A. REŞADİ, 2014

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

ANADOLU KÖRFARE POPULASYONLARININ (RODENTIA: SPALACIDAE) NÜKLEER GEN BETA- FİBRİNOJEN (BFIBR) VE MİTOKONDRİYAL DNA GEN SİTOKROM B İLE GENETİK VARYASYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

ARZU REŞADİ

Şubat, 2014

T.C
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANADOLU KÖRFARE POPULASYONLARININ (RODENTIA: SPALACIDAE) NÜKLEER GEN BETA- FİBRİNOJEN (BFIBR) VE MİTOKONDRİYAL DNA GEN SİTOKROM B İLE GENETİK VARYASYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

ARZU REŞADİ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ

Şubat, 2014

Arzu REŞADİ tarafından **Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ** danışmanlığında hazırlanan "**Anadolu Körfare Populasyonlarının (Rodentia: Spalacidae) nükleer gen beta- fibrinojen (BFIBR) ve mitokondriyal DNA gen sitokrom b ile genetik varyasyon düzeylerinin belirlenmesi**" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Nahit PAMUKOĞLU, Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fulya SAYGILI, Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

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

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından …./…./2014 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun …./…./2014 tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../2014

Doç. Dr. Osman SİVRİKAYA

MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Arzu REŞADİ

ÖZET

ANADOLU KÖRFARE POPULASYONLARININ (RODENTIA: SPALACIDAE) NÜKLEER GEN BETA- FİBRİNOJEN (BFIBR) VE MİTOKONDRİYAL DNA GEN SİTOKROM B İLE GENETİK VARYASYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

REŞADİ, Arzu

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman :Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ

Şubat, 2014, 86 sayfa

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de yayılış gösteren *N.leucodon, N.ehrenbergi* ve *N.xanthodon* türleri arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkları ortaya koymak için mitokondriyal DNA sitokrom b gen bölgesi ve nükleer DNA BFIB intron 7 gen bölgesinin DNA sekans analizi yapılmıştır.

Türkiye'den 98 ve Genbank'tan alınan 60 örnek ile toplamda iki cinse ait (*Spalax* ve *Nannospalax*), 158 körfare örneğin filogenetik analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak, *Spalax* ve *Nannosplax* cinslerinin birbirinlerinden ayrıldığı gözlenmiştir.

Ayrıca, bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, Türkiye'de yayılış gösterdiği bilinen üç tür dışında allopatrik dağılışa sahip başka türlerin olduğu da belirlenmiştir. Buna göre, *N.cilicicus, N.leucodon, N.ehrenbergi, N.xanthodon, N.nehringi* ve *N.captorum* olmak üzere en az 6 tür olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler:N.cilicicus, N.leucodon, N.ehrenbergi, N.xanthodon, N.nehringi, N.captorum, Mitokondriyal DNA, sitokrom b, nükleer DNA, beta fibrinojen

SUMMARY

DETERMINING THE LEVELS OF GENETIC VARIATION INFERRED FROM NUCLEAR GENE BETA- FIBRINOGEN (BFIBR) AND MITOCHONDRIAL DNA GENE CYTOCHROME B IN ANATOLIAN SUBTERRANEAN MOLE RATS (RODENTIA: SPALACIDAE)

REŞADİ, Arzu

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor :Asistant Professor Dr. Teoman KANKILIÇ

Şubat 2014, 86 pages

In the M.sC thesis, genetic differentiations and similarities between *N.leucodon, N.ehrenbergi, N.xanthodon* were determined by DNA sequence analysis using mitochondrial DNA cytochrome b gene region and nuclear DNA beta fibrinogene intron 7 gene region.

With 98 samples that are taken from Turkey and 60 samples from Genbank, in total 158 blind Mole Rat samples of two genera which are *Spalax* and *Nannosplax* have been anaysed filogenetically. As a result, *Spalax* and *Nannospalax* have been impliticly observed as seperate genera.

Furthermore according to the results of the thesis, it has been found that are also species that have allopatric distribution except well-known three species in Turkey. Accordingly, there are at least 6 species which are called *N.cilicicus, N.leucodon, N.ehrenbergi, N.xanthodon, N.nehringi* ve *N.captorum.*

*Keywords:N.cilicicus, N.leucodon, N.ehrenbergi, N.xanthodon, N.nehringi, N.captorum,*Mitochondrial DNA, cytochrome b, nuclear DNA, beta fibrinogen

ÖN SÖZ

Bu çalışmada, *Nannospalax* cinsine ait Türkiye örneklerinde nükleer genlerden beta fibrinojen intron 7 bölgesi ve mitokondiyal DNA'nın sitokrom b bölgesi çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarla paket programlar kullanılarak analizler yapılmış ve aynı primerlerle farklı bölgelerden çalışılmış *Nannospalax*'a ait diziler Genbank'tan alınarak Maximum Likelihood ve Neighbor Joining ağaçları çizilmiş ve karşılaştırmalı sonuçlara yer verilmiştir.

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde, planlanıp yürütülmesinde destek, ilgi ve teşviklerini esirgemeyen, benim için adeta bir yol gösterici olan danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ'a en içten duygularla teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük emeği olan, bana laboratuarında çalışma fırsatı veren, her türlü destek ve imkânı sunan Belçika Liege Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Johan MICHAUX'a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarıma katkılarından dolayı ve tez çalışmam için gerekli birçok istatistiksel programı öğrenmeme yardımcı olan Dr. Alice LATINNE'ye, ayrıca laboratuarda karşılaştığım sorunlar karşısında bana daima yardımcı olan Nathalie SMITHZ, François GILLERT, Alice MOUTON ve Laurent GOHY'e sonsuz teşekkürler.

Tezimin daha kapsamlı hale gelmesi için isteğime yanıt ve bana değer vererek çalışmış oldukları 13 adet Spalax cinsine ait sitokrom b gen bölgesi dizilerini yolladıkları için sayın Prof. Dr. Gabor CSORBA ve ekibine teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam esnasında analiz programları ile ilgili eksiklerimin kapanmasında yardımlarını gördüğüm Aksaray Üniversitesi'nden Doç. Dr. Tolga KANKILIÇ'a, ayrıca çalışılan canlı ile ilgili fotoğraflarını paylaşmama izin veren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ahmet KARATAŞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince varlıklarıyla maddi- manevi yanımda olan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Cemil İŞLEK ile bir abla gibi daima bana destek olan Ar. Gör. Yasemin MERİÇ İŞLEK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımız süresince birlikte yol katettiğimiz arkadaşım H. Didem ÇELİKBİLEK'e, Arif Can ERDİK ve Burcu AYDIN'a; dostluklarıyla her zaman yanımda olan Yeşim GÜÇLÜ BİLGİÇ, Nebahat ESER, Ebru TUNCER, Seda IŞIK, Tuncer KAYIKÇI ile Hasan UZUN'a ve yurt dışında kaldığım süre boyunca daima yardımını gördüğüm sevgili arkadaşım Burcuhan ŞENER'e teşekkür ederim.

Özellikle bana karşı hoşgörüleri, sınırsız sevgileri ve her an verdikleri moral için kardeşlerim Aslı REŞADİ ve Yunus Emre REŞADİ'ye gönülden teşekkürler.

Son olarak benim bu günlere gelmemi sağlayan, emeklerini ödeyemeyeceğim, maddi-manevi destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen biricik annem Gönül REŞADİ ve babam Cengiz REŞADİ'ye minnettarım.

Bu tez çalışması, **112 T 606** numaralı "DNA'da SSR (Mikrosatellit) Analiz Yöntemiyle Körfare (*Nannospalax nehringi*) Populasyonlarının Genetik Yapısının Araştırılması" isimli Tübitak Hızlı Destek Projesi, **FEB 2013/01** numaralı "Türkiye körfarelerine ait kromozomal soyların evrimsel ilişkileri ve taksonomik pozisyonlarının mitokondriyal 12S ribozomal RNA sekans analizi ile araştırılması" isimli ve **FEB 2013/03** numaralı "Anadolu Körfare Populasyonlarının (Rodentia: Spalacidae) nükleer gen beta-fibrinojen (BFIBR) ve mitokondriyal DNA gen sitokrom b ile genetik varyasyon düzeylerinin belirlenmesi" isimli BAP projelerinden üretilmiş olup, projelere destek sağlayan TÜBİTAK ve Niğde Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Arzu REŞADİ

Şubat, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
SUMMARY v
ÖN SÖZ vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ xv
SİMGE VE KISALTMALAR xvi
BÖLÜM I GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 3
BÖLÜM II KURAMSAL TEMELLER 10
2.1 Ordo: Rodentia (Mammalia) 10
2.2 Familya: SpalacidaecGray, 1921 10
2.3 *Spalax* Güldensteadt, 1770 14
2.4 Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Nükleer DNA (nDNA) 15
2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 17
2.6 Filogenetik Analizler 20
BÖLÜM III MATERYAL ve METOT 22
3.1 Materyal 22
3.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar 28
3.3 Örneklerin Mitokondriyal DNA İzolasyonu 28
3.4 Nanodrop İle DNA Miktarının Belirlenmesi 30
3.5 Genomik DNA, mtDNA ve Kullanılan Primerler 31
3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonu 31
3.7 PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü 32
3.8 Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi 34
3.8.1 Sekansların Eldesi 34
3.8.2 Sekansların Okunması ve Dizi Analizi 34
3.8.3 Haplotip Çeşitliliği ve Nükleotid Çeşitliliği Hesaplama 35
3.8.4 Network Analizi 35
3.8.5 Mitokondriyal DNA Haplotiplerinin Filogenetik Analizleri 36

BÖLÜM IV BULGULAR 37
4.1 MtDNA Sitokrom b Bölgesi İçin Yapılan Analiz Sonuçları 37
4.1.1 Sitokromb gen bölgesi sekans analizi sonuçlarına göre belirlenen haplotipler 38
4.1.2 Sitokromb gen bölgesi için genetik çeşitlilik analiz sonuçları 42
4.1.3 Sitokrom b için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi 42
4.1.4 Sitokrom b için Neighbor Joining (NJ) analiz sonuçları 44
4.1.5 Sitokrom b için Maximum Likelihood (ML) analiz sonuçları 45
4.1.6 Sitokrom b gen bölgesine ait network analizi sonuçları 49
4.2 Nükleer Gen Beta Fibrinojen İntron 7 Gen Bölgesi İçin Yapılan Analiz Sonuçları 50
4.2.1 Nükleer Gen Beta Fibrinojen gen bölgesi sekans analizi sonuçlarına göre belirlenen haplotipler 50
4.2.2 Nükleer Gen Beta Fibrinojen gen bölgesi için genetik çeşitlilik analiz sonuçları 51
4.2.3 Nükleer Gen Beta Fibrinojen için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi 54
4.2.4 Nükleer Gen Beta Fibrinojen için Neighbor Joining (NJ) analiz sonuçları 55
4.2.5 Nükleer Gen Beta Fibrinojen için Maximum Likelihood (ML) analiz sonuçları 55
4.2.6 Nükleer Gen Beta Fibrinojen gen bölgesine ait network analizi sonuçları 57
4.3 Nükleer Gen Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b Gen Bölgesi İçin Yapılan Ortak Analiz Sonuçları 59
4.3.1 Nükleer Gen Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b ortak gen bölgesi sekans analizi sonuçlarına göre belirlenen haplotipler 59
4.3.2 Nükleer Gen Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgesi için genetik çeşitlilik analiz sonuçları 59
4.3.3 Nükleer Gen Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b ortak gen bölgesi için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi 63
4.3.4 Nükleer Gen Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b için Neighbor Joining (NJ) analiz sonuçları 64

4.3.5 Nükleer Gen Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b için Maximum Likelihood (ML) analiz sonuçları 65
4.3.6 Nükleer Gen Beta Fibrinojen gen bölgesine ait network analizi sonuçları 68
BÖLÜM V TARTIŞMA ve SONUÇ 69
5.1 Tür Seviyesinde Taksonomi ve Genetik İlişkiler 69
5.2 Alttür ve Sitotip Seviyesinde Taksonomi ve Genetik İlişkiler 73
KAYNAKLAR 77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye'den tanımlanan ve kaydı verilen körfare tür ve alttürleri ve karyotip sonuçları 6
Çizelge 3.1. Filogenetik analizlerde kullanılan dış gruplara ait bilgiler 22
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan *Nannospalax* cinsi körfare örneklerine ait bilgiler (▲: Çalışmada kullanılan GenBank örnekleri; TR: Türkiye; H: Macaristan; SRB: Sırbistan; MK: Makedonya; BIH: Bosna-Hersek; UA: Ukrayna; IL: İsrail; ET: Mısır; ROM: Romanya). 23
Çizelge 3.3. Bazı örneklere ait nanodrop ölçüm sonucu elde edilen DNA miktarları. 30
Çizelge 3.4. Çalışılan primerlerin baz dizileri ve çalışılan gen bölgeleri. 31
Çizelge 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışımı. 32
Çizelge 4.1.. Sitokrom b gen bölgesi nükleotidler arasındaki transisyon/ transversiyon değişim oranları (koyu yazılan değerler transisyon değişim oranlarını ifade eder, italik yazılan değerler ise transversiyon oranlarını göstermektedir). 37
Çizelge 4.2. Sitokrom b sonuçlarına göre elde edilen haplotipleri gösteren liste 38
Çizelge 4.3. Sitokrom b gen bölgesi için çalışılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsi örneklerin genetik çeşitlilik değerleri 43
Çizelge 4.4. Sitokrom b için yapılacak analizlerde kullanılması hesaplanan model test sonucu 44
Çizelge 4.5. Beta fibrinojen gen bölgesi nükleotidler arasındaki transisyon/ transversiyon değişim oranları (koyu yazılan değerler transisyon değişim oranlarını ifade eder, italik yazılan değerler ise transversiyon oranlarını göstermektedir). 51
Çizelge 4.6. Nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi sekans analizi sonuçlarına göre belirlenen haplotipleri gösteren liste 52
Çizelge 4.7. Nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi için çalışılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsi örneklerin genetik çeşitlilik değerleri 53
Çizelge 4.8. Nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi 54
Çizelge 4.9. Beta fibrinojen ve sitokrom b ortak sekansları için haplotip listesi 60

Çizelge 4.10. Beta fibrinojen ve sitokrom b ortak sekansları için çalışılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsi örneklerin genetik çeşitlilik değerleri 62
Çizelge 4.11. Beta fibrinojen ve sitokrom b gen bölgesi için filogenetik analizlerde kullanılması hesaplanan model test sonuçları 63
Çizelge 5.1. Sitokrom b gen bölgesine ait türler arasında hesaplanan Kimura-2-Parametresi mesafe matriksi (Bold) ve standart hataları (italik)..... 72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hayvan mitokondriyal DNA'sının genel görünümü 15
Şekil 2.2. Bir PCR döngüsü .....
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan *Nannospalax* cinsi körfare örneklerinin alındığı bölgeler ve çalışmada kullanılan Genbank dizilerinin alındığı bölgeleri gösteren harita..... 27
Şekil 4.1. Sitokrom b gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan neighbour joning (NJ) filogenetik ağacı. 47
Şekil 4.2. Sitokrom b gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan maximum likelihood (ML) filogenetik ağacı 48
Şekil 4.3. Sitokrom b gen bölgesine ait network analizi sonuçları..... 50
Şekil 4.4. Nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi sekans analizi sonuçları ile oluşturulan neighbour joning (NJ) filogenetik ağacı 56
Şekil 4.5. Nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi sekans analizi sonuçları ile oluşturulan maximum likelihood (ML) filogenetik ağacı 57
Şekil 4.6. Nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesine ait network analizi sonuçları..... 58
Şekil 4.7. Nükleer gen beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan neighbour joning (NJ) filogenetik ağacı 66
Şekil 4.8. Nükleer gen beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan maximum likelihood (ML) filogenetik ağacı .. 67
Şekil 4.9. mitokondriyal sitokrom b ve nükleer beta fibrinojen gen bölgelerine ait network analiz sonuçları 68
Şekil 5.1. Türkiye'deki körfare türlerinin coğrafik yayılışı..... 73

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 2.1. Anadolu körfaresi (*Nannospalax nehringi*) 12
Fotoğraf 2.2. Filistin körfaresi (*Nannospalax ehrenbergi*) 12
Fotoğraf 2.3. Beyazdişli körfare (*Nannospalax leucodon*) 13
Fotoğraf 2.4. Bir körfarenin yaşadığı doğal ortamında toprak yüzeyinde oluşturduğu çıkıntılar..... 14
Fotoğraf 3.1. Çalışmada kullanılan PCR cihazı..... 32
Fotoğraf 3.2. Çalışmalar esnasında çekilen bir örnek jel resmi..... 33
Fotoğraf 3.3. Çalışmaların bir kısmının yapıldığı Evrimsel Biyoloji laboratuarının genel görüntüsü 34
Fotoğraf 3.4. Align edilmiş ve alt alta dizilmiş haldeki örneklere ait consensus dizileri35

SİMGE VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	**Açıklama**
µl	Mikrolitre
2n	Diploit kromozom
A	Adenin
bç/ bp	Baz çifti
BIH	Bosna Hersek
C	Sitozin
C: IAA	Kloroform izoamil alkol
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
cyt b	Sitokrom b
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
ET	Mısır
EtBr	Etidyum Bromür
G	Guanin
G+I	Gamma Invariant
H	Haplotip Çeşitliliği
H	Macaristan

IL	Israil
k_1	Pürinler için Transisyon / Transversiyon Oranı
k_2	Pirimidinler için Transisyon / Transversiyon Oranı
kb	Kilo Baz
Lok	Lokalite
MgCl	Magnezyum Klorür
MK	Makedonya
ML	Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood)
MP	Maksimum Parsimoni
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
nDNA	Nükleer DNA
NaCl	Sodyum Klorür
NJ	Neighbour Joining
nmol	Nano Mol
PCR=PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Toplam Transisyon / Transversiyon Oranı
RAPDs	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriction Fragment of Length Polymorphism

Rmp	Devir sayısı (santrifüj cihazı)
Rom	Romanya
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SRB	Sırbistan
T	Timin
TR	Türkiye
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
U	Urasil
UK	Ukrayna

Simge	**Açıklama**
%	Yüzde
^{o}C	Santigrat derece
♀	Dişi birey
♂	Erkek birey
π	Nükleotid çeşitliliği

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Türkiye, coğrafi konumu ve kısa mesafelerde değişen jeomorfolojik özellikleri nedeniyle bünyesinde çok farklı iklim tiplerini barındırmaktadır. Bu nedenle de çok çeşitli bitki örtüsü ve hayvan topluluklarına ev sahipliği yapmaktadır. Ayrıca Anadolu Kuvaterner'in Pleistosen devrinin glasiyal dönemlerinde kuzeyden gelen canlılara, interglasiyal dönemlerinde güneyden gelen canlılara sığınak görevi üslenmesi bu çeşitliliği olumlu yönde etkilemiştir. Anadolu'nun kendi faunasının yanı sıra, kuzeyden ve güneyden gelerek Anadolu'ya farklı zamanlarda sığınan türlerin zaman içinde ve farklı iklim ve ekolojik şartlardaki ortamlara farklılaşarak uyum sağlamaları nedeniyle, Anadolu toprakları küçük bir alana sahip olsa da, biyolojik çeşitlilik açısından kıta özelliği gösterecek seviyede zenginliğe sahiptir (Gür, 2013). Anadolu'nun değişken iklimsel ve topoğrafik özelliklerine ve yakın mesafelerde değişen ekolojik koşullarına çok iyi adaptasyon sağlayıp, yaygın yayılış gösteren ve bu nedenle tür/alttür çeşitliliği yüksek olan canlılardan biri körfarelerdir. Körfareler Anadolu'nun hemen her yerinde toprak altında açtıkları galerilerde yaşamlarını sürdüren ve nadiren toprak üstüne çıkan canlılardır. Toprak üstüne çıkmadıkları için toprak altına uzanan yumru köklü bitkilerin (Patates, Soğan, Sarımsak, Havuç, Şeker pancarı vb.) kökleri ile beslenirler ve bu nedenle tarım zararlısı olarak bilinirler.

Körfareler günümüzde *Nannospalax* ve *Spalax* olmak üzere iki cins altında sınıflandırılmaktadır. Ülkemiz körfareleri *Nannospalax* cinsi altında sınıflandırılır. Bu cinsin temsilcileri Avrupa, Türkiye, Ermenistan, Suriye, Filistin, Irak, İsrail, Ürdün ve Mısır'da yayılış gösterirken, *Spalax* cinsi temsilcileri Kafkasya, Transkafkasya, Ukrayna, Romanya'da yayılış göstermektedir (Wilson ve Reeder, 2005). *Nannospalax* temsilcilerinde görülen biyolojik çeşitliliğin neredeyse % 60 kadarı Anadolu körfarelerinde bulunmaktadır (Kryštufek ve Vohralík, 2009). Anadolu körfarelerinde görülen bu çeşitliliğin en önemli nedenlerinden biri, bu canlıların sürekli toprak altında kalmaları ve hareket yeteneklerinin sınırlı olması ve bu nedenle yakın mesafelerdeki populasyonlar arasında bile gen alışverişinin düşük olmasıdır (Savic ve Nevo, 1990).

Körfarelerin taksonomisi bütün taksonomik seviyelerde karmaşık ve problemlidir. Özellikle Anadolu körfarelerinin tür ve alttür durumları belirsizdir. Bu belirsizliğe neden olan iki önemli etken vardır. Bu etkenlerden birincisi bu hayvanların morfolojik olarak birbirlerine çok benzemeleri (sibling tür) ve körfare populasyonlarını morfolojiye dayanarak sınıflandırmanın çok zor olmasıdır. Bu nedenle bu zamana kadar Anadolu körfareleri için pek çok tür ve alttür tanımlanmış, fakat günümüzde bunların büyük kısmı sinonim durumuna

düşmüştür. İkinci önemli etken körfarelerin diploid kromozom sayıları (2n) farklı çok sayıda populasyon içermesi (sitotip) ve farklı diploid kromozom sayısına sahip olan populasyonların büyük çoğunluğunun tür ve/veya alttür seviyesinde genetik farklılığa sahip olmalarıdır (Kryštufek ve Vohralík, 2009).

Türkiye günümüzde üç körfare türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu türlerden *N. leucodon* sadece Trakya'da, *N. ehrenbergi* Güneydoğu Anadolu'da ve *N. xanthodon* ise Güneydoğu Anadolu bölgesi haricinde tüm Anadolu'da yayılış göstermektedir (Kryštufek ve Vohralík, 2009). Fakat bu türler Türkiye körfare populasyonlarını tam anlamıyla temsil etmemektedir (Nevo vd., 1994, Kankılıç vd., 2014a, b). Özellikle *N. xanthodon* türü için bu zamana kadar diploid kromozom sayıları birbirinden farklı 12 sitotip (2n= 36, 38, 40, 44, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62) tanımlanmıştır. Mevcut sitotiplerin tamamı için olmasa da büyük çoğunluğu arasındaki genetik ilişkiler araştırılmış ve sitotiplerin ayrı türler olarak değerlendirilmesinin gerekliliği bu çalışmalarda vurgulanmıştır (Nevo vd., 1995; Kandemir vd., 2012; Arslan vd., 2010; Kankılıç vd., 2013, 2014a). Anadolu'daki diğer türlere ait sitotipler de dikkate alındığında Türkiye körfare tür sayısının 20'ye ulaşacağı düşünülmektedir (Nevo vd., 1994).

Anadolu körfareleri için tanımlanmış olan 2n= 36, 2n= 38, 2n= 40, 2n= 44 populasyonları endemik sitotiplerdir. Bu sitotipler gerçekten tür seviyesinde farklılığa sahiplerse, Anadolu'ya endemik türler olacaklardır. Tür dağılımının ve bunların taksonomik durumlarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi herhangi bir coğrafik alandaki biyolojik çeşitliliğin ele alınmasında temel bir ihtiyaçtır. Bu durum biyoçeşitlilik yönetimi ve koruma planlaması çalışmalarına başlamada en temel gereksinimdir. Bu nedenle tez çalışmasında, Türkiye'de 59 lokaliteden toplanan farklı diploid kromozom sayılarına sahip 98 körfare örneğinde, mitokondriyal DNA'nın filogenetik çalışmalarda en sık kullanılan gen bölgesi olan sitokrom b lokusu ve daha önce hiç çalışılmamış olan nükleer genlerden beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi çalışılmıştır. Kapsamlı bir çalışma olması amaçlanarak Genbank'tan alınan farklı ülkelere ait 60 körfare örneği de çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma ile Türkiye için tanımlanmış körfare tür ve alttürlerinin taksonomik durumlarının belirlenmesi, bu türler için tanımlanan sitotipler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkların araştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca Genbank'tan temin edilen farklı ülkelere ait sekanslar kullanılarak körfarelerin filogenisi ve evrimsel geçmişini, farklı programlar vasıtasıyla yapılan genetik analizlerle ve filogenetik ağaçlar ile aydınlatmak amaçlanmaktadır.

1.1 **Literatür Özeti**

Körfareler morfolojik açıdan birbirlerine oldukça benzer bireyleri içeren populasyonlardan oluşmaktadır. Bu nedenle körfareler kemiriciler içinde crytik sibling-tür kompleksine iyi bir örnek teşkil etmektedirler. Fakat, Anadolu körfare populasyonları için bu zamana kadar yapılmış olan yeni takson tanımlarının hepsi morfoloji temellidir. Geçmişten günümüze farklı araştırıcılar tarafından Anadolu'nun farklı lokalitelerinden körfareler için yeni tür ve alttürler tanımlanmıştır. Daha sonra başka araştırıcılar Anadolu'nun farklı bölgelerinden körfareler için farklı tür ve alttür tanımları yapmış ve yeni tanımlanan türler sinonim durumuna düşmüştür. Son otuz yıllık peryotta körfareler için yeni tür tanımları yapılmaya devam edilirken, bir yandan da eskiden tanımlanmış olan türlerin taksonomik durumları sorgulanarak körfare sinonim tür envanteri genişletilmiştir.

İlk körfare türü Nordmann (1840) tarafından Rusya (Odessa)'dan *Spalax leucodon* adıyla tanımlanmıştır. Türkiye'den ise Nordmann (1840) tarafından İzmir'den *Spalax typhlus xanthodon* alttürü tanımlanmıştır. Daha sonra Nehring (1898) tarafından Bosna'dan *Spalax monticola* türü tanımlanmıştır. *S. monticola* tanımlandıktan sonra, Mehely (1909) tarafından *Spalax monticola anatolicus* adı ile bir alttür İzmir (Bornova)'dan tanımlanmıştır. Bu alttürü tanımlarken Mehely (1909) *S. typhlus xanthodon*'dan hiç bahsetmemiştir. Mehely (1909) çalışmasından tam 100 sene sonra Kryštufek ve Vohralík (2009) tarafından bu alttür tekrar gündeme alınmış ve bu türün Güney Doğu Anadolu hariç tüm Anadolu'da hakim tür olduğu kabul edilmiştir. Ognev (1947) *S. leucodon* ile *S. monticola*'nın sinonim olduğunu ve öncelik kuralı nedeniyle *S. leucodon* adının kullanılması gerektiğini ileri sürmüştür.

Türkiye'den bir diğer tür Satunin (1898) tarafından Iğdır'ın Gaziler nahiyesi sınırları içindeki Kaskoparan Köyü'nden sağlanan 4 örnek için *Spalax nehringi* adı altında tanımlanmıştır. Satunin *Spalax nehringi*'yi tanımlarken örneklerden birini tip örneği olarak seçmemiştir. Daha sonra Ognev (1947) bu dört örnekten birini tip olarak seçerek karşılaştırmalarını bu örnek üzerine yapmıştır. Mehely (1909) bu türü *Spalax monticola nehringi* alttürü adı altında sınıflamıştır. Mehely (1909) ayrıca Ardahan (Göle)'den *Spalax monticola armeniacus* alttürünü tanımlamıştır.

Nehring (1898) tarafından İsrail (Yafa)'dan *Spalax ehrenbergi*, İskenderun (Çengen Köy)'dan *Spalax intermedius*, Kırgız Stepleri (eski Astragon vilayeti, Şu anki Kazakistanın Batısı)'nden *Spalax kirgisorum* ve Mısır'dan *Spalax aegyptiacus* türlerini tanımlamıştır. Nehring (1898) *Spalax kirgisorum* türünü tanımlarken tek bir örnek kullanmıştır. Sonra Mehely (1909) Kırgızistan'dan aldığı topotip örnekleri ile Nehring (1898) tarafından *Spalax kirgisorum*'un holotipi için verilen özellikler karşılaştırmış ve bu holotipe benzeyen hiçbir örnek

belirlememiştir. Bunun üzerine Mehely (1909), Nehring (1898) tarafından Kırgız Steplerinden tanımlanan türün tip lokalitesinin doğru olmadığını, gerçek tip lokalitesinin günümüz Kuzey Suriye olması gerektiğini ileri sürmüş, Nehring (1898) tarafından tanımlanan bu dört türün birbirlerinin sinonimi olduğunu belirterek öncelik kuralı nedeniyle hepsini *Spalax ehrenbergi* türü altında sınıflandırmıştır. Ayrıca, Szunyoghy (1941) tarafından Adana (Ceyhan)'dan alınan örnekler *Spalax ehrenbergi* var. *ceyhanus* olarak değerlendirilmiştir.

Mehely (1909) İstanbul (Bakırköy)'den *Spalax monticola turcicus* adı ile bir alttür tanımlamıştır. Fakat, Savic ve Soldatovic (1984) Trakya körfare örneklerini *Spalax turcicus* tür adı altında sınıflandırmıştır.

Mehely (1909) Niğde (Madenköy)'den aldığı örnekleri *Spalax monticola cilicicus* olarak, Matschie (1919) Eskişehir'deki körfareleri *Spalax labaumei* olarak, Hinton (1920) Kütahya örneklerini *Spalax monticola corybantium* ve Çankırı'dan elde edilen örnekleri *Spalax monticola captorum* olarak sınıflandırmıştır. Ayrıca Szunyoghy (1941) Malatya örneklerini *Spalax vasvárii* adı altında kullanmıştır.

Yakın geçmişte ise Coşkun (1996a) tarafından Tunceli (Gömemiş)'den *Nannospalax tuncelicus*, Coşkun (1996b) tarafından Gaziantep (Sarıgüllük)'ten *Nannospalax nehringi nevoi* ve Coşkun (2004) tarafından Tunceli (Ovacık)'den *Nannospalax munzuri* türleri tanımlanmıştır.

Cins seviyesinde Topachevskii (1969)'nin körfare sınıflandırması kabul görmektedir. Fakat, Topachevskii (1969) çalışmasında Türkiye körfarelerini *Microspalax* cins ismi altında sınıflandırılmıştır. Gromov ve Baranova (1981), homonimlikten dolayı *Microspalax* cins ismi yerine *Nannospalax* cins ismini kullandığı için, Türkiye körfareleri günümüzde *Nannospalax* Palmer, 1903 cinsi altında sınıflandırılmaktadır.

Kıvanç (1988) tarafından geniş örneklem kullanılarak yapılan çalışmada, Türkiye körfareleri iki tür (*Spalax leucodon* ve *Spalax ehrenbergi*) ve bu türlere ait 7 alttür (*S. l. nehringi*, *S. l. armeniacus, S. l. anatolicus, S.l. turcicus, S.l. cilicicus, S. e. intermedius* ve *S. e. kirgisorum*) altında sınıflandırılmıştır. Kıvanç (1988)'e göre *S. ehrenbergi* Mersin, Adana ve Hatay'dan başlayarak Hakkari'ye kadar, Torosların güneyindeki Güney Doğu Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir. *S. leucodon* türü ise *S. ehrenbergi*'nin haricinde Türkiye'nin geri kalan bölgelerinde yayılış göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda Anadolu ve Trakya'dan tanımlanan türler *S. leucodon* türünün sinonimi olarak kabul edilmiştir.

Wilson ve Reeder (2005), Türkiye'de *S. ehrenbergi, S. nehringi* ve *S. leucodon* olmak üzere 3 körfare türünün bulunduğunu belirtmişlerdir. Araştırıcılar bu türlerden *Spalax ehrenbergi*'nin Güneydoğu Anadolu, Irak, Lübnan, Suriye, İsrail, Ürdün, Libya, Güney Afrika ve Mısır'da; *Spalax leucodon*'un Balkanlar, Bulgaristan, Romanya, Yunanistan ve Türkiye'de Trakya'da; *Spalax nehringi*'nin ise Trakya, Bozcaada, Gökçeada, Güneydoğu Anadolu hariç tüm Türkiye'de yayılış gösterdiğini belirtmişlerdir. Kıvanç (1988) çalışmasındakinin aksine, Wilson ve Reeder (2005) *S. leucodon* türünün sadece Trakya'da bulunduğunu ve Anadolu'da geniş yayılışa sahip olan türün *S. nehringi* olduğunu söylemiştir.

