

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN KAYALIK FARESİ,
Apodemus mystacinus (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia)
POPULASYONLARININ RAPD-PCR ANALİZİ

Gül OLGUN

Biyoloji Anabilim Dalı

ANKARA

2007

Her Hakkı Saklıdır©

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN KAYALIK FARESİ, *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) POPULASYONLARININ RAPD-PCR ANALİZİ

Gül OLGUN

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK

Apodemus mystacinus Balkanlar'dan Orta Asya ve Kafkasya'ya kadar geniş yayılış göstermektedir. Türkiye'de *A. mystacinus*'un üç alttürü bulunmaktadır. Daha önceki bir çok çalışma da dahil olmak üzere, *A. mystacinus*'un Türkiye'deki taksonomik durumu problemlidir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'deki *A. mystacinus*'un DNA markerlarına dayanarak genetik yapısını araştırmak ve populasyon genetiğine katkıda bulunmaktır. Türkiye'deki 9 lokaliteden toplam 18 birey toplandı. *A. mystacinus* populasyonlarındaki genetik varyasyonun miktarını ortaya koymak için RAPD-DNA marker sistemi kullanıldı. Çalışılan populasyonlar arasındaki genetik ilişkileri göstermek için Nei'nin genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamaları kullanıldı. Hesaplamalar POPGENE ve POPULATION bilgisayar programları ile yapıldı. Çalışılan 60 RAPD markerının 14 tanesi 154 polimorfik RAPD bandı ortaya koymuştur. *A. mystacinus* populasyonları için hesaplanan genetik farklılık Trabzon populasyonunda $H = 0,0227$ (%P= 4,55) ile Muğla populasyonunda $H = 0,2045$ (%P= 40,91) aralığındadır. *A. mystacinus* populasyonlarındaki toplam genetik farklılık $H_T = 0,3087$ olarak hesaplandı. Çalışılan populasyonlar arasındaki genetik farklılığı gösteren G_{ST} değeri (0,7438) önemli derecede yüksek çıktı. Genetik mesafe verisiyle oluşturulan dendrogram 3 kümelenme gösterdi. *A. mystacinus* kümesindeki gruplanmanın önceden belirlenen alttür kategorileri ile kısmen uyumlu idi.

2007, 62 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Kayalık Faresi, *Apodemus mystacinus*, RAPD-PCR, Türkiye.

ABSTRACT

Master Thesis

RAPD-PCR ANALYSIS OF ROCKY MOUSE, *Apodemus mystacinus* (DANFORD AND ALSTON,1877) (MAMMALIA: RODENTIA) IN TURKEY

Gül OLGUN

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Apodemus mystacinus is widely distributed from Balkans to Middle East and Caucasus.

Three subspecies of *A. mystacinus* are distributed in Turkey. Despite of several previous studies, the taxonomic status of *A. mystacinus* in Turkey is problematic. The aim of the present study is to survey genetic structure based on DNA markers and to make contribution to the taxonomic status, population genetics of *A. mystacinus* in Turkey. A total of 18 specimens were collected from 9 locations in Turkey. To explore the extent of genetic variation in *A. mystacinus* populations a Randomly Amplified Polymorphic DNA marker system was used. The estimates of Nei's standard genetic identity and standard genetic distance were calculated to show the genetic relationships between studied populations. All estimations were calculated with the POPGENE and POPULATION softwares. With the 60 RAPD markers tested, 14 of them yielded 154 polymorphic DNA bands. The estimated genetic diversity for *A. mystacinus* populations was ranged from $H = 0.0227$ (%P= 4.55) for Trabzon and to 0.2045 (%P=40.91) for Muğla population. The total genetic diversity was calculated as $H_T = 0.3087$ in *A. mystacinus* populations from Turkey. G_{ST} value calculated was high (0.7438) indicating that genetic differentiation among the studied populations was substantial. Dendrogram constructed with genetic distance data contained 3 clusters. The groupings in the *A. mystacinus* cluster were partly consistent with the previously assigned subspecific categories.

2007, 62 Pages

Key Words: Rocky Mouse, *Apodemus mystacinus*, RAPD-PCR, Turkey.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımnda, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan daima bana destek olan tez danışmanım Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK'a; örnek temini ve teşhisinde yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK'a ve Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e; bu çalışmanın her aşamasında beni yönlendiren, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. İrfan KANDEMİR'e ve Dr. Gaye KANDEMİR'e; değerli hocam Doç. Dr. Ahmet KARATAŞ'a; her an bana yol gösteren ve manevi desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Teoman KANKILIÇ'a; jel görüntüleme sistemlerini benimle paylaşan Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma ve özellikle Banu ÖZDEN'e; her türlü laboratuvar ihtiyaçlarımı karşılayan ve kapılarını bana her daim açık tutan Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda çalışan değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma; manevi desteklerinden güç bulduğum arkadaşlarım Zeycan CEYHAN, Pınar ÇAM, Şafak BULUT, Duygu YÜCE, Ufuk GÜNDURU, Sevilay ÜSTÜNBAŞ, Sidar BEREKETOĞLU, Duygu AKKAYA ve Omurgalı Hayvan Sistematiği Laboratuvarı'nda çalışan tüm arkadaşlarıma ve de varlıklarıyla ayakta kaldığım maddi ve manevi tüm desteklerini benden hiç bir zaman esirgemeyen her adımında yanımda olan aileme, sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğü tarafından 2005-07-05-099 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Gül OLGUN

Ankara, Temmuz 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Ordo: Rodentia.....	4
2.2 Familia: Muridae (Fareler ve Sıçanlar).....	5
2.3 Genus: <i>Apodemus</i> Kaup, 1829.....	5
2.3.1 Species: <i>Apodemus mystacinus</i> Danford and Alston, 1877	5
2.3.2 Species: <i>Apodemus sylvaticus</i> Linnaeus, 1758.....	6
2.3.3 Species: <i>Apodemus flavicollis</i> Melchior, 1834	6
2.3.4 Species: <i>Apodemus agrarius</i> Pallas, 1771	6
2.3.5 Species: <i>Apodemus uralensis</i> Pallas, 1811	7
2.3.6 <i>Apodemus iconicus</i> Heptner, 1948	7
2.4 Morfoloji	7
2.5 Markerler (Belirteçler)	8
2.5.1 Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markerler.....	9
2.5.2 PCR (Polimerase Chain Reaction)'a dayalı DNA markerleri	9
2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	11
2.6.1 Taq Polimeraz	14
2.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Avantajları	16
2.7 RAPD-PCR.....	16
2.7.1 RAPD Polimorfizminin İzlenmesi	17
2.8 RAPD-PCR Problemleri ve Bazı Çözümleri	19
3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1 Materyal.....	26
3.2 Yöntem	28
3.3 DNA İzolasyonu.....	28

3.4 DNA Miktarının Belirlenmesi.....	30
3.5 RAPD Primerleri.....	31
3.6 RAPD-PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu	32
3.7 Agaroz Jel Elektforezi.....	34
3.8 Jellerin Yorumlanması	34
3.9 Veri Analizleri	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1 İstatistik Analizi Sonuçları.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Rekombinant DNA teknolojisi	10
Şekil 2.2 Primer-kalıp bağlanması	12
Şekil 2.3 Denatürasyon	13
Şekil 2.4 Bağlanma	13
Şekil 2.5 Polimeraz enzimi bağlanması ve zincir uzaması	14
Şekil 2.6 Bir zincir reaksiyonu olan PCR	15
Şekil 2.7 a Güçlü ve zayıf bandın şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.7 b Jel üzerindeki görünüm.....	22
Şekil 3.1 <i>Apodemus</i> ve <i>Mus</i> örneklerinin toplandığı bölgelerin harita üzerinde gösterimi.....	27
Şekil 4.1 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-06 (5'-TGCTCTGCCC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	37
Şekil 4.2 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-07 (5'-GGTGACGCAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	37
Şekil 4.3 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-08 (5'-GTCCACACGG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	38
Şekil 4.4 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-09 (5'-TGGGGGACTC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	38
Şekil 4.5 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-12 (5'-CCTTGACGCA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	39
Şekil 4.6 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-17 (5'-AGGGAACGAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	39
Şekil 4.7 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-19 (5'-ACCCCGAAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	40
Şekil 4.8 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPB-20 (5'-GGACCCTTAC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	40
Şekil 4.9 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPD-02 (5'-GGACCCAACC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	41
Şekil 4.10 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPD-03 (5'-GTCGCCGTCA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	42

Şekil 4.11 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPD-13 (5'-GGGGTGACGA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	42
Şekil 4.12 <i>A.mystacinus</i> örneklerinin OPD-15 (5'-CATCCGTGCT-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	43
Şekil 4.13 Nei (1972)'nin standart genetik mesafe ölçümlerine göre yapılan yakın bağlantı ağacı (NJ).	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 <i>A. mystacinus</i> türü örnek bölgeleri.....	26
Çizelge 3.2 Çalışmada dış grup olarak kullanılan türler ve bölgeleri	27
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları	30
Çizelge 3.4 Analizlerde kullanılan primerler ve baz dizileri	31
Çizelge 3.5 Bellinvia <i>et al.</i> , 1999 tarafından uygulanan PCR reaksiyonu.....	32
Çizelge 3.6 Mishra <i>et al.</i> , 2002 tarafından uygulanan PCR reaksiyonu	32
Çizelge 3.7 Kaya and Neale, 1995 tarafından uygulanan PCR reaksiyonu.....	33
Çizelge 3.8 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü programı.....	33
Çizelge 3.9 Optimum reaksiyon koşulları.....	33
Çizelge 4.1 Tüm lokuslar için genetik varyasyon analizleri (Nei, 1987).....	45
Çizelge 4.2 Alt popülasyonlar için genetik farklılaşma analizleri (Nei, 1987).....	45
Çizelge 4.3 Genetik mesafe (çizelgenin üstündeki) ve genetik benzerlik (çizelgenin altındaki) hesaplamaları (Nei, 1972).....	46
Çizelge 4.4 Nei (1972)'nin standart genetik mesafe değerleri (Ds).....	47

1. GİRİŞ

Orman faresi *Apodemus* Kaup, 1829 cinsi Palearktik bölgenin ılıman alanlarında geniş yayılış göstermektedir (Filippucci *et al.* 2002). Cins, Zimmermann (1962)'a göre üç altcins ayrılmaktadır. Bu altcinslerden *Apodemus* Kaup, 1829 Orta Avrupa'dan Doğu Asya'ya kadar, *Sylvaemus* Ognev and Worobiev (1923) Batı Palearktik'te ve *Alsomys* Dukelski (1829) Doğu Palearktik'te yayılış göstermektedir (Musser and Carleton 1993). Bununla beraber son zamanlarda *Apodemus-Sylvaemus* sistematik problemi üzerine odaklanan Musser *et al.* (1996), orman faresini üç altcins altında toplamıştır. Bunlar, *Sylvaemus*, *Apodemus* ve *Argenteus*'dur. Bu altcinslerde yer alan türler aşağıdaki gibidir:

Sylvaemus altcinsi: *A.sylvaticus*

A.flavicollis

A.uralensis

A.mystacinus

A.fulvipectus

A.hermonensis

A.alpicola

A.arianus

A.hyrceanicus

A.ponticus

A.rusipes

A.wardi

Apodemus altcinsi: *A.agrarius*

A.chevrieri

A.speciosus

A. peninsulae

A.latrorum

A. droco

A. semotus

A.gurkha

Argenteus altcinsi: *A.argenteus*

Balkan Yarımadası ve Ortadoğu’da bulunan *Apodemus mystacinus*, diğer *Sylvaemus* türlerinden morfolojik olarak açık bir şekilde ayrılabilir ve bundan dolayı bazı yazarlar tarafından *Karstomys* (Martini 1939) altcinsine ayrılmış olmakla birlikte *Karstomys*’in geçerliliği genellikle kabul edilmemiştir (Filippucci *et al.* 2002).

Ancak bu altcins ayrımları ve altcinsler içindeki türlerin taksonomik durumları hala tartışmalıdır.

Türkiye’de *Apodemus* cinsine ait altı tür yayılış göstermektedir. Kayalık faresi olarak bilinen *Apodemus mystacinus*’un Türkiye’deki kaydı ilk olarak Danford and Alston (1877) tarafından Sebil (Mersin)’den verilmiştir. Bu tür, deniz seviyesinden 2700 m yüksekliğe kadar, ormanların içinde veya açık alanlarda bulunan kayalık bölgelerde yaşar (Çolak vd. 2004). *A. mystacinus*, Yunanistan, Yugoslavya, Bulgaristan, Suriye, Lübnan, Filistin, Irak ve Kafkasya’da yayılış göstermektedir (Ellerman and Morrison-Scott 1951, Corbet 1978, Musser and Carleton 1993). Tür, beş alttüre sahiptir.

Bu alttürlerden:

A. m. mystacinus Danford and Alston, 1877 Sebil’de

A. m. epimelas Nehring, 1902 Yunanistan ve Ege Adaları’nda

A. m. smyrnensis Thomas, 1903 Batı Türkiye’de

A. m. rhodius Festa, 1914 Rodos ve Girit Adaları’nda

A. m. euxinus Allen, 1915 Türkiye’nin kuzeyinde Altındere (Trabzon)’de kaydedilmiştir.

Ellerman (1948), *A. m. rhodius* ve *A. m. smyrnensis*’i *A. m. mystacinus*’un sinonimi olarak kaydetmiştir. Ellerman ve Morrison-Scott (1951)’a göre *A. m. euxinus*, ayrı bir alttürdür ve *A. m. smyrnensis*, *A. m. mystacinus*’un sinonimidir. Mezherin (1997), *A. m. epimelas*’ı tür statüsüne yerleştirmiş ve bu da alloenzim çalışmalarına dayanarak Filippucci *et al.* (2002) tarafından desteklenmiştir. Vohralik *et al.* (2002), *A. m. mystacinus* ve *A. m. epimelas*’ın taksonomik statülerini teyit ederek Altındere (Trabzon)’den tanımlanan *A. m. euxinus*’un farklı bir alttür olamayacağını belirtmişlerdir. Doğramacı (1972) morfolojik ve biyometrik değerlendirmelerinde, *A. m. mystacinus* ve *A. m. euxinus*’un Anadolu’da yayılış gösterdiğini ve *A. m. mystacinus*’un

Balkanlar'da yaşıyan *A. m. epimelas*'tan ayrıldığını, Ardanuç örneklerinin *A. m. mystacinus* ve *A. m. euxinus* arasında hibrit özellikte olduğunu kaydetmiştir. Verimli vd. (2000), Batı Anadolu, Akseki ve Ardanuç populasyonlarının kan serum proteinlerine göre ayrıldıklarını göstermiştir. Çolak vd. (2004), yaptıkları çalışmalarda morfolojik ve biyometrik özelliklerine göre *A. m. mystacinus*'un *A. m. euxinus*'tan ayrıldığını kaydetmişlerdir.

Son yıllarda morfolojik olarak benzer taksonların taksonomik statülerinin belirlenmesinde genetik markerler kullanılarak filogenetik ilişkilerden yararlanılmakta ve bu bilgiler, diğer karakterlerle birlikte kullanılmaktadır. Populasyon içi ve populasyonlar arasındaki genetik değişkenlik üzerindeki çalışmalar, türleşme ve evrimsel değişimlerin daha iyi anlaşılabilmesi için iyi bir bakış açısı sağlayabilir (Almeida *et al.* 2000). Genetik çalışmalardan yararlanılarak birçok yeni tür tanımlanmış (Filippucci *et al.* 1989, Mezhzherin and Zagorodnyuk 1989, Vorontsov *et al.* 1992) ve çeşitli alttürler tür seviyesine yükseltilmiştir (Storch and Lütt 1989, Mezhzherin 1991, Vogel *et al.* 1991, Mezhzherin *et al.* 1991, Vorontsov *et al.* 1992, Orlov *et al.* 1996).

