

T.C.
NIĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NANNOSPALAX NEHRINGI VE *NANNOSPALAX EHRENBERGI* (RODENTIA,
SPALACIDAE) TÜRLERİNDE PCR-RFLP İLE MİTOKONDRİYAL DNA D-LOOP VE
SİTOKROM B BÖLGELERİNİN HAPLOTİP ÇEŞİTLİLİĞİ

CANAN GÜRPINAR

Haziran 2012

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NANNOSPALAX NEHRINGI VE *NANNOSPALAX EHRENBERGI* (RODENTIA,
SPALACIDAE) TÜRLERİNDE PCR-RFLP İLE MİTOKONDRIYAL DNA D-LOOP VE
SİTOKROM B BÖLGELERİNİN HAPLOTİP ÇEŞİTLİLİĞİ

CANAN GÜRPINAR

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ

Haziran 2012

Canan GÜRPINAR tarafından Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ danışmanlığında hazırlanan “*Nannospalax nehringi* ve *Nannospalax ehrenbergi* (Rodentia, Spalacidae) Türlerinde PCR-RFLP ile Mitokondriyal DNA D-loop ve Sitokrom b Bölgelerinin Haplotip Çeşitliliği” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ, Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

(Unvan, Adı Soyadı) (Kurumu)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ, Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

(Unvan, Adı Soyadı) (Kurumu)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Tarkan YORULMAZ, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen
Fakültesi Biyoloji Bölümü

(Unvan, Adı Soyadı) (Kurumu)

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/....../2012 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2012 tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../2012

Doç. Dr. Osman SIVRİKAYA

MÜDÜR

ÖZET

NANNOSPALAX NEHRINGI VE *NANNOSPALAX EHRENBERRI* (RODENTIA, SPALACIDAE) TÜRLERİNDE PCR-RFLP İLE MİTOKONDRIYAL DNA D-LOOP VE SİTOKROM B BÖLGELERİNİN HAPLOTİP ÇEŞİTLİLİĞİ

GÜRPINAR, Canan

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ

Haziran 2012, 61 sayfa

RFLP metodu kullanılarak mt-DNA D-loop ve sitokrom b bölgelerindeki genetik farklılıklar *Nannospalax xanthodon* ve *Nannospalax ehrenbergi* türleri arasında belirlendi. Anadolu'da yaşayan iki tür için *Nannospalax xanthodon* (62 populasyon) ve *Nannospalax ehrenbergi* (2 populasyon) toplam 94 örnek çalışıldı.

Mitokondriyal DNA'da genetik farklılıkları belirlemek için, mt-DNA'nın iki bölgesi (790 bp uzunluğunda D-loop ve 500 bp uzunluğunda Cyt-b) izole edildi ve BamH-I, Taq-I, Alu-I and Msp-I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. BamH-I D-loop bölgesini kesmezken, Alu-I, Msp-I and Taq-I enzimleri bu bölgeyi pek çok örnekte sırasıyla 100-240-450 bp, 280-510bp, 170-620bp uzunluğunda bölgelerden kesti. Sitokrom b bölgesinde ise Bamh-I, Msp-I and Taq-I enzimleri bu bölgeyi pek çok örnekte sırasıyla 110-130-260bp, 200-300bp, 200-230-270-300bp uzunluğunda bölgelerden kesti. Filogenetik yapı Batı Anadolu'nun kromozomal formlarının Anadolu'daki diğer kromozomal formlardan farklı olduğunu gösterdi. Batı Anadolu formları ve diğer bölgelerdeki kromozomal formlar arasında genetik mesafe yüksek bulundu.

Anahtar Sözcükler: *Nannospalax xanthodon*, *Nannospalax ehrenbergi*, sitotip, RFLP

SUMMARY

HAPLOTIP DIVERSITY OF THE MITOCHONDRIAL DNA D-LOOP AND CYTOCHROME B REGIONS IN *NANNOSPALAX NEHRINGI* AND *NANNOSPALAX EHRENBERGI* (RODENTIA, SPALACIDAE) DETECTED BY PCR-RFLP

GÜRPINAR, Canan

Niğde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assistant Professor Dr. Teoman KANKILIÇ

June 2012, 61 pages

Genetic difference between the mt DNA D-loop and Cyt-b region was determined in the two species *Nannospalax xanthodon* and *Nannospalax ehrenbergi* using Pcr-RFLP method. 94 mole rat samples belonging to two species *S. xanthodon* (62 populations) and *S. ehrenbergi* (2 populations) distributed in Anatolia were studied

In order to detect genetic differences in mtDNA, DNA was isolated two parts of 790 bp of D-loop and 500 bp of Cyt-b in mt DNA was amplified and cut with BamH-I, Taq-I, Alu-I and Msp-I restriction enzymes. BamH-I enzyme didn't cut the D-loop region while Alu-I, Msp-I and Taq-I enzymes cut a lot of samples in 100-240-450 bp, 280-510bp, 170-620bp-length bands, respectively. In the amplified region for cyt-b region: Bamh-I, Msp-I and Taq-I enzymes cut a lot of samples in 110-130-260bp, 200-300bp, 200-230-270-300bp length bands, respectively.

In our phylogenetic reconstruction show that the chromosome forms of Western Anatolia is different from all other chromosome forms of Anatolia. Genetic distance is found high between western forms and other chromosome forms.

Keywords: *Nannospalax xanthodon*, *Nannospalax ehrenbergi*, Cytotype, RFLP

TEŞEKKÜR

Bu alışmada bana sonsuz fedakârlık ve emeği ile yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, hiçbir zaman hakkını ödeyemeyeceğim, yaptığım tüm hataları hoşgörü ve anlayıőla karşılayan, çok değerli hocam, danıőmanım Yrd. Doç. Dr Teoman KANKILIÇ'a, benimle birlikte yüksek lisans yapan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Didem ÇELİKBİLEK ve Arzu REŐADI'ye, eőim Abidin GÜRPINAR'a ve onlardan çaldığım zaman için oğullarım Kemal ve Cihan'a, okumamda destek olan canım anneme kuru ve yetersiz olduğunu bildiğim ama içten bir TEŞEKKÜR'ü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
BÖLÜM I. GİRİŞ.....	1
1.1 Ordo: Rodentia (Mammalia)	1
1.2 Familya: Spalacidae Gray, 1821	2
1.3 Cins: <i>Spalax (Nannospalax)</i> Güldenstaedt	2
1.4 Kaynak Özetleri.....	4
BÖLÜM II. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1 Materyalin Toplanması ve Hazırlanması.....	14
2.2 Karyotip Preparasyon Tekniği	17
2.3 RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Yönteminin Prensipleri.....	18
2.3.1 Bir restriksiyon sindiriminin gerçekleştirilmesi	19
2.3.2 Restriksiyon endonükleaz kesim sonuçlarının değerlendirilmesi.....	21
2.4 Çalışılan <i>Nannospalax</i> Cinsi Örneklerin Mitokondriyal DNA İzolasyonu	22
2.5 Genomik DNA, mt DNA ve Kullanılan Primerler.....	23
2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	24
2.7 PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü	25
2.8 PCR Ürününün Restriksiyon Enzimler ile Muamelesi.....	26
2.9 RFLP-pcr Jellerinin Yorumlanması	26
2.10 RFLP-pcr Verilerinin İstatistik Analizleri	27
2.10.1 Allel sayısı	27
2.10.2 Etkin allel sayısı.....	27
2.10.3 Shannon sabiti.....	27
2.10.4 Polimorfik lokus oranı.....	27
2.10.5 Genetik mesafe	28
2.10.6 Kümeleme analizi	28
2.10.7 Temel koordinat analizi (PCoA).....	28
2.10.8 AMOVA (Moleküler varyans analizi)	29
BÖLÜM III. ARAŞTIRMA BULGULAR.....	30

3.1 Çalışmada Kullanılan Körfare Örneklerinin Mitokondriyal DNA İzolasyonu.....	30
3.2 Çalışmada Kullanılan Körfare Örneklerinin Mitokondriyal DNA Kontrol (D-loop) ve Sitokrom b Bölgesinin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması.....	30
3.3 Mitokondriyal DNA Kontrol Bölgesi RFLP Analiz Sonuçları.....	31
3.3.1 D-loop lokusu Alu-I restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	31
3.3.2 D-loop lokusu BamH-I restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	32
3.3.3 D-loop lokusu Msp-I restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	33
3.3.4 D-loop lokusu Taq-I restriksiyon enzimi kombinasyonu.....	34
3.4 Mitokondriyal DNA Sitokrom b Bölgesi RFLP Analiz Sonuçları	35
3.4.1 Sitokrom b lokusu BamH-I restriksiyon enzimi kombinasyonu	35
3.4.2 Sitokrom b lokusu Msp-I restriksiyon enzimi kombinasyonu	37
3.4.3 Sitokrom b lokusu Taq-I restriksiyon enzimi kombinasyonu	38
3.5 Mitokondriyal DNA Sitokrom b ve D-loop Bölgesi RFLP Analiz Sonuçlarının	39
3.5.1 RFLP analizi verilerinde AMOVA (Moleküler Varyans Analizi)	45
3.5.2 Temel Koordinat Analizi (PCoA: Principal Coordinate Analysis)	45
3.5.3 RFLP verilerinde genetik mesafe analizi	46
BÖLÜM IV. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan körfare örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler.....	15
Çizelge 2.2 Çalışılan primerlerin baz dizileri ve çalışılan gen bölgeleri.....	24
Çizelge 2.3 Polimeraz zincir reaksiyonu Pcr karışımı	25
Çizelge 2.4 PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
Çizelge 2.5 Çalışmada kullanılan Restriksiyon endonükleazların kesme pozisyonları ..	26
Çizelge 2.6 PCR ürününün Restriksiyon endonükleazlar ile muamelesi	26
Çizelge 3.1 RFLP analizi sonucu örneklere ait 1/0 bantlanma paternleri	40
Çizelge 3.2 Populasyonlar için lokuslarda gözlenen ortalama allel sayısı	43
Çizelge. 3.3 RFLP sonucu elde edilen DNA bantlarının populasyonlardaki sayıları	44
Çizelge 3.4 Aksis ve örnek vektörlerinden elde edilen Eigen değerleri.....	46
Çizelge 3.5 Kromozomal formlar arasındaki Nei [76] genetik mesafe değerleri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Manisa-Alaşehir'den Prof. Dr. Ahmet KARATAŞ tarafından çekilen <i>N. xanthodon</i> türüne ait fotoğraf	3
Şekil 1.2 Spalacidae familyasının (kırmızı alan) ve <i>Microspalax</i> cinsinin (yeşil sınırlar) yayılışlarını gösteren harita	5
Şekil 2.1 Körfare örneklerinin toplandığı bölgelerin harita üzerinde gösterimi.....	17
Şekil 2.2 Laboratuvarında restriksiyon sindiriminin gerçekleştirilmesi	21
Şekil 2.3 mt-DNA'da çalışılan bölgeleri gösteren DNA haritası.....	24
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan örneklerin izole DNA'ların elektroforez görüntüsü.....	30
Şekil 3.2 mtDNA kontrol bölgesi ve Sitokrom b bölgesinin PCR ile çoğaltılma sonuçları	31
Şekil 3.3 D-loop lokusunda Alu-I restriksiyon enzimi kesim modelleri.....	32
Şekil 3.4 D-loop lokusunda BamH-I restriksiyon enzimi kesim modelleri	33
Şekil 3.5 D-loop lokusunda Msp-I restriksiyon enzimi kesim modelleri.....	34
Şekil 3.6 D-loop lokusunda Taq-I restriksiyon enzimi kesim modelleri	35
Şekil 3.7 Sitokrom b lokusunda BamH-I restriksiyon enzimi kesim modelleri	36
Şekil 3.8 Sitokrom b lokusunda Msp-I restriksiyon enzimi kesim modelleri	37
Şekil 3.9 Sitokrom b lokusunda Taq-I restriksiyon enzimi kesim modelleri	38
Şekil. 3.10 RFLP sonucu elde edilen DNA bantlarının populasyonlardaki dağılışı.....	44
Şekil 3.11 Moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları.....	45
Şekil 3.12 RFLP verilerinin 16 kromozomal formda Temel Koordinat Analiz sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi	46
Şekil 3.13 Nei [76] tarafsız genetik mesafe değerlerine göre oluşturulan UPGMA ağacı	47
Şekil 3.14 Nei [76] tarafsız genetik mesafe değerlerine göre oluşturulan N.J ağacı	48

BÖLÜM I

GİRİŞ

1.1 Ordo: Rodentia (Mammalia)

Rodentia ordosu 29 familya, 400'den fazla cins ve 2800'ün üzerinde türüyle memeli sınıfının en büyük takımıdır. Antarktika, Yeni Zelanda ve birkaç okyanus takımadası hariç bütün karalara yayılmışlardır. Bu hayvanlar kara, ağaç, toprak altı ve yarı sucul olmak üzere çok farklı habitatlarda yayılış gösterirler. Diğer takımlardan kolayca ayrılabilen kemiricilerin kendi içlerinde filogenetik durumları birçok yönden kesin değildir. Çiğneme kasları ve kafatası yapıları kemiricileri sınıflandırmak için önemli morfolojik özelliklerdir. Her bir grup kafatası yapısı, çenenin kafatası ile yapmış olduğu bağlantıyla birbirinden ayrılır. Rodentia ordosu, çiğneme kaslarının konumuna göre bazı kaynaklarda 4, bazılarında 5 alttakıma ayrılmaktadır [1].

Rodentia takımını diğerlerinden ayıran en önemli ayırıcı karakterler, köpek dişleri ve ön azı dişlerinin kaybolması ile oluşan diastema boşluğudur. Diastema boşluğu üst kesici dişlerle birinci azı (molar) diş arasında bulunan ve besinleri toplamak için kullanılan bir boşluktur. Her iki çenenin önünde bulunan ikişer adet kesici diş tüm kemiricilerin ortak özelliği olup bu dişler köksüzdür ve devamlı büyürler. Kesici dişlerin kırılması halinde yerine yeni diş çıkmayacağından dolayı kırılan dişin karşısındaki diş devamlı büyüyerek hayvanın ölümüne neden olabilir [1]. Azı molar dişlerin en önemli özelliği çiğneme yüzeylerinde mine katlanmalarının bulunmasıdır. Bu dişler kemirmede kullanılmaz ve büyümmezler. Kemiricilerin genel diş formülü $1/1 \ 0/0 \ 0/0 \ 3/3 = 16$ 'dır. Bazı kemirici türlerinde ön azı (premolar) dişlerde bulunur. Bunların sayısı hiçbir zaman iki çiftten fazla olmaz. Kemiriciler en fazla 22 dişe sahiptirler [2].

Bazı türlerde besinin toplanmasına yarayan yanak keseleri vardır. Mideleri basit, körbağırsakları uzundur. Kuyrukları çoğunlukla 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. Gececi olanlarda ise oldukça büyüktür. Gözler başın yan taraflarında yer aldıklarından hem önü hem de arkayı aynı anda görebilirler. Suda yaşayanlarda gözler başın üst kısmındadır. Kulaklar da yaşam biçimine göre değişik şekiller gösterir. Örneğin, toprak altında ve suda

yaşayanlarda oldukça küçülmüştür. Kemiriciler genellikle herbivor ya da omnivordurlar. Üreme kapasiteleri çok yüksektir. Gebelik süreleri 14-170 gün arasında değişir. Çoğunlukla yılda birkaç defa doğururlar ve her doğumda 1-18 yavru yaparlar. Bazı türleri insanlar için hastalık taşıyıcıları nedeniyle ya da ekonomik yönden zararlıdır [3].

1.2 Familya: Spalacidae Gray, 1821

Körfareler yüksek derecede toprak altı hayata uyum göstermiş hayvanlardır. Neredeyse tamamen toprak altında yaşarlar ve kökler, rizomlar ve soğanlarla beslenirler. Bir dış açıklığı bulunmayan gözler küçülmüş ve görevini yitirmiştir. Dış kulak gerilemiştir ve kuyruk bulunmaz. Ayaklar kazmak için adapte olmamıştır, bu fonksiyon başın buldozer etkisi ile dişlerle yerine getirilmektedir. Pençeler özellikle genişlememiştir. Kafatası fossorial (kazıcı) hayat için oldukça farklılaşmıştır ve yetişkinlerde kuvvetli şekilde eğimli bir yapı kazanmıştır. Supraoccipital bölge posterior zygomatik köklerin seviyesine ulaşarak öne doğru meyilleşmiştir. Böylece kafatasının toplam uzunluğunun 1/3 veya daha fazlasını kapsar. Zygomatik plate'ler nispeten dardır; infraorbital foramina geniştir. Foramina incisiva çok küçüktür ve dar bir yarık şeklindedir. Pterygoid fossa dorsal olarak kapanmamıştır ve böylece geniş bir foramen gibi görülür. Kesici dişler oldukça geniştir, alt kesiciler mandibul üzerinde kondillerin gerisinde güçlü çıkıntılar (process) oluşturur. Çiğneme dişleri köklüdür; genç hayvanların dişlerinin iç ve dış girintili kıvrımları kısa sürede taç yüzeyinde izole olmuş adacıklar haline gelir [2]. Baş ve vücut uzunluğu 130-310 mm arasında sıralanmaktadır. Ortalama vücut ağırlığı 100-570 gr arasında değişmektedir. Vücut büyüklüğü iklim, toprak tipi ve habitat verimliliğine bağlı olarak coğrafik olarak değişmektedir. Kürk rengi koyu kahverenginden sarımsı gri rengine kısmen toprak yapısına bağlı olarak değişmektedir. Kürk oldukça yumuşak, yoğun ve esnektir [4].

1.3 Cins: *Spalax (Nannospalax) Guldenstaedt*

Tip Türü: *Spalax microphthalmus* Guldenstaedt, 1770.

Sinonimler: *Anotis* Rafinesque, 1815; *Aspalax* Desmarest, 1804; *Glis* Erxleben, 1777; *Macrospalax* Mehély, 1909; *Mesospalax*, Mehély, 1909; *Microspalax* Mehély, 1909; *Myospalax* Hermann, 1783; *Nannospalax* Palmer, 1903; *Ommatostergus* Nordmann, 1840; *Talpoides* Lacepede, 1799; *Ujhelylana* Strand, 1922.



Şekil 1.1 Manisa-Alaşehir'den Prof. Dr. Ahmet KARATAŞ tarafından çekilen *N. xanthodon* türüne ait fotoğraf

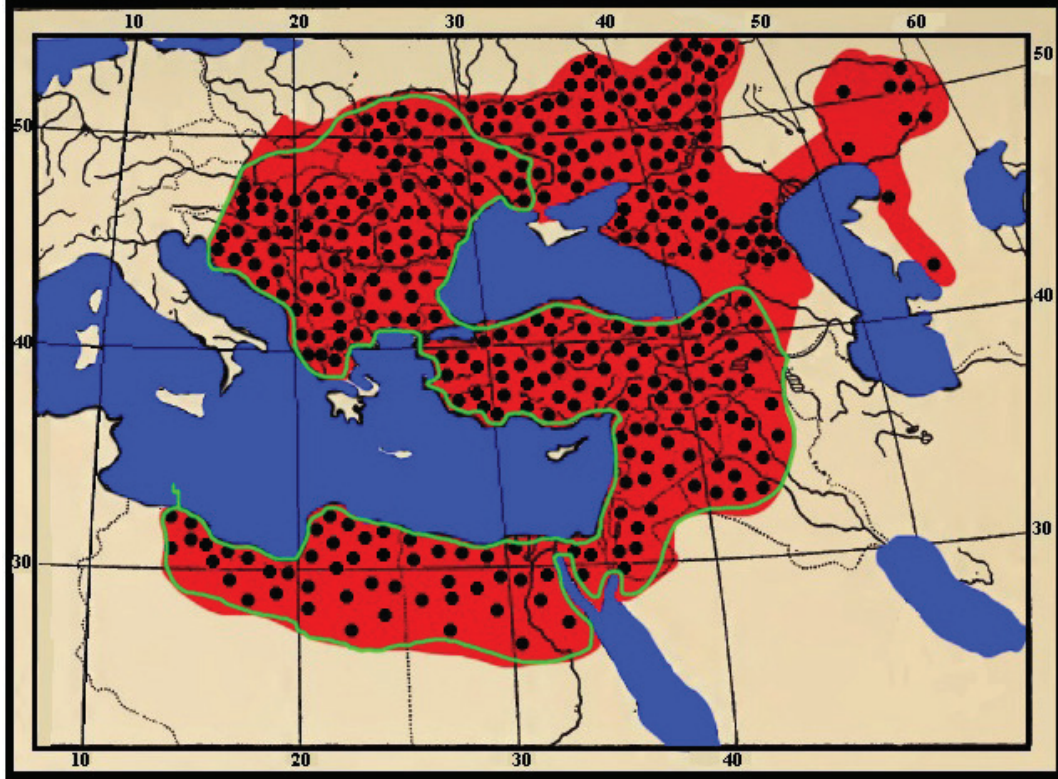
Spalax cinsi bireyleri hayatlarının neredeyse tamamını toprak altında dişleriyle kazdığı galerilerde geçirmekte ve bu galerileri açarken rastladıkları bitkilerin toprak altı organları ve bitkiyi kökünden tutup toprak altına tamamen çekerek yaprak kısımları ile beslenmektedir. Kış uykusuna yatmazlar. Soğuk kış ve çok sıcak yaz dönemlerinde aktivitesini azaltarak uygun mevsimlerde depoladığı besinleri yiyerek yaşamaktadır. Körfareler tarım alanlarında da yaygın bir şekilde bulunmaktadır ve özellikle soğan, havuç, patates gibi yumrulu bitkileri yuvasına taşıyarak depolar ve bu yüzden ürün kaybına sebep olurlar. Bir *Spalax* yuvasında 20 kg kadar patates bulunduğu belirlenmiştir [2]. Vücut renkleri mevsimsel farklılıklar göstermekle birlikte, genel vücut rengi gövdenin üst tarafı ile yanlarda sarımsı olup çok sık ve yumuşak kıllarla kaplıdır. Kulak bölgesi ile gövdenin alt kısmı koyu, başın ön tarafı ise açık gri renktedir. Alt çeneden karına doğru uzanan kısım seyrek tüylerle kaplıdır [5]. Gövde silindirik şeklinde olup, baş gövde kalınlığına yakındır. Boyun kısa ve gövde kalınlığı kadardır. Ağız küt, gözler körelmiş olup, büyükçe olan ve orta kulağa açılan kulak açıklığı tüyler arasında görülebilmektedir. Kuyruk mevcut olmayıp, bu kısımda çok küçük, çıplak bir çıkıntı vardır [5].

Diş formülü: i 1/1, c 0/0, pm 0/0, m 3/3 = 16.

1.4 Kaynak Özetleri

Kemiriciler içinde toprak altı ekolojik nişini kullanan ekstrem örneklerden olan Spalacidae familyasının temsilcileri Anadolu'da bir bölgeden köken almıştır. Günümüzde Güneydoğu Avrupa, Anadolu, Kafkasya, Transkafkasya, Ukrayna, Ermenistan, Suriye, Filistin, İsrail, Irak, Ürdün ve Kuzey Afrika'da yayılış göstermektedir (Şekil1.2) [6, 7].

Yakın geçmişte *Spalax* Güldenstaedt, 1770 cinsi tanımlanmış ve daha sonra Spalacidae Gray, 1821 familyası oluşturulmuştur. Familyanın kuruluşundan bu yana Spalacidae, familya, cins ve türlerinin sistematigi ve filogenisi problemlidir ve araştırmacılar arasında henüz fikir birliği sağlanamamıştır [6]. Bu sistematik belirsizlik Spalacidae temsilcilerinin anavatanı olan Anadolu'da daha karmaşık bir boyut almıştır. Bu güne kadar Anadolu körfareleri üzerine yapılmış sistematik çalışmaların çoğu, farklı araştırmacılar tarafından farklı zaman ve bölgelerden alınan, az sayıdaki örneklerle dayalı tipolojik çalışmalar olmuş, popülasyonlara dayalı birkaç çalışmada ise, sadece bazı özelliklerin istatistiksel analizlerin yapılması ile yetinilmiştir. Örneğin, Anadolu'dan Mehély [8] tarafından kayıtları verilen *Spalax monticola turcicus* sadece 6, *S. m. armeniacus* ve *S. m. anatolicus* sadece 3 ve *S. m. cilicicus* sadece 1 kafatasına bakılarak tanımlanmıştır. Pek çok araştırmacı alttür veya tür tanımlarını yaparken her bir hayvandan inceledikleri morfolojik karakterlerin varyasyon sınırlarını araştırmamış, tanımlamalar sadece birkaç hayvanda gördükleri farklılıklar üzerine yapılmıştır. Bu nedenle geçmişten bu zamana kadar tanımlanan pek çok tür ve alttür ya sinonim olmuş (*S. labaumei* Metschie 1919, *S. m. corybantium* Hinton 1920, *S. m. captorum* Hinton 1920) ya da nomenklatürden çıkarılma durumuna gelmiştir (*Nannospalax kirgisorum* Nehring 1898).