Gromov ve Baranova (1981) ile Corbet ve Hill (1991) çalışmalarında ise Spalacidae familyası *Spalax* ve *Nannospalax* olarak iki cins içerisinde değerlendirilmiştir. Türkiye körfareleri *Nannospalax* cins ismi altında sınıflandırılmış ve Türkiye'de *N. ehrenbergi, N. nehringi* ve *N. leucodon* olmak üzere üç körfare türünün olduğu ifade edilmiştir.

Kryštufek ve Vohralík (2009), Türkiye ve Kıbrıs memelileri üzerine yaptıkları çalışmada, Gromov ve Baranova (1981) ile Corbet ve Hill (1991) tarafından yapılan çalışmalara uygun olarak Türkiye körfareleri *Nannospalax* cinsi altında sınıflandırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak Kryštufek ve Vohralík (2009), Türkiye'de *N. xanthodon* (*N. nehringi*'nin sinonimi), *N. leucodon* (Trakya-Marmara), *N. ehrenbergi* (Güneydoğu Anadolu) türlerinin bulunduğunu, diğer isimlerin bunların sinonimleri olduğunu belirtmişlerdir.

Türkiye körfareleri üzerine yapılan morfoloji temelli yukarıda özetlenen çalışmalar birbirleri ile uyuşmayan sonuçlar içermektedir. Özellikle Türkiye'de hangi tür ve alttürlerin olduğu, tanımlanan alttür ve türlerin geçerlilikleri ve mevcut türlerin yayılış sınırları halen tartışmalıdır.

Morfolojik araştırmalar sonucunda Türkiye körfarelerinin taksonomisi tam anlamıyla belirlenememişken, son 30 yıl süresince yapılan karyolojik çalışmaların sonuçları durumu daha karmaşık bir hale sokmuştur. Bu zamana kadar Türkiye körfareleri için yapılan karyolojik çalışmalarda Anadolu'da yaygın yayılış gösterdiği kabul edilen *N. xanthodon* (revizyon için bakınız, Kryštufek ve Vohralík, 2009) türü için 12 farklı diploid kromozom değerine sahip populasyon (2n = 36, 38, 40, 44, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62) tanımlanmıştır (Nevo vd., 1995; Sözen 2004; Sözen vd., 2006; Coşkun vd., 2006; Kankılıç vd., 2007, 2009, 2010; Sözen vd., 2013). Trakya'da bulunan diğer körfare türü olan *N. leucodon*'un diploid kromozom sayısı 2n= 56 ve kromozom kol sayısı NFa= 72 ve 74 arasında değişmektedir (Sözen, 2004; Sözen vd., 2006). Ayrıca Anadolu'daki diğer tür olan *N. ehrenbergi* için 5 farklı sitotip (2n= 48, 52, 54, 56, 58) tanımlanmıştır (Coşkun vd., 2006). Sadece populasyonların diploid kromozom değerindeki farklılıklar dikkate alındığında Türkiye

körfareleri için farklı sitotiplerin sayısı 20'ye ulaşmaktadır. Fakat Türkiye körfareleri o kadar çok kromozomal polimorfizme sahiptir ki, diploid kromozom sayıları aynı fakat kromozom kol sayıları birbirinden farklı allopatrik çok sayıda populasyon içermektedir. Örneğin İç Anadolu'da yayılış gösteren 2n= 60 sitotipi için 6 farklı kol sayısına sahip (NF= 74, 76, 78, 80, 82, 84) allopatrik populasyon tanımlanmıştır (Sözen vd., 2013). Bu türün diğer sitotiplerinde de aynı şekilde farklılaşma görülmektedir (Kankılıç vd., 2010).

Bu zamana kadar Türkiye için tanımlanmış olan tür ve alttürlerin topotip örnekleri toplanarak karyotip analizleri yapılmıştır. Tanımlanan tür ve alttürlerin topotiplerinde belirlenen karyolojik bulgular Çizelge 1.1.'de verilmektedir.

Çizelge 1.1. Türkiye'den tanımlanan ve kaydı verilen körfare tür ve alttürleri ve karyotip sonuçları

YAZAR	LOKALİTE	TÜR VE ALTTÜRLER	2n, NF	Kaynak
Nordman (1840)	İzmir	*Spalax typhlus xanthodon*	38, 74	Nevo vd. (1995), Sözen (2004), Tez vd. (2002), Kankılıç vd. (2009)
Nehring (1898)	Bosna	*Spalax monticola*	54, 90	Savic ve Nevo (1990)
	İskenderun (Çengenköy)	*Spalax intermedius*	52, 74	Coşkun vd. (2006)
	İsrail (Yafa)	*Spalax ehrenbergi*	60, 76	Wahrman vd. (1985)
	Mısır	*Spalax aegyptiacus*	60, 76	Lay ve Nadler (1972)
	Suriye	*Spalax kirgisorum*	?	
Satunin (1898)	Iğdır (Kazkoparan)	*Spalax nehringi*	48, 68	Coşkun ve Kaya (2013)
Mehély (1909)	Ardahan (Göle)	*Spalax m. armeniacus*	50, 70	Coşkun (2003), Kankılıç vd. (2007), Ulutürk vd. (2009)
	Niğde (Madenköy)	*Spalax m. cilicicus*	58, 72	Sözen ve Kıvanç (1998)
	İzmir (Bornova)	*Spalax m. anatolicus*	38, 74	Nevo vd. (1995), Sözen (2004), Tez vd. (2002), Kankılıç vd. (2009)
	İstanbul (Bakırköy)	*Spalax m. turcicus*	56, 78	Sözen vd. (2006)
Metschie (1919)	Eskişehir (Porsuk Nehri)	*Spalax labaumei*	60, 76	Kankılıç vd. (2009)
Hinton (1920)	Kütahya (Gediz)	*Spalax m. corybantium*	60, 76	Kankılıç vd. (2009)
	Çankırı	*Spalax m. captorum*	54, 74	Çataklı (2004)
Szunyoghy (1941)	Malatya	*Spalax vasvárii*	60, 82	Ulutürk vd. (2009)
	Adana-Ceyhan	*Spalax ceyhanus*	56, 72	Coşkun vd. (2006)
Coşkun (1996a)	Tunceli (Gömemiş)	*Nannospalax tuncelicus*	54, 74	Coşkun (2004c)
Coşkun (1996b)	Gaziantep (Sarıgüllük)	*N. nehringi nevoi*	52, 74	Coşkun (2004b)
Coşkun (2004)	Tunceli (Ovacık)	*N. munzuri*	58, 68	Coşkun (2004c)

Körfarelerin kromozomal türleri ve populasyonları kendi klimatik habitatlarını, bulundukları coğrafi bölgelerin iklim şartlarına göre seçerler. Özellikle, nemlilik ve kuraklık habitat seçiminde temel ayrıştırıcı olarak görülmektedir (Nevo vd., 2001). Türkiye'de yayılış gösteren körfarelerde de görülen populasyon içi çeşitliliğin, diğer bazı türlerde de olduğu gibi ülkede görülen farklı iklim ve coğrafik etmenlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Nevo vd., 1995).

Nannospalax türlerinin populasyonlara ayrılmasında coğrafi yapı etkilidir ancak aynı coğrafi bölgenin farklı alanlarında bulunan körfarelerde ve buna bağlı olarak populasyonlar içinde de

yüksek kromozom çeşitliliği görülmektedir. Birçok araştırıcı, izolasyonun yanında eşeysel davranışa bağlı izolasyonun da etkili olduğunu ve bu izolasyon sebebiyle de populasyonlar arasında gen alışverişinin kısıtlı olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca bu canlıların hareket yeteneklerinin sınırlı olması da gen alışverişinin kısıtlanmasına sebeptir. Bu verilere dayanarak, körfarelerin türleşmeleri üzerine coğrafik bariyerlerin etkili olduğu söylenebilir (Wahrmann vd., 1969; Nevo, 1979).

Nevo (1991), İsrail'de yaşayan dar hibrid zonlarla birbirlerinden ayrılan dört sitotipin bulunduğunu ve bu sitotiplerin türleşme sürecinin son aşamasında olan biyolojik türler olduklarını ifade etmiştir. Daha sonra Nevo vd. (2001) İsrail'de dağılım gösteren *S. ehrenbergi*'ye ait 2n= 52, 54, 58 ve 60 sitotiplerin her birinin ayrı bir tür olduklarını (*S.galili, S.golani, S. carmeli, S. judaei*) ifade etmiştir. İsrail'deki bu durum Türkiye körfare örnekleri için de değerlendirilmiş ve Nevo vd. (1995) Türkiye'de de 20'den fazla tür bulunabileceğini ileri sürmüştür. Türkiye'de bulunan üç tür için diploid kromozom sayısı bakımından 20 farklı sitotip, kromozom kol sayısı bakımından yaklaşık 40 sitotip, aynı diploid kromozom sayısı (2n) veya kromozom kol sayısına (NF) sahip olan fakat oldukça farklı coğrafik bölgelerde yaşayan populasyonlar da (allopatrik populasyonlar) dikkate alındığında yaklaşık 50 farklı sitotipin varlığı belirlenmiştir. Kryštufek vd. (2012) "sitotip= tür" yaklaşımının doğru bir yaklaşım olmadığını, Kankılıç vd. (2013, 2014a, b) ise Türkiye'deki tüm sitotipler olmasa da Anadolu'daki bazı sitotiplerin gerçekten tür seviyesinde farklılığa sahip olduğunu ve ayrı türler olarak değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmektedir.

Nevo vd. (1995) körfareleri sadece morfolojik özelliklerine göre sınıflandırmanın doğru bir yaklaşım olmadığını ve tanımlanmış morfotürlerin ve sitotiplerin, sitogenetik ve moleküler yöntemlerle analiz edilerek, Türkiye körfare taksonomisinin yeniden değerlendirilmesinin uygun bir yaklaşım olduğu ileri sürmüştür.

Arslan vd. (2010) Anadolu'dan üç sitotipe ait (2n= 40, 58 ve 60) *Nannosplax xanthodon* örneklerinde mtDNA cyt-b bölgesini çalışmışlardır. Elde edilen verilerle haplotip hesaplamaları ve çizilen filogenetik ağaçların sonuçları ışığında, Anadolu *Nannospalax*'larının, İsrail körfarelerinin tersine parapatrik değil allopatrik bir tür olduğunu belirtmişlerdir. Araştırıcılar, Robertsonian kromozom mutasyonlarının farklı sitotiplerin oluşmasında en önemli etken olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışılan bu üç sitotipin ayrı tür olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kryštufek vd. (2012) yaptıkları çalışma ile, Bosna Hersek, Türkiye, İsrail ve Mısır'dan 34 farklı lokaliteden aldıkları 53 örnek için mtDNA'nın cyt-b gen bölgesini çalışmışlardır. *Nannospalax* cinsinin genetik orijininin Asya kıtası olduğunu ifade etmişlerdir. Genetik

varyasyon seviyesi üç tür arasında *Nannospalax leucodon* türünde en düşük, *N. xanthodon* türünde en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Nevo vd. (1995)'in "her sitotip tür olmalıdır" hipotezi bu çalışmada reddedilmektedir.

Kandemir vd. (2012), Türkiye'de bulunan üç türde (*N.xanthodon, N. ehrenbergi, N. leucodon*) 47 örneğin mtDNA'nın cyt-b gen bölgesinin 402 bp'lik kısmını çalışarak Türkiye körfare sitotipleri arasında genetik varyasyonları incelemişlerdir. İlginç olan sonuçlar arasında Türkiye'de *N.ehrenbergi*'nin iki sitotipi (2n= 52 ve 2n=56) arasındaki genetik mesafe 0.087 bulunmuştur, bulunan bu sonucun İsrail'deki iki en uzak ilişkili iki tür arasında (*N.golani* ve *N. carmeli*) belirlenen genetik mesafe değerinden daha büyük olduğu ifade edilmiştir. *N. xanthodon* ile ilgili olarak düşük diploid sayılı (2n= 36,38,40 ve 50) sitotiplerin, *N.leucodon* populasyonları ile birlikte monofiletik bir grup oluşturduklarını ifade etmişlerdir. Ayrıca yapılan mtDNA analiz sonuçlarıyla 2n= 38 sitotipli örnekler ile izole bir ada olan Gökçeada'da da varolan aynı sitotipe sahip bireylerin birbirlerinden farklı olarak çeşitlilik gösterdiklerini bulmuşlardır.

Kankılıç vd. (2013), *N. xanthodon* ve *N. ehrenbergi* türlerine ait 154 örneği rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPDs) analizi ile çalışarak sitotipler arasında genetik varyasyon seviyelerini araştırmışlardır. Özellikle İç Anadolu körfare sitotiplerinde görülen farklılaşmanın peripatrik mekanizmalarla gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Ayrıca bu çalışmada, körfare sitotiplerinin coğrafik yayılışlarına uygun olarak allopatrik sitotip grupları oluşturdukları ve bu nedenle her bir sitotipin ayrı bir tür olarak değerlendirmenin yanlış bir yaklaşım olduğu ileri sürülmüştür.

Kankılıç ve Gürpınar (2014a), Anadolu'dan aldıkları *N. xanthodon* ve *N. ehrenbergi* türlerine ait 94 örneğin mtDNA RFLP analizini yaparak, sitotipler arasında D-loop ve sitokrom b gen bölgelerindeki genetik varyasyonları araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Doğu Anadolu'dan alınan örneklerin (2n= 48 ve 50) *N. nehringi* olarak adlandırılmasının daha doğru olacağını, bu bölgede bulunan kör farelerin *N. xanthodon*'un sinonimi olarak ifade edilmesinin yanlış olduğunu belirtmişlerdir. Araştırıcılar, bu çalışma ile *N. nehringi* ve ilk kez Metschie (1919) tarafından Eskişehir'den tanımlanan *N. labaumei* türünün, Anadolu körfareleri için geçerli türler olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kankılıç vd. (2014b) yaptıkları çalışmada, Türkiye'de 58 lokaliteden aldıkları *Nannospalax* cinsi örneklerinin bakulum kemiklerini ilk defa ve kapsamlı bir biçimde morfolojik ve biyometrik açıdan karşılaştırmışlardır. Bakulum(os penis) bilindiği üzere, morfolojik açıdan gösterdiği farklılıklar sebebiyle tür teşhisi ve taksonomide sıklıkla kullanılmaktadır. Araştırıcılar bu çalışmada Batı Anadolu, Orta Anadolu ve Doğu Anadolu populasyonlarının

aynı tür olamayacak seviyede farklı bakuluma sahip olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışma ile Türkiye'deki körfareler belirli sitotip gruplarını içinde barındıran 5 allopatrik tür (*N. leucodon, N. ehrenbergi, N. xanthodon* ve *N. nehringi, N. laboumei*) altında sınıflandırılmıştır.

Bu zamana kadar yapılan çalışmalar Türkiye körfarelerinin taksonomisini net bir şekilde ortaya koyamamıştır. Son zamanda birkaç moleküler temelli çalışma yapılmış, fakat bu çalışmaların hiçbirinde Türkiye'deki tüm sitotipler birlikte değerlendirilmemiştir. Bu tez çalışmasında özellikle mtDNA'nın cyt-b bölgesi çalışılarak, daha önceki çalışmalarda bu gen bölgesi için elde edilen sekans sonuçları bu tez çalışmasına ilave edilerek mevcut sitotipler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmanın güvenilirliğini güçlendirmek için bir nükleer gen bölgesi (Beta Fibrinojen) çalışmaya dahil edilmiştir. Her iki gen bölgesinin sekans analizleri sonucu elde edilen veriler ile oluşturulacak filogenetik analizlerle mevcut türlerin geçerlilikleri, sitotiplerin türler içindeki durumları, tür= sitotip hipotezinin doğruluğu araştırılacaktır.

BÖLÜM II
KURAMSAL TEMELLER

2.1 Ordo: Rodentia (Mammalia)

Rodentia ordosu, 2800'den fazla türü ile memeli sınıfının en büyük takımı olup dünya memeli türlerinin yaklaşık yarısını kapsamaktadır (Ognev, 1947; Nowak, 1991; Wilson ve Reeder, 2005). Dünyanın kemirici hayvanları neredeyse bütün kıtalarında (Antartika ve Kutuplar hariç) yayılmış durumdadır. Kemirgenler oldukça farklı iklim tiplerine uyum göstermektedirler. Çok farklı ekolojik koşullara ve yaşam alanlarına uyum sağlamışlardır ve bu hayvanlar, kara, ağaç, toprak altı ve yarı sucul olarak farklı habitatlarda dağılış gösterirler. Bu hayvanların yayılışlarında vejetasyonun, arazi yapısının, atmosferik nemin ve toprak yapısının önemli etkisi vardır (Yüksel ve Ulutürk, 2004).

Diğer ordolardan kolaylıkla ayırt edilebilen bu ordonun kendi içerisinde filogenetik durumu halen netlik kazanmamıştır. Çiğneme kasları ve kafa yapıları kemiricileri sınıflandırmak için kullanılabilen önemli kriterler olup, her bir grup kafatası yapısı ve çenenin kafatası ile yapmış olduğu bağlantıyla birbirinden ayrılmaktadır. Bu ayrıma göre 4 bazı kaynaklarda ise 5 subordoya ayrılmaktadırlar.

Rodentia ordosunu diğer ordolardan ayıran en belirgin özelliği diestema boşluğunun oluşudur. Diestema boşluğu, köpek dişleri ve önazı dişlerinin kaybolması ile oluşan bir boşluktur. Bu boşluk kesici dişlerle azı diş arasında bulunmaktadır ve besin toplamaya yarar. Her iki çenenin önünde ikişer adet kesici diş bulunması tüm kemiricilerin ortak özelliği olup bu dişler köksüzdür ve devamlı büyüme gösterirler. Kesici dişlerden birinin kırılması ile yerine yeni diş çıkamamasından dolayı kırılan dişin karşısındaki diş devamlı olarak büyüme gösterir ve hayvanın ölümüne yol açabilir (Ognev,1947).

2.2 Familya: Spalacidae Gray,1821

Körfareler toprakaltı hayata adapte olmuş hayvanlardır. Genellikle toprak altında yumru köklü bitkilerin kökleri ile beslenirler. Bu hayvanlar neredeyse tamamen toprak altında yaşamlarını sürdürürler. Gözlerinin bulunmayışı, kulak kepçelerinin körelmiş olmasıyla diğer kemirgenlerden ayrılırlar.

Genel morfolojileri, iklim ve coğrafi şartlara bağlı olarak çok az değişim gösterse de genel itibariyle aynıdır (Fotoğraf 2.1., Fotoğraf 2.2., Fotoğraf 2.3.). Gövde, silindir şeklinde olup, baş gövdeden biraz daha geniştir. Baş ve beden uzunlukları 130 ile 310 mm arasında değişmektedir. Ağız küt, gözler körelmiş olup, deri altında kalarak işlevini yitirmiştir ve

dışarıdan bakıldığında görünmemektedir. Burun pedinin her iki tarafından kulağa doğru fırça şeklindeki beyaz renkte kıllar dokunma duyusunun algılanmasında önemli rol oynarlar. Kulak kepçeleri yoktur fakat orta kulağa açılan kulak açıklığı tüyler arasında görülmektedir. Kuyruk, kıllar içinde belirgin olmayan küçük bir çıkıntı halindedir. Ön ve arka ayakları beş parmaklı, keskin tırnaklı olup ayakları çıplak ve buruşuktur. Kazma işini dişleriyle yaptıkları için ayaklar kazma işi için uyum sağlayamamış ve zayıf kalmıştır. Kafatası fossorial (kazıcı) hayat için oldukça farklılaşmıştır ve yetişkinlerde kuvvetli şekilde eğimli bir yapı kazanmıştır. Supraoccipital bölge posterior zygomatik köklerin seviyesine ulaşarak öne doğru meyillenmiştir. Böylece kafatası toplam uzunluğunun 1/3 veya daha fazlasını kapsar. Zygomatik plate'ler nispeten dardır, infraorbital foramina geniştir. Foramina incisiva çok küçük olup dar bir foramen şeklindedir. Kesici dişler geniş olup, alt kesici mandibul üzerinde kondillerin gerisinde çıkıntı oluşturmaktadır. Molar (çiğneme) dişler köklüdür, genç hayvanların dişlerinin iç ve dış girintili kıvrımları bir süre sonra taç yüzeyinde izole olmuş adacık şeklini almaktadır. Genel diş formülleri; I 1/1, C 0/0, PM 0/0 M 3/3= 16'dır. (Ognev, 1947; Harrison ve Bates, 1991; Qumsiyeh, 1996).

Ortalama ağırlıkları 100-570 gr kadardır. Vücut renkleri mevsimsel varyasyon göstermekle beraber, genel vücut rengi sarımsı kahverengi olup sık ve yumuşak kıllarla kaplıdır. Penislerinde, baculum (os penis) bulunur. Baculum, orta kısmında yukarı doğru kuvvetlice yay şeklini alan ince bir gövdeye sahiptir. Taban kısmı ise yanlara doğru genişlemiştir ve uç kısmı genişlememiştir. Baculum (os penis), erkek hayvanlarda bulunan ve farklı morfoloji gösteren, üretranın üzerinde ve penisin distal ucunda bulunan bir kemiktir. Bu kemik, morfolojisi dolayısıyla sıklıkla tür teşhisinde ve taksonomide kullanılmaktadır (Kankılıç vd., 2014b). Dişilerinde bir çift pektoralde ve iki çift abdominalde meme bulunmaktadır (Ognev, 1947; Harrison ve Bates, 1991). Seksüel aktivite, bütün yıl boyunca mevcut olup, ocak ve şubat aylarında artmaktadır. Çoğunlukla dişiler yılda bir defa doğururlar, yılda birden fazla doğum yapan körfare oranı önemsiz bulunmuştur (Savic, 1973).

Fotoğraf 2.1. Anadolu körfaresi (*Nannospalax nehringi*) (Fotograf: *Ahmet KARATAŞ*).

Fotoğraf 2.2. Filistin körfaresi (*Nannospalax ehrenbergi*) (Fotograf: *Ahmet KARATAŞ*).

Fotoğraf 2.3. Beyazdişli körfare (*Nannospalax leucodon*) (Fotograf: *Ahmet KARATAŞ*).

Çiftleşme dönemi dışında yalnız ve toprakaltında kazdıkları galeri sistemlerinde yaşarlar. Ana yuvada günlük yaşam odasının yanı sıra besin odası ile dışkı odası bulunmaktadır. Hayvan, genellikle yumuşak tarım alanlarında, çayırlıklarda ve steplerde yaşarlar. Özellikle tarım alanlarında ekonomik zarara sebep olurlar. Soğan, patates ve havuç gibi yiyeceklerle beslenen *Spalax*'lardan birinin yuvasında 20 kg kadar patates bulunduğu belirlenmiştir. Dışarıdan bakıldığında tümsekler halinde görülen bu galeriler labirent şeklindedir (Harrison ve Bates, 1991) (Fotoğraf 2.4.). Fizyolojik açıdan incelediğinde *Spalax*'ların son derece saldırgan olduğu, hırıltıya benzer sesler çıkardıkları gözlenmiştir. Körfareler, başlarıyla tünelin tavanına vurarak ritmik sismik dalgalar oluştururlar. Ayrıca, altı-yedi farklı ses çıkartarak aralarında iletişim sağlarlar. Sismik dalgalar ve diğer seslerle rakipler uyarıldığı gibi karşı cinsin bulunmasında da etkilidir (Mason ve Narins, 2001).

Fotoğraf 2.4. Bir körfarenin yaşadığı doğal ortamında toprak yüzeyinde oluşturduğu çıkıntılar.

2.3 *Spalax* Güldensteadt, 1770

Spalacidae familyası monogeneriktir, böylece familya için verilen karakterler cins için de geçerlidir. Topachevskii (1969) tarafından *Spalax* cinsinin en eski türünün, Pliosen dönemine ait (5 milyon yıl önce), Ukrayna ve Makedonya'da bulunan *S.odessanus* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca araştırıcı, bu familya için *Prospalax* adlı fosil cinsin bulunduğunu da ifade etmiştir.

Ognev (1947) Spalacidae'nin tek bir cinsi olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca Ellerman (1966) da familyanın tek üyesinin *Spalax* olduğunu ve altcinsleri ayırmada supracondyloid foramenlerin bulunup bulunmayışının kullanılması gerektiğini, fakat bunun da değişken karakter olmasından ötürü altcins ayrımının yapılamadığını belirtmiştir. Topachevskii (1969) yaptığı geniş revizyonda körfareleri *Microsapalax* ve *Spalax* cinsi olarak 8 yaşayan ve 4 fosil türe bölmüştür. Fakat Corbet (1978), Topachevskii (1969)'in sınıflandırmasında körfarelerin çok fazla türe bölündüğünü belirtmiş ve *Spalax* cinsini üç türe ayırmıştır. Daha sonra Corbet, Hill

ile bareber yayınladığı Dünya Memelileri Tür Listesi kitabında körfareleri iki cins ve sekiz türe ayırmıştır (Corbet ve Hill, 1991). Verilen sınıflandırma şu şekildedir;

Familya: Muridae

Altfamilya: Spalacinae

Cins: *Spalax*

Tür: *S. arenarius, S.giganteus, S.graecus, S.microphthalmus, S.polonicus*

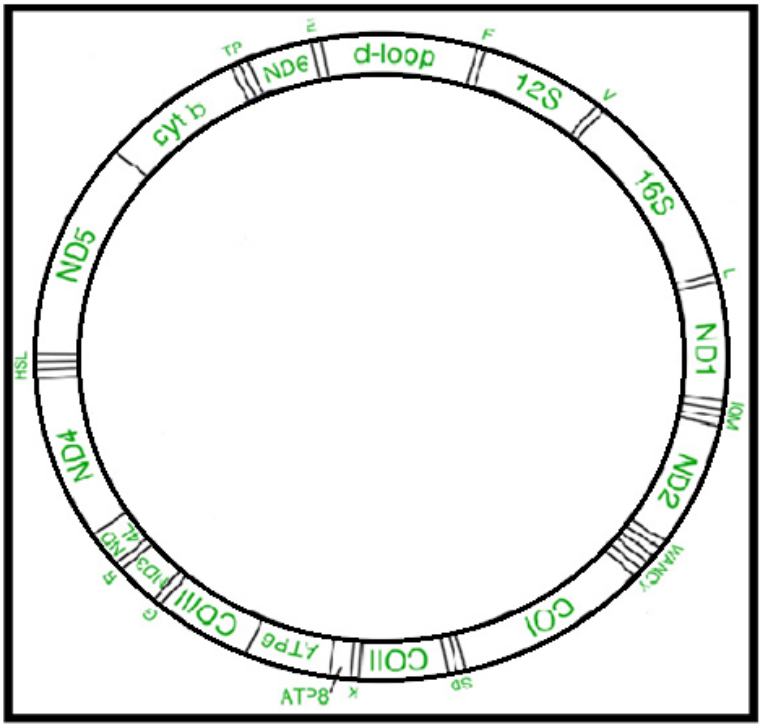
Cins: *Nannospalax* (*Spalax, Mesospalax, Microspalax*)

Tür: *N. ehrenbergi, N.leucodon, N. nehringi*

2.4 Mitokondrial DNA (mtDNA) ve Nükleer DNA (nDNA)

Evrim çalışmalarında genomun en çok çalışılan kısımlarından biri de mtDNA'dır (Wilson vd., 1985). Mitokondriyal DNA, küçük; yaklaşık 16.569 bp, çift iplikli, sirküler bir molekül olup, çekirdek DNA'sının %1'inden az sayıda DNA içermektedir (Wallace, 1986). Ayrıca mtDNA, mitokondri matriksine yerleşmiştir. Nükleer DNA ise, hücre nükleusu içine yerleşmiş büyük lineer bir moleküldür. nDNA intron içerirken, mtDNA'da intron bölgeleri bulunmamaktadır. NDNA analizi, mtDNA ile elde edilen filogenezleri doğrulamak için yapılması tavsiye edilmektedir.

Hayvan mtDNA'sı, 15-20 kb uzunluğunda, 22 tRNA, 2 rRNA, 13 elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda görev yapan 13 mRNA'yı kodlayan toplam 37 genden oluşan kapalı halkasal bir moleküldür (Klug ve Cummings, 2000) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Hayvan mitokondrial DNA'sının genel görünümü.

Sitoplazmik DNA olarak da adlandırılan mtDNA'da yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan kontrol bölgesi replikasyonun başladığı bölge olarak bilinmektedir. Diğer DNA türlerine benzer biçimde, mtDNA'da kodlanan ve kodlamayan (kontrol bölgesi) bölgeler mevcuttur. MtDNA, hücre içinde çok sayıda kopya halinde bulunmaktadır. MtDNA hızla gelişen genlere ve son derece korunmuş bölgelere sahiptir. MtDNA anne tarafından kalıtılır, çabuk gelişir ve büyük kısmında rekombinasyon görülmemektedir. Bu özellikler populasyon genetiği açısından büyük önem taşır ve taksonlar üzerinde geniş bir bant aralığında kullanıma olanak sağlamaktadır. Rekombinasyonun neredeyse görülmemesi, kalıtımın daha rahat izlenmesine olanak sağlamaktadır ve bu nedenle yüksek evrimsel stabiliteye sahiptir. Dolayısıyla mtDNA, belirli bir varyasyonu, nüfus yapısını ve filogenetik ilişkileri belirlemede önem arz etmektedir (Avise vd., 1987; Brown vd., 1982; Kocher vd., 1989).

MtDNA genomu içinde, sitokrom b geni mitokondriyal komplex III merkezi bir katalitik alt birimi temsil eden mitokondriyal genlerden biridir ve çoğu ökaryotik hücrede yaşam için çok önemli olan oksidatif fosforilasyon sisteminden sorumludur. Memeli hayvanlarda inter spesifik moleküler taksonomi ve filogenetik çalışmalar için en yaygın olarak kullanılan mitokondriyal DNA genidir. (Kocher vd., 1989; Montgelard vd., 1997; Prusak vd., 2004). Sitokrom b geni, farklı taksonomik grupların

belirli kodon pozisyonlarında ayırıcı taban tercihlerine sahip olduğu görülmektedir (Irwin vd., 1991).

Sitokrom b geni her iki korunmuş ve değişken bölgeleri ya da her ikisinin etki alanlarının daha derin değerlendirilmesinde uygun olmasının yanı sıra daha fazla yeni farklılıkları değerlendirebilmektedir (Meyer ve Wilson, 1990; Irwin vd., 1991; Cantatore vd., 1994; Lydeard ve Roe, 1997; Kumazawa ve Nishida, 2000; Sturmbauer ve Meyer, 1992; Rocha-Olivares vd., 1999; Kirchman vd., 2000; Lovejoy ve de Araujo 2000).

Sitokrom b geni kullanılmasının diğer avantajları; sitokrom b geni net hizalanmalar ile pozisyonel homoloji kurulması için olanak sağlar. Hem daha yavaş hem de hızlı gelişmekte olan bölgeleri (kodon pozisyonları) ve memeli türler arasında yüksek ölçüde korunmuş sekans parçalarını içerir (Irwin vd.,1991). Bu nedenle, sitokrom b ve diğer genler dahil olan analizler son derece tavsiye edilir.

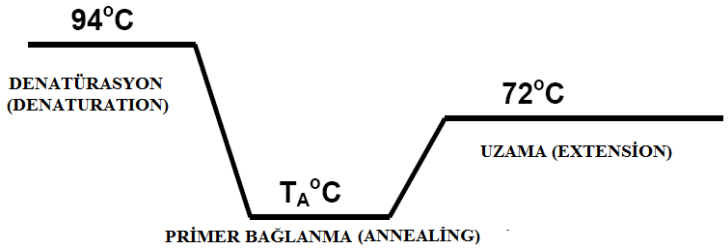
2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR=PZR)

PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. İn vitro koşullarda, istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin, çok sayıda kopyasının elde edilmesi için 1980'li yıllardan beri kullanılan bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği, çok az miktarda DNA'yla çalışmaya olanak sağlamaktadır ve bu yüzden çeşitli araştırmalarda büyük öneme sahiptir (Mullis, 1990; Erlich, 1989).