Apodemus cinsi üzerinde yapılan sistematik çalışmalar için geleneksel morfolojik yaklaşımlar, türlerin benzer dış görünüşleri ve özellikle *Sylvaemus* altcinsi içindeki fenotipik sibling türlerin yaygın olarak bulunması yüzünden zordur. Bu yüzden çeşitli genetik markerlerin (belirteçlerin) kullanıldığı uygulamalarda önemli başarılar elde edilmiştir (Engel *et al.* 1973, Csaikl *et al.* 1980, Britton-Davidian *et al.* 1991, Filippucci 1992, Lavrenchenko and Likhnova 1995, Vapa *et al.* 1995). Ancak son yıllarda allozim çalışmaları dışında genomik ve mitokondriyal DNA üzerinde PCR'a dayalı çeşitli moleküler filogenetik yaklaşımları kullanan araştırmalar da yapılmıştır (Csaikl *et al.* 1990, Michaux *et al.* 1996, Chelomina *et al.* 1998, Reutter *et al.* 2002, Makova *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 1990, Libois *et al.* 2001, Tegelström and Jaarola 1989, Michaux *et al.* 1998, Chelomina 1998, Hsu and Lin 2001, Bellinvia *et al.* 1999, Michaux *et al.* 2005).

Bütün bu bilgilere dayanarak *A. m. mystacinus* ile *A. m. euxinus* alttürlerinin taksonomik durumlarının kesinlik kazanmadığı ve taksonomik problemlerin çözümünde

uygulanan metotların yanında yeni metotların kullanılmasının gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle RAPD-PCR yöntemi ile *A. mystacinus* populasyonlarının analiz edilerek alttür problemlerinin çözümüne ve türün populasyon genetiğine katkı sağlanması tezin amacını oluşturmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Regnum: Animalia

Classis: Mammalia

Subclassis: Eutheria

2.1 Ordo: Rodentia

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

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

Bazı türlerde besinin toplanmasına yarayan yanak keseleri vardır. Mideleri basit, kör bağırsakları uzundur. Kuyrukları uzun, bazı türlerde pullarla örtülüdür. Toprak altında tüneller kazarak yaşayanlarda tırnaklar gelişmiştir. Gözler yaşam biçimine bağlı olarak farklı büyüklükte olabilir. Toprak altında yaşayanlarda gözler küçülmüş hatta bazı türlerde körelerek deri altında kalmıştır. Gececil olanlarda ise oldukça büyüktür. Kulaklar da yaşam biçimine göre değişik şekiller gösterirler. Örneğin toprak altında ve suda yaşayanlarda oldukça küçülmüştür. Gebelik süreleri 14–170 gün arasında değişir. Çoğunluğu yılda birkaç defa doğururlar ve her defasında 1–18 yavru yaparlar. Küçük kemiriciler iki yıldan daha az yaşarlar (Ceyhan 2007).

2.2 Familia: Muridae (Fareler ve Sıçanlar)

Vücut büyüklüğü ev faresinden sıçan büyüklüğüne kadar değişir. Kuyruk uzun, beden 2/3 kadardır. Kulaklar, gözler ve ardayaklar nispeten büyüktür. Molarlar daima köklü ve çiğneme yüzeylerinin üstü kabarık çıkıntılı, çıkıntılar en iyi olarak M'de tanınmaktadır. Kafasında büyük infroorbital kanal bulunur. Beslenme, çok çeşitli olup tohum ve meyveleri tercih ederler. Kış uykusuna yatmazlar (Ceyhan 2007).

2.3 Genus: *Apodemus* Kaup, 1829

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

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

Asyatik Türkiye (Anadolu)'de yayılış göstermektedir. Ormanların içindeki kayalık bölgeler ya da açık alanlarda bulunan kayalık bölgelerde yaşarlar. Dorsal kürk rengi, ortasında daha koyu bir hat bulunduracak şekilde gri-siyah olarak kırçilli şekilde renklenmiştir. Yüz bölgesi bazı örneklerde biraz daha açıkken, geneli dorsal kürk rengine yakındır. Sırt kısmında bulunan koyu hat burundan kuyruk ucuna kadar ilerler. Karın bölgesiyle, dorsal kısım arasında hat belirgindir. Kuyruk üst yüzeyi dorsalle, alt yüzeyi ise karın bölgesiyle uyumlu olup iki renklidir. Karın kürkü saf beyazdan koyu griye kadar varyasyon gösterir. Göğüs lekesi bulunmamaktadır. Ön ve ardayakların üst kısmı beyaz ince, sık kıllarla örtülüdür. Ayak tabanları çıplak, tabandan geri kalan kısım karın kürküne benzer (Yiğit vd., 2006).

2.3.2 Species: *Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758

Tüm Türkiye’de yayılış göstermektedir. Tarlalarda ağaç topluluklarının bulunduğu yerlerde yaşarlar. Sırt kısımları grimsi kahverengi; sırtın orta kısmı genellikle koyulaşmış; karın kısmı beyazımsı gümüş grisidir. Gerdandaki sarımsı kahverengi benek, daha dar ve daha uzundur. Kuyruk belirgin olarak iki renkli; üstte sırtın ortası gibi koyu renkli, altta açıktır (Demirsoy 1996).

2.3.3 Species: *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834

Tüm Türkiye’de yayılış göstermektedir. Yağış alan ve yapraklarını döken ormanları tercih ederler. Dorsal kürk açık kıızıdan, koyu griye kadar çok geniş farklılıklar gösterir. Yüz bölgesi dorsal kürkle aynı renktedir. Dorsaldeki koyu çizgi tamamına yakınında bulunmasına rağmen bazı örneklerde yok ya da çok belirsiz şekildedir. Kuyruk iki renklidir, alt kısmı ventral, üst kısmı dorsal kürk rengindedir. Karın kürkü kirli beyaz renktedir. Göğüs lekesi çok çeşitlilik göstermektedir, genelde belirgin olmakla beraber, küçük lekeli ya da lekesiz örnekler de mevcuttur. Ön ve ardayakların üst kısmı sık, kısa ve kirli beyaz kıllarla kaplıdır. Ayak tabanları ise çıplaktır. Topuk kısımlarında belirgin bir koyulaşma vardır (Yiğit vd. 2006)

2.3.4 Species: *Apodemus agrarius* Pallas, 1771

Trakya’nın kuzeyinde yayılış göstermektedir. Yaprak döken ağaçların bulunduğu ormanlarda yaşarlar. Dorsal kürkü koyu kahverengi renktedir. Dorsaldeki siyah ince şerit türün karakteristik özelliğidir. Ventral kürk küllü gri renktedir ve dorsalle ayrımı çok belirgindir. Kuyruğun dorsal kısmı koyu, ventral kısmı ise dorsalden daha açık renktedir. Kuyruk kısa tüylerle kaplıdır (Yiğit vd. 2006).

2.3.5 Species: *Apodemus uralensis* Pallas, 1811

Bu tür Türkiye’de Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. Yapraklarını döken ağaçlardan oluşan ormanları tercih ederler. Dorsal kürk gri-kızıl kırçillı renktedir. Sırtta bulunan ve burun ucundan kuyruk sonuna kadar uzanan koyu hat diğer türlere göre bu türde çok belirgin değildir. Yüz bölgesi dorsal kürk rengiyle aynıdır. Dorsal ve ventral bölgeler belirgin bir hatla birbirinden ayrılır. Kuyruk iki renklidir, alt kısmı ventral, üst kısmı dorsal kürk rengi ile uyumludur. Ventral kürk rengi gri ve beyazın farklı tonlarında ve kırçillıdır. Göğüs lekesi genelde bulunmaz ancak bir örnekte nokta şeklinde olduğu saptanmıştır. Ön ve ardayakların üst kısmı beyaz, kısa ve sık kıllarla örtülüdür. Ayak tabanları çıplak, topuk kısmı ise kıllıdır (Yiğit vd. 2006).

2.3.6 *Apodemus iconicus* Heptner, 1948

Trakya hariç tüm Anadolu’da yayılış göstermektedir. Orman içlerinde ve yüksekliği 300-2800 metre arasında değişen dağlık arazilerde bulunurlar. Dorsal kürk rengi açık kızıl ve grinin değişik tonlarındadır. Sırtta bulunan koyu hat *A. iconicus*’ta az belirgindir, bazı örneklerde mevcut değildir. Ventral renklenme beyaz ve gridir. Dorsal kürk ile ventral kürk rengi yanlarda kesin bir hatla ayrılır. Kuyruk iki renklidir, alt kısmı ventral, üst kısmı dorsal kürkle uyumludur. Göğüs lekesi bu türde bulunmamaktadır, az sayıda örnekte (n=5) belirsiz bir çizgi halindedir. Ön ve arka ayaklar ince beyaz kıllarla örtülüdür. Ayakların tabanı çıplaktır (Yiğit vd. 2006).

2.4 Morfoloji

Atasal soy hatlarını çalışmanın bir yolu da yaşayan bütün varlıkların filogenisini oluşturmaktır. Evrensel bir filogeni en erken yaşam formlarının, hücresel doğalarının ötesinde, ilave karakteristik özelliklerinin çalışılmasına olanak sağlar. Tüm canlıların filogenisini oluşturmak için ilk girişim, organizmaların morfolojisine dayandırılmıştır. Morfolojik yaklaşım, ökaryotları içeren yaşam ağacının dalları ile ilgilenen biyologlar için verimli olmuştur. Morfoloji, tarihsel olarak çok sayıda taksonomik grubun filogenisinin temelidir (Freeman and Herron 1999).

2.5 Markerler (Belirteçler)

Biyologlar, amino asit dizilerini ve DNA ile RNA'daki nükleotid dizilerini okumak için yeni metodlar geliştirdiklerinde, filogenileri hesaplamak için yeni bir çok teknik kullanılmaya başlandı (Freeman and Herron 1999).

Sistematikçiler türler arasındaki filogenetik ayrımları yapabilmek için protein ve nükleik asitlerinin karşılaştırmalarını kullanırlar. Bu protein ve nükleik asitler, marker olarak adlandırılırlar. Markerler genel olarak protein markerler (izoenzimler) ve moleküler markerler (RAPD, RFLP, AFLP, SSR vb.) olarak iki grup altında toplanabilir. Moleküler markerler ise hibridizasyona dayalı markerler, PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı markerler ve ESTler (Expressed Sequence Tags) olarak gruplandırılır. Moleküler ve genetik anlamıyla marker, bir DNA parçasını ifade eder. Son 10 yıldır moleküler markerler hayvan genetiğinde, DNA seviyesindeki polimorfizmleri ortaya çıkarmak için anahtar rol oynamışlardır (Vignal *et al.* 2002).

Markerlerin kullanım amaçları çok çeşitli olmakla beraber şu şekilde sıralanabilir:

- Genetik haritaların hazırlanması
- Genetik parmak izi analizleri
- Doğrudan gen etiketlenmesi
- Genlerin klonlanması
- Genom analizleri ve organizasyonları
- Evrimsel gelişim
- Kromozomların yeniden yapılandırılması çalışmaları
- Genetik kaynakların ve çeşitlerin korunması çalışmaları
- Genetik varyasyon çalışmaları
- Populasyonlar arası genetik mesafenin veya filogenetik benzerliğin hesaplanması

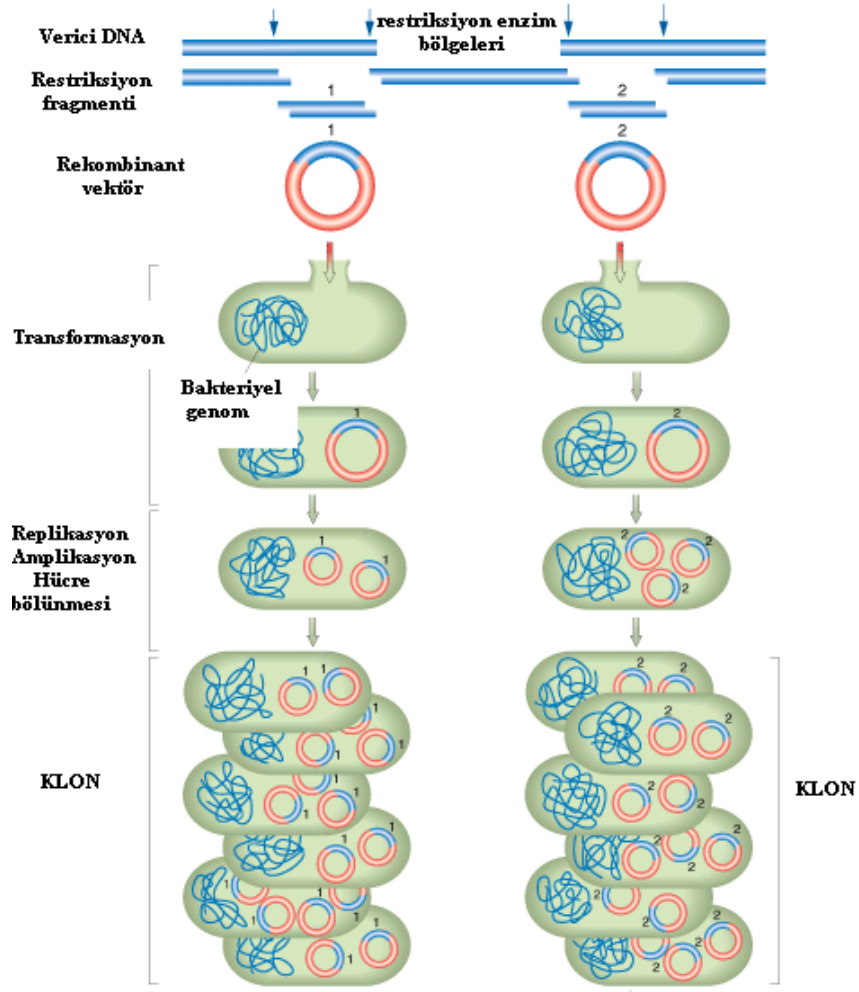
Şu anda en yaygın olarak kullanılan dört temel moleküler marker bulunmaktadır. Bunlar RFLP, RAPD, AFLP ve Mikrosatellit (ya da SSR-simple sequence repeat-, STR –short tandem repeat-)’dir.

2.5.1 Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markerler

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi olarak bilinen ve çeşitli şekillerde restriksiyon enzimleri ile kesilerek işaretlenmiş DNA parçalarının (prob), araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA ile hibridizasyonuna dayalı bir sistemdir. Farklı DNA parçalarının jel elektroforez yöntemi ile koşturularak ayrıştırılmasını ve bu parçacıkların membrana emdirilmesi (blotting) sonucunda prob-DNA hibridizasyonu basamaklarını içermektedir.