Şekil 1.2 Spalacidae familyasının (kırmızı alan) ve *Microspalax* cinsinin (yeşil sınırlar) yayılışlarını gösteren harita [6,7]

Anadolu, Miyosen'den günümüze kadar hem jeolojik olaylar bakımından hem de klimatolojik açıdan dünyanın en hareketli bölgelerinden biridir. Pleistosen'de meydana gelen soğuk dönemlerde canlıların Anadolu'daki daha uygun ortamlar olan vadilere çekilmesi, bunların dışındaki çevrelerde hemen hemen tam bir tundra ikliminin hüküm sürmesi; bu vadilerde bulunan canlıların uzun bir süre yalıtılmış olarak kalmaları; Anadolu'yu, zoocoğrafik açıdan çok sayıda kompartımana bölmüştür. Ayrıca kıtalar arasında bir geçiş bölgesi olmasından dolayı, jeolojik devirler boyunca farklı kökene sahip olan canlıların geçiş bölgesi ve sığınma yeri olmuş ve bu nedenle biyoçeşitlilik bakımından oldukça zenginleşmiştir [9]. Jeolojik devirler boyunca meydana gelen tüm bu etkin olaylar, özellikle körfareler gibi pasif olarak hareket eden canlılar üzerine etkisi büyük olmuş ve bu canlıların tür veya alttür düzeyinde farklılaşmasını sağlamıştır.

Bu güne kadar Anadolu'dan ilk körfare kaydı Nordmann [10] tarafından İzmir'den *S. typhlus xanthodon* adı ile verilmiştir. Bunu takiben, Nehring [11] Bosna'dan *S. monticola*, Çengenköy: (Antakya: İskenderun)'den *S. intermedius*, Yafa: (İsrail)'den *S. ehrenbergi*, Mısır'dan *S. aegyptiacus*, Suriye'nin kuzeyinden *S. kirgisorum* adı ile yeni

türler tanımlamıştır. Satunin [12] Kazkoparan: (Kars: Gaziler)’den *S. nehringi* adıyla başka bir tür tanımlamıştır. Mehély [8] Kura: (Ardahan: Göle) nehrinin kaynağı dolaylarından *S. m. armeniacus*, Madenköy: (Niğde: Çiftahan)’den *S. m. cilicicus*, Bornova: (İzmir)’den *S. m. anatolicus*, Bakırköy: (İstanbul)’den *S. m. turcicus* adları ile yeni alttürler tanımlamıştır. Metschie [13] Porsuk: (Eskişehir) nehri civarından *S. labaumei* türünü tanımlamıştır. Hinton [14] Murat dağ: (Kütahya: Gediz)’den *S. m. corybantium* ve Çankırı’dan *S. m. captorum* alttürlerini tanımlamıştır. Misonne [15] Urfa’dan almış olduğu örnekleri *S. ehrenbergi* Nehring olarak teşhis etmiştir. Son olarak, Coşkun [16] Gömemiş: (Tunceli)’ten *Nannospalax tuncelicus*; Coşkun [17] Sarıgüllük: (Gaziantep)’ten *N. nehringi nevoi*, Coşkun [18] Sarıtosun: (Tunceli: Ovacık)’dan *N. munzuri* türünü tanımlamıştır.

Mehély [8] *Spalax* cinsi üzerine yaptığı “species generis *Spalax*” isimli monografında, *Spalax* cinsini üç altcins (*Microspalax*, *Mesospalax*, *Macrospalax*) bölerek incelemiştir. Ayrıca, Nehring [11] tarafından tanımlanan *S.kirgisorum*, *S.ehrenbergi*, *S. intermedius*, *S. aegyptiacus* türlerini *S. ehrenbergi* türü altında toplamış ve bu türlerle birlikte Nehring [19] tarafından Lübnan’ın Holosen çökeltilerinden tanımlanan *S.fritschi* Nehring türleri için *Microspalax* altcinsini oluşturmuştur. Mehély [8] *S. nehringi* Satunin, 1898 türünü, *S. leucodon* türünün bir alttürü olarak değerlendirmiş ve bu türün yayılış sınırları içerisinde Türkiye-Trakya’yı da katmıştır.

Ognev [1], Mehély [8] tarafından *Spalax* cinsi üzerine yapılan monografi incelemiş ve *Microspalax* ile *Mesospalax* altcinslerinin sinonim olduklarını, bu nedenle *Spalax* cinsinin *Spalax (Macrospalax)* Mehély [8] ve *Microspalax* Mehély [8] olmak üzere iki altcinsten oluşabileceğini ileri sürmüştür. Ognev [1] yapmış olduğu çalışmada bu altcinsleri, özellikle subracondyloid foramina’nın bulunması (*Spalax*) ve bulunmaması (*Microspalax*) durumuna göre ayırmıştır. Ognev [1], Nehring [11] tarafından verilen *Spalax m.* için verilen ayırıcı özelliklerin Nordmann [10] tarafından yeni form olarak verilen *S. t. leucodon* için verilen özelliklerle tamamen aynı olduğunu belirterek, *monticola* adının öncelik kuralına uygun olarak *leucodon* ile yer değiştirilmesi gerektiğini ve *S. leucodon* isminin geçerli olduğunu söylemiştir. Ayrıca Ognev [1] *S. l. nehringi* Satunin, 1898 ve *S. l. armeniacus* Mehély [8] 1909 alttürlerinin benzer olduklarını söylemiştir.

Ellerman ve Morrison-Scott [20], Mehély [8] tarafından *Spalax* cinsi için tanımlanan üç altcins ait tip örnekleri arasında fark bulunmadığı ve bu cinsi altcinslere ayırmanın hatalı olduğunu ileri sürmüştür. Hatta bu cins içinde sadece üç türün bulunduğunu (*S. microphthalmus* Güldenstaedt, *S. ehrenbergi* Nehring, *S. leucodon* Nordmann) ve bu türlerden sadece *S. leucodon*'un Türkiye'de yayılış gösterdiğini belirtmiştir.

Topachevskii [7] yaşayan körfareleri Spalacinae subfamilyası altında incelemiştir. Bu familyayı ilk önce iki cins (*Microspalax* Nehring, 1897 ve *Spalax* Güldenstaedt, 1770) blmştir. Daha sonra *Microspalax* cinsini ise iki altcins (*Microspalax* Nehring, 1897 ve *Mesospalax* Mehely, 1909) ayırmıştır. Anadolu'da yayılış gösteren *S. ehrenbergi* Nehring 1898 türünü *Microspalax* altcinsi altında, *S. nehringi* Satunin, 1898 ve *S. leucodon* türlerini ise *Mesospalax* altcinsi altında incelemiştir. Topachevskii [7] alışmasında Nehring [11] tarafından Anadolu'dan tanımlanan dört türü Mehély [8] sınıflandırmasına uygun olarak (*S. ehrenbergi*, *S. kirgisorum*, *S. intermedius*, *S. aegyptiacus*) *S. ehrenbergi* türü altında birleştirmiştir. Böylece *S. ehrenbergi* türünün Mısır, Suriye, Lübnan, Ürdün, Türkiye'nin Güney Doğusunda yayılışa sahip olduğunu belirtmiştir. Ayrıca *S. e. ehrenbergi* Nehring 1898'in Türkiye'nin güneyinde bir alanda yayılışa sahip olduğunu söylemiş fakat bu alttürün kesin yayılış sınırları hakkında tam bir bilgi verememiştir. Tam bir yayılış sınırları vermese de *S. nehringi* Satunin, 1898 türünün Anadolu'da yayılışa sahip olduğunu söyleyerek bu türü iki alttre blmştir. Mehély [8] tarafından şuan ki Kura: (Ardahan: Gle) nehri dolaylarından verilen diğer bir alttür olan *S. n. armeniacus* türünü, *S. n. nehringi* Satunin, 1898 içinde sınıflandırmış ve Türkiye'nin Dođusundaki Ağrı Dağı'nın batısındaki havzada yayılış gösterdiğini belirtmiştir. Mehely [8] ve Hinton [14] tarafından verilen diğer alttürleri ise (*S. n. cilicicus* Mehély [8]; *S. n. anaticus* Mehély [8]; *S. n. turcicus*, Mehély [8]; *S. n. corybantium* Hinton; *S. n. captorum* Hinton) *S. n. cilicicus* Mehély [8] alttürü altına toplamıştır. Topachevskii [7] ilk önce Nehring [11] ve ondan sonra Mehely [8] tarafından Balkan lkeleri, Romanya, Macaristan ve Trakya'da bulunduğu kabul edilen *S. leucodon* Nordman, 1840 türünü iki alttre blmştir (*S. l. leucodon* Nordmann, 1840 ve *S. l. monticola* Nehring, 1898). Bu türlerden *S. l. monticola* Nehring alttrnn Yugoslavya, Yunanistan'ın Kuzeyi, Bulgaristan, Macaristan ile birlikte Trakya-Türkiye'de bulunduğunu belirtmiştir.

Corbet [21], Topachevskii [7] ve Mehély [8] tarafından körfareler için yapılan sınıflandırmanın çok karmaşık olduğunu belirterek, körfareleri üç congenerik (hemcins) species (*S. microphthalmus* Güldenstaedt, *S. giganteus* Nehring, *S. leucodon* Nordmann) altında toplamıştır. Corbet [21], Harrison [22] çalışmasına paralel olarak, *S. leucodon* ve *S. ehrenbergi* türlerinin conspesific olduğunu belirtmiştir. Corbet [21] bu türlerden sadece *S. leucodon*'un Anadolu'da yayılış gösterdiğini söylemiştir. Fakat Corbet ve Hill [23] alışmasında Spalacidae familyasını iki cins (*Spalax* ve *Nannospalax*) ve sekiz tre bölmüştür. Bu cinslerden *Nannospalax* (*Spalax*, *Microspalax*, *Mesospalax*)  tür ile temsil edilmektedir (*N. ehrenbergi*, *N. leucodon*, *N. nehringi*) ve sadece *N. nehringi* türü Anadolu'da yayılışa sahiptir.

Mursaloğlu [24], Ognev [1]'in çalışmasına dayanarak Türkiye körfare örneklerini subracondyloid foramina'nın bulunması bakımından *Microspalax* altcinsi içinde incelemiştir. Yaptığı alışmada Türkiye'de sadece iki türün *S. leucodon*, Nordmann (Anadolu ve Trakya) ve *S. ehrenbergi* Nehring (Güneydoğu Anadolu) bulunduğunu belirtmiştir.

Gromov ve Baranova [25] yaptığı çalışmada yaşıyan körfareleri Spalacidae Gray, 1821 familyası altında iki cins altında sınıflandırmıştır (*Nannospalax* Palmer, 1903 ve *Spalax* Güldenstaedt, 1770). Gromov ve Baranova [25], *Microspalax* Nehring, 1898 cins isminin daha önce Megnin ve Trouessart (1884) tarafından Acarina için kullanıldığını, öncelik kuralına göre *Microspalax* Nehring cins isminin *Nannospalax* Palmer, 1903 ile yer değiştirilmesi gerektiğini söylemiştir. Gromov ve Baranova [25] iki cins içinde on yaşıyan tür tanımlamış ve türlerden sadece *Nannospalax nehringi* Satunin, *Nannospalax leucodon* Nordmann türlerinin Türkiye'de bulunduğunu belirtmiştir.

Kıvanç [26], Mursaloğlu [24]'nun örnekleri üzerine yaptığı doktora tez çalışmasında, Türkiye'den 1100 körfare örneğini inceleyerek, *Spalax* cinsine ait *S. leucodon* ve *S. ehrenbergi* türleri ile bu türlere ait *S. l. nehringi*, *S. l. armeniacus*, *S. l. cilicicus*, *S. l. anatolicus*, *S. l. turcicus*, *S. e. intermedius* ve *S. e. kirgisorum* alttürlerinin Türkiye'de yayılış gösterdiğini bildirmiştir. Bu türlerden *S. leucodon*'un Türkiye'nin Doğu Anadolu, İç Anadolu, Karadeniz, Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde yayılış gösterdiğini belirtmiştir. Bu türün alt türlerinden *S. l. nehringi*'nin Doğu Karadeniz'de, Doğu Anadolu'da, Munzur ve devamı olan dağlar boyunca Anamur'a doğru; *S. l. armeniacus*'un Artvin, Ardahan yörelerinde; *S. l. cilicicus*'un İç Anadolu'da ve Orta Karadeniz'de; *S. l. anatolicus*'un Ege ve Akdeniz bölgelerinde; *S. l. turcicus*'un Trakya

ve Bolu, İzmit yörelerinde yayılış gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca *S. ehrenbergi* türünün ise Doğu Anadolu bölgesinin güneyinde ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yayılış gösterdiğini, bu türün alttürlerinden *S. e. kirgisorum*'un Urfa bölgesinde, *S. e. intermedius*'un Urfa civarı hariç Doğu Anadolu bölgesinin güneyinde ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yayılış gösterdiğini belirtmiştir.

Harrison and Bates [2] Arabistan Memelileri üzerine yapmış olduğu çalışmada Libya, Arap Yarımadası, Anadolu, Trans Kafkasya ve Avrupa'nın Güney Doğusunda *Spalax leucodon* Nordmann türünün bulunduğunu belirtmiştir.

Wilson ve Reeder [27] körfareleri Spalacidae Gray, 1821 familyası ve tek bir cins (*Spalax* Güldenstaedt, 1770) altında incelemiştir. *Spalax* cinsini altcins'e ayırmamıştır. Bu cins altında 13 tür tanımlamıştır. Bu türlerden *Spalax ehrenbergi* (Nehring, 1898) (Türkiye'nin Güney Doğusu), *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Türkiye'nin Kuzey Batısı, Trakya ve Marmara bölgesinde) ve *Spalax nehringi* (Satunin, 1898) (Gökçeada, Bozcaada, Trakya, Güney Doğu Anadolu haricinde tüm Türkiye'de) türlerinin Türkiye'de yayılışa sahip olduğunu belirtmiştir.

Kryštufek and Vohralik [28] Türkiye ve Kıbrıs memelileri üzerine yaptığı çalışmada Türkiye körfarelerini bütün ayrıntılarıyla incelemiştir. Bu çalışmasında Türkiye'de üç körfare türünün bulunduğunu, bu türlerden *S. ehrenbergi* türünün Türkiye'nin Güneydoęu Anadolu bölgesinde, *S. leucodon*'un Trakya'da ve *S. xanthodon* türünün ise her iki türün yayılış alanlarının haricinde kalan bütün Anadolu'da yayılışa sahip olduğunu belirtmiştir.

Yukarıda verilen çalışmalar genellikle yayılış kayıtları ile birlikte morfolojik özelliklere dayalı çalışmalardır. Bu çalışmalar sonucunda bazı araştırmacılar körfareleri tek bir cins altında [1, 2, 20, 21, 27, 28, 29], bazıları ise iki cins altında [7, 25], bazı araştırmacılar ise cinsleri altcinslere ayırarak sınıflandırmışlardır [7, 8, 30,]. Dünya literatürü gözden geçirildiğinde, genellikle morfolojik çalışmalarda Topachevskii [7]'nin ortaya koyduğu sınıflandırmanın benimsendiği ve takip edildiği görülmektedir. Türkiye'de Spalacidae ile ilgili çalışmalar dikkate alındığında, cins ve altcinslerin taksonomik durumunun henüz tam olarak açıklığa kavuşmadığı görülür. Zira bazı çalışmalarda Ognev [1]'in ortaya koyduğu ve Mursaloğlu [24]'nun da teyit ettiği cins ve altcinsler kullanılmakta, bazı çalışmalarda ise Türkiye'de Topachevskii [7]'nin cins ve altcinsleri kullanılmaktadır. Türkiye Spalacidae familyasındaki cins ve altcins problemlerinin

çözümü üzerine kapsamlı bir çalışma yapılmadığı için, bu çalışmada Türkiye’de yayılışa sahip olan körfareler Topachevskii [7]’a uygun olarak *Microspalax* Nehring, 1898 cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Fakat *Microspalax* Nehring, 1898 cinsi daha önce *Microspalax* Megnin and Trouessart, 1884 şeklinde bir Acarina için kullanıldığı için [1, 25], öncelik kuralına uygun olarak biz bu çalışmada körfarelerde *Microspalax* yerine *Nannospalax* Palmer, 1903 cins ismini kullanmayı uygun bulduk.

Türkiye sınırları içinden körfareler için bu güne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından 6 tür ve 8 alttür tanımı yapılmıştır. Bu zamana kadar tanımlanmış tür ve alttürler üzerine yapılan morfoloji temelli çalışmalar, Türkiye’de sadece üç türün (*Nannospalax ehrenbergi*, *N.xanthodon* (sinonim *N. nehringi*), *N. leucodon*) bulunduğunu işaret etmektedir [27, 28]. Fakat son 30 yıl içinde bu familya mensupları üzerinde yapılan karyolojik çalışmalar, körfarelere taksonomisini daha karmaşık bir hale sokmuştur.

Türkiye’deki *Nannospalax* (=cins Topachevskii’ye göre *Microspalax*, altcins Mehely’e göre *Microspalax* = *Microspalax* + *Mesospalax*) türleriyle ilgili karyolojik çalışmalar, Türkiye’deki her üç türünde, diploid kromozom sayıları farklı çok sayıda populasyondan (Sitetip) oluştuğunu göstermektedir. Bu türlerden Balkan ülkelerinde ve Trakya’da geniş yayılışa sahip olan *Nannospalax leucodon* üzerine yapılan karyolojik çalışmalar, bu türün diploid kromozom sayısının $2n= 46 - 58$, Temel Kromozom Kol Sayısı (NFa) = $72 - 94$ arasında değişen yaklaşık 30 sitotipten oluştuğunu göstermektedir [6, 31]. Fakat Trakya’da yalnızca $2n = 56$ NFa = 72 (Gelibolu-Eceabat; [31]) ve $2n= 56$ NFa = 74 (Trakya’nın geri kalan kısmı, [32]) olmak üzere iki sitotip bulunmaktadır.

Anadolu’da geniş bir yayılışa sahip tür olan *Nannospalax xanthodon* (*N. nehringi*’nin sinonimi) üzerine yapılan karyolojik çalışmalar, bu tür içinde diploid kromozom sayısı $2n= 36 - 62$ arasında, Temel Kromozom Kol Sayısı (NFa)= $64 - 84$ arasında değişen 28 farklı sitotipin bulunduğunu göstermektedir [31- 44].

Ürdün, İsrail, Mısır ve Türkiye (Güneydoğu Anadolu)’de bulunan bir diğer tür olan *Nannospalax ehrenbergi* üzerine yapılan karyolojik çalışmalar, bu türün diploid kromozom sayısının $2n= 48 - 62$ arasında, Temel Kromozom Kol Sayısının (NFa)= $62 - 86$ arasında değiştiğini göstermektedir. Türkiye örnekleri üzerine yapılan çalışmalarda ise diploid kromozom sayısı $2n= 48, 52, 54, 56, 58$ olan ve Temel Kromozom Kol Sayısı (NFa)= $62, 64, 68, 70, 72, 76, 78, 82$ olan yaklaşık 12 sitotip tanımlanmıştır [35,

37, 38, 45, 47]. Sonuç olarak, Türkiye’deki mevcut üç türde tanımlanmış sitotip sayısı 42’ye ulaşmıştır. Her ne kadar morfoloji temelli çalışmalarla bu cinsin Türkiye’deki taksonomik durumu hakkında bazı sonuçlara varmışlarsa da son yıllarda hız kazanan karyolojik çalışmalar sonucu, belirlenen sitotiplerin nasıl sınıflandırılacağı araştırmacılar arasında tartışma konusu olmuştur. Zira İsrail’de yayılış gösteren *Nannospalax ehrenbergi*’ye ait dört sitotip ($2n = 52, 54, 58, 60$), ayrı birer tür olarak tanımlanmıştır (*N. galili*, *N. golani*, *N. carmeli*, *N. judaei*) [48]. İsrail’deki bu durum, evrimsel olarak birbirinden daha önce ayrılmış atasal formların bulunduğu Türkiye örnekleri üzerinde araştırılmış ve Anadolu’da 20’den fazla türün bulunduğu ileri sürülmüştür [37, 49, 50, 51]. Türkiye körfare türleri için belirlenen sitotiplerin fazlalığı ve herbir tür içindeki sitotiplerin morfolojik olarak çok benzer özellikler göstermeleri bu sitotiplerin araştırmacılar tarafından ayrı bir takson olarak tanımlanmasını zorlaştırmıştır. Bundan dolayı pek çok araştırmacı mevcut sitotipleri tür üstü bir kategoride gruplama ihtiyacı duymuş ve mevcut türleri taksonomik bir kategori olmayan “Superspecies=üsttür” olarak kabul etmişlerdir [6, 37, 52].

Populasyon genetiği ve filogeni çalışmalarında kullanılan çoğu belirteçler, İsrail körfarelerinde araştırılmış ve İsrail sitotipleri için tanımlanan (*S. galili*, $2n=52$; *S. golani*, $2n=54$; *S. carmeli*, $2n=58$; *S. judaei*, $2n=60$) türlerin filogenetik yapıları ve evrimsel açılımları detaylı olarak çalışılmıştır [48]. İlk çalışma İsrail’de 1989 yılında, *N. ehrenbergi* türünün kromozomal formları arasında DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile başlamıştır [53]. Bunu takiben yine İsrail’de Haptoglobin [54] ve Aldolase [55] DNA polimorfizm çalışmaları ile devam etmiştir. Son iki çalışmada elde edilen DNA farklı restriksiyon enzimleri ile kesilerek (RFLP) varyasyon araştırması yapılmış ve bu türde çok fazla varyasyonun olduğu tespit edilmiştir. Sonraki çalışmalar, RAPD (Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA) ve daha sonra ise birçok mtDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılıp ya RFLP ya da DNA dizi analizleri ile yapılan araştırmalardır [56, 57, 58, 59].

Bu zamana kadar Türkiye körfare örnekleri üzerine sınırlı sayıda genetik çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar genellikle sınırlı örnek serisi üzerine, birkaç sitotip üzerine yapılan çalışmalardır. Her ne kadar bu çalışmalarda birkaç sitotip çalışılmış olsa da, elde edilen sonuçlar, Türkiye körfarelerinin taksonomik durumu hakkındaki genel manzaranın tahmini için çok değerli bilgiler sağlamıştır. Örneğin Nevo et al. [37], Türkiye’den *N. xanthodon*’a ait 20 lokaliteden elde ettiği 55 örnek ve *N. ehrenbergi*’ye

ait 4 lokaliteden 14 örnek, her iki tür için toplam 9 sitotip üzerine yaptığı allozim çalışmasında, ortaya çıkan heterozigotluk (*H*) ve karyolojik çalışmalar sonucundaki diploid kromozom değerlerinin ($2n$), Anadolu ve İsrail’de ekolojik olarak sert ve kurak bölgelere gidildikçe bir artış eğiliminde olduğunu vurgulamaktadır. Bu çalışmada değerlendirilen 37 loci’nin 5’inin her iki süper türde farklı allellere (*Adh*, *Me-1*, *Pt-1*, *Mpi*, *Np*) fikse olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak süper türler içinde, bazı sitotipler arasında da dikkate değer genetik farklılıklar belirlenmiştir. Bu nedenle Nevo [37], mevcut sitotiplerin ayrı biyolojik türler olarak değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmüştür.

