Sequencing) yapılmıştır.

PCR rnleri agaroz jel üzerinde ticari kit (QIAquick[®] Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak saflaştırılmıştır (bu işlemde üretici firmanın kullanım tavsiye ettiği kullanım prosedürü uygulanmıştır).

Saflaştırılan PCR rnlerin DNA dizin analizlerinin tespiti için ticari kit (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, ABD) kullanılmıştır (bu işlemde üretici firmanın kullanım tavsiye ettiği kullanım prosedürü uygulanmıştır). Kullanıma hazır kit reagentinden 8 μ l, her bir primerden 1 μ l (3.2 picomol), PCR ürününden 5 μ l ve distile su 6 μ l olmak üzere toplam 20 μ l hacminde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon PCR Thermalcycler (PTC100 MJ

Research, ABD) cihazında üretici firmanın tavsiye ettiği döngü ve derecelerde gerçekleşmiştir (Çizelge 2.5).

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	

Gerçekleşen reaksiyonlar ticari bir kit (DyeEx 2.0 Nucleospin, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) ile nükleotidlerinden uzaklaştırılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örnekler ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) otomatik DNA Analiz cihazı kullanılarak DNA dizinleri elde edilmiştir.

2.10. Filogenetik Analizler

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 and Higgins 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?](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.

3. BULGULAR

3.1. Tür: *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) Orman faresi

1758. *Mus sylvaticus* Linnaeus, Syst. Nat. I., 10th ed., p. 62.

Tip yeri: Upsala, İsveç

1915. *Apodemus sylvaticus* Miller, Ann. Mag. Nat. Hist., 8th sr. VI. P. 460.

3.2. Ayırıcı özellikler

Foramen incisiva uzun olup birinci üst moların (M¹) alveolunun ön kenar hizasını aşar. Örneklerin çoğunda çene altında ön bacakların omuza bağlandığı hizadan başlayan 2-4 mm eninde ve gittikçe daralan 6-14 mm boyunda kirli sarı bir leke vardır. Damağın arka kısmı nispeten yuvarlakça bir uç yapar. M¹ üzerinde küçük bir t12 zirvesi M² üzerindeki az belirgin t3 zirvesiyle bağlantılıdır. M¹ 4 köke sahiptir (Yorulmaz ve Albayrak, 2009).

3.3. Ölçüler

Kırıkkale ilinden alınan *Apodemus sylvaticus* örneğinden alınan bazı iç ve dış özellik ölçüleri ile ağırlıkları kaydedilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Apodemus sylvaticus*'a ait iç ve dış özellik ölçüleri (cm, gr)

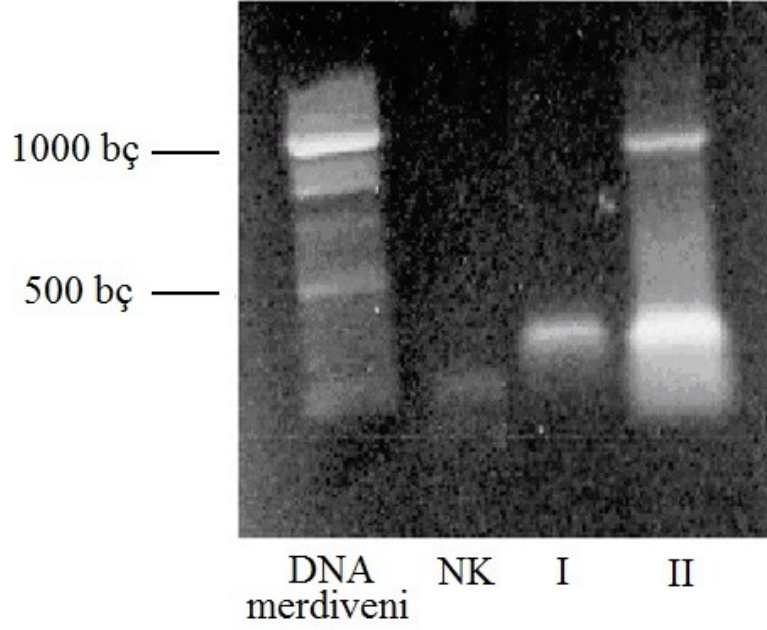
Özellikler	ÖS	Değer
Tümboy	1	195
Kuyruk uzunluğu	1	105
Ardayak uzunluğu	1	23
Kulak uzunluğu	1	14
Ağırlık	1	25
Diastema uzunluğu	1	6.50
Foramen incisiva uzunluğu	1	4.52
Nasal uzunluk	1	8.70
Üst molar alveol uzunluğu	1	3.84
İnterorbital genişlik	1	4.40
Nasal genişlik	1	2.56
Palatinal uzunluk	1	10.64
Alt molar alveol uzunluğu	1	3.70
Altçene uzunluğu	1	13.76