2.5.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)’a dayalı DNA markerleri

Rekombinant DNA teknolojisi, 1970’li yılların başında biyoloji bilimi için bir araç olarak geliştirildi (Arnheim and Erlich 1992). Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin birleştirilerek yeni bir kombinasyonun oluşturulmasını ifade eder. Bu teknikteki temel işlemler bir dizi basamağı içerir. Doku ya da hücrelerden izole edilen DNA moleküllerinin, restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşturulan parçaları vektör ya da taşıyıcı bir molekül ile birleştirilir. Kendi DNA’sı ile birlikte üzerinde yabancı DNA molekülü taşıyan vektörün oluşturduğu rekombinant DNA molekülü, bir konakçı hücreye aktarılır ve burada kendini konakçı hücre DNA’sı ile birlikte eşleyerek kopyalarını yavru hücreye aktarır. Klonlanmış DNA, konakçı hücrelerden izole edilip incelenebilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Rekombinant DNA teknolojisi
<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>

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

PCR'a dayalı moleküler markerler arasında en yaygın olarak kullanılanlar RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphism) ve Mikrosatellit (ya da SSR-simple sequence repeat-, STR –short tandem repeat-)’dir.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA olarak adlandırılmaktadır. 9-10 nükleotid uzunluğundaki primer DNA’lar kullanılarak, genom üzerinde rastgele bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirilir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA’lar çalışılır. Primer bağlanmasıyla, Polimeraz enzimi 5’→3’ yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltır ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boylarla boyanarak izlenebilir

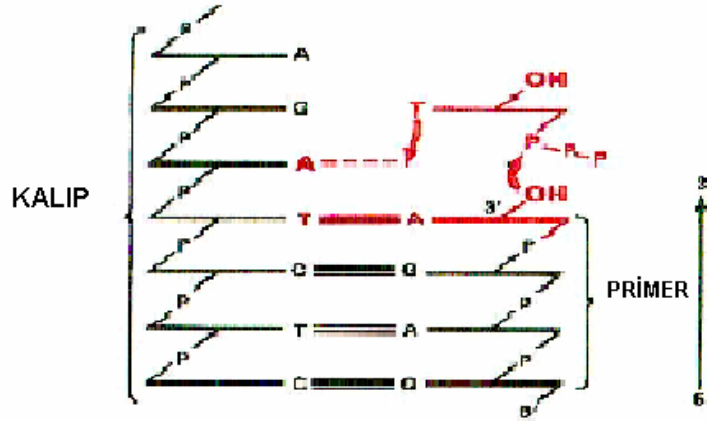
AFLP: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi denilen bu yöntem, restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarının seçici çoğaltılması temeline dayanmaktadır. AFLP’de dizi bilgisine gerek yoktur. RFLP ve RAPD yöntemlerine göre 10 kez daha fazla genetik lokus incelenebilmektedir ve nispeten çok daha kısa bir süre içerisinde binlerce bağımsız lokus hakkında yorum yapılabilmektedir.

Mikrosatellit: STR (short tandem repeat) Kısa Tandem Tekrarları ya da SSR (simple sequence repeat) Basit Dizi Tekrarları olarak da adlandırılan ve ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlanan 2–6 nükleotidli gruplara mikrosatellit denilmektedir. (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n ve (GACA)_n gibi örnekler verilebilir. Burada n, ardışık tekrar sayısıdır. Mikrosatellitler kodominant markerlerdir ve Mendel kalıtımı gösterir. Bu yöntemle heterozigot tayini yapılabilir.

2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR (Polymerase Chain Reaction) ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için hedef DNA’nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilere ihtiyaç vardır. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA’ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır (Arnheim and Erlich 1992). Oligonükleotidler, DNA polimeraz enzimi tarafından katalize edilen bir seri DNA sentez reaksiyonlarında primer olarak görev yaparlar (Şekil 2.2). Bu oligonükleotidlerin baz dizileri birbirlerinden farklı olup her bir

oligonükleotid, kalıp görevi gören çift sarmal DNA molekülünün tek sarmalına tamamlayıcıdır. İki oligonükleotid primere ilaveten, reaksiyonda bir ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve 4 dNTP molekülü yer alır.



Şekil 2.2 Primer-kalıp bağlanması

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

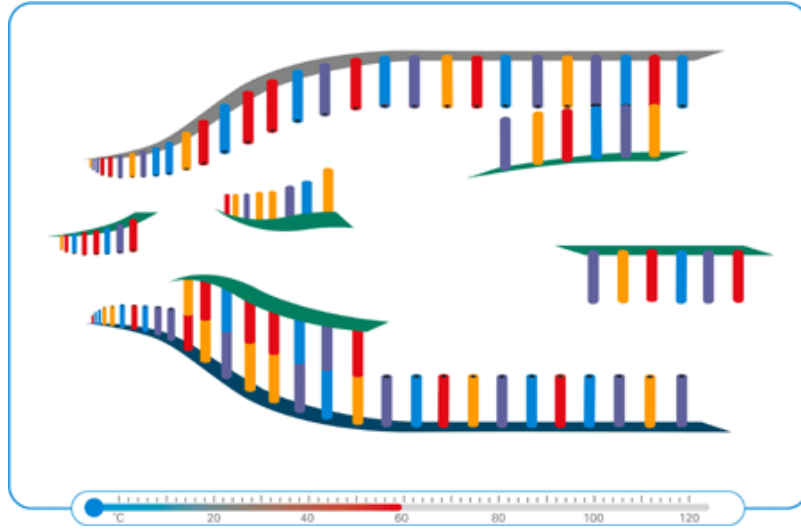
PCR reaksiyonunda üç temel basamak mevcuttur. Bunlar sırasıyla: Denatürasyon, Bağlanma (Annealing) ve Uzama (Extension) aşamalarıdır.

1. Denatürasyon: Çift zincirli DNA'nın tek zincir haline getirildiği basamaktır (Şekil 2.3). Buna göre ilk adımda, çoğaltılacak olan DNA, denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. İki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz ve 4 adet dNTP'den oluşan reaksiyon karışımı içinde bulunan DNA, 90–95°C'de 5 dakika süreyle ısıtılarak denatüre edilir.



Şekil 2.3 Denatürasyon (<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>)

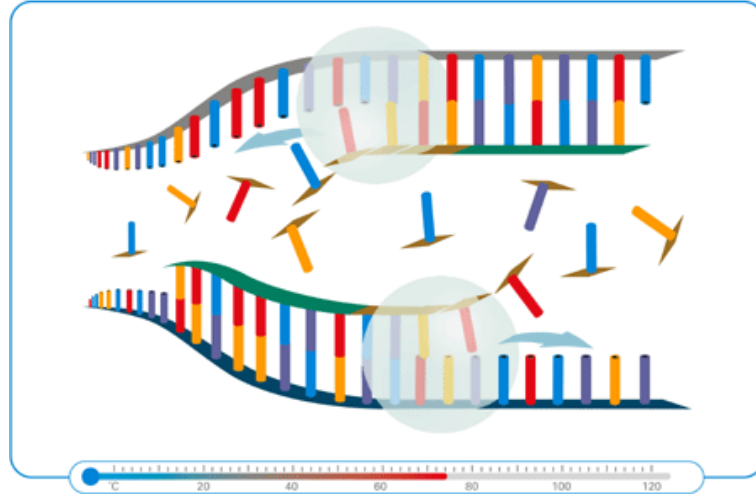
2. Bağlanma (Annealing): Primerlerin bağlandığı basamaktır (Şekil 2.4). Sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincir haline getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler, 15–30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir. Çoğaltılacak olan DNA bölgesinin uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanarak kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası görevi yaparlar.



Şekil 2.4 Bağlanma (<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>)

3. Uzama (Extension): DNA Polimeraz enzimi tarafından zincir uzamasının gerçekleştirildiği basamaktır (Şekil 2.5). DNA sentezi 70 ila 75°C arasında gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru

ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.



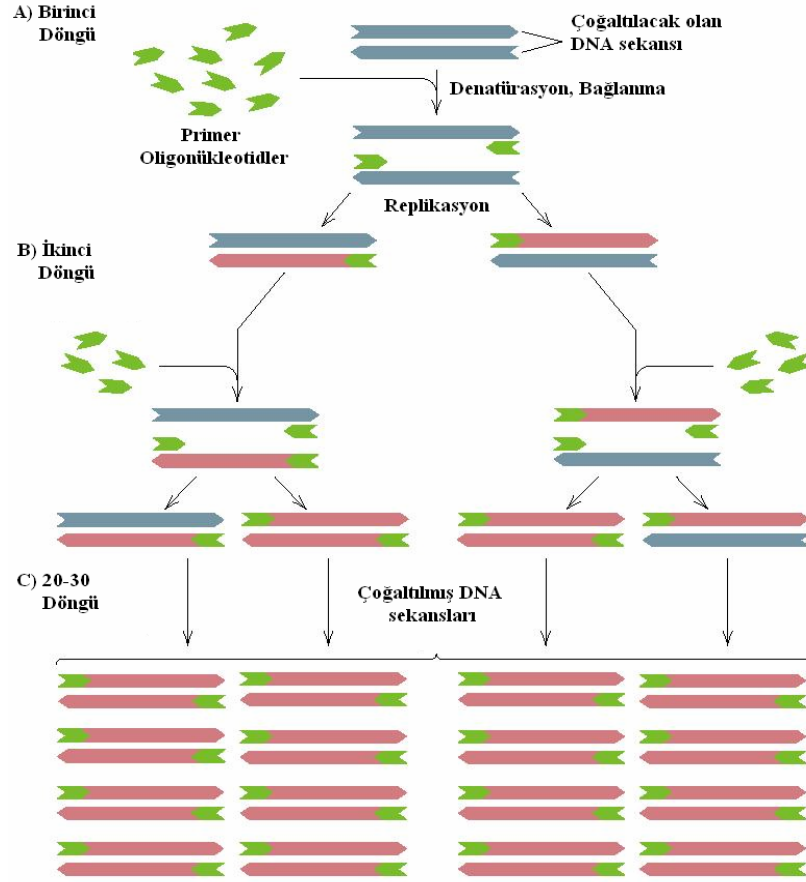
Şekil 2.5 Polimeraz enzimi bağlanması ve zincir uzaması
(<http://www.enigmadiagnostics.com/template2.php?page=technology.php&m=2>)

2.6.1 *Taq* Polimeraz

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

PCR, bir zincir reaksiyonudur, çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkmaktadır ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4–5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. 20–30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1.000.000 kez artış olur. İşlem, ısı döngücüsü (thermocycler)

denilen makinelerde, döngü sayısı ve sıcaklıkları önceden belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Bir zincir reaksiyonu olan PCR
(<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>)

2.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Avantajları

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

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

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

2.7 RAPD-PCR

Yüksek çözümlü genetik markerlerin çeşitliliği, evrim biyologlarına, bir canlı yapısını ve soy ağacını ortaya çıkartmak için çok büyük avantajlar sağlamıştır. Son yıllarda rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) nın gelişimiyle, bu teknik, populasyon genetiği ve genetik haritalamadan filocoğrafya ve tür tanımlamaya kadar birçok uygulama alanı bulmuştur. RAPD in ortaya koyduğu genetik bilgi ayrıca filogenilerin yeniden kurulması için de kullanılabilir (Landry and Lapointe 1996). RAPD, bütün PCR temelli markerlerin en basitidir. RAPD markerleri, küçük (10 baz), %50'den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PCR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Primerler, amplifikasyonun başlaması için karşılıklı yerlerdeki başlama bölgelerine bağlanmalıdır.

RAPD markerler anonimdirler ve dominant alleller gibi ifade edilirler. Ancak filogenetik akrabalıkların ortaya çıkartılmasında genellikle yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte, RAPD-PCR birçok taksonda, çoğu mendelian alleller gibi davranan bağımsız markerlerin polimorfizmini kolaylıkla ortaya çıkartabilmektedir. Evrimsel sınıflandırmalarda markerlerin birçoğu mevcut varyasyonları gösterir.

Williams *et al.* (1990) tarafından geliştirilen RAPD-DNA markerleriyle, bireyin DNA'sı artık nispeten daha ucuza ve öncelikli sekans bilgisine ihtiyaç duyulmadan çoğaltılabilmektedir. Radyoizotoplar gereksizdir. PCR, RAPD markerlerini çoğaltmak için kullanıldığından, az miktarda, parçalanmamış DNA gereklidir.

RAPD-PCR primerleri, belli bir hedef sekansı çoğaltmak için düzenlenmez. Çoğaltılmış lokus anonimdir ve genom arasına dağılmıştır. RAPD lokusu, çeşitli avantajlar taşımaktadır. Bunlardan biri de çalışılan takson için, nükleotid dizisinin önceden bilinmesine ihtiyaç duyulmamasıdır. Diğeri ise lokusların çoğunun nötral (tarafsız) markerler olarak iş görmesidir. Buna dayanarak birçok araştırmacı, RAPD lokuslarının ancak kullanılan oligonükleotidin primer bağlanma yerine tam olarak uyması sonucunda çoğaltılabileceğini ileri sürer. Williams *et al.* (1990), insan, soya, mısır ve maya DNA'sı ile yaptıkları testlerde primer bağlanma yerinde tek bir nükleotid değişiminin amplifikasyonu engelleyebileceğini göstermişlerdir.

2.7.1 RAPD Polimorfizminin İzlenmesi

Belirli bir lokustaki allel çeşitliliğini ölçmek için bireylerin genotiplerini belirlemek gerekmektedir. Jel elektroforezi, populasyonlardaki genetik varyasyon miktarını hesaplamak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Özetle elektroforez, molekülleri birbirinden ayırmada kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte jel üzerinde yer alan oyuklara molekül karışımını içeren solüsyon, pipet aracılığıyla doldurulur. Jel daha sonra elektrik akımını iletmesi için bir tampon çözelti içerisine yerleştirilir. Elektrodlara bağlanmış olan bir güç kaynağı jel ortamında bir elektriksel alanın oluşmasını sağlar. DNA molekülü öncelikle her bir nükleotidde bulunan fosfat grubu nedeniyle solüsyon içinde negatif yüklüdür. Uzunlukları ne olursa olsun tüm DNA molekülleri aynı yük/kütle oranına sahiptirler. Ancak, küçük DNA molekülleri elektroforez jelinde daha hızlı hareket ederler (Freeman and Herron 1999).

Jel üzerindeki farklı boyutlardaki bantların genellikle bağımsız lokusu temsil ettiği düşünülür ve bağımsız özellikler olarak değerlendirilir. Ancak her örnekte böyle bir durum yoktur. Martin *et al.* (1991) ve Smith *et al.* (1994), farklı bantların homolog diziler içeren tek bir primerle çoğaltılabileceğini göstermişlerdir. Bu da farklı bantların bağımsız özellikleri gerektirmediğini gösterir. Bu tür bantlar, aynı lokustaki homolog allelleri veya gen dublikasyonlarını gösterebilir.

Bazı durumlarda, bir bandın varlığına ya da yokluğuna karar vermek zor olabilmektedir çünkü, bant yoğunlukları kantitatif olarak değişebilir. Bant yoğunluğunun kendisi, kalıtılabilir olmasına rağmen kalıtsal olmayan faktörler, örneğin PCR şartları, DNA konsantrasyonları ve diğer lokuslarla ilişkiler önemli derecede bant yoğunluğunun varyasyonuna sebep olabilir.

Çoğunlukla farz edilen şudur; belirli bir primer, aynı moleküler ağırlıklı bantları amplifiye ettiği zaman, aynı allelik durumu ifade edebilmektedir, bu da dominant (baskın) alleldir. Tersine bir bandın yokluğu da tek bir alternatif allelik durumu göstermektedir, buna null (resesif) allel denir. RAPD bantları genellikle diploitlerdeki fenotipik dominant markerler olarak ifade edilmektedir. Baskın allel için homozigot ve heterozigot bireylerin genotipleri arasında ayırım yapmak çoğunlukla imkânsız olabilmektedir (Arnheim and Erlich 1992).