Türkiye körfare popülasyonları üzerine yapılan diğer bir önemli çalışmada, Suzuki et al. [50] Türkiye’den *N. xanthodon* örneklerine ait 10 lokaliteden üç sitotip ($2n=38, 54, 62$), Türkiye’den *N. ehrenbergi* için iki lokaliteden iki sitotip ($2n=52$ ve 58), İsrail’den bir sitotip ($2n=54$) ve Mısır’dan bir sitotip ($2n=60$) olmak üzere toplam 14 farklı lokaliteden alınan örneklerin genom DNA özütünün 10 restriksiyon enzimi ile kesimi yapılarak ribozomal DNA (rDNA) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) farklılıklarını, kromozomal formların popülasyon yapılarını ve evrimsel ilişkilerini ortaya çıkarmaya çalışmışlardır. Çalışılan *N. xanthodon* ve *N. ehrenbergi* türleri arasında rDNA bakımından ortalama % 8, her bir tür içinde ortalama % 4 farklılık bulunmuştur. Tür içerisindeki farklılıkların özellikle diploit kromozom sayısı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte aynı diploid kromozom sayısına sahip örnekler arasında yaklaşık olarak % 1,5 farklılık belirlenmiştir. *N. ehrenbergi* örnekleri arasında mtDNA bakımından % 10 ve *N. xanthodon* örnekleri arasında % 12 gibi daha yüksek bir farklılık değeri bulunmuştur.

Arslan et al. [51] ise Türkiye’den 13 örnekte Mitokondriyal DNA’nın sitokrom b geninin 630 baz çiftlik bölgesinin sekans analizini çalışmıştır. Bu çalışmada sadece üç sitotip ($2n= 40, 54, 60$) çalışılmış ve bu sitotiplerin sitokrom b haplotipleri filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Bu çalışma sonucunda üç sitotip arasında yüksek seviyede genetik farklılık belirlenmiş ve üç sitotipin birbirinden farklı üç ayrı allopatrik tür olduğu ileri sürülmüştür.

Türkiye bu cinsin gen merkezi [49] olmasına rağmen körfareler üzerine bugüne kadar çalışmalar kromozom ve morfoloji üzerinde yoğunlaşmış, popülasyon genetiği, taksonomisi ve filogenileri üzerine moleküler temelli çalışmalar ise az örneğe dayalı birkaç sitotip üzerine yapılan çalışmalar ile sınırlı kalmıştır. Popülasyonların sahip

olduğu tür ve alttür düzeyleri, kromozomal formların belirli belirteçlere göre gösterdiği farklılıklar, çevresel etmenlerle ilişkileri ve evrimsel gelişimleri hakkındaki çalışmaların yapılması gerekmektedir. Evrimsel olayları açıklamada model bir organizma olmasına karşın, Türkiye *Spalax* populasyonları bu açıdan şimdiye kadar çok az çalışılmıştır.

Yukarıda belirtildiği gibi sadece geleneksel morfolojik çalışmalar ile elde edilen sonuçlar ve karyoloji temelli çalışmalarla elde edilen sonuçları kullanarak belirli kararlara varmak hatalı sonuçlar doğurmaktadır. Bütün bu bilgilere dayanarak Türkiye’den bu zamana kadar tanımlanan körfare türlerinin, alttürlerinin ve sitotiplerin taksonomik durumlarının kesinlik kazanmadığı, mevcut sitotiplerin ise tür seviyesinde genetik farklılıklar göstermesi nedeniyle, bu zamana kadar tanımlanmış olan tür, alttürlerin taksonomik durumlarının şuan ki bilgilerimiz ışığında geçerliliklerinin araştırılması ve sağlam bir zemine oturtulması gereklidir. Özellikle Nevo et al. [37], Türkiye’deki körfareleri karyolojik ve elektroforetik olarak inceleyerek Türkiye’de morfolojik çalışmalara göre yapılan taksonomik durumun bu cinsin taksonomisini gerçekçi bir şekilde yansıtmadığını ve bu yüzden Türkiye’deki Spalacidae taksonomisinin morfolojinin yanı sıra karyolojik ve genetik olarak yeniden değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Bu çalışma ile Türkiye’deki *Nannospalax* genusu temsilcileri üzerine bu zamana kadar yapılan morfolojik, karyolojik ve genetik çalışmaların sonuçları ile bizim çalışmalarımızın sonuçları birleştirilerek mevcut körfare türleri arasında ve içindeki genetik farklılıklar ve benzerliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye’den tanımlanan tür, alttürler ve sitotiplerin taksonomik durumları, Türkiye’nin hemen her yerinde yaptığımız arazi çalışmaları sonucunda elde ettiğimiz geniş çaplı örnek serisi ile analiz edilmiştir.

BÖLÜM II

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyalin Toplanması ve Hazırlanması

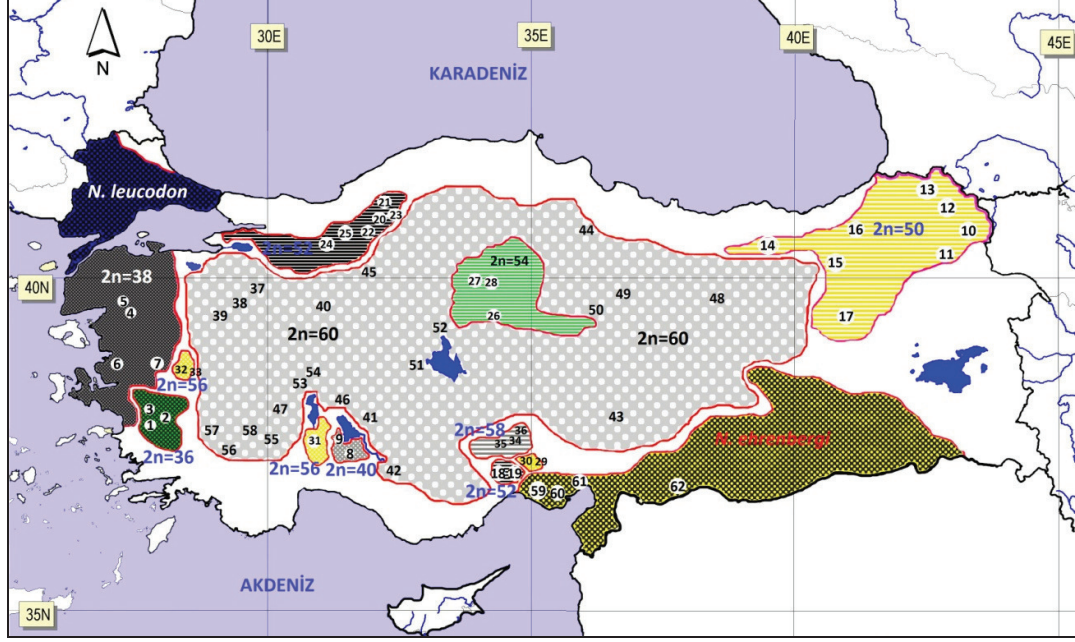
Bu çalışma hem arazi hem de laboratuvar olmak üzere iki aşamalı yürütülmüştür. Arazi çalışmalarının yapıldığı ve örneklerin alındığı lokaliteler Çizelge 2.1 ve Şekil 2.1’de harita üzerinde gösterilmiştir. Toplam 94 körfare örneği 62 lokaliteden toplanmıştır. *N. ehrenbergi* türünde tek sitotipe ait (2n=56) 12 örnek, *N. xanthodon* türünde 9 sitotipe ait (2n=36, 38, 40, 50, 52, 54, 56, 58, 60) 82 örnek üzerine çalışılmıştır. Araziden toplanan örnekler kapanlar ile canlı olarak laboratuvara getirilmiş, hayvan bakım odasında bir süre bekletildikten sonra Hayvan Deneyleri Etik Kurulu yönetmeliğine uygun olarak deneylere tabi tutulan örneklerin standart dış ölçüleri (tüm boy, ardayak) ve ağırlıkları (gr) alınmıştır. Hayvanlar üzerine yapılan deneyler Niğde Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 12.12.2011 tarihli 8. Toplantısında alınan 1. Kararı doğrultusunda gerçekleşmiştir. Hayvanların araziden canlı olarak yakalanması Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü’nün 14.10.2011 tarihli ve B.23.0.DMP.0.15.01-510.02-15759 sayılı araştırma izni ile gerçekleştirilmiştir. Araziden yakalanan hayvanların Ford ve Hamerton [60]’a göre “Colchicinehypotonic citrate” tekniği kullanılarak karyotip analizleri yapılmıştır. Ayrıca araziden toplanan canlı örneklerden RFLP-Pcr çalışmalarında daha sonra kullanmak üzere kan ve doku örnekleri alınmış ve -86 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan körfare örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler. H.N: Haritadaki numarası

N	H.N.	Kayıt Numarası	Lokalite	2n, NF	Rakım	Enlem	Boylam
1	1	6256♀	Yağhanlı Köyü: (Aydın: Koçarlı)	2n=36 NF=68	35 m	37°44N	27°34E
2	1	6250♀	Yağhanlı Köyü: (Aydın: Koçarlı)	2n=36 NF=68	35 m	37°44N	27°34E
3	2	6207♀	Haydarlı Köyü: (Aydın: Koçarlı)	2n=36 NF=68	26 m	37°44N	27°33E
4	2	6209♂	Haydarlı Köyü: (Aydın: Koçarlı)	2n=36 NF=68	26 m	37°44N	27°33E
5	3	6197♀	Bıyıklı Köyü: (Aydın: Koçarlı)	2n=36 NF=68	41 m	37°45N	27°34E
6	4	6161♀	Çömlekçi: (Balıkesir: Bigadiç)	2n=38 NF=74	417 m	39°29N	28°02E
7	5	6160♀	Kepsut: (Balıkesir)	2n=38 NF=74	80 m	39°41N	28°10E
8	6	6132♀	Foça-Bağarası: (İzmir)	2n=38 NF=74	100 m	38°40N	26°45E
9	6	6165♂	Foça-Bağarası: (İzmir)	2n=38 NF=74	100 m	38°40N	26°45E
10	7	6131♂	Akhisar: (Manisa)	2n=38 NF=74	132 m	38°55N	27°51E
11	7	6153♀	Akhisar: (Manisa)	2n=38 NF=74	132 m	38°55N	27°51E
12	8	6267♀	Yeşildağ: (Konya: Beyşehir)	2n=40 NF=72	1130 m	37°32N	31°28E
13	8	6263♀	Yeşildağ: (Konya: Beyşehir)	2n=40 NF=72	1130 m	37°32N	31°28E
14	8	6268♀	Yeşildağ: (Konya: Beyşehir)	2n=40 NF=72	1130 m	37°32N	31°28E
15	9	6225♀	Yenişarbademli: (Isparta)	2n=40 NF=72	1210 m	37°42N	31°23E
16	9	6254♂	Yenişarbademli: (Isparta)	2n=40 NF=72	1210 m	37°42N	31°23E
17	9	6262♀	Yenişarbademli: (Isparta)	2n=40 NF=72	1210 m	37°42N	31°23E
18	10	4887♀	Susuz: (Kars)	2n = 50 NF = 70	1930 m	40°46N	43°20E
19	11	4880♂	Selim: (Kars)	2n = 50 NF = 70	1955 m	40°27N	42°47E
20	12	5306♀	Göle: (Ardahan)	2n = 50 NF = 70	2196 m	40°47N	42°36E
21	12	5286♀	Göle: (Ardahan)	2n = 50 NF = 70	2196 m	40°47N	42°36E
22	13	3369♀	Merkez: (Ardahan)	2n = 50 NF = 70	1881 m	41°06N	42°42E
23	13	3322♀	Merkez: (Ardahan)	2n = 50 NF = 70	1881 m	41°06N	42°42E
24	14	4642♂	Eğribel Geçidi: (Giresun)	2n = 50 NF = 72	2174 m	40°26N	38°24E
25	14	4645♂	Eğribel Geçidi: (Giresun)	2n = 50 NF = 72	2174 m	40°26N	38°24E
26	15	4671♀	Demirözü: (Bayburt)	2n = 50 NF = 72	1744 m	40°09N	39°53E
27	15	4661♂	Demirözü: (Bayburt)	2n = 50 NF = 72	1744 m	40°09N	39°53E
28	16	4669♀	Ovid Dağ: (Rize)	2n = 50 NF = 72	1012 m	40°47N	40°32E
29	16	4648♂	Ovid Dağ: (Rize)	2n = 50 NF = 72	1012 m	40°47N	40°32E
30	17	3324♂	Erzurum 20 km Doğu	2n = 50 NF = 72	2376 m	40°01N	41°27E
31	18	2169♀	Sebil Yaylası: (Mersin)	2n=52 NF=72 G	1080 m	37°07N	34°33E
32	18	2165♂	Sebil Yaylası: (Mersin)	2n=52 NF=72 G	1080 m	37°07N	34°33E
33	18	2166♀	Sebil Yaylası: (Mersin)	2n=52 NF=72 G	1080 m	37°07N	34°33E
34	19	3851♀	Çamlıyayla: (Mersin)	2n=52 NF=72 G	2024 m	37°16N	34°33E
35	19	2658♂	Çamlıyayla: (Mersin)	2n=52 NF=72 G	2024 m	37°16N	34°33E
36	20	4009♂	Yeniçağa: (Bolu)	2n=52 NF=70 K	1000 m	40°46N	32°01E
37	21	3985♂	Demirciler: (Bolu: Mengen)	2n=52 NF=70 K	690 m	40°57N	32°05E
38	22	4849♀	Seben: (Bolu)	2n=52 NF=70 K	761 m	40°24N	31°34E
39	23	4830♂	Gerede: (Bolu)	2n=52 NF=70 K	1326 m	40°47N	32°11E
40	24	4201♂	Abant: (Bolu)	2n=52 NF=70 K	868 m	40°43N	31°32E
41	25	4203♀	Mudurnu: (Bolu)	2n=52 NF=70 K	880 m	40°27N	31°12E
42	26	4572♀	Seyfe Gölü: (Kırşehir)	2n=54 NF=74	1135 m	39°11N	34°20E
43	26	4571♀	Seyfe Gölü: (Kırşehir)	2n=54 NF=74	1135 m	39°11N	34°20E
44	27	5170♀	Kırıkkale 5 km doğu	2n=54 NF=74	744 m	39°50N	33°33E
45	27	5172♂	Kırıkkale 5 km doğu	2n=54 NF=74	744 m	39°50N	33°33E
46	28	5452♂	Kırıkkale 10 km doğu	2n=54 NF=74	773 m	39°51N	33°35E
47	29	3499♂	Elmalı: (Mersin: Gülek)	2n=56 NF=72 G	1835 m	37°22N	38°45E
48	29	3497♂	Elmalı: (Mersin: Gülek)	2n=56 NF=72 G	1140 m	37°15N	34°46E
49	30	3500♀	Karboğazi: (Mersin: Gülek)	2n=56 NF=72 G	1305 m	37°18N	34°43E
50	31	4793♀	Yılanlı Köyü: (Isparta: Aksu)	2n=56 NF=72 B	1227 m	37°47N	30°59E

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan körfare örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı bölgeler. H.N: Haritadaki numarası (Devam)

N	HN	Kayıt Numarası	Lokalite	2n, NF	Rakım	Enlem	Boylam
51	31	6270♀	Yılanlı Köyü: (Isparta: Aksu)	2n=56NF=72 B	1227 m	37°47'N	30°59' E
52	32	6141♀	Kula: (Manisa)	2n=56NF=72 B	661 m	38°32'N	28°38' E
53	32	6135♂	Kula: (Manisa)	2n=56NF=72 B	661 m	38°32'N	28°38' E
54	33	6224♀	Gediz Sapağı: (Uşak)	2n=56NF=72 B	691 m	38°40'N	29°14' E
55	34	2220♂	Madenköy: (Niğde: Ulukışla)	2n=58NF=72	1717 m	37°26'N	34°37' E
56	34	2433♀	Madenköy: (Niğde: Ulukışla)	2n=58NF=72	1717 m	37°26'N	34°37' E
57	35	2337♂	Karagöl: (Niğde: Ulukışla)	2n=58NF=72	2588 m	37°24'N	34°33' E
58	35	2333♂	Karagöl: (Niğde: Ulukışla)	2n=58NF=72	2588 m	37°24'N	34°33' E
59	36	2656♂	Alpu: (Adana: Pozantı)	2n=58NF=72	1060 m	37°28'N	34°52' E
60	37	6148♂	Bozüyük: (Bilecik)	2n=60NF=76	754 m	39°54'N	30°02' E
61	38	6145♂	Küplüce: (Kütahya: Simav)	2n=60NF=76	1132 m	38°59'N	29°03' E
62	39	5848♂	Emet: (Kütahya)	2n=60NF=76	904 m	39°20'N	29°15' E
63	40	5944♂	Günyüzü: (Eskişehir: Sivrihisar)	2n=60NF=76	888 m	39°23'N	31°48' E
64	41	4310♂	Kireli: (Konya: Beyşehir: Hüyük)	2n=60NF=76	1150 m	37°55'N	31°32' E
65	42	3396♀	Salamat yay.: (Antalya: Akseki)	2n=60NF=78	1252 m	37°02'N	31°46' E
66	43	3619♂	Göksun: (Kahramanmaraş)	2n=60NF=78	1341 m	38°01'N	36°29' E
67	44	5049♀	Kavak: (Samsun)	2n=60NF=78	610 m	41°04'N	36°02' E
68	45	4835♂	Çeltikli: (Ankara)	2n=60NF=78	688 m	40°07'N	32°03' E
69	46	4790♂	Madenli köy: (Isparta: Gelendost)	2n=60NF=78	1032m	38°11'N	31°06' E
70	47	6231♀	Atabey: (Isparta)	2n=60NF=78	1037m	37°57'N	30°38' E
71	48	4657♂	İmranlı: (Sivas)	2n=60NF=80	1611m	39°52'N	38°06' E
72	49	4644♀	Yıldızeli: (Sivas)	2n=60NF=80	1401m	39°51'N	36°35' E
73	50	5289♀	Saraykent: (Yozgat)	2n=60NF=80	1316m	39°39'N	35°52' E
74	51	4541♂	Cihanbeyli: (Konya)	2n=60NF=80	973m	38°39'N	32°55' E
75	52	4534♂	Bala: (Ankara)	2n=60NF=80	1324m	39°33'N	33°07' E
76	53	2504♂	Afyon-10 km Kuzeydoğu	2n=60NF=82	1009m	38°48'N	30°32' E
77	53	6214♂	Afyon-10 km Kuzeydoğu	2n=60NF=82	1009m	38°48'N	30°32' E
78	54	5563♀	Eber Gölü: (Afyon)	2n=60NF=82	1009m	38°35'N	31°07' E
79	55	2516♀	Burdur 5 km güney	2n=60NF=84	985m	37°42'N	30°16' E
80	56	6234♀	Bıçaklı köyü: (Denizli: Çameli)	2n=60NF=84	1300m	37°04'N	29°20' E
81	57	6198♂	Acıpayam: (Denizli)	2n=60NF=84	926m	37°25'N	29°21' E
82	58	6253♂	Harmanlı k.: (Burdur: Yeşilova)	2n=60NF=84	1085m	37°35'N	29°54' E
83	59	3850♀	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
84	59	3849♀	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
85	59	2081♀	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
86	59	2090♂	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
87	59	2935♂	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
88	59	2936♀	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
89	59	2106♀	Özbek köyü: (Mersin: Tarsus)	2n=56NF=72 Ehr	46m	36°58'N	34°56' E
90	60	2089♂	Tarsus 5 km Kuzeydoğu	2n=56NF=72 Ehr	15m	36°55'N	34°54' E
91	60	2104♂	Tarsus 5 km Kuzeydoğu	2n=56NF=72 Ehr	15m	36°55'N	34°54' E
92	61	2085♂	Şeyhmurat k.: (Adana: Yüreğir)	2n=56NF=72 Ehr	11m	36°51'N	35°25' E
93	61	2091♀	Şeyhmurat k.: (Adana: Yüreğir)	2n=56NF=72 Ehr	11m	36°51'N	35°25' E
94	62	2167♂	Kilis 10 km Doğu	2n=56NF=72 Ehr	664m	36°43'N	37°08' E



Şekil 2.1 Körfare örneklerinin toplandığı bölgelerin harita üzerinde gösterimi

2.2 Karyotip Preparasyon Tekniği

1. Örnekler eterle bayıltılarak karın peritonununun hem sağ, hem de sol bölgesine hayvanın her gram ağırlığı için 0,01 ml olacak şekilde kolçisin (1/1000'lik) enjekte edildi.
2. Hayvan 3-4 saat bekletildi.
3. Hayvan bayıltılarak öldürüldü. Femur kemiği çıkarılarak kemik iliği % 1'lik sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$ 'dan 1,4 gr alınarak 100 ml saf suya tamamlanır) ile yıkanarak tüpe alındı.
4. Na-sitrat ile yıkanan kemik iliği solusyonu 30 °C'lik etüvde 15 dakika bekletildi.
5. Solusyon 500-700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
6. Çökmüş hücreler 15 dakika fikse edildi (fiksatif = metanol 3 / asetik asit 1 oranında taze olarak hazırlandı).
7. Fiksasyondan sonra 500-700 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Tekrar fiksatif ilave edilerek aynı şekilde santrifüj yapıldı, bu işlem 3-4 kez tekrarlandı ve ortamdaki Na-sitrat tamamen uzaklaştırılmış oldu. Son santrifüjden sonra süpernatantın atılmasıyla arta kalan 1 ml kadar hücresel tortudan preparasyon yapıldı.
8. Elde edilen bu hücreli kısımdan pastör pipetiyle alınarak hafif eğimli şekilde yerleştirilmiş lam üzerine 5-10 cm yükseklikten damlatılarak 5-10 adet yayma preparat yapıldı.
9. Preparat alev almamasına dikkat edilerek ispirto alevinde kurutuldu.

10. Stoktan seyreltilerek taze hazırlanmış 1/10'luk Giemsa boyası ile 12 dakika boyama yapıldı.

11. Kanada balsamı ile kapatılarak daimi preparat yapıldı

2.3 RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Yönteminin Prensipleri

Son 40 yıl içerisinde, biyolojik organizmaların genetik yapıları ve bunların evrimi ve sistematigi hakkında destekleyici bilgiler elde etmek amacıyla, araştırmacılar genetik varyasyonun biyokimyasal özellikler temelinde belirlenmesi üzerine moleküler seviyede çalışmalar üzerine yoğunlaşmıştır [61]. İlk kez 1966 yılında protein elektroforezi çalışmaları ile biyokimyasal düzeyde organizmaların genotipik yapılarının belirlenmesine başlanmıştır. Proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik makromoleküllerin kimyasal doğası, bu moleküllerin çalışılmasını kolaylaştırmıştır. Bu makromoleküller iyonize olabilen gruplara sahip olan biyolojik moleküllerdir. Makromoleküllerin iyonize grupları solusyonlarda katyon (+) veya anyon (-) olarak yüklü moleküller halinde bulunurlar. Benzer yüklü moleküller ise farklı molekül ağırlığına sahip olacaklarından yani yük/kütle oranları da farklı olacağından, elektrik akımı ve molekül ağırlıkları etkisinde farklı bant modelleri göstereceklerdir. Elektroforez adı verilen işlem böyle iyonik gruplar içeren makromoleküllerin elektrik alanı etkisinde yüklerine, büyüklüklerine ve üç boyutlu konformasyonlarına bağlı olarak ayrılmaları olayıdır [62]. Populasyon genetiği üzerine çalışan araştırmacılar 1990'lı yıllara kadar biyokimyasal markırları (protein ve enzim) populasyonlar arasındaki ve içindeki genetik farklılık ve benzerliklerin tespit edilmesi amacıyla yaygın bir şekilde kullanmışlardır. Bu tarihten sonra biyokimyasal genetik çalışmaların doğasından kaynaklanan kimi zorlukları gidermek amacıyla DNA molekülü seviyesinde yeni yöntemlerin geliştirilmesine başlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında en önemlilerinden birisi Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemidir.