PCR'ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, dNTP karışımı, tampon ve MgCl'dür. PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleitid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur (Arı, 2008; Ochman vd., 1988) (Şekil 2.2.).

PCR analizinde DNA molekülünün belirli bir bölgesinin çoğaltma işlemi doğal bir hücrenin içindeki DNA replikasyonu ile eşdeğerdir. Fakat doğal replikasyondan farklı olarak polimeraz zincir reaksiyonunda replikasyon çatalı oluşmaz. Bir PCR döngüsü

denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur.

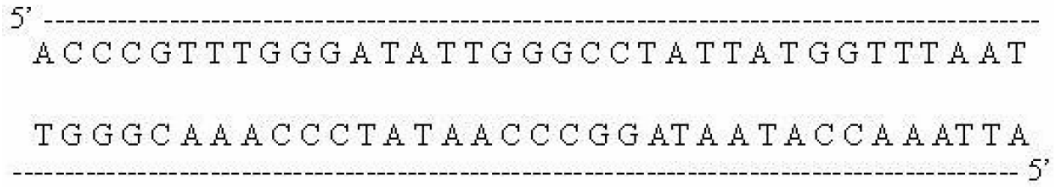


Şekil 2.2. Bir PCR döngüsü

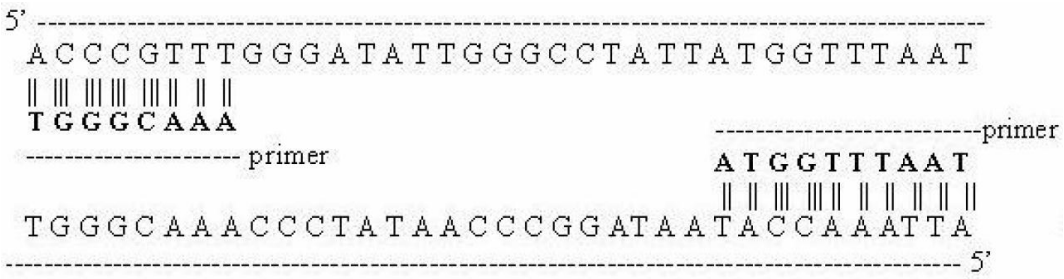
PCR'da polimerizasyonun başlayabilmesi için çift zincirli DNA'nın (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) biçimine getirilmesi gereklidir. Bu nedenle PCR'da çift sarmal yapıdaki DNA molekülü yüksek sıcaklıkta (92-95 °C) denatüre edilir. Bu nedenle bu aşamaya denatürasyon aşaması adı verilmektedir. PCR analizinde DNA'nın belirli bölgesini çoğaltmak için tasarlanmış olan spesifik oligonükleotit primerleri tek zincirli DNA'ya bağlanması gereklidir. Bu aşamaya primer eşleşmesi veya bağlanması adı verilir. Daha sonra Mg^{+2} iyonlarının varlığında, katalizör olarak DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması sağlanır. Bu aşama primer uzaması olarak adlandırılır. Ard arda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Potansiyel olarak her döngünün % 100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 30 döngü sonucu 2^{30} kat ürün meydana gelir.

1. Genellikle PCR analizinde yaklaşık 100-1000 bp uzunluğunda bir DNA bölgesi amplifiye edilir. En büyük amplifikasyon ürünü 5000 bp olmalıdır. Birisi forward diğeri revers olarak adlandırılan primer çifti DNA'nın her bir zincirindeki primer bağlanma bölgelerindeki (Flanking region) DNA parçası ile komplementer diziye sahip olmalıdır.

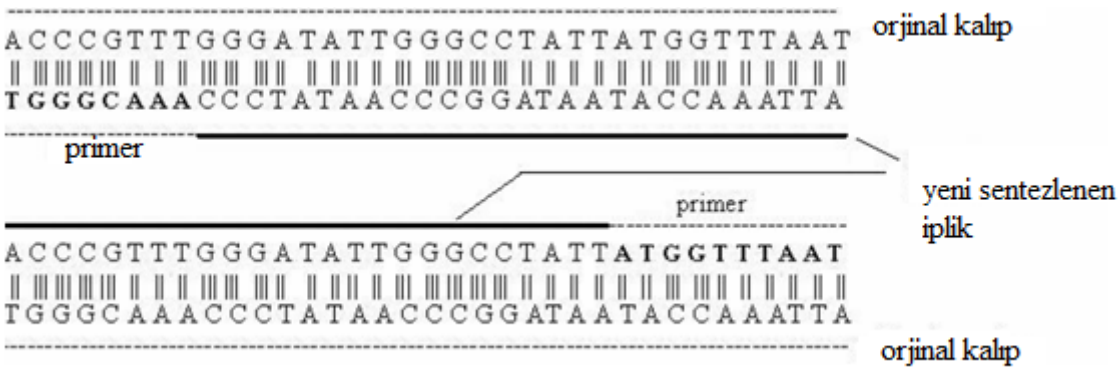
2. Hedef DNA molekülü 92-95°C'de denatüre edilerek, bazlar arasındaki hidrojen bağlarının bozulması sağlanır. Böylece çift iplikli DNA tek zincirli DNA haline getirilir.



3. PCR aleti DNA denatüre oladuktan sonra sıcaklığı 60-75 °C'ye düşürdüğünde oligonükleotit primerler bağlanma bölgelerinden DNA zincirlerine bağlanırlar. Ortamda dNTP ve Taq DNA Polimeraz enzimi bulunduğundan primerin açık olan 3-OH uçlarına nükleotitler DNA'ya komplementer olacak şekilde bağlanır.



4. DNA polimeraz ile nükleotitler bağlanarak her bir DNA zincirinden tam kopya yeni DNA zincirleri sentezlenir.



PCR'da çoğaltılan ürünlerin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde en basit ve genel olanı, elektroforezdir. Agaroz ya da poliakrilamid jellerde, bir flouresan boya olan ve DNA ipliklerinin arasına giren, boya ile ürünler görülür. Boyamadan

sonra DNA, jel üzerinde bir UV transilüminatörden yararlanılarak görünür hale gelir. Jelin kalıcı görünümü fotoğraflamak yoluyla elde edilmektedir.

Bu tekniğin dezavantajları, başlangıçta pahalı laboratuar ekipmanlarına ihtiyaç duyulması, iyi eğitilmiş eleman gerekliliği ve bazen kontaminasyonlar sonucu hataya neden olması göze çarpar fakat bu yöntemin en önemli avantajı, çok küçük miktarda DNA veya RNA'nın istenen bölgesinin kısa süre içerisinde, milyonlarca defa çoğaltabilmektir. Bu teknik aynı zamanda çok hassas, spesifik ve güvenilirdir (Yılmaz ve Devran, 2003; Arı, 2008; Holland vd., 1991).

2.6 Filogenetik Analizler

Türler arasındaki evrimsel ilişkiyi belirlemek için en uygun yöntem DNA'da meydana gelen değişimlerdir. Elde edilen verilerden yola çıkılarak yapılan istatistiksel analizler ile bu analizler neticesinde çizilen filogenetik ağaçlarla, dallanmalar ve evrimsel zamanları görülebilir. Ayrıca, taksonlar arasında hangisinin diğeriyle yakın ya da uzak akraba olduğunu belirlemeye yardımcıdır (Freeman ve Herron, 1999).

Filogenetik olarak çizilen ağaçlar genetik veriler kullanılarak, farklı programlar vasıtasıyla, farklı şekillerde karşımıza çıkabilir. Bunlardan en fazla kullanılanları Maximum Parsimoni, Maximum Likelihood ve Neighbor-Joining ağaçlardır.

Parsimoni, kelime anlamı ile tutumluluk demektir. Parsimoni yöntemi kullanarak, türlere ait en az evrimsel değişiklikler baz alınarak en basit ve olası ağaç seçilmiş olunur. Birçok olası ağaç içerisinden en iyi ağacı seçmede kullanılan diğer bir yöntem olan Maximum olasılık, kullanılan bilgisayar programı ile, her bir ağacın topolojisi incelenmesi yoluyla verilen belirlenmiş bir karakter modeli altında (GTR, HKY gibi) çeşitli hesaplamalar yapar ve en olası ağacı çizer.

Model test ne anlama gelmektedir ve önemi nedir? sorusuna yanıt verilmeden önce modellerden de bahsetmek gerekmektedir. Filogenetik analizlerde kullanılmakta olan HKY, GTR, K80, TN93 gibi bazı modeller bulunmaktadır. Bu modeller, DNA dizileri için fenomonolojik açıklama sağlar. Evrimsel analizler ile, dizilerin zaman ölçekleri çok çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Böylece farklı durumlar arasındaki değişim oranları açısından bu modelleri ifade etmek mümkündür. Bu modellerden JC69 (Jukes ve Cantor, 1969) modeli, olası tüm nükleotit ikamesi için eşit olasılıklar (0,25) varsayan basit değişim modelidir. Yer değiştirmelerin rastgele çıktığı ve mutasyon hızının tüm nükleotidler için eşit olasılıkta olduğunu varsaymaktadır. K80 (Kimura, 1980) modeli, transisyonların transversiyonlardan daha sık görüldüğünü varsaymaktadır. Transisyon; pirimidinden pirimidine ya da pürinden

pürine (yani A-T, C-G) geçişler ile transversiyon, pürinden pirimidine ya ta tam tersi geçişleri (A-G, C-T) birbirinden ayırır. F81 (Felsenstein, 1981), bazlara ait frekansların farklılıklar gösterdiği (0.15; 0.20; 0.05 gibi) JC69 modelinin bir uzantısıdır. HKY85 (Hasegawa, Kishino ve Yano, 1985) modeli, Kimura80 ve Felsenstein81 modellerinde yapılan uzantıların birleştirilerek hesaplandığı düşünülebilir. Yani bu geçişler ve transversiyonlar ile transisyonlar arası geçişler eşit olmayan baz frekanslarını sağlar. T92 modeli, K80 yöntemi geliştirerek Tamura tarafından site başına DNA dizileri arasındaki nükleotit değişim sayısını ifade etmek için geliştirilen basit bir matematiksel yöntemdir. Drosophila mtDNA örneğinde olduğu gibi güçlü geçiş transisyon-transversiyon ve G+C içeriği yanlılıkları olduğunda bu yöntem yararlı olacaktır. Bu modele göre kodlayıcı olmayan diziler arasındaki evrimsel mesafe verilir. TN93 modeli (Tamura ve Nei, 1993), iki tip arasındaki transisyon oranına sahiptir. Yani, A-G ve T-C. Transversiyonların aynı hızda gerçekleştiği varsayılır ancak bu oran transisyonlardaki orandan farklı bırakılır. GTR, genelleştirilmiş geri dönüşümlü zaman (Tavare, 1986), GTR olası en nötr, bağımsız modeldir.

Çizilen bu ağaçların güvenilirlik dereceleri nedir? sorusuna cevap olarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmaktadır. Çizilen her bir ağaçta bootstrap adı verilen değer bulunmaktadır ve bu değer ağacın güvenilirliği hakkında fikir vermektedir. Açılımı seç-bağla testi olan bu yöntem, bir ağaç üzerinde bulunan dallardan hangisinin daha fazla desteklendiği bilgisini vermektedir. İstenilen tekrarda genellikle minimum 100 tekrar veya genellikle 1000 tekrar yaptırılarak bootstrop değerleri her bir dal için % 50, 70 veya 100 gibi farklı değerler vermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak da %50'nin altındaki bir sonucun güvenilirliği tartışılabilecektir. Bir çalışmada en iyi sonuca varmak için tek bir ağaç çizilmesi ve yorumlanması yerine birkaç ağaç birden çizilmesi ile ağaçta bulunan dallar ve dalların gösterdikleri bootstrop değerleri karşılaştırılması araştırıcıyı en güvenilir sonuca ulaştıracaktır (Freeman ve Herron, 1999).

Ayrıca genetik mesafe hesaplamaları da filogenetik analizlerde yüksek oranda çalışılmaktadır. Bu yönteme göre, morfolojik bir özelliğin varlığı veya yokluğu ya da bir gen bölgesinde bulunan bir nükleotidin çeşidine göre karakterler uzaklık değerine çevrilmektedirler. Böylece taksonlar arasında benzerlik derecesi hesaplanmış olur (Swafford vd., 1996).

BÖLÜM III
MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

Araştırma materyalini oluşturan körfare örnekleri, Türkiye'nin farklı bölgelerinden Yrd. Doç. Dr. Teoman KANKILIÇ tarafından değişik tarihlerde yapılan arazi çalışmaları ile 59lokaliteden toplanmıştır (Şekil 3.2.). Materyali oluşturan 98 *Nannospalax* örneği, 48 erkek ve 50 dişi bireyden oluşmaktadır (Çizelge 3.1.). *Nannospalax ehrenbergi* türünden 3 sitotipe ait (2n= 48,52 ve 56) 16 örnek ile *Nannospalax xanthodon* türünden 4 sitotipe ait (2n= 36, 38, 40, 52) ve *Nannospalax nehringi* türünden 2 sitotipe ait (2n= 48, 50) ve *Nannospalax cilicicus* türüne ait 5 sitotipten (2n= 52, 54, 56, 58, 60) toplam 81 örnek çalışılmıştır. Bu örnekler haricinde filogenetik analizlerde kullanılmak üzere *Nannospalax* cinsine ait Türkiye, Macaristan, Sırbistan, Bosna-Hersek, Ukrayna, Makedonya, İsrail ve Mısır'dan GenBank'da cyt-b genine ait sekans dizisi bulunan 47 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca Ukrayna ve Romanyadan çeşitli lokalitelerden alınan ve sitokrom b gen bölgesi çalışılan *Spalax* cinsine ait 13 örnek de bu çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm örnekler Çizelge 3.2.'de ve Şekil 3.1.'de ayrıntısıyla verilmiştir. Dış grup olarak kullanılması için *Nannospalax* ile aynı familyaya dahil olan *Mus* ve *Rattus* cinslerine ait Çizelge 3.1.'de verilen 2 örnek filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

Çalışma 2011-2013 yılları arasında Niğde Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı ve Sitogenetik Laboratuarı ile ERASMUS programı çerçevesinde Belçika Liége Üniversitesi Evrimsel Biyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür (Fotoğraf 3.3).

Çizelge 3.1. Filogenetik analizlerde kullanılan dışgruplara ait bilgiler

Kod	Tür	Lokalite	Referans
EF605471 (BFIBR)	*Mus musculus*	-	Storz vd., 2007
HM217436 (CYT-B)	*Rattus tanezumi voucher*	Thailand- Kalasin	Pages vd., 2010

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan*Nannospalax* cinsi körfare örneklerine ait bilgiler (▲: Çalışmada kullanılan GenBank örnekleri; TR: Türkiye; H: Macaristan; SRB: Sırbistan; MK: Makedonya; BIH: Bosna-Hersek; UA: Ukrayna; IL: İsrail; ET: Mısır, ROM: Romanya).

Lokalite No	Müze No Gen Bank No	Cinsiyet	Tür Adı	Lokalite	Kromozom Soy	Cyt-b	BFIBI
Lok 1	6256	♀	*N. xanthodon*	TR: Aydın (Koçarlı-Yağhanlı Köyü)	2n=36 NF=68	+	+
Lok 1	6222	♀	*N. xanthodon*	TR: Aydın (Koçarlı-Yağhanlı Köyü)	2n=36 NF=68	+	
Lok 1	6215	♀	*N. xanthodon*	TR: Aydın (Koçarlı-Yağhanlı Köyü)	2n=36 NF=68	+	
Lok 2	6197	♀	*N. xanthodon*	TR: Aydın (Koçarlı- Bıyıklı Köyü)	2n=36 NF=68		+
Lok 3	6251	♂	*N. xanthodon*	TR: Aydın (Koçarlı- Haydarlı Köyü)	2n=36 NF=68	+	+
Lok 4	6232	♂	*N. xanthodon*	TR: Aydın (Ortaklar-Magnesia)	2n=36 NF=68	+	+
Lok 5	6154	♀	*N. xanthodon*	TR: Balıkesir (Kepsut)	2n=38 NF=74	+	
Lok 5	6120	♂	*N. xanthodon*	TR: Balıkesir (Kepsut)	2n=38 NF=74	+	
Lok 5	6144	♂	*N. xanthodon*	TR: Balıkesir (Kepsut)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 5	6150	♀	*N. xanthodon*	TR: Balıkesir (Kepsut)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 5	6160	♀	*N. xanthodon*	TR: Balıkesir (Kepsut)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 6	6161	♀	*N. xanthodon*	TR: Balıkesir (Çömlekçi –Bigadiç)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 7	6138	♂	*N. xanthodon*	TR: İzmir (Foça- Bağarası Köyü)	2n=38 NF=74	+	
Lok 7	6140	♀	*N. xanthodon*	TR: İzmir (Foça- Bağarası Köyü)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 7	6139	♀	*N. xanthodon*	TR: İzmir (Foça- Bağarası Köyü)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 7	6132	♀	*N. xanthodon*	TR: İzmir (Foça- Bağarası Köyü)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 8	6131	♂	*N. xanthodon*	TR: Manisa (Akhisar)	2n=38 NF=74	+	+
Lok 9	6210	♂	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yenişarbademli)	2n=40 NF=72	+	
Lok 9	6265	♀	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yenişarbademli)	2n=40 NF=72	+	+
Lok 9	6206	♂	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yenişarbademli)	2n=40 NF=72	+	+
Lok 9	6254	♂	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yenişarbademli)	2n=40 NF=72	+	+
Lok 9	6204	♀	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yenişarbademli)	2n=56 NF=72	+	
Lok 10	6219	♂	*N. xanthodon*	TR: Konya (Yeşildağ)	2n=40 NF=72	+	+
Lok 10	6203	♂	*N. xanthodon*	TR: Konya (Yeşildağ)	2n=40 NF=72	+	+
Lok 10	6255	♂	*N. xanthodon*	TR: Konya (Yeşildağ)	2n=40 NF=72	+	+
Lok 10	6263	♀	*N. xanthodon*	TR: Konya (Yeşildağ)	2n=40 NF=72	+	+
▲ Lok 11	JX451856	-	*N. xanthodon*	TR: Konya (Gökçimen)	2n=40 NF=72	+	
▲ Lok 12	JX451857	-	*N. xanthodon*	TR: Konya (Bayvasar)	2n=40 NF=72	+	
Lok 13	6363	♀	*N. xanthodon*	TR: Ağrı (Taşlıçay)	2n=48 NF=68	+	
Lok 14	4887	♀	*N. xanthodon*	TR: Kars (Susuz)	2n=50 NF=70	+	+
Lok 15	4880	♂	*N. xanthodon*	TR: Kars (Selim)	2n=50 NF=70	+	+
▲ Lok 16	JX451854	-	*N. xanthodon*	TR: Kars (Sarıkamış)	2n=50 NF=70	+	+
Lok 17	5306	♀	*N. xanthodon*	TR: Ardahan (Göle)	2n=50 NF=70	+	+
Lok 18	3322	♂	*N. xanthodon*	TR: Ardahan (10 km Batı)	2n=50 NF=70	+	+
Lok 19	4661	♂	*N. xanthodon*	TR: Bayburt (Demirözü)	2n=50 NF=72	+	
Lok 20	4669	♀	*N. xanthodon*	TR: Rize (Ovit Dağı)	2n=50 NF=72	+	

Çizelge 3.2. (Devam)

Lokalite No	Müze No Gen Bank No	Cinsiyet	Tür Adı	Lokalite	Kromozom Soy	Cyt-b	BFIBI
Lok 21	3324	♂	*N. xanthodon*	TR: Erzurum (20 km Doğu)	2n=50 NF=72	+	+
Lok 22	120	♂	*N. xanthodon*	TR: Mersin (Sebil Yaylası)	2n=52 NF=72 G	+	+
Lok 23	123	♂	*N. xanthodon*	TR: Mersin (Çamlıyayla)	2n=52 NF=72 G		+
Lok 24	4009	♂	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Yeniçağ 1 km Doğu)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 25	3985	♂	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Mengen)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 26	4849	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Seben)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 27	4201	♂	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Abant)	2n=52 NF=70 K	+	
Lok 27	4202	♂	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Abant)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 28	4830	♂	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Gerede)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 28	4825	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Gerede)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 28	4831	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Gerede)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 28	4834	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Gerede)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 29	4936	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Merkez)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 29	4935	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Merkez)	2n=52 NF=70 K	+	
▲ Lok 29	JX451855	-	*N. xanthodon*	TR: Bolu	2n=52 NF=70 K	+	
Lok 30	4203	♀	*N. xanthodon*	TR: Bolu (Mudurnu)	2n=52 NF=70 K	+	+
Lok 31	4916	♀	*N. xanthodon*	TR: Kırıkkale (Merkez)	2n=54 NF=74	+	
Lok 31	4917	♂	*N. xanthodon*	TR: Kırıkkale (Merkez)	2n=54 NF=74	+	
Lok 31	4912	♂	*N. xanthodon*	TR: Kırıkkale (Merkez)	2n=54 NF=74	+	+
Lok 32	5453	♂	*N. xanthodon*	TR: Kırıkkale (25 km doğu)	2n=54 NF=74	+	+
Lok 33	4913	♂	*N. xanthodon*	TR: Kırıkkale (Keskin)	2n=54 NF=74	+	+
Lok 34	4572	♀	*N. xanthodon*	TR: Kırşehir (Seyfe Gölü)	2n=54 NF=74	+	
Lok 35	137	♀	*N. xanthodon*	TR: Adana (Pozantı-Akçatekir Y.)	2n=56 NF=72	+	
Lok 36	6135	♂	*N. xanthodon*	TR: Manisa (Kula)	2n=56 NF=72	+	
Lok 36	6117	♂	*N. xanthodon*	TR: Manisa (Kula)	2n=56 NF=72	+	
Lok 36	6151	♀	*N. xanthodon*	TR: Manisa (Kula)	2n=56 NF=72	+	
Lok 37	6220	♀	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yılanlı Köyü-Aksu)	2n=56 NF=72	+	+
Lok 37	6213	♀	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yılanlı Köyü-Aksu)	2n=56 NF=72	+	+
Lok 37	6270	♀	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Yılanlı Köyü-Aksu)	2n=56 NF=72	+	+
Lok 38	6224	♀	*N. xanthodon*	TR: Uşak (15 km Batı)	2n=56 NF=72	+	
▲ Lok 39	FJ656297	-	*N. xanthodon*	TR: Karabük	2n=56 NF=72	+	
▲ Lok 40	JX451850	-	*N. xanthodon*	TR: Karaman (Ereğli)	2n=58 NF=72	+	
▲ Lok 40	JX451851	-	*N. xanthodon*	TR: Karaman (Ereğli)	2n=58 NF=72	+	
▲ Lok 40	JX451861	-	*N. xanthodon*	TR: Karaman (Ereğli)	2n=58 NF=72	+	
▲ Lok 40	JX451862	-	*N. xanthodon*	TR: Karaman (Ereğli)	2n=58 NF=72	+	
Lok 41	181	♂	*N. xanthodon*	TR: Adana (Alpu-Pozantı)	2n=58 NF=72	+	+
Lok 42	38	♀	*N. xanthodon*	TR: Niğde (Niğde Üni. Kampüs)	2n=58 NF=72	+	+
Lok 43	36	♂	*N. xanthodon*	TR: Niğde (Çamardı)	2n=58 NF=72	+	

Çizelge 3.2. (Devam)

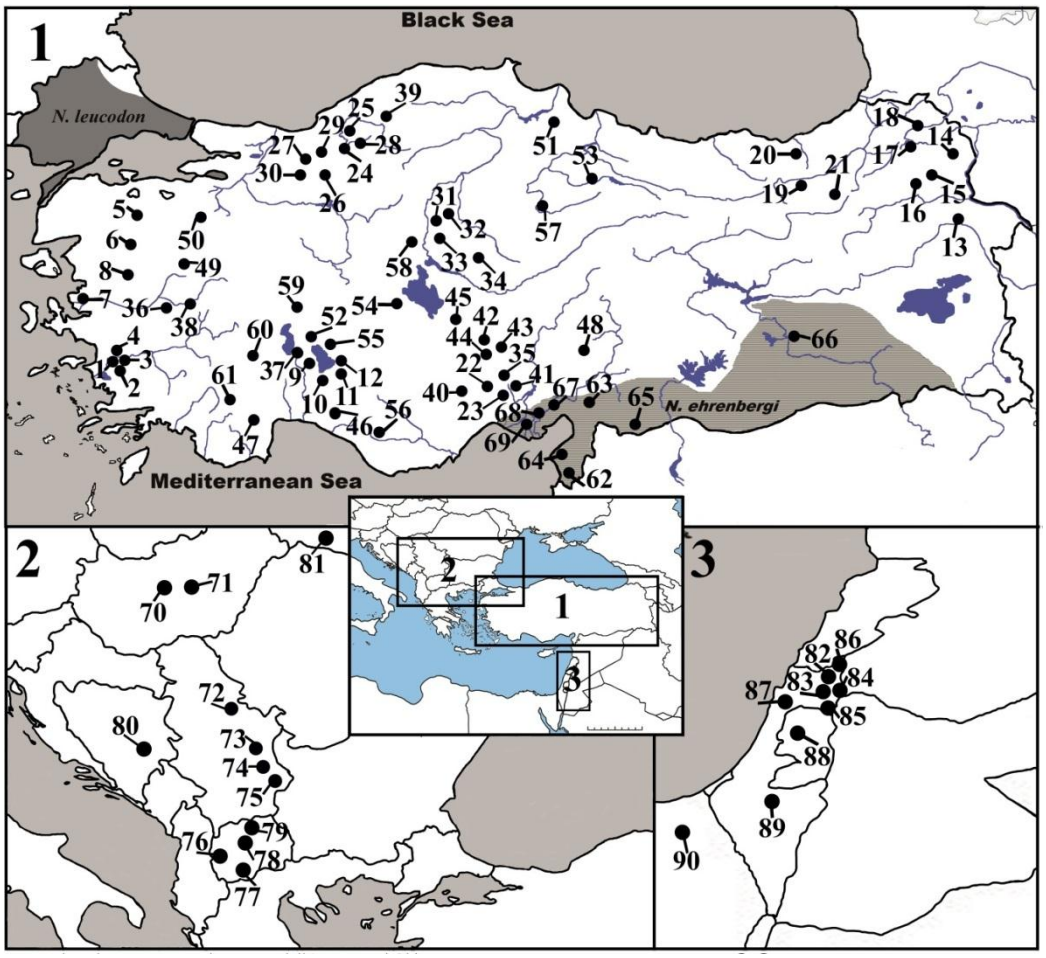
Lokalite No	Müze No Gen Bank No	Cinsiyet	Tür Adı	Lokalite	Kromozom Soy	Cyt-b	BFIBI
Lok 43	35	♀	*N. xanthodon*	TR: Niğde (Çamardı)	2n=58 NF=72	+	+
Lok 44	173	♂	*N. xanthodon*	TR: Niğde (Ulukışla)	2n=58 NF=72	+	+
Lok 44	165	♀	*N. xanthodon*	TR: Niğde (Ulukışla)	2n=58 NF=72	+	+
▲ Lok 45	JX451852	-	*N. xanthodon*	TR: Aksaray (Güzelyurt)	2n = 60	+	
Lok 46	194	♀	*N. xanthodon*	TR: Antalya (Akseki-Salamut Y.)	2n=60 NF=74	+	+
▲ Lok 47	JX451858	-	*N. xanthodon*	TR: Antalya (Çığlıkara)	2n = 60	+	
Lok 48	198	♂	*N. xanthodon*	TR: Kahramanmaraş (Göksun)	2n=60 NF=74	+	+
Lok 49	6145	♂	*N. xanthodon*	TR: Kütahya (Simav-Küplüce Köyü)	2n=60 NF=76		+
Lok 50	6148	♂	*N. xanthodon*	TR: Bilecik (Bozüyük)	2n=60 NF=76	+	+
Lok 51	5049	♀	*N. xanthodon*	TR: Samsun (Kavak)	2n=60 NF=78	+	+
Lok 52	4790	♂	*N. xanthodon*	TR: Isparta (Madenli-Gelendost)	2n=60 NF=78	+	+
Lok 53	4644	♀	*N. xanthodon*	TR: Sivas (Yıldızeli)	2n=60 NF=80	+	+
Lok 54	4541	♂	*N. xanthodon*	TR: Konya (Cihanbeyli)	2n=60 NF=80		+
▲ Lok 54	JX451853	-	*N. xanthodon*	TR: Konya (Cihanbeyli)	2n=60 NF=80	+	
▲ Lok 55	JX451859	-	*N. xanthodon*	TR: Konya (Hüyük)	2n=60	+	
▲ Lok 56	JX451860	-	*N. xanthodon*	TR: Konya (Hadim)	2n=60	+	
Lok 57	5289	♀	*N. xanthodon*	TR: Yozgat (Saraykent)	2n=60 NF=80	+	+
Lok 58	4534	♂	*N. xanthodon*	TR: Ankara (Bala)	2n=60 NF=80	+	+
Lok 59	5563	♀	*N. xanthodon*	TR: Afyon (Eber Gölü)	2n=60 NF=82	+	+
Lok 60	6253	♂	*N. xanthodon*	TR: Burdur (Harmanlı Köyü-Yeşilova)	2n=60 NF=84		+
Lok 61	6234	♀	*N. xanthodon*	TR: Denizli (Çameli-Bıçaklı Köyü)	2n=60 NF=84	+	
Lok 62	39	♀	*N. ehrenbergi*	TR: Hatay (Şenköy- Çatbaşı mevki)	2n=48 NF=74	+	+
Lok 62	45	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Hatay (Şenköy- Çatbaşı mevki)	2n=48 NF=74	+	+
Lok 62	46	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Hatay (Şenköy- Çatbaşı mevki)	2n=48 NF=74	+	+
Lok 62	50	♀	*N. ehrenbergi*	TR: Hatay (Şenköy- Çatbaşı mevki)	2n=48 NF=74	+	
Lok 62	51	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Hatay (Şenköy- Çatbaşı mevki)	2n=48 NF=74	+	
Lok 63	40	♀	*N. ehrenbergi*	TR: Osmaniye (Bahçe-Budacık Köyü)	2n=52 NF=74	+	+
Lok 63	44	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Osmaniye (Bahçe-Budacık Köyü)	2n=52 NF=74	+	+
Lok 63	49	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Osmaniye (Bahçe-Budacık Köyü)	2n=52 NF=74	+	+
Lok 63	53	♀	*N. ehrenbergi*	TR: Osmaniye (Bahçe-Budacık Köyü)	2n=52 NF=74		+
Lok 64	47	♀	*N. ehrenbergi*	TR: İskenderun (Arsuz-Karahüseyinli)	2n=52 NF=74	+	
Lok 64	48	♀	*N. ehrenbergi*	TR: İskenderun (Arsuz-Karahüseyinli)	2n=52 NF=74	+	
Lok 65	217	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Kilis (10 km Doğu)	2n=52 NF=74	+	
▲ Lok 66	AJ311138	-	*N. ehrenbergi*	TR: Diyarbakır	2n=52	+	
▲ Lok 66	AJ389537	-	*N. ehrenbergi*	TR: Diyarbakır	2n=52	+	
Lok 67	52	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Adana (Çukurova Üni. Kampüs)	2n=56 NF=72	+	

Çizelge 3.2. (Devam)

Lokalite No	Müze No Gen Bank No	Cinsiyet	Tür Adı	Lokalite	Kromozom Soy	Cyt-b	BFIBI
Lok 68	229	♀	*N. ehrenbergi*	TR: Adana (Şeyhmurat)	2n=56 NF=72	+	+
Lok 69	221	♂	*N. ehrenbergi*	TR: Mersin-Tarsus	2n=56 NF=72	+	+
▲ Lok 70	JN656387	-	*N. l. hungaricus*	H: Macaristan	2n = 48	+	
▲ Lok 71	JN656387	-	*N. l. transsylvanicus*	H: Macaristan	2n = 50	+	
▲ Lok 72	JX451842	-	*N. l. hungaricus*	SRB: Sırbistan (Grebenac)	2n = 48	+	
▲ Lok 72	JX451843	-	*N. l. hungaricus*	SRB: Sırbistan (Grebenac)	2n = 48	+	
▲ Lok 73	JX451844	-	*N. l. Serbicus*	SRB: Sırbistan (Alecsinac)	2n = 54	+	
▲ Lok 74	JX451845	-	*N. l. Serbicus*	SRB: Sırbistan (Bela Palanka)	2n = 54	+	
▲ Lok 75	JX451846	-	*N. l. Serbicus*	SRB: Sırbistan (Dimitrovgrad)	2n = 54	+	
▲ Lok 76	JX451834	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Bistra)	2n = 52	+	
▲ Lok 76	JX451835	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Bistra)	2n = 52	+	
▲ Lok 77	JX451836	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Pelister)	2n = 52	+	
▲ Lok 77	JX451837	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Pelister)	2n = 52	+	
▲ Lok 77	JX451838	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Pelister)	2n = 52	+	
▲ Lok 77	JX451839	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Pelister)	2n = 52	+	
▲ Lok 77	JX451840	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Pelister)	2n = 52	+	
▲ Lok 78	JX451848	-	*N. l. macedonicus*	MK: Makedonya (Mt. Jakupica)	2n = 52	+	
▲ Lok 79	JX451847	-	*N. l. Serbicus*	MK: Makedonya (Skopje, Tekija)	2n = 54	+	
▲ Lok 80	JX451833	-	*N. l. hercegoviensis*	BIH: Bosna-Hersek(Mt. Jahorina)	2n = 54	+	
▲ Lok 81	JN656388	-	*N. leucodon*	UA: Ukrayna	2n = 56	+	
▲ Lok 82	JX451825	-	*N. galili*	IL: İsrail (Kerem Ben Zimra)	2n = 52	+	
▲ Lok 82	JX451827	-	*N. galili*	IL: İsrail (Kerem Ben Zimra)	2n = 52	+	
▲ Lok 83	JX451826	-	*N. galili*	IL: İsrail (Dalton)	2n = 52	+	
▲ Lok 84	JX451828	-	*N. golani*	IL: İsrail (Al Quenitra)	2n = 54	+	
▲ Lok 84	JX451829	-	*N. golani*	IL: İsrail (Al Quenitra)	2n = 54	+	
▲ Lok 85	JX451830	-	*N. golani*	IL: İsrail (El Al)	2n = 54	+	
▲ Lok 86	JX451831	-	*N. golani*	IL: İsrail (Mt. Hermon)	2n = 54	+	
▲ Lok 86	AF155871	-	*N. golani*	IL: İsrail (Mt. Hermon)	2n = 54	+	
▲ Lok 87	JX451821	-	*N. carmeli*	IL: İsrail (Mukhraka)	2n = 58	+	
▲ Lok 87	JX451832	-	*N. carmeli*	IL: İsrail (Mukhraka)	2n = 58	+	
▲ Lok 88	JX451822	-	*N. judai*	IL: İsrail (Anza)	2n = 60	+	
▲ Lok 89	JX451823	-	*N. judai*	IL: İsrail (Lahav)	2n = 60	+	
▲ Lok 90	JX451824	-	*N. aegyptiacus*	ET: Mısır	2n = 60	+	

Çizelge 3.2. (Devam)

Lokalite No	Müze No Gen Bank No	Cinsiyet	Tür Adı	Lokalite	Kromozom Soy	Cyt-b	BFIBI
▲Lok91	KF021251	-	*Spalax graceus s. str*	ROM: Romanya (David Valey)	2n=?	+	
▲Lok92	KF021253	-	*Spalax graceus s. str*	ROM: Romanya (Delalul kri)	2n=?	+	
▲Lok93	KF021254	-	*Spalax arenarius*	UA: Ukrayna (Khersa, Tzurupsnsk)	2n=?	+	
▲Lok94	KF021255 KF021262	-	*Spalax arenarius*	UA: Ukrayna (Khersa, Tzurupsnsk)	2n=?	+	
▲Lok95	KF021256	-	*Spalax antiquus*	ROM: Romanya (Aiton)	2n=?	+	
▲Lok96	KF021257	-	*Spalax antiquus*	ROM: Romanya (Sanduleşti)	2n=?	+	
▲Lok97	KF021258 KF021259	-	*Spalax microphtalmus*	UA: Ukrayna (Novomoszkovs)	2n=?	+	
▲Lok98	KF021260 KF021261	-	*Spalax zemni*	UA: Ukrayna (Krivij Rig)	2n=?	+	
▲Lok99	KF021263	-	*Spalax antiquus*	ROM: Romanya (Budeşti)	2n=?	+	



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan *Nannospalax* cinsi körfare örneklerinin alındığı bölgeler (1), ve çalışmada kullanılan Genbank dizilerinin alındığı bölgeleri (2-3) gösteren harita.