RAPD lokusundaki polimorfizm, birçok nedenden kaynaklanabilmektedir, örneğin çoğaltılmış bir bant, en azından şu üç yolun birisinde null allel sayılmaktadır:

- 1- Hem bir hem de her iki bağlanma bölgesi, mutasyonlara bağlı olarak kaybolabilir.
- 2- Bağlanma bölgeleri arasında insersiyon meydana gelebilir.
- 3- Bağlanma bölgelerinde yeniden düzenlenmeler (re-arrangements) meydana gelebilir.

Karşılıklı bağlanma bölgelerinin bir veya her ikisinde meydana gelen mutasyon, bu bölgeyi komplementer bir primer tarafından tanımlanabilir hale getirir, kısa bir parçanın araya girmesiyle, sekansın yeniden düzenlenmesiyle veya meydana gelen bir delesyon, PCR ile amplifiye edilebilir.

Populasyonun genetik parametrelerini ve filogenilerini analiz etmek için RAPD markerleri kullanıldığı zaman varyasyonun varlığı ya da yokluğu, amplifikasyon artefaktlarına veya araştırma metodlarının yanlışlığına bağlı olabilir. Bazı yazarlar, RAPD markerlerinin filogenetik bilginin belirli bir miktarını içerdiğini fakat

filogenilerin bu markerlerle çıkartılmasının kolay olmadığını ve elde edilen sonuçların yorumlanmasının genellikle zor olduğunu öne sürerler. Ayrıca Heun and Helentjaris (1993), RAPD markerlerindeki gözlenen aşık varyasyonların sebebinin, tanıma bölgesindeki nokta mutasyonlarında olmayabileceğine bunun yerine PCR ürünleri ve primerler arasındaki rekabetten kaynaklandığına dikkat çekerler (Landry and Lapointe 1996). Bu tip varyasyonlar, akrabalık ilişkilerinin ölçümlerini allak bullak edebilmektedir.

2.8 RAPD-PCR Problemleri ve Bazı Çözümleri

Yüksek çözünürlüklü bir genetik marker, belli bir bireyden güvenli ve tekrarlanabilir olarak çoğaltılabildiği zaman kullanışlıdır ve her element kalıtılabilir olmalıdır. Diğer yüksek çözünürlüklü markerlerde olduğu gibi, PCR bağımlı teknikte, farklı amplifikasyon şartları, farklı amplifikasyon ürünlerini ortaya çıkartabilir. Bu tarz amplifikasyon artefaktları RAPD-PCR için birçok ciddi probleme neden olur çünkü çoğaltılan lokus genellikle anonimdir, primer-kalıp bağlanma şartlarına nispeten izin verir, parçalanmamış DNA kullanılmalıdır ve farklı amplifikasyon parametreleri bağlanma biçimlerini etkileyebilir (Arnheim and Erlich 1992).

Sheweder *et al.* (1995), güvenilir ve tutarsız amplifikasyonların genel nedenlerini şöyle açıklamışlardır:

- 1- PCR cihazının modeli
- 2- Bağlanma sıcaklıkları
- 3- Denatürasyon, primer bağlanması ve uzama zamanları
- 4- dNTP konsantrasyonu
- 5- *Taq* Polimeraz konsantrasyonu ve kaynağı

Bu nedenlerin yanında, kalıp DNA'ya spesifik olmayan bağlanmalar da tutarsız amplifikasyonlara neden olabilir. Örnek işlenmesindeki ve saklanmasıdaki farklılıklar (örneğin, donma-çözme sayısı) da varyasyonları ortaya çıkartabilmektedir.

Sonuç olarak RAPD prosedürünün sırasıyla dikkatli bir şekilde izlenmesi, farklı amplifikasyon ürünlerinin ortaya çıkmasını büyük oranda engelleyebilir.

RAPD bantları, agaroz jelde birbirine yakın koşabilmektedirler ve bu durumda ayırım yapmak zor olur. RAPD lokuslarının mesafeleri yakın olduğu zaman, amplifikasyon ürünlerinin veya aynı lokusdaki farklı allellerin molekül ağırlığı ayırt edilemeyebilir.

Aynı bireydeki (jelde aynı şeritte) homolog (fakat farklı) allellerin veya homolog olmayan allellerin birlikte göçü, iki veya daha fazla amplifikasyon ürünlerini içeren karışık (birleşik) bir bandı üretebilir. Bu şekildeki karışık bantlar, lokus başına allel sayısının, heterozigotluğun ve polimorfik lokusun frekansının eksik değerlendirilmesine neden olur ve birey genotipleri ve populasyonlar arasındaki ayırım gücünü azaltır. Dolayısıyla, homolog ve homolog olmayan ürünlerin birlikte göçü kladistik analizleri değiştirebilecektir (Arnheim and Erlich 1992).

Bütün bu sorunların karşısında üzerinde durulması gereken iki nokta bulunmaktadır. Bunlardan biri RAPD-PCR'in çözüm gücünü arttırmak diğeri ise bağımsız lokuslardaki polimorfizmi ortaya çıkartmaktır.

RAPD-PCR'in çözüm gücünü arttırmak için öncelikli izlenecek yol, probleme jel seviyesinde yaklaşmak olacaktır. Agaroz jel elektroforezi, özellikle bantlar net olmadığı zaman çoğaltılmış DNA'nın moleküler ağırlığındaki küçük farklılıkları ortaya çıkarmakta bazen yetersiz olabilmektedir. Bu nedenle, pahalı ve toksik bir madde olmasına rağmen akrilamid, yüksek çözüm gücü nedeniyle kullanılmaktadır. Daha ucuz bir yöntem de örnekleri uzun jellerde koşturmaktır. Hunt and Page (1992), çapraz bağların eklenmesiyle (%1'lik synergel, çapraz bağları içermektedir) düşük konsantrasyonlu agaroz jelin (%0.6) de diğeri bir yöntem olarak kullanılabileceğini ileri sürmüştür. Böylece bulanıklık müthiş bir şekilde azaltılmış ve 10 baz çifti kadar az olan bölgeleri ayıran bantların izlenmesine izin vermiştir.

RAPD bantları genellikle varlık ya da yokluk karakterlerinin ayırımına göre değerlendirilmektedir. Yine de:

1-Bazı bantlar, diğerlerine göre sürekli olarak daha fazla amplifiye olur.

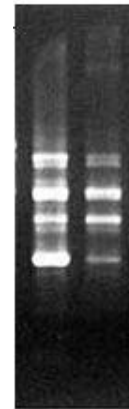
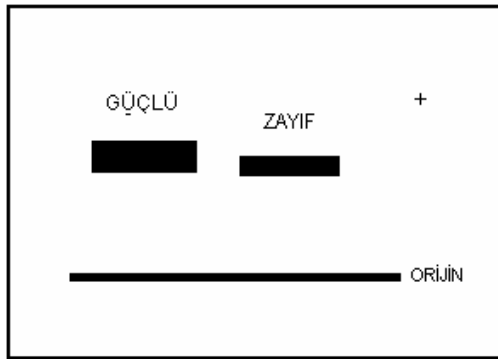
2-Farklı bireylerdeki belirli bir bandın durumu ya da görüntüsü, nicel olarak eser halde görülebilirlikten hatasız parlaklığa kadar değişebilir.

Ayrıca, parlak bantlar, zayıf olanlardan daha hatasız çoğaltılma eğilimindedirler. Çünkü zayıf bir şekilde çoğaltılmış ürünü ethidium bromür ile boyanmış jelde teşhis etmek zor olur. Gerçekte zayıf bir şekilde amplifiye olan bir allel bulunmasına rağmen, bu lokus null/null homozigotu olarak değerlendirilebilir(Arnheim and Erlich 1992) .

Bant yoğunluğundaki bazı varyasyonların, hem tekrarlanabilir hem de kalıtsal olduğu görülmüştür. Bant yoğunluğundaki kalıtsal varyasyon şunlara bağlı olabilir:

- 1- Belirli bir primer-kalıp kombinasyonu ile çoğaltılabilir lokusların kopya sayılarındaki varyasyonlara
- 2- Lokus içindeki ardışık tekrarlı çoğaltılabilir sekansların kopya sayısındaki varyasyonlara
- 3- Lokus arasındaki ilave interaksiyonlardaki varyasyonlara

Sonuç olarak spesifik RAPD bandının yoğunluğu hem tekrarlanabilir hem de kalıtsal olduğu zaman bile, aynı bandın bir tanesinde güçlü ifade edilmiş diğerinde ise zayıf ifade edilmiş olduğu durumda iki bireyin nasıl kıyaslanabileceği sorusunu akla getirmektedir (Şekil 2.7 a ve b). Böyle yoğunluk farklılıklarını değerlendirmeye ilgili bir problem, beklendiği gibi özellikle ethidium bromür ile boyanmış jellerde bandın yoğunluğunun miktarını hesaplamak zordur. İkinci problem, yoğunluktaki farklılıkların, bunun altında yatan genotip farklılıkları ile nasıl ilişkilendirileceğinin bilinmemesidir.



Şekil 2.7 a Güçlü ve zayıf bandın şematik gösterimi, b Jel üzerindeki görünüm

Bantlar parlaklıklarına göre sınıflandırılabilir, belirli bir bandın parlaklık sınıflarının kalıtımı analiz edilebilir ve farklı parlaklık kategorileri, aynı lokustaki farklı alleller olarak değerlendirilebilir.

Diğer iki çözüm daha gerçekçidir. İlkinde her polimorfik bant kullanılır: bant, var olarak değerlendirilir, eğer belirlenemeyecek gibi ise yoğunluğu göz ardı edilir ve yok sayılır. Bu prosedür bant yoğunluğundaki varyasyonun sebebinin genetik veya genetik olmadığını ayırt edemez.

Diğer çözüm ise bu bantlar sadece parlak bir şekilde mevcut olduğu zaman değerlendirilir. Bu durumda, bant çok zayıf veya hiç olmadığına (örneğin, değerlendirilememesi durumunda) yok sayılır. Bu değerlendirme prosedüründe, bantların varlığı veya yokluğu gibi şiddetine aldırılmayarak bütün bantların sınıflandırılmasında sübjektif bir eğilimin olmadığı açıktır.

RAPD allelleri, dominant markerler gibi ifade edilir. Böylece RAPD lokusundaki allelik ve genotipik frekansları şu nedenlerden dolayı doğru bir şekilde hesaplamak olasıdır:

- 1- Örnek sayısının çok olması gerekir (bu nedenle gerçek allelik frekansların hesaplanmasında hata en aza indirilmiş olur)
- 2- Null allellerin sıklığı 0.1'i aşmalıdır
- 3- Burada incelenen lokus biallelik olmalıdır.

Eğer bütün bu şartların tümü karşılanırsa, F istatistikleri hesaplamak için bu frekanslar kullanılabilir ve ebeveyn olasılıkları da karakterize edilebilir. Bu şartlar yoksa allelik ve genotipik frekansları hesaplamak imkânsız olacaktır (Arnheim and Erlich 1992).

RAPD lokusunun nötral olduğu varsayılarak, her lokusun iki allelden oluştuğu, birinin ifade edildiği, diğerinin ise null olduğu düşünülmektedir. Bazı lokuslarda, allellerden birinin, diğerinden daha yaygın olacağı, oysa diğer lokuslar için tersinin doğru olacağı düşünülmektedir. Çünkü bir allelin diğerinden sistematik olarak daha yaygın olduğuna inanmak için bir sebep yoktur (örneğin, allellerin varlık-yokluk oranı yaklaşık olarak

50:50 olmalıdır). Null alleller birçok defa mevcut allellerden sayıca üstündür ve fenotip yokluğu, RAPD-PCR tarafından çoğaltılmayan karakterleri içine alan bir allel havuzunu kapsar. Eğer bu doğruysa ve mevcut fenotipler pek çok allelli kapsarsa, varlık yokluk verisinden RAPD allelik frekansı hesaplamak için bir yol bulunamayabilir (Arnheim and Erlich 1992).

RAPD markerlerinin Mendelian olmayan kalıtımı, RAPD lokuslarındaki allelik varyasyon miktarının ve heterozigotluğun hesaplanmasında normalden yüksek değerlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çünkü RAPD lokusu anonimdir ve RAPD bantlarının biçimi, sadece çoklu lokusların ve dominant allellerin kalıtımını yansıtır. RAPD markerlerinin Mendelian olmayan kalıtımını ayırt etmek çok zor olabilir. Şans eseri RAPD markerlerinin geçiş genetiğinin birçok analizi göstermiştir ki, bantların çoğu, Mendelian alleller gibi davranır.

Yavru bireylerde atasal olmayan bantların bulunmasının üç tane nedeni vardır:

- 1- Olası ebeveynler aslında gerçek genetik atalar değildir.
- 2- Kontaminasyon, kalıp DNA'nın parçalanması ve uygun olmayan bir teknik gibi laboratuvar ve saha artefaktları, tutarlı ve tekrarlanabilir bantların bazılarının sahte görünümüne ya da bantların gözden kaybolmasına yol açar.
- 3- RAPD-PCR'da oldukça müsamahakâr bağlanma şartları kullanıldığından, heterodubleks yapılar ortaya çıkabilir. Bu yapılar homolog alleller, homolog olmayan bölgeyi içerdiği zaman ortaya çıkar. Bu, jeldeki göç oranı lokusdaki her allellin gerçek uzunluğundan farklı olan hibrit bir fragment meydana getirir.

Bu soruna tek ve kesin yaklaşım, bütün bantlar üzerinde ayırım (segregation) analizleri uygulamak olmalıdır. Böylece Mendelian alleller gibi davranan markerleri öyle davranmayanlardan ayırır ve bütün ayrılmayan bantlar sonraki analizlerde elimine edilir. Teorik olarak, eğer gözlenen tüm bantlar, Mendelian markerler gibi davransaydı, her türlü dahil etme (inclusion), hariç tutma (exclusion) birleşimlerini kullanarak veya olasılık (likelihood) algoritmaları kullanılarak atayı (ebeveynleri) analiz etmek mümkün olabilirdi. Benzer olarak, bu tip bütün markerler, daha yüksek taksonlardaki soy ilişkilerinin hesaplanması için kullanışlı bilgiler sağlayabilir (Arnheim and Erlich 1992).

RAPD tekniği, ciddi zayıflıklar gösterebilmektedir; kurulan filogeniler, farklı memeli ordoları arasında her zaman ayırt edici olmayabilir. RAPD karşılaştırmaları, aynı primerle çoğaltılmış aynı moleküler ağırlıktaki bantların homolog DNA sekanslarını temsil ettiği varsayımına dayanır. Fakat birbirinden daha uzak iki örneğin, bu varsayımı karşılaması daha az muhtemeldir. Yine de, RAPD markerleri sayısız çalışmada da gösterildiği gibi yakın akraba organizmalardaki genetik polimorfizmi belirlemede çok güçlü bir araçtır. Bu gözlemler familya seviyesine kadar karşılaştırmaların muhtemelen daha düzenli olduğunu göstermiştir (Landry and Lapointe 1996).