Arber Werner [63] tarafından ikili sarmal DNA molekülünü belirli nükleotit sıralarından kesen bakteriyel kökenli restriksiyon enzimlerinin keşfedilmesi ile moleküler biyoloji alanında önemli gelişmeler yaşanmıştır. RFLP tekniği DNA düzeyinde polimorfizm elde etmek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bazı bakteri soyları bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı bağışıklık göstermektedir. Bakteriler, bakteriyofajlara (bakteri enfekte ederek çoğalan virüsler) karşı savunma mekanizması olarak, Bakteriyofajın DNA'sını çoğaltmadan ve yeni

bakteriyofaj partiküllerini sentezlemeye başlamadan önce bakteriyofaj DNA'sını yıkan bir enzim üretir. Bu sindirim enzimlerine restriksiyon endonükleazlar adı verilir ve birçok belki de tüm bakterilerce sentezlenmektedir. Bir bakteri bakteriyofajlar tarafından enfekte edildiği zaman, konakçı bakterilerin endonükleaz enzimleri fajların DNA'sını çeşitli noktalardan keserek o fajın konakçı bakteride çoğalmasını önlemiş olmaktadır [64].

Bu güne kadar, 1200'ün üzerinde restriksiyon endonükleaz tanımlanmıştır. Restriksiyon enzimleri DNA molekülünü 4-8 bp DNA sıralarından tanıyarak bu bölgelerden kesen enzimlerdir. Bu enzimlerin en önemli özellikleri her bir enzimin DNA molekülünü kesen spesifik bir tanıma dizisine sahip olmasıdır. Yani belli bir restriksiyon enzimi tanıma dizisinde DNA'yı kesecektir ve onun dışındaki bölgeleri kesmeyecektir. Örneğin *Pvu I* (*Proteus vulgaris*'ten izole edilen) restriksiyon endonükleaz DNA'yı sadece CGATCG heksanükleotitte kesmektedir. Aksine *Pvu II* denilen aynı bakteriden izole edilen diğer bir restriksiyon enzimi DNA'yı CAGCTG olan farklı bir heksanükleotitten kesmektedir [65].

Birçok restriksiyon endonükleazlar tanıma dizisini ortadan kesip küt ya da düz uçlarla sonuçlanan basit bir ikili iplikcik yapar. Bununla birlikte diğer bazı restriksiyon enzimleri iki DNA iplikçliğini aynı pozisyonda (hizada) kesmezler. Bu restriksiyon enzimleri tarafından çift iplikli DNA'nın kesiminde her iki sarmalda kesim bölgelerinde iki ya da üç nükleotit karşı karşıya gelmez. Bundan dolayı, meydana gelen DNA parçalarının her iki ucunda çok kısa tek iplikli bir sarmal olur. Bunlara, DNA moleküllerinin baz çiftleri yeniden bir araya gelip yapışabildikleri için yapışkan ya da kohesif uçlar adı verilir [65].

2.3.1 Bir restriksiyon sindiriminin gerçekleştirilmesi

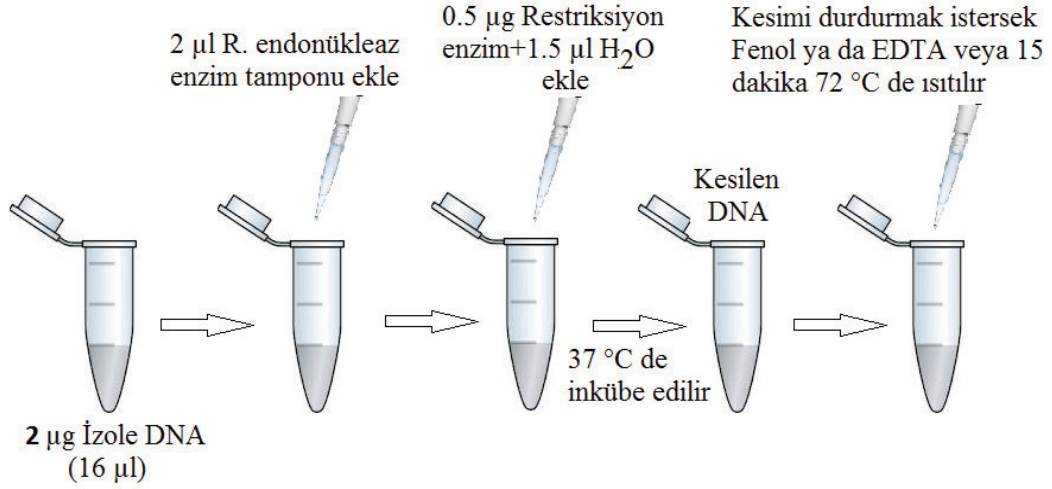
Pcr temelli RFLP analizleri (PCR-RFLP) ya da lokusa özgü RFLP tekniği özgün bir lokusta polimorfizm tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart PCR işlemi ile üzerinde durulan lokus çoğaltılmakta ve çeşitli kesim enzimleri ile elde edilen PCR parçacığı kesilmektedir. Kesim sonucu oluşan kesim parçacık modellerine göre kesim noktasının varlığı veya yokluğuna göre bireyler arasındaki farklılıklar tespit edilmektedir. Bu yöntemde bireyler arasında tespit edilen polimorfizm, enzim tanıma bölgesinde meydana gelen bir nükleotidin eklenmesi, bir nükleotidin eksilmesi veya bir

nükleotidin değişmesi şeklinde ortaya çıkan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır.

PCR-RFLP yöntemi kodominant kalıtım modeline uygun markerler vermektedir. Bu yöntemde rutin PCR reaksiyonunda olduğu gibi uzun oligonükleotit primerler kullanıldığı için oldukça güvenilir bir çoğaltım yapmaktadır. Çoğaltılan lokus ya da gen hakkında önceden bilgi sahibi olunmasının gerekliliği tekniğin bir eksiği olarak ifade edilmektedir. Ayrıca çalışılacak lokuslar için özgün primerlerin hazırlanması zaman ve maliyet gerektiren bir süreçtir. Çalışmanın içeriğine bağlı olarak kullanılacak olan kesim enzimleri de maliyeti arttıran diğer unsurlar olarak ele alınmalıdır [66, 67, 68].

Bu teknikte ilk önce gerekli olan DNA miktarı bir pipetle test tüpüne aktarılır. Kesilecek olan DNA miktarı yapılacak olan deneye bağlıdır. Restriksiyon enzimi olarak bilinen konsantrasyonlardaki saf çözelti olarak ticari firmalardan sağlanan enzimler kullanılır. Fakat izole edilen ve belirli bölgelere ait dizileri PCR'da çoğaltılan DNA özütü üzerine enzim ilave edilmeden önce, enzimin maksimum aktivitesini ve doğru şartları sağlamak önemlidir. Pek çok restriksiyon endonükleazlar, pH 7.4 de maksimum aktivite gösterecektir, fakat farklı enzimler iyonik güç (genellikle NaCl tarafından sağlanır) ve Mg^{+2} konsantrasyonu (tüm tip II restriksiyon endonükleazları işlev görmek için magnezyuma ihtiyaç duyar) için gereksinimleri farklıdır. Enzim için doğru şartlar önemlidir, yanlış NaCl ve Mg^{+2} konsantrasyonları, restriksiyon endonükleazın aktivitesini düşürmekle kalmaz, enzimin özgülüğünde de değişimlere yol açabilir ve bundan dolayı enzimin standart tanıma yerlerine ilave DNA kesimleri olur. Ticari olarak aldığımız restriksiyon endonükleazlara ait tampon on kez konsantre edilmiş halidir ve reaksiyon karışımına ilave edilerek seyreltilir. Bu yüzden çalışma esnasında toplam reaksiyon karışımının onda biri olacak şekilde restriksiyon endonükleaz karışımından eklenir. Eğer kullanacağımız pcr reaksiyon karışımımız 20 µl ise 2 µl restriksiyon endonükleaz tamponundan eklenir. Tampon izole edilen ve pcr ile çoğaltılan karışımına eklendikten sonra, karışımına restriksiyon endonükleazlar eklenebilir. Kolaylık olsun diye bir ünite enzim bir saatte 1 µg DNA yı kesmek için gerekli olan miktarı ifade eder, öyle ise 2 µg izole DNA yı kesmek için iki ünite restriksiyon endonükleaz enzimi yeterlidir. Restriksiyon endonükleazlar genellikle 2 ünite/µl konsantrasyonda hazırlanmıştır, öyle ise 0.5 µl DNA yı kesmek için yeterli olacaktır. Bunun için, reaksiyon karışımındaki son bileşenlerin hacmi 20 µl ye tamamlayan 0.5 µl restriksiyon endonükleaz enzimi ve 1.5 µl saf sudur.

Üzerinde durulacak bir diğer önemli husus ise inkübasyon sıcaklığıdır. Pekçok restriksiyon endonükleazlar 37 °C de en iyi çalışır, fakat bu durum bazıları için farklıdır. Örneğin *Taq I* normal olarak sıcak kaplıcalar gibi ortamlarda çok yüksek sıcaklıklarda yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilmiştir. Bu nedenle *Taq I* restriksiyon sindirimi maksimum enzim aktivitesini elde etmek için 65 °C de inkübe edilmelidir [65].



Şekil 2.2 Laboratuvarında restriksiyon sindiriminin gerçekleştirilmesi [65]

2.3.2 Restriksiyon endonükleaz kesim sonuçlarının değerlendirilmesi

Restriksiyon sindirimi, orijinal moleküldeki endonükleaz için tanıma dizilerinin kesin pozisyonlarına bağlı olarak çeşitli sayıda DNA parçaları meydana getirir. DNA molekülünün kesilip kesilmediğinin anlaşılmasının bir yolu, basitçe vizkozitesini saptamaktır. Daha büyük DNA molekülleri küçük olanlardan daha vizkoz bir çözelti meydana getirirler ve bundan dolayı kesilme vizkozitenin düşüşü ile ilişkilidir.

Proteinler ve pek çok diğer bileşikler gibi, DNA molekülleri de bir elektrik yükü taşırlar ve DNA'nın elektrik yükü fosfat gruplarından dolayı negatiftir. Sonuç olarak, DNA molekülleri bir elektrik alanına koyuldukları zaman, pozitif kutba doğru hareket edeceklerdir. Molekülün hareket hızı molekülün şekli ve elektrik yüküne bağlıdır. Genellikle agaroz, poliakrilamid ya da ikisinin karışımından yapılan jel, DNA moleküllerinin pozitif elektrotlara varmak için içinden geçmek zorunda oldukları kompleks bir gözenek ağından oluşur. Daha küçük DNA molekülleri bu gözeneklerde daha hızlı hareket edebilirler. Bundan dolayı jel elektroforezi büyüklüklerine göre DNA moleküllerini ayırabilirler [65].

Jel elektroforezi pozitif elektrota doğru, en küçük moleküllerin en uzak mesafeye hareketi ile farklı büyüklükte DNA moleküllerini ayıracaktır. Şayet farklı büyüklükte çeşitli DNA parçaları mevcutsa (mesela, iyi bir restriksiyon sindiriminin sonucu), sonra bir seri bant jelde ortaya çıkacaktır. Bir jel elektroforezinin sonucunu görmenin en kolay yolu, DNA yı görünür yapacak olan bir boya ile jeli boyamaktır. Etidium bromit rutin olarak agaroz jeldeki DNA yı boyamak için kullanılmaktadır. Farklı büyüklükte DNA ların yerlerini gösteren bantlar EtBr boyanmasından sonra ultraviyole ışığı altında yeterli miktarda DNA mevcut oldukça, açık bir şekilde görülebilir.

2.4 Çalışılan *Nannospalax* Cinsi Örneklerin Mitokondriyal DNA İzolasyonu

Nannospalax xanthodon türü için 9, *Nannospalax ehrenbergi* türü için 1 kromozomal forma ait örneklerin böbrek ve karaciğer dokularından DNA izole edildi. Bu işlemde Doyle ve Doyle [69] metodu modifiye edilerek CTAB DNA izolasyon yöntemi kullanıldı. Yöntem aşağıda belirtildiği gibi sırasıyla uygulanmıştır:

- A. Küçük parçalara ayrılan doku örnekleri ependorf tüpe konulduktan sonra üzerine 300 µl CTAB (Kloroform, Tris-HCl, EDTA, NaCl) tamponu eklenerek mümkün olduğu kadar homojen bir sıvı elde edinceye kadar tek kullanımlık havaneli ile ezildi.
- B. Homojenata sırasıyla 300 µl CTAB ve 50 µl BME (β-Merkapto etanol) katılarak eklenip ependorf tüp hafifçe karıştırıldı.
- C. Karışım 65 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi.
- D. 500 µl C : IAA (Kloroform izoamil alkol) (24 : 1) ilave edildi ve karışım süte benzer bir kıvama gelinceye kadar hafifçe karıştırıldı.
- E. 13.000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
- F. Santrifüj edilen dokuların içinde olduğu ependorf tüpler, aynı eğik açıda olacak şekilde buza yerleştirildi. DNA üstteki sıvı tabakada olacağından üst faz pipetle çekilerek ayrı bir ependorf tüpe konuldu.
- G. 500 µl -20 °C'de soğutulmuş izopropanol tüplere eklenen tüpler yavaşça karıştırıldı.
- H. -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra 13.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.

- I. Süpernatant döküldü ve pellet 2 kere % 70'lik ve 1 kere de % 100'lük etil alkol ile yıkandı.
- J. Pellet ependorf tüp içinde laminar flow kabinde 1 gece kurumaya bırakıldı.
- K. Kuruyan DNA'nın üzerine 25-100 µl TE (Tris-EDTA) tampon ve DNA çözdürülür ve +4 de 1 gece bekletilir.
- L. Çözünen DNA ya 2 µl RNase eklendi, 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- M. DNA'nın saflık ve miktar tayini Nanodrop ND1000 spektrofotometer ve agaroz jel aracılığı ile kontrol edilir.
- N. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler:

CTAB Buffer:

CTAB	2 gr
1 M Tris-HCl pH 8,0	10 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	4 ml
5 M NaCl	28 ml
dH ₂ O	58 ml

TE Buffer pH 8,0:

1M Tris-HCl çözeltisi	1 ml
0,5 M EDTA	2 ml
dH ₂ O	97 ml

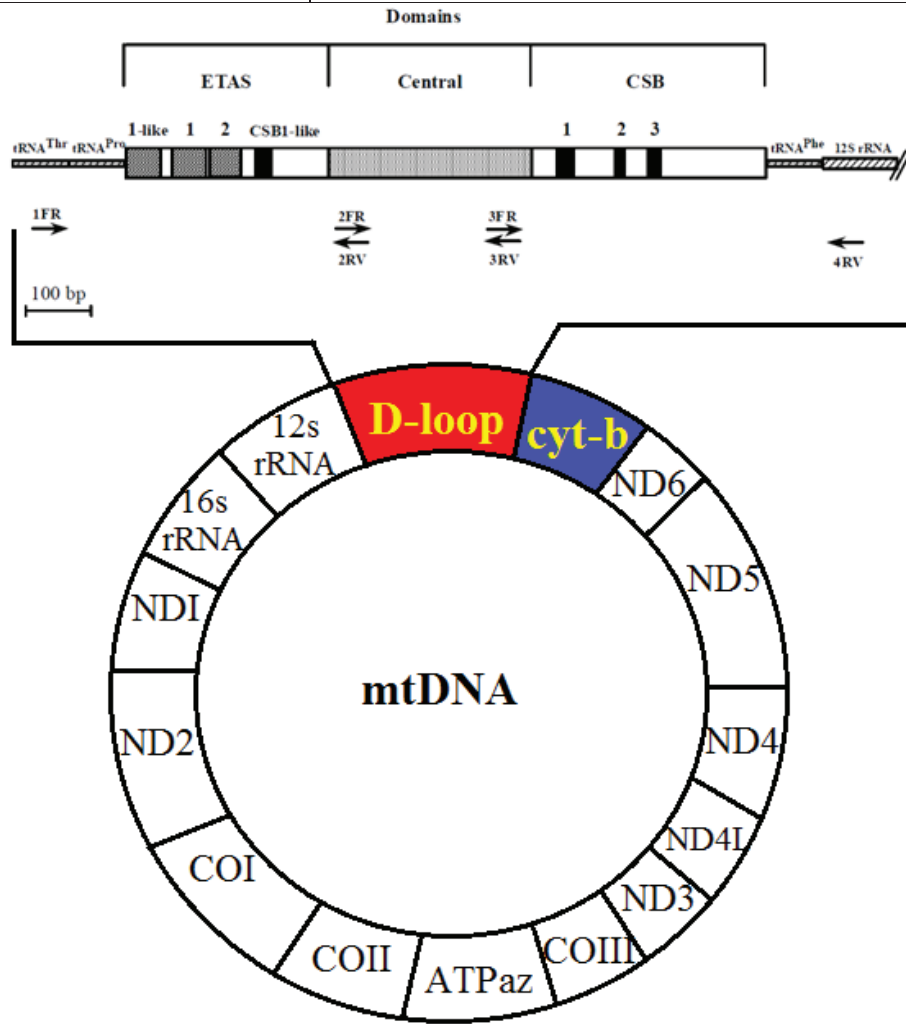
Karışım hazırlandıktan sonra 1 saat otoklavda tutulur.

2.5 Genomik DNA, mt DNA ve Kullanılan Primerler

Gen materyali olarak PCR için mt-DNA'nın D-loop ve Sitokrom b bölgesi kullanılmıştır (Şekil 2.3). Primer olarak PCR için mt-DNA'nın D-loop bölgesi için 1FR ve 4RV evrensel primerleri, Sitokrom b bölgesi içinse L14724 ve H15154 evrensel primerleri kullanılmıştır (Çizelge 2.2). Körfarelerde 16.408 bp uzunluğundaki halkasal mt-DNA genomunun 790 bp lineer kısmı D-loop bölgesi, 500 bp lineer kısmı ise sitokrom b bölgesini oluşturur.

Çizelge 2.2 Çalışılan primerlerin baz dizileri ve çalışılan gen bölgeleri

Primerler	(5'-3')
L14724 Forward (Sitokrom b)	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3' 28 bp
H15154 Reverse (Sitokrom b)	5'-GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3' 28 bp
1FR Forward (D-loop)	5'-TAATTACCCTGGTCTTGTA -3' 20 bp
4FR Reverse (D-loop)	5'-CTAATAATAAGGCCAGGACC -3' 20 bp



Şekil 2.3 mt-DNA'da çalışılan bölgeleri gösteren DNA haritası [59]

2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu bölümde çalışılan örneklerin mt-DNA'sının D-loop ve Sitokrom b bölgesinin PCR ile amplifiye edilmesi amaçlanmıştır. Bu işlemde kullanılan PCR karışımı Çizelge 2.3' de verilmiştir. PCR amplifikasyonu için Kaya and Neale [70] tarafından uygulanan PCR döngü programı, bazı değişikliklerle laboratuvar koşullarına uyarlanmış ve kullanılmıştır.

Hazırlanan eppendorf tüpleri thermocycler cihazına yerleştirilip 95 °C’de 1 dakika ön denaturasyon, 94 °C’de 1 dakika denaturasyon, 36 °C’de 2 dakika bağlanma, 72 °C’de toplam 45 siklusta 2 dakika uzama ve 72 °C’de toplam 15 dakika son uzama aşamalarını içeren PCR döngü programına maruz bırakıldı.

Çizelge 2.3 Polimeraz zincir reaksiyonu Pcr karışımı

Kimyasal Maddeler	Hacim
10XPCR buffer (Fermentas)	2,5 µl
4x10 µmol deoksinükleotidtrifosfat set (dNTP-Fermentas)	4 µl
25 mM MgCl ₂ (Fermentas)	2 µl
Forward Primer (20-25 pmol)	1 ml
Reverse Primer (20-25 pmol)	1 ml
5unit/µl <i>Tag</i> DNA polimeraz (Sigma)	0,3 µl
pcr-H ₂ O (Sigma)	13,2 µl
DNA (Genomik+mtDNA)	1 µl
Toplam	25 µl

2.7 PCR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Kontrolü

PCR ürününün kontrolü için % 1’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Çizelge 2.4’de hacimleri belirtilmiş olan agaroz 1XTAE tamponu mikrodalga fırında 30 sn kadar kaynatılıp hafifçe soğuduktan sonra EtBr konulmuş ve elle hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. Daha sonra elektroforez küveti içine dökülmüştür. Yaklaşık 10-15 dk’da donan agaroz jelinde örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur. İlk kuyuya DNA işaretleyiciden 5,5 µl, sonraki kuyulara da 2 µl BFB (Brom Fenol Blue) ile boyanmış her bir örneğe ait 10 µl PCR ürünü yüklenmiştir. Daha sonra 113 Volt’da 20 dk yürütülmüştür. UV ışığı altında (KODAK Jel Görüntüleme Sistemi) görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

Çizelge 2.4 PCR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Kontrolü İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddeler	Hacim
Agaroz	0.3 gr
1XTAE Tamponu	30 µl
EtBr (10 mg/ml)	5.5 µl
BFB (Brom Fenol Blue)	2 ml
DNA İşaretleyici	5.5 µl
PCR Ürünü	10 µl

2.8 PCR Ürününün Restriksiyon Enzimler ile Muamelesi

RFLP uygulamasında mt-DNA'nın D-loop bölgesi 4 Restriksiyon endonükleaz enzimi ile, sitokrom b bölgesi ise 4 enzim ile kesilmiştir. Her iki gen bölgesi için toplam 4 farklı Restriksiyon endonükleaz kullanılmıştır. RFLP uygulamasında kullanılan Restriksiyon endonükleazlar ve kesme pozisyonları Çizelge 2.5' de verilmiştir. PCR ürününün Restriksiyon enzimleri ile muamelesinde kullanılan karışım miktarları ise Çizelge 2.6' da verilmiştir. Restriksiyon Endonükleazlar ile muamele edilerek oluşturulan toplam karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra su banyosunda 37 °C'de bir gece (12 saat) inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 2.5 Çalışmada kullanılan Restriksiyon endonükleazların kesme pozisyonları

Restriksiyon Endonükleazlar	Kesme Pozisyonları	Reaksiyon ısısı	Genomik Kaynak
<i>Alu-I</i> (yalnızca D-loop'da kullanıldı)	5'- AGCT ↓ -3' 3'- ↑ TCGA -5'	37 °C	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>Bam HI</i> (D-loop ve Sitokrom b'de kullanıldı)	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'	37 °C	<i>Curtobacterium albidum</i>
<i>Msp-I</i> (D-loop ve Sitokrom b'de kullanıldı)	5'- C↓CGG -3' 3'- GGC ↑C -5'	37 °C	<i>Moraxella species</i>
<i>TaqI</i> (D-loop ve Sitokrom b'de kullanıldı)	5'-T↓CGA-3' 3'-AGC↑T-5'	65 °C	<i>Thermus aquaticus</i>

Çizelge 2.6 PCR ürününün Restriksiyon endonükleazlar ile muamelesi

Enzimin Adı	<i>Alu-I</i>	<i>Bam HI</i>	<i>Msp-I</i>	<i>TaqI</i>
dH ₂ O	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
PCR Ürünü	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Enzim Miktarı (U/ µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Enzim Tamponu	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl
BSA (Bovin Serum Albumin)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Toplam Hacim	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

2.9 RFLP-pcr Jellerinin Yorumlanması

Amplifikasyon ürünleri görsel olarak değerlendirilmiştir. Tüm bantlar değerlendirmeye alınmıştır. RFLP bantlarının büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100–3000 baz çifti arasındaki bantları içeren DNA standartı (Generuler TM 100 base pair Plus DNA

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

2.10 RFLP-pcr Verilerinin İstatistik Analizleri

Populasyon içindeki ve arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmak için RFLP analizi sonucunda her iki mt-DNA gen bölgesi (D-loop ve Sitokrom b) için elde edilen veriler için; populasyonların allel frekansları, Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıkları, polimorfik lokusların yüzdeleri, populasyonlar içinde ve arasında genetik genetik çeşitlilik miktarı (Shannon çeşitlilik indeksi, I), genetik mesafe (D) hesaplandı.