3. 4. İncelenen Örnek ve Kayıt Yerleri

Kırıkkale, Sulakyurt, 1 (ergin ♂, 15 Eylül 2008), Kırıkkale: Kırıkkale Üniversitesi Kampüsü (27 Nisan 2001) 1731 ♂.

3.5. PCR Çalışmaları Sonuçlarının Yorumlanması

PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünler %2 agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuçlar UV transillumunatör üzerinde değerlendirilerek fotoğraflama yapılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda beklenen pozitiflik için, L14115 ve L14648 primer çifti için yaklaşık 100 bç, H15288 ve H14742 primer çifti için yaklaşık 1000 bç ve β -aktin F ve β -aktin R primer çifti için 100 bç bölgelerinde spesifik bantların şekillenmiş olduğu görülmüştür. Sonuçlar polaroid fotoğraf çekilerek kayıt altına alınmıştır (Şekil 3.1). Elde edilen ürünler DNA Dizin Analizi testinde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Agaroz jelde Primer L ve Primer H setleriyle yürütülmüş reaksiyon görüntüsü (DNA merdiveni: Moleküler marker, NK: Negatif kontrol, I: Primer L ile elde edilmiş reaksiyon görüntüsü, II: Primer H ile elde edilmiş reaksiyon görüntüsü).

3.6. Genetik Analizler

Apodemus sylvaticus'un mitokondrial DNA'sı izole edilerek sitokrom b ve β aktin genlerinin dizi analizi yapıldı. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ile bazlar belirlenmiştir (Şekil 3.2).