Belirli bir çalışma için gerekli primer sayısı da önemlidir. Çalışmaya daha fazla primer katıldığı zaman tutarlılık artacaktır. Bununla birlikte, RAPD markerleri ile ortaya çıkarılan sonuçlar, filogenetik yaklaşımlara ve /veya seçilen mesafe katsayılarına bağlıdır. Bu seçimler dikkatle düşünölmelidir çünkü karşılaştırılan organizmaların akrabalıkları etkileyici bir faktördür (Landry and Lapointe 1996).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

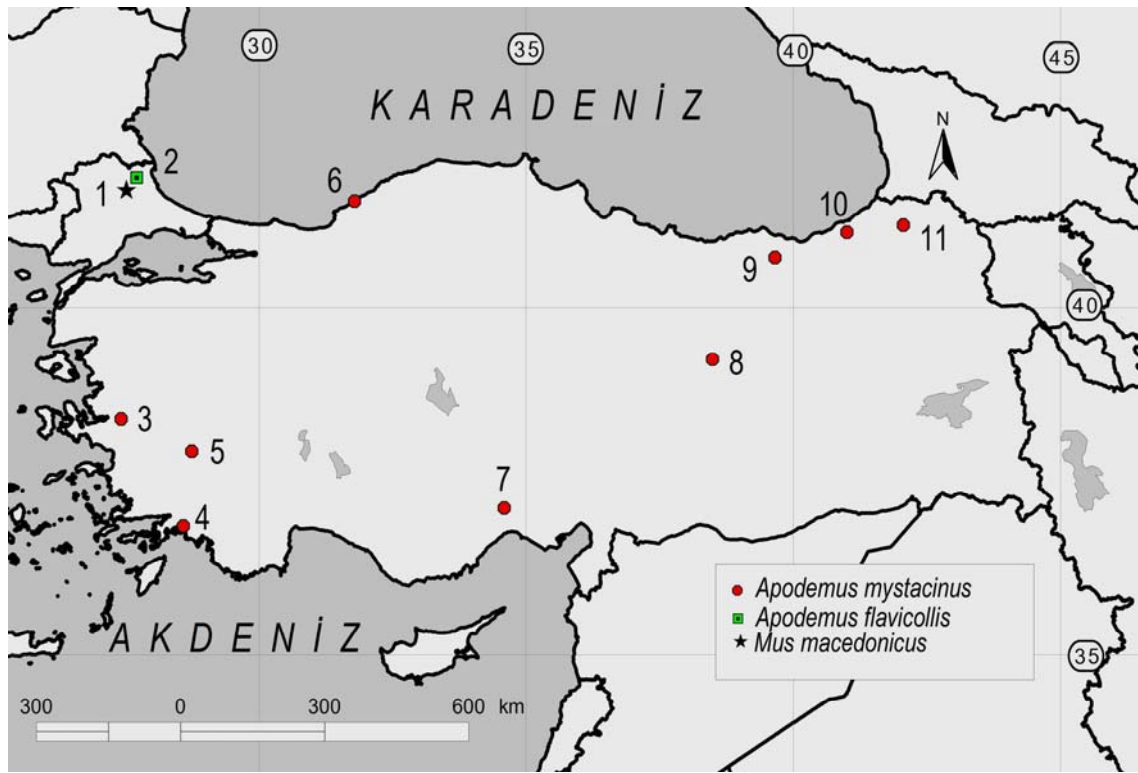
Bu araştırma Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Omurgalı Hayvan Sistematigi laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan örnekler Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK tarafından toplanılan ve teşhisleri yapılan *Apodemus mystacinus* örnekleri ve dış grup olarak kullanılan *Apodemus flavicollis* ve *Mus macodenicus* örneklerinden oluşmaktadır. Çeşitli bölgelerden toplanan *A. mystacinus* örnekleri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Kullanılan dış gruplar ise Çizelge 3.2'de yer almaktadır. Şekil 3.1'de örneklerin alındığı bölgeler harita üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Apodemus mystacinus* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler

	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
1	5205	<i>A.mystacinus</i>	ZONGULDAK
2	5206	<i>A.mystacinus</i>	ZONGULDAK
3	2304	<i>A.mystacinus</i>	Ardanuç-ARTVİN
4	2306	<i>A.mystacinus</i>	Ardanuç-ARTVİN
5	5385	<i>A.mystacinus</i>	Çamlıhemşin-RİZE
6	5386	<i>A.mystacinus</i>	Çamlıhemşin-RİZE
7	3343	<i>A.mystacinus</i>	Sümela- TRABZON
8	3797	<i>A.mystacinus</i>	Sümela- TRABZON
9	5268	<i>A.mystacinus</i>	Kemaliye-ERZİNCAN
10	5280	<i>A.mystacinus</i>	Kemaliye-ERZİNCAN
11	2193	<i>A.mystacinus</i>	Sebil-MERSİN
12	2842	<i>A.mystacinus</i>	Sebil-MERSİN
13	5500	<i>A.mystacinus</i>	Köyceğiz-MUĞLA
14	5501	<i>A.mystacinus</i>	Köyceğiz-MUĞLA
15	2594	<i>A.mystacinus</i>	Buharkent-AYDIN
16	2596	<i>A.mystacinus</i>	Buharkent-AYDIN
17	2540	<i>A.mystacinus</i>	Kemalpaşa-İZMİR
18	2589	<i>A.mystacinus</i>	Kemalpaşa-İZMİR

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

	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
1	2392	<i>A.flavicollis</i>	Velikaköprüsü-KIRKLARELİ
2	1928	<i>A.flavicollis</i>	Velikaköprüsü-KIRKLARELİ
3	2398	<i>M. macodenicus</i>	TRAKYA
4	2400	<i>M. macodenicus</i>	TRAKYA



Şekil 3.1 *Apodemus* ve *Mus* örneklerinin toplandığı bölgelerin harita üzerinde gösterimi. 3-11: *A. mystacinus*, 2: *A. flavicollis*, 1: *M. macodenicus*

3.2 Yöntem

Araştırmada araziden canlı yakalanan örneklerden alınan böbrek dokusu ependorf tüplere konularak - 30°C’de saklandı. Daha sonra DNA izolasyon prosedürü uygulanarak dokulardan DNA izole edildi. Tüm dokular izole edildikten sonra RAPD-

PCR yöntemi ile amplifiye edilen DNA örnekleri, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu.

3.3 DNA İzolasyonu

On bir populyasyondan alınan *A. mystacinus*, *A. flavicollis* ve *M. macodenicus* örneklerinin böbrek dokusundan DNA izole edildi. Bu işlemde Padmalatha K and Prasad (2006) ve Doyle and Doyle (1991) metodları kombine edilerek ve uyarlanarak CTAB DNA izolasyonu kullanıldı. Metod aşağıda belirtildiği gibi sırasıyla uygulanmıştır:

Küçük parçalara ayrılmış doku örnekleri ependorf tüpe konulduktan sonra üzerine 300 µl CTAB (Kloroform, Tris-HCl, EDTA, NaCl) tamponu eklenip mümkün olduğu kadar homojen bir sıvı elde edinceye kadar tek kullanımlık havaneli ile ezildi. Homojenata sırasıyla 300 µl CTAB ve 50 µl BME (β-Merkapto etanol) eklenip ependorf tüp hafifçe karıştırıldı. Karışım 65°C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi. 500 µl C: IAA (Kloroform izoamil alkol) (24:1) ilave edildi ve karışım süte benzer bir kıvama gelinceye kadar hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj edilen dokuların içinde olduğu ependorf tüpleri, aynı eğik açıda olacak şekilde buza yerleştirildi. DNA üstteki sıvı tabakada olacağından üst faz pipetle çekildi ve ayrı bir ependorf tüpe konuldu. 500 µl -20°C'de soğutulmuş izopropanol tüplere eklendi ve tüpler yavaşça karıştırıldı. -20°C'de bir gece bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet 2 kere %70 1 kere de %100'lük etil alkol ile yıkandı. Pellet ependorf tüp içinde laminar flow kabinde en az 1 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA'nın üzerine 500 µl TE (Tris-EDTA) tampon ve 2 µl RNase eklendi, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. 500 µl P:C:IAA (Fenol:Kloroform:Izoamil alkol) (25:24:1) karışıma ilave edildi. 10.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant tekrar ayrı bir tüpe konuldu ve üzerine 500 µl C: IAA (24:1) ilave edildi. Karışım süte benzer bir kıvama gelinceye kadar hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant ayrı bir ependorfa konuldu. 500 µl 3M sodyum asetat ve 500 µl etil alkol, ayrılan süpernatanta eklendi. 13.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Pellet ayrıldı

ve kurutuldu. DNA 100 µl TE (Tris-EDTA) tamponda çözüldü. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

İzolasyonda kullanılan çözeltiler:

CTAB Buffer

CTAB : 2 gr

Tris-HCl : 1 M pH: 8.0

EDTA : 0.5 M pH: 8.0

NaCl : 5 M

TE Buffer pH: 8.0

Tris Base çözeltisi (1M) : 1 ml

EDTA (0,5 M) : 20 µl

Tris Base : 1M pH: 8.0

EDTA : 0.5M pH: 8.0

NaCl : 5M .

RNase A(10mg/ml, Fermentas) : 2 µl

3.4 DNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin spektrofotometre (Agilent 2100 Bioanalyser NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer) ile ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümden alınan DNA miktarı ve saflığı sonuçlarının tamamı çizelge 3.3’de gösterildiği gibidir. Bir böbreğin yarısından izole edilen DNA miktarları 130,71 ng/µl ile 1342,775 ng/µl arasında değişmiştir. PCR uygulamaları için DNA örnekleri 100 ng/µl’ye seyreltilmiştir. Seyreltilmiş DNA örnekleri çalışma boyunca -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *A. mystacinus* DNA örneklerinin spektrofotometre ile ölçüm sonuçları

Kayıt No	Lokalite	ng/µl *	260/280**
5205	ZONGULDAK	473,795	2,08
5206	ZONGULDAK	627,55	2,07
2304	Ardanuç-ARTVİN	939,105	2,07
2306	Ardanuç-ARTVİN	751,29	2,08
5385	Çamlıhemşin-RİZE	620,14	2,09
5386	Çamlıhemşin-RİZE	494,11	2,09
3343	Sümela- TRABZON	666,155	2,09
3797	Sümela- TRABZON	742,365	2,07
5268	Kemaliye-ERZİNCAN	853,915	1,98
5280	Kemaliye-ERZİNCAN	1342,775	2,05
2193	Sebil-MERSİN	233,56	2,02
2842	Sebil-MERSİN	615,47	2,08
5500	Köyceğiz-MUĞLA	425,375	2,09
5501	Köyceğiz-MUĞLA	571,055	2,08
2594	Buharkent-AYDIN	130,71	2,07
2596	Buharkent-AYDIN	658,21	2,08
2540	Kemalpaşa-İZMİR	658,21	2,09
2589	Kemalpaşa-İZMİR	703,775	2,07

* : 1 µl’deki ng cinsinden DNA miktarı

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

3.5 RAPD Primerleri

Çalışmamızda kullanılan RAPD primerleri, rastgele seçilmiş 10 bazlık primerlerdir. Çalışmada toplam 60 primer çalışılmıştır; bunlar her bir seride 20 primer içeren OPA, OPB ve OPD serisi primerlerdir (Thermo Electron). Bunlardan tutarlı sonuç veren 14 tanesi Çizelge 3.4’de verilmiştir. Primerler G+C içeriği %60–70 olacak şekilde seçilmiştir. Çalışmadaki 22 örnek aşağıdaki tabloda gösterilen primerler ile taranmıştır.

Çizelge 3.4 Analizlerde kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer	Sekans
OPB-06	5'-TGCTCTGCCC-3'
OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'
OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'
OPB-09	5'-TGGGGGACTC-3'
OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'
OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'
OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'
OPB-19	5'-ACCCCGAAG-3'
OPB-20	5'-GGACCCTTAC-3'
OPD-02	5'-GGACCCAACC-3'
OPD-03	5'-GTCGCCGTCA-3'
OPD-13	5'-GGGGTGACGA-3'
OPD-15	5'-CATCCGTGCT-3'

3.6 RAPD-PCR Amplifikasyonu ve Optimizasyonu

PCR amplifikasyonu için öncelikle Bellinvia *et al.* (1999) (Çizelge 3.5) ve Mishra *et al.* (2002) (Çizelge 3.6) tarafından uygulanan PCR döngü programı denenmiş fakat gereken başarı sağlanamamıştır. Sonuç olarak en son Kaya and Neale (1995) (Çizelge 3.7) tarafından uygulanan PCR döngü programı, bazı değişikliklerle laboratuvar koşullarına uyarlanmıştır ve beklenen sonuç elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan reaksiyon şartları Çizelge 3.8’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.5 Bellinvia *et al.*(1999) tarafından uygulanan PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	60 saniye	1
Denatürasyon	97°C	40 saniye	
Bağlanma	37°C	40 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika 30 saniye	45
Son Uzama	72°C	10 dakika 30 saniye	1

Çizelge 3.6 Mishra *et al.*(2002) tarafından uygulanan PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	1 dakika	1
Denatürasyon	94°C	1 dakika	
Bağlanma	40°C	1 dakika	
Uzama	72°C	2 dakika	40
Son Uzama	72°C	5 dakika	1

Çizelge 3.7 Kaya and Neale (1995) tarafından uygulanan PCR döngü programı

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

Çizelge 3.8 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü programı

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

PCR optimizasyonu için değişik *Taq* polimeraz ve DNA konsantrasyonları denenmiştir. 25 µl reaksiyon hacmi başına 25, 50, 75 ve 100 ng DNA miktarları ile 1,5 ve 2,5 u *Taq* polimeraz konsantrasyonları denenmiştir. En iyi sonuçlar 100 ng DNA ile 1,5 u *Taq* polimeraz konsantrasyonları ile sağlanmıştır. Optimum reaksiyon koşulları Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9 Optimum reaksiyon koşulları

Element	Kullanılan Miktar (µl)
dNTP Karışımı (4x10µmol)	4
MgCl ₂ (25mM)	1,5
10X PCR Karışımı (0,6ml)	2,5
Primer (1 pmol)	1
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (5u/ µl)	0,3
DNA	1
H ₂ O	14,5
Toplam reaksiyon karışımı	25

3.7 Agaroz Jel Elektroforezi

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

3.8 Jellerin yorumlanması

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

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

3.9 Veri analizleri

Final veri seti sadece polimorfik bantları içerdi. Veri dosyaları POPGENE (Yeh *et al.* 1997) ve POPULATION 1.0 (Langella 2000)’da analiz edilecek şekilde hazırlandı.

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

Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü (G_{ST}) Nei (1987)’ye göre hesaplandı. $N_m = 0.5(1 - G_{ST}) / G_{ST}$ formülü kullanılarak her lokus için nesil başına göçlerin ortalama sayısını ve lokuslar arasındaki ortalama değeri hesaplamak için G_{ST} tahminleri kullanıldı.