2.10.1 Allel sayısı

Genetik varyasyonun bir diğer göstergesi olan lokus başına düşen allel sayısı (Na), RFLP-Pcr verilerinde POPGENE 1.32 [71] paket programı kullanılarak aşağıdaki formülle [72] hesaplandı. Formülde Na_i: i lokusundaki allel sayısı, r: lokus sayısıdır.

$$Ortalama(n_a) = \frac{\sum_i n_{a_i}}{r} \quad (2.1)$$

2.10.2 Etkin allel sayısı

Etkin allel sayısı RFLP-Pcr verilerinde POPGENE 1.32 [71] paket programı kullanılarak Kimura and Crow [73] tarafından geliştirilen aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Formülde N_e: etkin allel sayısı, X_i: i allellerinin frekansdır.

$$N_e = 1 / \sum x_i^2 \quad (2.2)$$

2.10.3 Shannon sabiti

Shannon sabiti her bir populasyondaki genetik çeşitlilik düzeyini ifade etmektedir. RFLP-Pcr analizlerinde bu sabit POPGENE 1.32 [71] paket programı kullanılarak hesaplandı. Allel frekansına dayanılarak Lewontin [74] tarafından geliştirilen aşağıdaki formül kullanıldı. Formülde H₀: Shannon sabiti, p_i: allel frekansdır.

$$H_0 = - \sum p_i \ln p_i \quad (2.3)$$

2.10.4 Polimorfik lokus oranı

Bu çalışmada en yaygın allelin (X_i) frekansı 0,95'e eşit veya az ise o lokus polimorfik kabul edilmektedir. RFLP-Pcr analizlerinde GenAIEx 6.2 [75] paket programı

kullanıldı. Bu programda polimorfik lokusların oranı Nei [72] tarafından geliştirilen aşağıdaki formülle hesaplandı. Formülde N_p : polimorfik lokus sayısı, r : lokus sayısıdır.

$$P = \frac{n_p}{r} \quad (2.4)$$

RFLP-Pcr verilerinde populasyonlara göre farklı bant sayısı, yaygın bantların dağılımı ve özel bantlar GenAlEx 6.2 [75] paket programında hesaplandı.

2.10.5 Genetik mesafe

Genetik mesafe populasyon (ya da tür) çiftleri arasındaki gen farklılıklarının büyüklüğüdür. Bu değerler genellikle geometrik uzaklıklarla eşit, yani mesafe değerinin “0” olması farklılık olmadığına işaretler. Benzerlik (I) ve mesafe (D) değerleri birbirlerine komplementerdir. En fazla kullanılan genetik mesafe değeri Nei [72] bu çalışmada RFLP-Pcr verilerinde tercih edilmiştir. RFLP-Pcr verilerinde POPGENE 1.32 [71] paket programları kullanılmıştır.

$$I = \frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}}$$

$$J_{xy} = \sum_i^m x_i y_i \quad J_x = \sum_i^m x_i^2 \quad J_y = \sum_i^m y_i^2 \quad (2.5)$$

Yukarıdaki formülde I : x ve y populasyonlarının genetik benzerliğidir. Çalışılan tüm lokuslar için J_{xy} , J_x ve J_y değerleri toplanıp lokus sayısına bölünerek tüm alleller için ortalaması alınmaktadır. Elde edilen ortalama değerler (J'_{xy} , J'_x ve J'_y) genetik mesafe (D') ve benzerliğin tahmininde kullanılmaktadır.

$$I' = \frac{J'_{xy}}{(J'_x J'_y)^{1/2}} \quad D' = -\ln I' \quad (2.6)$$

2.10.6 Kümeleme analizi

Kümeleme analizi RFLP-Pcr verilerinde Nei [76]'e göre oluşturulan genetik mesafe matrisi kullanılarak kuruldu.

2.10.7 Temel koordinat analizi (PCoA)

Çalışılan populasyonlarda genetik varyasyonu görmek için çok değişkenli istatistik analizlerinden Temel Koordinat Analizi (PCoA) RFLP-pcr analizlerinden elde edilen

allel frekans verileri temel alınarak GenAIEx 6.2 [75] paket programı kullanılarak hesaplandı.

2.10.8 AMOVA (Moleküler varyans analizi)

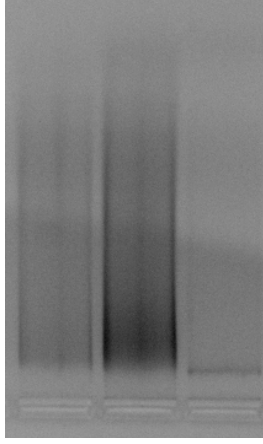
AMOVA moleküler verileri temel alarak popülasyonların ortalama değerleri arasında fark olup olmadığını belirleyen çok değişkenli bir analizdir. Bu analiz moleküler verilerde örneğin RFLP, AFLP, RAPD, Allozim analizlerinde allel frekanslarını kullanarak popülasyonlar arasındaki genetik yapı hakkında bilgi vermektedir. Bu çalışmada bu analiz GenAIEx [75] paket programı kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM III

ARAŞTIRMA BULGULAR

3.1 Çalışmada Kullanılan Körfare Örneklerinin Mitokondriyal DNA İzolasyonu

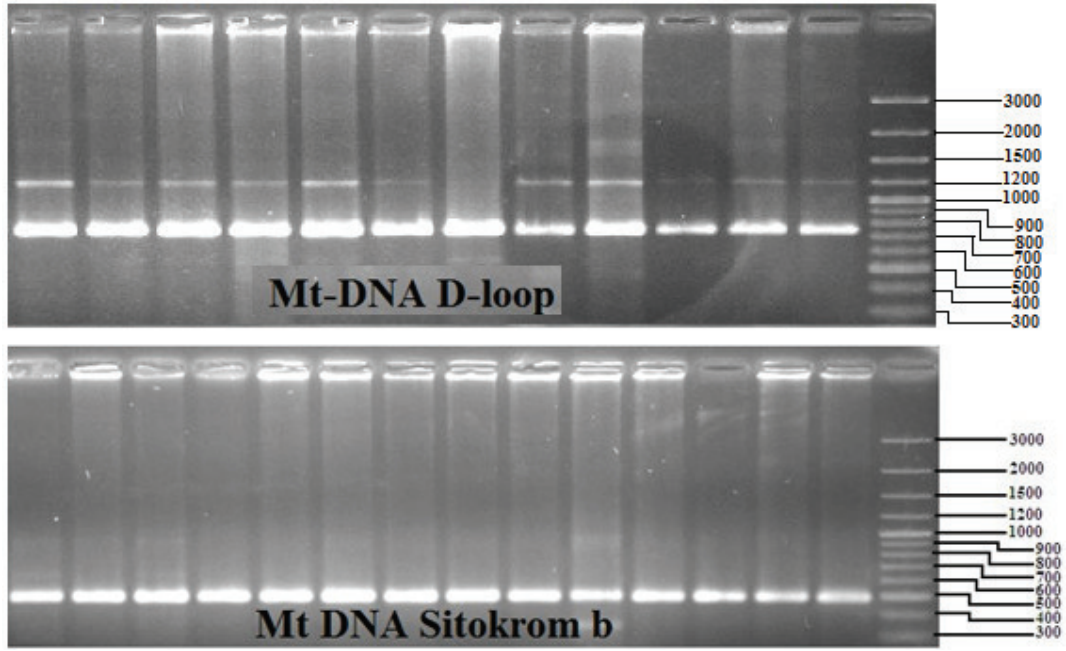
Araziden yakalanarak tahnit edilen örneklerden alınan doku (kas, karaciğer ve böbrek) örneklerinden CTAP yöntemiyle total DNA ve mtDNA'lar izole edildi. Tüm örnekler izolasyon sonrasında % 1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforezle analiz edildi. DNA izolasyonları yapılan bazı örneklere ait elektroforez sonuçları Şekil 3.1'de verilmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi izole edilen total DNA miktarı 150-200 ng/ µl arasında değişmektedir.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan örneklerin izole DNA'ların elektroforez görüntüsü

3.2 Çalışmada Kullanılan Körfare Örneklerinin Mitokondriyal DNA Kontrol (D-loop) ve Sitokrom b Bölgesinin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması

Mitokondriyal DNA kontrol bölgesi ve Sitokrom b bölgesinin PZR yöntemiyle çoğaltılması işleminde bu bölgelere özgü tasarlanmış primer setleri kullanılmıştır. PZR sonucunda elde edilen DNA'lar analiz için % 2'lik agaroz jellere aktarılmış. Böylece primerler ile çoğaltılan DNA'nın uzunluğu (bp) elektroforez ile belirlenmiştir. Elektroforez sonucunda Etbr ile boyanan DNA örneklerinin jel görüntüleme sistemiyle elde edilen görüntüsü ve çalışılan mtDNA bölgelerinin büyüklükleri Şekil 3.2'de görülmektedir. Elektroforez sonucunda çalışılan mtDNA'nın kontrol bölgesinin yaklaşık 790bp uzunluğunda, Sitokrom b bölgesinin ise yaklaşık 500bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.



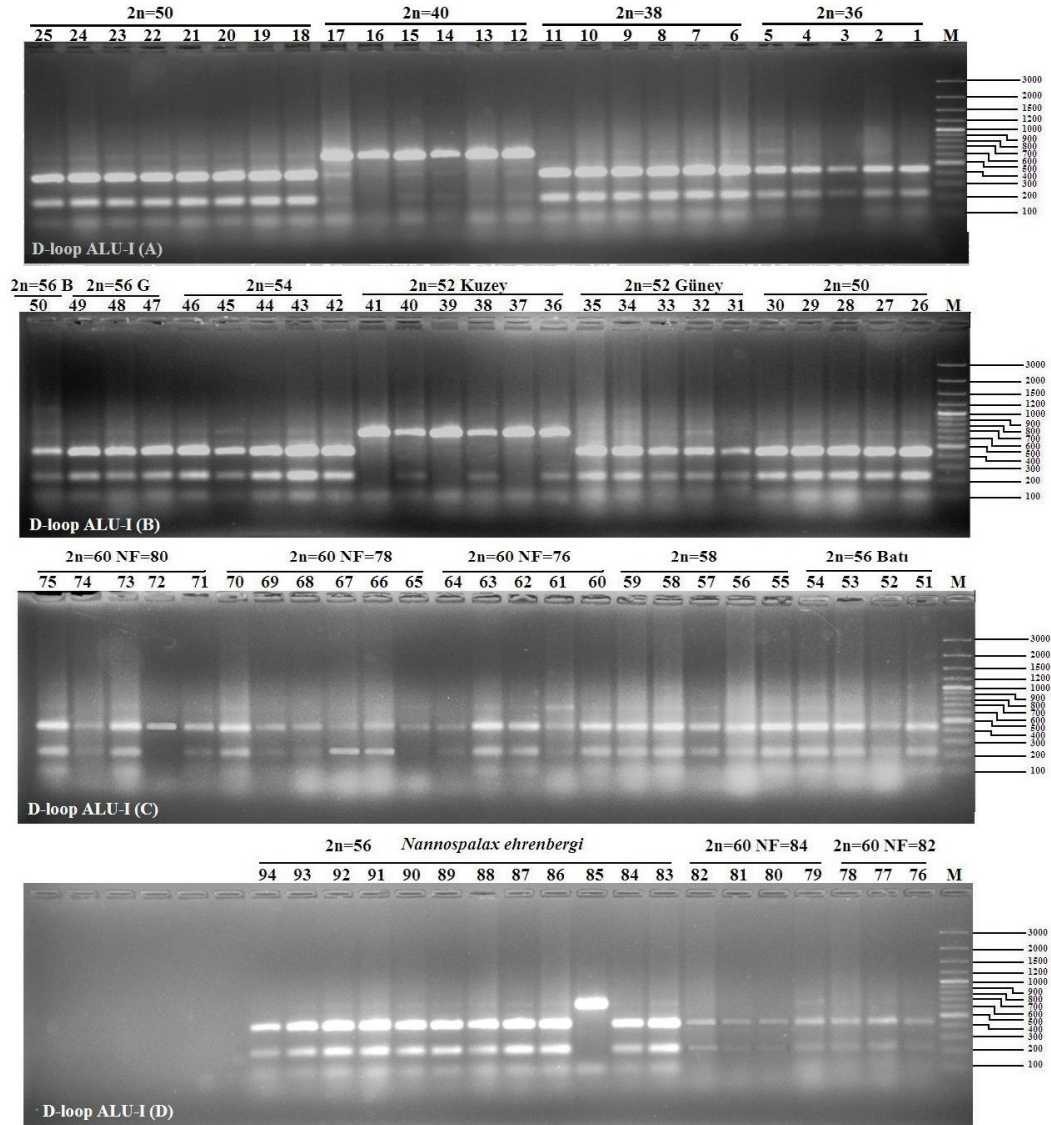
Şekil 3.2 mtDNA kontrol bölgesi ve Sitokrom b bölgesinin PCR ile çoğaltılma sonuçları

3.3 Mitokondriyal DNA Kontrol Bölgesi RFLP Analiz Sonuçları

D-loop lokusu 12S rRNA ve Sitokrom b lokusları arasında yer alan yaklaşık (979-983bp) uzunluğunda bir lokustur. Bu lokusun yaklaşık 790bp uzunluğundaki bir bölümü Pcr ile çoğaltılmış ve Alu-I, Bamh-I, Msp-I ve Taq-I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek polimorfizm analizleri yapılmıştır.

3.3.1 D-loop lokusu Alu-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

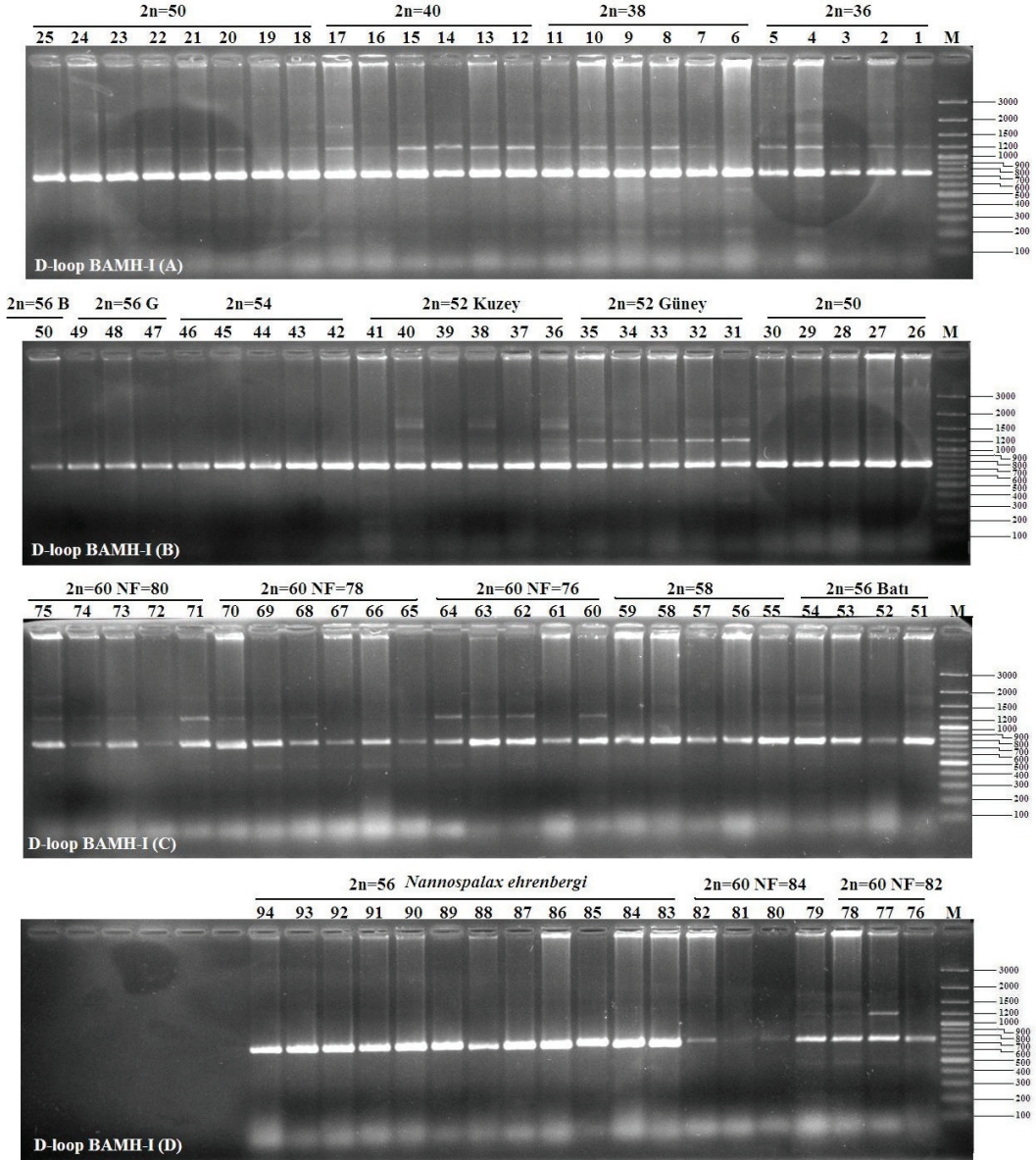
D-loop bölgesi Alu-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile 2 bölgeden kesilmiştir. Alu-I enzimi ile kesim sonucunda tüm örneklerde yaklaşık 100bp, 240bp, 450bp ve 790bp uzunluğunda 4 DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 3.3). Alu-I enzimi sadece 2n=40 ve 2n=52 sitotiplerindeki bireylere ait DNA'ları kesmemiş ve 790bp uzunluğunda DNA bandları gözlenmiştir. Bu sitotiplerin haricinde diğer tüm sitotipler 2 bölgeden kesilmiş ve 100bp, 240bp ve 450bp uzunluğunda 4 DNA bandı gözlenmiştir. Bu nedenle ALU-I enzimi 2n=40 ve 2n=52 sitotiplerini diğer sitotiplerden ayırmıştır.



Şekil 3.3 D-loop lokusunda Alu-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

3.3.2 D-loop lokusu BamH-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

D-loop bölgesi BamH-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmemiştir. BamH-I enzimi tüm örnekler için DNA'ları kesmemiş ve 790bp uzunluğunda tek bir DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 3.4). Bu nedenle BamH-I restriksiyon endonükleaz enzimi sitotipler arasında ayırıcı bir özellik taşımamaktadır.

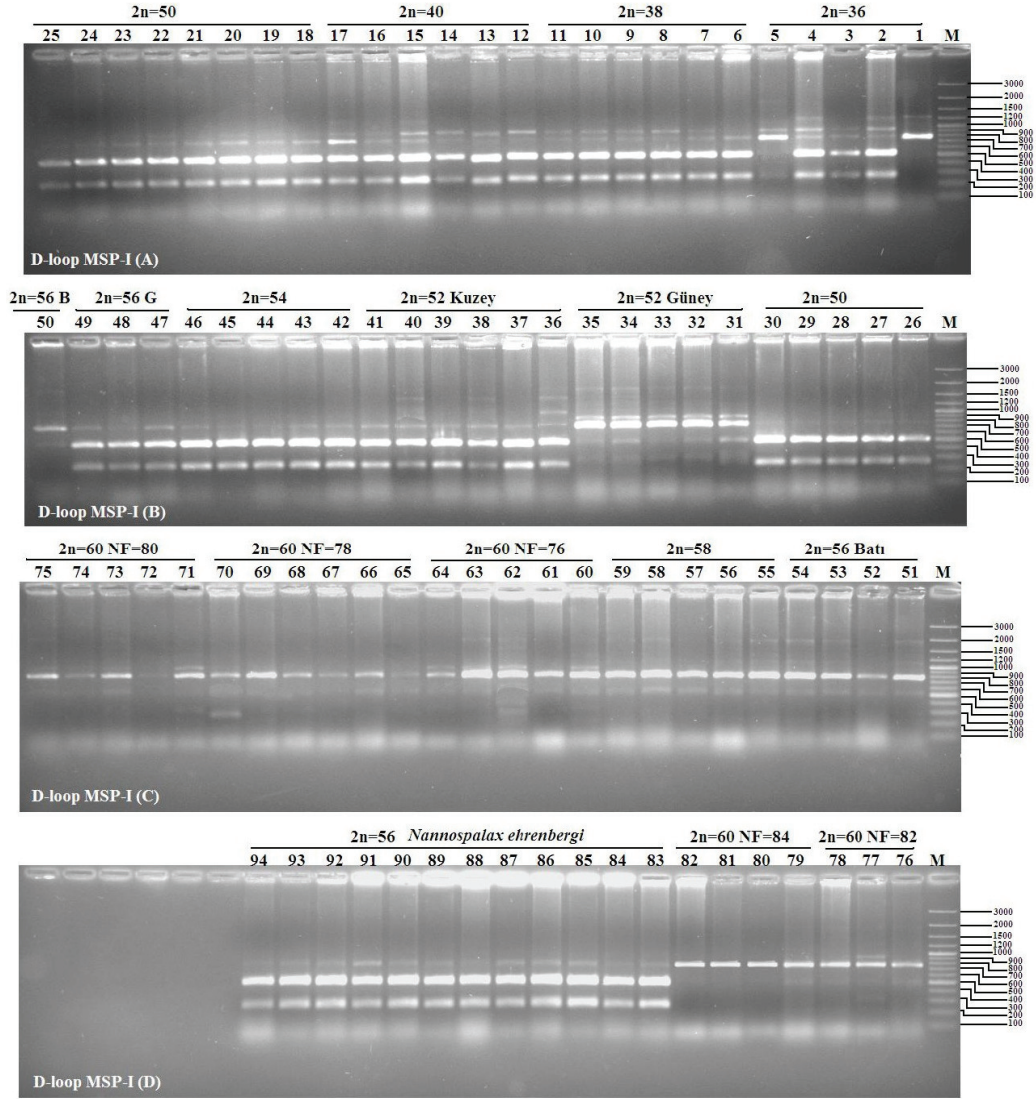


Şekil 3.4 D-loop lokusunda BamH-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

3.3.3 D-loop lokusu Msp-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

D-loop bölgesi Msp-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile 1 bölgeden kesilmiştir. Msp-I enzimi ile kesim sonucunda tüm örneklerde yaklaşık 280bp, 510bp ve 790bp uzunluğunda 3 DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 3.5). Msp-I enzimi 2n=36 sitotipinde sadece 2 örnek olmak üzere 2n=52 Güney, 2n=56 Batı, 2n=58 ve 2n=60 sitotiplerine ait bireylerin tamamında DNA'ları kesmemiş ve 790bp uzunluğunda DNA bandları gözlenmiştir. Bu sitotiplerin haricinde diğer tüm sitotipler (2n=36, 2n=38, 2n=40,

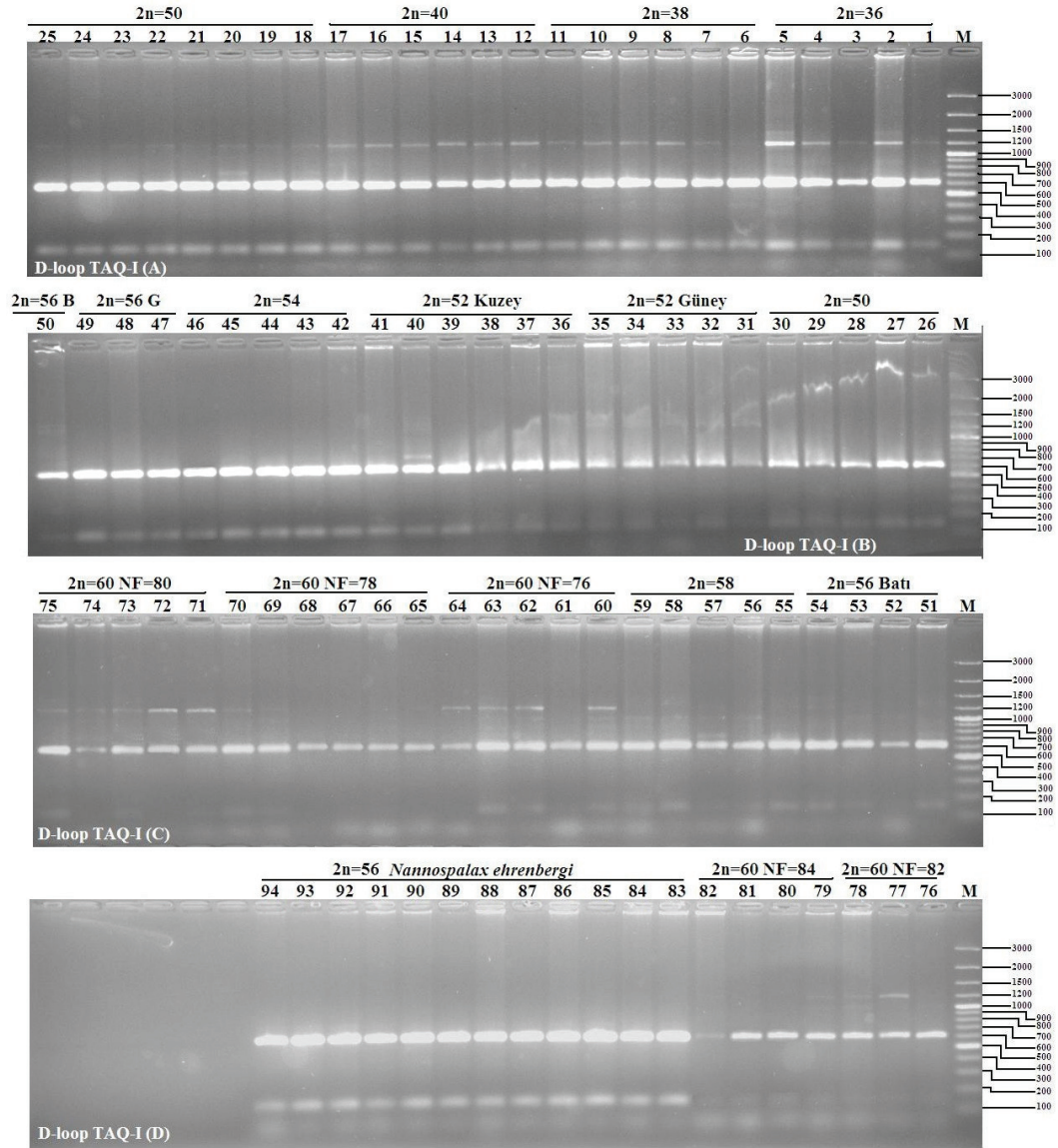
2n=50, 2n=52 Kuzey, 2n=54, 2n=56 Güney) 1 bölgeden kesilmiş ve 280bp, 510bp uzunluğunda 2 DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 D-loop lokusunda Msp-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

3.3.4 D-loop lokusu Taq-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

D-loop bölgesi Taq-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile 1 bölgeden kesilmiştir. Taq-I enzimi ile kesim sonucunda tüm örneklerde yaklaşık 170bp ve 620bp uzunluğunda 2 DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 3.6). Taq-I enzimi tüm örneklere ait DNA'ları aynı noktadan kesmiş ve tüm örneklerde aynı uzunlukta iki DNA band profili göstermiştir.