3.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan örneklerin muhafazası için buzdolabı ve derin dondurucular kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve genetik çalışmalar esnasında pHmetre, otoklav, su banyosu, saf su cihazı, hassas terazi, magnetik karıştırıcı, mikrodalga, santrifüj, PCR cihazı, DNA elektroforesis tankı, spektrofotometre ve jel görüntüleme cihazından yararlanılmıştır.

3.3 Örneklerin Mitokondriyal DNA İzolasyonu

Çalışılan *Nannospalax* cinsi örneklerinin kas, böbrek ve karaciğer dokularından DNA izole edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi yapılıncaya kadar dokular alkol içerisinde muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için, ayrı zamanlarda ve farklı laboratuarlarda çalışılmasından dolayı iki yöntem kullanılmıştır. İlk çalışılan 52 örnek için Doyle ve Doyle (1991) metodu modifiye edilerek "CTAB DNA İzolasyon" metodu uygulanmıştır. Diğer 45 örnek için ise Spin-Column Protokol (DNeasy Tissue Handbook, 2004, QIAGEN) kullanılmıştır.

A. CTAB İzolasyon Prosedürü;

1. Örneklere ait dokular küçük parçalara ayrılır ve üzerine 200 µl CTAB tamponu (Kloroform, Tris-HCl EDTA, NaCl) eklenerek doku tamamen homojen hale gelinceye kadar homojenize çubuklar ile ependorf tüp içerisinde ezilir.
2. Homojenize edilen dokuların üzerine 400 µl CTAB ve 50 µl BEM (BC-Merkaptoetanol) ilave edilir ve 10 sn. vortekslenir.
3. Ependorf tüpler 65^0C'ye ayarlanmış su banyosunda 1 saat inkübe edilir.
4. 500 µl C:IAA (24:1) eklenerek karışım süte benzer bir kıvam alıncaya kadar hafifçe karıştırılır.
5. 13000 rpm'de $+4^0$C'de 15 dk. santrifüj edilir.
6. Santrifüj işleminin ardından alınan tüplerin üst fazında DNA bulunmaktadır. Dikkatli bir şekilde alınan tüpler soğuk buz üzerine konur. Ardından üst faz pipet yardımı ile alınarak yeni ependorf tüplere aktarılır.
7. Tüp içerisinde bulunan DNA karışımı üzerine buzdolabında 20^0C'de bekletilen İzopropanol'den 500 µl eklenir ve karışması sağlanır.
8. -20^0C'de bir gece bekletilen tüpler ertesi gün alınarak 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.

9. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım atılır ve tüp içinde bulunan pellet %70'lik ve %100'lük etanol ile 2-3 kez yıkanarak laminar flow kabin içerisinde bir gece kurumaya bırakılır.
10. Elde edilen ve kuruyan DNA 100 µl TE (Tris-EDTA) tampon eklenmek suretiyle çözülür, +4^{0}C'de bir gece bekletilir.
11. Çözünen DNA'ya 2 µl Ribonükleaz (RNAse) eklenir ve sonra -20^{0}C'ye alınır.

DNA İzolasyonunda 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_2O	58 ml

Bütün maddeler karıştırılır ve ısıtılmak suretiyle

TE Buffer :

1 M Tris- HCl (pH:8,0)	1 ml
0,5 M EDTA (pH:8,0)	2 ml
dH_2O	97 ml

Hazırlanan çözelti en az bir saat süre ile otoklavda

B. Spin-Column Protokolü:

1. Ependorf tüp içerisine dokulardan alınan küçük parçalar konur.
2. 20 µl Proteinaz-k eklenir ve vortekslenir ve bütün dokunun solüsyonun içinde olduğundan emin olunması için kontrol edilir.
3. 500 rpm'de 56^{0}C'ye ayarlanan çalkalamalı inkübatöre konulur ve minimum üç saat beklenir. Bu süre içerisinde birkaç kez vorteksleme işlemi yapılır.
4. İnkübasyon işleminin ardından 200 µl Buffer AL eklenir ve vortekslenir.
5. %96-100'lük 200 µl etanol eklenir ve vortekslenerek karışması sağlanır.
6. DNAeasy minispin kolumn tüplerine mikropipet yardımı ile ependorf tüplerde bulunan bütün sıvı aktarılır.
7. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılır ardından collection tüp çöpe atılır.
8. Yeni collection tüp içerisine alınan spin columnun üzerine 5100 µl Buffer AW1 (wash buffer 1) eklenir.
9. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır, collection tüp değiştirilir.
10. 500 µl Buffer AW2 (wash buffer 2) ilave edilir.

11. 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilir ve santrifüj sonrası alınan spin column yeni ependorf tüpe yerleştirilir.

12. 200 µl Buffer AE (Elotion Buffer) eklenir. 5 dakika bekleme sonrası 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek saf DNA elde edilerek işlem sonlandırılır.

13. Elde edilen DNA'lar numaralandırılmış ependorf tüplere alınarak $+4^0$C'de saklanır.

3.4 Nanodrop ile DNA miktarının belirlenmesi

Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen DNA'nın saflık ve miktar tayini Biospec-nano Spektrofotometre cihazı ile elde edilmiştir. Spektral yöntem, nükleotidlerde bulunan heterosiklik halkaların taşıdığı 260 nm dalga boyunda ışığı emme özelliği sayesinde, bu dalga boyundaki nükleik asitlerin absorblama miktarının bir ölçüsüdür.

Bunun için öncelikle kullanılan cihaza 2 µl ddH_2O konarak spektrofotometreye yerleştirilmiş ve cihaz sıfırlanarak ölçüme hazır hale gelmiştir. Ardından ekstraksiyonu yapılan örneklerden 3'er µl alınarak spektrofotometre cihazında ölçümleri yapılmıştır. Çizelge 3.3.'de bazı örneklere ait sonuçlar verilmiştir. Ayrıca örneklerin sahip olduğu DNA miktarı çok fazla olduğu için en iyi sonucu alabilmek adına çeşitli oranlarda (1/20, 1/50, 1/100, 1/200) dilüe edilmiş ve en iyi bant görünümü veren oran çalışmadaki tüm örnekler için kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Bazı örneklere ait nanodrop ölçüm sonucu elde edilen DNA miktarları.

Örneğe ait numara	Nanodrop ile alınan sonuç
6135	1094,37
6254	1173,14
6363	451,16
4913	859,37
6232	765,15
6140	138,86
6204	175,26
6251	105,70

3.5 Genomik DNA, mt DNA ve Kullanılan Primerler

Bu çalışmada, nükleer gen olarak nükleer genlerden Beta Fibrinojen genin intron 7 bölgesi çalışılmıştır. Bu bölgeyi çoğaltabilmek için, Seddon vd. (2001) tarafından *Erinaceus europaeus* ve *Erinaceus concolor* türleri üzerine yaptıkları çalışmada kullanılan BFIBR1 ve BFIBR2 primer çifti tercih edilmiş ve bu primerlerle nükleer gen BFIBR gen bölgesinin yaklaşık 750 bp'lik kısmı çoğaltılmıştır. Mitokondriyal DNA'nın sitokrom bölgesi içinse

evrensel primerler olan ve daha önce Kocher vd. (1989), Kryštufek vd. (2012) tarafından da kullanılmış olan L14727-SP (ileri primer) ve H15497-SP (geri primer) primer çifti kullanılmıştır. Bu yüzden yeniden primer dizayn edilmemiştir (Çizelge 3.4.). Primerler ticari bir firmadan sipariş edilerek PCR için kullanılabilir hale getirilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışılan primerlerin baz dizileri ve çalışılan gen bölgeleri.

Primer adı	Baz uzunluğu (5'-3')	Referans
L14727-SP	5'-GACAGGAAAAATCATCGTTG-3'	Kocher vd., 1989
H15497-SP	5'-TAGTAATTAGTCNGGGTCTCC-3'	Kocher vd., 1989
BFIBR1	5'-TTCACAACGGCATGTTCTTCAG-3'	Seddon vd.,2001
BFIBR2	5'-AANGKCCACCCCAGTAGTATCTG-3'	Seddon vd.,2001

3.6 PCR Amplifikasyonu

PCR ile çalışılan örneklerin beta fibrinojen intron 7 bölgesi ile sitokrom b bölgesi amplifiye edilmesi amaçlanmıştır. PCR amplifikasyonu için Seddon vd. (2001); Nicolas vd. (2012); Ducroz vd. (2001); Latinne vd. (2011, 2012) makalelerinde kullanılan PCR döngü programları ile kullanılan ürün miktarları incelenmiştir. Sonuç olarak modifiye edilerek kullanılabilecek en iyi program ve PCR karışımı hazırlanmaya çalışılmıştır (Çizelge 3.5.).

PCR karışımı içine örneklere ait DNA'lar eklenmiştir ve yapılan PCR'ın güvenilirliğinin kontrolü için bir tüp içerisine örnek konmaksızın yalnızca PCR karışımı eklenerek PCR cihazına dikkatlice yerleştirilmiştir. Amplifikasyon için G-Storm, VWR Unocycler ve eppendorf Mastercycler gradient cihazları kullanılmıştır (Şekil 3.2.). BFIBRI (Beta Fibrinojen) programı için; 94^0C'de 5 dakika ön denaturasyon, 94^0C'de 45 saniye denaturasyon işlemi yapılmıştır. 50^0C'de 1.30 dakika bağlanmayı 72^0C'de 1.40 dakika uzama işlemi izlemiştir.10 dakikalık 72^0C'deki son uzama aşamasıyla son bulan bu program toplam 35 döngüden oluşmaktadır.

Çizelge 3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışımı.

Kimyasallar	Kullanılan miktarlar	Stok
Primer 1 (Forward)	12,5 µl	2mM
Primer 1 (Rewerse)	12,5 µl	2 mM
dNTP	1 µl	10 mM (Promega)
Buffer Tampon	10 µl	5x reaksiyon buffer (Promega)
H_2O	9 µl	-
Taq polimeraz	0,2 µl	5 u/ µl (Promega)
Toplam	50 µl	

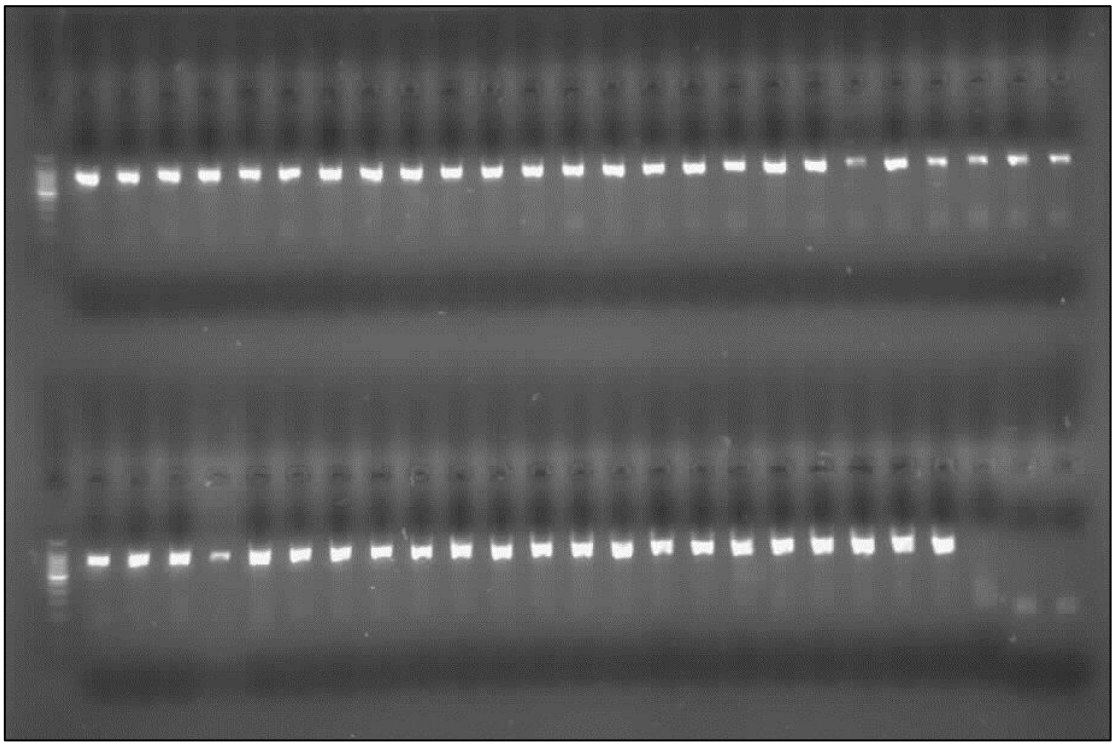
Cyt-b (Sitokrom b) programı için ise; 94^0C'de 2 dakika ön denaturasyon, 94^0C'de 30 saniye denaturasyon işlemi yapılmıştır. 48^0C'de 1 dakika bağlanmayı 72^0C'de 1.30 dakika uzama işlemi izlemiştir. Toplam 40 döngüden oluşan bu program 10 dakikalık 72^0C'deki son uzama aşamasıyla tamamlanmıştır.

Fotoğraf 3.1. Çalışmada kullanılan PCR cihazı.

3.7 PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü

PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jel hazırlanarak kontrol edilmiştir. Bir erlen içerisine 1xTAE (Merc) tamponundan 100 ml alınarak 1,5 gr. agaroz ilave edilmiştir. Mikrodalga içerisinde arada hafifçe karıştırarak köpürüp saydamlaşıncaya kadar yaklaşık 30-40 sn bekletilmiş ve ardından soğuması için soğuk su bulunan kap içerisinde 15 sn süreyle tutulmuştur. Daha sonra 3 µl midori green eklenmiştir. Elektroforez küvetine döküldükten sonra kuyucuk oluşturmak

için taraklar konulmuştur. Jelin donmasıyla birlikte, taraklar çıkartılarak içinde seyreltilmiş 1xTAE Buffer bulunan elektroforesis tankına konmuştur. Jeldeki ilk kuyucuğa 5 µl 100 bp DNA Ladder (Promega) yüklenmiştir. Örnekler ise 3'er µl alınmış ve 3 µl 5x Green Reaction Buffer (yükleme çözeltisi) ile karıştırılarak diğer kuyucuklara yüklenmiştir. En son kuyucuğa örnek eklenmeksizin yalnızca PCR karışımı konarak bant varlığı olup olmadığı kontrol edilmek istenmiştir. Mupid-One Elektroforez Cihazı 20 dakika 100 Voltta çalıştırılmıştır. Amplifiye edilen ürünleri görüntülemek için DNA fragmantlarını boyutlarına göre ayıran agaroz jel elektroforez sisteminin ardından Syngene G-Box Biomaging system kullanılmıştır. CihazınUV ışığı altında jellerde bulunan bantlar görüntülenmiştir (Fotoğraf 3.2.).



Fotoğraf 3.2. Çalışmalar esnasında çekilen örnek bir jel resmi

Fotoğraf 3.3. Çalışmaların yapıldığı Evrimsel Biyoloji Laboratuvarı genel görünüşü.

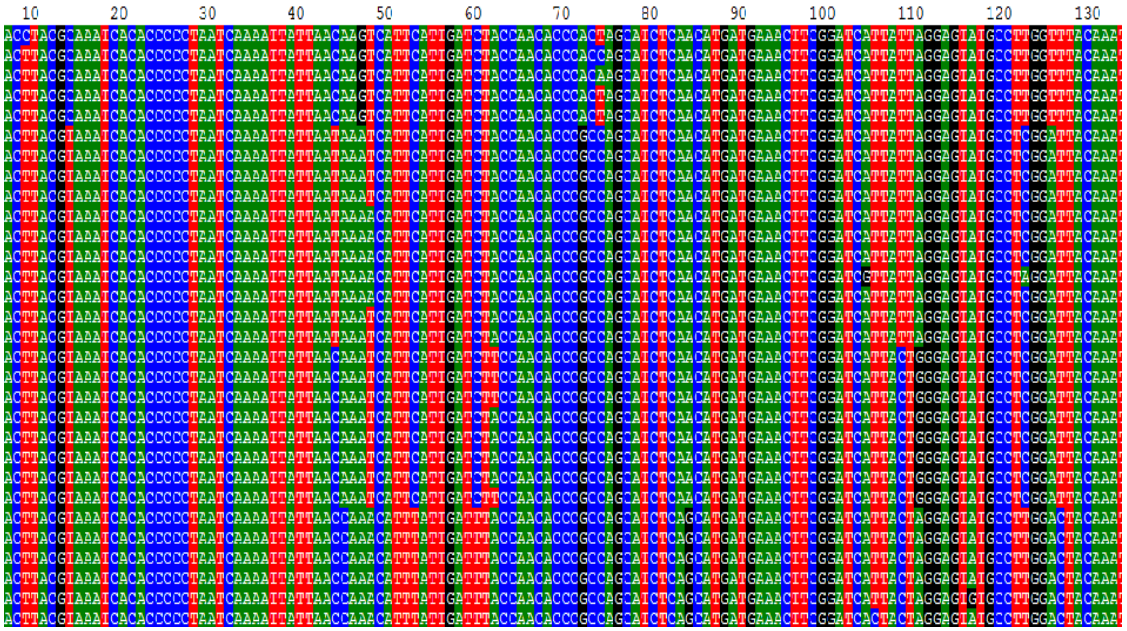
3.8 Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

3.8.1 Sekansların Eldesi

Elde edilen PCR ürünleri Fransa-Paris'e Bibliothèque du Vivant (CNRS, l'INRA ve CEA (Centre National de Séquençage)'eve MacroGen Firması'na (Hollanda)'ya gönderilmiş, burada BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) otomatik sekans aleti kullanılarak, zincir durdurma metodu olarak da bilinen Sanger Yöntemi ile DNA dizileri belirlenmiştir. Bu metoda göre, her bir DNA nükleotidi farklı floresan boya (Big Dye Mix) ile boyanarak, DNA parçaları kolondan geçtikten sonra lazer ışığı yardımıyla DNA bazlarının dizisinin tespiti yapılmıştır. Dizi sonucu elde edilen ham sekans verileri (kramotogromlar) tarafımıza e-mail yoluyla gönderilmiştir.

3.8.2 Sekansların Okunması, Dizi Analizi

Her bir birey için elde edilen sekans sonuçları BioEdit (ver. 7.0.9) (Hall, 1999) programı ile dizilim düzenlenmiştir. Hizalanmaları tamamlanan her bir örnek için ileri primer ve geri primerler için elimizde olan sekanslar yine aynı program ile align edilip birleştirilmiş, uç kısımlardaki bozuk kısımlar atılmıştır. Sahip olunan tüm örnekler için bu işlemin yapılmasının ardından bütün örnekler altalta dizilerek analize hazır hale getirilmiştir (Fotoğraf 3.4.).



Fotoğraf 3.4. Align edilmiş ve altalta dizilmiş haldeki örneklere ait consensus dizileri.

3.8.3 Haplotip çeşitliliği (h) ve Nükleotid Çeşitliliği (π) Hesaplama

Nükleer ve mitokondrial olmak üzere her iki DNA'nın uygun primerlerle çalışılması ve incelenmesi tamamlanan *Nannospalax* örneklerine ait haplotipleri belirlemek için ARLEQUIN (ver. 3.5; Holsinger, 2010) adlı populasyon genetiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta olan analiz programı kullanılmıştır. Ayrıca dnaSP5 (ver. 5; Rozas vd., 2009) programı ile de haplotipler gerek tek tek gerek populasyon ve tür bazında hesaplanmıştır, sonuçlara ARLEQUIN programı ile de ulaşılarak programların doğrulukları teyit edilmiştir.

3.8.4 Network Analizi

DNA hizalama hatalarını engelleme amacı ile kullanılan diğer bir yöntem ise Network Analizi'dir (ver. 4.6; Fluxus, 2012). Network analizi, bu çalışmada örnekler arasındaki bağlantıyı ve ayrıca aynı haplotipe sahip bireyleri daha iyi görmek için kullanılmıştır.

3.8.5 mtDNA Haplotiplerinin Filogenetik Analizleri

Haplotipleri belirlenen örneklerden aynı haplotipe sahip olanlar çıkarılmış ve dış grupların eklenmesiyle birlikte MEGA (ver. 5.2; Kumar vd., 2011) programları ile ve online hizmet

veren phyML montpeiller (ver. 3; Guindon vd., 2010) ile çeşitli ağaçlar çizilmiştir. Bu ağaçlar çizilmeden hemen önce MEGA (ver. 5.2; Kumar vd., 2011) programı ile model teste tabii tutulmuştur.

Model teste sokulan bir data en uygun ağacın çizilebileceği modeli vererek boostrap değerlerinin daha güçlü çıkmasına ve evrimsel soyları araştırılan gruplarda daha destekli sonuçlar elde edebilmemize olanak sağlamaktadır. Ayrıca bu programlar vasıtasıyla örneklerin barındırdığı nükleotid oranları hesaplanmıştır. Bununla birlikte genetik uzaklık analizleri de yapılmıştır.

BÖLÜM IV
BULGULAR

4.1 Mitokondriyal DNA Sitokrom b Bölgesi için Yapılan Analiz Sonuçları

Bu tez çalışmasında kullanılan 48 dişi ve 43 erkek birey olarak toplam 91 *Nannospalax* örneğinin mitokondriyal sitokrom b gen bölgesinin 820 bp uzunluğundaki bölgeden elde edilen DNA dizisinin nükleotid kompozisyonunun Adenin ve Timin bakımından zengin olduğu görülmüştür. % 30.1 Timin, % 24.9 Sitonin, % 31.2 Adenin ve % 13.8 Guanin içermektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsine ait tüm örneklerde 757 pozisyonda nükleotit değişimi meydana gelmiştir. Transisyon/transversiyon oranı pürinler (Adenin ve Guanin) için k_1= 1.722, pirimidinler (Timin, Urasil, Sitozin) için k_2= 10.901 olarak belirlenmiştir. Toplam transisyon/transversiyon oranı yani R değeri R= [A*G* k_1 + T*C* k_2] / [(A+G) * (T*C)] formülü ile 4.619 olarak hesaplanmış olup tüm nükleotidlerin yer değişim oranları Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Nükleotidler arasındaki transisyon/ transversiyon değişim oranları (koyu yazılan değerler transisyon değişim oranlarını ifade eder, italik yazılan değerler ise transversiyon oranlarını göstermektedir).

	A	**T**	**C**	**G**
A	-	*2.81*	*2.32*	**3.27**
T	*2.9*	-	**32**	*1.29*
C	*2.9*	**38.76**	-	*1.29*
G	**7.34**	*2.81*	*2.32*	-

Bilindiği üzre transisyon ve transversiyon olarak iki şekilde DNA nokta mutasyonları gerçekleşmektedir. Transisyon nükleotid değişimleri pürin bazların pirimidin bazlara ya da pirimidin bazların pürinlere değişimini ifade etmektedir. Çalışılan DNA dizilerinin transisyon/transversiyon oranınının belirlenmesi, nükleotidlerin yer değişim mekanizmalarının anlaşılmasında büyük önem arz etmektedir.

4.1.1 Sitokrom b gen bölgesi sekans analizi sonuçlarına göre belirlenen haplotipler

Sitokrom b ile çalışılan örnekler dnaSP5 (Rozas vd., 2009) programına fasta format halinde girilerek özgün haplotip listesi elde edilmiş ve Çizelge 4.2.' de verilmiştir. Burada amacımız örnek sayısının çok oluşu nedeni ile ve filogenetik ağacımızda meydana gelebilecek karmaşık görüntünün önüne geçilmesi içindir.

Çizelge 4.2. Sitokrom b sonuçlarına göre elde edilen haplotipleri gösteren liste.

