T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDEKİ *NANNOSPALAX NEHRINGI* SATUNIN, 1898 (MAMMALIA: RODENTIA) ÜSTTÜRÜNÜN SSCP METODU KULLANILARAK SİTOKROM b GENİNİN DNA DİZİ VARYASYONLARI

Elif GÜLBAHÇE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Konya, 2009

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KONYA BÖLGESİNDEKİ *NANNOSPALAX NEHRINGI* SATUNIN, 1898 (MAMMALIA: RODENTIA) ÜSTTÜRÜNÜN SSCP METODU KULLANILARAK SİTOKROM b GENİNİN DNA DİZİ VARYASYONLARI

Elif GÜLBAHÇE

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Y. Doç. Dr. Emine ARSLAN

2009, 67 Sayfa

Jüri: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK

Bu çalışmada morfolojik olarak ayırt edilemeyen *Nannospalax nehringi* üsttürüne ait 2n=40, 58 ve 60 kromozomal formların mitokondrial bir gen olan sitokrom b geni ile genetik akrabalığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Konya bölgesinde yayılış gösteren bu kromozomal formların sitokrom b geninin dizi varyasyonları SSCP ve dizi analizi metodu kullanılarak tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuçları ile CLC Main Workbench versiyon 5.1 bilgisayar programı yardımıyla genetik akrabalığı gösteren dendrogram elde edilmiştir. Bu dendrograma göre 2n=40 kromozomal forma ait bireyler ayrı monofiletik bir grupta yer alırken, bundan oldukça farklı bir yerde ise 2n=58 ve 60 kromozomal forma ait örnekler kümelenmişlerdir. On üç farklı lokaliteden toplam 14 kör fare örneğinin sitokrom b geni dizi varyasyonları %18.6 olarak hesaplanmıştır ve bu varyasyonların %26.6'sı transversiyondur. Dizi analizi sonuçlarına göre baz pozisyonundaki en çok farklılık 2n=40 kromozomal form ile 2n=60 kromozomal form arasında görülmüştür (%10.2). Elde edilen sonuçlar 2n=40 kromozomal formun türleşmesini desteklemektedir. SSCP ve dizi analizi yöntemleri kullanılarak Sitokrom b geninin kör farelerin filogenisinde oldukça faydalı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Nannospalax nehringi*, Sitokrom b, SSCP, Dizi Analizi

ABSTRACT

MSc. Thesis

DNA SEQUENCE VARIATIONS OF THE CYTOCHROME b GENE USING SSCP METHODOF THE *NANNOSPALAX NEHRINGI* SATUNIN, 1898 (MAMMALIA: RODENTIA) SUPERSPECIES IN KONYA REGION

Elif GÜLBAHÇE

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emine ARSLAN

2009, 67 Pages

Jury: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Assist. Prof. Dr. Emine ARSLAN

Assist. Prof. Dr. Haluk ÖZPARLAK

The aim of this study was to determine the genetic relationship of the chromosomal forms of 2n=40, 58 and 60 that belong to Superspecies, *Nannospalax nehringi,* which was not classified morphologically with cytochrome b gene, the mitochondrial gene. Sequence variations of cytochrome b gene of these chromosomal forms distributed in Konya region were found using SSCP and sequence analysis method. With DNA Sequence analysis results, dendrogram which shows genetic relationship was obtained with the help of CLC Main Workbench version 5.1 computer programme. According to this dendrogram, while indivuduals belonging to 2n=40 choromosomal form take place in a separate monophyletic group, samples belonging to 2n=58 and 60 chromosomal forms are clustered in a quite different place. From thirteen different localities, cytochrome b sequence variations of 14 blind mole rat samples were estimated as 18.6%, and 26.6% of these variations are transversions. According to sequence analysis, the biggest difference in base position was observed between 2n= 40 chromosomal form and 2n= 60 chromosomal form (10.2%). The results supported the classification of the two chromosomal forms. By using SSCP and sequence variation, cytochrome b gene was observed to be quite useful in phylogeny of blind mole rats.

Keywords: *Nannospalax nehringi*, Cytochrome b, SSCP, Sequence Analysis

ÖNSÖZ

Bu çalışmada öncelikle her türlü bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen bana her konuda yardımcı olan, beni her zaman destekleyen ve başarıya ulaşmam için elinden gelen her türlü fedakârlığı gösteren değerli Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam için gerekli örneklerimin toplanmasında bizzat bulunan ve örneklerimin kromozom sayısının belirlenmesinde bana yardımcı olan Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Atilla ARSLAN'a, yine moleküler çalışmalarımda karşılaştığım problemleri aşmam için bana yardımcı olan ve laboratuvarında bana çalışma imkânı sunan Sayın Hocam Dr. Hilal ARIKOĞLU'na, elde ettiğim sonuçların değerlendirilmesinde ve her türlü problemimde benden yardımını esirgemeyen Sayın Dr. Tuna UYSAL hocama ve laboratuar çalışmalarımda yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Serengül LADİKLİ ve Ömer DURSUN'a, bu araştırmayı maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam ve öğrenim hayatım boyunca her koşulda maddi manevi her türlü desteği sağlayan ve benim bu günlere ulaşmamda çok büyük emekleri geçen değerli babam Suphi GÜLBAHÇE ve annem Şenay Fatma GÜLBAHÇE'ye, son olarak mutlu günlerime sevecenliği ve espirileriyle daha da çok neşe katan sevgili kardeşim Erdi GÜLBAHÇE'ye sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

2008, Konya
Elif GULBAHÇE

İÇİNDEKİLER

ÖZET ……. iii

ABSTRACT ……..... iv

ÖNSÖZ ……..... v

İÇİNDEKİLER ……..... vi

ŞEKİLLER DİZİNİ …….. viii

TABLOLAR DİZİNİ ……..... x

SİMGELER DİZİNİ …… xi

1. GİRİŞ …… 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI ……..... 7

2.1. Polimorfizm ……..... 13

2.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ……..... 13
2.1.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) …… 14

2.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) …….. 14

2.3. DNA Dizi Analizi ……. 16

3. MATERYAL VE METOT ……..... 17

3.1. Materyal …….. 17

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvan Örnekleri ……... 17

3.1.2. Kimyasal Maddeler …….. 18

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler ……. 19

3.1.3.1. Dokudan Genomik DNA İzolasyonu İçin Gerekli Çözeltiler . 19

3.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Gerekli Çözeltiler ……..... 19

3.1.3.3. SSCP İçin Gerekli Çözeltiler …….. 20

3.1.3.3.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Gerekli Çözeltiler 20

3.1.3.3.2. SSCP Tamponu İçin Gerekli Çözeltiler ……. 20

3.1.3.3.3. Gümüş Boyama İçin Gerekli Çözeltiler ……..... 20
3.2. Metot …… 21
3.2.1. Doku Örnekleri ……...……. 21
3.2.2. Dokudan Genomik DNA İzolasyonu ……. 21
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması …….. 22
3.2.4. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ……. 23
3.2.5. PZR Ürünlerinin SSCP Analizi …….. 23
3.2.5.1. Camların Hazırlanması …….. 23
3.2.5.2. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması …….. 24
3.2.5.3. PZR Ürünlerinin SSCP çözeltisiyle Tek İplik Oluşturulması ve Poliakrilamid Jele Yüklenmesi …… 24
3.2.5.4. Gümüş Boyama ……..... 25
3.2.6. Dizi Analizi ……..... 25
3.2.7. İstatiksel Değerlendirme ……..... 26
4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA ……..…….. 27
4.1. PZR ……..…….... 27
4.2. SSCP Analizi Sonuçları …… 28
4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçları ……..... 30
4.4. Filogenetik Analiz ……..……..... 45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER …….. 53
6. KAYNAKLAR ……..……. 55

ŞEKİLLER DİZİNİ

No **Sayfa**

Şekil 1.1. *Nannospalax* Üsttürlerinin Türkiyedeki yayılış alanı (Sözen 2004) …… 3

Şekil. 4.1. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 386 bç büyüklüğündeki PZR ürününün Agaroz jel görüntüsü ……. 27

Şekil. 4.2. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 473 bç büyüklüğündeki PZR ürününün Agaroz jel görüntüsü ……..... 28

Şekil 4.3. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 386 bç'lik ilk parçasının SSCP analizi ……. 29

Şekil 4.4. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 473bç'lik ikinci parçasının SSCP analizi …… 29

Şekil 4.5. *N. nehringi* 5 üsttürünün sitokrom b genini içine alan 386 bç'lik mtDNA'nın ham dizi verisi …… 31

Şekil 4.6. *N. nehringi* 5 üsttürünün sitokrom b genini içine alan 473 bç'lik mtDNA'nın ham dizi verisi ……... 32

Şekil 4.7. Çalışılan *Nannospalax nehringi* üsttürlerinin sitokrom b dizileri …… 34

Şekil 4.8. NCBI Gen bankasındaki diziler (Sözen ve ark. 2009) ile çalışılan örneklerin sitokrom b dizilerinin hizanlanması …….. 42

Şekil 4.8. (devam) NCBI Gen bankasındaki diziler (Sözen ve ark. 2009) ile çalışılan örneklerin sitokrom b dizilerinin hizanlanması ……..... 43

Şekil 4.8. (Son) NCBI Gen bankasındaki diziler (Sözen ve ark. 2009) ile çalışılan örneklerin sitokrom b dizilerinin hizanlanması ……..…… 44

Şekil 4.9. Sitokrom b geninin primer tasarısının yapıldığı Gen Bankasında mevcut olan (AJ389537 erişim nolu) *Nannospalax ehrenbergi* üsttürü ile çalışılan 14 örneğin CLC Main Workbench versiyon 5.1 programı ile elde edilen dendrogramı …….. 46

Şekil 4.10. CLC Main Workbench versiyon 5.1 ile NCBI Gen bankası ve çalışılan örneklerin birlikte dendrogramı …… 49

TABLOLAR DİZİNİ

No **Sayfa**

Tablo 3.1. Konya ilinden elde edilen körfarelerin lokaliteleri ……. 18

Tablo. 3.2. Sitokrom b gen bölgesine ait kullanılan primerler, ürün büyüklüğü ve primer bağlanma sıcaklıkları Tm (ºC) ……..…… 22

Tablo.3.3. Poliakrilamid Jel içeriği ……..... 24

Tablo 4.1. 14 *Nannospalax nehringi* üsttürünün genetik uzaklık matrixsi ……. 47

SİMGELER DİZİNİ

AFLP: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

APS: Amonyum Per Sülfat

bç: Baz çifti

ºC: Santgrad derece

dATP: deoksi adenozin trifosfat

dCTP: deoksi sitidin trifosfat

dGTP: deoksi guanozin trifosfat

dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP

dTTP: deoksi timidin trifosfat

EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit

Hx: Ortalama entropi

mA: Miliamper

Mg: Miligram

MgCl2: Magnezyum klorür

mM: Milimolar

mtDNA: Mitokondrial DNA

ml: Mililitre

NaCl: Sodyum klorür

ng: Nanogram

NF: Temel kromozom kol sayısı

NFa : Otozomal Kromozom Kol Sayısı

NOR: Nükleolar Organizatör Bölgeler (Nucleolar Organizer Region)

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reactions)

RAPD: RasgeleÇoğaltılmış DNA Farklılığı (Random Amplification of Polymorphic DNA)

rDNA: Ribozomal DNA

RFLP : Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (Restriksiyon fragment Lenght Polymorphism)

Rpm: Dakikadaki devir sayısı

SDS: Sodyum Dodasil Sülfat

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

SSCP: Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism)

TAE: Tris-Asetikasit-EDTA (Tampon)

TBE: Tris-Borikasit-EDTA (Tampon)

TE: Tris-EDTA (Tampon)

TEMED: Tetrametiletildiamin (Tetramethylethylenediamine)

Tm: Erime sıcaklığı

Tris-HCl: Tris hidroklorür

UV: Ultraviyole

W: Watt

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

1. GİRİŞ

Türkiye'deki jeomorfolojik değişimler canlılarda az ya da çok değişimler meydana getirmiştir. Anadolu üç kıtanın birleştiği stratejik bir bölge olması nedeniyle birçok türün gen merkezi olmakla birlikte biyoçeşitlilik açısından da oldukça zengindir. Dünya'daki ekocoğrafik bölgelerle karşılaştırıldığında Amazon bölgesinden daha zengin ekosistemlere sahip olması yönleriyle de dünyadaki nadir ekolojik alanlardan biridir (Kışlalıoğlu ve Berkes 1987, Kurtonur 1996, Benda ve Horacek 1998, Gülkaç ve Yüksel 1999). Ayrıca milyonlarca yıldır geçirdiği jeolojik değişiklikler nedeniyle flora ve faunasında büyük çeşitlenmelere sebep olmuştur. Bu değişimlerden etkilenen gruplardan birisi de *Spalax* cinsi kör farelerdir (Gülkaç ve Yüksel 1999). Bu cinse dahil üyeler üzerinde yapılan çalışmalar 1770'li yılların sonlarında başlamış ve Spalacidae familyasına ait bireyler olarak kabul edilmişlerdir (Topochevskii 1969, Mursaloğlu 1979, Savic 1982, Kıvanç 1988, Savic ve Nevo 1990, Nevo 1991). Spalacidae familyasının cins ve türlerinin filogenisi ve sistematiği familyanın tanımlanmasından beri problemlidir. Bu problem tür seviyesine kadar görülmektedir ve hala tam olarak çözümlenememiştir. Bu problemin nedeni, familya üyelerinin toprak altı yaşama kongervent evrimleri ve son derece morfolojik olarak benzer olmalarıdır (Savic ve Nevo 1990).

Spalacidae familyası paleartrik bölgede bulunmaktadır. Bu familyanın dağılım alanı Kuzeydoğu Afrika, Balkanlar, Güneydoğu Avrupa, Orta Asya, Orta doğu ve Kafkasları içermektedir (Corbet 1978).

Spalacidae familyası monofiletik bir grup olmakla birlikte semi-hypsodont, köklü ve güçlü dişlere sahip olmaları ile karakterize edilmektedir (Ünay 1996, Nevo ve ark. 2001). Ellerman (1940), Ellerman ve Marrison-Scott (1966) *Spalax* cinsine ait *Spalax ehrenbergi, Spalax leucodon* ve *Spalax microphthalmus* olmak üzere üç tür belirlemişlerdir. Bunun yanında *Spalax* cinsi için ayrı ayrı pek çok adlandırma (Mehely 1909, Topachevskii 1969, Wilson ve Reeder 1993, Savic ve Nevo 1990) yapılmıştır.

Nevo'nun (1991) çalışmasında da belirttiği gibi Topachevskii (1969), Spalacidae'yi Prospalacinae ve Spalacinae olmak üzere iki alt familyaya ayırmıştır. Bu araştırmacıya göre, Prospalacinae'ye ait fosil olarak değerlendirilen tek bir cinsi *Prospalax* vardır. Bu cins De Burujin tarafından Anomalamyidae familyasına dahil edildiği için günümüzde Prospalacinae kullanılmamaktadır. Günümüzde yaşayan Spalacinae alt familyası ise *Microspalax* ve *Spalax* olmak üzere iki cins ile temsil edilmektedir.

Topachevskii'nin (1969) yaptığı taksonomik hiyeraşi şu şekildedir;

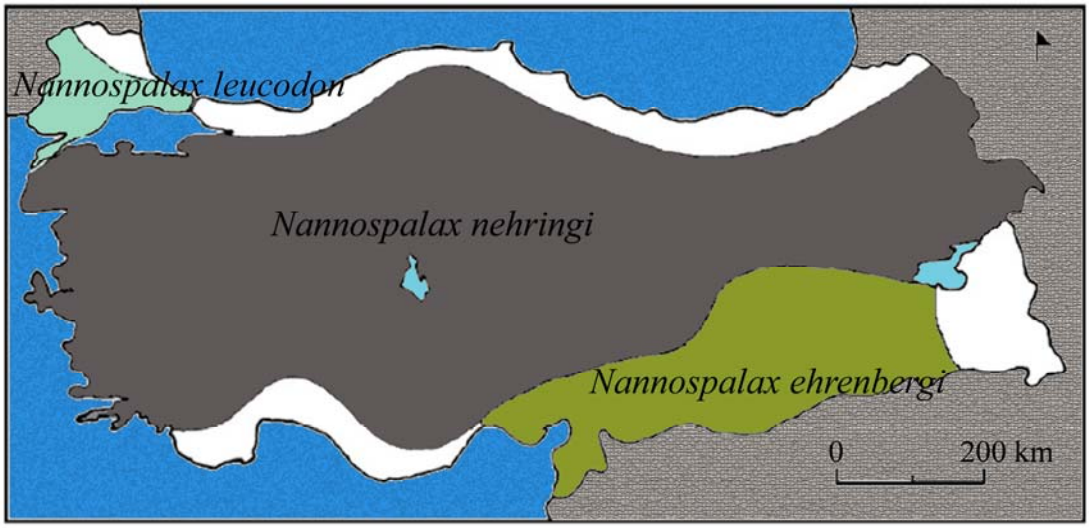
Familya: Spalacidae
1. Altfamilya: Prospalacinae
Cins: *Prospalax*
Tür: *P. piriscus, P. rumanus*
2. Altfamilya: Spalacinae
Cins: *Microspalax*
Altcins: *Microspalax*
Tür: *M. ehrenbergi*, *M. compositodontus*
Altcins: *Mesospalax*
Tür: *M. nehringi*, *M. leucodon*
Cins: *Spalax*
Tür: *S. giganteus*, *S. arenarius*, *S. graecus*, *S. polonicus*, *S. microphtalmus, S. minor*

Bununla birlikte, Sözen ve ark. (1999) M*icrospalax* (Nehring 1898) cinsinin 1884 yılında Megnin ve Trouessart tarafından bir Acarina için kullanıldığını belirterek *Microspalax* yerine *Nannospalax* Palmer, 1903 kullanılması gerektiğini belirtmiştir.

Wilson ve Reeder'e göre (2005) ise Spalacinae alt familyasına ait *Nannospalax* (*Mesospalax*, *Microspalax* ve *Spalax*'ı kapsayan) adı ile tek bir cins mevcuttur. Bu cinse ait *N. ehrenbergi* (Nehring 1898), *N. leucodon* (Nordmann 1840) ve *N. nehringi* (Satunin 1898) olmak üzere üç tür bulunmaktadır (Aşan ve Yağcı 2008).

Nannospalax cinsinin yayılış alanları şu şekildedir ve Türkiyedeki yayılış alanı Şekil 1.1'de gösterilmektedir (Akan 2009);

- ***N. leucodon:*** Dünya'da Balkan Yarımadası (Macaristan, Yunanistan, Romanya, Bulgaristan), Ukrayna, Odessa olup Türkiye'de ise Trakya
- ***N. ehrenbergi:*** Dünya'da Yafa, Kuzey Irak, Suriye, Lübnan, Ürdün ve Kuzey Afrika olup Türkiye'de ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi
- ***N. nehringi*:** Dünya'da Ermenistan, Gürcistan, Kasikoporan olup Türkiye'de ise Marmara Bölgesi, Ege Bölgesi, İç Anadolu Bölgesi, Doğu Anadolu Bölgesi ile Gökçeada ve Bozcaada



Şekil 1.1. *Nannospalax* üsttürlerinin Türkiyedeki yayılış alanı (Sözen 2004)

Bu çalışmada ise Wilson ve Reeder'in (2005) yapmış olduğu sınıflandırma dikkate alınmıştır.

Literatürlerde *Nannospalax* cinsi için yayılış alanlarında günümüze kadar 50'den fazla kromozomal form (2n=36-62, Temel kromozom kol sayısı (NF)=70-124) bulunmuştur (Wahrman ve ark. 1969, Nevo ve ark. 1994a, 1995, 2001, Sözen 2004). Bu cinsin yayılış gösterdiği alanlar içinde de en fazla çeşitlilik gösteren yer Türkiye'dir ve 30'dan fazla kromozomal form bulundurmaktadır (Nevo ve ark. 1994a ve 2001, Sözen ve Kıvanç 1998a ve b, Sözen ve ark. 1999, 2000a, b ve 2006,

Tez ve ark. 2001 ve 2002, Coşkun 2003 ve 2004, Sevindik 2004, Çataklı 2004, Sözen 2004, Sözen ve Matur 2005). İç Anadolu bölgesindeki kör fare populasyonlarının diploid kromozom sayıları ise 2n=40-58 arasında bulunsa da bu populasyonların ana karyotipleri 2n=60 ve 2n=62'dir (Tez ve ark. 2001).