Şekil 3.6 D-loop lokusunda Taq-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

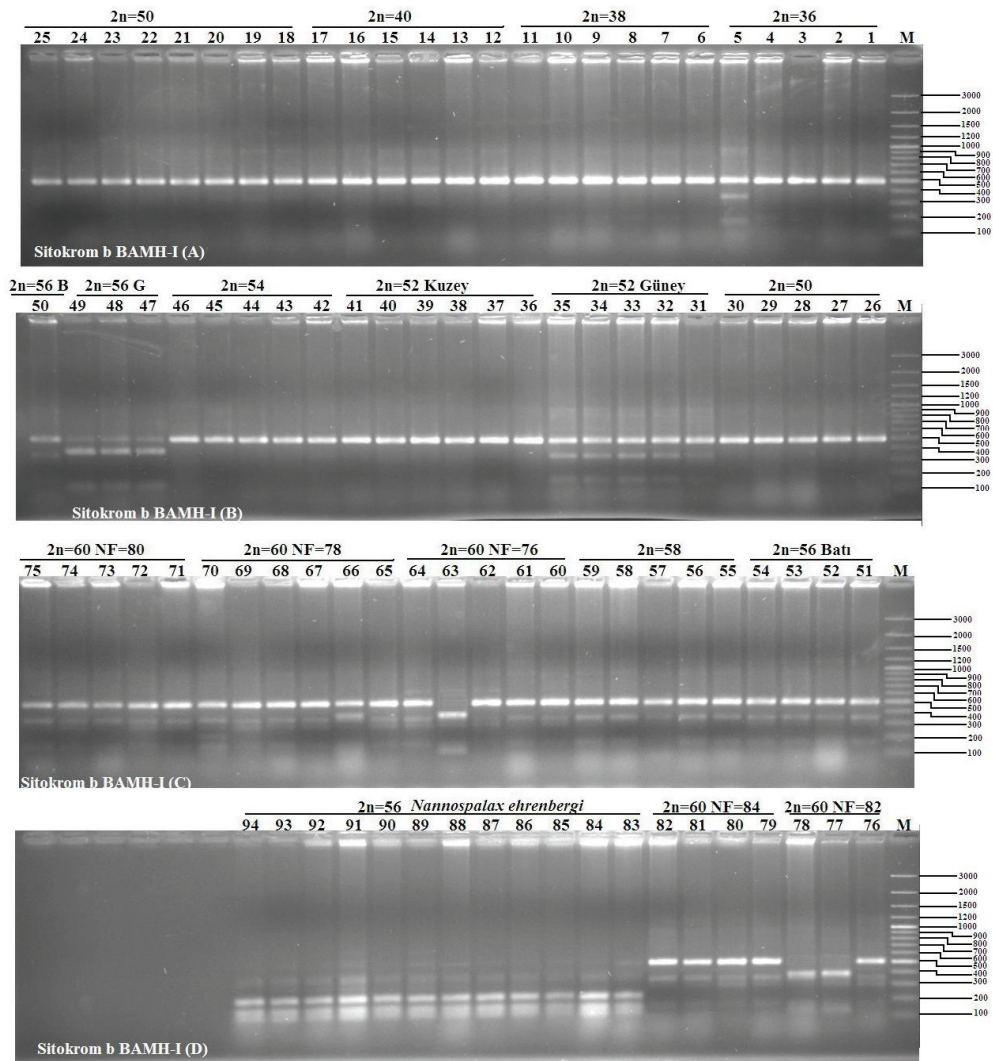
3.4 Mitokondriyal DNA Sitokrom b Bölgesi RFLP Analiz Sonuçları

Sitokrom b lokusu ND6 ve D-loop lokusları arasında yer alan yaklaşık (1140 bp) uzunluğunda bir lokustur. Bu lokusun yaklaşık 500 bp uzunluğundaki bir bölümü Pcr ile çoğaltılmış ve BamH-I, Msp-I ve Taq-I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek polimorfizm analizleri yapılmıştır.

3.4.1 Sitokrom b lokusu BamH-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

Sitokrom b bölgesi BamH-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile *N. xanthodon* sitotipleri 1 bölgeden, *N. ehrenbergi* sitotipleri ise 2 bölgeden kesilmiştir. *N. xanthodon*

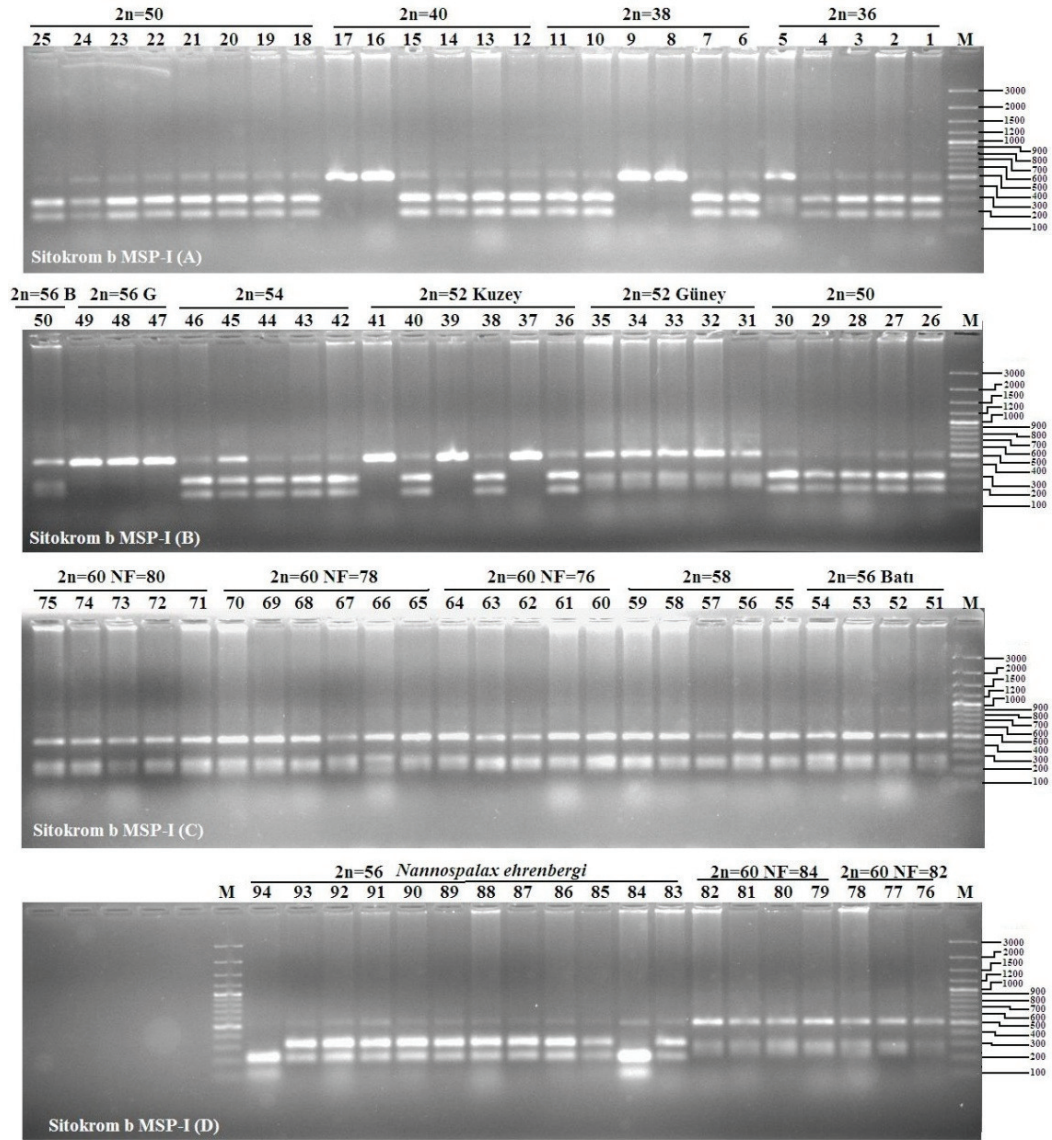
sitotiplerinde Sitokrom b bölgesi sadece 2n=56 Güney, 2n=60 NF=76 (sadece 1 örnek) ve 2n=60 NF=80 (Sadece 2 örnek) bir noktadan kesilmiş ve kesim sonucunda yaklaşık 110bp ve 390bp uzunluğunda 2 DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 3.7). Bu sitotiplerin haricinde diğer bütün *N. xanthodon* sitotiplerine ait sitokrom b bölgesi BamH-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmemiş ve 500bp uzunluğunda tek bir DNA bandı görülmüştür. *N. ehrenbergi* örneklerinde ise bütün örneklerin sitokrom b bölgesi yaklaşık 110bp, 130bp ve 260bp uzunluğunda 3 DNA bandı verecek şekilde 2 bölgeden kesilmiştir. BamH-I enziminde görülen farklı kesim kombinasyonu ile *N. xanthodon* türü *N. ehrenbergi* türünden ayrılmıştır.



Şekil 3.7 Sitokrom b lokusunda BamH-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

3.4.2 Sitokrom b lokusu Msp-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

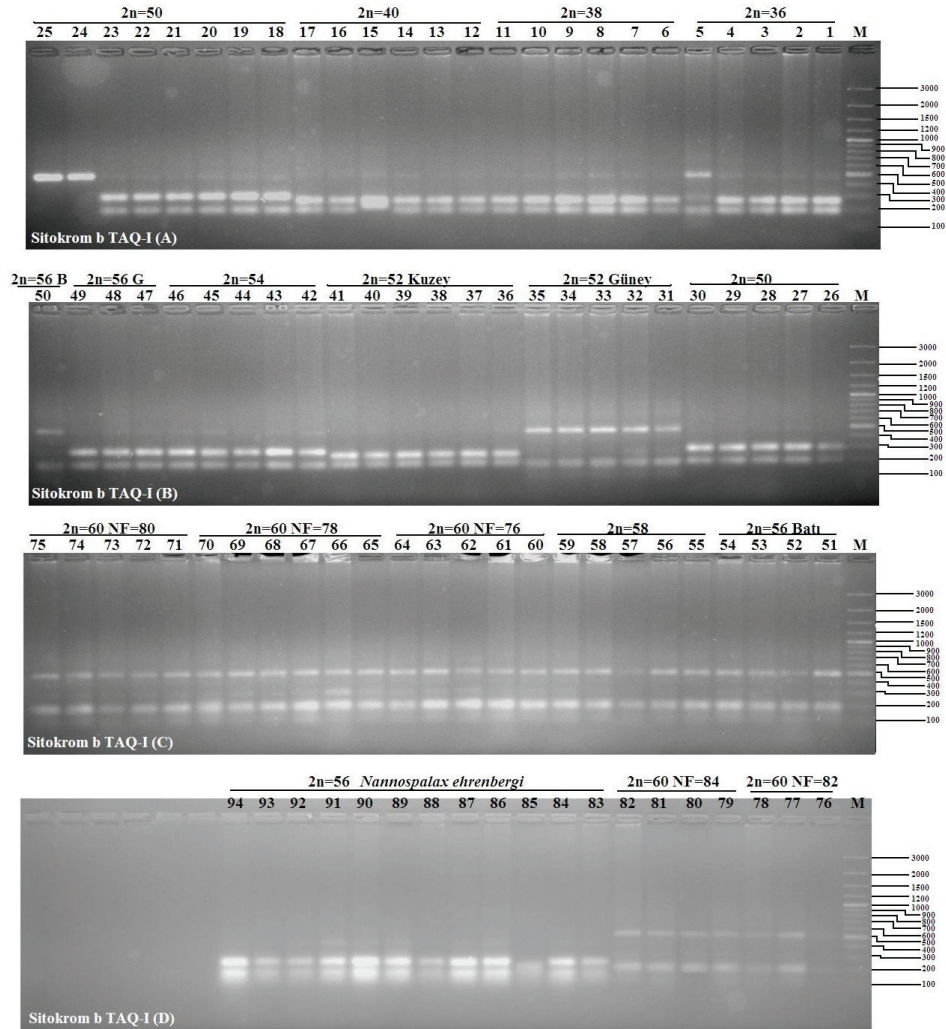
Sitokrom b bölgesi Msp-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile *N. xanthon* sitotiplerinin bazıları ($2n=36$, $2n=38$ -4 örnek, $2n=40$ -4 örnek, $2n=50$, $2n=52$ -3 örnek, $2n=54$) 1 bölgeden kesilmiş ve yaklaşık 200bp ve 300bp uzunluğunda 2 DNA bandı gözlenmiştir. *N. xanthon* türüne ait diğer sitotiplere ($2n=52$ Güney, $2n=56$, $2n=58$, $2n=60$) ait DNA örnekleri Msp-I enzimi ile kesilmemiş ve 500bp uzunluğunda bir DNA bandı görülmüştür. *N. ehrenbergi* sitotipleri ise 1 bölgeden kesilmiş ve *N. xanthon* sitotiplerinde olduğu gibi 200bp ve 300bp uzunluğunda 2 DNA bandı göstermiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Sitokrom b lokusunda Msp-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

3.4.3 Sitokrom b lokusu Taq-I restriksiyon enzimi kombinasyonu

Sitokrom b bölgesi Taq-I restriksiyon endonükleaz enzimi ile 2n=50-2 örnek, 2n=52 Güney, 2n=56 Batı, 2n=58, 2n=60 sitotipleri hariç tüm sitotiplerde 1 bölgeden kesilmiştir. Kesim olmayan yukarıdaki sitotiplerde yaklaşık 500 bp DNA bandı gözlenmiştir. *N. xanthon* türüne ait 2n=56 Güney, 2n=54, 2n=50-11 örnek sitotiplerinde ve *N. ehrenbergi* türünde DNA örnekleri Taq-I enzimi ile kesilmiş ve yaklaşık 200bp ve 300bp uzunluğunda 2 DNA bandı görülmüştür. Bu sitotiplerden farklı olarak *N. xanthon* türünün 2n=36, 2n=38, 2n=40, 2n=52 Kuzey sitotiplerinde ise yine 1 bölgeden kesilmiş ve 230bp ve 270bp uzunluğunda 2 DNA bandı göstermiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Sitokrom b lokusunda Taq-I restriksiyon enzimi kesim modelleri

3.5 Mitokondriyal DNA Sitokrom b ve D-loop Bölgesi RFLP Analiz Sonuçlarının

İstatistik Analizleri

Amplifikasyon ürünleri görsel olarak değerlendirilmiştir. RFLP bantlarının büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100–3000 baz çifti arasındaki bantları içeren DNA standartı (Generuler TM 100 base pair Plus DNA Ladder, Fermentas) kullanılmıştır. Diploit kromozom sayısının ($2n$), kromozom kol sayısı (NF) ve lokalitelere göre oluşturulan 16 popülasyonun, 4 Restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak RFLP analizi yapıldı. PCR ile çoğaltılmış ürünlerin bant biçimleri agaroz jel elektroforezi ile koşturulduktan sonra yorumlandı. Jel üzerinde DNA fragmentlerinin varlığı ya da yokluğu (1 ya da 0) belirlenerek veri seti oluşturuldu. Var olan her bir haploit bant için “1” rakamı, olmayan bant için ise “0” rakamı kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda gözlenen bantlanma paternleri sonucu elde edilen 1/0 data Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Elde edilen 1/0 data matrisi kullanılarak popülasyonlar için lokuslarda gözlenen ortalama allel sayısı, etkin allellerin ortalama sayısı, polimorfik lokus yüzdesi (% P), beklenen heterozigotluk (H_e), unbiased beklenen heterozigotluk (UHe), Shannon indeksi (I) değerleri ile standart sapmaları hesaplandı (Çizelge 4.18).

Çizelge 3.1 RFLP analizi sonucu örneklere ait 1/0 bantlanma paternleri

Örnek Sayıları	Sitotipler																						
1	D-loop ALU-I 100bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	
2	D-loop ALU-I 240bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
3	D-loop ALU-I 450bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
4	D-loop ALU-I 790bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
5	D-loop BAMH-I 790bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
6	D-loop MSP-I 280bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	D-loop MSP-I 510bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	D-loop MSP-I 790bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
9	D-loop TAQ-I 170bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
10	D-loop TAQ-I 620bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
11	Sitokrom b BAMH-I 110bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Sitokrom b BAMH-I 130bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Sitokrom b BAMH-I 260 bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Sitokrom b BAMH-I 390 bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Sitokrom b BAMH-I 500 bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Sitokrom b MSP-I 200bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
17	Sitokrom b MSP-I 300bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
18	Sitokrom b MSP-I 500bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	Sitokrom b TAQ-I 200bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
20	Sitokrom b TAQ-I 230bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
21	Sitokrom b TAQ-I 270bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
22	Sitokrom b TAQ-I 300bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
23	Sitokrom b TAQ-I 500bp	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
24		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
25		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
26		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
27		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
28		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
29		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
30		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1

Çizelge 3.1 RFLP analizi sonucu örneklere ait 1/0 bantlanma paternleri (Devam)

Örnek Sayıları	Sitotipler																						
31	2n=52 G	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
32		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
33		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
34		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
35		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
36	2n=52 K	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
37		0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
38		0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
39		0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
40		0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
41	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
42	2n=54	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
43		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
44		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
45		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
46	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	
47	2n=56 G	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
48		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
49		1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
50	2n=56 Batu	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
51		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
52		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
53		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
54		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
55	2n=58	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
56		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
57		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
58		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
59		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
60	2n=60 76	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
61		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
62		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
63		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
64		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1

Çizelge 3.1 RFLP analizi sonucu örneklere ait 1/0 bantlanma paternleri (Devam)

Örnek Sayıları	Sitotipler																						
65	D-loop ALU-I 100bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
66	D-loop ALU-I 240bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
67	D-loop ALU-I 450bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
68	D-loop ALU-I 790bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
69	D-loop BAMH-I 790bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
70	D-loop MSP-I 280bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
71	D-loop MSP-I 510bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
72	D-loop MSP-I 790bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
73	D-loop TAQ-I 170bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
74	D-loop TAQ-I 620bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
75	Sitokrom b BAMH-I 110bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
76	Sitokrom b BAMH-I 130bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
77	Sitokrom b BAMH-I 260 bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
78	Sitokrom b BAMH-I 390 bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
79	Sitokrom b BAMH-I 500 bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
80	Sitokrom b MSP-I 200bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
81	Sitokrom b MSP-I 300bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
82	Sitokrom b MSP-I 500bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
83	Sitokrom b TAQ-I 200bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
84	Sitokrom b TAQ-I 230bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
85	Sitokrom b TAQ-I 270bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
86	Sitokrom b TAQ-I 300bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
87	Sitokrom b TAQ-I 500bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
88	Sitokrom b TAQ-I 200bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
89	Sitokrom b TAQ-I 230bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
90	Sitokrom b TAQ-I 270bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
91	Sitokrom b TAQ-I 300bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
92	Sitokrom b TAQ-I 500bp	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
93		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
94		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1

Yapılan istatistik analizleri sonucunda gözlenen ortalama allel sayısı 0,435 ile 0,913 arasında değişmesine karşın, etkin allellerin ortalama sayısı 1 ile 1,182 arasında değişen daha yüksek değerler gösterdi. Gözlenen ortalama allel sayısı, etkin allellerin ortalama sayısı ve polimorfik lokus yüzdesinin en yüksek değeri 2n=36 (Aydın) popülasyonunda gözlemlendi. En düşük değerler ise 2n=56 Batı ve 2n=58 (Niğde) popülasyonunda gözlemlendi. Diğer popülasyonlarda her üç değer de birbirleriyle orantılı bir şekilde dağılıma sahip

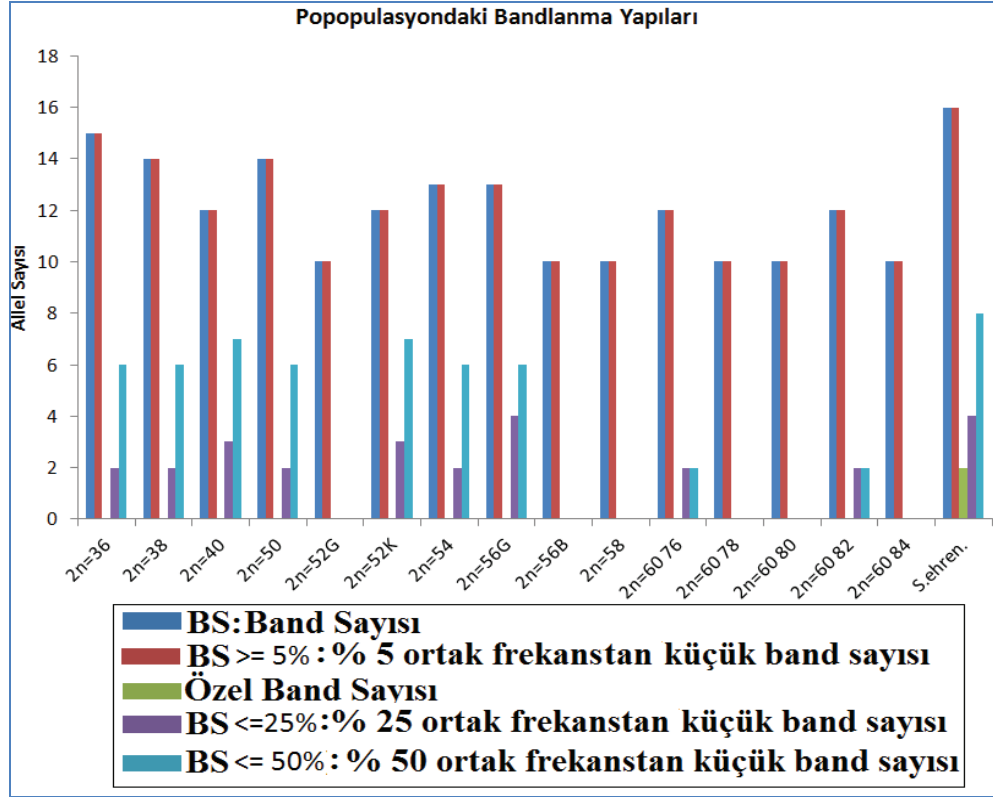
olduğu bulundu. Benzer şekilde Shannon'un çeşitlilik indeksi (I) populasyonlarda en yüksek 2n=36 (Aydın) (0,153±0,056) kromozom formlarında gözlemlendi. Diğer tüm populasyonların ortalama Shannon indeksi aşağı yukarı yakın değerlerde bulundu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Populasyonlar için lokuslarda gözlenen ortalama allel sayısı (Na), efektif allellerin ortalama sayısı (Ne), polimorfik lokus yüzdesi (% P), Shannon indeksi (I) değerleri ile standart sapmalar (SS)