POPULATIONS 1.0 programı ile Nei (1972)’nin genetik mesafe değerleri (D_s) kullanılarak bir dendogram (Neighbour-joining trees= yakın bağlantı ağacı= NJ) kuruldu.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Türkiye'nin 11 lokalitesinden toplanan 22 örneğin böbrek dokularından izole edilen DNA'lar nanodrop spektrofotometrede ölçülerek saflık dereceleri ve miktarları belirlendi. DNA'ların kalitesi ise agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünleri %1,7'lik agaroz jelde koşturuldu. 60 RAPD primeri denendi ancak bunların 14 tanesinden tutarlı sonuçlar alındı. Bu 14 RAPD markerinden toplam 154 polimorfik bant elde edildi. Her bir primerden elde edilen polimorfik bant sayısı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Çalışılan 12 primer ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1-12' de gösterilmiştir ve bu bantlar var-yok analizi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilen bantların POPGENE Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis, Version 1.31 (Yeh et al.1997) ve POPULATION 1.0 (Langella 2000) programları ile analizleri yapıldı. Bu programlar ile yapılan analizler şunlardır:

Na : Her örnek için gözlenen allel sayısı

Ne : Etkili allel sayısı

Nm : Gen akışı

H : Nei'nin genetik çeşitliliği (1987)

I : Shanon information indeksi

H_I :Populasyondaki bir bireyin gözlenen heterozigotluğu

H_S :Populasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu

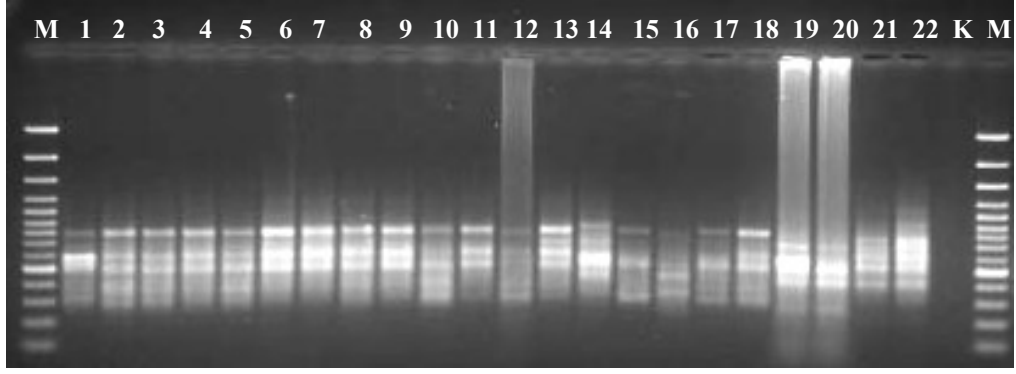
H_T :Tüm populasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu

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

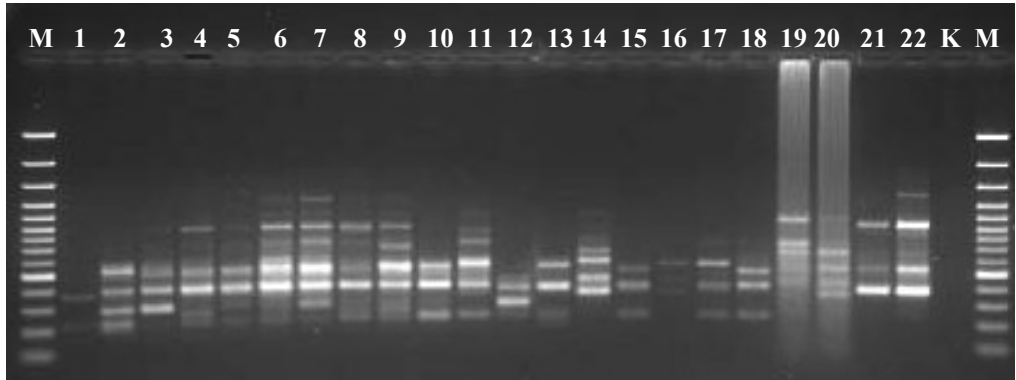
D_S :Nei'nin genetik mesafe değeri (1972)

Çizelge 4.1 Her bir primerden elde edilen polimorfik bant sayısı.

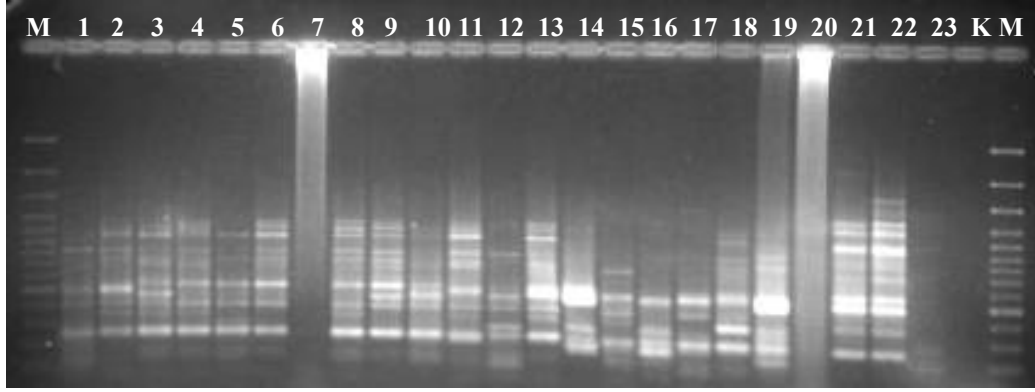
Primer	Sekans	Polimorfik bantların sayısı
OPB-06	5'-TGCTCTGCCC-3'	7
OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'	15
OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'	17
OPB-09	5'-TGGGGGACTC-3'	10
OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	7
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'	7
OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'	15
OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'	13
OPB-19	5'-ACCCCCGAAG-3'	9
OPB-20	5'-GGACCCTTAC-3'	6
OPD-02	5'-GGACCCAACC-3'	10
OPD-03	5'-GTCGCCGTCA-3'	12
OPD-13	5'-GGGGTGACGA-3'	16
OPD-15	5'-CATCCGTGCT-3'	10



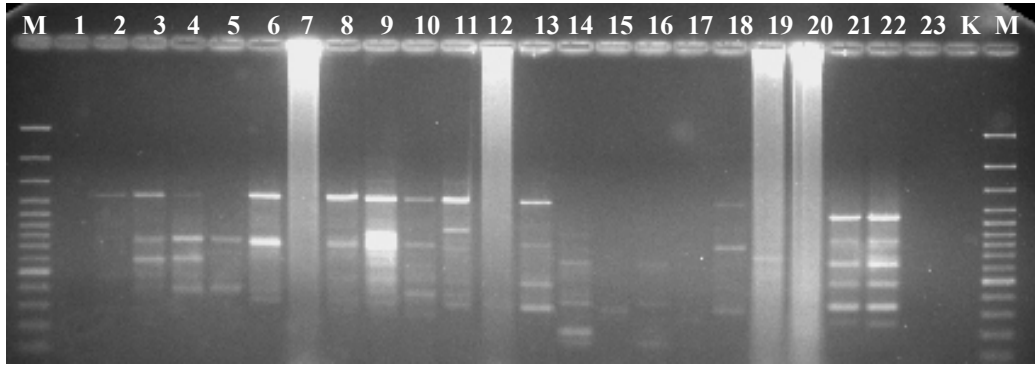
Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-06 (5'-TGCTCTGCCC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, K: Negatif Kontrol.



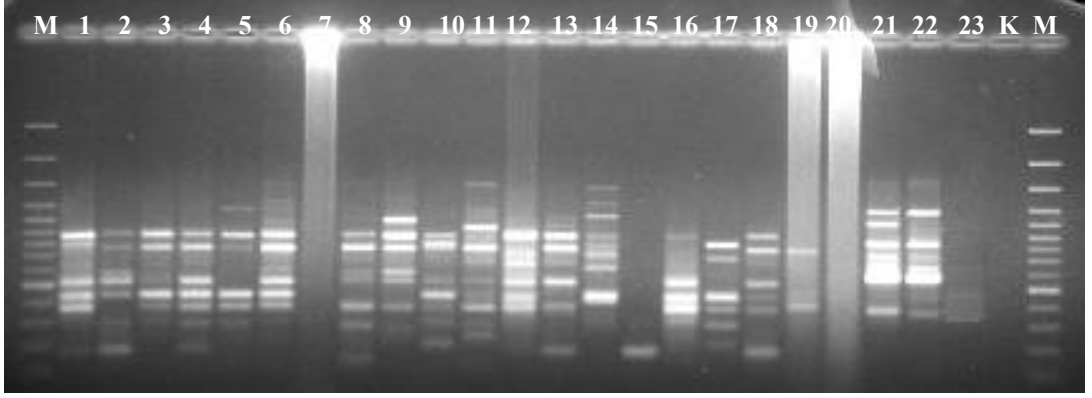
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-07 (5'-GGTGACGCAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.(Örnek sıralanışı Şekil 4.1' deki gibidir.)



Şekil 4.3 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-08 (5'-GTCCACACGG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, 23: Boş, K: Negatif Kontrol.



Şekil 4.4 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-09 (5'-TGGGGGACTC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. (Örnek sıralanışı Şekil 4.3'deki gibidir.)



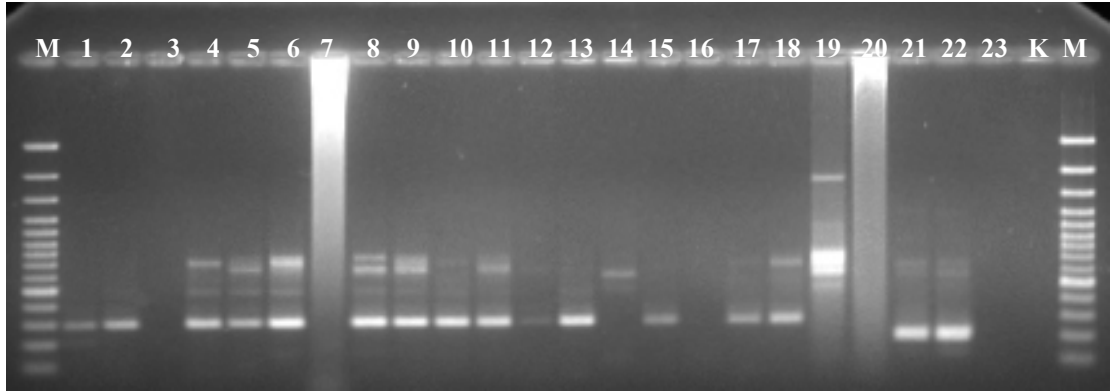
Şekil 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-12 (5'-CCTTGACGCA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, 23: Boş, K: Negatif Kontrol.



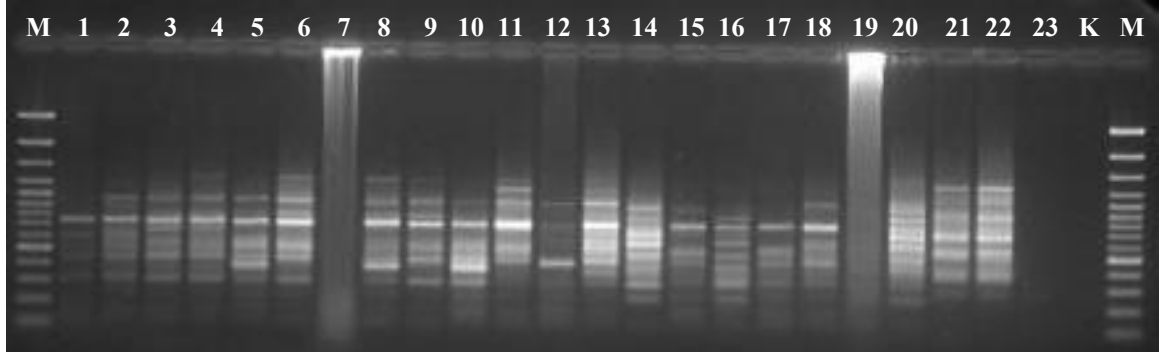
Şekil 4.6 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-17 (5'-AGGGAACGAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. (Örnek sıralanışı Şekil 4.5'deki gibidir.)



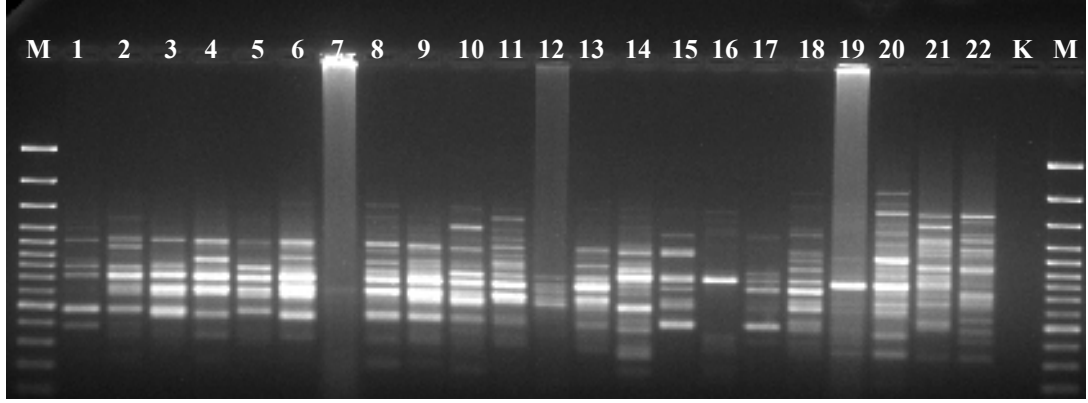
Şekil 4.7 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-19 (5'-ACCCCGAAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, 23: Boş, K: Negatif Kontrol.



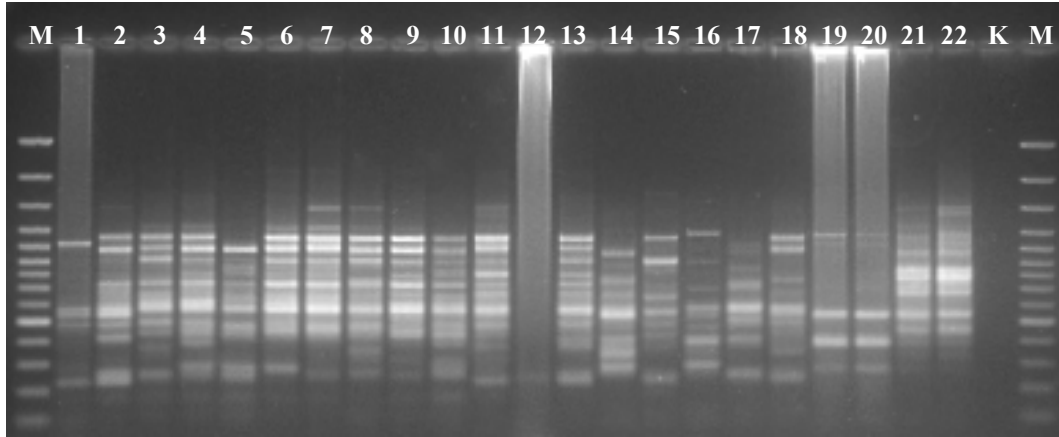
Şekil 4.8 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-20 (5'-GGACCCTTAC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. (Örnek sıralanışı Şekil 4.7'deki gibidir.)



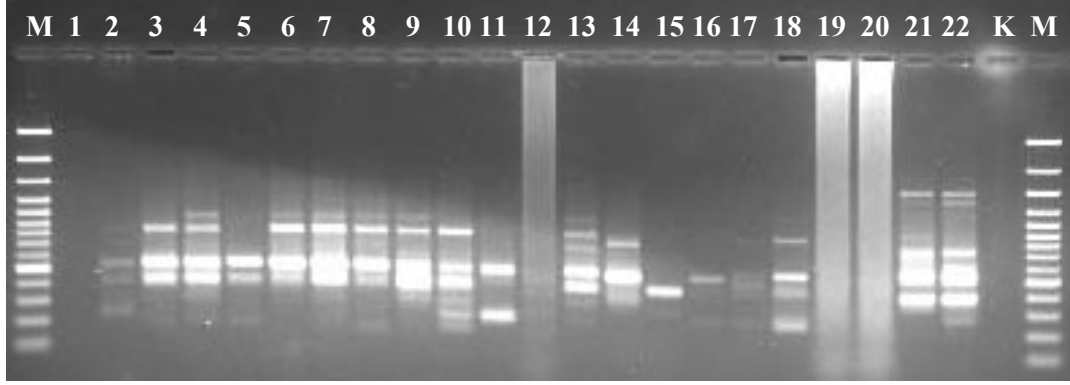
Şekil 4.9 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-02 (5'-GGACCCAACC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, 23: Boş, K: Negatif Kontrol.



Şekil 4.10 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-03 (5'-GTCGCCGTCA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, K: Negatif Kontrol.



Şekil 4.11 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-13 (5'-GGGGTGACGA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. (Örnek sıralanışı Şekil 4.10'daki gibidir.)



Şekil 4.12 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-15 (5'-CATCCGTGCT-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü. M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), 1 ve 2: *A.mystacinus*-Zonguldak, 3 ve 4: *A.mystacinus*-Ardanuç/Artvin, 5 ve 6: *A.mystacinus*- Çamlıhemşin/Rize, 7 ve 8: *A.mystacinus*- Sümela/Trabzon, 9 ve 10: *A.mystacinus*- Kemaliye/Erzincan, 11 ve 12: *A.mystacinus*- Sebil/Mersin, 13 ve 14: *A.mystacinus*- Köyceğiz/Muğla, 15 ve 16: *A.mystacinus*- Buharkent/Aydın, 17 ve 18: *A.mystacinus*- Kemalpaşa/İzmir, 19 ve 20: *A.flavicollis*- Velikaköprüsü/Kırklareli, 21 ve 22: *Mus*- Trakya, K: Negatif Kontrol.

4.1 İstatistik analizi sonuçları

İstatistik analizleri için POPGENE Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis, Version 1.31 (YEH *et al.* 1997) ve POPULATION 1.0 (Langella, 2000) programları kullanıldı. POPGENE programı ile Nei (1987)'ye göre tüm lokuslar için genetik varyasyon ve alt popülasyonlardaki genetik farklılaşma değerleri Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'de gösterilmektedir. POPULATIONS 1.0 programı ile Nei (1972)'nin genetik mesafe değerleriyle oluşturulan yakın bağlantı ağacı (Neighbour Joining Trees) Şekil 4.13'de gösterilmektedir.

Apodemus mystacinus popülasyonları için hesaplanan genetik farklılaşma değerleri, Trabzon popülasyonunda en düşük $H = 0,0227$ (P, polimorfik lokus yüzdesi = 4,55) değerdedir. Muğla popülasyonunda ise bu değer en yüksek seviyededir $H = 0,2045$ (%P=40,91) (Çizelge 4.2).

Türkiye'deki *A. mystacinus* popülasyonlarının toplam gen farklılaşması $H_T = 0,3087$ olarak hesaplanmıştır. Çalışılan popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmayı gösteren G_{ST} değeri, 0,7438 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Nei (1972)'ye göre hesaplanan genetik mesafe değerleri, 0,0842 (Artvin ve Rize) ile 0,3515 (Trabzon ve Aydın) arasındadır. Böylece genetik olarak en uzak popülasyonlar Trabzon ve Aydın; birbirine en yakın popülasyonlar ise Artvin ve Rize popülasyonlarının olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4). Genetik benzerlik verileri genetik mesafe değerleri ile tamamiyle uyumlu çıkmıştır. Beklendiği gibi Trabzon ve Aydın popülasyonları en az benzerlik gösteren popülasyonlarken (0,7036), Artvin ve Rize popülasyonları ise genetik benzerlik değerleri bakımından birbirine en yakın popülasyonlardır (0,9192) (Çizelge 4.4).

Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendogram, 3 kümelene göstermiştir; ilk grup 5 popülasyondan oluşmuştur. İlk küme içerisinde Artvin ve Rize popülasyonları, 74'lük bootstrap değeri ile bağlanmıştır. Buna ek olarak Trabzon, Erzincan ve Mersin popülasyonları aynı küme içerisinde yer almış ve sırasıyla 42, 49, 76'lük bootstrap

değerleriyle Artvin ve Rize populasyonlarına bağlanmıştır. İkinci grup, 58'lik bootstrap değeri ile Zonguldak ve İzmir populasyonlarını içermektedir. Aydın populasyonu bu gruba 36'lık bootstrap değeri ile bağlanmıştır. Üçüncü grup 74'lük bootstrap değeri ile yalnızca Muğla populasyonundan oluşmaktadır ve populasyon tek başına ayrılmıştır. Ayrıca dış gruplar olan *A. flavicollis* ve *M. macedonicus* populasyonları bu bağlantı ağacına 91 ve 96'lık bootstrap değeri ile bağlanmıştır (Şekil 4.13).

Çizelge 4.2 Tüm lokuslar için genetik varyasyon analizleri (Nei 1987)

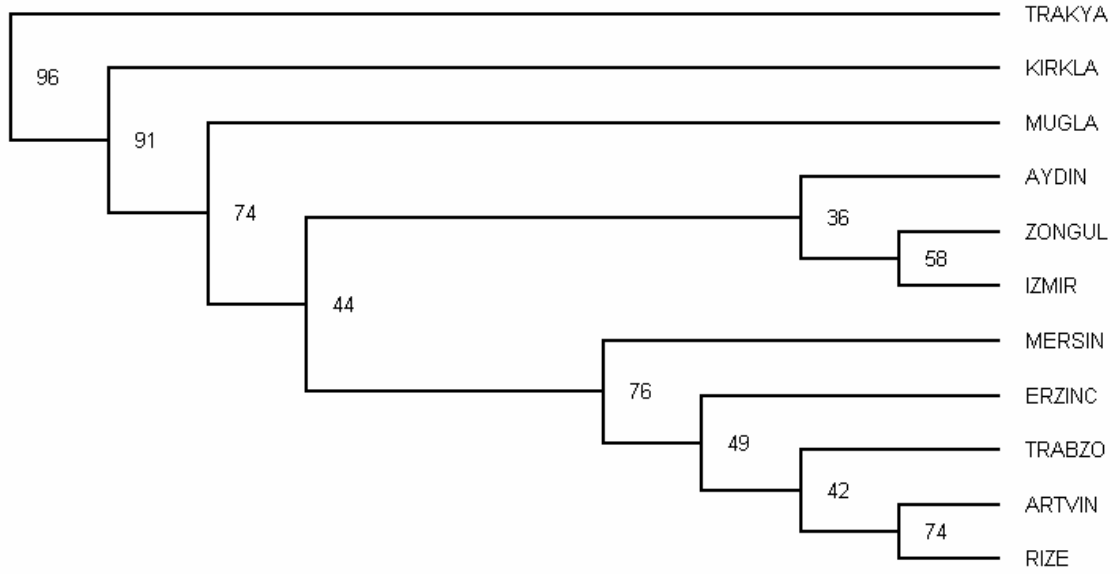
Lokalite	Örnek Sayısı	Na	Ne	H	I	P	%P
ZONGULDAK	2	1,194	1,194	0,097	0,135	30	19,48
ARTVİN	2	1,064	1,064	0,032	0,045	10	6,49
RİZE	2	1,175	1,175	0,087	0,121	27	17,53
TRABZON	1	1,045	1,045	0,022	0,031	7	4,55
ERZİNCAN	2	1,064	1,064	0,032	0,045	23	14,94
MERSİN	2	1,214	1,214	0,107	0,148	33	21,43
MUĞLA	2	1,409	1,409	0,204	0,283	63	40,91
AYDIN	2	1,168	1,168	0,084	0,117	26	16,88
İZMİR	2	1,207	1,207	0,103	0,144	32	20,78
KIRKLARELİ	1	1,074	1,074	0,037	0,051	10	6,49
TRAKYA	2	1,032	1,032	0,016	0,022	5	3,25
Ortalama	2	1,150	1,150	0,074	0,103	24,1	15,7

Çizelge 4.3 Alt populasyonlar için genetik farklılaşma analizleri (Nei 1987)

Örnek Sayısı	Ht	Hs	Gst	Nm
20	0.308	0.079	0.743	0.172

Çizelge 4.4 Genetik mesafe (alt diagonal) ve genetik benzerlik (üst diagonal) hesaplamaları (Nei, 1972). **1:** Zonguldak, **2:** Artvin, **3:** Rize, **4:** Trabzon, **5:** Erzincan, **6:** Mersin, **7:** Muğla, **8:** Aydın, **9:** İzmir, **10:** Kırklareli, **11:** Trakya.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0	0.8443	0.8372	0.7674	0.8207	0.8210	0.7817	0.8393	0.8376	0.6198	0.5272
2	0.1693	0	0.9192	0.8748	0.8887	0.8349	0.7846	0.7658	0.8159	0.5662	0.4892
3	0.1777	0.0842	0	0.8940	0.8975	0.8454	0.7813	0.7602	0.7900	0.5460	0.4969
4	0.2647	0.1338	0.1121	0	0.8706	0.8238	0.7181	0.7036	0.7112	0.5275	0.5199
5	0.1976	0.1180	0.1081	0.1385	0	0.8430	0.7682	0.7337	0.7666	0.5421	0.5070
6	0.1972	0.1805	0.1680	0.1939	0.1708	0	0.7975	0.7721	0.7623	0.5406	0.5058
7	0.2463	0.2426	0.2468	0.3312	0.2637	0.2263	0	0.7799	0.7922	0.5847	0.5872
8	0.1752	0.2668	0.2742	0.3515	0.3097	0.2587	0.2486	0	0.8459	0.6525	0.5337
9	0.1773	0.2034	0.2358	0.3407	0.2658	0.2715	0.2330	0.1673	0	0.6371	0.5049
10	0.4783	0.5688	0.6052	0.6396	0.6123	0.6151	0.5367	0.4269	0.4509	0	0.5043
11	0.6402	0.7150	0.6993	0.6542	0.6792	0.6816	0.5323	0.6280	0.6835	0.6846	0



Şekil 4.13 *A. mystacinus* populasyonları arasındaki genetik ilişkileri, Nei (1972)'nin standart genetik mesafe değerlerine göre gösteren dendrogram (yakın bağlantı ağacı -NJ).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğramacı (1972), yaptığı morfolojik çalışmalarla *A. m. mystacinus* ile *A. m. euxinus* popülasyonlarının Anadolu ve Karadeniz bölgesinde yayılış gösterdiğini ortaya koymuştur. Ardanoç- Artvin'in *A. m. mystacinus* ve *A. m. euxinus* alttürlerinin hibriti olduğunu rapor etmiştir. Çolak vd. (2007), esteraz enzimine dayanarak yaptıkları allozim çalışmasında Ardanoç, Sebil ve Manisa popülasyonlarının EST-2D alleleline sahipken, Altındere ve Akçakoca popülasyonlarının EST-2D alleleline sahip olmadığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte Ardanoç ve Anadolu popülasyonlarının EST-3C alleleline sahip olduklarını bulmuşlardır. Bu durum Ardanoç popülasyonunun *A. m. mystacinus* ve *A. m. euxinus* alttürlerinin hibriti olabileceğini ortaya koymuş ve Doğramacı (1972)'nin morfoloji çalışmalarını desteklemiştir.

Bizim bulgularımızda Artvin (Ardanoç) ve Rize popülasyonları yakın bağlantı ağacında birbirine bağlanmıştır. Buna ek olarak Trabzon, Erzincan ve Mersin popülasyonları aynı kümelenme grubu içerisinde yer almış, Artvin ve Rize popülasyonlarına bağlanmıştır. Buna göre Trabzon, Artvin (Ardanoç) ve Rize popülasyonlarının beraber oluşturduğu kümelenme *A. m. euxinus* olarak düşünülebilir. Bu bulgular Çolak vd. (2007)'nin çalışması ile uyumludur. Mersin (Sebil) popülasyonu ise *A. m. mystacinus*'un tip yeridir. Bu durumda Erzincan popülasyonunun bu kümelenmede *A. m. mystacinus* ile *A. m. euxinus* arasında hibrit özellik gösterdiği düşünülebilir.

Neuhäser (1936), *A. m. symrnensis*'in Türkiye'nin batısında ve Toros Dağları'nda yayılış gösterdiğini rapor etmiştir. Çolak (2007), esteraz allellerinin gösterdiği farklılıklardan dolayı İzmir-Aydın-Bursa popülasyonlarının diğer popülasyonlardan açık bir şekilde ayrıldığını bulmuşlardır. Bu tez çalışmasındaki bulgularımız da bu durumu desteklemektedir. Michaux *et al.* (2005) *A. m. mystacinus* örneklerinin iki mitokondriyal DNA bölgesine (sitokrom b ve D-loop) ve the *interstitial retinol binding protein (IRBP)* nükleer genine bağlı olarak yaptıkları çalışmalarında ise güneybatı Türkiye popülasyonlarının *A. m. rhodius* olabileceğini ancak nükleer genler açısından Türkiye'de iki farklı soyun ayırt edilemediğini belirtmişlerdir. Güney Batı

Türkiye'deki *A. mystacinus*'un Girit'den alınan örneklerle yakın akraba olduklarını ancak Doğu Bölgesi'ndeki populasyonlardan uzak olduklarını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızdaki dendogramda Zonguldak, Aydın ve İzmir populasyonlarını içeren ayrı bir kümelenme oluşmuştur. Muğla populasyonu bu gruba bağlanmıştır. Bu kümelenme Neuhäser (1936)'e göre *A. m. symrnensis* olarak değerlendirilebilmekle beraber Michaux *et al.* (2005) güneybatı Türkiye'de bu alttürden bahsetmemiştir. Bizim çalışmamızda Güney Batı Anadolu'da iki ayrı kümelenmenin ortaya çıkması, bu bölgede iki farklı genetik soyun olabileceğini göstermektedir.

Vohralik *et al.* (2002), Asya ve Avrupa *A. mystacinus* populasyonları arasında belirgin bir farklılık olduğunu ve Asya populasyonlarının Avrupa populasyonlarından daha homojen olduğunu yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Bu gözlem ayrıca Verimli vd. (2000) Batı Anadolu ve Ardanuç populasyonlarında yaptıkları çalışmada pre-albumin bölgesinde gözlenen toplam bant sayısını sırasıyla 3-4 ve 4 olarak tespit etmişlerdir. Ve bu serum proteinleriyle bu populasyonların ayırt edilemediğini ileri sürmüşlerdir. RAPD markerleriyle yapılan bu çalışmada ise *A. mystacinus* populasyonları arasında farklılaşmalar gözlenmiştir. Bu sonuçlar Vohralik *et al.* (2002) ve Verimli vd. (2000)'nin bulgularını desteklememektedir. Biyometrik karşılaştırmalar ve fallik karakterlere bağlı olarak Anadolu'daki *A. m. mystacinus*'un Avrupa'daki *A. epimelas*'dan farklı olduğu ve *A. m. euxinus*'un her ikisinden de farklı bir form olduğu Çolak vd. (2004) tarafından ortaya konmuştur. Bu sonuçlar ise bizim çalışmamızla uyumludur.

Apodemus mystacinus populasyonları için hesapladığımız genetik çeşitlilik değerleri, Trabzon populasyonunda en düşük $H = 0,0227$ (P, polimorfik lokus yüzdesi = 4.55) değerdedir. Muğla populasyonunda ise bu değer en yüksek seviyededir $H = 0,2045$ (P=%40.91). Filippucci *et al.* (2002), *Apodemus* cinsi üzerinde 38 enzim (allozim) lokusu çalışmalarına dayanarak bulduğu verilerde *A. mystacinus* populasyonlarında H_e değerini 0.059 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar Türkiye populasyonlarını, İsrail populasyonlarına Balkan populasyonlarına göre daha yakın bulmuşlardır.

Türkiye'deki *A. mystacinus* populasyonlarının gözlenen ortalama heterozigotluk (Nei'nin genetik çeşitliliği) $H= 0.074$ olarak hesaplanmıştır. Çalışılan populasyonlar arasındaki gen akışı değeri, $N_m=0.172$ olarak bulunmuştur. Filippucci *et al.*(2002), ise çalışmalarında H değerini 0.059 ve N_m değerini ise 1.439 olarak göstermiştir. H ve N_m değerleri populasyonlardaki önemli gen akışını belirten değerlerdir. Wright (1969)'a göre N_m değerinin 1'den küçük çıkması populasyonun genetik sürüklenme yüzünden farklılaşmaya başladığını ifade eder. Bizim çalışmamızda bu değer 1'in altında olduğundan *A. mystacinus* populasyonlarında farklılaşmanın olduğu söylenebilir. Ancak Filippucci *et al.*(2002) un bulduğu N_m değeri 1'in üstündedir. Bu durumda bizim çalışmamız Filippucci *et al.*(2002)'un allozim çalışmasındaki değerleriyle uyumlu değildir.

Bu çalışmadaki sonuçlar geçmiş yıllarda yapılan morfolojik ve enzimsel çalışmalara kısmen destek sağlamıştır. Ancak Michaux *et al.* (2005) ve Filippucci *et al.* (2002) tarafından da belirtildiği gibi *A. mystacinus*'un alttürlerine ait taksonomik sorunların çözülebilmesi için daha çok örnek ile enzim sistemleri ve diğer genetik çalışmaları (mitokondriyal veya nükleer) içeren daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>

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

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

Arnheim, N. and Erlich, H. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131 – 56.

Almeida, C.F., Moreira, A.M.M., Bonvicino, R.C. and Cerqueira, R. 2000. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 793- 797

Bellinvia, E., Muncilinger, P. and Fleger J. 1999. Application of the RAPD technique for a study of the phylogenetic relationships among eight species of the genus *Apodemus*. *Folia Zool.* 48(4): 241-248.

Britton-Davidian, J., Vahdati, M., Benmehdi, F., Gros, P., Nance, V., Croset, H., Guerassimov, S. and Triantaphyllidis, C. 1991. Genetic differentiation in four species of *Apodemus* from Southern Europa: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius*, and *A. mystacinus* (Muridae, Rodentia). *Z. Säugetierkd.* 56: 25-33.

Ceyhan, Z. 2007. Doğu Karadeniz Bölgesinde yayılış gösteren *Apodemus* Kaup, 1829 (Mammalia: Rodentia) cinsinin morfolojik analizi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi.

Chelomina, G.N., Suzuki, H., Tsuchiya, K., Moriwaki, K., Lyapunova, E.A., & Vorontsov, N.N. 1998. Sequencing of the mtDNA cytochrome b gene and reconstruction of the maternal relationships of wood and field mice of the genus *Apodemus* (Muridae, Rodentia). *Genetika*, 34:650-651. (in Russian, with a summary in English).

Chelomina, G.N. 1998. Molecular phylogeny of forest and field mice of the genus *Apodemus* (Muridae, Rodentia) based on the data on restriction analysis of total nuclear DNA. *Genetika*, 34(9):1286-1292.

Corbet, G.B. 1978. The Mammals of the Palearctic Region; A Taxonomic Review. London, Brit. Mus. (Nat. Hist.), Cornell Univ. Press.

Csaikl, F., Engel, W. and Schmidtke, J. 1980. On the biochemical systematics of three *Apodemus* species. *Vomp. Biochem. Physiol.*, 65:411-414.

Csaikl, F., Haberning, M. and Csaikl, U. 1990. A comparative restriction endonuclease analysis of nuclear DNA from Austrian *Apodemus* species: intraspecific variability in middle repetitive DNA families contrasts isoenzyme data. *Z. Säugetierkd.*, 55:55-59.

Çolak, E., Yiğit, N., Çolak, R., Sözen, M., Özkurt, Ş. and Kankılıç, T., 2004. Taxonomic Status and Distribution of *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Turk J Zool* 28(2004) 285-294.

- Çolak, R., Kandemir, İ., Çolak E. and Yiğit N. 2007. Esterase Variation in Rocky Mouse, *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Acta zool. bulg.*, 59 (1), 2007: 47-52
- Danford, C. and Alston, E. 1877. On the Mammals of Asia Minor. *Proc. Zool. Soc.* London., 270 – 281.
- Demirsoy, A. 1996. Türkiye Omurgalıları, Memeliler. Meteksan Yayınevi. ISBN: 975-7746-24-X
- Doğramacı, S. 1972. Türkiye *Apodemus* (Mammalia: Rodentia)'larının Taksonomik Durumları. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1):13-15
- Ellerman, J.R. 1948. Key to The Rodents of Southwest Asia in the British Museum Collection. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 118: 765-816.
- Ellerman, J.R. and Morrison-Scott, T.C.S. 1951. Checklist of Palaearctic and Indian Mammals 1758-1946. *Brit. Mus. Nat. Hist. London.*
- Engel, W., Vogel, W., Voiculescu, L., Rogers, H., Zenzes, M. and Bender, K. 1973. Cytogenetic and biochemical differences between *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* possibly responsible for the failure to inbreed. *Comp. Physiol. Biochem.*, 44B:1165-1173.
- Filippucci, M. G. 1992. Allozyme variation and divergence among European, Middle Eastern and North African species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae). *Israel J. Zool.*, 38:193-218.
- Filippucci, M. G., Simson, S. and Nevo, E. 1989. Evolutionary Biology of the Genus *Apodemus* Kamp, 1829 in Israel. Allozymic and Biometric Analyses with Description of a New Species; *Apodemus hermonensis* (Rodentia: Muridae). *Boll. Zool.*, 56: 361 - 376.
- Filippucci, M.G., Macholan, M. and Michaux, J.R. 2002. Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae, Rodentia). *Biol. J. Linn. Soc.* 75: 395-419.
- Freeman, S. and Herron, J.C. *Evolutinary analyses* (2nd Edition©1999).
- Heun, M. and Helentjaris, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* 85:961-968.
- Hsu, F.H., F.J., Lin, Y.S. 2001. Phylogeographic structure of the Formosan wood mouse, *Apodemus semotus* Thomas. *Zoological Studies.* 40(2):91-102.
- Hunt, G.J. and Page, R.E. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphisms in the honey bee. *Theor. Appl. Gent.* 85:15-20
- Kaya, Z. and Neale, D.B. 1995. Linkage Map Based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in *Pinus brutia*. *Silvae Genetica:* 44, 110-116.
- Landry, P. And Lapointe, F. 1996 RAPD problems in phylogenetics. *Zool. Scripta.* 25(4): 283-290

- Langella, O. 2000. POPULATIONS: Population Genetic Software (Individuals or populations distances, phylogenetic trees). CNRS, France. <http://pge.cnrs-gif.fr/bio-info/populations>.
- Lavrenchenko, L.A. and Likhnova, O.P. 1995. Allozymic and morphological variability in three syntopic wood mice species of the subgenus *Sylvaemus* (Rodentia, Muridae, *Apodemus*) from Daghestan. *Zool. Zh.*, 74:107-119.
- Libois, R.M., Michaux, J.R., Ramalhinho, M.G., Maurois, C., and Sara, M. 2001. On the origine and systematics of the northern African wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations: a comparative study of mtDNA restriction patterns. *Can. J. Zool.* 79:1503-1511.
- Makova, K.D., Nekrutenko, A. and Baker, R.J. 2000. Evolution of microsatellite alleles in four species of mice (Genus *Apodemus*). *J. Mol. Evol.* 51:166-172.
- Martin, G.B., Williams, J.G.K and Tanksley, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomanas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- Mezhzherin, S. V. 1991. On specific distinctness of *Apodemus (Sylvaemus) ponticus* (Rodentia, Muridae). *Vestnik Zoologii*, (6):34-40 (in Russian, with a summary in English).
- Mezhzherin, S. V. 1997. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Palearctic mice (Rodentia, Muridae). *Genetika*, 33:78-86 (in Russian, with a summary in English).
- Mezhzherin, S. V., and Zagorodnyuk, I. V., 1989. A new species of wood mouse of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae). *Vestnik Zoologii*, 1989(4):55-59(in Russian, with a summary in English).
- Michaux, J.R., Filipucci, M. G., Libois, R.M., Fons, R., and Matagne, R.F. 1996. Biogeography and taxonomy of *Apodemus sylvaticus* (the woodmouse) in the Tyrrhenian region: enzymatic variations and mitochondrial DNA restriction pattern analysis. *Heredity.* 76:267-277.
- Michaux, J.R., Libois, R.M., Ramalhinho, M.G., and Maurois, C. 1998. On the mtDNA restriction patterns variation of the Iberian wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*). Comparison with other west Mediterranean populations. *Hereditas*, 29: 187-194.
- Michaux, J., Bellinvia, E. And Lymberakis, P. 2005. Taxonomy, evolutionary history and biogeography of the broad-toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*) in the eastern Mediterranean area based on mitochondrial and nuclear genes. *Biol. J. of the Lin. Soc.* 85: 53-63.
- Mishra, M., Dubey, N., Totey, S.M., Bhat, K.V., Babu, S., Awasthi-Kalia, M. and Anand, R.K. 2002. Phylogenetic relationships and genetic polymorphisms in wild Indian mice. *Biomolecular Engineering* 18: 281-288
- Musser, G. G. and Carleton, M. D. 1993. Family Muridae. In: Wilson, D. E. and Reeder, D. A. M. (eds.), *Mammal species of the world*, 2nd edition. Smithsonian Institution Press, Washington and London : 501-755.

- Musser, G.G., Brothers, E.M., Carleton, M.D. and Hutterer, R. 1996. Taxonomy and distributional records of Oriental and Euro-pean *Apodemus*, with a review of the *Apodemus Sylvaemus* problem. *Bonner Zoologische Beiträge* 46: 143–190.
- Neuhaser, G. 1936. Die Muriden von Kleinasien. *Z. Säugetierkde.* 11: 161-236.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance Between Populations. *American Naturalist.* 106:283-292.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia Uni. Press, New York.
- Ognev, S. I. 1947. *Mammals of the USSR and adjacent countries, Vol. 5, Moscov – Leningrad.*
- Orlov, V.N., Bulatova, N.Sh., Nadjafova, R.S., and Kozlovsky, A. I. 1996. Evolutionary classification of European wood mice of the subgenus *Sylvaemus* based on allozyme and chromosome data. *Bonn. Zool. Beitr.,* 46: 191-202.
- Padmalatha, K. and Prasad, M.N.V. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology* 5(3):230-234.
- Reutter, B.A., Petit , E., and Vogel, P. 2002. Molecular identification of an endemic Alpine mammal, *Apodemus alpicola*, using a PCR-based RFLP method. *Revue Suisse de Zoologie.* 109(1):9-16.
- Scheweder, M.E., Shatters, R.G. Jr., West, S.H. and Smith, R.L. 1995. Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analyses. *Biotechniques* 19:38-42.
- Smith, J.L., Scott-Craig, J.S., Leadbetter, J.R. Bush, G.L., Roberts, D.L. and Fulbright, D.W. 1994. Characterization of random amplified polymorphic dna (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3:135-145
- Storch, G. and Lütt, O. 1989. Artstatus der Alpenwaldmaus, *Apodemus alpicola* Heinrich, 1952. *Z. Säugetierkd.,* 54: 337-346.
- Suzuki, H., Tsuchiya , K., Sakaizumi , M., Wakana , S., Gotoh , O., Saitou, N., Moriwaki, K., and Sakurai , S. 1990. Differentiation of restriction sites in ribosomal DNA in the Genus *Apodemus*. *Biochem. Genet.* 28(3/4):137-149.
- Tegelström, H. and Jaarola , M. 1989. Genetic divergence in mitochondrial DNA between the Wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and the yellow necked mouse (*A. flavicollis*). *Hereditas,* 111:49-60
- Thomas, O. 1903. On Two New Muridae from Smyrna. *Ann. Mag. Nat. Hist.,* London, 7(12): 188-190.
- Vapa, L., Karanovic, I., Radovic, D., Purger, J., and Bokorov, M. 1995. Genetic distance between three species of the genus *Apodemus* Kaup, 1829. *Proc. Nat. Sc., Matica Srpska,* 88: 27-31

- Verimli, R., Çolak, E., Yiğit, N., Sözen, M. and Özkurt, Ş. 2000. Electrophoretic aspects of blood-serum proteins of *Apodemus mystacinus* and *Apodemus agrarius* (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Turk. J Zool*, 24: 225-229
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. and Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34: 275-305.
- Vogel, P., Maddelena, T., Mabile, A., and Paquet, G. 1991. Confirmation biochimique du status spécifique du mulot alpestre *Apodemus alpicola* Heinrich, 1952 (Mammalia, Rodentia). *Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat.*, 80: 471-481.
- Vohralik, V., Frynta, D., Mikulova, P., Benda, P. and Nova, P. 2002. Multivariate morphometrics of *Apodemus mystacinus* in the Near east and its divergence from European *A. m. epimelas* (Mammalia: Rodentia). *Isr. J. Zool.* 48: 135-148.
- Vorontsov, N. N., Boyeskorov, G. G., Mezhzherin, S. V., Lyapunova, E. A., and Kandaurov, A. S. 1992. Systematics of the Caucasian wood mice of the subgenus *Sylvaemus* (Mammalia, Rodentia, Apodemus). *Zool. Zh.* 71:119-131(in Russian, with a summary in English).
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18 (22) 6531.
- Wilson, D. E., and D. M. Reeder, eds. 1993. *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*, 2nd ed. Smithsonian Institution Press, Washington DC, 1206 pp.
- Wright, S. (1969): *Evolution and Genetics of Populations: The Theory of Gene Frequencies*. Chicago: Univ. Chicago Pres.
- Yeh, C.F., Yang, R. and Boyle, T. 1997. POPGENE Version 1.31. Windows-based Software for Population Genetics Analysis.
- Yiğit, N., Çolak, E., Sözen, M. ve Karataş, A. 2006. *Rodents of Türkiye*. ISBN: 9944-5560-0-9
- Zimmermann K. 1962. Die Untergattungen der Gattung *Apodemus* Kaup. *Bonner Zoologische Beiträge* 13: 198–208.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gül Olgun

Doğum yeri : Kırıkkale

Doğum Tarihi: 05.04.1982

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ayrancı Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (1996-2000)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2000–2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2004-2007)

Seminer : “Memeli Sistematiğinde RAPD-PCR Çalışmaları” (Y.L)

Kongre : 18. Uluslararası Biyoloji Kongresi. (Katılımcı) 2006, Haziran.
: FEBS2007 MOLECULAR MACHINES KONGRESİ-Viyana
(Poster Sunumu) 2007, Temmuz.

Çalışmakta olduğu kurum: Ankara Üniversitesi (Biyolog)