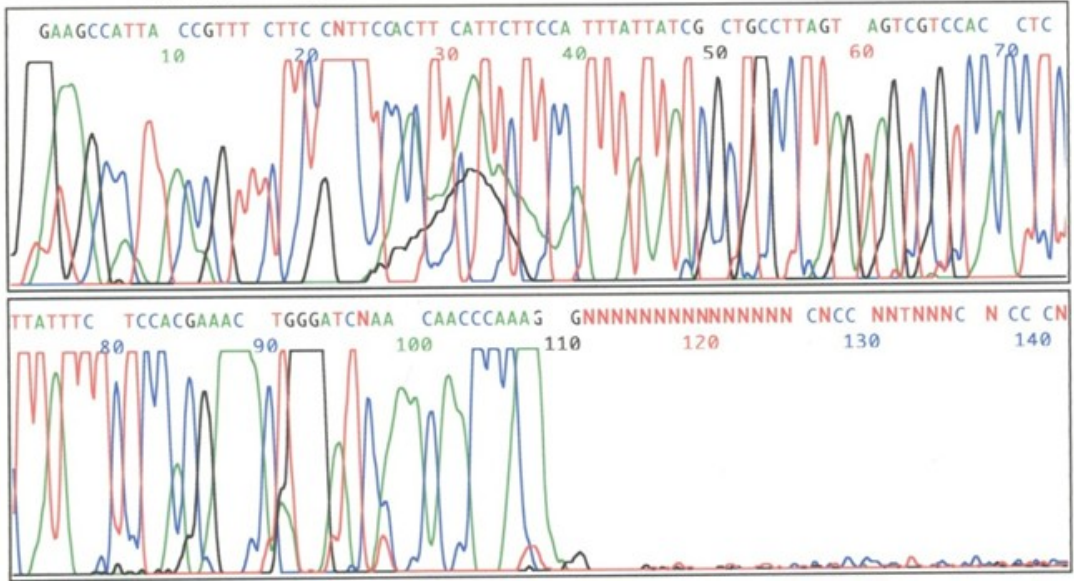


Model 310
Version 3.4.1
ABI-CE1
Version 3.2

rodent L
rodent L
Lane 1

Signal G:98 A:191 T:177 C:88
DT310POP6(BDv3)v1.mob
V3 MATRIX YENI
Points 1243 to 4640 Pk 1 Loc: 1243

Page 1 of 1
Thu, Feb 11, 2010 09:22
Thu, Feb 11, 2010 08:22
Spacing: 8.83(8.83)