Türkiye'deki *Nannospalax*'ların her bir kromozomal formu için kromozomal türleşme yapılması önerilmektedir (Nevo ve ark. 1994a, 1995). Kromozom sayıları farklı olan formların genetik farklılaşma derecesinin belirlenmesi, gen akışlarının devam edip etmediğinin ortaya konması ve bu formların ayrı birer tür olup olmadığının karar verilmesi için sadece morfolojik özelliklerinin değil aynı zamanda moleküler bazı tekniklerin (mtDNA, enzim elektroforezleri v.b.) ve kromozom bantlama gibi çalışmaların da yapılması gerekmektedir (Akçın 2006).

Tek başına morfolojik karakterler kullanılarak toplam karakter örneklerinin anlaşılmasının güçlüğü nedeniyle karşılıklı filogeniyi düzenlemek çok zordur. Son yıllarda herhangi bir organizmanın total DNA'sından markır genlerin dizilemesine ve çoğaltımına izin veren yeni bir kimyasal PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu=Polimerase Chain Reactions) metodu geliştirilmiştir (Wink ve ark. 1993). Bu markır genlerin dizi varyasyonları türler, cinsler ve yüksek taksonlar arasında akrabalıkları değerlendirmek için kullanılabilir (Hillis ve Moritz 1990, Hoelzel 1992). Temel amaç, esas evolüsyon tarihinin ve göç modelinin yorumlanması ve filogenetik ağaçların yeniden yapılandırılmasıdır. Bunun için kullanışlı bir markır olarak görülen gen, sitokrom b genidir. Çünkü bu gen tür, cins ve familya seviyesindeki kuşlar ve diğer omurgalı hayvanlarda filogenetik akrabalığı incelemek için yeteri kadar dizi varyasyonu göstermektedir (Hillis ve Moritz 1990, Hoelzel 1992, Wink ve ark. 1993).

Kromozomal türler arasındaki sınırlı gen akışı çok sayıda genetik markırlarla belgelendirilmektedir (Nevo 1991). Pek çok hayvan türlerinin evrimsel akrabalıkları ve populasyon yapılarının açığa çıkarılması çalışmalarında ribozomal DNA (rDNA) ve mitokondrial DNA (mtDNA) moleküler genetik markırları olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Arnhein ve ark. 1980, Yonekawa ve ark. 1981, 1988, Ferris ve ark. 1983, Wilson ve ark. 1984, Suzuki ve ark. 1986, 1987, 1990, 1994, Allard ve

Honeycutt 1991, Nevo ve Beiles 1992, Wall ve ark. 1992, Hosoda ve ark. 1993, Nevo ve ark. 1993). Hem rDNA ve mtDNA'nın memeli genomunda kopyaları olduğu için hem de pek çok Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP)'leri her populasyona (populasyon içi ve populasyonlar arası) özgü olduğu için populasyonların tanımlanmasında güçlü tanısal markırlar olarak iş yaparlar (Suzuki ve ark. 1996).

Nüklear ve mitokondrial dizilerin evolüsyon gelişimlerinde farklı kullanıma sahip olduğu bilinmektedir (Robinson ve ark. 1997). Rodentlerin taksonomik incelemelerine göre moleküler çalışmalar, dizisi bilinen sadece iki mitokondrial gen (12S rRNA ve sitokrom b) çalışmaları ile başlangıç aşamasındadır (Nedbal ve ark. 1994, 1996, Catzeflis ve ark. 1995, Hanni ve ark. 1995). Nükleotit kompozisyon heterojenitesi memelilerin sitokrom b genleri arasında incelenmiş (Jermiin ve ark. 1994) ve bu hem evolüsyon oranlarını hem de tahminlerini etkilemiştir (Andrews ve ark. 1998).

mtDNA, hem tür içinde hemde türler arasındaki büyük dizi polimorfizmlerini (Avise ve ark. 1983, Avise 1991) ve hızlı bir evolüsyon oranında tür altı kategorileri arasındaki çeşitliliği gösteren son derece aydınlatıcı genetik bir markırdır (Suzuki ve ark. 1999).

Nüklear ribozomal rRNA geni ve bütün mtDNA atasal farklılık içeren filogenetik akrabalığın değerlendirilmesinde kullanılmasına rağmen, populasyon ya da düşük seviyedeki taksonomik akrabalığın değerlendirilmesinde sadece mtDNA genleri kullanılmaktadır (Rocha-Olivares ve ark. 1999, Lovejoy ve de Araujo 2000, Tsigenopoulos ve Berrebi 2000).

Sitokrom b filogenetik çalışmalar için en çok kullanılan genlerden biri olarak düşünülür ve muhtemelen protein ürününün yapısı ve fonksiyonu ile ilgili olarak en iyi bilinen mitokondrial gendir (Esposti ve ark. 1993). Bu nedenle canlıların taksonomik seviyedeki farklılığın çözümü için sistematik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism; SSCP) analizi, PZR'a dayalı mutasyonların tanımlanması için oldukça basit, güvenilir ve hassas metodlardan biridir (Orita ve ark. 1989, Sheffield ve ark. 1993). Pek çok literatür SSCP'nin tek baz değişikliklerini belirlemek için etkileyici hassasiyette bir metot olduğunu savunmaktadır. Ancak küçük fragmentler (<300 bç) tek baz değişikliklerini belirlemede oldukça uygundur (Fujita ve Silver 2008).

Türkiye'de *Nannospalax*'ın kromozomal formlarına ait sitokrom b geninin dizi varyasyonları online veri tabanı olan NCBI Gen Bankasında bulunmakta olup yayınlanmış bir makaleye rastlanmamıştır (Sözen ve ark. 2009).

Bu çalışmanın amacı, Konya bölgesinde yayılış gösteren morfolojik olarak ayırt edilmesi mümkün olmayan ve farklı kromozomal formlara sahip olan *N. nehringi* üsttürüne ait 2n=40, 58 ve 60 formlarının sitokrom b geni dizi varyasyonları belirlenerek bu cinsin kromozom formları arasındaki polimorfizmlere göre akrabalık derecesini tesbit etmek ve NCBI Gen Bankasında bulunan diğer sitokrom b dizi varyasyonları ile karşılaştırmaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Muroidea familyasına ait olan rodentler memelilerin birçok farklı grubunu oluştururlar (Musser ve Carleton, 1993). Evolüsyon sistematik çalışanları bu familyayı, birçok kararsızlıklara ve çakışan fikirlere rağmen 17 büyük altfamilyaya ayırmaya karar vermişlerdir (Michaux ve ark. 2001). Spalacidae familyası da Muroidea'nın özelleşmiş bir dalı olarak değerlendirilmesine (Corbet 1978, Nowak ve Parasido 1983, Carleton ve Muser 1984, Corbet ve Hill 1991) rağmen Topachevskii (1969), Harrisson (1972), Mursaloğlu (1979), Savic ve Nevo (1990) gibi çok sayıda araştırmacı çalışmalarında Spalacidae'yi kabul etmektedir. Son taksonomik çalışmaların çoğunda bu alt familyaya ait olan kör fareler toprak altı yaşama adapte olmuşlardır ve bu cinse ait bireyler Güneydoğu Avrupa, Anadolu, Kafkasya, Transkafkasya, Ukrayna, Ermenistan, Suriye, Filistin, İsrail, Irak, Ürdün ve Kuzey Afrika'da yayılış göstermektedirler (Corbet 1978, Savic ve Nevo 1990, Harrison ve Bates 1991).

Spalacidae sistematik ve filogenik açıdan tanımlandığından beri tartışmalıdır ve bu tartışma tür seviyesinde olup henüz bir fikir birliğine ulaşılamamıştır (Ognev 1947, Topachevskii 1969, Corbet 1978, Carleton ve Musser 1984, Savic ve Nevo 1990, Wilson ve Reeder 1993). Bu karmaşık durumun nedeni, familya üyelerinin toprak altı yaşama kongervent evrimleri ve son derece morfolojik olarak benzer olmalarıdır (Savic ve Nevo 1990).

Literatürlerde *Nannospalax* cinsinin rapor edildiği bazı çalışmalarda 2n=36 ile 2n=62 arasında 50'den fazla kromozomal formu bildirilmiştir (Wahrman ve ark. 1969, Nevo ve ark. 1994a, 1995 ve 2001, Sözen 2004).

Kıvanç (1988) tarafından verilen yayılış alanında *Nannospalax leucodon cilicicus* için 7 farklı kromozomal formu (2n=50, 52, 54, 56, 58, 60, 62) belirlenmiştir (Nevo ve ark. 1994a, 1995, Sözen ve Kıvanç, 1998a, b, Sözen ve ark. 1999, 2000b, Sözen 2004, Sevindik 2004, Çataklı 2004).

Rabitson translokasyonu olarak bilinen sentromerik kaynaşma ile kromozom translokasyonu birçok hayvan türünde incelenerek (Suzuki ve ark. 1996). Spalacidae familyası içinde oldukça yaygın olduğu görülmüştür (Savic ve Nevo 1990, Nevo 1991, 1994a, 1995, 2000, 2001, Sözen 2004). Türkiye'de *Nannospalax* cinsinin morfolojik çalışmalar bakımından *N. leucodon* ve *N. ehrenbergi* olmak üzere iki türü ve *N. leucodon nehringi, N.l. armeniacus, N.l. cilicicus, N.l. anatolicus, N.l. turcicus, N. nehringi tuncelicus, N. n. nevoii, N. ehrenbergi intermedius* ve *N.e. kirgisorum* olmak üzere dokuz alttürü tanımlanmıştır (Mursaloğlu 1979, Kıvanç 1988, Coşkun 1996 a,b). Daha sonra Coşkun (2004) Türkiye *Nannospalax*'larından daha önce alttür olarak tanımladığı *N.l. tuncelicus*'u (1996a) tür seviyesine yükseltmiş ve *Nannospalax tuncelicus* ismini vermiştir ve bundan başka *Nannospalax munzuri* üsttürünü tanımlamıştır.

Türkiye'de bulunan *N. nehringi* Nevo ve ark. (2001) tarafından bir üsttür olarak değerlendirilmekte ve İsrail'deki *N. ehrenbergi*'nin atasal formu olduğu belirtilmektedir. Bu yüzden *N. nehringi* daha fazla yaşlı populasyonlara sahip olmalıdır ve Türkiye'de bulunan populasyonlar genetik mesafe ve allel içerikleri bakımından farklı olmalıdırlar (Nevo ve ark. 1995).

Türkiye'de bulunan *N. nehringi* üsttürü için 2n=36, 38, 40, 48NE, 48E, 50E, 50W, 50N; 52S, 52N, 54N, 54C, 54E, 56S, 56W; 56N, 58S, 58N; 60E, 60C, 60W ve 62 olmak üzere 22 karyolojik form tespit edilmiştir. Ayrıca kromozomal kol sayısı da 68-84 arasındadır (Soldotovic ve Savic 1978, Savic ve Soldotovic 1979, Giagia ve ark. 1982, Yüksel 1984, Gülkaç ve Yüksel 1989, Nevo ve ark. 1994a ve 1995, Sözen ve Kıvanç 1998 a,b, Sözen ve ark. 1999, 2000 a, b ve 2006, Tez ve ark. 2001, 2002, Yüksel ve Gülkaç 2001, Coşkun 2003, Sözen 2004, Sözen ve Matur 2005, Çataklı 2004, Sevindik 2004, Matur ve Sözen 2005). Bu değer aynı kromozom sayısına, fakat farklı NF değerine sahip formlar göz önüne alındığında 33 olmaktadır ve *N.nehringi* biyolojik bir tür olmaya adaydır (Akçın 2006). Heterozigotluk ve 2n değeri ekolojik bakımdan kurak, sert, iklimsel olarak çeşitli ve coğrafik genç olan İç Anadolu'ya doğru her yönden artmaktadır (Nevo 1991). Türkiye'de ise kromozomal türleşme merkeze doğrudur (Nevo ve ark. 1994a, 1995). Nevo ve ark. (1994a)

Türkiye'de 24 lokaliteden 69 örnek üzerinde çalışarak *Nannospalax*'ların türleşme ve adaptasyonu için iklimsel çeşitlilik ve kuraklık stresi ile doğru orantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte Sözen ve ark. (2000b) yalnız 2n değerinin değil de NF değerinin de kuraklık stresi ve iklimsel çeşitlilikle doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu teorinin tam tersine olan çalışmalar da mevcuttur. Sevindik (2004) Kastamonu yöresindeki *Nannospalax*'ların ve Çataklı (2004) Çankırı ilindeki *Nannospalax*'ların bu teoriye uymadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Kankılıç ve ark.'da (2005) Ankara-Beyşehir (Konya) arasında bulunan *Nannospalax*'ların kromozom sayılarını incelemiş ve Nevo ve ark. (1994a)'nın kuraklık teorisine uymadığını göstermiştir.

Yalnız morfolojik özelliklere dayanılarak yapılan çalışmaların ve oluşturulan sistematik sonuçların, karyotip ve allozim çalışmalarının sonuçlarına göre gerçekçi görünmemektedir (Nevo ve ark. 1994a, 1995, 2001). Bunun nedeni morfolojik çalışmaların klasik morfolojik taksonomiye dayanması ve de Spalacidae'nin evriminde gözlenen kromozomal türleşmeyi göz önünde bulundurmamasıdır (Nevo ve ark. 2001).

Rodentler, moleküler evolüsyon çalışmalarında çok fazla ilgi çekmektedir (Robinson-Rechavi ve ark. 2000) ve yaşayan memeli türlerinin %40'nı oluşturmaktadır (Wilson ve Reeder 1993). Hem morfolojik hem de moleküler yaklaşımlar bunların akrabalık ilişkilerini çözmek amacıyla kullanılmaktadır. Geleneksel sistematikçiler, doğal bir grup olarak Rodentia ordosunu çeşitli morfolojik benzerlikleri destekleyen kanıtlar sağlamışlardır. Fakat moleküler çalışmalarda, sadece birkaç takson incelendiği zaman çatışmalı sonuçlar sağlamaktadır (Graur ve ark. 1991, Hasegawava ark. 1992, Philippe ve Douzery 1994). Moleküler sistematik çalışanları, genellikle iki Muridea (*Mus*, *Rattus*) ve bir veya iki Caviomorpha (başlıca *Cavia*) ile sınırlı çok az taksonomik çalışma sayesinde çeşitli mitokondrial ve nüklear veriler sağlayarak bu tartışmaya katkıda bulunmuşlardır (Allard ve ark. 1991, Li ve ark. 1992a, b, Ma ve ark. 1993, Martignetti ve Brarius 1993, Wolf ve ark. 1993, Frye ve Hedges 1995). On üç mitokondrial proteini kodlayan genleri içeren çoğu kapsamlı veriler hala rodentlerin çok atadan geldiğini önermektedir (Porter ve ark. 1996).

Moleküler dizi verileri, sadece plesentalı memelilerin supraordinal gruplarında tamamen farklı bir bakış açısına neden olmakla kalmaz aynı zamanda nüklear ve mitokondrial dizilerin incelenmesinde farklı sonuçlar gösterir. Nüklear genler ve mitokondrial genomlar, farklı kalıtım yolları, farklı seleksiyon baskıları, nesillerin ayırımı, gen duplikasyonu gibi metotlarda diferansiyel cevapların ve hibrit özellikleri sonucunda ayrı filogeniler meydana getirmektedirler (Reyes ve ark. 2004).

Sitokrom c oksidaz subunit I ve subunit II genleri ve sitokrom b geninde 7 tamamlanmış memeli mitokondrial genomlarının (rat, fare, insan, inek, balina, fok ve opossum) evrimsel oranlarının analizi bu nesiller arasında önemli varyasyonlar göstermiştir (Janke ve ark. 1994). Sitokrom c oksidaz subunit I geninin daha detaylı karşılaştırmalı analizi maymun benzeri primatların önemli nesilleri boyunca hızlanan evrimsel bir oranı doğrulamıştır (Adkins ve Honeycutt 1994, Adkins ve ark. 1996, Ramharack ve Deeley 1987). Sitokrom b, insanların hızlı evrimsel bir orana sahip olduklarını göstermiştir (Irwin ve ark. 1991, Ma ve ark. 1993).

Aminoasit dizi verilerinin son zamanlardaki analizi, memeli ordosu olan Rodentia'da rodentlerin tek atadan geldiğini destekleyen morfolojik verilerin tam tersine çok atadan geldiğini önermektedir (Graur ve ark. 1992). Fakat Frye ve Hedges (1995), 12S rRNA, 16S rRNA, $tRNA^{VAL}$'nin komşu mitokondrial dizi verilerinin maksimum parsimoni analizi ve bütün neighbor-joining istatistiklerine göre rodentlerin monofiletik olduğunu desteklemişlerdir.

Son zamandaki moleküler analizler *Myospalax* cinsinin rodentlerin alt familyası olan Cricetinae içerisinde bulunduğunu göstermişlerdir. Norris ve ark. (2003), bu kanıyı 12S rRNA ve sitokrom b genlerini kullanarak analiz etmişler ve sonuçta bu cinsin Spalacidae alt familyası içerisine dahil edilmesini önermişlerdir.

Mitokondrial ve nüklear rDNA boşluk bölgelerindeki restriksiyon kesim varyasyonları, *N. leucodon* (2n=38, 54 ve 62) ve *N. ehrenbergi* (2n=52, 54, 58 ve 60) iki üsttürü ile temsil edilen değişken kromozom sayılı kör farelerin çeşitli populasyonlarında incelenmiştir (Suzuki ve ark. 1996). Her bir üsttürün içindeki varyasyon ortalamanın üzerinde %4 olmasına karşın, üsttürlerin üyeleri arasında

rDNA boşluklarının dizi farklılıkları %8 olarak bulunmuştur. rDNA boşluklarının üsttürler içindeki bu farklılık genellikle diploid kromozom sayılarındaki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu büyük farklılık (yaklaşık olarak %1.5) aynı diploid kromozom sayılarına sahip populasyonlar arasında da tespit edilmiştir. mtDNA dizi farklılığı ise *N. ehrenbergi*'nin haplotipleri arasında %10 veya daha yüksek ve *N. leucodon* haplotipleri arasında ise yaklaşık %12 olarak bulunmuştur. Tam tersi olarak üsttürler arasındaki dizi farklılığının oranı %7.4-12'dir. Kör farelerin her bir üsttürü içindeki mtDNA'ların bu büyük farklılığı atasal mtDNA polimorfizmlerinin korunmasıyla açıklanabileceği sonucuna varılmıştır (Suzuki ve ark. 1996).

Diğer yandan Nevo ve ark. (1993), İsrail'de dört kromozomal form içeren *N. ehrenbergi*'nin mtDNA varyasyonunu incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile mtDNA farklılığının İsrail'de kuzey-güney yönünde düşükten yükseğe doğru diploid numaralarında arttığını 2n=60 kromozom sayısına sahip olan genç türlerde mtDNA farklılığının yüksekliğinin umulmadık şekilde olduğunu ve mtDNA haplotiplerinin 2n=52-54 ve 2n=56-60 olan iki büyük grup içerisine alınabileceğini önermişlerdir. Sonuçta dört kromozomal form arasında ve içerisinde görülen mtDNA farklılığının tüm örneklerinin DNA hibridizasyon ve allozim içeren önceki çalışmalarda da önerildiği gibi yeni bir türün evolüsyon gelişimini içermesi ile uyumlu olduğunu belirtmişlerdir (Nevo ve ark. 1993).