Haplotip Numarası	Örnek Sayısı	Tür	Müze Numaraları	Lokalite
H1	1	*N.xanthodon*	6256	Lok1
H2	1	*N. xanthodon*	6222	Lok1
H3	1	*N. xanthodon*	6251	Lok3
H4	2	*N. xanthodon*	6232, 6215	Lok1, Lok4
H5	4	*N. xanthodon*	6154, 6120, 6144, 6150	Lok5
H6	3	*N. xanthodon*	6138, 6140, 6139	Lok7
H7	1	*N. xanthodon*	6131	Lok8
H8	1	*N. xanthodon*	6132	Lok7
H9	1	*N. xanthodon*	6161	Lok6
H10	1	*N. xanthodon*	6160	Lok5
H11	1	*N. xanthodon*	6210	Lok9
H12	3	*N. xanthodon*	6265, 6206, 6254	Lok9
H13	1	*N. xanthodon*	6219	Lok10
H14	1	*N. xanthodon*	6203	Lok10
H15	2	*N. xanthodon*	6255, 6263	Lok10
H16	1	*N. xanthodon*	6363	Lok13
H17	1	*N. xanthodon*	4887	Lok14
H18	1	*N. xanthodon*	4880	Lok15
H19	1	*N. xanthodon*	5306	Lok17
H20	1	*N. xanthodon*	3322	Lok18
H21	1	*N. xanthodon*	4661	Lok19

Çizelge 4.2. (Devam)

Haplotip Numarası	Örnek Sayısı	Tür	Müze Numaraları	Lokalite
H22	1	*N. xanthodon*	4669	Lok20
H23	1	*N. xanthodon*	3324	Lok21
H24	1	*N. xanthodon*	120	Lok22
H25	3	*N. xanthodon*	123, 173, 165	Lok23, Lok44
H26	1	*N. xanthodon*	3985	Lok25
H 27	1	*N. xanthodon*	4849	Lok23
H28	1	*N. xanthodon*	4830	Lok25
H29	1	*N. xanthodon*	4201	Lok27
H30	1	*N. xanthodon*	4202	Lok27
H31	1	*N. xanthodon*	4825	Lok28
H32	1	*N. xanthodon*	4831	Lok28
H33	1	*N. xanthodon*	4834	Lok28
H34	1	*N. xanthodon*	4936	Lok29
H35	1	*N. xanthodon*	4935	Lok29
H36	1	*N. xanthodon*	4203	Lok30
H37	1	*N. xanthodon*	4572	Lok34
H38	1	*N. xanthodon*	137	Lok35
H39	3	*N. xanthodon*	4916, 4917, 4912	Lok31
H40	1	*N. xanthodon*	5453	Lok32
H41	1	*N. xanthodon*	4913	Lok33
H42	1	*N. xanthodon*	6204	Lok9
H43	1	*N. xanthodon*	6270	Lok37
H44	2	*N. xanthodon*	6135, 6117	Lok36
H45	1	*N. xanthodon*	6224	Lok38
H46	1	*N. xanthodon*	6220	Lok37
H47	1	*N. xanthodon*	6213	Lok37
H48	1	*N. xanthodon*	6151	Lok36
H49	1	*N. xanthodon*	181	Lok41
H50	1	*N. xanthodon*	36	Lok43
H51	1	*N. xanthodon*	35	Lok43
H52	1	*N. xanthodon*	38	Lok42
H53	1	*N. xanthodon*	6148	Lok50
H54	1	*N. xanthodon*	194	Lok46
H55	1	*N. xanthodon*	198	Lok48
H56	1	*N. xanthodon*	5049	Lok51
H57	1	*N. xanthodon*	4790	Lok52

Çizelge 4.2. (Devam)

Haplotip Numarası	Örnek Sayısı	Tür	Müze Numaraları	Lokalite
H58	1	*N. xanthodon*	4644	Lok53
H59	1	*N. xanthodon*	5289	Lok57
H60	1	*N. xanthodon*	4534	Lok58
H61	1	*N. xanthodon*	5563	Lok59
H62	1	*N. xanthodon*	6234	Lok61
H63	1	*N.ehrenbergi*	39	Lok62
H64	1	*N.ehrenbergi*	45	Lok62
H65	1	*N.ehrenbergi*	46	Lok62
H66	2	*N.ehrenbergi*	50, 51	Lok62
H67	2	*N.ehrenbergi*	40, 49	Lok63
H68	1	*N.ehrenbergi*	44	Lok63
H69	2	*N.ehrenbergi*	47, 48	Lok64
H70	1	*N.ehrenbergi*	53	Lok63
H71	1	*N.ehrenbergi*	217	Lok65
H72	1	*N.ehrenbergi*	52	Lok67
H73	1	*N.ehrenbergi*	221	Lok69
H74	1	*N.ehrenbergi*	229	Lok68
H75	1	*N.leucodon*	L1	Lok80
H76	1	*N.leucodon*	L10	Lok76
H77	1	*N.leucodon*	L11	Lok76
H78	2	*N.leucodon*	L12, L6	Lok77, Lok74
H79	1	*N.leucodon*	L13	Lok77
H80	1	*N.leucodon*	L14	Lok77
H81	1	*N.leucodon*	L15	Lok77
H82	1	*N.leucodon*	L16	Lok77
H83	1	*N.leucodon*	L2	-
H84	1	*N.leucodon*	L3	Lok72
H85	1	*N.leucodon*	L4	Lok72
H86	1	*N.leucodon*	L5	Lok73
H87	1	*N.leucodon*	L7	Lok75
H88	1	*N.leucodon*	L8	Lok79
H89	1	*N.leucodon*	L9	Lok78
H90	1	*N.leucodon*	L22	Lok81
H91	1	*N.leucodon*	L23	Lok70
H92	1	*N.leucodon*	L25	Lok71
H93	1	*N.ehrenbergi*	E10	Lok87

Çizelge 4.2. (Devam)

Haplotip Numarası	Örnek Sayısı	Tür	Müze Numaraları	Lokalite
H94	1	*N.ehrenbergi*	E11	Lok88
H95	1	*N.ehrenbergi*	E12	Lok89
H96	1	*N.ehrenbergi*	E13	Lok90
H97	1	*N.ehrenbergi*	E2	Lok82
H 98	1	*N.ehrenbergi*	E3	Lok83
H99	1	*N.ehrenbergi*	E4	Lok82
H100	1	*N.ehrenbergi*	E5	Lok84
H101	1	*N.ehrenbergi*	E6	Lok84
H102	1	*N.ehrenbergi*	E7	Lok85
H103	1	*N.ehrenbergi*	E8	Lok86
H104	1	*N.ehrenbergi*	E9	Lok87
H105	1	*N.ehrenbergi*	E26	Lok86
H106	2	*N.ehrenbergi*	E27, E32	Lok66
H107	1	*N.xanthodon*	X10	Lok40
H108	1	*N.xanthodon*	X11	Lok40
H109	1	*N.xanthodon*	X12	Lok45
H110	1	*N.xanthodon*	X13	Lok54
H111	1	*N.xanthodon*	X14	Lok16
H112	1	*N.xanthodon*	X2	Lok29
H113	1	*N.xanthodon*	X3	Lok11
H114	1	*N.xanthodon*	X4	Lok12
H115	1	*N.xanthodon*	X5	Lok47
H116	1	*N.xanthodon*	X6	Lok55
H117	1	*N.xanthodon*	X7	Lok56
H118	1	*N.xanthodon*	X8	Lok40
H119	1	*N.xanthodon*	X9	Lok40
H120	1	*Spalax graceus*	KF021251	David Valey Rom
H121	1	*Spalax graceus*	KF021252	David Valey Rom
H122	1	*Spalax graceus*	KF021253	Delalul kri Rom
H123	3	*Spalax arenarius*	KF021254, KF021255, KF021262	Khersa, Tzurupsnsk, Ukraine
H124	1	*Spalax antiquus*	KF021256	Aiton, Rom
H125	1	*Spalax antiquus*	KF021257	Sanduleşti, Rom
H126	1	*Spalax microphtalmus*	KF021258, KF021259	Novomoszkovs, Uk
H127	1	*Spalax zemni*	KF021260, KF021261	Krivij Rig, Uk
H128	2	*Spalax antiquus*	KF021263	Budeşti, Rom

4.1.2 Sitokrom-b gen bölgesi için genetik çeşitlilik analiz sonuçları

Çalışılan örnekler tür bazında incelendiğinde en fazla nükleotid çeşitliliğe sahip olan türün *Nannospalax nehringi* olduğu belirlenmiştir. Bu türe ait incelenen 8 örnek için 8 haplotip tespit edilmiş ve haplotip çeşitliliği h= 1.000 olduğu hesaplanmıştır. Nükleotid değişimi ise π= 0.012 bulunmuştur. Diğer polimorfik sitotip 2n= 60 sitotipidir. Bu sitotipte haplotip çeşitliliği h= 1.00 olarak hesaplanmıştır. Nükleotit çeşitliliğinin en yüksek değerleri (sırasıyla π= 0.020 ve 0.053) *N. cilicicus* sitotiplerinde (2n= 60 ve 2n= 58) belirlenmiştir. Diploit kromozom sayısı (2n) bakımından en fazla haplotip çeşitliliği gösteren grup 2n= 60 kromozomal soy içerisinde gözlenmiştir. Bu formda incelenen 15 örneğin hepsi ayrı bir haplotip olarak karşımıza çıkmıştır. Çalışılan her örneğin ayrı nükleotid dizilimine sahip olması nedeniyle haplotip çeşitliliği h= 1.000 olarak belirlenmiştir. Sitotipler arasında haplotip çeşitliliği en yüksek değerleri; Bolu ve civarında yayılış gösteren 2n= 52K sitotipinde, İç Anadolu'da geniş yayılışa sahip olan 2n= 60 sitotipinde, Doğu Anadolu'da bulunan *N. nehringi* türüne ait 2n= 48 ve 50 sitotiplerinde ve Güney Doğu Anadolu bölgesinde yayılış gösteren *N. ehrenbergi* türünün 2n = 56 sitotipinde göstermiştir. En düşük haplotip çeşitlilik değerleri ise Ege Bölgesinde geniş yayılışa sahip olan *N. xanthodon* türünün 2n= 38 sitotipinde (h= 0.8364) gözlenmiştir. Nükleotit çeşitliliği sitotipler arasında en yüksek değerleri *N. cilicicus* türünün 2n = 60 sitotipinde (π= 0.05318) ve *N. ehrenbergi* türünün 2n= 52 sitotipinde (π= 0.02686) göstermiştir. En düşük nükleotit çeşitlilik değeri ise *N. ehrenbergi* türünde 2n = 48 sitotipinde (π= 0.003170) belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

4.1.3 Sitokrom b için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi

Bu tez çalışmasında yapılacak olan analizlerde en iyi sonucu alabilmek adına Mega (ver. 5,2; Kumar vd., 2011) programı vasıtasıyla model testler oluşturulmuştur. Bu çalışmada kullanılabilecek en uygun modeller *Nannospalax* ve *Spalax* cinslerine ait örneklerin çalışıldığı gen bölgelerine göre ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sitokrom b bölgesi için filogenetik ağaçlarda kullanılacak en uygun modelin TN93+G+I olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.3. Sitokrom b gen bölgesi için çalışılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsi örneklerin genetik çeşitlilik değerleri.

Kromozom Soylara Göre			**Türlere Göre**	
Nannospalax xanthadon				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 36	0.9000 +/- 0.1610	0.003567 +/- 0.02611	0.9876 +/- 0.0080	0.0084139 +/- 0.040920
2n = 38	0.8364 +/- 0.0887	0.014507 +/- 0.008001		
2n = 40	0.9111 +/- 0.0773	0.010128 +/- 0.005787		
2n = 52	1.0000 +/- 0.0340	0.015476 +/- 0.010565		
Nannospalax cilicicus				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 54	0.8571 +/- 0.1371	0.018871 +/- 0.010904	0.9867 +/- 0.0120	0.060551 +/- 0.029855
2n = 56	0.9663 +/- 0.0772	0.012691 +/- 0.007340		
2n = 58	0.9778 +/- 0.0540	0.020285 +/- 0.011108		
2n = 60	1.0000 +/- 0.0243	0.053180 +/- 0.027284		
Nannospalax nehringi				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 48	1.0000 +/- 0.000	-	1.0000 +/- 0.0625	0.019485 +/- 0.011004
2n = 50	1.0000 +/- 0.0625	0.023353 +/- 0.013089		
Nannospalax ehrenbergi				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n= 48	0.9000 +/- 0.1610	0.003170 +/- 0.002370	0.9706 +/- 0.0278	0.048693 +/- 0.024815
2n= 52	0.9167 +/- 0.725	0.026860 +/- 0.014736		
2n= 56	1.0000 +/- 0.2722	0.011449 +/- 0.008786		

Çizelge 4.4. Sitokrom b için yapılacak analizlerde kullanılması için hesaplanan model test sonucu.

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R
TN93+G+I	**262**	**14056**	**11645**	**-5559.8**	**0.480308**	**0.99227**	**5.2117**
HKY+G+I	261	14060	11659	-5567.4	0.471935	0.91283	5.0533
HKY+G	260	14077	11685	-5581.6	n/a	0.25284	4.9973
TN93+G	261	14077	11676	-5576.1	n/a	0.25788	5.0893
GTR+G+I	265	14087	11649	-5558.8	0.478562	0.99209	4.7283
GTR+G	264	14107	11679	-5574.4	n/a	0.25977	4.6264
T92+G+I	259	14128	11745	-5612.7	0.451491	0.82889	4.8424
T92+G	258	14143	11769	-5625.7	n/a	0.262	4.8091
K2+G+I	258	14200	11826	-5654.1	0.422712	0.71308	4.7402
K2+G	257	14207	11842	-5663.1	n/a	0.25569	4.734
TN93+I	261	14253	11852	-5663.9	0.564545	n/a	4.5966
HKY+I	260	14264	11872	-5674.8	0.566871	n/a	4.5974
GTR+I	264	14285	11857	-5663.4	0.565649	n/a	4.1458
T92+I	258	14340	11966	-5724.2	0.566991	n/a	4.4072
K2+I	257	14424	12060	-5772	0.567921	n/a	4.3354
JC+G+I	257	15119	12754	-6119.2	0.427089	0.81146	0.5
JC+G	256	15125	12770	-6128	n/a	0.27506	0.5
TN93	260	15279	12887	-6182.8	n/a	n/a	3.992
GTR	263	15300	12880	-6176.1	n/a	n/a	3.2614
HKY	259	15305	12922	-6200.9	n/a	n/a	3.9733
JC+I	256	15316	12961	-6223.7	0.566838	n/a	0.5
T92	257	15332	12968	-6225.9	n/a	n/a	3.9673
K2	256	15400	13045	-6265.6	n/a	n/a	3.9586
JC	255	16257	13911	-6699.4	n/a	n/a	0.5

4.1.4 Sitokrom b için neigbour joining (NJ) analiz sonuçları

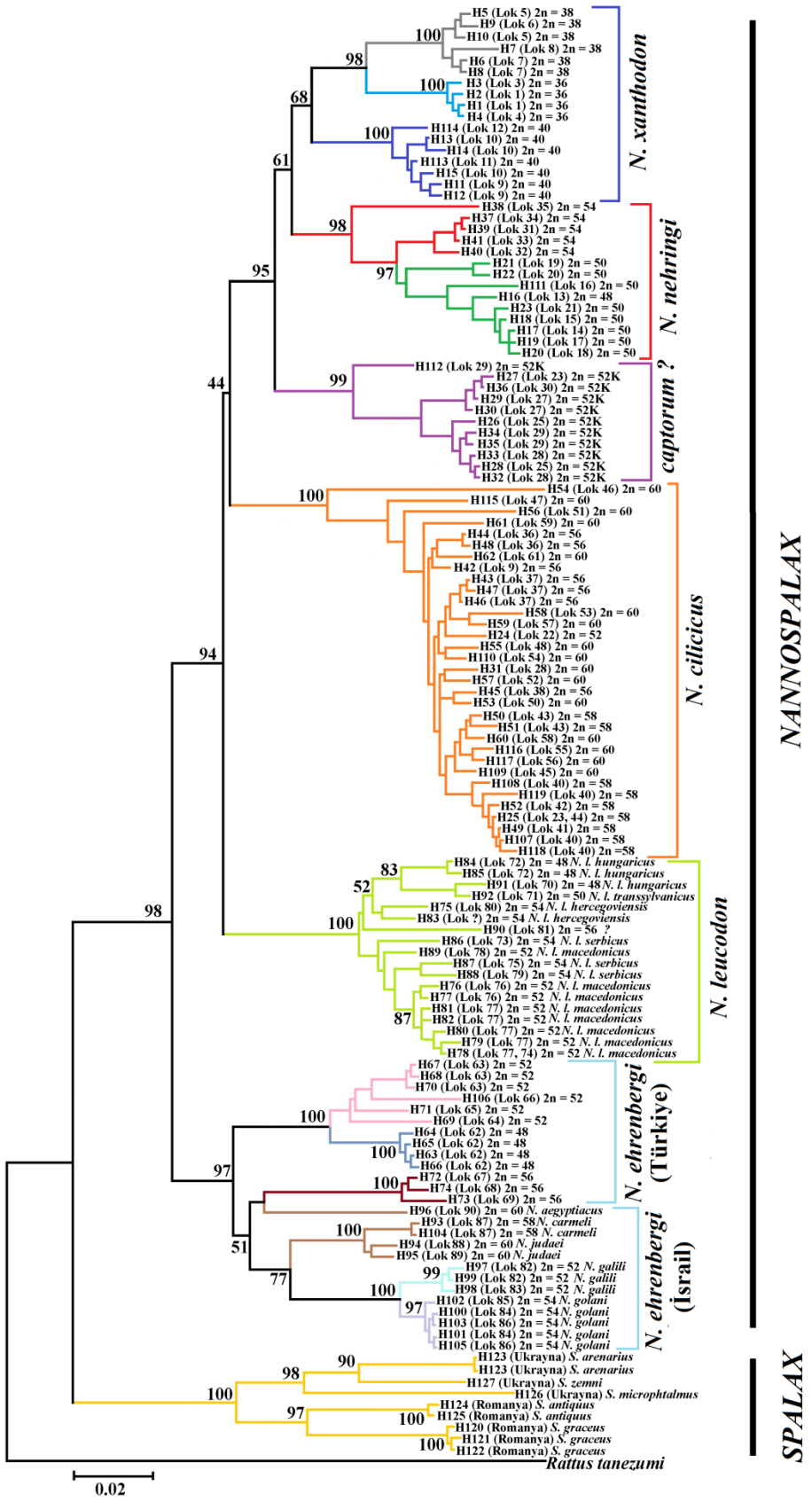
Bu tez çalışmasında mitokondriyal DNA'nın cyt-b gen bölgesinden elde edilen DNA dizileri filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Sitokrom b gen bölgesi için *Nannospalax* cinsi için Türkiye'den*N. cilicicus* (44 örnek), *N. nehringi* (8 örnek), *N. xanthodon* (41 örnek), *N. ehrenbergi* (18 örnek) türleri, Balkanlar'dan *N. leucodon* (18 örnek) türü ve İsrail ve Mısır'dan *N. ehrenbergi* (13 örnek) çalışılmıştır. *Spalax* cinsi için Romanya ve Ukrayna'dan *Spalax graceus* (3 örnek), *Spalax arenarius* (3 örnek), *Spalax antiquus* (3 örnek), *Spalax micropthalmus* (2 örnek) ve *Spalax zemni* (2 örnek) türleri analizlere tabi turulmuştur. Yapılan NJ analizi sonucunda *Nannospalax* ve *Spalax* cinsine ait türler % 98 bootstrap değeri ile birbirlerinden ayrılmış ve ayrı birer monofiletik soy (lineage) oluşturmuşlardır. *Spalax* cinsi içinde bu zamana kadar tanımlanmış olan morfotürler % 90-100 arasında değişen yüksek bootstrap değerleri ile birbirlerinden ayrılarak alt kladlar oluşturmuşlardır. *Nannospalax* cinsine ait örnekler ise oldukça polimorfik bulunmuştur. *N. ehrenbergi* türüne ait Güneydoğu

Anadolu örnekleri ve İsrail örnekleri diğer körfare örneklerinden % 98 bootstrap değeri ile ayrılmış ve farklı dalda kümelenmiştir. *N. ehrenbergi* türüne ait Anadolu ve İsrail örnekleri ise % 97 bootstrap değeri ile birbirlerinden farklı bulunmuştur. Ayrıca İsrail'den tanımlanmış olan *N. judaei* (2n= 60), *N. carmeli* (2n= 58), *N. galili* (2n= 52) ve *N. golani* (2n= 54) türleri ve Mısır'dan tanımlanan *N. aegyptiacus* (2n= 60) türleri kendi içinde alt dallanma göstererek % 51-100 arasında değişen yüksek bootstrap değeri ile birbirlerinden ayrı olarak kümelenmişlerdir. Anadolu örneklerinden 2n= 36, 38 ve 40 diploid kromozom değerine sahip örnekler *N. xanthodon* türü altında değerlendirilmiş ve ortak bir dalda kümelenmişlerdir. Doğu Anadolu'da ve İç Anadolu'nun doğusunda yayılış gösteren 2n= 48, 50 ve 54 diploid kromozom değerine sahip örnekler *N. nehringi* türü altında sınıflandırılmış ve % 98 bootstrap değeri ile *N. xanthodon* örneklerinden ayrılmıştır. Bolu ve civarında geniş yayılış gösteren 2n= 52 diploid kromozom sayısına sahip olan populasyonlar *N. nehringi* ve *N. xanthodon* türlerinden % 95 bootstrap değeri ile ayrı bulunmuş ve bu bölgeden daha önce tanımlanan alttür olan *N. monticola captorum*'un adı bu örnekler için kullanılmıştır. Günümüzde *N. xanthodon* türü altında sınıflandırılan ve İç Anadolu'da geniş yayılış gösteren 2n= 52, 56, 58 ve 60 diploid kromozom değerlerine sahip olan populasyonlar diğer üç tür (*N. nehringi*, *N. xanthodon* ve *captorum*?)'den yüksek bootstrap değeri ile (% 100) ayrılmış ve farklı bir dalda kümelenmiştir. İç Anadolu'da bulunan bu populasyonlar diğer üç türden farklı bulunmuş ve ayrı bir tür olarak kabul edilmiştir. Bu bölgeden Mehely (1909) tarafından Niğde (Madenköy)'den tanımlanmış olan *N. l. cilicicus*'un en eski takson olduğu belirlendiğinden, bu bölgedeki körfareler *N. cilicicus* tür ismi altında sınıflanmıştır. Balkanlar'da yayılış gösteren *N. leucodon* % 94 bootstrap değeri ile Anadolu körfare örneklerinden ayrı bir dalda kümelenmiştir. *N. leucodon* türü için daha önce tanımlanmış olan alttürler ise alt dallarda ayrı ayrı kümelenmişlerdir. NJ analizleri Anadolu'da tek bir türün değil (*N. xanthodon*) birden fazla türün varlığını göstermektedir (Şekil 4.1.).

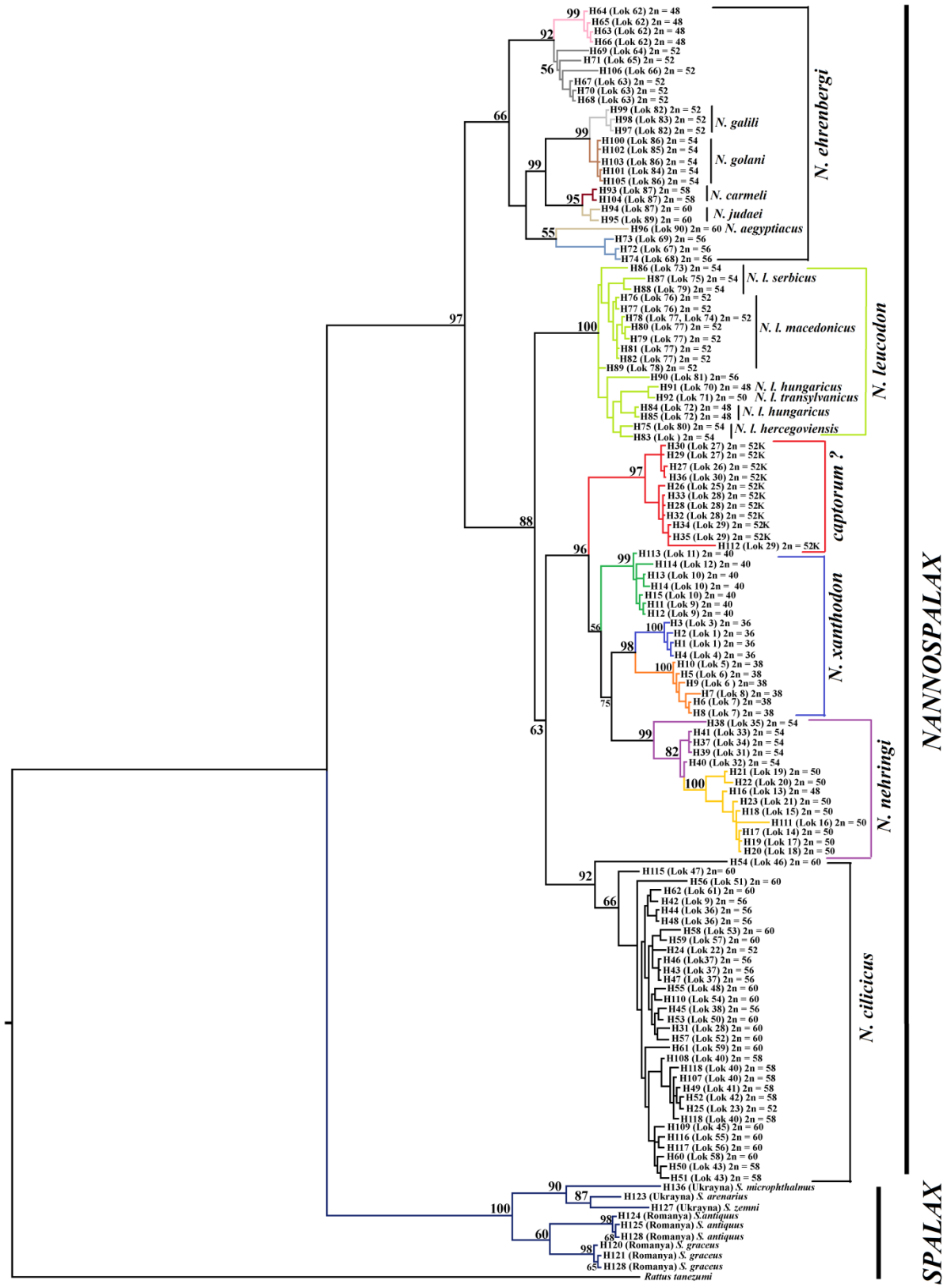
4.1.5 Sitokrom b için maksimum likelihood (ML) analiz sonuçları

NJ analizinde kullanılan örnekler ML filogenetik analiz için de kullanılmıştır. Bu analizde de *Spalax* ve *Nannospalax* cinsleri ayrı birer monofiletik grup oluşturmuş ve iki ayrı soy (lineage) halinde kümelenmiştir. Her iki cinstede alt dallanmalar NJ analizinde elde edilen sonuçlarla benzer bulunmuştur. Her iki filogenetik ağaçta da İç Anadolu (2n= 52, 56, 58 ve 60) körfare örnekleri haricinde diğer bütün sitotipler ayrı dallarda bağımsız olarak kümelenmişlerdir. Her iki analizde de *N. xanthodon* (2n= 36, 38, 40) türüne ait populasyonlar, 2n= 52 *captorum* ve *N. nehringi* türüne ait populasyonlar ile daha yakın ilişkili bulunmuş ve yakın dallarda kümelenmiştir. İç Anadolu'da geniş yayılış gösteren populasyonlar (2n= 52,

56, 58, 60) diğer körfare populasyonlarına (*N. xanthodon, captorum, N. nehringi*) coğrafik olarak komşu olsa da farklı bir dalda kümelenerek ayrı bir monofiletik grup oluşturmuşlardır. Bu nedenle yüksek diploid kromozom değeri gösteren bu populasyonlar ayrı bir tür altında (*N. cilicicus*) sınıflandırılmıştır. NJ analizine benzer olarak ML analizinde de Doğu Anadolu'da bulunan 2n= 48 ve 50 sitotiplerini içeren *N. nehringi* türü İç Anadolu'nun doğu kısmında Kırıkkale-Kırşehir-Yozgat ve Kuzey Adana'da yayılış gösteren 2n= 54 sitotipine ait populasyonlar ile genetik açıdan yakın ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle 2n= 54 sitotipine ait bireyler *N. nehringi* türü altında sınıflandırılmıştır. Balkanlarda yayılış gösteren *N. leucodon* türü ise İç Anadolu'da bulunan türlerle filogenetik açıdan daha yakın, *N. ehrenbergi* türü ile daha uzak ilişkili bulunmuştur (Şekil 4.2.). Çoğunlukla her iki ağaçta'da aynı diploid kromozom sayısını (2n) gösteren körfare örnekleri bir arada ortak bir dalda kümelenirken, İç Anadolu'da bulunan *N. cilicicus* sitotiplerine (2n= 52, 56, 58 ve 60) ait körfare örneklerinde farklı diploid kromozomlu sitotipler karmaşık (heterojen) bir halde hep beraber kümelenmişlerdir. Bu durum İç Anadolu'da bulunan bu dört sitotipin ortak bir atadan yakın zamanda ayrıldıklarını ve bu nedenle aralarında tür veya alttür seviyesinde farklı genetik yapı biriktiremediklerini göstermektedir. Buna karşın diğer türlerin sahip oldukları sitotipler tür/alttür seviyesinde genetik farklılığa sahiptir (Şekil 4.2.).



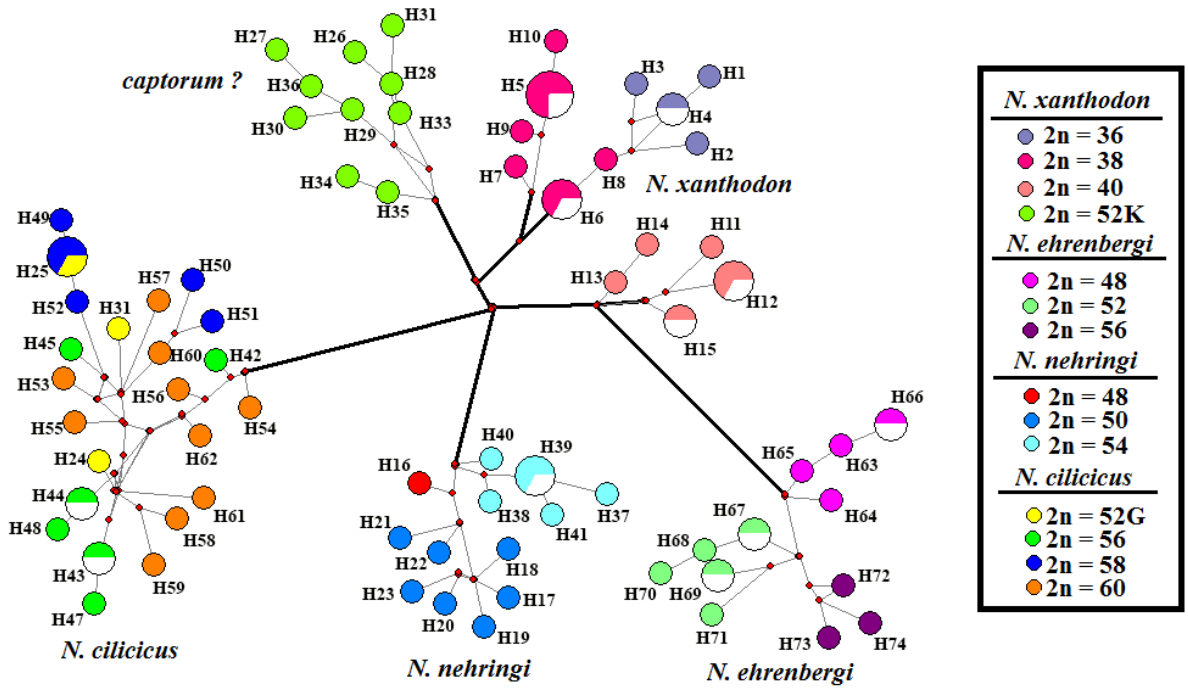
Şekil 4.1. Sitokrom b gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan neighbour joning (NJ) filogenetik ağacı.



Şekil 4.2. Sitokrom b gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan maksimum likelihood (ML) filogenetik ağacı.

4.1.6 Sitokrom b gen bölgesine ait network analizi sonuçları

Sitokrom b gen bölgeleri incelenerek sekans analizi yapılan ve Bioedit (ver 7.0.9, Hall, 1999) programı vasıtasıyla fasta format haline getirilen örneklere ait nükleotit dizileri, dnasp5 (ver.5, Rozas vd., 2009) programı ile Phylip formatına çevrilmiş ve ardından Network (ver. 4,6; Fluxus) programı ile network analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda ağaçlarda elde edilen bulgularla network analizi sonucu elde edilen bulguların tamamen örtüştüğü gözlenmiştir. Aynı türe ait bireyler aynı kolda kümelenirken, aynı haplotipe sahip bireyler de daha büyük daireler meydana getirmişlerdir. Şekil 4.3.'de sitokrom b gen bölgesi çalışılan 91 örneğe ait network ağacı verilmiştir. Bu analiz sonucunda da Türkiye'de şuan kabul edilen morfolojiye dayalı sınıflandırmanın yanlış bir yaklaşım olduğu belirgin şekilde görülmektedir. *N. ehrenbergi* haricinde tüm Anadolu'nun tek bir tür ile (*N. xanthodon*) temsil edilemeyecek kadar farklı populasyonlardan oluştuğu network analizinde çok belirgin olarak görülmektedir. Özellikle İç Anadolu körfare populasyonları, Batı Anadolu körfare populasyonları ve Doğu Anadolu populasyonlarından oldukça farklı bulunmuştur. Haplotip çeşitliliği bakımından bakıldığında en yüksek çeşitlilik *N. cilicicus* türüne ait sitotiplerde görülmektedir. Fakat *N. cilicicus* türünde aynı sitotipe ait haplotipler bir arada ve yakın dallarda kümelenmemiş, diğer sitotiplere ait haplotiplerle birlikte karmaşık bir küme oluşturmuştur. *N. xanthodon* türünde 2n= 36 ve 2n= 38 sitotiplerine ait sitokrom b nükleotit dizilerinin, bu türe ait diğer sitotiplerin nükleotit dizilerine nazaran daha özdeş yapıda olduğu belirlenmiştir. *N. ehrenbergi* türünde çalışılan üç ayrı sitotip (2n= 48, 52, 56) üç farklı haplotip grubu oluşturmuştur. *N. ehrenbergi* türü altında sınıflandırılan bu üç sitotip tür seviyesinde farklılık göstermektedir. NJ ve ML filogenetik analiz sonuçlarına benzer şekilde network analiz sonucunda da İç Anadolu'da bulunan 2n= 54 sitotipi Doğu Anadolu'da bulunan 2n= 48 ve 50 *N.nehringi* sitotipleri ile yakın ilişkili bulunmuş ve bu sitotipe ait haplotipler *N. nehringi* türü içinde kümelenmiştir. Sitokrom b gen bölgesinin sekans analizleri sonucu elde edilen data kullanılarak yapılan network analizi sonucunda da Türkiye körfarelerinin sadece üç tür ile temsilinin hatalı olduğu, bu türlere ilave olarak özellikle Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Bolu ve civarında bulunan körfarelerin (2n= 52) ayrı bir tür seviyesinde genetik farklılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Allopatrik olarak birbirlerinden farklılaşan bu körfare populasyonların içerdikleri farklı sitotipler de aralarında belirgin genetik farklılığa sahiptir.



Şekil 4.3. Sitokrom b gen bölgesine ait network analiz sonuçları.

4.2 Nükleer Beta Fibrinojen İntron 7 Gen Bölgesi için Yapılan Analiz Sonuçları

Türkiyenin çeşitli lokalitelerinden toplanan 69 *Nannospalax* (34 dişi ve 35 erkek) örneğine ait sekans analizi sonucunda 697 pozisyonda nükleotit değişimi belirlenmiştir. Toplam transisyon/transversiyon oranı yani R değeri 1.98 olduğu görülmektedir. Nükleer bir gen olan Beta Fibrinojen İntron 7 lokusunda 750 bç'lik kısım değerlendirilmiş ve bu gen bölgesinden elde edilen DNA dizisinin nükleotid kompozisyonunun Adenin ve Timin bakımından zengin olduğu görülmüştür. Çalışılan 750 bç uzunluğundaki bu gen bölgesi % 30.4 Timin, % 18.0 Sitonin, % 31.3 Adenin ve % 20.1 Guanin içermektedir. Beta fibrinojen intron 7 gen bölgesinde meydana gelen tüm nükleotidlerin yer değişim oranları Çizelge 4.5.'de gösterilmektedir.