Pop		N	Na	Ne	I	% P
2n=36	Mean	5,000	0,913	1,182	0,153	26,09
	SE	-	0,165	0,070	0,056	-
2n=38	Mean	6,000	0,739	1,104	0,083	13,04
	SE	-	0,144	0,057	0,046	-
2n=40	Mean	6,000	0,652	1,104	0,083	13,04
	SE	-	0,149	0,057	0,046	-
2n=50	Mean	13,000	0,739	1,046	0,056	13,04
	SE	-	0,144	0,025	0,031	-
2n=52G	Mean	5,000	0,435	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=52K	Mean	6,000	0,652	1,130	0,090	13,04
	SE	-	0,149	0,072	0,050	-
2n=54	Mean	5,000	0,565	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=56G	Mean	3,000	0,565	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=56B	Mean	5,000	0,435	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=58	Mean	5,000	0,435	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=60 76	Mean	5,000	0,652	1,061	0,065	13,04
	SE	-	0,149	0,034	0,036	-
2n=60 78	Mean	6,000	0,435	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=60 80	Mean	5,000	0,435	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
2n=60 82	Mean	3,000	0,652	1,104	0,083	13,04
	SE	-	0,149	0,057	0,046	-
2n=60 84	Mean	4,000	0,435	1,000	0,000	0,00
	SE	-	0,106	0,000	0,000	-
<i>N.ehrenbergi</i>	Mean	12,000	0,826	1,024	0,037	13,04
	SE	-	0,136	0,013	0,021	-
Total	Mean	5,875	0,598	1,047	0,041	7,34
	SE	0,139	0,032	0,010	0,008	2,05

Çalışılan 4 Restriksiyon endonükleaz enziminin kesimi sonucu elde edilen 16 farklı bant profilinin populasyonlardaki dağılışı ile özel bant sayıları ve yaygın olan bant sayılarının populasyonlara göre dağılımı Şekil 3.10 ve Çizelge 3.3'de gösterildi. 2n=36 (Aydın) ve 2n=38 (İzmir ve Balıkesir) kromozomal formlarda ve *N. ehrenbergi* türünde farklı bant sayısı en yüksek değerler gösterdi (15, 14 ve 16). Benzer olarak 2n=40 (Yeşiladağ ve Yenişarbademli) ve 2n=54 (Kırıkale) gibi batıya yakın kenar

kromozomal formlarda da farklı bant sayısı oldukça yüksek bulundu. $2n=60$ gurubu ve güney doğu poulasyonlarında ise 10 ile 13 arasında değişen daha düşük değerli bant sayısı gözlemlendi. *N. ehrenbergi* türüne ait popülasyonlarda 2 özel bant tesbit edildi. Diğer kromozomal formlarda özel bant bulunmadı. % 25 ve 50 oranından büyük ve eşit sayıda yaygın bantların sayısı en yüksek $2n=36$, $2n=38$, $2n=40$, $2n=50$ sitotiplerinde ve *N. ehrenbergi* türünde oldukça yüksek bulundu. Diğer popülasyonlarda ise daha düşük değerler gösterdiği belirlendi.



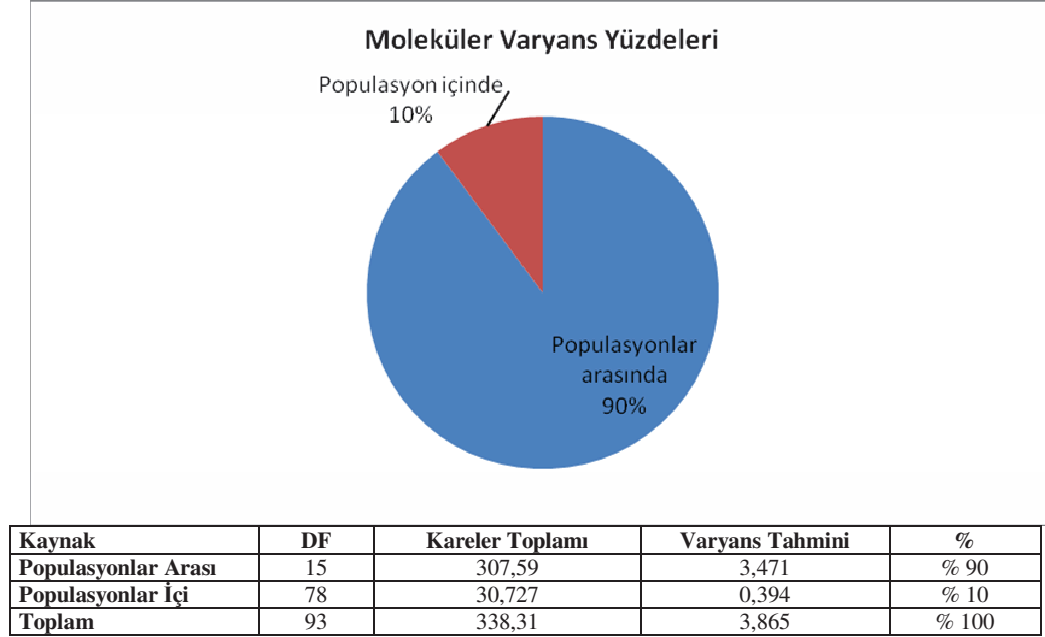
Şekil. 3.10 RFLP sonucu elde edilen DNA bantlarının popülasyonlardaki dağılışı

Çizelge. 3.3 RFLP sonucu elde edilen DNA bantlarının popülasyonlardaki sayıları

Population	BS	BS >% 5	Özel Bant Sayısı	BS< %25	BS< %50	Population	BS	BS >% 5	Özel Bant Sayısı	BS< %25	BS< %50
2n=36	15	15	0	2	6	2n=56B	10	10	0	0	0
2n=38	14	14	0	2	6	2n=58	10	10	0	0	0
2n=40	12	12	0	3	7	2n=60 76	12	12	0	2	2
2n=50	14	14	0	2	6	2n=60 78	10	10	0	0	0
2n=52G	10	10	0	0	0	2n=60 80	10	10	0	0	0
2n=52K	12	12	0	3	7	2n=60 82	12	12	0	2	2
2n=54	13	13	0	2	6	2n=60 84	10	10	0	0	0
2n=56G	13	13	0	4	6	<i>N.ehrenbergi</i>	16	16	2	4	8

3.5.1 RFLP analizi verilerinde AMOVA (Moleküler Varyans Analizi)

N. xanthodon örneklerini içeren 15 kromozomal formun moleküler varyans analizi Genalex 6.0 paket programı ile hesaplandı. Populasyonlar arası varyans yüzdesi (% 90), populasyonlar içi varyans yüzdesinden (% 10) daha büyük bulundu ($P < 0,05$). AMOVA analiz sonucu ve grafik üzerinde gösterimi Şekil 3.11’de verildi.



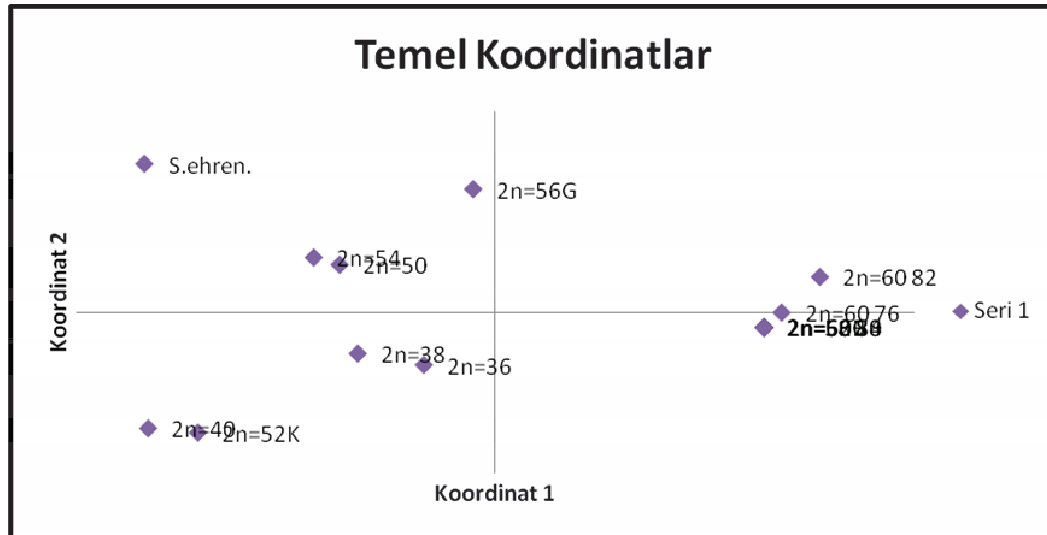
Şekil 3.11 Moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları. Serbestlik derecesi (DF), Kareler toplamı, Varyans tahmini, Yüzde toplam varyasyon (%)

3.5.2 Temel Koordinat Analizi (PCoA: Principal Coordinate Analysis)

RFLP analizi sonucu elde edilen 16 populusyona ait veriler GenAlEx 6.2 programı kullanılarak temel koordinat analizi yapıldı. İlk üç aksis toplam genetik varyasyonun % 96,84’ünü açıkladı. En yüksek varyasyon değerleri ile eigen değerleri I. aksiste açıklandı (Çizelge 3.4). Temel koordinat analizinde koordinat 1 ve 2’de üç guruba ayırdı (Şekil 3.12). 1. grup $2n=60$ diploit kromozoma sahip formlar, $2n=58$ (Niğde), $2n=52$ Güney (Mersin) ve $2n=56$ Güney kromozomal formları, ikinci grup $2n=36$ (Aydın), $2n=38$ (İzmir, Balıkesir, Manisa), $2n=40$ (Yeşildağ, Yenişarbademli), $2n=52$ Kuzey (Bolu) kromozomal formlarını içine almaktadır. Üçüncü grup *N. ehrenbergi*, $2n=54$ ve $2n=50$ kromozom formlarını içerir ve pozitif eigen vektör değerleriyle tamamen farklı bir düzlemde kümelendi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Aksis ve örnek vektörlerinden elde edilen Eigen değerleri

Eigen Değerleri	1	2	3	4	5
2n=36	353,243	180,408	51,438	13,610	5,509
2n=38	-1,320	-2,559	2,784	-1,747	0,493
2n=40	-2,542	-2,015	2,096	0,383	1,852
2n=52 Güney	-6,413	-5,625	-1,432	-0,196	-0,662
2n=52 Kuzey	-2,877	2,267	3,054	0,772	-0,681
2n=54	4,967	-0,755	0,594	0,177	-0,183
2n=56 Güney	-5,496	-5,834	-2,278	0,823	0,060
2n=56 Batı	-3,356	2,615	2,920	1,102	-0,274
2n=58	-0,410	5,911	-2,424	1,793	0,647
2n=60 NF=74	4,967	-0,755	0,594	0,177	-0,183
2n=60 NF=76	4,967	-0,755	0,594	0,177	-0,183
2n=60 NF=78	5,289	-0,041	-0,263	-0,150	0,056
2n=60 NF=80	4,967	-0,755	0,594	0,177	-0,183
2n=60 NF=82	4,967	-0,755	0,594	0,177	-0,183
2n=60 NF=84	5,997	1,683	-2,430	-1,198	0,435
<i>N. ehrenbergi</i>	4,967	-0,755	0,594	0,177	-0,183
TOPLAM	-6,485	7,137	-0,484	-1,740	-0,211



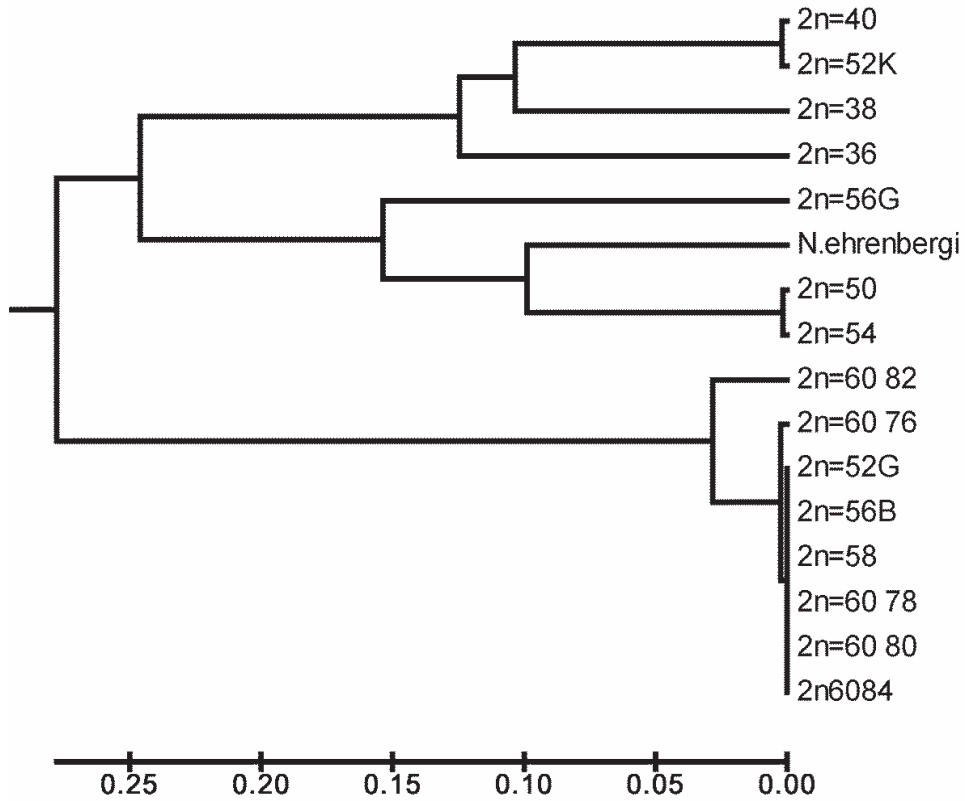
Şekil 3.12 RFLP verilerinin 16 kromozomal formda Temel Koordinat Analiz sonuçlarının grafik üzerinde gösterimi

3.5.3 RFLP verilerinde genetik mesafe analizi

Populasyonlar arası Nei [76]'nin tarafsız (unbiased) genetik mesafe ve genetik benzerlik değerleri POPGENE paket programı kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4.21). *N.*

xanthodon populasyonları içerisinde en yüksek genetik mesafe değeri $2n=40$ (Yeşildağ, Yenişarbademli) ile $2n=60$ NF=82 (Afyon) kromozomal formlar arasında gözlemlendi.

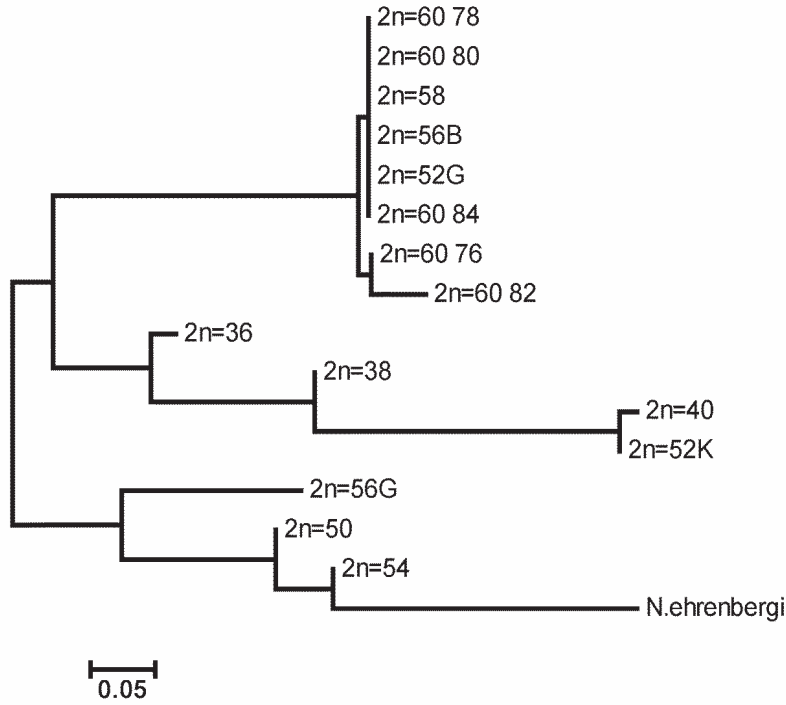
Nei [76] tarafsız genetik mesafe değerleriyle MEGA paket programı kullanılarak oluşturulan UPGMA ağacı Şekil 3.13'de gösterildi. Yine aynı mesafe matrisine göre N. J. ağacı MEGA paket programında oluşturuldu (Şekil 3.14). İki ağaçta da benzer kümelenmeler gözlemlendi. Temelde iki ana dal yaklaşık $D=0,3$ üzerinde bir genetik mesafe değeriyle ayrıldı. Birinci ana dal yaklaşık $D=0,25$ genetik mesafe değeriyle iki alt dala ayrıldı. İlk alt dal *S. ehrenbergi* ve $2n=50$ ve $2n=54$, diğer alt dallarda ise $2n=36$, $2n=38$, $2n=40$ ve $2n=52$ Kuzey sitotipleri beraber kümelendi. İkinci ana dalda $2n=60$, $2n=58$, $2n=56$ ve $2n=52$ Güney populasyonları kümelendi.



Şekil 3.13 Nei [76] tarafsız genetik mesafe değerlerine göre oluşturulan UPGMA ağacı

Çizelge 3.5 Kromozomal formlar arasındaki Nei [76] genetik mesafe değerleri

Populasyon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. 2n=36	0,000															
2. 2n=38	0,025	0,000														
3. 2n=40	0,241	0,204	0,000													
4. 2n=52 G	0,209	0,189	0,438	0,000												
5. 2n=52 K	0,320	0,398	0,708	0,447	0,000											
6. 2n=54	0,256	0,210	0,004	0,470	0,659	0,000										
7. 2n=56 G	0,235	0,215	0,467	0,003	0,496	0,499	0,000									
8. 2n=56 B	0,563	0,467	0,803	0,313	0,496	0,750	0,302	0,000								
9. 2n=58	0,320	0,398	0,708	0,447	0,000	0,659	0,496	0,496	0,000							
10. 2n=60 74	0,320	0,398	0,708	0,447	0,000	0,659	0,496	0,496	0,000	0,000						
11. 2n=60 76	0,338	0,417	0,743	0,468	0,005	0,692	0,519	0,433	0,005	0,005	0,000					
12. 2n=60 78	0,320	0,398	0,708	0,447	0,000	0,659	0,496	0,496	0,000	0,000	0,005	0,000				
13. 2n=60 80	0,320	0,398	0,708	0,447	0,000	0,659	0,496	0,496	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000			
14. 2n=60 82	0,426	0,511	0,879	0,566	0,061	0,821	0,621	0,333	0,061	0,061	0,030	0,061	0,061	0,000		
15. 2n=60 84	0,320	0,398	0,708	0,447	0,000	0,659	0,496	0,496	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,061	0,000	
16. <i>N.ehrenbergi</i>	0,509	0,475	0,768	0,202	0,848	0,814	0,194	0,307	0,848	0,848	0,807	0,848	0,848	0,752	0,848	0,000



Şekil 3.14 Nei [76] tarafsız genetik mesafe değerlerine göre oluşturulan N.J ağacı

BÖLÜM IV

TARTIŞMA VE SONUÇ

Körfareler üzerine yapılan en kapsamlı revizyon çalışmasında Topachevskii [7] Türkiye’de sadece üç körfare türünün bulunduğunu (*Microspalax leucodon*, *Microspalax ehrenbergi* ve *Microspalax nehringi*) belirtmiştir. Mehely [8], Ognev [1], Ellerman and Morrison-Scott [20], Corbet [21], Mursaloğlu [24], Kıvanç [26], Savic and Nevo [6], Nevo et al. [37, 49] ise bu türlerden *N. ehrenbergi* türünün Güneydoğu Anadolu’da, diğer tür olan *N. leucodon* türünün ise Anadolu’nun diğer bölgelerinde bulunduğunu belirtmişlerdir. Topachevskii [7] tarafından kabul edilen *N. nehringi* türü ise ayrı bir tür olarak kabul edilmemiş ve çoğunlukla *N. leucodon* türünün bir alttürü olarak değerlendirilmiştir.

Diğer kapsamlı revizyon çalışmalarda [23, 25, 27], Türkiye’de üç körfare türünün bulunduğu ve bunlardan *N. nehringi* türünün Gökçeada, Bozcaada, Trakya ve Güneydoğu Anadolu hariç bütün Türkiye’de yayılış gösterdiği, *N. leucodon* türünün sadece Trakya’da, *N. ehrenbergi* türünün ise sadece Güneydoğu Anadolu’da yayılış gösterdiği belirtilmiştir. Fakat, Kryštufek and Vohralík [28] tarafından Türkiye ve Kıbrıs memelileri üzerine yapılan revizyon çalışmasında, Anadolu’da yayılış gösteren *N. nehringi* tür isminin geçerli olmadığı ve bunun daha önce Nordmann, [10] tarafından İzmir’den tanımlanan *N. xanthodon* türünün sinonimi olduğunu ileri sürmüştür. Bu nedenle, Trakya ve Güneydoğu Anadolu hariç Anadolu’nun diğer kesimlerinde bu türün yayılış gösterdiğini belirtmiştir.

Bu zamana kadar yapılan çalışmalar Güneydoğu Anadolu’da *N. ehrenbergi* türünün tartışmasız geçerli bir tür olduğunu göstermektedir. Bunun aksine pek çok araştırmacı Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinden tanımlanan diğer üç türün (*N. xanthodon*, *N. nehringi* ve *N. leucodon*) conspecific olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle bu türlerin herbiri, araştırmacılar tarafından farklı zaman periyotlarında Anadolu’da yayılış gösteren hakim tür olarak kullanılmıştır. Son yapılan çalışmalarda *N. leucodon* türünün Anadolu’da bulunmadığı sadece Trakya ve Balkanlar’da yayılış gösterdiği kabul görmektedir. Bu durumda Anadolu körfareleri için iki türün varlığından sözedilebilir.

Bu türlerden birisi Kryštufek and Vohralík [28] tarafından kabul edilen *N. xanthodon* türü diğeri ise Topachevskii [7] tarafından kabul edilen *N. nehringi* türüdür. Ayrıca, bu

türlerin haricinde Matschie [13] tarafından Eskişehir'den *S. labaumei* adında bir tür daha tanımlanmıştır.

Anadolu'nun büyük kesiminde yayılışa sahip olan körfarelerin nasıl sınıflandırılacağı bu nedenle tartışmalıdır. *Nannospalax* taksonomisinde aşağıda belirtilen hususlar çözüm beklemektedir;

1. Kryštufek and Vohralík [28] tarafından belirtildiği gibi Anadolu'da yaygın tür olan *N. xanthodon* (sinonim *N. labaumei* ve *N. nehringi*) bütün Anadolu formları için geçerli bir tür müdür?
2. Diğer pekçok araştırmacı tarafından [7, 23, 25, 27] Anadolu'da yaygın tür olarak kabul edilen *N. nehringi* geçerli bir tür müdür?
3. Anadolu'da yayılışlarının yaygın olduğu kabul edilen *N. xanthodon*, *N. nehringi* ve *N. labaumei* gerçekten birbirlerinin sinonimi mi yoksa bunlar birbirlerinden farklı türler midir?
4. Ayrı tür olmaları durumunda Anadolu'da yayılış gösteren körfare popülasyonlarına ait farklı sitotiplerin taksonomik durumları nasıl olmalıdır?