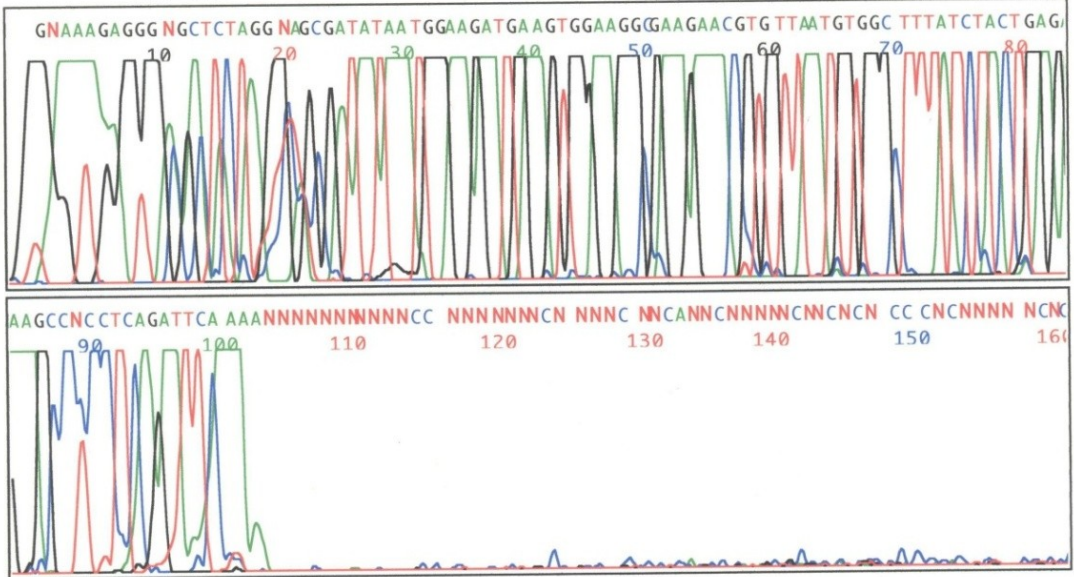


Model 310
Version 3.4.1
ABI-CE1
Version 3.2

rodent H
rodent H
Lane 2

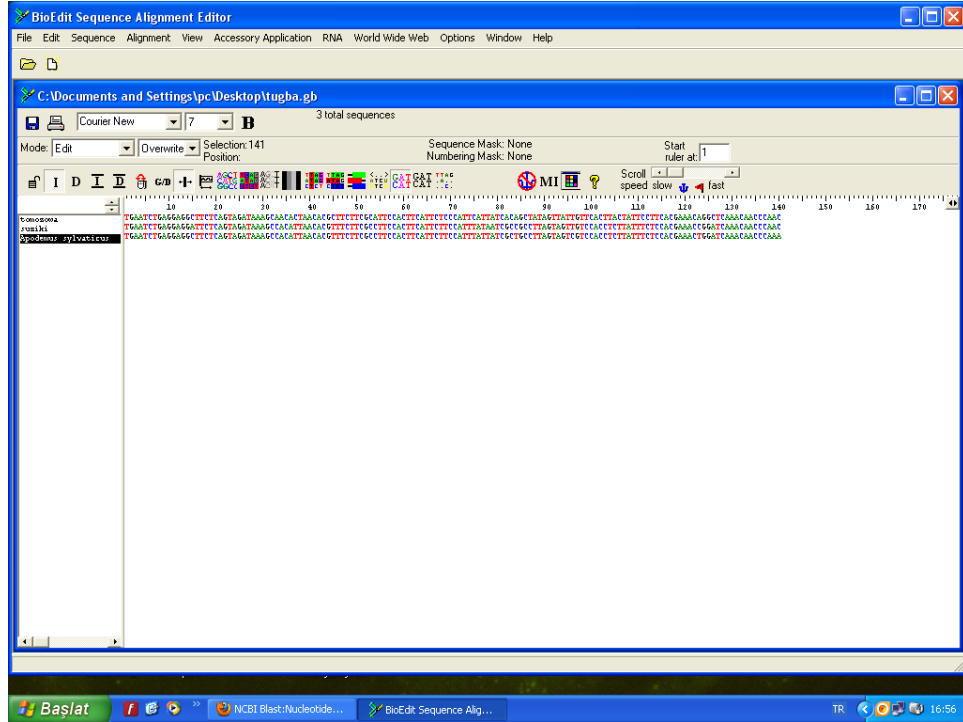
Signal G:293 A:369 T:153 C:37
DT310POP6(BDv3)v1.mob
V3 MATRIX YENI
Points 1088 to 4640 Pk 1 Loc: 1088

Page 1 of 1
Thu, Feb 11, 2010 09:55
Thu, Feb 11, 2010 09:09
Spacing: 10.34(10.34)

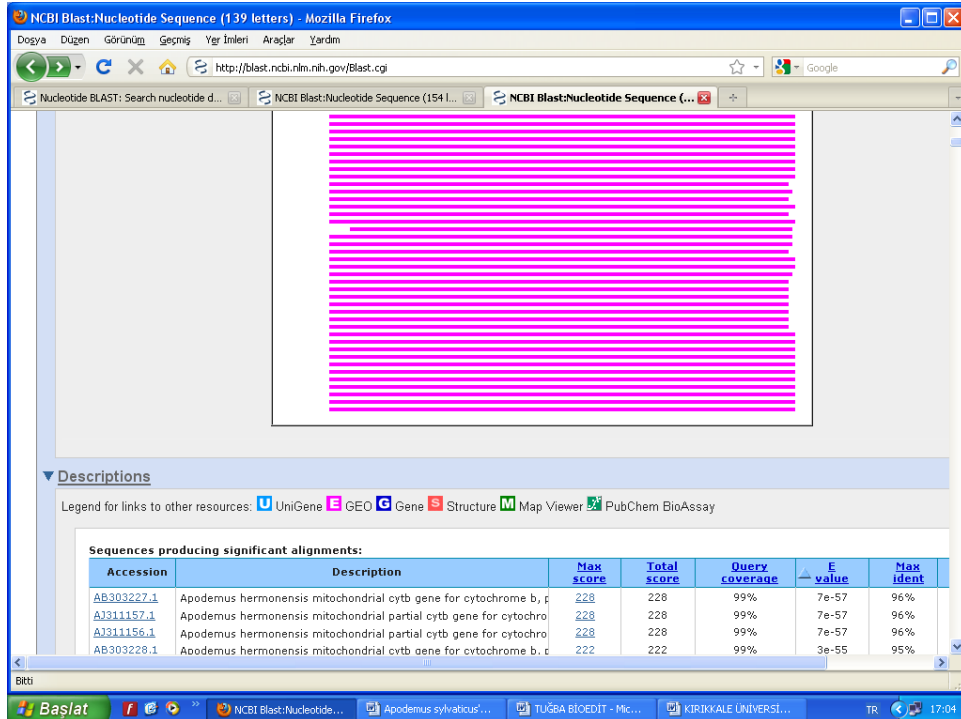


Şekil 3.2. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ile Dizin Analizi Sonucu