4.2.1 Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi sekans analiz sonuçlarına göre belirlenen haplotipler

Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi çalışılan örnekler dnaSP5 (Rozas vd., 2009) programına fasta format halinde girilerek özgün haplotip listesi elde edilmiş ve Çizelge 4.6.' da verilmiştir. *N. xanthodon* ve *N. ehrenbergi* türlerine ait 69 örnekte beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi çalışılmış ve çalışılan 69 örnek için 29 haplotip belirlenmiştir. Belirlenen haplotiplerin 21 tanesi *N. xanthodon* türüne ait bireylerde, 8 tanesi ise *N. ehrenbergi* türüne ait bireylerde gözlenmiştir. Sitokrom b gen bölgesi ile karşılaştırıldığında bu gen bölgesinde

belirlenen haplotip çeşitliliği daha düşüktür. Örnek sayısının az oluşundan dolayı çalışılan beta fibrinojen gen bölgesi için 29 haplotip belirlenmiş olsa da filogenetik analizlerde tüm örnekler kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. Betafibrinojen gen bölgesi nükleotidler arasındaki transisyon/transversiyon değişim oranları (koyu yazılan değerler transisyon değişim oranlarını ifade eder, italik yazılan değerler ise transversiyon oranlarını göstermektedir).

	A	**T**	**C**	**G**
A	-	*4.91*	*3.25*	**12.47**
T	*5.06*	-	**13.39**	*2.92*
C	*5.06*	**20.24**	-	*2.92*
G	**21.64**	*4.91*	*3.25*	-

4.2.2 Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi için genetik çeşitlilik analiz sonuçları

Beta fibrinojen gen lokusunda yaklaşık 750bç uzunluğunda bir bölge çalışılmış ve çalışılan gen bölgesinde genetik çeşitlilik en yüksek *N. ehrenbergi* (h= 0.9778) ve *N. xanthodon* (h= 0.9113) türlerinde belirlenmiştir. En düşük genetik çeşitlilik ise *N. cilicicus* türünde (h= 0.4767) belirlenmiştir. Nükleotit çeşitliliğinin en yüksek değerleri ise *N. ehrenbergi* türünde (π= 0.0017) ve *N. xanthodon* türünde (π= 0.0016) olarak gözlenmiştir. Sitotip düzeyinde incelendiğinde en yüksek haplotip çeşitliliği *N. ehrenbergi* türüne ait 2n= 48 ve 2n= 52 sitotiplerinde (h= 1.00), en düşük *N. cilicicus* türüne ait 2n= 60 sitotipinde (h = 0.1667) gözlenmiştir. Nükleotit çeşitliliğinin en yüksek değerleri ise *N. xanthodon* türüne ait 2n= 40 (π= 0.019) sitotipinde ve 2n = 38 (π= 0.016) sitotipinde gözlenmiştir. Nükleotit çeşitliliğinin en düşük değerleri 2n= 60 sitotipinde π= 0.0007 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7.)

Çizelge 4.6. Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi sekans analiz sonuçlarına göre belirlenen haplotipleri gösteren liste

Haplotip Numarası	Örnek Sayısı	Tür	Müze Numarası	Lokalite
H1	4	*N.xanthodon*	6256, 6251, 6232, 6197	Lok (1, 3, 4, 2)
H2	1	*N.xanthodon*	6144	Lok 5
H3	1	*N.xanthodon*	6150	Lok 5
H4	4	*N.xanthodon*	6140, 6131, 6161, 6160	Lok (7, 8, 6, 5)
H5	1	*N.xanthodon*	6139	Lok 7
H6	1	*N.xanthodon*	6132	Lok 7
H7	3	*N.xanthodon*	6265, 6263, 6254	Lok (9, 10)
H8	1	*N.xanthodon*	6206	Lok 9
H9	1	*N.xanthodon*	6219	Lok 10
H10	1	*N.xanthodon*	6203	Lok 10
H11	1	*N.xanthodon*	6255	Lok 10
H12	4	*N.xanthodon*	4887, 5306, 3322, 3324	Lok (21, 18, 17, 14)
H13	1	*N.xanthodon*	4880	Lok 15
H14	16	*N.xanthodon*	120, 123, 6270, 6220, 173, 181, 198, 6148, 6204, 194, 5049, 4790, 4644, 5289, 4534, 5563	Lok (22, 23, 37, 44, 41, 50, 9, 46, 51, 52, 53, 57, 58, 59)
H15	8	*N.xanthodon*	4009, 4849, 3985, 4202, 4936, 4830, 4834,4203	Lok (26, 28, 30, 29, 27, 25)
H16	1	*N.xanthodon*	4825	Lok 28
H17	1	*N.xanthodon*	4831	Lok 28
H18	3	*N.xanthodon*	5453, 4912, 4913	Lok (32, 31, 33)
H19	1	*N.xanthodon*	6213	Lok 37
H20	2	*N.xanthodon*	35, 38	Lok 43
H21	1	*N.xanthodon*	6253	Lok 60
H22	1	*N.ehrenbergi*	39	Lok 62
H23	1	*N.ehrenbergi*	45	Lok 62
H24	1	*N.ehrenbergi*	46	Lok 62
H25	1	*N.ehrenbergi*	40	Lok 63
H26	1	*N.ehrenbergi*	44	Lok 63
H27	1	*N.ehrenbergi*	49	Lok 63
H28	1	*N.ehrenbergi*	53	Lok 63
H29	2	*N.ehrenbergi*	221, 227	Lok 69

Çizelge 4.7. Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi için çalışılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsi örneklerin genetik çeşitlilik değerleri.

Kromozom Soylara Göre			**Türlere Göre**	
Nannospalax xanthadon				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 36	-	-	0.9113 +/- 0.0405	0.016747 +/- 0.008669
2n = 38	0.9643 +/- 0.0772	0.016521 +/- 0.009483		
2n = 40	0.9524 +/- 0.0955	0.019338 +/- 0.011241		
2n = 52	0.2222 +/- 0.1662	0.000679 +/- 0.000749		
Nannospalax cilicicus				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 54	-	-	0.4767 +/- 0.1154	0.002649 +/- 0.001749
2n = 56	0.6667 +/- 0.3143	0.001018 +/- 0.001252		
2n = 58	0.6000 +/- 0.1753	0.002748 +/- 0.002178		
2n = 60	0.1667 +/- 0.1343	0.000763 +/- 0.000783		
Nannospalax nehringi				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 50	0.5000 +/- 0.2652	0.002290 +/- 0.002013	0.4000 +/- 0.2373	0.001722 +/- 0.001508
Nannospalax ehrenbergi				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n= 48	1.0000 +/- 0.2722	0.005089 +/- 0.004294	0.9778 +/- 0.0540	0.017535 +/- 0.009711
2n= 52	1.0000 +/- 0.1768	0.008906 +/- 0.006280		
2n= 56	0.6667 +/- 0.3143	0.001018 +/- 0.001252		

4.2.3 Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi

Bu çalışmada nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesinin filogenetik anaizleri için kullanılabilecek en uygun modeller *Nannospalax* cinsine ait örneklerin çalışıldığı gen bölgelerine göre ayrı ayrı hesaplanmıştır. Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi için filogenetik ağaçlarda kullanılacak en uygun modelin T92 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Beta fibrinojen intron 7 gen bölgesi analizlerinde kullanılması için hesaplanan model test sonuçları.

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R
T92	**139**	**4880**	**3689.9**	**-1705.4**	**n/a**	**n/a**	**1.7076**
T92+G	140	4884.4	3685.7	-1702.3	n/a	1.15933	2.0212
T92+I	140	4885.2	3686.5	-1702.7	0.297493	n/a	2.0065
K2	138	4888.9	3707.3	-1715.2	n/a	n/a	1.7017
K2+G	139	4893	3702.8	-1711.9	n/a	1.08961	2.0108
K2+I	139	4893.3	3703.2	-1712.1	0.320501	n/a	2.0189
T92+G+I	141	4895	3687.7	-1702.3	0	1.15933	2.0212
HKY	141	4896.8	3689.6	-1703.3	n/a	n/a	1.7086
HKY+G	142	4901.2	3685.4	-1700.2	n/a	1.17762	2.0191
HKY+I	142	4902.1	3686.3	-1700.6	0.293298	n/a	2.0002
K2+G+I	140	4903.5	3704.8	-1711.9	0.042585	1.24169	2.0137
TN93	142	4905.8	3690	-1702.5	n/a	n/a	1.7136
TN93+G	143	4910.6	3686.3	-1699.6	n/a	1.22147	2.0144
HKY+G+I	143	4911.8	3687.4	-1700.2	0	1.17762	2.0191
TN93+I	143	4916.4	3692	-1702.5	0.00001	n/a	1.7136
TN93+G+I	144	4921.2	3688.3	-1699.6	0.010528	1.26229	2.0153
GTR	145	4931.8	3690.3	-1699.6	n/a	n/a	1.7214
GTR+G	146	4934.3	3684.3	-1695.6	n/a	0.87034	2.1918
GTR+I	146	4935.4	3685.4	-1696.2	0.335039	n/a	2.1774
JC	137	4941.8	3768.8	-1746.9	n/a	n/a	0.5
GTR+G+I	147	4944.9	3686.4	-1695.6	0.02348	0.92401	2.1959
JC+G	138	4946.7	3765.2	-1744.1	n/a	1.22141	0.5
JC+I	138	4947.2	3765.6	-1744.3	0.304923	n/a	0.5
JC+G+I	139	4957.3	3767.2	-1744.1	0	1.22142	0.5

4.2.4 Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen için neigbour joining (NJ) analiz sonuçları

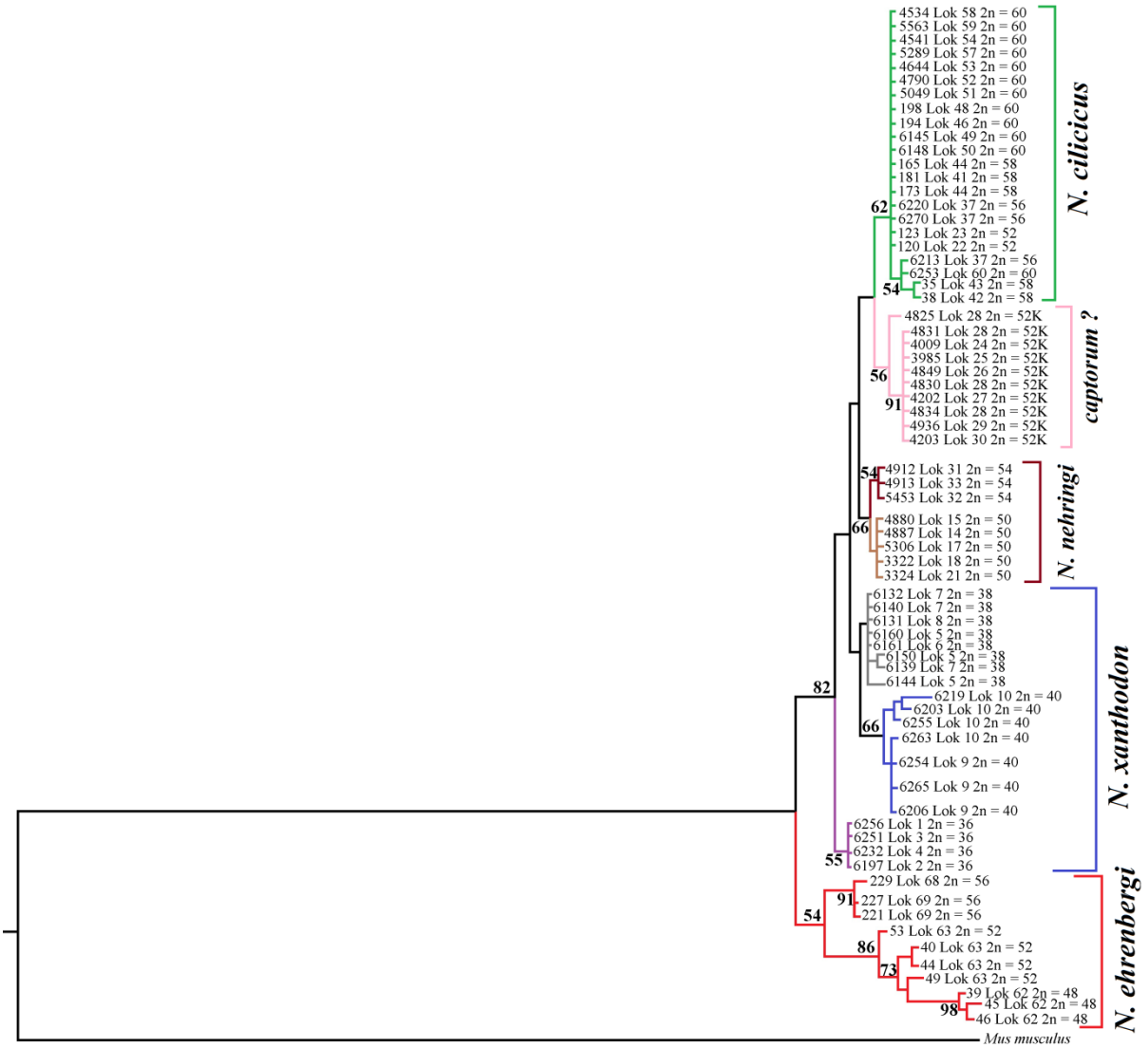
Tür bazında bakıldığında filogenetik analizler Güney Doğu Anadolu populasyonlarını bir grup içinde (*N. ehrenbergi*), Batı Anadolu'da bulunan 2n= 36 sitotipine ait populasyonları ise ayrı bir grup içinde kümelemiş olup bu populasyonları birbirlerinden ve diğer populasyonlardan ayırmıştır. Bu bölgeler haricinde Anadolu'nun tamamında bulunduğu kabul edilen *N. xanthodon* türü ise oldukça polimorfik bir yapı sergilemiştir. *N. xanthodon* türü içindeki populasyonlar diploid kromozom sayıları ve coğrafi konumları bakımından hem birbirlerinden hem de diğer türlere ait populasyonlardan ayrılmışlardır. İç Anadolu bölgesinde yayılış gösteren kromozomal soylar (2n= 52G, 56, 58 ve 60) ortak bir dalda kümelenirken, Batı Anadolu'da yayılış gösteren kromozomal soylar (2n= 38, 40) ayrı dallarda, Doğu Anadolu'da yayılış gösteren kromozomal soylar ise (2n= 48, 50, 54) ayrı dalda kümelenmişlerdir (Şekil 4.4.).

Kimura-2-parametresi model alınarak oluşturulan NJ analizi sonucunda *N. ehrenbergi* türü, diğer kromozomal soy ve türlerden % 54 bootstrap değeriyle iki ayrı dalda kümelenmiştir. Diğer alt dalda *N. nehringi* türü, *N. xanthodon*ve *N. cilicicus* türünün tüm kromozom soylarına ait bireyler ayrı gruplar içinde kümelenerek ayrı bir dalda gruplar oluşturmuştur. Bu ana dal içinde *N. cilicicus* türü bireyleri % 62 güvenirlikle ayrı bir dalda kümelenmiştir. *N.xanthodon* türünün sinonimi olarak kabul edilen Doğu Anadolu kromozomal soylarını (2n = 48, 50, 54) içine alan *N. nehringi* türü % 66 güvenilirlikle bir dalda, düşük kromozom sayılarına sahip olan Batı Anadolu kromozomal soylarını içeren *N. xanthodon* % 82 güvenilirlikle ayrı bir dalda kümelenmiştir. Bu türlerin haricinde *N. xanthodon* içinde sınıflandırılan diğer kromozomal soylar (2n= 36, 38, 40) ve 2n= 52K aynı ana daldan yüksek bootstrap değerleriyle ayrı ayrı dallarda kümelenmişlerdir. Bu durum *N. xanthodon* içindeki bu kromozomal soyların ayrı tür seviyesinde farklılığa sahip olduğunu göstermektedir. Diğer *N. xanthodon* kromozomal soylarından farklı olarak İç Anadolu'da Kızılırmak Havzası içinde yayılış gösteren 2n= 54 kromozomal formu *N. nehringi* populasyonları ile birlikte kümelenmiştir fakat bu alt daldan % 54 güvenilirlikle ayrı bir grup oluşturmuştur (Şekil 4.8.).

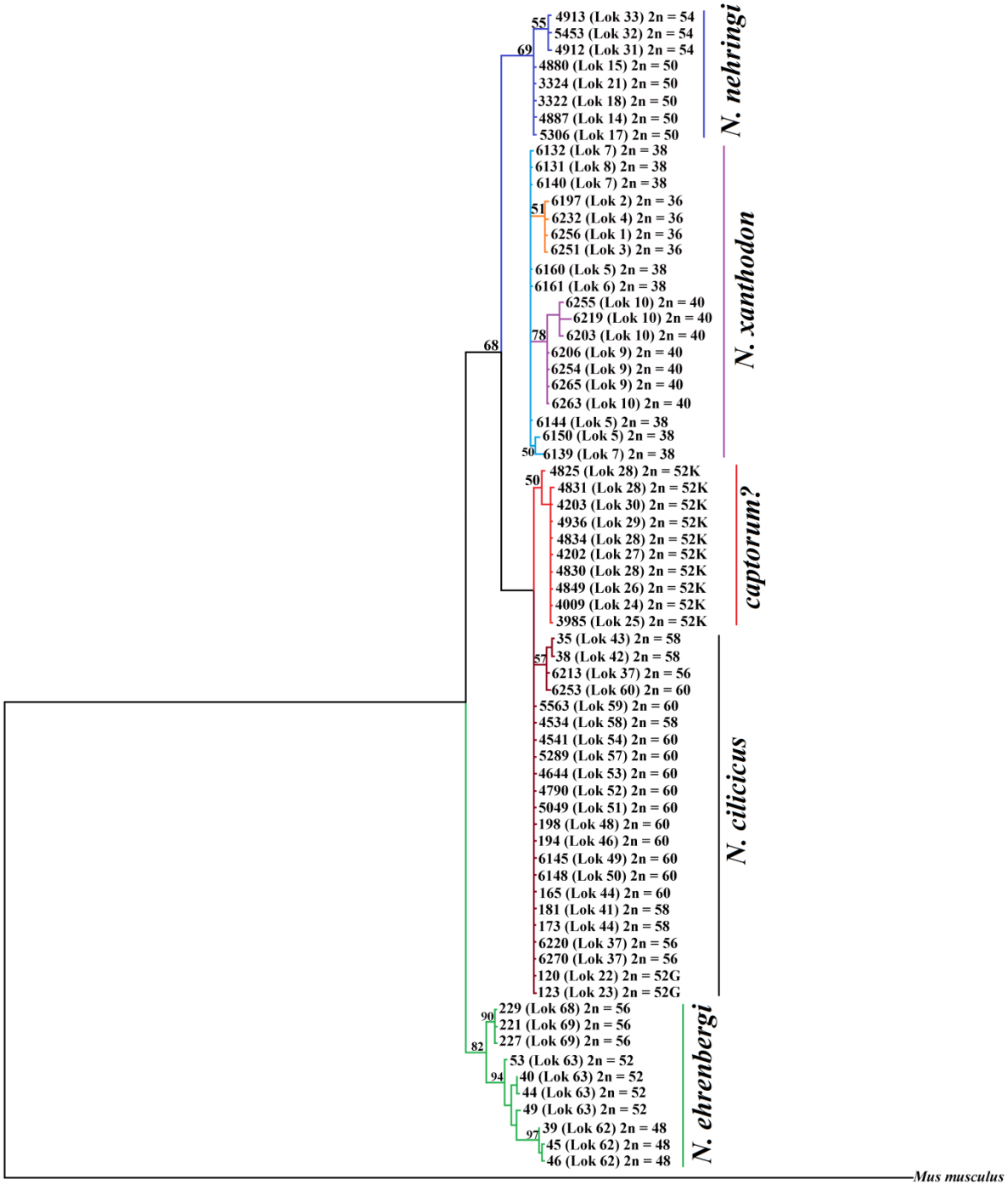
4.2.5 Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen için maksimum likelihood (ML) analiz sonuçları

Bu analiz sonucu ortaya çıkan filogenetik ağacın yapısı NJ ağacın sonuçları ile örtüşmektedir. ML ağacında da *N. ehrenbergi* türü ve diğer populasyonlar % 82 güvenilirlikteki bootstrap değeriyle birbirlerinden ayrılmışlardır. Fakat NJ ağacından farklı olarak *N. xanthodon* türüne

ait 2n= 36 kromozomal soy örnekleri *N. ehrenbergi* türüne yakın dalda değil *N. xanthodon* türü altında kümelenmiştir. Diğer üst dalda % 62 güvenilirlikle *N. cilicicus* türü, % 56 güvenilirlikle 2n= 52K kromozomal soy örnekleri ayrı dallarda kümelenmiştir. 2n= 54 İç Anadolu örnekleri *N. nehringi* türüne yakın; 2n= 52K Bolu örnekleri, *N. cilicicus* türü populasyonlarına daha yakın kümelenmiştir. NJ ağacında olduğu gibi *N. cilicicus* türü içindeki kromozomal soylar yüksek bootstrap değeriyle diğer tür ve kromozomal soy populasyonlarından ayrılmıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan neighbour joning (NJ) filogenetik ağacı.

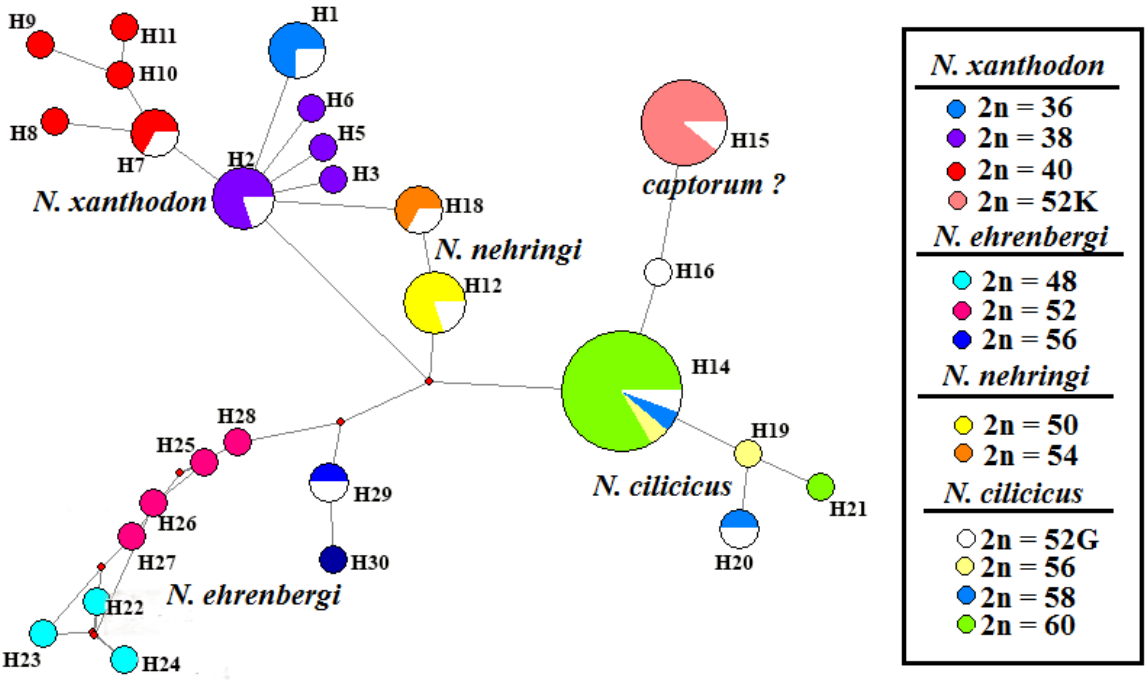


Şekil 4.5. Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan maksimum likelihood (ML) filogenetik ağacı.

4.2.6 Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesine ait network analizi sonuçları

Toplam 69 örnekten elde edilen dizi analizi verilerine göre oluşturulan network filogenetik analizleri, NJ ve ML analizleri sonucu ortaya çıkan kümelenmeleri ve bu kümeler arasındaki ilişkileri desteklemiştir. Diğer filogenetik ağaçlarda olduğu gibi network analizinde de *N. ehrenbergi* ve *N. cilicicus* tartışmasız bir şekilde diğer tür ve kromozomal soylardan farklı bölgelerde gruplar oluşturmuştur. Diğer filogenetik analizlerde olduğu gibi İç Anadolu'da

yayılış gösteren 2n= 52G, 56, 58 ve 60 kromozom sayılarına sahip olan populasyonlara ait haplotipler beraber ayrı bir grup oluşturarak *N. xanthodon*'un diğer populasyonlarından çok belirgin bir şekilde ayrılmıştır. Filogenetik analizlerde belirlendiği gibi *N. xanthodon* türü birbirinden oldukça farklı genetik kompozisyona sahip populasyonların birleştiği bir tür halindedir ve bu tür içindeki gruplaşmalar kromozom soylar ile direkt ilişkilidir. Her bir kromozomal soya ait haplotipler kendi grubunda kümelenmiştir. Fakat her bir kromozomal soyun oluşturduğu bu haplotip grupları hem *N. xanthodon*'un topotip örneklerini içine alan 2n= 38 kromozomal soydan hem de diğer kromozomal soylardan oldukça farklı bulunmuştur. Bu nedenle *N. xanthodon* türünün şuanki taksonomik durumu ve yayılış alanı filogenetik analizlerde destek bulmamıştır. Filogenetik analizler daha önce Anadolu'dan tanımlanan fakat son çalışmalarda *N. xanthodon* türünün sinonimi olarak kabul edilen türlerin geçerliliklerini desteklemektedir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesine ait network analiz sonuçları.

4.3 Nükleer Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b Gen Bölgesi için Yapılan Ortak Analiz Sonuçları

Türkiyenin çeşitli lokalitelerinden toplanan *Nannospalax* cinsine ait örneklerde, her iki gen bölgesi için ortak kullanılan 69 örneğe ait nükleotit dizileri birleştirilerek ortaya çıkan yaklaşık 1550 bç (750 bç + 800 bç) uzunluğundaki nükleer ve mitokondriyal nükleotit dizileri kullanılarak ortak filogenetik analizler yapılmıştır.

4.3.1 Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen bölgesi sekans analiz sonuçlarına göre belirlenen haplotipler

Nükleer beta fibrinojen intron 7 gen bölgesive mitokondriyal DNA sitokrom b gen bölgesi için çalışılan örnekler dnaSP5 (Rozas vd., 2009) programına fasta format halinde girilerek bitişik (concatenate) dizilerden elde edilen özgün haplotip listesi Çizelge 4.9.' da verilmiştir. Çalışılan 69 örnekte 59 tane haplotip belirlenmiştir. Belirlenen haplotiplerin 26 tanesi *N. xanthodon* türüne ait bireylerde (2n= 36, 38, 40), 8 tanesi ise *N. ehrenbergi* türüne ait bireylerde (2n= 48, 52, 56), 20 tanesi *N. cilicicus* türüne ait örneklerde (2n= 52, 56, 58, 60) ve 5 tanesi *N. nehringi* türüne ait bireylerde (2n= 48, 50, 54) gözlenmiştir. Sitokrom b gen bölgesi ile karşılaştırıldığında bu gen bölgesinde belirlenen haplotip çeşitliliği daha düşüktür. Tüm haplotipler değerlendirildiğinde en yüksek haplotip sayısı Batı Anadolu ve İç Anadolu körfare populasyonlarında belirlenmiştir.

4.3.2 Nükleer Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgesi için genetik çeşitlilik analiz sonuçları

Haplotip çeşitliliği *N. xanthodon, N. nehringi* ve *N. ehrenbergi* türlerinde h= 1.000 olarak belirlenirken, *N. cilicicus* türünde h= 0.9870 olarak belirlenmiştir. Tür düzeyinde nükleotit çeşitlilik en yüksek *N. xanthodon* türüne ait populasyonlarda (π= 0.040) gözlenirken, en düşük *N. nehringi* türünde gözlenmiştir (π= 0.0034). Sitotip düzeyinde haplotip çeşitliliği sadece 2n= 58 sitotipinde h= 0.900 değerini gösterirken, değer tüm sitotiplerde h= 1.000 olarak belirlenmiştir. Sitotip düzeyinde nükleotit çeşitliliği en yüksek değerini 2n= 60 sitotipinde (π= 0.026) göstermiştir. En düşük nükleotit çeşitliliği değeri ise 2n = 36 sitotipinde π= 0.0018 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10.)

Çizelge 4.9. Beta fibrinojen ve Sitokrom b ortak sekansları için haplotip listesi.

Haplotip Numarası	Tür	Müze Numarası	Lokalite
H1	*N. xanthodon*	6256	Lok1
H2	*N. xanthodon*	6251	Lok1
H3	*N. xanthodon*	6232	Lok3
H4	*N. xanthodon*	6144	Lok1, Lok4
H5	*N. xanthodon*	6150	Lok5
H6	*N. xanthodon*	6160	Lok7
H7	*N. xanthodon*	6161	Lok8
H8	*N. xanthodon*	6140	Lok7
H9	*N. xanthodon*	6139	Lok6
H10	*N. xanthodon*	6132	Lok5
H11	*N. xanthodon*	6131	Lok9
H12	*N. xanthodon*	6265, 6254	Lok9
H13	*N. xanthodon*	6206	Lok10
H14	*N. xanthodon*	6219	Lok10
H15	*N. xanthodon*	6203	Lok10
H16	*N. xanthodon*	6255	Lok13
H17	*N. xanthodon*	6263	Lok14
H18	*N. nehringi*	4887	Lok15
H19	*N. nehringi*	4880	Lok17
H20	*N. nehringi*	5306	Lok18
H21	*N. nehringi*	3322	Lok19
H22	*N. nehringi*	3324	Lok20
H23	*N. cilicicus*	120	Lok21
H24	*N. cilicicus*	123,173, 165	Lok22
H25	*N. xanthodon*	3985	Lok23, Lok44
H26	*N. xanthodon*	4849	Lok25
H27	*N. xanthodon*	4202	Lok23
H28	*N. xanthodon*	4830	Lok25
H29	*N. xanthodon*	4825	Lok27
H30	*N. xanthodon*	4831	Lok27
H31	*N. xanthodon*	4834	Lok28

Çizelge 4.9. Devam

Haplotip Numarası	Tür	Müze Numarası	Lokalite
H32	*N. xanthodon*	4936	Lok28
H33	*N. xanthodon*	4203	Lok28
H34	*N. cilicicus*	4912	Lok39
H35	*N. cilicicus*	545	Lok39
H36	*N. cilicicus*	4913	Lok30
H37	*N. cilicicus*	6220	Lok34
H38	*N. cilicicus*	6213	Lok35
H39	*N. cilicicus*	6270	Lok31
H40	*N. cilicicus*	181	Lok32
H41	*N. cilicicus*	38	Lok33
H42	*N. cilicicus*	35	Lok9
H43	*N. cilicicus*	194	Lok37
H44	*N. cilicicus*	198	Lok36
H45	*N. cilicicus*	6148	Lok38
H46	*N. cilicicus*	5049	Lok37
H47	*N. cilicicus*	4790	Lok37
H48	*N. cilicicus*	4644	Lok36
H49	*N. cilicicus*	5289	Lok41
H50	*N. cilicicus*	4534	Lok43
H51	*N. cilicicus*	5563	Lok43
H52	*N. ehrenbergi*	39	Lok42
H53	*N. ehrenbergi*	45	Lok50
H54	*N. ehrenbergi*	46	Lok46
H55	*N. ehrenbergi*	40	Lok48
H56	*N. ehrenbergi*	44	Lok51
H57	*N. ehrenbergi*	49	Lok52
H58	*N. ehrenbergi*	229	Lok53
H59	*N. ehrenbergi*	221	Lok57

Çizelge 4.10. Beta fibrinojen ve Sitokrom b ortak sekansları için çalışılan ve lokalitesi Türkiye olan *Nannospalax* cinsi örneklerin genetik çeşitlilik değerleri.