Bu zamana kadar Türkiye körfare popülasyonları üzerine moleküler marker kullanılarak yapılan çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan Arslan et al. [51] Türkiye'de *N. xanthodon* türüne ait sitotip olarak değerlendirdiği 2n=40, 58, 60 olmak üzere üç sitotipin genetik farklılığını Mitokondriyal DNA'nın 630bp uzunluğunda Sitokrom b bölgesini çalışarak analiz etmiştir. Bu çalışmasında Arslan et al. [51] çalışılan üç sitotipin sitokrom b bölgesinin baz dizisindeki farklılıklar bakımından üç sitotipin ayrı türler olabilecekleri belirtilmiştir.

Bir diğer çalışmada Kandemir et al. [77] Mitokondriyal DNA'nın sitokrom b bölgesinde 420bp uzunluğunda bir bölgeyi, *N. xanthodon* türünde 6 sitotip (2n=36, 38, 40, 50, 56, 60), *N. leucodon* türünde 1 sitotip (2n=56), *N. ehrenbergi* türünde 2 sitotip (2n=52 ve 2n=56) üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda özellikle *N. xanthodon* türüne ait sitotipler arasında yeni tür olabilecek özellikte farklılıklara sahip popülasyonların bulunduğu ileri sürülmüştür.

Bu tez çalışmasında 4 restriksiyon endonükleaz enzimi tarafından mtDNA'nın iki bölgesinin kesilmesi temel alınarak yapılan RFLP analizi sonucunda gözlenen allel sayısı, etkin allellerin sayısı ve polimorfik lokus yüzdesi bakımından elde edilen en

yüksek değerler, $2n=36$ (Aydın) sitotipinde, en düşük değerler ise $2n=58$ (Niğde) populasyonunda gözlenmiştir. Shannon genetik çeşitlilik indeksi $2n=36, 38, 40, 52$ Kuzey kromozomal formu ve *N. ehrenbergi* türü haricinde bütün populasyonlarda yaklaşık olarak eşit bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bu değerler Ben-Shlomo et al. [57] çalışmasında verilen değerlerle uygunluk göstermemektedir. Ben-Shlomo et al. [57] tarafından belirtildiği gibi kromozomal formlarda, beklenen heterozigotluk değeri ve elde edilen genetik çeşitlilik, $2n$ değerine paralel olarak İç Anadolu'ya doğru bir artış göstermemiştir. Bunun aksine bu değerler Batı Anadolu populasyonlarında daha yüksek bulunmuştur. Örneğin farklı bant sayısı bakımından en yüksek değerleri $2n=36$ (Aydın), $2n=38$ (İzmir ve Balıkesir), $2n=40$ (Beyşehir ve Yenişarbademli) ve $2n=52$ (Bolu) kromozomal formları ve *N. ehrenbergi* türü göstermiştir. Populasyonlarda gözlenen özel bant ise sadece *N. ehrenbergi* türünde bulunmuştur. Bu durum *N. ehrenbergi* türünün geçerli ve tartışmasız bir tür olduğu gerçeğini kanıtlamaktadır.

Tez çalışmasında değerlendirilen populasyonlarda batıdan örneklenen populasyonlar ile doğudan örneklenen populasyonlar kendi aralarında benzeşerek alt gruplaşma oluşturmaktadırlar. Bu durum Wahlund [78] etkisine uygunluk göstermektedir. Körfareler gibi hareket yeteneği kısıtlı canlılarda populasyonlar arasında görülen bu coğrafik kutuplaşma kendini birbirlerine çok yakın populasyonlarda bile oldukça güçlü göstermektedir. Birbirine yakın coğrafik bölgelerde bulunan körfare sitotiplerinin yakın genetik mesafe değerleri göstermeleri, uzak bölgelerde yaşayanların ise daha yüksek genetik mesafe değerleri göstermeleri buna iyi bir örnektir. Yakın populasyonlar arasındaki homozigotluktaki aşırılık, benzer genotipler arasında çiftleşme (inbreeding, kendileşme) gibi nedenlerden dolayı olabilir. Toprak altında yaşayan canlılarda doğal seleksiyon baskısının fazla olması, zamanla bu canlıların farklı ekolojik şartlara adaptif uyuma zorlanmasına ve farklı ekolojik koşullarda farklı kromozomal formların oluşmasının neden olduğu düşünülmektedir. Fakat aynı coğrafik bölgede yaşayan sitotipler arasındaki genetik indeksler, farklı coğrafik bölgedekiler arasında yaşayanlardan oldukça farklı olsada, aynı bölgedeki pek çok sitotip arasında da genetik farklılık miktarları oldukça yüksektir. Yakın coğrafik bölgelerde yaşayan sitotipler arasında gözlenen bu durum her populasyondaki her bir lokusun çevresel faktörlerdeki değişimlerden bağımsız olarak etkilendiğini göstermektedir. Körfarelerin toprak altında kısıtlı hareket yetenekleri bu canlılar arasında bir coğrafik izolasyon mekanizması gibi

görev yapmakta ve yakın alanlarda yaşayan sitotipler birbirlerinden zamanla farklılaşmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında yapılan RFLP analizleri, İç Anadolu'da $2n=60$ kromozomal formunun, Batı Anadolu'da $2n=36$ ve 38 kromozomal formunun ve Güneydoğu Anadolu'da *N. ehrenbergi* türünün ve Doğu Anadolu'da $2n=50$ kromozomal formunun en fazla yaygın allel barındıran formlar olduklarını gösterdi. Zima [79] tarafından belirtildiği gibi yaygın yayılışa sahip olan kromozomal formların atasal formlar olduğu hipotezi doğrultusunda, bu formların atasal kromozomal formlar olduğu ve $2n=56$, $2n=58$, $2n=52G$ kromozomal formların $2n=60$ kromozomal formundan, $2n=36$, $2n=40$, $2n=52$, $2n=54$ kromozomal formların $2n=38$ kromozomal formundan evrimleştikleri kabul edildi.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler Güneydoğu Anadolu Bölgesinde *N. ehrenbergi* türünün geçerli bir tür olduğu gerçeğini desteklese de, *N. xanthodon*, *N. nehringi* veya *N. leucodon* türlerinden birinin Anadolu'nun geri kalan kısmında yayılış gösteren hakim türler olduğu görüşünü desteklememektedir. Yapılan analizler sonucunda özellikle Batı Anadolu bölgesinde yaşayan sitotiplere ($2n=36$, $2n=38$, $2n=40$ ve $2n=52$ Kuzey) ait popülasyonların, İç Anadolu Bölgesinde yaşayan $2n=60$, 58 , 56 ve 52 sitotiplere sahip popülasyonlardan oldukça farklılaştıkları belirlenmiştir. Bu durum Doğu Anadolu bölgesinde yaşayan $2n=50$ sitotipe ait popülasyonlar ile diğer popülasyonlar arasında da görülmektedir. Anadolu'da yaşayan her bir sitotip ayrı tür seviyesinde farklılığa sahip olmasa da belirli sitotip grupları arasında çok bariz farklılıklar bulunmaktadır. Özellikle *N. xanthodon* türünün tip lokalitesini (İzmir) içine alan $2n=38$ sitotipi ve buna yakın komşu popülasyon olan $2n=36$ sitotipi (Aydın), Beyşehir'de oldukça izole ve küçük bir popülasyon halinde olan $2n=40$ sitotipi, Bolu ve çevresinde geniş bir yayılış gösteren $2n=52$ Kuzey sitotipi, Doğu Anadolu Bölgesinin neredeyse tamamında bulunan $2n=50$ sitotipi ve İç Anadolu Bölgesinin en yaygın formu olan $2n=60$ sitotipi genetik olarak oldukça farklı bulunmuştur. *N. xanthodon* türünün tip lokalitesinin İzmir'de olması bakımından İzmir ve çevresinde yaşayan $2n=38$ sitotipi *N. xanthodon* türü olarak değerlendirilebilir. Benzer olarak tip yeri Kars-Kazıkoparan olan *N. nehringi* türü *N. xanthodon* türünün sinonimi değil ve ayrı bir türdür ayrıca $2n=50$ sitotipinin yayılış gösterdiği Doğu Anadolu'da hakim türdür. Ne *N. xanthodon* türü ne de *N. nehringi* türü İç Anadolu Bölgesinde yayılış göstermemektedir. İç Anadolu bölgesinde ise özellikle $2n=60$ sitotipi ve bu sitotipten evrimleşen fakat tür seviyesinde tamamen genetik olarak

farklılaşmamış türev sitotipler ($2n=58$, $2n=56$, $2n=54$, $2n=52$) ayrı bir tür altında toplanmalıdır. Bu bölgeden daha önce tanımlanan en eski tür Matschie 1919 tarafından Eskişehir'den *S. labaumei* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle İç Anadolu'da *N. labaumei* türünün geçerli tür olduğu bu tez çalışmasında kabul edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Ognev, S.I., Mammals of the U.S.S.R. and adjacent Countries, Vol. V, Rodents, Moskova, 1-662, 1947.
- [2] Harrison, D.L. and Bates, P.J.J., Mammals of Arabia, Second Edition, Harr. Zool. Mus. Pub. 1-353, 1991.
- [3] Buckie, A. P., Smith, R. H., Rodent pests and their control, CAB int. Press 405 pages, London, 1994.
- [4] Nevo, E., Evolutionary theory and processes of active speciation and adaptive radiation in subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel, Evol. Biol. 25: 1-125, 1991.
- [5] Kırıl, E. ve Benli, O., Orta Anadolu'nun kemirici türleri ve zarar yaptığı kültür bitkileri: Bit. Kor. Bült. 19 (4): 191-217, 1947.
- [6] Savic, I.R. and Nevo, E., The Spalacidae: evolutionary history, speciation, and population biology. In: Nevo, E. ve Reig, O.A. (eds). Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels, Wiley-Liss, New York, pp. 129-154, 1990.
- [7] Topachevskii, W.A., Fauna U.S.S.R. Spalacidae, Leningrad; Nauka. (English translation; U.S Dept. Commerce. Natn. Info. Serv., Springfield, Virginia, 1969.
- [8] Mehely, (Mammalia: Rodentia) in Turkey, Acta Zoologica Bulgarica, 59 (1): 41-46, 1909.
- [9] Kosswig, C., Zoogeographynof the Near East. Syst. Zool. 4, 1955.
- [10] Nordmann, A., Observations sur la Faune Pontique, A. Demidoff Voyage dans la Russie Meridion. 3: 35, 1840.
- [11] Nehring, A., Über mehrere neue *Spalax* Arten. Sitzb. der Gesellsch. Naturf. Freunde Z. Berlin. 171-183, 1898.
- [12] Satunin, K.A., *Spalax nehringi* nov. ap., Zool. Anz. XXI, 314-315, 1898.
- [13] Matschie, P., *Spalax labauzei* eine anscheinend noch nicht beschriebene Blindmaus aus Kleinasien. Sitz. Ber. Ges. Nat. Fr. Berlin, 35-38, 1919.
- [14] Hinton, M.A.C., Three new subspecies of *Spalax monticola*. Ann. Mag. Hist. 5: 313-318, 1920.

- [15] Misonne, X., Mammifères de la Turquie sud-orientale et du nord de la Syrie. *Mammalia*, 21: 53-68, 1957.
- [16] Coşkun, Y., A new subspecies of *Spalax nehringi* (Satunin, 1898) (Rodentia; Spalacidae) from Turkey. *Saugetierkd. Mitt*, 38: 103–109, 1996a.
- [17] Coşkun, Y., *Spalax nehringi nevoi*, a new mole rats from southeast Anatolia, Turkey (Rodentia; Spalacidae). *Saugetierkd. Mitt*, 38: 135–142, 1996b.
- [18] Coşkun, Y., A new species of mole rat, *Nannospalax munzuri* sp. n., and karyotype of *Nannospalax tuncelicus* (Coşkun, 1996) (Rodentia: Spalacidae) in eastern Anatolia. *Zoology Middle East*, 33: 153–162, 2004.
- [19] Nehring, A., Über *Dipus schlüteri* n sp. und einige andere Nager aus Palastina. *Sitz. Ber. Nat. Fr., Berlin*, 163-176, 1901.
- [20] Ellerman, J.R. and Morrison–Scott, T.C.S., Checklist of Palearctic and Indian Mammals, 1758-1946. Second edition, British Museum (Natural History), London, 1-810, 1966.
- [21] Corbet, G.B., The Mammals of The Palearctic region; a taxonomic review. *Brit. Mus. Nat. Hist., London / Oxford Univ. Pres*, 1978.
- [22] Harrison, D. L., The Mammals of Arabia. Vol. III, Lagomorpha Rodentia. London, XVII + 382-670, 1972.
- [23] Corbet, G.B. and Hill, J.E., A world list of mammalian species. Third edition. Natural History Museum Publ., London / Oxford Univ. Pres, 1991.
- [24] Mursaloğlu, B., Türkiye *Spalax*'larında (Mammalia: Rodentia) Sistemik Problemler. T.B.T.A.K. VI. Bilim Kongresi, Mat., Fiz. ve Biyo. Bil. Araş. Gr. Biyo. Sek. Teb. 83–92, 1979.
- [25] Gromov, I.M. and Baranova, G.I., Catalogue of Mammals in U.S.S.R. Leningrad; Nauka, pp 455 (In Russian), 1981.
- [26] Kıvanç, E., Türkiye *Spalax*'larının Coğrafik Varyasyonları. Ankara 72, Teksir – Daktilo – Fotokopi. 88 Sayfa, 1988.
- [27] Wilson, D.E. and Reeder, D.M. (eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Third Edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2005.

- [28] Kryštufek, B., Vohralík, V., Mammals of Turkey and Cyprus: Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. Koper, Založba Annales, 2009.
- [29] Mehely, L., Species generis *Spalax*. Die Arten der Blindmause in systematischer und phylogenetischer Beziehung. Mathematische und naturwissenschaftliche Berichte aus Ungarn 28: 1-385, 1913.
- [30] Satunin, K.A., Mlekopitaiushchiia Kavkazskago kraia=Mammalia Caucasica. Publikations Art. Book. Erscheinungsjahr, 1920.
- [31] Sözen, M., A karyological study on subterranean mole rats of the *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 superspecies in Turkey. Zeitschrift für Säugetierkunde, 69: 420-429, 2004.
- [32] Sözen, M., Sevindik, M. and Matur F., Karyological and morphological characteristics of *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Mammalia: Rodentia) superspecies around Kastamonu Province, Turkey. Turkish Journal of Zoology 30: 205-219, 2006.
- [33] Savic, I.R. and Soldatovic, B., Distribution range and evolution of chromosomal forms in the Spalacidae of Balkan Peninsula and bordering regions. J. Biogeography. 6: 363-374, 1979.
- [34] Giagia, E., Savic, I. and Soldatovic, B., Chromosomal forms of the mole rat *Microspalax* from Greece and Turkey. Z. F. Säugetierkunde. 47 (4): 231-236, 1982.
- [35] Yüksel, E., Cytogenetic study in *Spalax* (Rodentia; Spalacidae) from Turkey. Communications, C; Biologie. 2: 1-12, 1984.
- [36] Gülkaç, M. D. ve Yüksel, E., Malatya yöresi körfareleri (Rodentia; Spalacidae) üzerine sitogenetik bir inceleme. Doğa Tü. Biyol. D., 13: 63-71, 1989.
- [37] Nevo, E., Filipucci, M.G., Redi, C.D., Simson, S., Heth, G. and Beiles, A., Karyotype and genetic evolution in speciation of subterranean mole rats of the genus *Spalax* in Turkey. Evol. J. Linn. Soc. 54: 203–229, 1995.
- [38] Ivanitskaya, E., Coşkun, Y. and Nevo, E., Banded karyotypes of mole rats (*Spalax*, Spalacidae, Rodentia) from Turkey: A comparative analysis. J. Zool. Syst. Evol. Research. 35: 171–177, 1997.

- [39] Sözen, M. and Kıvanç, E., Two new karyotypic forms of *Spalax leucodon* (Nordmann, 1840) (Mammalia; Rodentia) from Turkey. *Z. Saugetierk.* 63: 307-310, 1998.
- [40] Coşkun, Y., A study on the morphology and karyology of *Nannospalax nehringi* (Satunin, 1898) (Rodentia: Spalacidae) from northeast Anatolia, Turkey. *Turk. J. Zool.* 27: 171-176, 2003.
- [41] Kankılıç, T., Çolak, R., Kankılıç, T. and Çolak, E., On the Morphology and Karyology of *Spalax leucodon armeniacus* Mehely, 1909, and *Spalax leucodon cilicicus* Mehely, 1909 (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 59 (1): 41-46, 2007a.
- [42] Kankılıç, T., Kankılıç, T., Çolak, R., Çolak, E. and Karataş, A., Karyological comparison of populations of the *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 superspecies (Rodentia: Spalacidae) in Turkey. *Zoology in the Middle East* 42: 15-24, 2007b.
- [43] Kankılıç, T., Çolak, E., Kankılıç, Tol., Macro - Anatomical and Karyological Features of Two Blind Mole Rat Subspecies (Rodentia: Spalacidae) from Turkey. *Anat. Histol. Embryol.*, 38: 145–153, 2009.
- [44] Kankılıç, T., Kankılıç, T., Şeker, P.S., Çolak, R., Selvi, E., Çolak, E., Contributions to the Karyology and Distribution Areas of Cytotypes of *Nannospalax leucodon* (Rodentia: Spalacidae) in Western Anatolia. *Acta Zoologica Bulgarica*, 62 (2): 161-167, 2010.
- [45] Yüksel, E. and Gülkaç, M.D., On the Karyotypes of in some Populations of the Subterranean Mole Rats in the Lower Euphrates Basin, Turkey. *Caryologia*, 45: 175-190, 1992.
- [46] Ivanitskaya, E. and Nevo, E., Cytogenetics of mole rats of the *Spalax ehrenbergi* superspecies from Jordan (Spalacidae, Rodentia). *Z. Saugetierk.* 63: 336-346, 1998.
- [47] Coşkun, Y., Ulutürk, S., Yürümez, G., Chromosomal diversity in mole - rat of the species *Nannospalax ehrenbergi* (Rodentia: Spalacidae) from south Anatolia, Turkey, *Mamm. Biol.*, 71: 244–250, 2006.
- [48] Nevo, E., Ivanitskaya, E. and Beiles, A., Adaptive radiation of blind subterranean mole rats: naming and revisiting the four sibling species of the *Spalax ehrenbergi*

superspecies in Israel: *Spalax galili* (2n= 52), *S. golani* (2n= 54), *S. carmeli* (2n= 58), and *S. judaei* (2n= 60). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 2001.

[49] Nevo, E., Filippucci, M.G., Redi, C., Korol, A. and Beiles, A., Chromosomal speciation and adaptive radiation of mole rats in Asia Minor correlated with increased ecological stress, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 8160-8164, 1994.

[50] Suzuki, H., Wakana, S., Yonekawa, H., Moriwaki, K., Sakurai, S. and Nevo, E., Variations in Ribosomal DNA and Mitochondrial DNA among Chromosomal Species of Subterranean Mole Rats. Mol. Biol. Evol. 13 (1): 85-92, 1996.

[51] Arslan, E., Gülbahçe, E., Arıkoğlu, H., Arslan, A., Buzan, E.V. and Krystufek B., Mitochondrial divergence between three cytotypes of the Anatolian mole rat, *Nannospalax xanthodon* (Nordmann, 1849). Zoology in the Middle East, 50: 27-34, 2010.

[52] Coşkun, Y., Ulutürk, S., Kaya, A., Karyotypes of *Nannospalax* (Palmer 1903) Populations (Rodentia: Spalacidae) from Central Eastern Anatolia, Turkey. Hystrix It. J. Mamm. 21: 89-96, 2010.

[53] Catzeflis, F.M., Nevo, E., Ahlquist, J. and Sibley, C.H., Relationships of the chromosomal species in the Eurasian mole rats of the *Spalax ehrenbergi* group as determined by DNA-DNA hybridization, and an estimate of the spalacidae-murid divergence time. J. Mol. Evol. 29: 223-232, 1989.

[54] Nevo, E., Ben-Shlomo, R. and Maeda, N., Haptoglobin DNA polymorphism in subterranean mole rats of the *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel. Heredity, 62: 85-90, 1989.

[55] Nevo, E., Joh, K., Hori, K. and Beiles, A., Aldolase DNA polymorphism in subterranean mole rats: Genetic differentiation and environmental correlates. Heredity. 65: 307-320, 1990.

[56] Nevo, E., Beiles, A. and Spradling, T.H., Molecular evolution of cytochrome b of mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel. J. Mol. Evol. 49: 215-226, 1999.

[57] Ben-Shlomo, R., Fahima, T. and Nevo, E., Random amplified polymorphic DNA of the *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel. Israel Journal of Zoology. 42: 317-326, 1996.

- [58] Nevo, E., Honeycutt, R.L., Yonekawa, H., et al., Mitochondrial DNA polymorphism in subterranean mole-rats of the *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel, and its peripheral isolates, *Mol. Biol. Evol.*, 10: 590–604, 2003.
- [59] Reyes, A., Nevo, E. and Saccone, C., DNA sequence variation in the mitochondrial control region of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Israel, *Molecular Biology and Evolution* 20: 622–632, 2003.
- [60] Ford, C.E. and Hamerton, J.L., A colchicine hypotonic citrate, squash for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 31: 247-251, 1956.
- [61] MacHugh, D.E., Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Ph.D. thesis, University of Dublin, 274 p., Dublin/Irlanda, 1996.
- [62] Hames, B.D. and Rickwood, D., *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach*. 2nd Ed. Oxford University Press, 383 p., New York, 1990.
- [63] Arber, W., Restriction endonucleases. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 17: 73-79, 1978.
- [64] Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M., *An introduction to genetic analysis*. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, p. 916, New York, 1996.
- [65] Bardakç1, F., Yenidünya, A.F., Yılmaz, N., *Gen Klonlama ve DNA Analizi Giriş (Çeviri Kitap)* Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti. Sertifika no: 13143, 2009.
- [66] Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331, 1980.
- [67] Hall, H.G., PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honeybees. *Biochemical Genetics*, 36: 351-361, 1998.
- [68] Vicente, M.C. and Fulton, T., *Molecular marker learning modules-Vol 1. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity*. International Plant Genetic Resources Institute Publications. CD-Rom, 2004.
- [69] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15, 1991.

- [70] Kaya, Z. and Neale, D.B., Linkage Map Based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in *Pinus brutia*. *Silvae Genetica*, 44: 110-116, 1995.
- [71] Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T., Popgene Version 1.31 Microsoft windows-based software for population genetics analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada, 1999.
- [72] Nei, M., *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Uni. Press, New York, 1987.
- [73] Kimura, M. and Crow, J.M., Effect of Overall Phenotypic Selection On Genetic Change At Individual Loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington. 75: 6168-6171, 1978.
- [74] Lewontin, R.C. and Hubby, J.L., A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 54: 595-609, 1966.
- [75] Peakall, R. and Smouse, P.E., GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 6: 288–295, 2006.
- [76] Nei, M., *Molecular population genetics and evolution*, Amsterdam (North Holland Publ. Com.), 1978.
- [77] Kandemir, I., Sözen, M., Matur, M., Kankılıç, T., Martinkova, N., Çolak, F., Ozkurt, Ş., Çolak, E., Phylogeny of species and cytotypes of mole rats (Spalacidae) in Turkey inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Folia Zoologica*, 61 (1): 25-33, 2012.
- [78] Wahlund, S., Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11: 65-106, 1928.
- [79] Zima, J., Chromosomal Evolution in small mammals (Insectivora, Chiroptera, Rodentia). *Hystrix*, 11 (2), 5-15, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

Sivas'ın Zara ilçesinde 1976 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Zara'da tamamladı. 1993'de Hacettepe üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalında öğrenimine başladı. 1998'de mezun oldu. Aynı yıl Sivas'ın Zara İlçesinde Reşit Akif Paşa İlköğretim Okulunda Fen Bilgisi Öğretmeni olarak atandı. 1999 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Daha sonra 2011'de 6111 sayılı yasa gereği Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisan öğrenimine devam etti. Halen Niğde Koyunlu Kasabası Namık Kemal İlköğretim Okulunda Fen ve Teknoloji öğretmenliği yapmaktadır.