Balkan endemik türü olan *Microtus thomasi*'nin, tür içi seviyede mikroevolüsyon sürecindeki coğrafik izolasyon ve/veya karyolojik farklılıklarını test etmek için mtDNA'nın D-loop bölgesindeki polimorfizmi RFLP ve dizi analiziyle araştırılmıştır (Thanou ve ark. 2005). Araştırma sonuçlarına göre hem polimorfik olmayan (2n=40) hem de polimorfik olan (2n<40) karyotipik formların populasyon içi ve populasyonlar arası polimorfizmi yüksek oranda gözlemlenmiştir.

Reyes ve ark. (2004) ise, memeli türlerinde mitokondrial ve nüklear genleri çalışarak önceki çalışılan sonuçlarla birlikte memeli türleri arasında filogenetik akrabalıkları güçlü bir şekilde bulmuşlardır.

Reyes ve ark. (2003) ise, *Spalax ehrenbergi* üsttürünün 4 türüne ait farklı populasyonlarını temsil eden 60 bireyde mitokondrial kontrol bölgesi dizisinin varyasyonunu çalışmışlar, bütün türlerin ve populasyonların kontrol bölgelerinin hem uzunluk bakımından hem de baz kompozisyonu bakımından oldukça benzer olduğunu bildirmişlerdir. Türler içinde güneye doğru çeşitliliğin artığını gözlemlemişler ve bunun sebebini ise kuraklık ve sıcaklık stresi gibi ekolojik faktörlere türlerin adaptasyonunun bir sonucu olarak açıklamışlardır.

Pek çok taksonomik seviyede farklılıkları çözmek için sistematik çalışmalarda mitokondrial sitokrom b geni yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Farias ve ark. (2001), akvaryum balıklarını içeren familya üyeleri içinde çeşitli seviyelerde filogenetik akrabalığı belirlemek için sitokrom b'nin faydaları üzerine yoğunlaşarak toplam 78 taksonu analizlerinde kullanmışlardır. Cichlidae familyasının monofili olduğunu % 68 oranında desteklemişlerdir.

Rodentlerin bir türü olan *Microtus agretis* türünün 60 lokaliteden 158 örneği arasından 57 haplotip seçilmiş ve bu örneklerin mtDNA'sına RLFP analizi yapılmıştır. Yoğun mtDNA çeşitliliği olduğunu ve bu tarla farelerinde mtDNA çeşitliliğinin açık bir şekilde coğrafik heterojenite gösterdiği gözlenmiştir (Jaarola ve Tegelstrom 1996).

Canidae familyasına ait iki köpek türü ve iki tilki türü olmak üzere toplam 4 türün bireyleri arasında iyi korunmuş olan leptin geninin polimorfizmi SSCP, RFLP ve dizi analizi ile belirlenmiştir. Leptin geninin ekzon 2 bölgesinde hiçbir farklılık gözlenmezken sadece ekzon 3'de varyasyon olduğu belirlenmiştir. Canidae familyasında nükleotit ve aminoasit dizilerinin kıyaslanması sonucunda leptin geninin %97-99 oranları arasında değişen yüksek benzerlikte olduğu görülmüştür (Chmurzynska ve ark. 2003).

Keçilerde CAST lokusunun SSCP metodu ile polimorfizmi çalışılmıştır. Sonuçta birbirinden farklı 7 SSCP profili seçilmiştir. SSCP bant profillerine göre dizi analizi için örnekler seçilmiş, belirlenen dizilerin SSCP örneklerinin kıyaslaması ile elde edilen profilleri doğruladığı bildirilmiştir (Zhou ve Hickford 2008).

Rakus ve ark. (2008), *Cyprinus carpio* L. türü balıklarda Major Histocompatibility (MH) geni polimorfizminin karakterizasyonu için PCR-RF-SSCP metodunu kullanmışlardır. Kombine olan bu metodun bu balıklarda MH polimorfizminin ve hastalık dirençliliği ilişkisini belirlemede gelecekte uygulanabileceğini önermişlerdir. Ayrıca bu tekniğin güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

2.1. Polimorfizm

Polimorfizm, bir populasyonda mevcut olan genetik çeşitliliğe denir ve bu doğal çeşitlilik kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılır. Gen polimorfzimleri (tek nükleotid polimorfizmi) ise genomik DNA'nın bir populasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz çifti değişiklikleridir. Bu tip polimorfizmler populasyonda yaygın olarak görülmekle birlikte etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler (Deligezer ve ark. 2004).

Polimorfizmler populasyonda en az %1 sıklıktan daha az yaygın bir varyantın olduğu bölge olarak da tanımlanırlar. Bu varyantlar düşük sıklıkta olmasına karşın bazı durumlarda çok önemlidirler (Mergen 2008).

2.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

Delesyon, insersiyon ve yer değiştirmeyi içererek bir baz değişikliği olan tek nükleotid polimorfizmi gen ifadesinnde ve protein fonksiyonunda oldukça etkilidir. Çeşitli gendeki mutasyonlar ve polimorfizmler, onların mutasyona uğramış proteinlerin fonksiyonlarında değişmelere neden olduğunu göstermiştir (He ve ark. 2008).

2.1.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism; RFLP)

Moleküler biyolojide büyük avantajların çoğu restriksiyon enzimlerinin keşfinden sonra gelmiştir. Moleküler genetik laboratuvarında, restriksiyon enzimleri restriksiyon uzunluk polimorfzmini analiz etmede geniş uygulama alanına sahiptir. Bütün RFLP uygulamaları bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile DNA kesimini içerir ve jel elektroforezi ile meydana gelen DNA parçaları birbirinden ayrılır. Daha sonra çeşitli boyuttaki DNA parçaları ya manüel ya da otoradyografi yöntemi ile gözlenir (Başıbüyük 2000).

Populasyon genetiği bakımından mtDNA büyük dikkat çekmektedir. Hayvan mtDNA'sı kapalı sirkular DNA molekülünün yaklaşık 15-20 kb uzunluğunda olmakla birlikte, gen içeriği ve dizisi olarak da yüksek derecede korunmuştur. mtDNA'nın dizi ayrımı, replikasyon esnasında kaynaklanan mutasyonlar için onarma mekanizmalarının azlığı nedeniyle kromozom DNA'sı daha yüksektir (Wilson ve ark. 1985). Küçük derecede etkili populasyonlarda mtDNA, nüklear DNA'dan rahatlıkla izole gen havuzları arasında sık sık farklılıklara neden olur. Çünkü hayvan mtDNA'sı tek kopya olan nüklear DNA'dan hızlı bir şekilde biriken mutasyonlar görülmektedir (Brown ve ark. 1979). Bu nedenle mtDNA populasyonlar için elverişili bir DNA belirteci olarak kullanılır (Başıbüyük 2000).

2.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP)

Tek zincir konformasyon polimorfizmi, bilinmeyen mutasyonların saptanması için polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı ucuz, kolay, duyarlı ve güvenilir bir tarama yöntemidir (Jordana ve ark. 1997, Kukita ve ark. 1997, Hayashi 1992). Bu yöntem genellikle küçük insersiyon ve delesyon mutasyonlarının ve nokta mutasyonlarının saptanması için tercih edilmektedir. Özellikle gen dizisi büyük olan gen bölgelerinde

dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem ile mutasyon saptama oranı %80 ile %90 arasında değişmektedir (Sheffied ve ark. 1993).

Metodun temeli, nükleotid dizisindeki değişikliklerin DNA tek ipliklerinin konformasyonunu etkilemesi sonucu elektrik hareketiyle farklı bantlar vermesidir. SSCP analizleri güvenirliği ve hassaslığı nedeniyle doğal mutasyonların ve DNA fragmentlerinin incelenmesi için uygundur. Çevresel değişkenlik DNA konformasyonu üzerinde doğrudan etkilidir, böylece sıcaklık, iyonik uzunluk, pH ve hazır bulunan jelde denatürasyon ve parametreler elektroforetik hareketliliği etkiler. SSCP analizi, tek zincirli DNA molekülündeki bir veya birden fazla nükleotid değişiklerinin, elektroforetik mobiliteyi değiştirme etkisine dayanarak mutasyonları saptayabilen bir uygulamadır. SSCP, dizi analizine alternatif olan bir yöntemdir ve tek bir nükleotid farklılığı dahi belirlenebilmektedir (Orita ve ark. 1989). Çünkü nokta mutasyonlarının DNA dizi analizi ile kesin teşhis edilebilmesine rağmen aranacak DNA parçası büyüdükçe, teşhis süresi ve analiz maliyeti artmaktadır. Bunu önlemek amacıyla; mutasyon içeren gen, kısa DNA parçacıkları halinde çoğaltılıp SSCP yöntemiyle taranarak mutasyonun bulunduğu fragment belirlenir. Böylece, büyük bir genin tümünü analiz etmek yerine sadece mutasyon içeren parçanın incelenme sürecini kısaltmasıyla maliyeti de azaltmaktadır. Burada asıl amaç mutasyonun bulunduğu bölgeyi belirlemektir. Yöntem, mutasyonu aranacak olan genin, primerler ile parçalar halinde çoğaltılması ve baz dizisinin veri tabanındaki diziden farklı olup olmadığının araştırılması ilkesine dayanmaktadır (Orita ve ark. 1989).

Her bir SSCP analizi için en uygun koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri (kullanılan poliakrilamid ve gliserol konsantrasyonu, denatürasyon ajan varlığı), elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforez zamanı, PZR ürünlerinin denatürasyon yöntemi, mutasyon tipi ve bulunduğu yer performansı etkilemektedir (Nollau ve Waganer 1997). Bu yöntemde duyarlılık üzerine en önemli etkenlerden biri de incelenen DNA fragmentinin uzunluğudur. DNA fragmentinin uzunluğu artarsa tekniğin duyarlılığı azalmaktadır (Çilingir 2001).

2.3. DNA Dizi Analizi

DNA parçası ancak nükleotit dizisi bilindiği zaman tam anlamıyla karakterize edilebilmektedir. DNA dizisinin belirlenmesi, genin yapısı, fonksiyonu ve ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili mekanizmaların anlaşılmasına büyük katkıda sağlamaktadır. DNA dizi analizi, genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ve gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların sayısı, çeşidi ve yeri hakkında bilgi vermektedir (Öner 2003).

Genomların dizi analizi için, Maxam-Gilbert yöntemi ve Sanger yöntemi gibi DNA baz dizileme yöntemlerinin yanı sıra otomatik DNA baz dizileme yöntemi de mevcuttur. İlk zamanlarda dizileme yönteminde radyoaktif izotoplar kullanılırken, otomatik baz dizileme yönteminde ise radyoaktif izotop yerine florasan boyalar kullanılmaktadır. Her bir baz farklı bir renkte olmak üzere toplam dört farklı renkte olan boyaların kullanıldığı bu sistemde dizinin okunmasını sağlayan pikler oluşur. Bu yöntem diğer yöntemlere göre daha ucuz, az iş zamanı isteyen ve daha uzun DNA baz dizisi okuma imkanı vermesi nedeniyle avantajlıdır (Çilingir 2001).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvan Örnekleri

Bu çalışmada Konya iline bağlı ilçelere ait 13 farklı lokaliteden; 8 erkek, 6 dişi olmak üzere toplam 14 kör fare örneği incelenmiştir (Tablo 3.1). Hayvanları canlı yakalamak için yuva sistemlerindeki galeriler açılmıştır. Kör fare açılan galerileri kapatmaya geldiğinde; bir çapa darbesiyle galeri ağzının 40-50 cm gerisinden galeri kesilerek, kör farenin geri kaçması önlenmiştir. Daha sonra hayvan çapa ile galeri ağzı arasında kalan yerden yakalanmıştır. Yakalan örneklerin kromozom sayılarının belirlenmesi ve DNA izolasyonu için doku örneklerinin alınması için laboratuvara getirilmiştir.

Tablo 3.1. Konya ilinden elde edilen kör farelerin lokaliteleri (Akan 2009)

Örnek Numarası	**Kromozom Sayısı (2n)**	**Kromozom Kol Sayısı (NF)**	**Otozomal Kromozom Kol Sayısı (NFa)**	**Lokalite**
1	60	79	75	Kampüs-Selçuklu
2	60	79	75	Erentepe-Güneysınır
3	60	79	75	Apa Barajı- Çumra
4	60	79	75	Kampüs-Selçuklu
5	60	79	75	Yazır- Selçuklu
6	40	72	68	Gökçimen-Beyşehir
7	60	79	75	Aydınkışla-Bozkır
8	60	74	70	Yarma-Kararatay
9	60	74	70	Hadim
10	60	80	76	Gölyazı-Cihanbeyli
11	60	79	75	Meram
12	40	72	68	Bayavşar-Beyşehir
13	60	80	76	Cihanbeyli
14	58	75	71	Ulukışla-Ereğli

3.1.2. Kimyasal Maddeler

EDTA, tris-HCl, fenol, kloroform, izoamil alkol, sodyum karbonat, gibi kimyasal maddeler Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Almanya firmasından, SDS, proteinaz K, agaroz, etidyum bromür, NaCl, izopropanol, glasial asetik asit, formaldehit, borik asit, TEMED, ksilen siyanol, amonyum per sülfat gibi kimyasal maddeler ise Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, 89552, Steinheim, Almanya firmasından temin edilmiştir.

Akrilamid, bisakrilamid, etil alkol Applichem, Darmstdt, Almanya firmasından, Taq polimeraz ve PZR tamponları ise Fermantas markadan sağlanmıştır.

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

3.1.3.1. Dokudan genomik DNA izolasyonu için gerekli çözeltiler

- STE tamponu : Tris-HCl 0.05 M pH:7,5, EDTA 0.001M pH:8, NaCl 0.1 M
- SDS : %20'lik konsantrasyonda hazırlanmıştır.
- Proteinaz K : 20 mg/ml
- NaCl : 2 M
- Kloroform / İzoamil alkol : 24:1 oranında
- Fenol / Kloroform/ İzoamilalkol : 25:24:1 oranında
- TE Tamponu : Tris-HCl 0.01 M pH:7,5, EDTA 0.001M pH:8

3.1.3.2. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

-Agaroz : %1 agaroz TAE tamponunda hazırlanmıştır.

-50 X Tris asetat (TAE) tamponu pH:8 : 242g Tris base, 57.1 ml glasial asetik asit, 100 ml 0.5 M pH:8 EDTA

-Etidyum Bromür : 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

3.1.3.3. SSCP için için gerekli çözeltiler

3.1.3.3.1. Poliakrilamid jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

- %30'luk Akrilamid/Bisakrilamaid : 29 g Akrilamid, 1 g Bisakrilamid, 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 10 X TBE Tampon pH:8.3 : 9.37 g EDTA, 108 g Tris-Base, 55 g Borik Asit
- Amonyum Per Sülfat (APS) : %10'luk konsantrasyonda hazırlanmıştır.

3.1.3.3.2. SSCP Tamponu için gerekli çözeltiler

- 0.025 g Bromofenol Mavisi, 0.025 g Ksilen Siyanol, dH_2O 2 ml, Formamid 8 ml.

3.1.3.3.3. Gümüş boyama için gerekli çözeltiler

- Glasiyel Asetik Asit : % 10'luk konsanrasyonda hazırlanmıştır.
- Gümüş Nitrat : 0.6 g Gümüş Nitrat, 250 ml dH_2O, 0.3 ml Formaldehit
- Sodyum Karbonat : 8.5 gr Sodyum karbonat, 250 ml dH_2O, 0.9 ml Formaldehit, 200 µl Sodyumtyosülfat
- Sodyumtyosülfat : 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Doku Örnekleri

Konya iline bağlı ilçelerden elde edilen canlı hayvanların sitogenetik analizler sonucu kromozom sayısı belirlenmiştir (Akan 2009). Daha sonra laboratuvarda servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi yapılmıştır. Bu hayvanlardan kas ve karaciğer örnekleri alınmıştır ve DNA izolasyonuna kadar -20 ˚C'de saklanmıştır.

3.2.2. Dokudan Genomik DNA izolasyonu

Dokudan DNA izolasyonu Hillis ve ark.'nın (1990b) önerdiği metoda göre yapılmıştır. 0.1 gr doku örneği havanda sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiştir. İçerisinde 500 µl STE tamponu bulunan ependorf tüplere toz haline getirilen doku örnekleri ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma 12.5 µl (20 mg/µl stok) proteinaz K ve 25 µl %20'lik SDS ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bu homojenat 55 ˚C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örneklere eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek yavaşça alt üst edilerek oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra bu örnekler 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve bu basamak tekrar edilmiştir. Elde edilen süpernatanta eşit hacimde kloroform/izoamilalkol (24:1) ilave edilerek 5 dk oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra 12.000 rpm'de 3 dk santrüfüj edilerek kloroform/izoamilalkol (24:1) basamağı tekrar edilmiştir. Süpernatanta 1 ml soğuk etanol ve 2 M NaCl ilave edlerek 20 dk soğukta presipite olması için bekletilmiştir. Presipitasyon sonunda pellet 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak etanol uzaklaştırılmış ve pellet kurutulmuştur. DNA 250 µl 1X TE tamponunda

çözülmüştür. Süspanse edilen DNA'ya 2.5 µl RNaz ilave edilerek 37 ˚C'deki inkübe edilmiştir ve -20 ˚C'de PZR işlemleri için saklanmıştır.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

Nannospalax ehrenbergi üsttürüne ait sitokrom b geninin (AF140524, Nevo ve ark. 1999) tüm gen dizisi PubMed NCBI Gen Bankasından temin edilmiştir. Bu gen dizilerine ait primerler http://www.idtdna.com adresindeki online primer dizayn programı ile tasarlanmıştır ve bu gen bölgesinin çoğaltımı için 2 çift primer çifti kullanılmıştır (Tablo 3.2). Fakat sadece sitokrom b genini çoğaltmak için uygun bir primer tasarlanamadığı için bu üsttüre ait AJ389537 (Montgelard ve ark. 2002) erişim nolu mitokondrial gen bölgesinden faydalanılmıştır.

Tablo 3.2. Sitokrom b gen bölgesine ait kullanılan primerler, ürün büyüklüğü ve primer bağlanma sıcaklıkları Tm (ºC)

Primer	**Dizi**	**Ürün Büyüklüğü (bç)**	**Tm (ºC)**
Primer 1 FW	5'-TCCCACAACCAACACAACCACCAA-3'	386	63 **ºC**
Primer 1 RW	3'-AAAGGCTGTAAGGGTGTCGGATGT-5'	386	59 **ºC**
Primer 2 FW	5'-ATCCGACACCCTTACAGCCTTT-3'	473	56 **ºC**
Primer 2 RW	3'-TGGAGTCTAGGCCTGATGGATT- 5'	473	54 **ºC**

Tasarlanan primer çiftlerinin en iyi çalışabilecekleri sıcaklığın ve reaksiyon koşullarının belirlenmesi için öncelikle gradient PZR yapılmıştır.

PZR uygulamaları için 15 µl çözelti hazırlanmıştır. Her reaksiyon karışımı için, 50 pikomol primer, 10X PZR tamponu (200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 750 mM Tris-HCl, pH:8.8, %0.1 Tween20), 25 mM MgCl, 20 mM dNTP ve 5U Taq polimeraz kullanılmıştır. Ayrıca hayvanların dokularından izole edilen genomik DNA'dan 50 ng karışıma eklenmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra thermo-cycler cihazı ile her bir primerin Tm değeri göz önüne alınarak gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Çoğaltım 35 döngüde yapılmıştır ve thermo-cycler cihazı 95 ºC'de 5 dk, 94 ºC'de 1 dk, birinci

primer için anneling sıcaklığı 57 ºC ve ikinci primer için primer birleşme sıcaklığı 61 ºC'de 1 dk ve 72 ºC'de 1 dk'ya programlanmıştır. 72 ºC uzatma sıcaklığında 5 dk basamağı da eklenerek ve hazırlanan tüpler Eppendorf marka thermo-cycler cihazına yerleştirilip çoğaltım yapılmıştır.

3.2.4. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Nannospalax nehringi'ye ait sitokrom b PZR ürünleri değerlendirilmek için %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Agaroz jel için 0.75 gr agaroz tartılıp, 75 ml TAE tamponu içinde kaynatılmıştır. Kaynadıktan sonra 50-60 ºC'ye kadar soğutulmuştur ve 12 µl etidyum bromür eklenerek elektroforez plate'ine dökülmüş ve tarak yerleştirilmiştir. Jel donduktan sonra PZR ürünleri kuyucuklara yüklenmiş ve PZR ile çoğaltılan bölgenin büyüklüğünü tespit etmek ve doğru bölgenin çoğaldığına karar verebilmek için 100-3000 bç'lik DNA molekül ağırlık belirleyicisi kullanılarak 100 voltta 20 dk yürütülmüştür. Yürütme sonunda, jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflar bilgisayara aktarılmıştır.

3.2.5. PZR ürünlerinin SSCP Analizi

3.2.5.1. Camların hazırlanması

U şekilli ve dikdörtgen şekilli camların her iki tarafı bir gazlı bez yardımı ile ile temizlenmiştir. Camların kenarına plastik ayıraçlar (Spacer) yerleştirilmiştir. Jelin akmasını önlemek için camların alt ve üst kısımlarının düzgün olmasına dikkat edilmiştir. Camlar elektroforez tankının kıskaçları ile iyice sıkıştırıldıktan sonra jel dökme aparatına yerleştirilmiştir.

3.2.5.2. Poliakrilamid jelin hazırlanması

Jel karışımı 250 ml'lik bir beher içerisinde 29:1 (%30'luk) akrilamid:bisakriamid oranında hazırlanmıştır. Hazırlanan poliakrilamid jel içeriği Tablo 3.3'de gösterilmiştir. %30'luk akrilamid çözeltisi, 10X TBE ve dH_2O karıştırılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan bu karışım burada APS ve TEMED ilave edilerek birkaç saniye daha karıştırılmıştır. Elde edilen jel 50 ml'lik enjektör yardımı ile yavaşça hava kabarcığı olmayacak şekilde iki cam arasına dökülmüştür. Kuyuların oluşturulması için tarak yerleştirilmiştir ve jelin polimerize olması için 45 dk beklenmiştir.

Tablo 3.3. Poliakrilamid Jel içeriği

% 30'luk akrilamid/bisakrilamaid	15 ml
10 X TBE tampon	5 ml
dH_2O	30 ml
APS	350 µl
TEMED	35 µl

3.2.5.3. PZR ürünlerinin SSCP çözeltisiyle tek iplik oluşturulması ve poliakrilamid jele yüklenmesi

Jel polimerize olduktan sonra jel dökme aparatından çıkartılıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tarak çıkartılarak, elektroforezin orta kısmına ve diğer kısımlarına 1X TBE konulmuştur. pH'ın dengelenmesi için 125 voltta 30 dk boş olarak ön yürütme yapılmıştır. Ön yürütmenin ardından PZR ürünlerinin tek iplik haline getirilmesi için PZR ürününden 4 µl, SSCP çözeltisinden 20 µl alınarak

homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 95 ºC'de 10 dk denatürasyona maruz bırakılarak PZR ürünü tek iplik haline getirilmiştir. Denatürasyondan hemen sonra buz üzerine alınmıştır ve birkaç dk bekletilmiştir. Tek iplik haline gelen ürünlerden 15 µl alınarak kuyucuklara yüklenmiştir. 125 voltta 18 mA'de 17 saat yürütülmüştür.

3.2.5.4. Gümüş boyama

Poliakrilamid jel ile ayrılan ürünlerin gözlenmesi için jel gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır. Jelin yürümesi tamamlandıktan sonra elektroforez tankından alınan camların arasındaki spacer'lar çıkartılmıştır. Bistüriyle dikkatli bir şekilde camın birbirinden ayrılması sağlandıktan sonra jel %10'luk glasiyel asetik asit çözeltisine alınarak 15 dk orta hızda çalkalanmıştır. Fikse edilen bantlar dH_2O küvetine alınarak 10 dk çalkalanmıştır. Ardından jel gümüş nitrat içerisine alınarak 30 dk çalkalanmıştır. 30 dk sonunda boyanan jelde bantların görünür hale gelmesi için sodyum karbonat içerisine alınarak elle yavaş bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra jel tekrar asetik asit çözeltisi içerisine alınarak 5 dk çalkalanmıştır. dH_2O küvetine alınarak 5 dk yıkama yapılmıştır. Asetat kağıtları arasına alınan jel, görüntüleme yapılarak benzer bantların gruplandırılması yapılmıştır.

3.2.6. Dizi Analizi

SSCP analizi ile ayrılan ürünlerin tümüne doğruluğunun tesbiti için dizi analizi uygulanmıştır. Elde edilen PZR ürünleri Macrogen (Güney Kore) Firmasına gönderilerek sitokrom b geninin DNA dizileri belirlenmiştir.

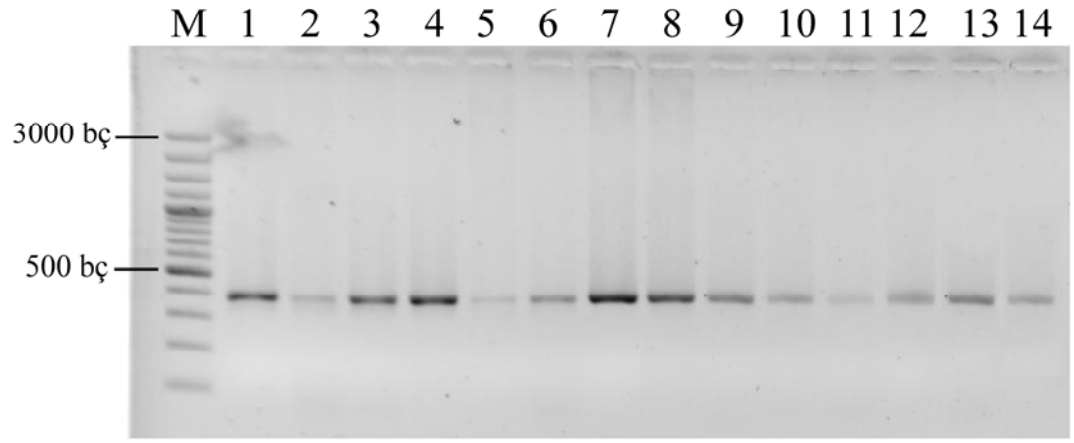
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Dizi analizi sonucunda elde edilen sitokrom b geninin DNA dizileri ve NCBI Gen Bankasından elde edilen verilerle birlikte çalışmada kullanılan diziler CLC Main Workbench versiyon 5.1 programı kullanılarak hizalanmış ve filogenetik ağaç yapılmıştır.

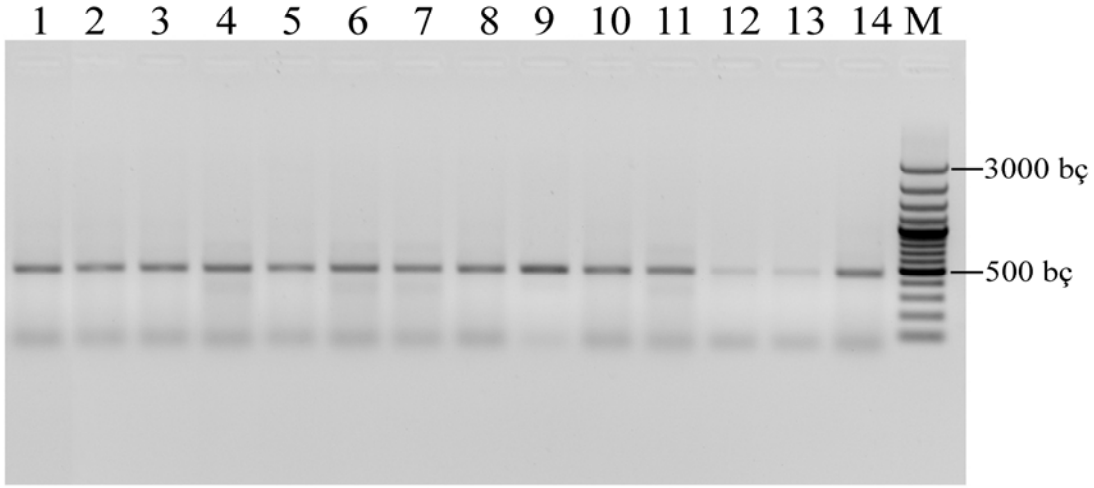
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. PZR

Konya bölgesindeki 13 farklı lokaliteden elde edilen toplam 14 kör farenin DNA izolasyonları yapılmış ve özellikle sitokrom b geni PZR ile çoğaltılmıştır. Sitokrom b genini içeren 837 bç'lik mtDNA dizisine göre tasarlanan 2 primer çifti ile çoğaltma yapılmıştır. SSCP metodunu uygulayabilmek için 402 bç'indeki sitokrom b genini içeren 837 bç'lik mitokondrial gen bölgesi 386 bç ve 473 bç'lik iki parça halinde çoğaltılmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



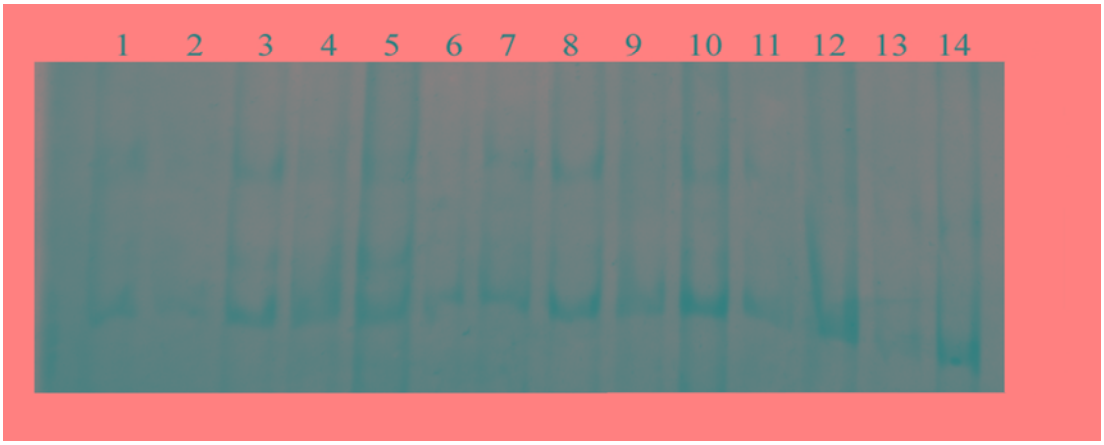
Şekil 4.1. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 386 bç büyüklüğündeki PZR ürününün agaroz jel görüntüsü



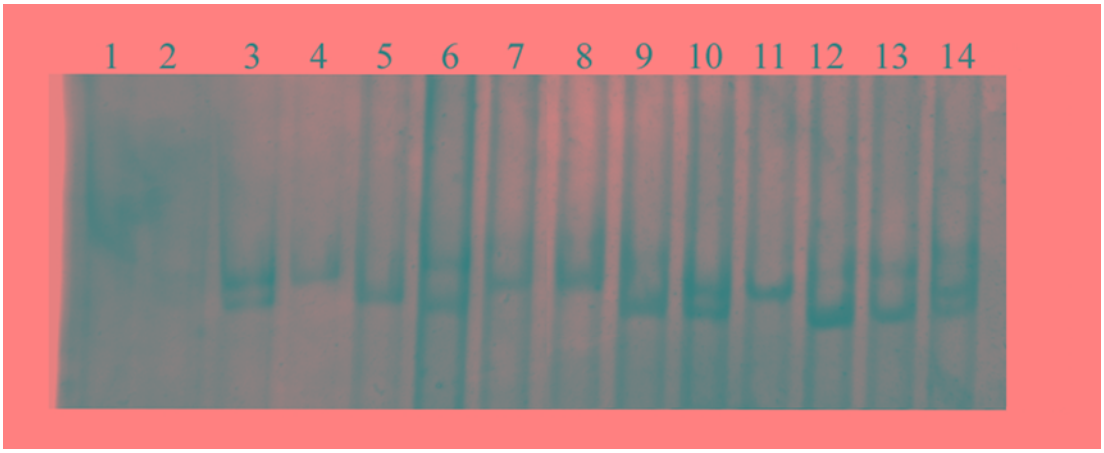
Şekil 4.2. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 473 bç büyüklüğündeki PZR ürününün agaroz jel görüntüsü

4.2. SSCP Analizi Sonuçları

Tek Nükleotit polimorfizmini belirlemek için SSCP metodu uygulanmıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4). SSCP'de farklı bant profili gösteren örneklerin dizi analizi yapılması planlanmıştır. Ancak bütün örnekler hemen hemen jel üzerinde farklı şekilde hareket ettikleri için tüm örneklerin dizi analizi yapılmıştır.



Şekil 4.3. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 386 bç'lik ilk parçasının SSCP analizi



Şekil 4.4. Çalışılan 14 örneğin sitokrom b genini içine alan mtDNA'nın 473 bç'lik ikinci parçasının SSCP analizi

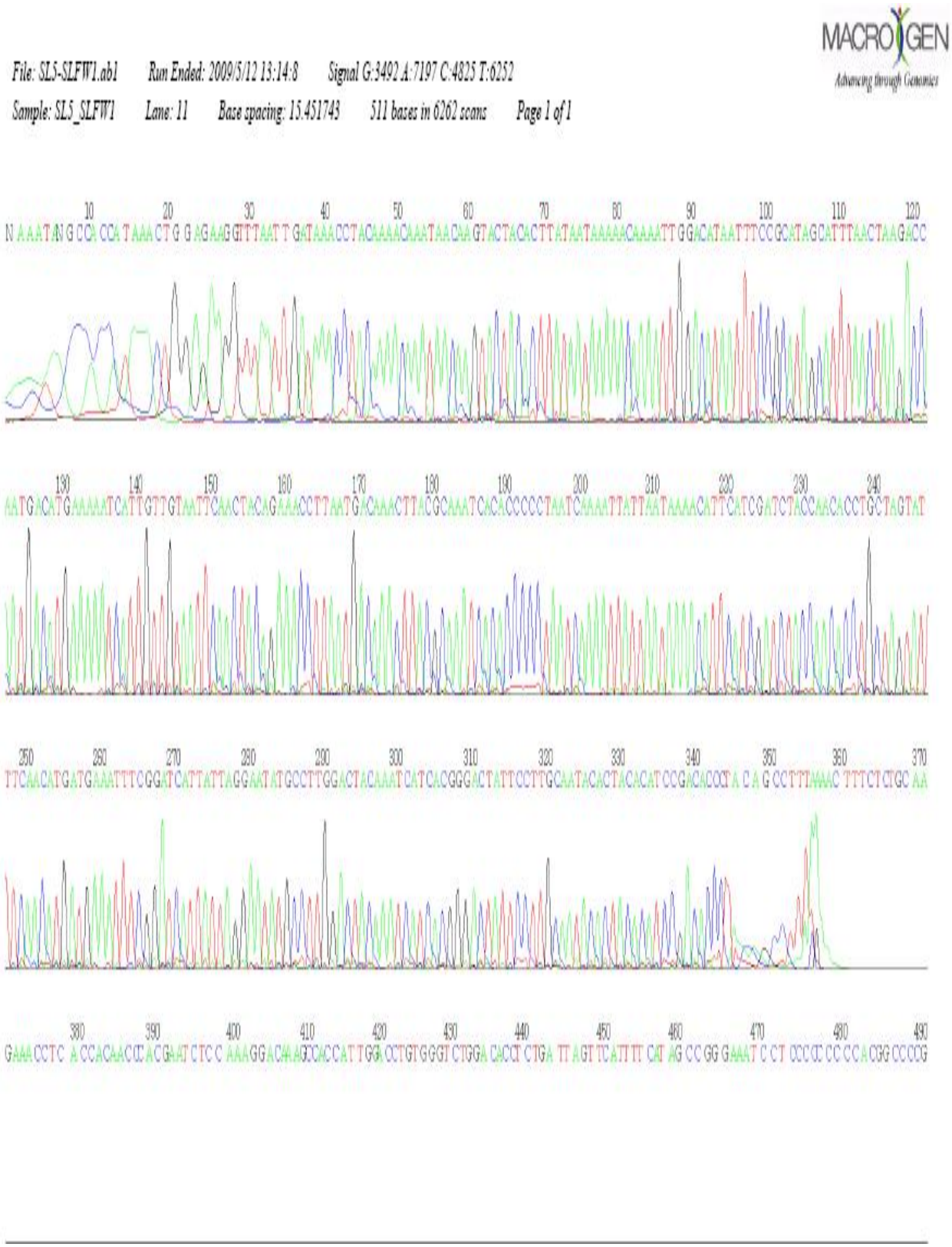
Dizi analizine göre %100 sitokrom b gen dizisi aynı olan *N. nehringi* 6 ve 12 nolu örneklerin SSCP profilleri de birbiri ile tamamen aynı olduğu görülmüştür. SSCP sonuçlarına göre 13 nolu örneğin, birinci primerle çoğaltılan mtDNA'nın birinci parçasında 6 ve 12 nolu örneklere benzerliği dikkat çekmiştir. Ancak dizi analizi sonuçlarına göre 13 nolu örnek ile 6 ve 12 nolu örnekler arasında oldukça varyasyon gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak da tek nükleotid farklılığını dahi belirleyebilen güvenilir bir metod olan SSCP'nin 386 ve 473 bç gibi uzunlukları gibi büyük fragmentler kullanılmış olmasının hassasiyetini etkilediği düşünülmektedir.

N. nehringi 4 ve 5'in birinci primer ile çoğaltılan ilk parçasının SSCP bant profilleri birbirine oldukça benzer (Şekil 4.3) olmasına karşın ikinci primer ile çoğaltılan ikinci parçanın SSCP bant profillerinde ise oldukça farklıdır (Şekil 4.4). Bunun nedeni Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 402 bç'lik sitokrom b gen dizisinin ilk primerle çoğaltılan 191 bç'lik ilk kısımda iki örnek arasında hiçbir dizi varyasyonunun olmaması, ikinci primer ile çoğaltılan bölgenin (192-402 bç) dizi analizinde ise sadece 258. bazda tek nükleotit polimorfizmidir.

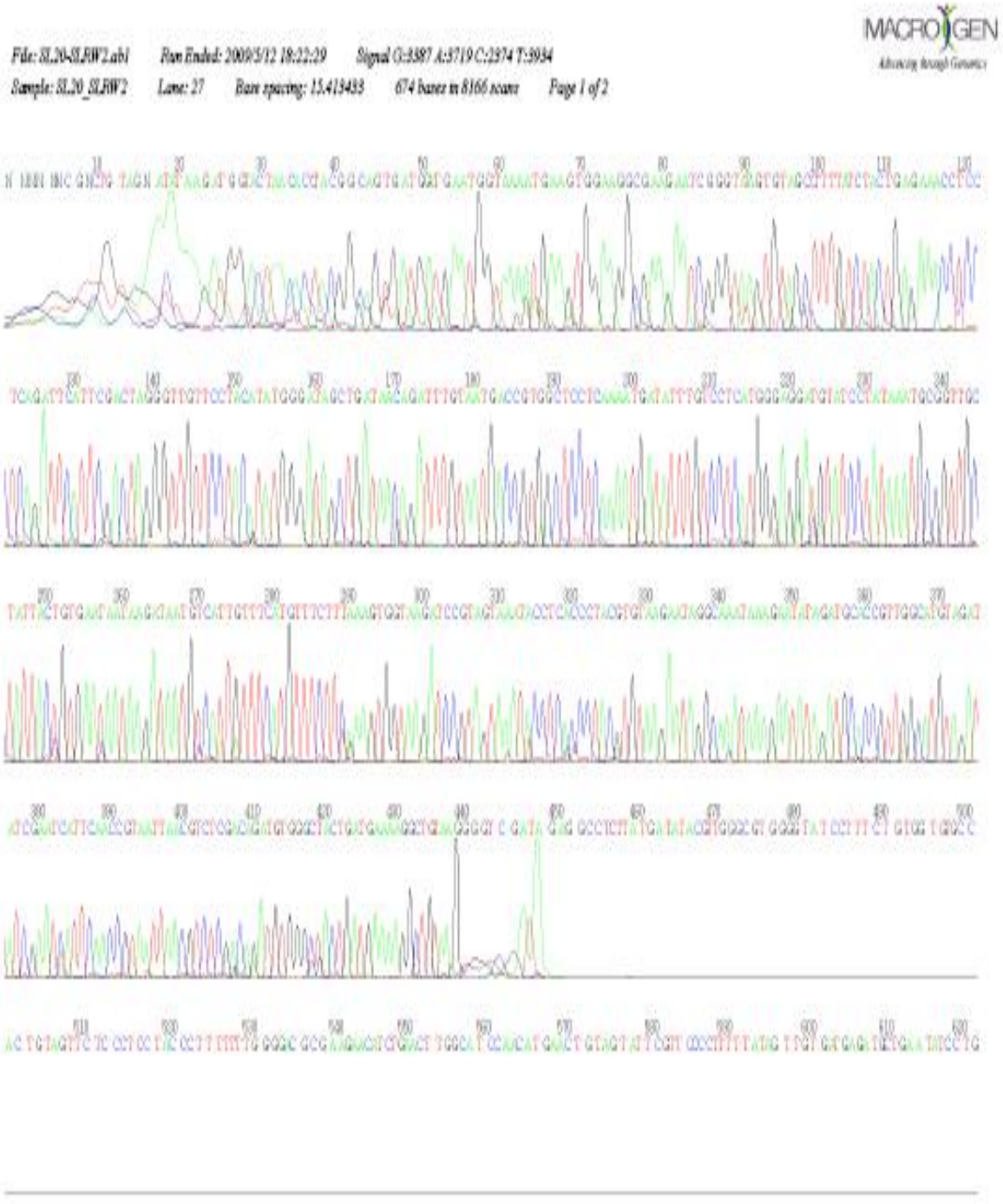
SSCP sonuçlarına göre *N. nehringi* 6 ve 12 nolu örneklerin dışındaki bütün bireyler az veya çok baz değişikliklerine sahip oldukları için farklı bant profilleri sergilemişlerdir. Bu nedenle bütün örneklerin dizi analizi yapılmıştır. *N. nehringi* 6 ve 12 nolu örneklerin dizi analizi sonuçları SSCP metodunun doğrulaması olmuştur.

4.2. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Macrogen'e yaptırılan örneklerden birinin (*N. nehringi* 5) dizi analizi verileri şekil 4.5 ve şekil 4.6'da görülmektedir. Çalışılan tüm *N. nehringi* üsttürüne ait bireylerin sitokrom b gen dizileri gen bankasındaki hem primerin tasarlandığı (Nevo ve ark. 1999) *N. ehrenbergi* üsttürü ile (Şekil 4.7) hem de Sözen ve ark.'ın (2009) sunduğu *N. nehringi* üsttürleri (Şekil 4.8) ile CLC Main Workbench versiyon 5.1 programı yardımıyla hizalanmıştır.



Şekil 4.5. *Nannospalax nehringi* 5 üsttürünün sitokrom b genini içine alan 386 bç'lik mtDNA'nın analiz sonucu



Şekil 4.6. *Nannospalax nehringi* 5 üsttürünün sitokrom b genini içine alan 473 bç'lik mtDNA'nın analiz sonucu

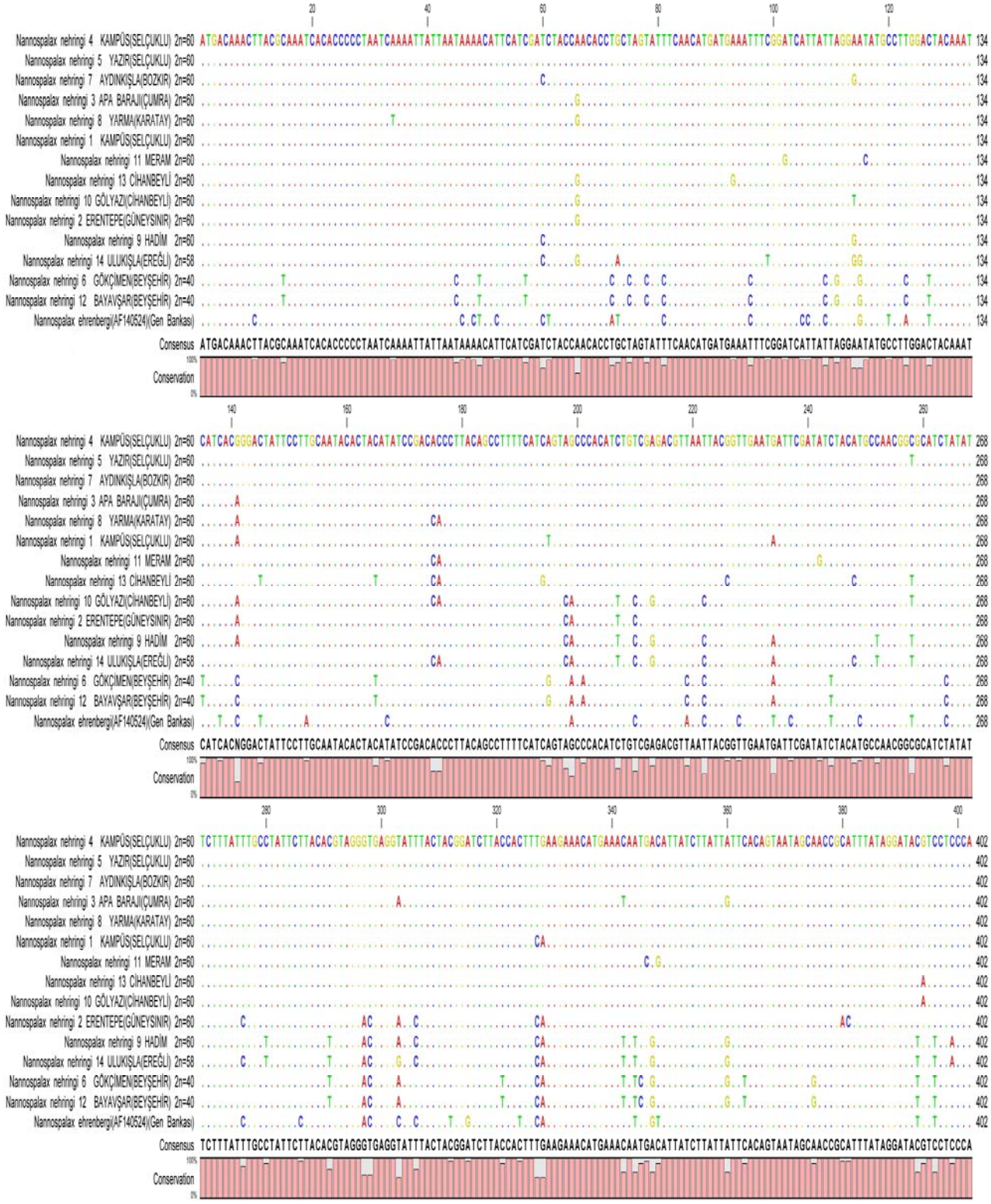
Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 2n=40 kromozomlu *N. nehringi* 6 ve 12 nolu bireyler arasında %0 dizi varyasyonu tesbit edilmiştir. 2n=60 kromozomlu bireyler içinde Selçuklu İlçesi'nden elde edilen *N. nehringi* 4 ve 5 nolu örnekler en az baz varyasyonu gösteren örneklerdir. Bu iki örneğin sadece 258 nolu baz kompozisyonu birinde C (4 nolu örnekte), birinde T (5 nolu örnekte) olarak değişiklik göstermektedir. *N. nehringi* 7 örneği (Bozkır-Aydınkışla) bu iki örnekten farklı olarak 60. bazda T yerine C, 114. bazda A yerine G'nin yer aldığı belirlenmiştir. Bu örneklerde meydana gelen varyasyonun çoğunun transisyonlar olduğu dikkat çekmiştir. 2n=60 kromozomal forma ait populasyonlar arasındaki varyasyon %11.94 olarak hesaplanmıştır. Bunun %37.5'i transversiyon tipi varyasyondur.

Kromozomal formlar arasındaki en çok dizi varyasyonu 2n=40 kromozomal form ile 2n=58 kromozomlu birey arasında bulunmuştur (%10.69). Bununda %13.9'u transversiyon, %86'sı transisyon varyasyonlarıdır.

2n=40 kromozomal forma ait bireyler ile 2n=60 kromozomlu formlar arasındaki varyasyonun ise %10.2 olduğu görülmüştür. Bu iki kromozomal forma ait bireyler arasındaki varyasyonların %12.19' u tranversiyon, %87.8'i transisyon tipi mutasyolardır.

En düşük dizi varyasyonu 2n=60 kromozomal forma ait bireyler ile 2n=58 kromozomlu birey arasında görülmüştür (%8.45). Bu varyasyonun %20.58' i transversiyon, %79.41'i transisyon tipi baz değişiklikleridir.

Çalışılan tüm kromozomal formlara ait bireyler arasında %18.6 varyasyon gözlenmiş, bununda %26.6'sı transversiyondur.



Şekil 4.7. Çalışılan *Nannospalax nehringi* üsttürlerinin sitokrom b dizileri

402 bç uzunluğundaki Sitokrom b geninde en küçük 3 ve en büyük 29 nükleotit arasında değişen farklı uzunluklarda toplam 38 korunmuş bölge bulunmuştur (BioEdit versiyon 7.0.9.0 programı yardımıyla hesaplanmıştır). Bu korunmuş bölgeler çalışılan 14 örnekle tamamen aynıdır. *N. nehringi* üsttürünün farklı kromozomal formlarına ait korunmuş bölgeler aşağıda görülmektedir.

Minimum segment uzunluğu : 3
Maximum ortalama entropi : 0.2
Her bir pozisyom için maximum entropi : 0.2

Bölge 1: Pozisyon 1 - 14
1 ATGACAAACTTACG 14
Segment uzunluğu: 14
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 2: Pozisyon 16 - 33
16 AAATCACACCCCCTAATC 33
Segment uzunluğu: 18
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 3: Pozisyon 35 - 44
35 AAATTATTAA 44
Segment uzunluğu: 10
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 4: Pozisyon 46 - 48
46 AAA 48
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 5: Pozisyon 50 - 56
50 CATTCAT 56
Segment uzunluğu: 7
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 6: Pozisyon 61 - 65
61 CTACC 65
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 7: Pozisyon 67 - 71
67 ACACC 71
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 8: Pozisyon 82 - 92
82 TCAACATGATG 92
Segment uzunluğu: 11
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 9: Pozisyon 103 - 108
103 TCATTA 108
Segment uzunluğu: 6
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 10: Pozisyon 117 - 122
117 ATGCCT 122
Segment uzunluğu: 6
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 11: Pozisyon 124 - 126
124 GGA 126
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 12: Pozisyon 128 - 134
128 TACAAAT 134
Segment uzunluğu: 7
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 13: Pozisyon 136 - 140
136 ATCAC 140
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 14: Pozisyon 142 - 144
142 GGA 144
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 15: Pozisyon 146 - 164
146 TATTCCTTGCAATACACTA 164
Segment uzunluğu: 19
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 16: Pozisyon 166 - 174
166 ATATCCGAC 174
Segment uzunluğu: 9
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 17: Pozisyon 177 - 193
177 CCTTACAGCCTTTTCAT 193
Segment uzunluğu: 17
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 18: Pozisyon 202 - 206
202 CACAT 206
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 19: Pozisyon 214 - 218
214 GACGT 218
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 20: Pozisyon 223 - 225
223 TAC 225
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 21: Pozisyon 227 - 233
227 GTTGAAT 233
Segment uzunluğu: 7
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 22: Pozisyon 235 - 241
235 ATTCGAT 241
Segment uzunluğu: 7
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 23: Pozisyon 245 - 247
245 TAC 247
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 24: Pozisyon 249 - 251
249 TGC 251
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 25: Pozisyon 253 - 257
253 AACGG 257
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 26: Pozisyon 259 - 263
259 GCATC 263
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 27: Pozisyon 265 - 275
265 ATATTCTTTAT 275
Segment uzunluğu: 11
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 28: Pozisyon 277 - 279
277 TGC 279
Segment uzunluğu: 3
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 29: Pozisyon 281 - 290
281 TATTCTTACA 290
Segment uzunluğu: 10
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 30: Pozisyon 292 - 296
292 GTAGG 296
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 31: Pozisyon 299 - 302
299 GAGG 302
Segment uzunluğu: 4
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 32: Pozisyon 307 - 320
307 TACTACGGATCTTA 320
Segment uzunluğu: 14
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 33: Pozisyon 322 - 326
322 CACTT 326
Segment uzunluğu: 5
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 34: Pozisyon 329 - 341
329 AAGAAACATGAAA 341
Segment uzunluğu: 13
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 35: Pozisyon 349 - 359
349 ATTATCTTATT 359
Segment uzunluğu: 11
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

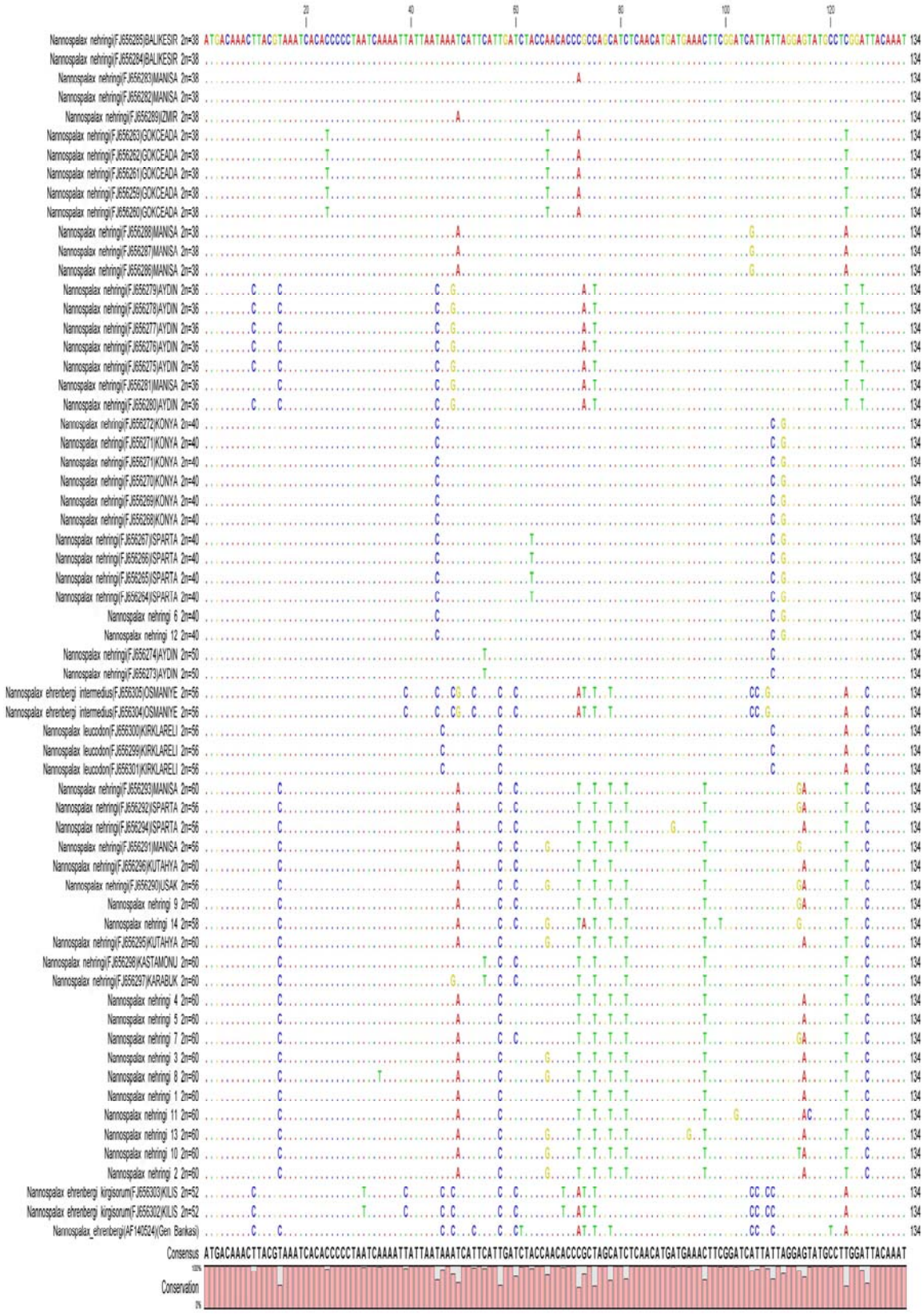
Bölge 36: Pozisyon 364 - 374
364 ACAGTAATAGC 374
Segment uzunluğu: 11
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Bölge 37: Pozisyon 376 - 379
376 ACCG 379
Segment uzunluğu: 4
Ortalama entropi (Hx): 0,0000

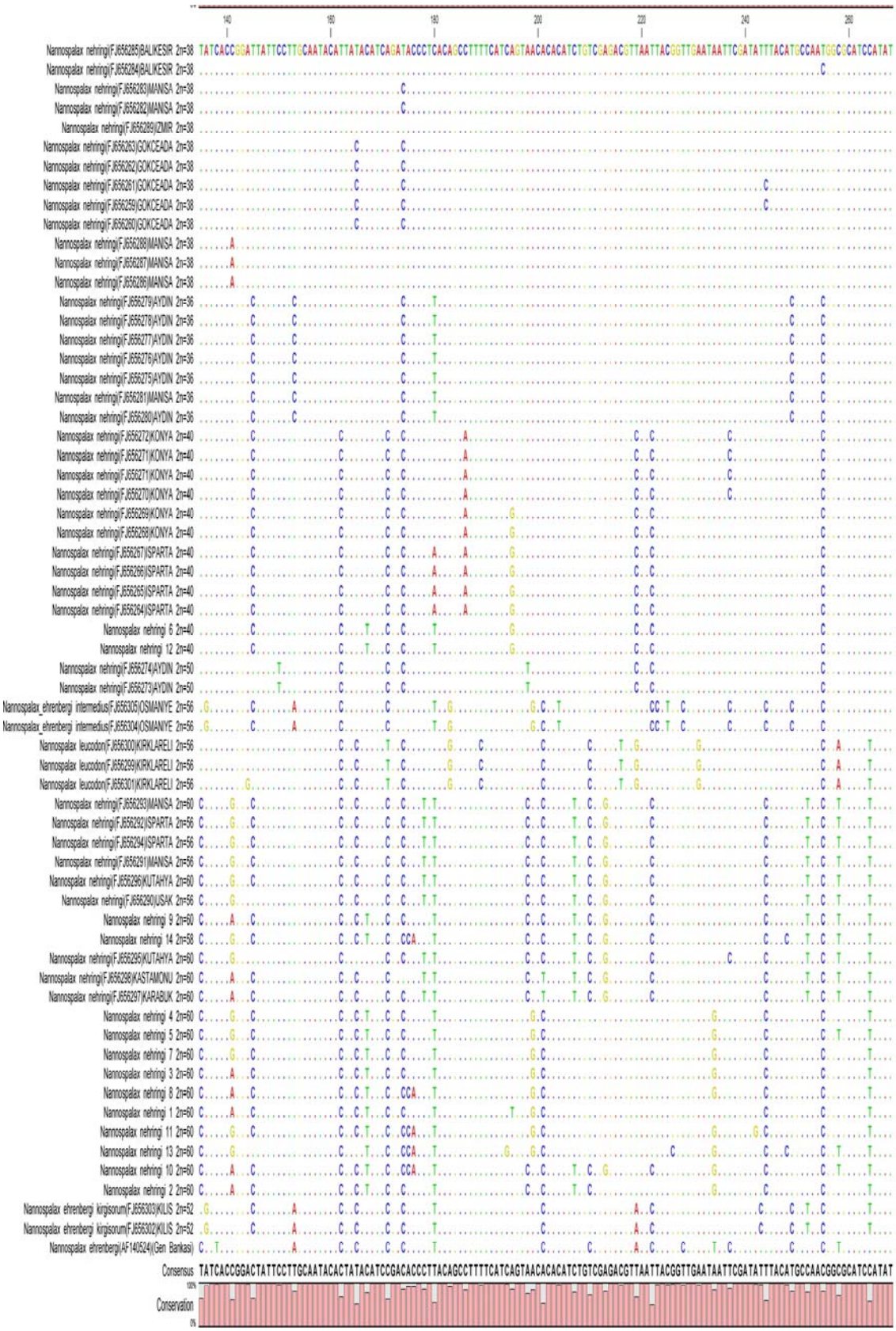
Bölge 38: Pozisyon 382 - 392
382 TTTATAGGATA 392
Segment uzunluğu: 11
Ortalama entropi (Hx): 0.0000

Şekil 4.8'de Gen bankasında Sözen ve ark.'nın (2009) bildirdiği Türkiye'nin bazı illerinde farklı kromozomal forma ait bireylerin bu çalışmadaki 14 bireyin dizileri ile hizalanmıştır. Buna göre *N. nehringi* 6 ve 12 nolu örnekler (2n=40), 2n=40 kromozomlu Konya, Aydın, Isparta örnekleri ile dizi analizi bakımından oldukça benzer olduğu sadece 167. ve 180. bazların diğerlerinde C iken, *N. nehringi* 6 ve 12'de T bulundurması bakımından farklı olduğu gözlenmiştir.

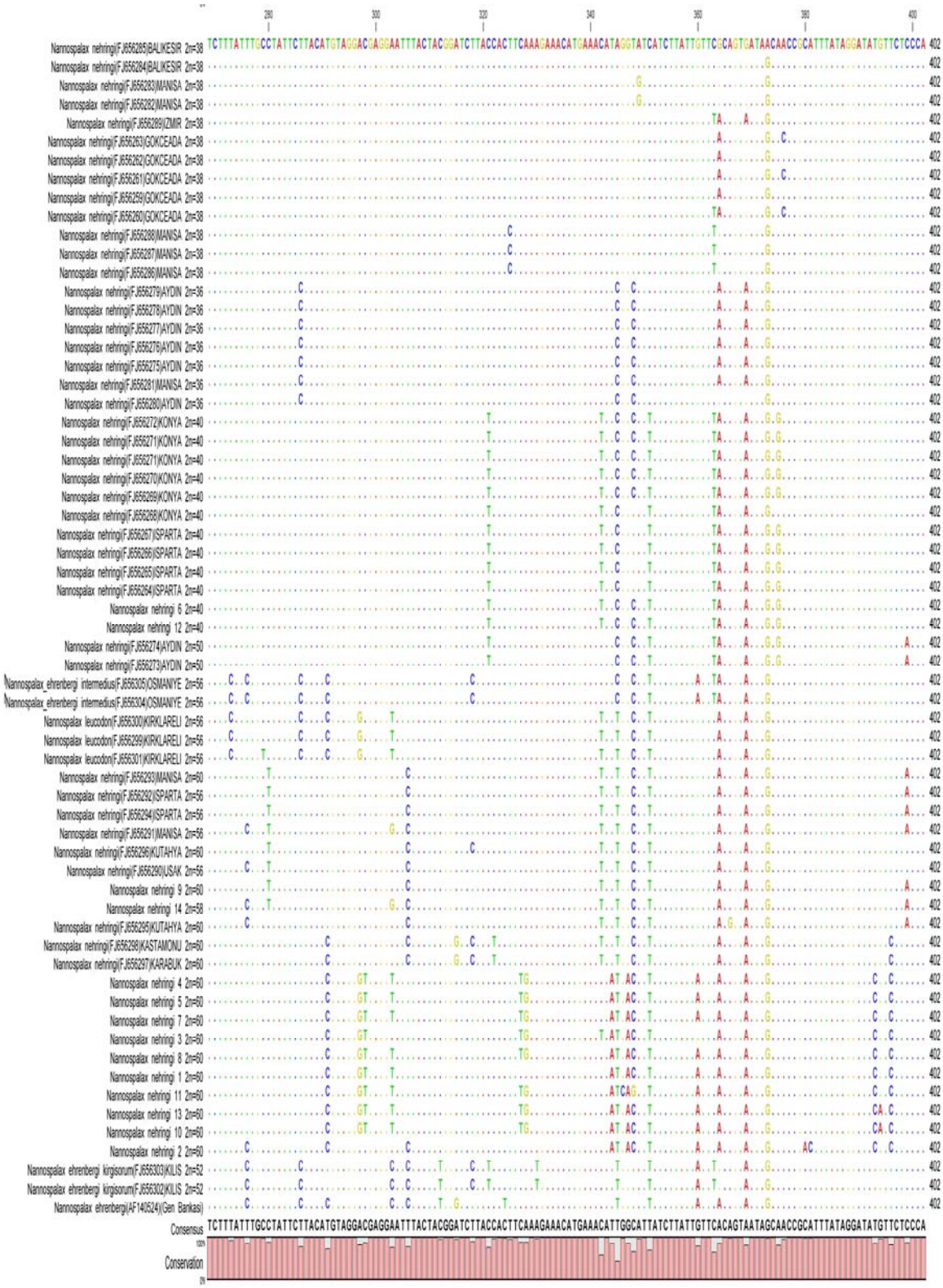
N. nehringi 9 ve 14 nolu örneklerin dışındaki diğer 10 *N. nehringi* örneği (2n=60), Isparta, Manisa, Kütahya, Uşak, Karabük, Kastamonu'daki (2n=60, 56) farklı kromozomal formdaki örnekle dizi analizi bakımından benzer olmasına rağmen bu 10 örneğin hepsini veya çoğunu diğerlerinden ayıran sadece 12 baz pozisyonu farklılığıdır. Bu farklılıklar, 167., 298., 327. bazlarda C yerine T'in, 199., 234., 297., 328. bazlarda A'nin yerine G'in, 291., 413., 416. bazlarda T yerine C'in, 303. bazda A yerine T'in, 360. bazda ise G yerine A'in gelmesi ile oluşmuştur. Bu baz pozisyonundaki değişikliklerin %8.3'ü transversiyon şeklindeki varyasyonlardır.



Şekil 4.8. NCBI Gen bankasındaki diziler (Sözen ve ark. 2009) ile çalışılan örneklerin sitokrom b dizilerinin hizalanması



Şekil 4.8 (devamı). NCBI Gen bankasındaki diziler (Sözen ve ark. 2009) ile çalışılan örneklerin sitokrom b dizilerinin hizalanması



Şekil 4.8 (son). NCBI Gen bankasındaki diziler (Sözen ve ark. 2009) ile çalışılan örneklerin sitokrom b dizilerinin hizalanması

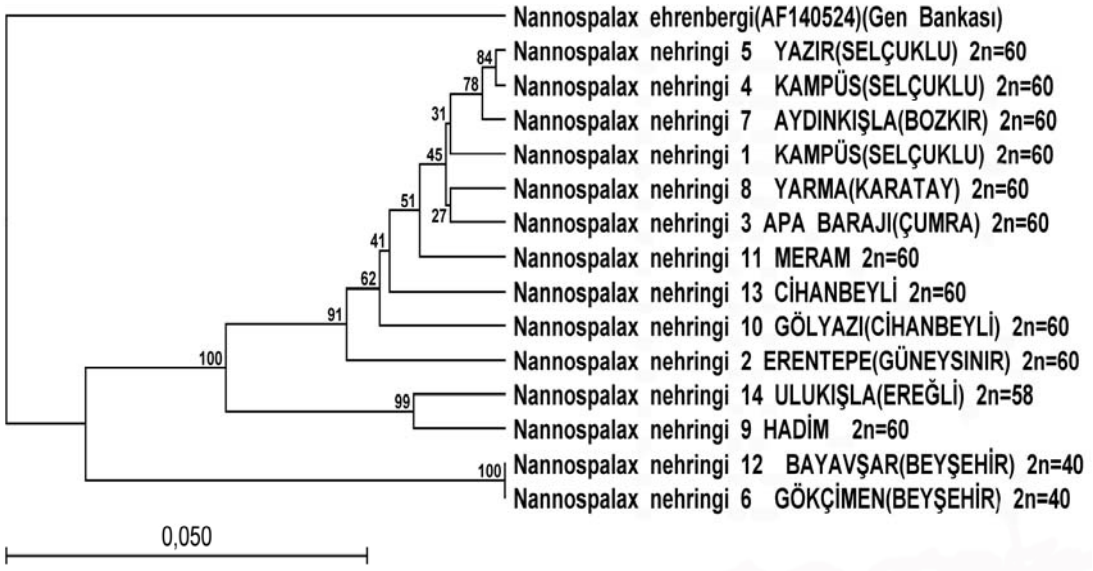
4.4. Filogenetik Analiz Sonuçları

Dizi analizinden elde edilen verilere göre CLC Main Workbench versiyon 5.1 programı ile filogenetik analizler yapılmıştır. Buna göre iki dendogram elde edilmiştir. Bunlardan biri 2008 yılında PUBMED NCBI veri tabanındaki Gen Bankasında primerlerin tasarlandığı AF140524 (Nevo ve ark. 1999) erişim nolu *Nannospalax ehrenbergi'*nin sitokrom b geni dizisi ile bu çalışmada kullanılan 14 örneğin kıyaslanması sonucu elde edilen dendrogramdır (Şekil 4.9). İkinci dendrogram ise gen bankasındaki *N. nehringi*'nin kromozomal formlarının sitokrom b geni ile (Sözen ve ark. 2009) bu çalışmadaki 14 örneğin dizilerinin kıyaslanması sonucunda elde edilmiştir (Şekil 4.10). Üsttürlerin CLC Main Workbench versiyon 5.1 programı ile genetik uzaklıklarının hesaplandığı matriks Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Şekil 4.9'daki dendrograma göre bu çalışmadaki üsttürden farklı olan *N. ehrenbergi* (Gen bankası) üsttürü normal olarak çalışılan üsttürlerin oluşturduğu gruplardan oldukça farklı bir yerde tesbit edilmiştir. Bunun dışında dendrogram 2 ana gruba ayrılarak birinci grupta 2n=58 ve 2n=60 kromozomlu örnekler yer alırken ikinci grupta 2n=40 kromozomlu 2 farklı lokaliteden elde edilen örnekler yer almıştır. İlk grup ise kendi içinde önemli bir ayırım göstermiştir. Çünkü 2n=58 ve 2n=60 kromozomları bünyesinde barındıran iki grup oluşturmuştur. Ancak Hadim'den elde edilen kromozom sayısı 2n=60 olan *N. nehringi* 9'un, Ereğli-Ulukışla lokalitesindeki *N. nehringi* 14 ile aynı grupta yer aldıkları ve %99 akraba oldukları gözlenmiştir. Bu sonucu destekler şekilde, Türkiye'deki farklı kromozom sayısına sahip tüm örneklerle yapılan dendrogramda (Şekil 4.10) 2n=56, 58 ve 2n=60 kromozomal formların bir kladda yer aldığı görülmüştür.

N. nehringi 3 ve *N. nehringi* 8 nolu örnekler yakın lokalitelerden toplandığı için bu benzerlik dendrograma da yansımıştır. Ancak Akan (2009) yaptığı Yüksek Lisans Tezinde aynı kromozom sayısına (2n=60) sahip olmalarına rağmen farklı NF değerine sahip olduğunu göstermiştir. Bunların genetik olarak oldukça benzer

olmaları sebebiyle NF=79 olan Çumra örneğinin (*N. nehringi* 3) perisentrik inversiyonla *N. nehringi* 8 örneğini meydana getirmiş olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.9. Sitokrom b geninin primer tasarısının yapıldığı Gen Bankasında mevcut olan (AJ389537 erişim nolu) *Nannospalax ehrenbergi* üsttürü ile çalışılan 14 örneğin CLC Main Workbench versiyon 5.1 programıyla elde edilen dendrogramı

Tablo 4.1. 14 *Nannospalax nehringi* üsttürünün genetik uzaklık matriksi

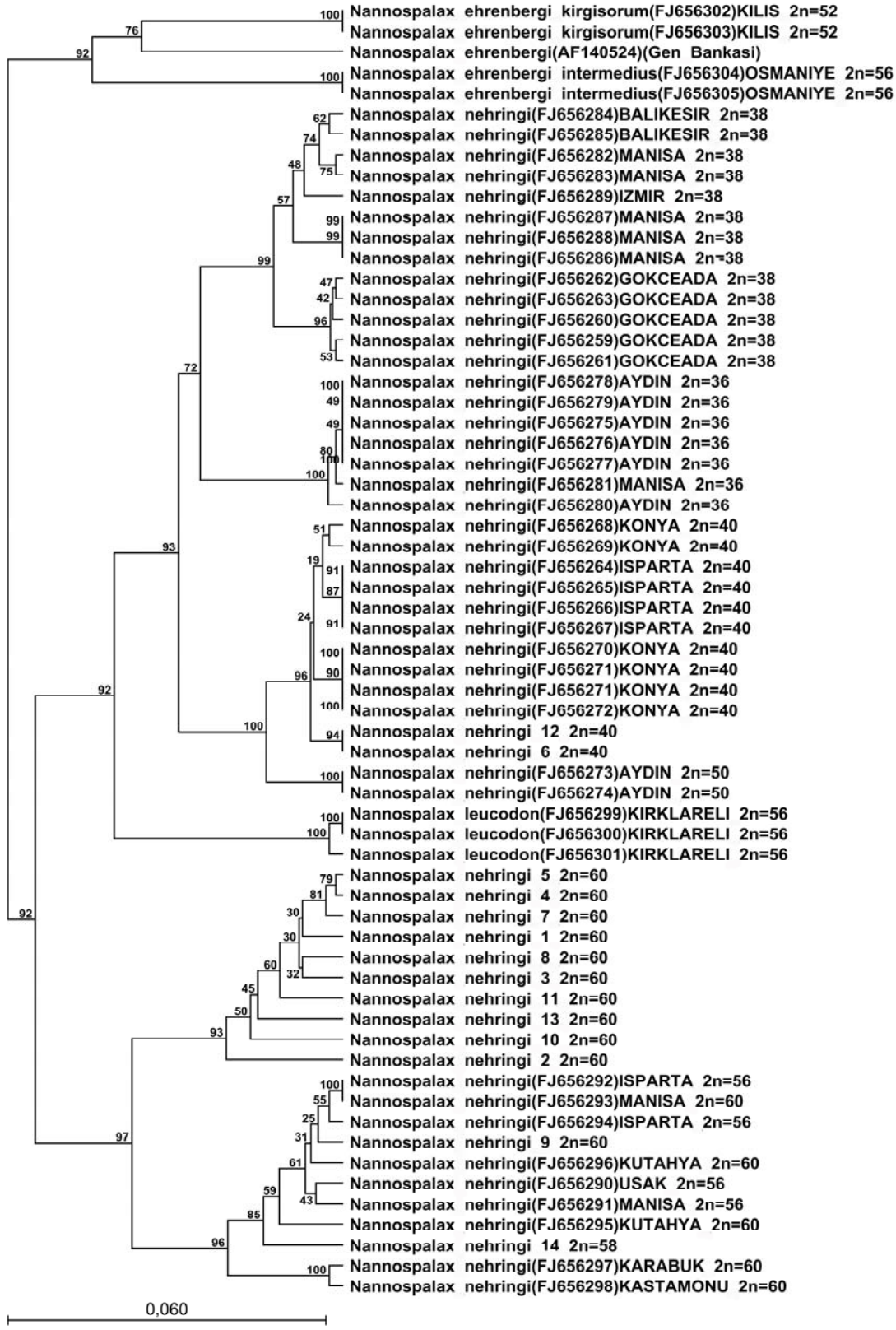
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
N. nehringi 4	1		0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03	0,04	0,07	0,09	0,11	0,11	0,14
N. nehringi 5	2	0,00		0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,07	0,09	0,11	0,11	0,13
N. nehringi 7	3	0,00	0,01		0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,06	0,08	0,12	0,12	0,14
N. nehringi 3	4	0,01	0,02	0,02		0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04	0,06	0,08	0,10	0,10	0,14
N. nehringi 8	5	0,01	0,02	0,02	0,02		0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,08	0,09	0,12	0,12	0,15
N. nehringi 1	6	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02		0,03	0,04	0,04	0,04	0,06	0,09	0,10	0,10	0,13
N. nehringi 11	7	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03		0,04	0,04	0,06	0,09	0,10	0,13	0,13	0,15
N. nehringi 13	8	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04		0,04	0,06	0,10	0,09	0,14	0,14	0,16
N. nehringi 10	9	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04		0,04	0,06	0,07	0,13	0,13	0,15
N. nehringi 2	10	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06	0,06	0,04		0,05	0,07	0,12	0,12	0,13
N. nehringi 9	11	0,07	0,07	0,06	0,06	0,08	0,06	0,09	0,10	0,06	0,05		0,03	0,10	0,10	0,12
N. nehringi 14	12	0,09	0,09	0,08	0,08	0,09	0,09	0,10	0,09	0,07	0,07	0,03		0,12	0,12	0,13
N. nehringi 6	13	0,11	0,11	0,12	0,10	0,12	0,10	0,13	0,14	0,13	0,12	0,10	0,12		0,00	0,13
N. nehringi 12	14	0,11	0,11	0,12	0,10	0,12	0,10	0,13	0,14	0,13	0,12	0,10	0,12	0,00		0,13
Gen Bankasi (AF140524)	15	0,14	0,13	0,14	0,14	0,15	0,13	0,15	0,16	0,15	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13	

Konya'nın Selçuklu İlçesi'nden elde edilen *N. nehringi* 4 (Kampüs) ve *N. nehringi* 5 (Yazır) örnekleri birbirine oldukça yakın bulunurken *N. nehringi* 7 nolu örnek de Bozkır'dan elde edilmesine rağmen bu gruba yakın yer almıştır. *N. nehringi* 1 (Kampüs)'de Selçuklu İlçesinden toplanmasına rağmen çok az bir farkla bu gruba uzak bulunmuştur. Bu küçük farklılıklara rağmen yinede bir grup içerisine toplanmışlardır. Bu durum lokalitelerin çok fazla coğrafik farklılığa sahip olmadığını göstermiştir. Akan (2009) bu örneklerin tamamının 2n=60 kromozomlu ve NF değerlerinin 79 olduğunu rapor etmiştir. Bu grubun dışında sırasıyla Meram, Cihanbeyli örnekleri ve Güney sınır örneği çok az farkla birbirinden ayrılmıştır. Ancak 2 Cihanbeyli örneği yine de aynı grup içinde yer almışlardır.

Bu dendrograma göre 2n=60 ve 2n=58 kromozomal formdaki bireylerin %100 oranında akraba oldukları ve tek atadan geldikleri belirlenmiştir. Ancak, 2n=40 kromozomlu iki bireyin ise bunlardan önemli bir farkla monofiletik bir grupta yer aldığı, kromozomal formu 2n=58 olan *N. nehringi* 14 ile kromozomal formu 2n=60 olan *N. nehringi* 9 nolu örneklerin ise kesinlikle birbirine %99 akraba olduğu ve 2n=60 kromozomal formdaki bireylerin atası ile ortak olduğu tesbit edilmiştir.

2009 yılında Türkiye'nin farklı lokalitelerinden elde edilen ve PUBMED NCBI veri bankasına girilen (Sözen ve ark. 2009 basılmamış makale) *N. nehringi* üsttürüne ait sitokrom b gen dizileri ile bu çalışmada kullanılan 14 örneğin sitokrom b geninin DNA dizileri kıyaslanarak genetik akrabalığı gösteren dendrogramda (Şekil 4.10) Türkiye'deki farklı lokalitelerden toplanan örneklerden aynı kromozom sayısına sahip olan örneklerin aynı gruplarda yer aldığı görülmüştür. Bu çalışmada yer alan *N. nehringi* 6 *ve N. nehringi* 12 nolu örnekler 2n=40 kromozomlu diğer Gen Bankasındaki Konya ve Isparta örnekleri ile aynı kümede %96 oranında akraba olarak yer almıştır. Kromozom sayısı 2n=60 olan Hadim örneği (*N. nehringi* 9) ve kromozom sayısı 2n= 58 olan Ereğli-Ulukışla örneği (*N. nehringi* 14) bu dendrogramda 2n=56 ve 2n=60 kromozomlu farklı coğrafik bölgelerden çalışılan örnekler arasında yer almış ve %85 oranında akraba oldukları gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan kromozom sayısı 2n=60 olan diğer 10 kör fare örneği %97 oranında akraba olan diğer 2n=60, 56 kromozomal formdaki örneklerle aynı atadan gelmiş olmalarına rağmen bunlardan farklı bir yerde kendi aralarında bir grup oluşturmuşlardır.

Şekil 4.10'daki dendrogramda *N. ehrenbergi*'nin Kilis ve Osmaniye örneklerinin *N. nehringi* ve *N. leucodon*'dan oldukça uzak bir kaldda yer aldığı görülürken *N. leucodon* (2n=56) üsttürünün kromozomal formu 2n=36, 38, 40 ve 50 olan *N. nehringi* üsttürleri ile %92 oranında oldukça yakın akraba olduğu dikkat çekmiştir. Bu bağlamda *N. nehringi* ile *N. leucodon*'un aynı atadan geldikleri savunulabilirken *N. ehrenbergi*'nin atasının bunlardan farklı olduğu söylenebilir.



Şekil 4.10. CLC Main Workbench versiyon 5.1 ile NCBI Gen bankası ve çalışılan örneklerin birlikte dendrogramı

Nevo ve ark. (1993), İsrail'de farklı kromozomal formlara sahip (2n=52, 54, 58, 60) *N. ehrenbergi* üsttürlerinin mtDNA polimorfizmlerini incelemişlerdir. Filogenetik analiz sonucunda iki büyük grup oluştuğunu ve bu gruplardan birinin 2n=52 ve 2n=54 kromozomlu örneklerin oluşturduğunu diğerinin ise 2n=58 ve 2n=60 kromozomlu örneklerin oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, kromozom sayısı 2n=60 olan Hadim örneği ile 2n=58 kromozomlu Ereğli-Ulukışla örneğinin aynı grupta yer alması bakımından önceki çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Sitokrom b geninin polimorfizmi 14 farklı lokaliteden elde edilen 14 birey arasında (2n=40, 58, 60) %18 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte 2n=60 kromozomlu olan populasyonlar arasında dizi varyasyonu %11,94, 2n=40 kromozomlu iki birey arasında %0 ve 2n=58 kromozomlu tek örneğimizin diğer kromozomal formlarla dizi varyasyonu %8.45 olarak tesbit edilmiştir. Suzuki ve ark.'nın (1996) Türkiye'nin sekiz farklı lokalitesinden topladıkları *N. nehringi* ve *N. ehrenbergi* üsttürlerinin farklı kromozomal formlara sahip olan bireyleri arasındaki mtDNA'nın dizi çeşitliğini belirlemişlerdir. Bunun sonucunda bu çalışma ile uyumlu olarak *N. ehrenbergi*'nin bireyleri arasındaki varyasyonun %10 ve daha yukarı, *N. nehringi* üsttürünün bireyleri arasındaki varyasyonu %12 olarak belirlerken, buna karşılık üsttürler arasındaki dizi varyasyonunu %7.4-12 arasında değişen oranlarda bulmuşlardır.

İsrail'de *Spalax ehrenbergi* üsttürünün farklı kromozomal formlara sahip olan dört türüne ait mitokondrial kontrol bölgelerinin dizilerindeki varyasyonlar incelendiğinde 2n=54 ile 2n=52 kromozomal forma sahip olan bireyler ayrı ayrı monofiletik bir grup içinde yer almışlardır. Ancak, 2n=58 ve 2n=60 kromozomal forma sahip bireyler açık olarak birbirinden ayrılmamış fakat diğer iki kromozomal formdan açık bir şekilde (%100) ayrılmıştır. Farklı kromozomal forma sahip dört tür içindeki populasyonlar arasındaki varyasyon %15.13 olarak belirlenirken aynı populasyona ait bireyler monofiletik bir grupta yer almamışlar ve varyasyon %57.83 olarak tesbit edilmiştir. Reyes ve ark. (2003) 2n=58 ve 2n=60 kromozomlu örnekler arasındaki bu genetik farklılığın fazla olmasını İsrail'in güneyinde yayılış gösteren bu bireylerin sıcak iklimde yaşamasına bağlamışlardır. Kör farelerin farklı

üsttürlerindeki mutasyonel örneklerdeki bu farklılıklara rağmen mitokondrial kontrol bölgesinin analiziyle bireyler, populasyonlar ve türler arasında filogenetik ilişkilerin kurulması için uygun olduğunu kanıtlamışlardır. Bu gen bölgesindeki gözlenen nükleotid çeşitliliğinin sitokrom b varyasyonlarının tahmini (Nevo ve ark. 1999), nüklear allozim çeşitlilik ölçümleri (Nevo ve ark. 1994b) ve RAPD çalışmalarıyla (Ben-Shloma, 1996) anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada ise 2n=40 kromozomlu bireyler 2n=58 ve 60 kromozomlu bireyler birbirine oldukça uzak gruplarda yer almışlardır. Reyes ve ark.'nın (2003) sonuçlarını destekler şekilde 2n=40 kromozomlu bireylerin monofiletik bir grupta yer aldığını diğer kromozomal formların ise ayrı ayrı monofiletik bir grupta yer almadığını yani her iki kromozomal formun birlikte monofiletik bir grupta bulunduklarını söyleyebiliriz. Kankılıç ve ark. (2005) Ankara ve Beyşehir arasındaki bölgeden elde ettikleri *N. nehringi*'deki allozim varyasyonları sonucunda Nevo ve ark.'nın (1994a, 1995) aksine kuzey ve güney bölgelerdeki bu populasyonlarda heterojenitenin artmadığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda Kankılıç ve ark. (2005) çalıştıkları üç populasyon (2n=40, 60, 62) arasında coğrafi bir bariyerin olmadığını aynı iklime sahip Ankara, Beyşehir ve Konya bölgelerindeki bu populasyonların genetik analizleri orta derecede genetik farklılığı yansıtmıştır. Bu çalışmadaki sitokrom b geninin dizi analizi sonuçları bunu tamamen desteklemektedir.

Akan (2009) kör fareler üzerine yaptığı sitogenetik çalışmada 2n=40 kromozomlu formun heterekromatin özelliği bakımından ve NOR lokalizasyonu açısından hem 2n=58 hem de 2n=60 kromozomal formdan oldukça farklı olduğunu belirtmiştir. 2n=40 kromozomlu formda ilginç olarak NOR'ların, tamamı heterokromatin olan kısa kollarda lokalize olmasıyla diğer iki kromozomal formdan ayrılmaktadır. 2n=58 ve 2n=60 kromozomal formlarda C-bantlarının sentromerik oluşu nedeniyle birbirine benzerlik gösterirken sentromerik C-bantlı kromozom sayısı bakımından farklılık olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmadaki sitokrom b dizi varyasyonları sonucu elde edilen dendrogramda 2n=40 kromozomlu bireyler diğer kromozomal formlara ait bireylerden oldukça uzak başka bir kladda yer almıştır. Her ne kadar 2n=58 kromozomlu birey 2n=60 kromozomal forma ait bireylerle birlikte bir büyük kladda yer alsa bile bunlarda kendi içinde iki farklı grup oluşturmuşlardır.

Bu sonuçlar hem Akan (2009)'nın bulgularını hemde daha önceki bazı çalışmaları (Suzuki ve ark. 1996, Ivanitskaya ve ark. 2008) desteklemektedir ve formların üsttür seviyesinde farklılaştığını ispatlamaktadır.

mtDNA'nın filogeninin yapılandırılması için faydalı olması mitokondrial genlerin rekombinasyonuna uğramayan tek bir bağlantı birimi olarak katıldığı gerçeğine dayandırılmaktadır. Mitokondrial gen ağaçları, nüklear genlere göre tür sayılarının takibinde daha iyi bir imkana sahiptir (Moore, 1995). Bu anlamda mitokondrial genlerin memeli filogenilerinin çözümlenmesinde daha etkili olduğunu (Arnason ve ark. 1999), bazı araştırıcılar tam tersine ise dizi uzunlukları kıyaslanırsa nüklear genlerin mitokondrial genlerden daha güçlü çözümlenmeye sahip olduğunu savunmaktadırlar (Springer ve ark. 2001). Ancak, Reyes ve ark. (2004) hem kör fareler hem de diğer rodentler üzerine yaptıkları çalışmalarında mitokondrial ve nüklear genlerin plesentalı memeliler arasındaki familya seviyesinde ve ordo seviyesinde akrabalığın oluşturulması için eşit şekilde güvenilir olduğunu savunmuşlardır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kör farelerinde SSCP analizi çalışmalarına rastlanmamıştır. Ancak bazı omurgalılarda SSCP yöntemiyle tek gen polimorfizmleri çalışılmış ve meydana gelen farklı SSCP profillerinin dizi analizine gönderilecek örneklerin seçiminde faydalı olduğu gösterilmiştir (Chmurzynska 2003, Rakus ve ark. 2008, He ve ark. 2008, Zhou ve Hickford 2008). Bu çalışmamızda ise 6 ile 12 nolu bireyler hariç bütün örneklerin SSCP profillerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Bu farklı profiller dizi analizi sonuçlarını desteklemiştir. Dizi analizi sonuçlarına göre sadece 6 ve 12 nolu örneklerimiz %100 birbirine benzer çıkmıştır. Bu çalışma daha önce yapılmış çalışmalarda da belirtildiği gibi dizi analizi için örnek seçiminde SSCP metodunun kullanılabileceği görüşünü desteklemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

mtDNA araştırmaları, mtDNA'nın pek çok tür içindeki populasyon yapısının klasik populasyon genetiği teorisiyle tahmin edildiği gibi gen akışı ve genetik kayma gibi evrimsel faktörlerden uzak, kararlı bir denge içinde olduğu belirtilmiştir. Aksine coğrafik yapı, tarihsel olaylar ve demografik süreçler tarafından kuvvetli bir şekilde etkilenmektedir. mtDNA soylarının sert bir coğrafi paylaşımı hayvan türleri üzerine düşük ve orta derecede dağılma yeteneğine sahiptir (Avise 1994).

Mitokondrial bir gen olan sitokrom b geninin korunmuş gen bölgeleri arasında olduğu bilinmektedir. Kör farelerde sitokrom b gen dizisi analizi ile tüm farklı kromozomal formlar arasındaki varyasyon %18.6 olarak bulunurken, 2n=60 kromozomlu formlar arasında %11.94, 2n=40 kromozomlu formlar arasında ise %0 varyasyon görülmüştür. Aynı iklim şartlarına sahip olan lokalitelerden toplandığı için ve çok fazla bir coğrafik farklılık olmadığı için sitokrom b geni varyasyonları, örneklerin toplanan daha çok lokalitelere göre değil kromozomal formlara göre gruplar oluşturduğu görülmüştür. Yinede 2n=60 kromozomlu bireylerdeki %11.94'lik varyasyonu Konya'nın farklı bölgelerinden toplanmasına bağlayabiliriz. Yaşadığı habitat yapısı, yükseklik, klimatik faktörler gibi coğrafik ve ekolojik faktörlerden oldukça fazla etkilenen bu hareket yeteneği sınırlı *Nannospalax* cinsine ait bireylerin türleşmesi üzerinde Anadolu'nun topografik yapısının da etkili olduğu bildirilmiştir (Gülkaç ve Yüksel 1999).

Daha önce gerek sitogenetik gerekse moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda vurgulandığı gibi bu çalışmanın sonuçlarına göre her bir kromozomal formun özellikle 2n=40'ın biyolojik türler olarak değerlendirmeye alınması gerektiği kanaatindeyiz. Konya Bölgesindeki kör farelerde görülen bu türleşme peripatrik türleşmedir. Peripatrik türleşme, periferdeki populasyonlarının farklılaşması ve sonrasında bu populasyon arasındaki üreme izolasyonunun gerçekleşmesi ile oluşur.

Bu önerimiz mtDNA analizlerine ilaveten nuklear DNA'ya dayalı farklı moleküler markırlar kullanılarak (AFLP gibi) ve morfometrik geometri çalışmaları

yapılarak filogenetik ağaçların aynı tür ağaçları oluşturup oluşturmadığı test edilebilir. Bu da kromozomal formların tür seviyesinde farklılaştığının ispatı için faydalı olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca elde ettiğimiz bu 14 örneğin sitokrom b gen dizisi daha önce çalışılan *N. nehringi* üsttürlerinden farklı baz pozisyonları içerdiği için NCBI PUBMED Gen Bankasına sunulacaktır.

6. KAYNAKLAR

Adkins, R. M., Honeycutt, R. L. 1994. Evolution of the primate cytochrome c oxidase subunit II gene. J. Mol. Evol. 38: 215–231.

Adkins, R. M., Honeycutt, R.L., Disotell, T. R. 1996. Evolution of eutherian cytochrome c oxidase subunit II:heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. Mol. Biol. Evol. 13: 1393–1404.

Akan, Ş. 2009. Konya Bölgesindeki Nannospalax (Mammalia: Rodentia) Kromozomal formlarının (2n=40, 58, 60) heterokromatin dağılımı ve Nükleolar Organizatör Bölgeleri (NORs). Yüksek Lisans Tezi, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 74s.

Akçın A.F. 2006. *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Mammalia:Rodentia)'un Bazı kromozomal formlarında (2n=50D, 50K, 52K, 54K, 56K, 58K, 60İç Anadolu ve 60K) molar çiğneme yüzeyi varyasyonlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Z.K.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, 109s.

Allard, M. W., Honeycutt, R. L.. 1991. Ribosomal DNA variation within and between species of rodents, with emphasis on the genus *Onychomys*. Mol. Biol. Evol. 8: 71-84.

Andrews, T. D., Jermiin, L.S., Easteal, S. 1998. Accelerated evolution of cytocrome b in simian primates: Adaptive evolution in concert with other mitochondrial proteins?. J. Mol. Evol. 47: 249-257.

Arnason, U., Gulberg, A., Janke, A. 1999. The mitochondrial DNA molecule of the aardvark, *Orycteropus afer*, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 266:339-345.

Arnheim, N., Krystal, M., Schmickjzl, R., Wilson, G., Ryder, 0., Zımmer E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7323-7327.

Aşan, N., Yağcı, T. 2008. Karyotype and hair scale structure of *Nannospalax leucodon* (Nordmann, 1840) from Central Anatolia (Rodentia:Spalacidae). Tr. J. Zool. 32: 125-130.

Avise, J.C., Shaphira, J.F., Daniel, S.W., Aquadro, C.F., Lansman, R.A. 1983. Mitochondrial DNA differentiation during the speciation process in *Peromyscus*. Mol. Biol. Evol. 1: 38–56.

Avise J.C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. Annual Reviews on Genetics 25: 45–69.

Avise J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution.Chapman&Hall. London.

Başıbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R. Quicke, D.L.J. 2000. Phylogenetic systematics A practical guide to the theory and practice. Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

Benda, P., Horacek, I. 1998. Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean. Part. I. Rewiew: Distribution and taxonmy of bats in Turkey. Acta. Soc. Zool. Bohem. 62: 255-313.

Ben-Shlomo, R., Fahima, T., Nevo, E. 1996. Random amplifield polymorfic DNA of the *Spalax ehrenbergi* superspecies in İsrail. Isr. J. Zool. 42:317-326.

Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C. 1979. Rapid evolotuion of animal mitochondrial DNA. Proceeding of National Academy of Sciences, USA 76: 1967-1971.

Catzeflis, F., Hanni, C., Sourrouille, P., Douzery, E. 1995. Molecular systematics of hystricognath rodents: The contribution of sciurognath mitochondrial 12S rRNA sequences. Mol. Phylogenetic Evol. 4: 357–360

Carleton, M.D., Musser, G.G. 1984. Order and Families of Recent Mammals of the World, (eds. Andeson, S. & Jones, J.K.J.,) Muroid rodents, Wiley & Sons, New York, pp. 289-380.

Chmurzynska, A., Zajac, M., Switonski, M. 2003. Molecular evolution of the leptin exon 3 in some species of the family *Canidae*. Genet. Sel. Evol. 35: 573-580.

Corbet G. B., 1978. Mammals of the Palearctic Region: A Taxonomic Review, British Mus. Nat. History, London, pp. 1-314

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

Coşkun Y. 1996a. A new subspecies of the *Spalax nehringi* (Satunin, 1898) (Rodentia: Spalacidae) from Turkey. Säugetierkdl. Mitt. 37: 103-109.

Coşkun Y. 1996b. *Spalax nehringi nevoi*, a new mole rat from southeast Anatolia, Turkey (Rodentia: Spalacidae), Säugetierkdl. Mitt. 38: 135-142.

Coşkun Y. 2003. A study on the morphology and karyology of *NannoSpalax nehringi* (Satunin, 1898) (Rodentia: Spalacidae) from Northeast Anatolia, Turkey, Turk. J. Zool. 27: 171-176.

Coşkun Y. 2004. Morphological and karyological characteristic of *Nannospalax ehrenbergi* (Nehring, 1898) (Rodentia: Spalacidae) from Hatay Province, Turkey. Turk. J. Zool. 28: 205-212.

Çataklı K. 2004. Çankırı ili *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Mammalia: Rodentia)'larının karyolojik ve morfolojik analizi, Yüksek Lisans Tezi, Z.K.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Zonguldak, 100s.

Çilingir O. 2001. Hemofili b hastalarında Faktör IX genindeki mutasyonların dizi analizi yöntemi ile saptanması. Doktora tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 33, 34s.

Deligezer, U., Akışık, E.E., Dalay, N. 2004. Gen polimorfizm analizinde lightcycler floresan PCR tekniğinin kullanılması: Myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalarda MTHFR C677T Gen Polimorfizm Dağılımının Belirlenmesi. Türk Onkoloji Dergisi, 19: 4.

Ellerman J.R. 1940. The Families and Genera of Living Rodents, British Mus. Nat. Hist., London. 1:651.

Ellerman, J.R., Morrison Scott, T.S.C. 1966. Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758-1946, British Mus. Nat. Hist., London. 49:169.

Esposti, D.M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli A., Patarnello, T., Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. Biochim Biophys Acta 1143: 243–271.

Farias, I.Z., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. 2001. The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationship among Cichlid Fishes. J. Mol. Evol. 53: 89-103.

Ferris, S. D., R. D. Sage, C. M. Huang, J. T. Nielsen, U. Ritte, ve A. C. Wilson. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2290-2294.

Frye, M. S., Hedges, S. B. 1995. Monophyly of the order Rodentia inferred from mitochondrial DNA sequences of the genes for 12S RNA, 16S RNA, and tRNA-Valine. *Mol. Biol. Evol.* 12: 168–176.

Fujita, K., Silver, J. 2008. Single strand conformational polymorphisim. Harbor Laboratory Press. 4: 137-140.

Giagia, E., Savic, I., Soldotovic, B. 1982. Chromosomal forms of the mole rat Micro*Spalax* from Greece and Turkey, Sond. Z. Säugetierkunde, 47: 231-236.

Graur, D., Hide, W. A., Li, W.-H. 1991. Is the guinea-pig a rodent? Nature 351: 649–652.

Graur, D., Hide, W. A., Zarkikh, A., Li, W.-H. 1992. The biochemical phylogeny of guinea pigs and gundis and the paraphyly of the order Rodentia. Comp. Biochem. Physiol. 101B: 495-498.

Gülkaç, M. D., Yüksel, E. 1989. Malatya yöresi kör fareleri (Rodentia: Spalacidae) üzerine sitogenetik bir inceleme, Doğa Tu. Biyol. D., 13: 63-71.

Gülkaç, M.D., Yüksel, E. 1999. Türkiye'deki *Spalax* tür ve alttürlerinin dağılımına ve türleşmesine coğrafik izolasyonun etkisi. Tr. J. Zool., 23(2): 491-496.

Hanni, C., Laudet, V., Barriel, V., Catzeflis, F. M. 1995. Evolutionary relationships of *Acomys* and other murids (Rodentia, Mammalia) based on complete 12S rRNA mitochondrial gene sequences. Israel J. Zool. 41**:** 131–146.

Harrison D.L. 1972. The Mammals of Arabia. Lagomorpha Rodentia. London, 3: 382-670.

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

Hasegawa, M., Cao, Y., Adachi, J., Yano, T. 1992. Rodent polyphyly Nature 355: 595.

Hayashi K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. Gata 9:73-79.

He, F., Wen, H.S., Dong, S.L, Wang, L.S., Chen, C.F., Shi, B., Mu, X.J., Yao, J., Zhou, Y.G. 2008. Identification of estrogen receptor α gene polymorphisms by SSCP and its effect on reproductive traits in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Elsevier Inc. 150: 278-283

Hillis, D.M., Moritz, C. 1990a. Molecular systematics, Sinauer Assoc. Inc., Sunderland.

Hillis, D.M., Larson, A., Scott, K.D., Zimmer, E.A. 1990b. Nucleic acids III: Sequencing. Molecular Systematics. Chp:9, 339-340.

Hoelzel A.R. 1992. Molecular genetic analysis of populations, IRL pres, Oxford.

Hosoda, T., H. Suzuki, T. Yamada, K. Tsuchiya. 1993. Restriction site polymorphism in the ribosomal DNA of eight species of Canidae and Mustelidae. Cytologia 58: 223-230.

Irwin, D. M., Kocher, T.D., Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. J. Mol. Evol. 32: 128–144.

Ivanıtskaya, E., Sözen, M., Rashkavetsky, L., Matur, F. 2008. Discrimination of 2n=60 *Spalax leucodon* cytotypes (Spalacidae, Rodentia) in Turkey by means of classical and molecular cytogenetic tecniques. Cytogenet. Genome. Res. 122: 149-149.

Jaarola, M., Tegelstrom, H. 1996. Mitochondrial DNA variation in the field vole (*Microtus agrestis*): Regional population structure and colonization history. Evolution 5: 2073- 2085.

Janke, A., Feldmaier-Fuchs, G., Thomas, W. K., von Haessler A, Pa¨a¨bo A . 1994. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. Genetics 137: 243–256.

Jermiin, L. S., Graur, D., Lowe, R. M., Crozier, R. H. 1994. Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. J. Mol. Evol. 39: 160–173

Jordana, A., Kalaydjieva, L., Savov, A., Clausters, M., Estivill X. 1997. SSCP Anaysis: A blind sensitivitiy trial. Human Mutation 10: 65-70.

Kankılıç, T., Çolak, E., Çolak, R., Yiğit, N. 2005. Allozyme variation in *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Rodentia: Spalacidae) in the area between Ankara and Beyşehir, Turkey. Turk. J. Zool 29: 377-384.

Kışlalıoğlu, M., Berkes, F. 1987. Biyolojik Çeşitlilik, T. Ç. S. V. Yayını, 122s.

Kıvanç E. 1988. Türkiye *Spalax*'larının Coğrafik varyasyonları, Ankara 72, Teksir-Daktilo-Fotokopi, 88s.

Kukita, Y., Tahira, T.,Sommer, S.S., Hayaski, K. 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH jel. Human Mutation 10: 400-407.

Kurtonur C. 1996. Türkiye Omurgalılar Tür Listesi. DTP-TBAG-Çev. Sek., 3:3-23.

Li, W. H., Hide, W. A., Zharkikh, A., Ma, D.-P., Graur, D. 1992a. The molecular taxonomy and evolution of the *Guinea Pig*. J. Hered. 83: 174–181.

Li, W. H., Hide, W. A., Graur, D. 1992b. Origin of rodents and guinea-pigs. Nature 359: 277–278.

Lovejoy, NR., de Arau´jo, MLG. 2000. Molecular systematics, biogeography,and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorrhaphis*. Mol. Ecol. 9(3): 259–268

Ma, D.-P., Zharkikh, A., Graur, D., Vandeberg, J. L., Li, W.-H. 1993. Structure and evolution of opossum, guinea pig, and porcupine cytochrome *b* genes. J. Mol. Evol. 36: 327–334.

Martignetti, J. A., Brosius, J. 1993. Neural BC1 RNA as an evolutionary marker: Guinea pig remains a rodent. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 90: 9698–9702.

Matur, F., Sözen, M. 2005. A karyological study on subterranean mole rats of the *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Mammalia: Rodentia) Superspecies in northwestern in Turkey. Zool. In The Middle East, 36: 5-10.

Mehely, V.L. 1909. A Foldi Kutyak Fajai, Budapest, (Mathem. Und naturwissenschaftliche Berichte aus UNgarn, Vol. 28, H. 4: 1-273.

Mergen H. 2008. Tek nükleotid polimorfzimleri (SNPs). Derleme. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/index_dosyalar/Page580.htm

Michaux, J., Reyes, A., Catzeflis, F. 2001. Evolutionary History of the Most Speciose Mammals: Molecular Phylogeny of Muroid Rodents. Mol. Biol. Evol. 18(11): 2017-2031.

Montgelard, C., Bentz, S., Tirard, C., Verneau, O., Catzeflis, F.M. 2002. Molecular systematics of sciurognathi (rodentia): the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes support the Anomaluroidea (Pedetidae and Anomaluridae). Mol. Phylogenet. Evol. 22(2): 220-233.

Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. Evolution 49: 718-726.

Mursaloğlu, B. 1979. Türkiye *Spalax*'larında (Mammalia: Rodentia) Sistematik Problemler, TÜBİTAK VI. Bilim Kongresi, Mat., Fiz. ve Biyo. Bil. Biyo. Sek., s. 83-92.

Musser, G.G., M.D. Carleton. 1993. Family Muridae. (eds. In: D.E. Wilson & D.M. Reeder.), Mammal species of the World. A taxonomic and geographic reference, 2nd ed. Smithsonian Institution Press, Washington. 501-755.

Nedbal, M. A., Allard, M. W., Honeycutt, R. L. 1994. Molecular systematics of hystricognath rodents: Evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. Mol. Phylogenet. Evol. 3: 206–220.

Nedbal, M. A., Honeycutt, R. L., Schlitter, D. A. 1996. Higher level systematics of rodents (Mammalia, Rodentia): Evidence from the mitochondrial 12S gene. J. Mammal. Evol. 3: 201–237.

Nehring A. 1898. Über mehrere neue *Spalax* Arten. Sitzb. der Gesellsch. Natur Freundez., Berlin, 171-183.

Nevo E. 1991. Evolutionary theory and processes of active speciation and adaptive radiation in subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel. Evol. Biol. 25: l-25.

Nevo, E., Beiles, A. 1992. mtDNA polymorphisms: evolutionary significance in adaptation and speciation of subterranean mole rats. Biol. J. Linn. Sot. 47: 385-405.

Nevo, E., Honeycutt, R. L., Yonekawa, H., Nelson, K., Hanzawa, N. 1993. Mitochondrial DNA polymorphisms in subterranean mole-rats of the *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel and its peripheral isolates. Mol. Biol. Evol. 10: 590-604.

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

Nevo, E., Filippucci, M.G., Beiles, A. 1994b. Genetic polymorphisms in subterranean mammals (*Spalax ehrenbergi* superspesies) in the Near East revisited: patterns and theory. Heredity 72: 465-487.

Nevo, E., Beiles, A., Spradling. 1999. Molecular evolution of cytochrome b of subterranean mole rats, Spalax ekrenbergi superspesies, in İsrael. J. Mol. Evol. 49: 215-226.

Nevo, E., Filippuci, M.G., Redi, C., Simson, S., Heth, G., Beiles, A. 1995. Karyotype and genetic evolution in speciation of subterranean mole rats of the genus *Spalax* in Turkey. Biological Journal of the Linnean Society, 54: 203-229.

Nevo, E. Ivanistkaya, E., Flippucci, M. E., Beiles, A. 2000. Speciation of subterranean mole rats *Spalax ehrenbergi*, in Jordan. Biological Journal of the Linnean Society, 69: 268-281.

Nevo, E., Ivanitskaya E., Beiles, A. 2001. 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. judei* (2n=60), Bachkhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Nollau, P., Wagener, C. 1997. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment, Clin. Chem. 43**:** 1114–1128.

Norris, W.R., Zhou, K., Zhou, C., Yang, G., Kilpatrick, C.W., Honeycutt, R.L. 2003. The Phylogenetic position of the Zokors (Myospalacinae) and comments on the families of Muroids (Rodentia). Mol. Phylogen. Evol. 31: 972-978.

Nowak. M.R., Paradiso, L.J. 1983. Walker's Mammals of the World. Vol. V. Rodents. Moskova. 662 p.

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

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5: 874–879.

Öner C. 2003. Genetik Kavramlar. Palme yayıncılık, Ankara, Türkiye. 522s.

Philippe, H., Douzery, E. 1994. The pitfalls of molecular phylogeny based on four species as illustrated by the Cetacea/Artiodactyla relationships. J. Mammal. Evol. 2: 133–152.

Porter, C. A., Goodman, M., Stanhope, M. J. 1996. Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von Willebrand factor gene. Mol. Phylogenet. Evol. 5: 89–101.

Rakus, K.L., Wiegertjes, G.F., Adamek, M.,Bekh, V., Adamek, M., Behk, V., Stet, R.J.M., Irnazarow, I. 2008. Application of PCR-RF-SSCP to study major histocompatibility class II B Polymorphism in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Elsewier, Fish& Shellfish Imn. 24: 734-744.

Ramharack, R., Deeley, R.G. 1987 Structure and evolution of primate cytochrome c oxidase subunit II gene. J. Biol. Chem. 262:14014–14021.

Reyes, A., Nevo, E., Saccone, C. 2003. DNA Sequence variation in the mitochondrial control region subteranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* Superspecies, in Israel. Mol. Biol. Evol. 20(4): 622-632.

Reyes, A., Gissi, C., Catzeflis, F., Nevo, E., Pesole, G., Sacconell, C. 2004. Congruent mammalian trees from mitochondrial and nuclear genes using bayesian methods. Mol. Biol. Evol. 21(2): 397-403.

Robinson, M., Catzeflis F., Briolay, J. Mouchiroud D. 1997. Molecular Phylogeny of Rodents, with Special Emphasis on Murids: Evidence from Nuclear Gene LCAT. Mol. Phylogen. Evol. 8: 423-434.

Robinson-Rechavi, M., Ponger, L., Mouchiroud, D. 2000. Nuclear gene LCAT supports rodent monophyly. Mol. Biol. Evol. 17(9): 1410-1412.

Rocha-Olivares, A., Rosenblatt, RH., Vetter, RD. 1999. Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (*Sebastes,* Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome*b* and control region sequences. Mol. Phylogen. Evol. 11(3): 441–458.

Savic I., Soldotovic, B. 1979. Distribution range and evolution of chromosomal forms in the Spalacidae of the Balkan Peninsula and bordering regions, J. Biogeography 6: 363-374.

Savic I. 1982. Familie *Spalacidae* Gray, 1821- Blindmause. In; Handbuch der Saugetiere Europas, Band 2/1 Rodentia. Akademishe Verlagsgesellschaft, Wiesbaden. Pp. 537-584.

Savic, I., Nevo, E. 1990. Evolution of subterranean Mammals at the organismal and molecular levels, (eds. E. nevo and A. O. Reig,) The Spalacidae; Evolutionary history, speciation and population Biology, Alan R. Liss, New York, pp. 129-153.

Sevindik M. 2004. Kastamonu ili *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Mammalia: Rodentia)'larının karyolojik ve morfolojik analizi, Yüksek lisanas tezi, Z. K. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Zonguldak, 144s.

Soldatovic B., I. Savic, 1978. Karyotypes in some populations of the genus *Spalax (MesoSpalax)* in Bulgaria and Turkey. Sonderdruck aus Säugetierk. Mitt., Vol. 26(4): 252-256.

Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., Stone, E.M., 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 16: 325–332.

Sözen, M., Kıvanç, E. 1998a. Two new karyotypic forms of *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 (Mammalia: Rodentia) from Turkey. Z. Säugetierkunde, 63: 307-310

Sözen, M., Kıvanç, E. 1998b. A new karyotype of *Spalax leucodon cilicicus* Mehely, 1909 (Mammalia: Rodentia) from type locality in Turkey. Isr. J. Zool, 44: 53-56.

Sözen, M., Çolak, E., Yiğit, N., Özkurt, Ş. ve Verimli, R. 1999. Contributions to the karyology and taxonomy of the genus *Spalax* Güldenstant, 1770 (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Z. Säugetierkunde, 64: 210-219.

Sözen, M., Çolak, E. ve Yiğit, N. 2000a. Contributions to the karyology and taxonomy of *Spalax leucodon nehringi* Satunin, 1898 and *Spalax leucodon armenicus* Mehely, 1909 (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Z. Säugetierkunde, 65: 309-312.

Sözen, M., Çolak, E., Yiğit, N. 2000b. A study on karyotypic evolution of the genus *Spalax* Güldenstatead, 1770 (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Isr. J. Zool. 46: 239-242.

Sözen, M. 2004. A karyological study on subterranean mole rats of the *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 superspecies in Turkey, Z. Säugetierkunde, 69: 420-429.

Sözen, M., Matur, F. 2005. Karabük, Bolu ve Ankara *Spalax* Guldenstaedt, 1770 (Mammalia: Rodentia) populasyonlarının karyolojik ve morfolojik özellikleri. TÜBİTAK- TBAG 2073 nihai raporu. 115s.

Sözen, M., Sevindik, M., Matur, F. 2006. Karyological and some morphological characteristic of *Spalax leucodon* Normdan, 1840 (Mammalia: Rodentia) Superspecies around Kastamonu province Turkey. T. J. Zool. 30: 205-219.

Sozen, M., Kandemir, I., Colak, E. 2009. DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b of blind mole rats, *Nannospalax* superspecies, cytotypes in Turkey. Unpublished

Springer, M.S., DeBery, R.W., Douady, C., Amrine, H.M., Madsen, O., deJong, W.W., Stanhope, M.J. 2001. Mitocondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mamalian phylogeny reconstruction. Mol. Biol. Evol. 18: 132-143.

Suzuki, H., Miyashita, N., Moriwaki, K., Kominami, R., Muramatsut, M., Kanehisa, E., Bonhommem, Petras, L., Z.-C. Yu, ve D.-Y. Lu. 1986. Evolutionary implication of

heterogeneity of the nontranscribed spacer region of ribosomal DNA repeating units in various subspecies of *Mus musculus.* Mol. Biol. Evol. 3: 126-137.

Suzuki, H., Moriwaki, K., Nevo, E. 1987. Ribosomal DNA (rDNA) spacer polymorphism in mole rats. Mol. Biol. Evol. 4: 602-607.

Suzuki, H ., Tsuchiyam K., Sakaızumıs, M., Wakana, S., Gotoh, 0., Saitou, N., Moriwaki, K., Sakurai, S. 1990. Differentiation of restriction sites in ribosomal DNA in the genus *Apodemus.* Biochem. Genet. 28: 137-149.

Suzuki, H., Tsuchiyam, K., Sakaızumis, M., Wakana, S., Sakurai, S. 1994. Evolution of restriction sites of ribosomal DNA in natural populations of the field mouse, *Apodemus speciosus.* J. Mol. Evol. 38: 107-l 12.

Suzuki, H., Wakana, S., Yonekawa, H., Moriwaki, K., Sakurai, S., Nevo, E. 1996. Variations in ribosomal DNA and mitochondrial DNA among chromosomal species of subterranean mole rats. Mol. Biol. Evol. 13(1): 85-92.

Suzuki, H., Isawa, M., Harada, M., Wakana, S., Sakaizumi, M., Han, S.H., Kitahara, E., Kimura, V., Kartavsteva, I., Tsuchiya, K. 1999. Molecular phylogeny of red-backed voles in far-east Asia based on variation of ribosomal and mitochondrial DNA. Journal of Mammalogy 80: 512–521.

Thanou, E., Fraguedakis-Tsolis, S., Chondropoulos, B. 2005. mtDNA variation and evalution of phylogenetic relationship among karyotypically polimorphic populations of *Microtus (Terricola) thomasi* (Arvicoliadae, Rodentia) from Greece. Biological Journal of the Linnean Society, 84: 55–68.

Tez, C., Gündüz, İ., Kefelioğlu, H. 2001. karyological study of *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 in central Anatolia, Pakistan Journal of Biological Sciences 4: 869-871.

Tez, C., Gündüz, İ., Kefelioğlu, H. 2002. New data on the distributionof 2n=38 *Spalax leucodon* Nordmann, 1840 cytotype in Turkey. Isr. J. Zool. Vol. 48: 155-159.

Tsigenopoulos, C.S., Berrebi, P. 2000. Molecular phylogeny of NorthMediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: Cyprinidae) inferredfrom cytochrome *b* sequences: biogeographic and systematic implications. Mol. Phylogen. Evol. 14(2):165–179.

Topachevskii W.A. 1969. Fauna USSR Spalacidae, Leningrad; Nauka. (English translation; US Dept. Commerce. Natn. Info. Serv., Springfield, Virginia).

Ünay E. 1996. The Evolution of Westrn Eurasian Neogene Mammal Faunas, (eds. Bernor, R.L., Fahlbuch, V. & H.W.,) On fossil Spalacidae, Columbia Universty Pres, New York, pp. 246-252.

Wahrman, J., Goitein, R. Nevo, E. 1969. Mole rat, *Spalax*; Evolutionary significance of chromosome variation. Science 164: 82-84.

Wall, D. A., Davis, S. K., Read, B. M. 1992. Phylogenetic relationships in the subfamily Bovinae (Mammalia: Artiodactyla) based on ribosomal DNA. J. Mammal. 73: 262-275.

Wilson, G.N., Knollerl, M., Szura, L.L., Schmickel, R.D. 1984. Individual and evolutionary variation of primate ribosomal DNA transcription initiation regions. Mol. Biol. Evol. 1: 221-237.

Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuci, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M. 1985. Mitokondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Bio. J. Lin. Soc. 26: 375-400.

Wilson, D. E., Reeder, D. M. 1993. ‘‘Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference,’’ 2nd ed., Smithsonian Institution Press, Washington D.C., pp. 1-1207.

Wilson, D. E., Reeder, D. M. 2005. Mammal Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference, Second Ed. Smithion Institution Press Washington and London.

Wink, M., Heidrich P., Kahl, U., Swatschek, I. 1993. Inter and intraspecific variation of the nucleotide sequence of the cytochrome *b* Gene in Cory’s (Calonectris diomedea), Manx Shearwater (*Puffunus puffunus*) and the Fulmar (*Fulmurus glacialis*). Verlag der Zeitschrift Für Naturforschung, D-W-7400 Tübingen, 0939-5075/93/0500-0504.

Wolf, B., Reinecke, K., Aumann, K. D., Brigelius-Flohe`, R., Flohe`, L. 1993. Taxonomical classification of the guinea pig based on its Cu/Zn superoxide dismutase sequence. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 641–649.

Yonekawah, H., Morıwakı, K., Gotoh, O., Hayashı, J.I., Watanabe, J., Miyashita, N. Petras, M.L., Tagashıra Y. 1981. Evolutionary relationships among five subspecies

of *Mus musculus* based on restriction enzyme cleavage patterns of mitochondrial DNA. Genetics 98: 80 l-8 16.

Yonekawah, ., K. Moriwaki,0 . Gotoh,N . Miyashita, . Matsushima, L. Shi, X.-L. Zhen, Y. Tagashira. 1988. Hybrid origin of Japanese mice "*Mus musculus mo- Zossinus"* : evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 563-78.

Yüksel E. 1984. Cytogenetic study in *Spalax* (Rodentia: Spalacidae) from Turkey. Communications; Biologie, 2: 1-12.

Yüksel, E., Gülkaç, M.D. 2001. The cytogenetical comparison of *Spalax* (Rodentia: Spalacidae) populations from middle Kızılırmak basin, Turkey. Turk. J. Biol, 25: 17-24.

Zhou, H., Hickford, J.G.H. 2008. Allelic polymorphisim of the caprine calpastatin (*CAST*) gene identified by PCR-SSCP. Elsewier, Meat Sc. 79: 403-405.