Kromozom Soylara Göre			**Türlere Göre**	
Nannospalax xanthadon				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 36	1.0000 +/- 0.2722	0.001890 +/- 0.001650	1.0000 +/- 0.1265	0.040340 +/-0.019991
2n = 38	1.0000 +/- 0.0625	0.0174651 +/- 0.00981		
2n = 40	1.0000 +/- 0.0764	0.013567 +/- 0.007746		
2n = 52	1.0000 +/- 0.0625	0.010200 +/- 0.005767		
Nannospalax cilicicus				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 54	1.0000 +/- 0.2722	0.005670 +/- 0.004375		
2n = 56	1.0000 +/- 0.2722	0.004252 +/- 0.003357	0.9870 +/- 0.0201	0.030097 +/- 0.015087
2n = 58	0.9000 +/- 0.1610	0.007229 +/- 0.004570		
2n = 60	1.0000 +/- 0.0524	0.026203 +/- 0.014153		
Nannospalax nehringi				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n = 50	1.0000 +/- 0.1265	0.003402 +/- 0.002294	1.0000 +/- 0.1265	0.003402 +/- 0.002294
Nannospalax ehrenbergi				
2n	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Haplotip Çeş. (H)	Nükleotit Çeşitliliği (π)
2n= 48	1.0000 +/- 0. 2722	0.004252 +/- 0.003357	1.0000 +/- 0.0625	0.034398 +/- 0.018800
2n= 52	1.0000 +/- 0.2722	0.004252 +/- 0.003357		
2n= 56	-	-		

4.3.3 Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen bölgesi için filogenetik analizlerde kullanılacak model testin belirlenmesi

Bu çalışmada Nükleer Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgesinin ortak filogenetik anaizleri için kullanılabilecek en uygun modeller *Nannospalax* cinsine ait örneklerin çalışıldığı gen bölgelerinin kombinasyonunun ardından hesaplanmıştır. Nükleer Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgesi için filogenetik ağaçlarda kullanılacak en uygun modelin TN93+G+I olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Nükleer Beta Fibrinojen ve Mitokondriyal Sitokrom b gen bölgesi için filogenetik analizlerde kullanılması için hesaplanan model test sonuçları.

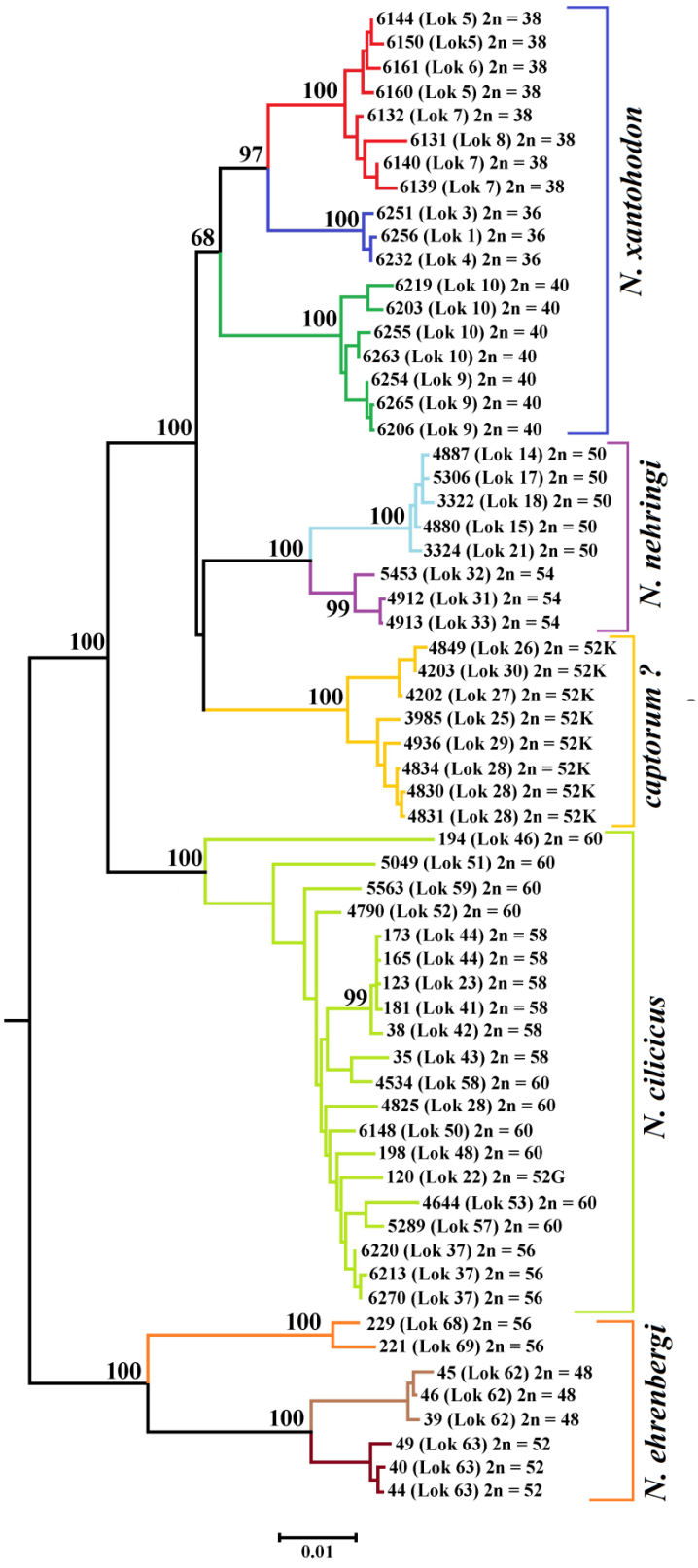
Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R
TN93+G+I	**128**	**11372**	**10183**	**-4963.5**	**0.663771**	**1.03104**	**4.2285**
HKY+G+I	127	11375	10195	-4970.5	0.674088	1.06111	4.1516
TN93+G	127	11377	10197	-4971.4	n/a	0.12559	4.1071
HKY+G	126	11381	10211	-4979.2	n/a	0.12026	4.0522
GTR+G+I	131	11406	10189	-4963.3	0.664131	1.03364	4.2329
GTR+G	130	11410	10203	-4971.2	n/a	0.12545	4.1125
T92+G+I	125	11416	10254	-5002	0.662994	1.00519	4.0289
T92+G	124	11421	10269	-5010.4	n/a	0.12424	3.9389
GTR+I	130	11429	10221	-4980.5	0.759346	n/a	3.9687
T92+I	124	11438	10286	-5018.8	0.761761	n/a	3.8852
K2+G+I	124	11505	10353	-5052.2	0.651203	0.85874	4.0381
K2+G	123	11514	10372	-5062.7	n/a	0.1244	3.9306
HKY+I	126	11721	10550	-5148.9	0.406388	n/a	3.7066
TN93+I	127	11874	10694	-5219.9	0.222675	n/a	3.6456
JC+G+I	123	11993	10850	-5301.8	0.656099	1.02056	0.5
JC+G	122	11996	10863	-5309.4	n/a	0.12796	0.5
TN93	126	12028	10858	-5302.7	n/a	n/a	3.5244
HKY	125	12047	10886	-5317.9	n/a	n/a	3.5166
GTR	129	12057	10858	-5300	n/a	n/a	3.526
K2+I	123	12062	10919	-5336.5	0.171158	n/a	3.5316
T92	123	12070	10927	-5340.3	n/a	n/a	3.509
K2	122	12169	11036	-5395.6	n/a	n/a	3.5076
JC+I	122	12556	11423	-5589.4	0.115452	n/a	0.5
JC	121	12621	11497	-5627.4	n/a	n/a	0.5

4.3.4 Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen için neigbour joining (NJ) analiz sonuçları

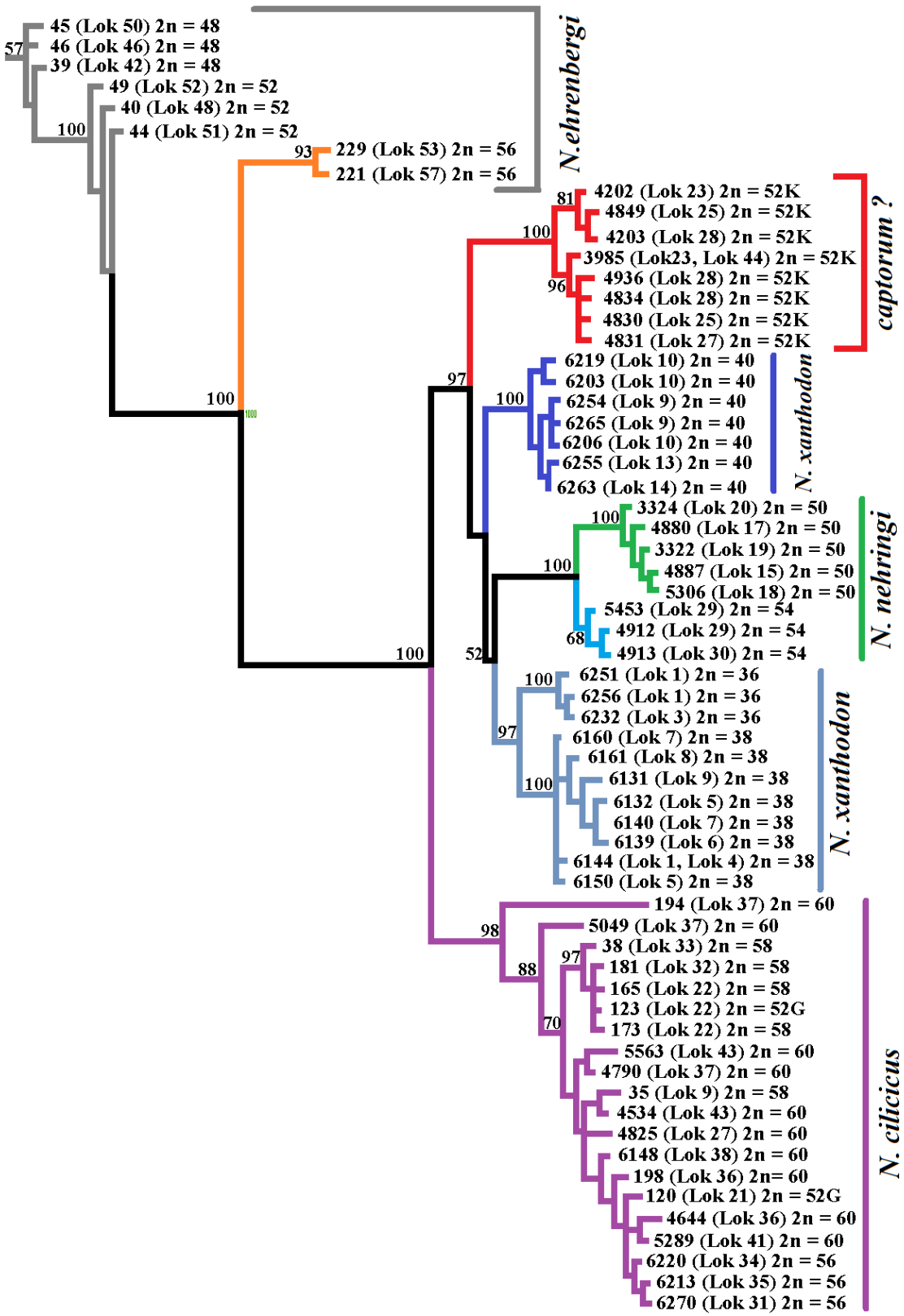
Nükleer gen olan beta fibrinojen intron 7 ve mitokondriyal DNA'nın sitokrom b genlerini temsil eden yaklaşık 1550 bç uzunluğundaki nükleotit dizisinin NJ analizi sonucunda türler 4 ana soy (lineage)'da gruplanmıştır. Birinci ana grup % 68 gibi yüksek bir bootstrap değeriyle diğer gruplardan ayrılarak *N. xanthodon* türüne ait sitotipleri (2n= 36, 38, 40) diğerlerinden ayırmıştır. İkinci grup % 100'luk bootstrap değeriyle *N. nehringi* türüne ait sitotipleri (2n= 50, 54) ve Bolu ve civarında yayılış gösteren *captorum* formuna ait 2n= 52K sitotiplerini diğer gruplardan ayırmıştır. Bu grup içinde İç Anadolu'da Kırıkkale ve civarında bulunan 2n= 54 sitotipi, diğer İç Anadolu sitotiplerinden farklı olarak *N. nehringi* türüne ait populasyonlarla yakın kümelenmiştir. Bu nedenle 2n= 54 Kırıkkale sitotipi *N. nehringi* türünün bir sitotipi olarak kabul edilmiştir. Bu grup içindeki sitotipler % 100 gibi yüksek bootstrap değerleri ile iki ayrı klad oluşturmuştur. Birinci klad *N. nehringi* populasyonlarını içerirken, diğer klad Bolu'da bulunan 2n= 52K (captorum) populasyonlarını içermektedir. Diğer filogenetik analizlerin sonuçlarına benzer şekilde İç Anadolu'da yayılış gösteren yüksek diploid kromozom değerine sahip olan (2n= 52, 56, 58, 60) populasyonlar üçüncü bir grup içinde % 100'lük bootstrap değeriyle ayrılmıştır. Bu grup Batı Anadolu körfare sitotipleri ve Doğu Anadolu körfare sitotipleri ile yakın ilişkili bulunmamıştır. Bu nedenle Türkiye'deki klasik morfotür yaklaşımı desteklenmemektedir. Bu çalışmada İç Anadolu körfareleri *N. cilicicus* türü içinde sınıflandırılmıştır. NJ filogenetik analizi sonucunda *N. ehrenbergi* türüne ait sitotipler tüm gruplardan yüksek bootstrap değeri ile ayrılmıştır. NJ analizi sonrası belirlenen her grup kendi içinde farklı sitotipleri temsil eden alt dallanmalar oluşturmaktadır. Her bir grup içindeki herbir alt dal yüksek değerli bootstrap değeriyle türlere ait sitotipleri birbirlerinden ayırmaktadır. NJ analizi Anadolu'da sadece iki körfare türünün bulunduğunu (*N. xanthodon* ve *N. ehrenbergi*) kabul eden klasik morfolojik sınıflandırmayı reddeden sonuçlar göstermektedir. Bu analiz sonucunda Anadolu'da 5 farklı türün olduğu (*N. xanthodon, N. nehringi, N. cilicicus, N. ehrenbergi, N. captorum*) belirlenmiştir. Ayrıca her bir tür grubu içindeki farklı sitotipler ile temsil edilen alt dallar ise farklı diploid kromozom değerine sahip alttürler olarak değerlendirilmelidir (Şekil 4.7).

4.3.5 Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen için maksimum likelihood (ML) analiz sonuçları

Bu analiz sonucu ortaya çıkan filogenetik ağacın yapısı NJ ağacın sonuçları ile örtüşse de bazı farklılıklar içermektedir. ML ağacında da *N. ehrenbergi* türü ve diğer populasyonlar % 100 güvenilirlikteki bootstrap değeriyle birbirlerinden ayrılmışlardır. Fakat NJ ağacından farklı olarak *N. xanthodon* türüne ait 2n= 40 kromozomal soy örnekleri bu türe ait diğer sitotiplerden (2n= 36 ve 38) ayrı bir alt dalda kümelenmiştir. NJ analizine benzer şekilde *N. nehringi* türüne ait populasyonlar coğrafik olarak birbirlerine çok uzak konumda yayılış gösterselerde birbirlerine yakın ilişkili bulunmuştur. Bu analizde de üst dalda % 100 güvenilirlikle *N. cilicicus* türü kümelenmiştir. 2n= 54 İç Anadolu örnekleri *N. nehringi* türüne yakın; 2n= 52K Bolu örnekleri, *N. xanthodon ve N. nehringi* türlerinin populasyonlarına daha yakın kümelenmiştir (Şekil 4.8).



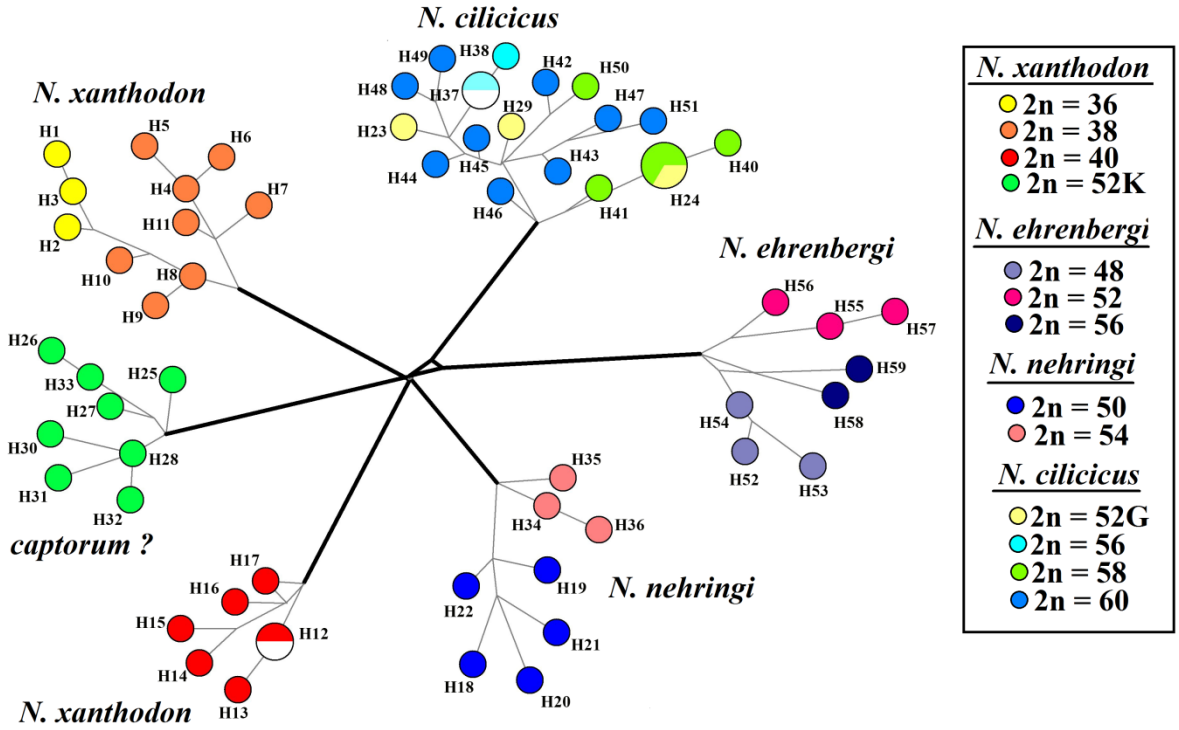
Şekil 4.7. Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan neighbour joning (NJ) filogenetik ağacı.



Şekil 4.8. Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen bölgesinin sekans analizi sonuçları ile oluşturulan maksimum likelihood (ML) filogenetik ağacı.

4.3.6. Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen bölgesine ait network analizi sonuçları

Her iki gen bölgesinde ortak çalışılan toplam 69 örnekten elde edilen dizi analizi verilerine göre oluşturulan network filogenetik analizleri, NJ ve ML analizleri sonucu ortaya çıkan kümelenmeleri ve bu kümeler arasındaki ilişkileri desteklemiştir. Diğer filogenetik ağaçlarda olduğu gibi network analizinde de *N. ehrenbergi* ve *N. cilicicus* tartışmasız bir şekilde diğer tür ve kromozomal soylardan farklı bölgelerde gruplar oluşturmuştur. Diğer filogenetik analizlerde olduğu gibi İç Anadolu'da yayılış gösteren 2n= 52G, 56, 58 ve 60 kromozom sayılarına sahip olan populasyonlara ait haplotipler beraber ayrı bir grup oluşturarak *N. xanthodon*'un diğer populasyonlarından çok belirgin bir şekilde ayrılmıştır. *N. xanthodon* türüne ait 2n= 36 ve 2n= 38 sitotiplerine ait haplotipler oldukça yakın kümelenirken, 2n= 40 sitotipine ait haplotipler ayrı bir grup içinde farklı bir topolojide kümelenmişlerdir. Bu durum *N. xanthodon* içindeki 2n= 40 sitotipine sahip populasyonların ayrı bir tür olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Nükleer beta fibrinojen ve mitokondriyal sitokrom b gen bölgesine ait network analiz sonuçları.

BÖLÜM V
TARTIŞMA

5.1 Tür Seviyesinde Taksonomi ve Genetik İlişkiler

Günümüzde Türkiye'de bulunan körfareler *Nannospalax* cinsi içinde sadece üç tür altında sınıflandırılmaktadır (Kryštufek ve Vohralík, 2009). Bu türlerden ilki Balkanlar ve Trakya'da yayılış gösteren *N. leucodon* türü, ikincisi Toros dağlarının güneyindeki Orta Doğu'da ve Mısır'da yayılış gösteren *N. ehrenbergi* türüdür. Üçüncü tür ise bu iki bölgenin ortasında izole kalan Anadolu'da bulunmakta olan *N. xanthodon* türüdür.

N. leucodon türü Balkanlar'da çok sayıda sitotip barındırmaktadır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalar sonucunda bu tür için allopatrik olarak yayılış gösteren farklı diploid kromozom değerine sahip çok sayıda alttür tanımlanmış (*N. l. transsylvanicus, N. l. syrmiensis, N. l. montanosyrmiensis, N. l. hercegoninensis, N. l. hungaricus, N. l. serbicus, N. l. macedonicus* ve *N. l. turcicus*) ve son yapılan moleküler temelli çalışmalarda bu tür için tanımlanan alttürlerin geçerlilikleri kanıtlanmıştır (Nemeth vd., 2009, 2013; Hadid vd., 2012; Kryštufek vd., 2012).

İsrail'de yayılış gösteren *N. ehrenbergi*'nin 4 farklı sitotipi (2n= 52, 54, 58, 60) ve Mısır'da bulunan bir sitotip (2n= 60) üzerine çok kapsamlı moleküler çalışmalar yapılarak bu sitotiplerin her biri ayrı birer tür olarak kabul edilmiştir (*N. galili*-2n= 52, *N. golani*-2n= 54, *N. carmeli*-2n= 58, *N. judaei*-2n= 60 ve *N. aegyptiacus*-2n= 60) (Nevo et al. 2001).

Türkiye körfare sitotip çeşitliliğinin % 60'ını barındırsa da; Türkiye körfarelerinin taksonomik durumları, alttür-tür durumları tam anlamıyla analiz edilmemiştir. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarla Trakya'da *N. leucodon*, Güney Doğu Anadolu'da ise *N. ehrenbergi* türü tartışmasız geçerli türler olarak kabul edilmiştir (Kryštufek ve Vohralík, 2009; Arslan vd., 2010; Hadid vd., 2012; Kryštufek vd., 2012; Kandemir vd., 2012;; Kankılıç vd., 2013, 2014a, b). İsrail'de yayılış gösteren sitotipler ayrı tür olarak kabul edilirken, Türkiye'deki *N. ehrenbergi* türü içerisinde allopatrik olarak yayılış gösteren farklı sitotiplerin taksonomik durumları halen belirsizdir (Kandemir vd., 2012). Türkiye'de en çok çeşitliliğin görüldüğü Anadolu körfare populasyonları tek bir tür ile (*N. xanthodon*) temsil edilmektedir.

Geçmişte morfolojiye dayalı yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye körfareleri için 9 türün (*N. xanthodon, N. intermedius, N. nehringi, N. labaumei, N. vasvari, N. ceyhanus, N. tuncelicus, N.munzuri, N. leucodon*) ve 8 alttürün (*N. typhlus xanthodon, N. leucodon armeniacus, N. leucodon cilicicus, N. leucodon anatolicus, N. leucodon turcicus, N. l. corybantium, N. leucodon captorum, N. nehringi nevoi*) adı geçmektedir. Kıvanç (1988) Türkiye körfareleri

üzerine yaptığı çalışmada yukarıda verilen türler ve alttürlere ait topotip örneklerini morfolojik olarak karşılaştırmış ve Türkiye'de sadece iki türün (*N. leucodon* ve *N. ehrenbergi*) bulunduğunu diğer tanımlanan türlerin bu iki türün sinonimi olduğunu belirtmiştir. Kıvanç (1988) ayrıca bu iki tür için 6 alttür tanımlamıştır (*N. leucodon armeniacus, N. leucodon cilicicus, N. leucodon anatolicus, N. leucodon turcicus, N. ehrenbergi intermedius* ve *N. ehrenbergi kirgisorum*). Kryštufek ve Vohralík (2009) Türkiye Memeli Hayvanları üzerine yaptığı çalışmada Trakya körfareleri için *N. leucodon,* Güneydoğu Anadolu körfareleri için *N. ehrenbergi* ve Anadolu'nun diğer kesimlerinde bulunan körfareler için ise İzmir'den verilen en eski kayıt olan *N. xanthodon* Nordmann, 1840 tür isminin geçerli olduğunu belirtmiştir. Kryštufek ve Vohralík (2009) çalışmasında *N. xanthodon* türünden sonra Anadolu'dan tanımlanan diğer türlerin (*N. nehringi* Satunin 1898, *N. labaumei* Metschie 1919, *N. vasvari* Szunyoghy 1941, *N. ceyhanus* Szunyoghy 1941, *N. tuncelicus* Coşkun 1996, *N.munzuri* Coşkun 1996) bu türün junior sinonimi olduğu kabul etmiştir.

Bu tez çalışmasında mitokondriyal DNA'nın sitokrom b ve nükleer gen beta fibrinojen intron 7 gen bölgesinden elde edilen sekans verilerinden üretilen NJ ağacı, ML ve Network analizleri sonucunda Türkiye körfarelerine ait sitotipler Batı Anadolu grubu, Güneydoğu Anadolu grubu, Doğu Anadolu grubu, Trakya Grubu, Kuzey Anadolu Grubu ve İç Anadolu grubu olmak üzere 6 ana grup altında kümelenmiştir. Şu an geçerli olan sınıflandırmadaTrakya grubu körfareler *N. leucodon* türü altında, Güneydoğu Anadolu grubu körfareler *N. ehrenbergi* türü altında sınıflandırılmaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, bu iki türün bu bölgeler için geçerli türler olduğunu desteklemektedir. Fakat Anadolu'nun diğer kısımlarında bulunan körfarelerin tek bir tür altında (*N. xanthodon*) sınıflandırılması, bu tez çalışması sonucu elde edilen bulgularla uygun bulunmamıştır. Bu tez çalışmasında yapılan filogenetik analizler sonuçları, Doğu Anadolu'da yayılış gösteren körfarelerin (2n= 48, 50, 54), İç Anadolu'da yayılış gösteren körfarelerin (2n= 52, 56, 58, 60), kuzeyde Bolu ili civarında (2n= 52K) ve güneyde Beyşehir Gölü etrafında izole olarak bulunan körfare populasyonlarının ayrı tür seviyesinde farklılıklara sahip olduklarını göstermektedir. Bu bölgelerde bulunan körfare populasyonları için tanımlanan en eski tür veya alttür kayıtları incelendiğinde, İç Anadolu körfareleri için en eski kayıtın *N. leucodon cilicicus* Mehely, 1909; Doğu Anadolu körfareleri için *N. nehringi* Satunin, 1898; Bolu civarında bulunan körfareler için *N. leucodon captorum* Hinton 1920 olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında İç Anadolu körfareleri için isim önceliği nedeniyle ilk olarak Niğde-Madenköy'den bir alttür olarak tanımlanan *cilicicus*, tür seviyesine çekilmiş ve İç Anadolu'da

yayılış gösteren ve 2n= 52, 56, 58, 60 diploid kromozom değerine sahip olan körfare populasyonları *N. cilicicus* tür ismi altında sınıflandırılmıştır. Doğu Anadolu bölgesinde ve İç Anadolu'nun doğu kısmında yayılış gösteren 2n= 48, 50, 54 diploid kromozom sayısına sahip körfareler ise ilk olarak Kars-Kaskoparan'dan tanımlanan tür olan *N. nehringi* türü altında sınıflandırılmıştır. Ayrıca tez çalışması sonucunda Türkiye sınırlarından İzmir'den tanımlanan en eski tür olan *N. xanthodon* türünün sadece Batı Anadolu'da yayılış gösterdiği ve bu türün sadece iki sitotiple (2n= 36 ve 2n= 38) temsil edildiği belirlenmiştir. Bu tez çalışması sonucu elde edilen bulgular, Bolu ve civarında bulunan 2n= 52 diploid kromozom değerine sahip olan populasyonların diğer körfare sitotiplerden farklı olduğunu ve bu populasyonların ayrı bir tür ismi altında sınıflandırılması gerektiğini göstermektedir. Bu formun yayılış gösterdiği coğrafik alan dikkate alındığında, bu bölgeden verilen en eski körfare kaydı *N. leucodon captorum* Hinton, 1920 olduğundan, Bolu populasyonları *N. captorum* tür adı altında sınıflandırılmıştır. Bu tez çalışmasında ayrıca, Beyşehir'de izole küçük bir populasyon halinde bulunan 2n= 40 sitotipinin ise ayrı bir tür olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Hem karyolojik ve morfolojik hem de coğrafik yayılışı açısından bu bölgeden elde edilen körfare örneklerine benzer bir kayıt daha önce tanımlanmadığından, bu sitotipin yeni bir isim altında sınıflandırılmalıdır. Bu tez çalışması sonucu Türkiye körfarelerinin üç tür altında sınıflandırılmasının hatalı olduğu anlaşılmış ve Türkiye'de *N. xanthodon, N. ehrenbergi, N. leucodon, N. cilicicus, N. captorum, N. nehringi* olmak üzere en az 6 türün bulunduğu kabul edilmiştir. Bu tez çalışması sonucu Türkiye körfareleri için önerilen bu sınıflandırma daha önce yapılan moleküler çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Türkiye körfareleri üzerine yapılan DNA temelli ilk çalışmada Arslan vd. (2010) 3 sitotipe (2n= 40, 2n= 58, 2n= 60) ait örnekte mitokondriyal DNA sitokrom b bölgesinin bir kısmının sekans analizi sonucunda, Batı Anadolu sitotip grubuna ait 2n= 40 sitotipi ile İç Anadolu sitotip grubuna ait 2 sitotip 2n= 58 ve 2n= 60 arasında K2P divergence değerlerini sırasıyla % 10.05 ve % 11.33 olarak belirlemiştir.

Kandemir vd. (2012) İç Anadolu ve Batı Anadolu *N. xanthodon* sitotiplerinde mitokondriyal DNA sitokrom b bölgesinin filogenetik analizi sonucunda düşük diploid kromozom değerine sahip Batı Anadolu sitotiplerin (2n= 36, 2n= 38, 2n= 40) ayrı bir monofiletik grup oluşturarak, yüksek değerli İç Anadolu sitotiplerinden (2n= 56, 2n= 58, 2n= 60) yüksek K2P distance değeriyle ayrıldığını belirtmiştir.

Bradley ve Baker (2001) tarafından kemiriciler için belirlenen "average sister-species difference" seviyesi (% 2.7 ve daha üstü) olarak belirlenmiş ve adı geçen çalışmada bu değerin üzerindeki değerlerin tür seviyesinde farklılığa işaret ettiği vurgulanmıştır. Kandemir

vd. (2012) ve Arslan vd. (2010) tarafından sitokrom b bölgesi kullanılarak hesaplanan sitotipler arasında belirlenen K2P değerleri ile Bradley ve Baker (2001)'ın K2P divergence değerleri karşılaştırıldığında, mevcut sitotiplerin tür seviyesinde genetik farklılığa sahip olduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasında türler arasında sitokrom b gen bölgesi için K2P divergence değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.1.). Sitokrom b gen bölgesi için türler arasında hesaplanan Kimura-2-parametresi mesafe değerleri Bradley ve Baker (2001) tarafından kemiriciler için belirlenen "average sister-species difference" seviyesi (% 2.7 ve daha üstü) değerlerinden daha yüksek değerler göstermektedir. Sitokrom b gen bölgesi için hesaplanan en düşük divergence değeri % 3 ile *N. cilicicus* ve *N. xanthodon* türü arasında belirlenirken, en yüksek divergence değeri % 7.7 ile *N. xanthodon* ile *N. ehrenbergi* türleri arasında belirlenmiştir. Bu değerler Arslan vd., (2010) ve Kandemir vd., (2012) çalışmasındaki değerler ile paralellik göstermektedir.