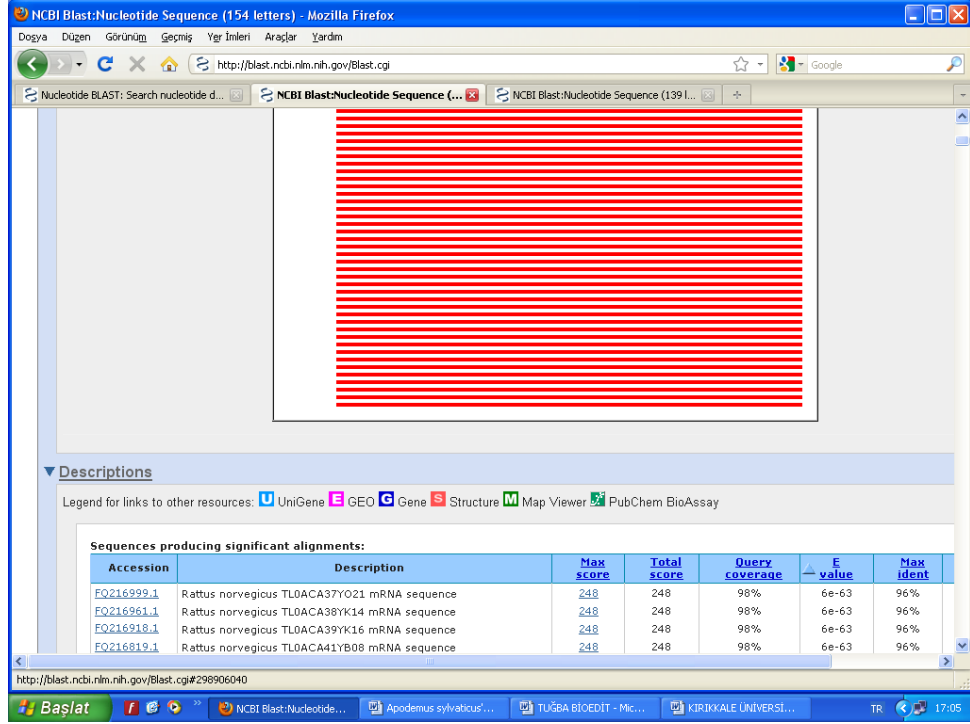
BioEdit bilgisayar yazılımı ile elde edilen baz dizileri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.3, 3.4, 3.5.).



Şekil 3.3. Baz dizileriyle ilgili BioEdit yazılım sonuçları



Şekil 3.4. Bazı türlerle yapılan karşılaştırmalarla ilgili sitokrom *b* genine ait BioEdit yazılım sonuçları



Şekil 3.5. Bazı türlerle yapılan karşılaştırmalarla ilgili β -aktin genine ait BioEdit yazılım sonuçları

3.7. DNA Dizini Analizi (Sequencing)

Apodemus sylvaticus' a ait kulak dokusundan sitokrom *b* genine ait 139 bç uzunluğunda dizin elde edildi. Elde edilen dizine ait baz sıralaması “TGA ATC TGA GGA GGC TTC TCA GTA GAT AAA GCC ACA TTA ACA CGT TTC TTC GCC TTC CAC TTC ATT CTT CCA TTT ATT ATC GCT GCC TTA GTA GTC GTC CAC CTC TTA TTT CTC CAC GAA CTG GAT CAA ACA ACC CAA A” şeklindedir.

Toplam 139 bç uzunluğundaki sekans analizinde Adenin bazları % 25.89, Timin % 31.65, Guanin % 13.66 ve Sitozin % 28.05'tir.

Apodemus sylvaticus' a ait kulak dokusundan β -aktin genine ait 154 bç uzunluğunda dizin elde edildi. Elde edilen dizine ait baz sıralaması “CGA TGA AGA TCA AGA TCA TTG CAC CTC CTG AGC GCA AGT ACT CAG TGT GGA TCG GTG GCT CCA TCC TGG CCT CGC TGT CCA CCT TCC AGC AGA TGT GGA TCA CCA AGC AGG AGT ACG ACG AGG CCG GTC CCT CCA TTG TCC ACC GCA AAT GCT T” şeklindedir.

Toplam 154 bç uzunluğundaki sekans analizinde Adenin bazları % 22.07, Timin % 21.42, Guanin % 25.32 ve Sitozin % 31.16'tir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Morfolojik olarak incelenerek *Apodemus sylvaticus* olduğu tespit edilen çalışmada kullanılan örneğe ait sitokrom *b* geni dizini % 84-96 oranlarında değişik türler ile benzerlik göstermektedir. GenBank'tan elde edilen sonuçlara göre *Apodemus hermonensis* ile % 96 oranında benzerlik gösterirken, *Hemigalus derbyanus* ve *Oryzomys nitidus* ile % 88, *Neotoma* türleri, *Euryoryzomys nitidus*, *Gerbillus nigeriae* ile % 87, *Mus lepidoides* ile % 85, *Microtus thomasi* ile % 84 oranında benzerlik göstermektedir. Bunlardan *Hemigalus derbyanus* türü hariç tamamı Muridae familyasına ait olup çalışmada konu olan *A. sylvaticus* ile aynı familyaya dâhildirler. *Hemigalus derbyanus* türü memeli sınıfına ait olup Etçiller takımına dâhildir. Bu açıdan farklı takımlara ait bu türün *A. sylvaticus* ile moleküler yönden benzerlik taşıdığı görülmektedir. *Oryzomys nitidus* Cricetidae takımına ait olup *A. sylvaticus* ile farklı takımlardan olduğundan tür kıyaslamasına gidilememektedir. Taksonomik açıdan çalışmayı anlamlı kılan aynı takım ve aynı cinse dâhil olan *A. hermonensis* ile olan yüksek orandaki benzerliğidir. Morfolojik açıdan benzerliği çok fazla olan *A. sylvaticus* ile *A. hermonensis* türlerinin, yapılan bu çalışmada moleküler yönden de yüksek oranda benzerlik taşıdığı görülmektedir. Tam bir tür kıyaslaması yapılabilmesi için sitokrom *b* ve β -aktin genlerinin çalışıldığı gen bölgelerinin daha fazla uzunlukta olması gerekmektedir. Ayrıca yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar sitokrom *b* geni açısından Martin ve Gerlach (2000) tarafından elde edilen bulgulara uyumlu görülmektedir.

β -aktin geni dizini ile ise yine % 96 oranında *Rattus norvegicus* ile benzerlik göstermektedir. Dolayısı ile sitokrom *b* ve β -aktin genleri *Apodemus* türlerinin ayrımı için kullanılmak istenirse sitokrom *b* geni uygun bir alternatif olarak görülmektedir. β -aktin geninin farklı cinse ait tür ile benzerlik göstermesi daha sonra yapılacak çalışmalarda *A. sylvaticus* türünün evrimsel yönden incelenmesi açısından sitokrom *b* geninin çalışılması uygun olduğu görülmektedir. Bu gen bölgesinin tam çalışılması *A. sylvaticus*'un *Apodemus*'un diğer türleriyle olan yakınlık uzaklık durumunu ve taksonomik açıdan değerlendirilmesini olanak sağlayacaktır.

Çalışmada elde edilen 139 baz çiftinden oluşan DNA dizini Martin ve Gerlach (2000) tarafından elde edilen 1140 bç DNA dizininden oldukça kısadır. Bu durum Martin ve Gerlach (2000) tarafından kullanılan ve sitokrom *b* genini tespit etmek için kullandıkları 1. primer çiftinin DNA dizini elde etme açısından bu çalışmada kullanılmalıdır. Dolayısı ile tür karşılaştırması yapmak açısından yetersizdir. Sonraki çalışmalarda Martin ve Gerlach (2000) tarafından kullanılan 2. primer çiftinin kullanılması tam bir değerlendirme vermesi açısından olumlu olacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2010a., employees.csbsju.edu/.../dna/oldnalanguage.html (Erişim tarihi: 16.01.2010).
- Anonim, 2010b., www.biocrawler.com/.../index.php?dir=a%2Fab%2F (Erişim tarihi: 08.03.2010).
- Anonim, 2010c., http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_b (Erişim tarihi: 20.07.2010).
- Anonim, 2010d., <http://en.wikipedia.org/wiki/Actin> (Erişim tarihi: 09.09.2010).
- Bartmann, S., Gerlach, G., 2001. Multiple paternity and similar variance in reproductive success of male and female wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*) housed in an Enclosure. *Ethology*, 107:888-899.
- Corbet, G.B., 1978. Mammale of the Palaearctic region: a taxonomic review. British Museum (Natural History) Cornell University Press. London and Africa, 74-136.
- Çolak, R., Çolak, E., 2005. Morphometric, karyotypic and electrophoretic analysis of the genus *Apodemus* Kaup, 1826 (Mammalia, Rodentia) in Thrace, Turk J. Zool. 29: 147-153.
- Danford, C., Alston, E., 1877. On the Mammals of Asia Minor. *Proc. Zool. Soc.*, London, 270-281.
- Davidian, B. J., Vahdati, M., 1991. Genetic differentiation in four species of *Apodemus* from southern Europe: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius* and *A. mystacinus* (Muridae, Rodentia). *Z. Saugetierkunde*, 56: 25-33.
- Demirsoy, A., 2003. Türkiye Omurgalıları Memeliler. Türkiye Omurgalı Faunasının Sistematik ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması ve Koruma Önlemlerinin Saptanması. Meteksan A. Ő., Maltepe, Ankara.
- Doğramacı, S., 1974. Türkiye *Apodemus* (Mammalia: Rodentia)'larının Taksonomik Durumları, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Araştırma Eserleri Serisi, Ankara, 1-56.

- Durmaz, R., 2001. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri, 15-70.
- Ellerman, J.R., Morrison-Scott, T.C.S., 1951. Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758-1946. Brit. Mus. (Nat. Hist.), London, 1-810.
- Filippucci, M. G., 1992. Allozyme variation and divergence among European, Middle Eastern and North African species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae). Israel Journal of Zoology, 38: 193-218.
- Filippucci, M. G., Storch, G., 1996. Taxonomy of the genus *Sylvaemus* in western Anatolia morphological and electrophoretic evidence (Mammalia: Rodentia: Muridae). Secnckenbergiana Biologica. 75: (1) 1-14.
- Filippucci, M. G., Simson, S., 1989. Evolutionary biology of the genus *Apodemus* Kaup, 1829 in Israel. Allozymic and biometric analysis with description of a new species: *Apodemus hermonensis* (Rodentia. Muridae), Bool. Zool. 56: 361-376.
- Frynta, D., Mikulova, P., 2001. Discriminant Analysis of Morphometric Characters in Four Species of *Apodemus* (Muridae: Rodentia) from Eastern Turkey and Iran. Israel Journal of Zoology, 47: 243-258.
- Gerstein, A.S., 2001. Molecular Biology Problem Solver a Laboratory Guide. Wiley-Iss, Canada.
- Haim, A., Plaut, I., 1996. Physiological diversity within and among wood Mouse (*Apodemus*) species in Israel. Israel Journal of Zoology, 42:347-351.
- Hall, R.E., Leonard, A.B., 1956. Comments on the taxonomic status of *Apodemus peninsulae*, with description of a new subspecies from North China. University of Kansas Publications, Museum of Natural History, 9 (8): 337-346.
- Harrison, D.L., Bates, P.J.J., 1991. The Mammals of Arabia. Harrison Zoological Museum, 237-243.
- Henderson, D.S., 2006. Methods in Molecular Biology DNA Repair Protocols Mammalian Systems. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Hu, P., Wu, S., Hernandez, N., 2004. A role for β -actin in RNA polymerase III transcription, Genes Dev., 18 (24): 3010–3015.).
- Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. J Mol Evol., 32(2):128-44.

- Jones, M. A. J., Amori, G., Bogdanowicz, W., 1999. The Atlas of European Mammals. T&AD Poyser Natural History, 266- 276.
- Jones, J. K., 1956. Comments on the taxonomic status of *Apodemus peninsulae*, with description of a new subspecies from North China. University of Kansas Publications Museum of Natural History. 9(8):337-346.
- Klug, S.W., Cummings, M.R., 2003. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 6: 513-747
- Krystufek, B., Janzekovic, F., 2004. Geometric morphometry of the upper molars European wood Mouse *Apodemus*. Folia Zool. 53(1):47-55.
- Krystufek, B., 2002. Identity of four *Apodemus (Sylvaemus)* types from the eastern Mediterranean and the Middle east. Mammalia. 66(1):43-51.
- Krystufek, B., Francky, R.M., 2005. Mt. Hermon field Mouse *Apodemus iconicus* is a member of the European mammal fauna. Folia Zoology. 54 (1-2): 69-74.
- Kurtonur, C., Albayrak, İ., Kıvanç, E., Kefelioğlu, H., Özkan, B., 1996. Türkiye Omurgalıları Tür Listesi; Memeliler (Mammalia). DPT/TBAG- Çev. Sek., Nürol Matb., Ankara, 1-23.
- Kuru, M., 1994. Omurgalı Hayvanlar. Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Matbaası, Ankara. 548-648.
- Macholan, M., Filippucci, M. G., 2001. Allozyme Variation and systematic of the genus *Apodemus* (Rodentia:Muridae) in Asia Minor and Iran, Journal of Mammalogy, 82(3):799-813.
- Martin, Y., Gerlach, G., 2000. Molecular phylogeny of European Muroid Rodents based on complete cytochrome b sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 16 (1): 37-47.
- Mayer, F., Dietz, C., Kiefer, A., 2007. Molecular species identification boosts bat diversity, Frontiers in Zoology, 4:4 doi: 10.1186/1742-9994-4-4.
- Michaux, J., Reyes, A., 2002. Evolutionary history of the most speciose mammals: molecular phylogeny of Muroid Rodents. Molecular Biology and Evolution. 18 (11): 2017-2031,
- Michaux, J.R., Magnanou, E., 2003. Mitochondrial phylogeography of the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. Molecular Ecology. 12: 685-697.

- Musser, G.G., Cartelon, M. D., 1996. Taxonomy and distributional records of oriental and European *Apodemus*, with a review of the *Apodemus-Sylvaemus* problem. *Bonn. Zool. Beitr.* 46 (1-4): 143-190.
- Neithammer, J., 1978. *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) Felsenmaus. 306-324, in *Handbuch der Säugetiere Europas* (J. Neithammer and F. Krapp, eds.). Akademische Verlagsgesellschaft (Wiesbaden), 1: 1-476.
- Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z., Yaffe, D., 1983. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic β -actin gene, *Nucleic Acids Research*, 11: 6
- Reutter, B.A., Hausser, J., 1999. Discriminant analysis of skull morphometric characters in *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, and *A. alpicola* (Mammalia: Rodentia) from the Alps. *Acta Theriologica*, 44 (3): 229-308.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual*. Agarose gel electrophoresis. Sambrook and Russell ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1 (3): 55- 517.
- Surzycki, S., 2000. *Basic techniques in molecular biology. PCR analysis*. Springer Berlin Heidelberg, USA, 406-413.
- White, B.A., 1993. *Methods in Molecular Biology PCR protocols current methods and applications*. Humana Press, Inc, Totowa, New Jersey, 15: 1-40
- Yorulmaz, T., Albayrak, İ., 2009. Studies on the morphology and karyology on the genus *Apodemus* from Turkey, with some notes on the bioecology. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 3 (1): 32-38.
- Zimmermann, K., 1962. Die Untergattungen der Gattung *Apodemus* Kaup. *Bonn. Zool. Beitr.*, 13: 198-208.