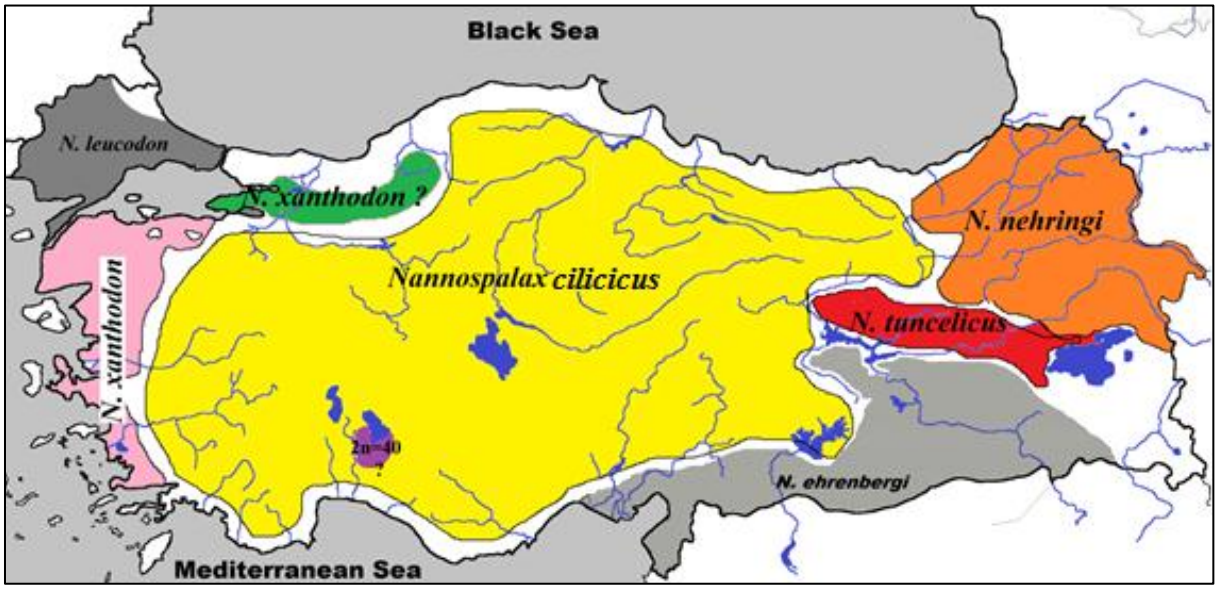
Çizelge 5.1. Sitokrom b gen bölgesine ait türler arasında hesaplanan Kimura-2-Parametresi mesafe matriksi (Koyu) ve standart hataları (italik).

	Türler	1	2	3	4
1	*N.xanthodon*		*0,007*	*0,004*	*0,008*
2	*N.nehringi*	**0,050**		*0,008*	*0,012*
3	*N.cilicicus*	**0,030**	**0,075**		*0,009*
4	*N.ehrenbergi*	**0,077**	**0,128**	*0,087*	

Diğer bir çalışmada Hadid vd. (2012) *Nannospalax* ve *Spalax* cinslerine ait körfare populasyonlarında mtDNA'nın yaklaşık 4 kb bölgenin sekans analizlerini çalışarak, *N. vasvarii* türü olarak düşündüğü İç Anadolu populasyonlarını (2n= 60, 2n= 62) ayrı bir klad "*vasvarii*", Anadolu'dan çalıştığı diğer sitotipleri (2n= 38, 2n= 40, 2n= 50, 2n= 54) ayrı bir klad "*xanthodon*" içinde gruplandırmıştır. Bu tez çalışmasında da İç Anadolu örnekleri diğer körfare örneklerinden oldukça farklı bulunmuştur. Bu tez çalışmasından farklı olarak Hadid vd. (2012) İç Anadolu körfare örnekleri için *N. vasvari* tür adını kullanmıştır. *N. vasvari* ilk kez Szunyoghy (1941) tarafından Malatya'dan tanımlanmıştır. Fakat İç Anadolu'dan Mehely (1909) tarafından Niğde–Madenköy'den *N. l. cilicicus* alttürü daha önce tanımlandığından öncelik kuralı doğrultusunda geçerli ismin *N. cilicicus* olması gereklidir. Malatya'dan toplanmış elimizdeki örnekler ile Niğde-Madenköy'den toplanan körfare örnekleri morfolojik açıdan incelendiğinde her iki topotip örneklerinde morfolojik olarak özdeş oldukları belirlenmiştir. Bu durumda Hadid vd. (2012) tarafından İç Anadolu örnekleri için kullanılan *N. vasvari* tür isminin yanlış kullanıldığını göstermektedir.

Son olarak Kryštufek vd. (2012) mtDNA'nın sitokrom b bölgesi sekans analizleri sonucunda da İç Anadolu sitotiplerini (2n= 58, 2n= 60) ve Batı Anadolu sitotiplerini (2n= 38, 2n= 40) ayrı kladlarda gruplamıştır. Kryštufek vd. (2012) çalışmasında sitotipler ve türler arasında belirlenen genetik ilişkiler bu tez çalışmasının sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile bu zamana kadar Türkiye körfareleri üzerine yapılan moleküler çalışmaların sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde Türkiye'de bulunan körfare türleri ve bu türlerin coğrafik yayılışları Şekil 5.1.'de verilmektedir.



Şekil 5.1. Türkiye'deki körfare türlerinin coğrafik yayılışları.

5.2 Alttür ve Sitotip Seviyesinde Taksonomi ve Genetik İlişkiler

Anadolu, körfarelerin biyoçeşitliliği açısından oldukça önemli bir bölgedir. Anadolu'nun ekolojik ve coğrafik açıdan birbirlerinden oldukça farklı bölgeler içermesi, bu bölgelerde yaşayan canlıların farklı ekolojik koşullara adaptasyonunu zorunlu kılmıştır. Bu nedenle özellikle toprak altında aşırı zor şartlarda yaşayan körfareler yaşamlarını devam ettirebilmek için güçlü adaptasyon stratejileri geliştirmiştir. Bu adaptasyon stratejilerinin en önemlisi bu canlıların belirgin özelliklerinden biri olan kromozomal yeniden düzenlemelerdir (Nevo vd., 1994; Ivanitskaya vd., 1997; Arslan vd., 2011; Sözen vd., 2013). Anadolu'nun farklı ekolojik ve coğrafik yapısı, Anadolu'da farklı endemik körfare sitotiplerinin (2n= 36, 38, 40, 44) oluşmasına ve farklılaşmasına neden olmuştur. Özellikle Toros Dağları veya Kızılırmak gibi büyük nehirler, hareket yetenekleri oldukça düşük olan körfare populasyonlarının birbirlerine izole olmalarını sağlayarak, izole olan bu bölgelerde geniş yayılışa sahip sitotiplerin oluşmasına neden olmuştur (Kankılıç vd., 2013). Ayrıca, bu canlıların düşük hareket

yetenekleri, beslenmek için belirli bitki köklerini tüketmeleri ve toprağı kazabilmek için daha az kayalık toprak istekleri körfare populasyonlarının aralarında sanki bir nehir ya da dağ silsilesi varmışcasına izole populasyonlar oluşturmasına ve farklılaşmasına neden olmaktadır (Kankılıç vd., 2013). Bu nedenle nehirler ve dağ silsileleri ile farklılaşan yaygın yayılış gösteren farklı sitotipler, kendi yayılış alanlarının periferinde ileri derecede farklılaşarak küçük izole sitotipler oluşturmaktadır. Moleküler çalışmalarda Anadolu körfare sitotipleri arasında yüksek düzeyde genetik farklılık değerleri belirlenmiştir (Arslan vd., 2010; Kandemir vd., 2012). İlk olarak Nevo (1995) Türkiye körfare populasyonları ve sitotipleri üzerine yaptığı Allozim temelli çalışmasında, Türkiye körfareleri için belirlenen sitotiplerin tür seviyesinde farklılığa sahip olduğunu ve birbirlerinden farklı allel içeriklerine sahip olduklarını beirterek, Türkiye'de mevcut morfotürlerin haricinde ilave 20 biyolojik türün bulunabileceğini ifade etmiştir. DNA temelli yapılan moleküler çalışmalarda Arslan vd. (2010) ve Kandemir vd. (2012), analiz ettikleri sitotiplerin tür seviyesinde genetik farklılığa sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmalardan farklı olarak Kryštufek vd. (2012), ilk olarak Nevo vd. (1995) tarafından ifade edilen Tür=Sitotip yaklaşımını reddetmiş ve böyle bir yaklaşımın körfare taksonomisini karmaşaya sürükleyeceğini ileri sürmüştür. Son olarak Kankılıç vd. (2013, 2014a, 2014b) Tür = Sitotip yaklaşımını kısmen redderek, mevcut tüm körfare sitotiplerinin olmasa da, belirli bazı sitotiplerin (2n= 36, 40, 52K) tür seviyesinde farklılık gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bu tez çalışması öncelikle diğer çalışmalardan farklı olarak hemen hemen tüm sitotipleri birarada değerlendirme imkanı sağlamıştır. Bu zamana kadar Türkiye körfareleri üzerine yapılan bütün moleküler çalışmalarda (Nevo vd., 1994; Arslan vd., 2010; Kryštufek vd., 2012; Kandemir vd., 2012; Hadid vd. 2012; Kankılıç vd., 2013, 2014a) İç Anadolu'da yayılış gösteren sitotipler (2n = 60, 58, 56, 52G) *N. xanthodon* türüne ait sitotiplerden ve diğer türlerden genetik açıdan farklı bulunmuş ve ayrı bir klad içerisinde monofiletik grup oluşturmuşlardır. Fakat bu tez çalışması haricinde hiç bir çalışmada bu grup ayrı bir tür altında sınıflandırılmamıştır. Bu klad içindeki sitotipler genellikle İç Anadolu'da yaygın yayılış gösteren 2n= 60 sitotipinin yayılışının periferinde bulunan türev populasyonlardır ve hem genetik çalışmalarda hem de klasik morfolojik çalışmalarda bu sitotipler arasında belirgin farklılıklar belirlenmemiştir (Kıvanç, 1988; Kankılıç vd., 2006; Kankılıç vd., 2014b). Bu sitotipler diploid kromozom sayıları açısından birbirlerinden oldukça farklı olsalar da, tür seviyesinde ve hatta alttür seviyesinde bile farklılık içermemektedirler. Bu nedenle bu tez çalışmasının sonuçları Tür=Sitotip yaklaşımını reddetmektedir. Bu tez çalışmasında birim olarak sitotiplerin ayrı bir takson olarak sınıflandırılmasından ziyade, ortak genetik özellikler taşıyan sitotip gruplarının ayrı bir takson

olarak düşünülmesinin daha doğru bir yaklaşım olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında yapılan filogenetik analizlerin sonuçları ve bu zamana kadar Türkiye körfareleri üzerine yapılan diğer moleküler çalışmaların sonuçları bir bütün halinde değerlendirildiğinde, farklı diploid kromozom değerine sahip olan populasyonların farklı zamanlarda farklı ana kromozomal formlardan (en geniş yayılış gösteren sitotipler) evrimleştiği ve ayrı monofiletik gruplarda kümelendikleri görülmektedir. Örneğin Batı Anadolu'da ve Anadolu'nun kuzeyinde yayılış gösteren sitotiplerin (2n= 36, 2n = 40, 2n= 50B, 2n= 52K), geniş yayılışa sahip 2n= 38 sitotipinden farklılaşan türev populasyonlar oldukları bu çalışmada kabul edilmiştir. Ayrıca, İç Anadolu'da bulunan sitotip grubu hem Batı Anadolu'daki sitotip grubundan (2n= 36, 38, 40, 50B, 52K), hem de Doğu Anadolu'daki sitotip grubundan (2n= 48, 2n= 50, 2n= 54M) genetik olarak oldukça farklı bulunmuştur.

Fakat Anadolu'nun kuzeyinde Bolu ve civarında yayılış gösteren 2n= 52K ve güneyde Beyşehir Gölü etrafında bulunan 2n= 40 sitotipleri Batı Anadolu sitotip grubuna dahil olsalar da bu gruptan ve diğer sitotiplerden ileri derecede genetik farklılık göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında yapılan filogenetik analizlerde Bolu ve Beyşehir populasyonlarında belirlenen genetik farklılık, daha önce Nevo vd. (1994) tarafından yapılan Türkiye körfarelerinde allozim elektroforezi ile ilgili çalışmada, bu populasyonların allozim kaynaklı farklı allel içerikleri nedeniyle de belirlenmiştir. Bolu populasyonlarında belirlenen genetik farklılık, ribosomal DNA ve mitokondriyal DNA'nın RFLP analizleri sonucunda da belirlenmiştir (Suzuki vd., 1996, Kankılıç vd., 2014a). Suzuki vd. (1996) tarafından Bolu populasyonlarında görülen genetik farklılığın neredeyse morfotürler (*N. xanthodon* ve *N. ehrenbergi*) arasında görülen kadar yüksek olduğu bildirilmiştir. Benzer olarak Kankılıç vd., (2014a) çalışmasında mitokondriyal DNA'nın D-loop ve Sitokrom b gen bölgelerinin farklı restriksiyon endonükleazlar ile kesimi sonucunda, bu iki sitotipte farklı bantlanma paternlerinin oluştuğu ve bu iki sitotipin diğer sitotiplerden daha ileri düzeyde genetik farklılığa sahip oldukları ileri sürülmüştür.

Diğer taraftan bu tez çalışmasında *N. nehringi* türü içinde sınıflandırılan üç sitotip için (2n= 48, 50, 54) durum daha karmaşık bulunmuştur. Bu tez çalışmasında yapılan tüm analizlerde İç Anadolu'da Kırıkkale civarında ve Adana'nın kuzeyinde yayılış gösterdiği belirlenen 2n = 54 sitotipi İç Anadolu körfare populasyonlarından oldukça farklı, fakat *N. nehringi* topotip örneklerine ise oldukça yakın ilişkili bulunmuştur. Bu sitotip örneklerine (2n= 48, 50, 54) ait kafatası ve fallus özellikleri incelendiğinde belirgin morfolojik karakterlerin (damağın arkasında diken şeklinde çıkıntı içermesi, büyük kafatası, diş köklerinin 3 köklü ve alveollerin üç gözlü olması, farklı bakulum yapısı, fallusun üç lob içermesi) özdeş oldukları ve bu

özellikler ile İç Anadolu'daki sitotiplerden ayrıldıkları belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında *N. nehringi* türüne ait sitotipler (2n= 48, 50, 54) filogenetik ağaçlarda ortak klad içerisinde kümelenseler de her bir sitotip yüksek bootstrap değeriyle alt dallarda farklı gruplar oluşturmuşlardır. Bu durum daha önce Kıvanç (1988) tarafından Doğu Anadolu körfare örneklerinin iki alttüre sahip olduğunu (*N. l. armeniacus* ve *N. l. nehringi*) ileri süren sınıflandırmasını destekler niteliktedir. *N.nehringi* türüne ait sitotiplerde görülen bu gruplaşma *N. ehrenbergi* sitotipleri arasında da belirgin olarak görülmektedir. Her iki türe ait sitotiplere ait örnekler daha önce körfareler üzerine yapılmış moleküler ve morfoloji temelli çalışmalara dahil edilmediğinden ve sadece bu tez çalışmasında kullanıldıklarından dolayı, bu sitotiplerin taksonomik durumları hakkında kesin sonuçlara varılamamıştır. Bu nedenle özellikle *N. nehringi* ve *N. ehrenbergi* türlerine ait sitotipler başka moleküler markerlar kullanılarak analiz edilmeli ve bu sitotiplere ait örneklerin morfolojik özellikleri belirlenerek, bu sitotiplere sahip populasyonların alttür ve tür durumları tekrar gözden geçirilmelidir.

KAYNAKLAR

Arı, Ş., "DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması", Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Temizkan, G., Arda, N. (editörler), ***Nobel Tıp Kitabevi*** İstanbul, Türkiye, s. 101-120, 2008.

Arslan, A., Akan, Ş. and Zima, J., ''Variation in C-heterochromatin and NOR distribution among chromosomal races of mole rats (Spalacidae) from Central Anatolia, Turkey'', ***Mammalian Bioogy*** 76, 28–35, 2011.

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

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M. and Bermingham, E., Joseph "The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics" ***Annual Reviev of Ecoogy and Systematics*** 18: 89-522, 1987.

Bradley, R. D. and Baker, R.J., "A test of the genetics species concept: cytochrome-b sequences and mammals", ***Journal of Mammology*** 82(4): 960-973, 2001.

Bradley, R.D and Baker, R.J., " A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals", ***Journal of Mammalogy*** 82 (4): 960-973, 2001.

Brown, W.M., George, M. Jr & Wilson, A.C., "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA", ***Proceedings of the National Academiy of Sciences*** 76, 1967-1971, 1979.

Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaletal, M.N. and Saccone, C., "Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some percifprmes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals", ***Journal of Molecular Evolution*** 39 (6): 589-597, 1994.

Corbet, G.B. and Hill, J.E. A world list of mammalian species. Third edition. **Natural History Museum Publ., London** / Oxford Univ. Press. 1991.

Corbet, G.B., "The Mammals of The Palaearctic region; a taxonomic review", Brit. Mus. Nat. Hist.,***London / Oxford University press.*** 1978.

Coşkun, Y., ''A New Subspecies of Spalax nehringi (Satunin 1898) (Rodentia: Spalacidae) from Turkey'', ***Saugetierkdl. Mitt.*** 37 (3), 103-109, 1996a.

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.

Coşkun, Y., "*Spalax nehringi nevoi,* a new mole rats from southeastAnatolia, Turkey (Rodentia; Spalacidae)", ***Saugetierkdl. Mitt*** 38, 135–142, 1996b.

Coşkun, Y., Ulutürk, S. and Yürümez, G., ‘’Chromosomal diversity in mole-rat of the species *Nannospalax ehrenbergi* (Rodentia: Spalacidae) from south Anatolia, Turkey’’, ***Mammalian Biology*** 71, 244−250, 2006.

DNeasy, Blood and Tissue Handbook, QIAGEN, ***Beckman Instruments***, 2006.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. "Isolation of plant DNA from fresh tissiue", ***Focus*** 12(1), 13-15, 1991.

Ducroz, J. F., Volobouev, V., and Granjon, L. ‘’An Assessment of the Systematics of Arvicanthine Rodents Using Mitochondrial DNA Sequences: Evolutionary and Biogeographical Implications’’, ***Journal of Mammalian Evolution*** 8, 3, 2001.

Ellerman, J.R. and Morrison–Scott, T.C.S., "Checklist of Palaearctic and Indian Mammals, 1758-1946. Second edition, ***British Museum (Natural History),*** London, 1-810, 1966.

Erlich, H.A., “Polymerase chain reaction”, ***Journal of Clinical Immunology*** 9 (6): 437-447, 1989.

Fluxus Technology, Network 4.6.1.1, 2012.

Freeman S. and Herron, J.C., "Evrimsel Analiz" Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytug. S. ve Gündüz. İ. (eds.), ***Palme Yayıncılık,*** 28-29, 438-449, 1999.

Gür, H. “The effects of the Late Quaternary glacial–interglacial cycles on Anatolian ground squirrels: range expansion during the glacial periods?”, ***Biological Journal of the Linnean Society*** 109, 19–32, 2013.

Gromov, I.M. and Baranova, G.I., "Catalogue of Mammals in U.S.S.R. Leningrad; Nauka", pp 455 (In Russian), 1981.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O., “New algorithms and methods to estimate maximum- likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.”, ***Systematic Biology*** 59 (3): 307- 21, 2010.

Gülkaç, M. D. ve Yüksel, E., ‘’Malatya yöresi körfareleri (Rodentia; Spalacidae) üzerine sitogenetik bir inceleme’’, ***Doğa Türk Biyoloji Dergisi*** 13, 63-71, 1989.

Gür, H. “The effects of the Late Quaternary glacial- interglacial cycles on Anatolian ground squirrels; range expansion during the glacial periods”, ***Biological Journal of the Linnean Society*** 109, 19-32, 2013.

Hadid, Y., Nemeth, A., Snir, S., Pavlicek, T., Csorba, G., Kazmer, M., Major, A., Mezhzherin, S., Rusin, M., Coskun, Y. and Nevo, E., ‘’Is Evolution of Blind Mole Rats Determined by Climate Oscillations’’, ***Plos One*** 7(1) , 2012.

Hall, T.A., ‘’BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment, editor and analysis program for Windows 95/98/ NT’’, ***Nucleic Acids Symposium Series*** 41, 95–98, 1999.

Harrison, D. L., "The Mammals of Arabia. Vol. III Lagomorpha Rodentia", ***London XVII,*** 382-670, 1972.

Harrison, D.L. and Bates, P.J.J., "Mammals of Arabia", Second Edition. ***Harr. Zool. Mus. Pub.,***1-353, 1991.

Hinton, M.A.C., "Three new subspecies of *Spalax monticola"*, ***Annals and Magazine of Natural History*** 5, 313-318, 1920.

Holland, J.J., De Ia Torre, J.C., Cıarke, D.K. and Duarte, E.A, “Quantition of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses”, ***Journal of Virology*** 65: 2960-2967, 1991.

Holsinger, K.E., “Next generation population genetics and phylogeography”, ***Molecular Ecology*** 19, 2361-2363, 2010.

Irwin, D.M, Kocher, T.D. and Wilson, C., “Evolution of the cytochrome b gene of mammals”, ***Journal of Moleculer Evolution*** 32: 128-144, 1991.

Ivanitskaya, E., Coşkun, Y. and Nevo, E., ‘’Banded karyotypes of mole rats (*Spalax*, Spalacidae, Rodentia) from Turkey: A comparative analysis’’, ***Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*** 35, 171–177, 1997.

Kandemir, I., Sözen, M., Matur, M., Kankılıç, T., Martinkova, N., Çolak, F., Ozkurt, Ş., and 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.

Kankılıç, T., Çolak, E. and Kankılıç, Tol., ‘’Macro - Anatomical and Karyological Features of Two Blind Mole Rat Subspecies (Rodentia: Spalacidae) from Turkey’’, ***Anatomy and Histology Embryology*** 38, 145−153, 2009.

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.

Kankılıç, T., Kankılıç, T., Çolak, R., Çolak, E. and Karataş, A., ‘’Karyological comparison of populations of the *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 supersupecies (Rodentia: Spalacidae) in Turkey’’, ***Zoology in the Middle East*** 42, 15-24, 2007b.

Kankılıç, T., Kankılıç, T., Şeker, P.S., Çolak, R., Selvi, E. and 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.

Kankılıç, Te., Kankılıç, To., Sözen, M. and Çolak, E., ‘’Genetic Diversity and Geographic Variation of Chromosomal races of Nannospalax xanthodon (Nordmann, 1840) and Nannospalax ehrenbergi (Nehring, 1898) from Turkey, Revealed by RAPD Analysis ‘’, ***Acta Zoologica Bulgarica*** 65(1), 45-58, 2013.

Kankılıç, T. and Gürpınar, C. “Revised classification design of the Anatolian species of Nannospalax (Rodentia: Spalacidae) using RFLP analysis”, ***Türk Journal of Zoology*** 38: 68-78, 2014.

Kankılıç, T., Kankılıç, To., Şeker, P.S.O. and Kıvanç, E., “Morphological and biometrical comparisions of the baculum in the genus Nannospalax Palmer, 1903 (Rodentia: Spalacidae) from Turkey with consideration of its taxonomic importance”, ***Türk Journal of Zoology*** 38: 144-157, 2014.

Kıvanç, E., "Türkiye *Spalax*'larının Coğrafik Varyasyonları", ***Ankara 72,*** Teksir – Daktilo – Fotokopi. 88 Sayfa., 1988.

Kirchmann, D.L, Meon, B., Cottrell, M.T. and Hutchins, D.A., “ Carbon versus iron limitation of bacterial growth in the California upwelling regime”, ***Limnology and Oceanography*** 45(8), 1681-1688, 2000.

Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A., Genetik Kavramlar, 8. Baskıdan çeviri, Çeviri Editörleri, Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Öğüş, A., Açık, L., ***Palme Yayıncılık,*** Ankara, 2011.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo S., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C., "Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers", ***Proceedings of the National Academicy of Sciences*** 86: 6196-6200, 1989.

Kryštufek B., Ivanitskaya E., Arslan A., Arslan E. & Bužan E.V., ''Evolutionary history of mole rats (genus Nannospalax) inferred from mitochondrial cytochrome b sequence'', ***Biological Journal of the Linnean Society*** 105, 446–455, 2012.

Kryštufek, B. and Vohralık, V., "Mammals of Turkey and Cyprus: Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae", ***Koper, Zalozba Annales***, 2009.

Kumazawa, Y. And Nishida, M. "A new model for gondwanian origin and plate tectonic transportation of the asian arowana", ***Molecular Phylogeny of Osteoglossoids*** 17 (12): 1869-1878, 2000.

Latinne, A., Waengsothom, S., Rojanadilok, P., Eimampai, K. and Sribuarod, K., "Combined mitochondrial and nuclear markers revealed a deep vicariant history for Lepoldamys neilli, a cave- dwelling rodent of Thailand", ***Plos One***, 7 (10): e47670, 2012.

Latinne, A., Waengsothorn, S., Herbreteau, V. And Michaux, J.R., "Evidence of complex phylogeographic structure fort he threatened rodent Leopoldamys neilli, in Southeast Asia", ***Conservation Genetics*** 12: 1495-1511, 2011.

Lovejoy, N.R. and de Araujo, M.L.G., "Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus Potamorrhaphis", ***Molecular Ecology*** 9: 259-269, 2000.

Lydeard, C. and Roe, K.J., "The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships actinopterygian fishes. In: molecular systematics of fishes (Kocher, T.D. and Stepien, C.A, eds), ***San Diego: Academic Press,*** 285-303, 1997.

Matschie, P. *Spalaxlabaumei* eine anscheinend noch nicht beschreibene Blindmaus aus Kleinasien. **Sitz. Ber. Ges. Nat. Fr. Berlin**, 35-38, 1919.

Matthew J. Mason and Peter M. Narins "Seismic Signal Use by Fossorial Mammals" ***American Zoology*** 41:1171-1184 (2001).

Mehely, "(Mammalia: Rodentia) in Turkey", ***Acta Zoologica Bulgarica.*** 59(1), 41-46, 1909.

Meyer, A. and Wilson, A.C., "Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish", ***Journal of Molecular Evolution,*** 31: 359-364, 1990.

Misonne, X., "Mammiferes de la Turquie sud-orientale et du nord de la Syrie", ***Mammalia*** 21, 53-68, 1957.

Montgelard, A., Caatzeflis, F.M. and Douzery, E. "Phylogenetiz relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparision of cytochrome b and 12S rRNA mitochondrial sequences" ***Molecular Biology and Evolution*** 14(5): 550-559, 1997

Mullis, K.B., "The unusual origin of the polymerase chain reaction a surprisingly simple method for making unlimited copies of DNA fragments was conceived under unlikely circumstances-during a moonlit drive though the mountains of Californi", ***Scientific American*** 262 (4), 56-61, 1990.

Nehring, A., ''Über mehrere neue *Spalax* Arten'', ***Sitzb. der Gesellsch. Naturf. Freunde Z.,*** Berlin., 171-183, 1898.

Nemeth, A., Homonnay, Z.G., Krizsik, V., Csorba, M., Pavlic, T., Hegyeli, Z., Hadid, Y., Sugar, S., Farkas, J. and Csorba, G., "Old views and new insifhts: taxonomic revision of the Bukovina blind mole rat, Spalax graecus (Rodentia: Spalacinae)", ***Zoological Journal of the Linnean Society*** 2013.

Németh, A., Révay, T., Hegyel, Z., Farkasi, J., Czabani, D., Rozsas, A. and Csorba, G., "Chromosomal forms and risk assesment of Nannospalax (superspecies leucodon) (Mammalia: Rodentia) in the Carpathian Basin", ***Folia Zoologica*** 58(3): 349-361, 2009.

Nevo, E., "Evolutionary theory and processes of active speciation and adaptive radiation in subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel", ***Evolution and Biology*** 25, 1-125, 1991.

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'', ***Proceedings of the National Academiy of Science*** USA. 91, 8160-8164, 1994.

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'', ***Evolution Journal of the Linnean Society*** 54, 203–229, 1995.

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.

Nicolas, V., Herbeteau, V., Couloux, A., Keovichit, K. and Douangboupha, B, "A remarkable case of micro- endemism in Laonastes aenigmamus (Diatomyidae, Rodentia) revealed by nuclear and mitochondrial DNA sequence data", ***Plos One*** 7 (11): e48145, 2012.

Nordmann, A., ''Observations sur la Faune Pontique'', A. Demidoff Voyage dans la ***Russie Meridion,*** 3(35), 1840.

Ognev, S.I., "Mammals of the U.S.S.R. and adjacent Countries. Vol. V. Rodents", ***Moskova***, 1-662, 1947.

Pages, M., Chaval, Y., Herbreteau, V., Waengsothom, S., Cosson, J.F., Hugot, J.P., Morand, S. and Michaux, J., "Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny- based delimination of species boundaries", ***Journal BMC Evolutionary Biology*** 10: 184, 2010.

Prusak, B., Grzybowski, G. And Zieba, G., "Taxonomic position of Bison bison (Linnaeus, 1758) and Bison bonasus (Linneaeus, 1758) based on analysis of cytb gene", ***Animal Science Papers and Reports*** 22 (1): 27-35.

Qumsiyeh, M.B. Mammals of the Holy, ***Texas Pech Press***, Lubbock, 1996.

Rocha- Olivares, A., Rosenblatt, H.R. and Vetter, D.R., "Molecular evolution, systematic and zoogeography of the rockfish subgenus Sebastomus (Sebastes, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome b and control region sequences", ***Molecular Evolution and Phylogenetic*** 11: 441-458, 1999.

Rozas, J., Librado, P., Sánchez-Del Barrio J.C., Messeguer, X. And Rozas, R., DnaSP Version 5, 2010.

Satunin, K.A., "*Spalax nehringi* nov. ap.", ***Zoologischer Anzeiger XXI,*** 314-315, 1898.

Savic, I.R. and Soldatovic, B., ''Distribution range and evolution of chromosomal forms in the Spalacidae of Balkan Peninsula and bordering regions'', ***Journal of Biogeography*** 6, 363-374, 1979.

Sözen, M., Çolak, F., Sevindik, M. ve Matur, F., "Cytotypes of Nannospalax xanthodon (Satunin, 1898) (Rodentia: Spalacidae) from western Anatolia", ***Turkish Journal of Zoology*** 37:1108- 25, 2013.

Sözen, M., Matur, F., Çolak, E., Özkurt, Ş. and Karatas, A., ''Some karyological records and a new cytotype for Spalax (Mammalia: Rodentia) in Turkey'', ***Folia Zoologica*** 55, 247-256, 2006a.

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.

Storz, J.F., Sabatino, S.J., Hoffmann, F.G., Gering, E.J., Moriyama, H., Ferrand, N., Monteiro, B. And Nachman, M.W, “The molecular basis of high-altitude adaptation in dear mice”, ***PLoS Genetics*** 2007.

Sturmbauer, C. and Meyer, A., “Genetic divergence, speciation and morphological statis a lineage of African cichlid fishes”, ***Nature,*** 13; 358 (6387): 578-81, 1992.

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", ***Molecular Biology and Evolution*** 13(1), 85-92, 1996.

Swofford, D.L., Olsen, G.J, Waddell, P.J. and Hillis, D.M., “Phylogenetic Inference” In Hillis, D.M., Moritz, D. and Mable, B.K., (editors), ***Molecular Systematics*** Sunderland, Massachusetts, 407-514, 1996.

Szunyoghy, J., ‘’Two new species of mole rats from Asia Minor’’, ***Allattani Kozlemenyek*** (in Hungarian with German summary) 38, 78–86, 1941.

Şen, Ş. Ve Sarıca, N., “Middle- Late Miocene Spalacidae (Mammalia) from western anatolia, and the phylogeny of the family”, ***Bulletin of the Earth Sciences Application and Research Centre of Hacettepe University*** 32 (1), 21-50, 2011.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., “MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods”, ***Molecular Biology and Evolution*** 28 (10): 2371-2739, 2011.

Topachevskii, W.A., "Fauna U.S.S.R. Spalacidae’’, ***Leningrad; Nauka,*** (English translation***;*** U.S Dept. Commerce. Natn. Info. Serv., Springfield, Virginia), 1969.

Wahrman, J., Goitein, R. and Nevo, E., ‘’Geographic variation of chromosome forms in Spalax, a subterranean mammal of restricted mobility’’, ***Comparative Mammalian Cytogenetics*** 30-48, 1969a.

Wallace, T., “Investion of long period regional body wavws for crustal structure”, ***Geophysical Research Letters*** 13:8 749-752 , 1986

Wilson, A.C., R.L Cann, S.M. Carr, M. George, JR., U. B. Gyllensten, K.M. Helm-Bychowski, R.G. Higuchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage and M. Stoneking,

"Mitochondrial DNA and two perspectives on evolution- ary genetics" ***Biological Journal of the Linnean Society*** 26: 375-400, 1985.

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.

Yılmaz, S. ve Devran, Z., "Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları", ***Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü***, Antalya, yıl?

ÖZGEÇMİŞ

Arzu REŞADİ 29.03.1989 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk öğrenimini (1995-2003) Yenituran İlköğretim Okulunda, ortaöğretimini (2003-2006) ise Mustafa Kemal Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Haziran 2011'de mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı.